

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び 国民受容に関する研究

分担課題 アレルゲンデータベースによるアレルゲン性評価に関する研究

研究分担者 安達 玲子 （国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長）
研究協力者 為広 紀正 （国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官）
研究協力者 酒井 信夫 （国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・室長）

研究要旨

本研究では、バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理に関する研究の一環として、アレルゲン性予測解析法の1つとして運用・公開しているアレルゲンデータベース(ADFS; Allergen Database for Food Safety)について、新たに発表されたアレルゲン情報及びエピトープ情報を追加し、データベースの更新を行った。その結果、3年間で、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報367、及び、25種のアレルゲンについて総数86のエピトープ情報を追加することができ、最終的に、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は2144となり、エピトープ既知のアレルゲ数は236となった。また、29年度にはそれまでのユーザー登録制を廃止し、ADFS利用に際しての利便性を向上させた。

A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在、様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物だけでなく、遺伝子組換え動物も開発が進んでいる。また最近では、遺伝子組換え植物同士を交配して得られるスタック品種も開発されている。これは、遺伝子を組み換えて付与された機能をスタックすることにより、生産性の向上等を図っているものであるが、このような品種について形質にどのような変化が現れるかについて研究されている例は少ない。これらのようなこれまで存在しなかった遺伝子組換え生物については、非意図的な影響等を考慮し、安全性評価の方法等について検討する必要がある。

多様化するバイオテクノロジー技術を用

いて開発される遺伝子組換え食品に関しては、そのリスクの1つとしてアレルゲン性増大の可能性が考えられる。本研究では、アレルゲン性解析法の1つとして開発した、アレルゲン性の予測機能を装備したアレルゲン・エピトープ情報データベース(ADFS; Allergen Database for Food Safety)に関して、その情報内容を更新し充実させることにより、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルゲン性評価系に関する研究を行う。

B. 研究方法

登録アレルゲン（アミノ酸配列情報）のアップデート

平成27年度から29年度の各年度ごとに、米国ネブラスカ大学リンカーン校が運営し

ているアレルゲンデータベース (AllergenOnline) における登録アレルゲンのアップデート内容を、ADFS に反映させた。

エピトープ情報の追加

平成 27 年度から 29 年度の各年度ごとに、前年の 6 月から当該年 5 月までの 1 年間に NCBI PubMed に収載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。キーワードとしては、IgE、epitope、linear、conformational、sequence、recognition 等々のワードを使用し、これらを複数組み合わせることで 6 通りの検索式を作成して検索を行った。この検索により抽出されてきた論文についてピアレビューを行った。その結果エピトープ情報を報告していると判断された論文について、そのエピトープ情報を整理し、アレルゲンデータベース (ADFS) のデータに追加した。

C. 研究結果

登録アレルゲン (アミノ酸配列情報) のアップデート

米国ネブラスカ大学リンカーン校が運営しているアレルゲンデータベースである AllergenOnline は、登録アレルゲンの全てが国際的なアレルギーの専門家チームによるピアレビューを経ており、登録タンパク質がアレルゲンであるというエビデンスの信頼性が非常に高いデータベースである (但しエピトープ情報は含まない)。ADFS における登録アレルゲンは平成 20 年度に AllergenOnline の登録アレルゲンと統合し、その後も AllergenOnline のアップデートに伴って ADFS 登録アレルゲンのアップデートを行っている。27-29 年度においても引き続きこのアップデート作業を実施した。

エピトープ情報の追加

エピトープ配列に関しては、27-29 年度の 3 年間で、キーワード検索により抽出された論文は 67 報であった。その中からアレルゲン・エピトープ情報が記載されている

と思われる 31 報を選択し、ピアレビューを行った。その結果、16 報の論文 (Table 1) から 25 種のアレルゲンについて、総数 86 のエピトープ情報を新たに追加した (Table 2)。

上記のアレルゲン及びエピトープ情報更新作業により、最終的に、ADFS のアレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 2144、エピトープ既知のアレルゲン数は 236、構造既知のアレルゲン数は 163、糖鎖付加アレルゲン数は 131 となった。

ユーザー登録制の廃止

ADFS の運用においては、これまでユーザーにメールアドレス及びパスワードを登録してもらい、登録ユーザーの人数を把握できるようにしていた。しかし、実際にはユーザーがパスワードを失念した場合等の管理者側への問い合わせが頻繁に生じており、また、ユーザー登録というステップが、トップページへのアクセス者の具体的な ADFS 利用を妨げる可能性も考えられた。そこで、このような状況を改善するため、また、ADFS へのアクセスや利用における利便性を向上させるため、ユーザー登録制を廃止し、トップページにアクセスカウント数を表示することとした。この変更により、ADFS の全てのウェブページへの容易なアクセスを可能とし、利用に際しての利便性を向上させ、より使いやすいデータベースとすることができた。システム変更後約 1 ヶ月経過した段階で、アクセス数は順調に増加している。

D. 考察

27-29 年度の 3 年間で、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報を 367 種追加、また、25 種のアレルゲンについて総数 86 のエピトープ情報を ADFS に追加した。本研究により、遺伝子組換え食品のアレルゲン性に関する評価・予測系を充実させることができ、現在までに既に開発されている遺伝子組み換え食品、及び多様化するバイオテクノロジー技術により今後作製

されるであろう新規遺伝子組換え食品のアレルゲン性を、より高い精度で評価・予測することが可能となった。

E. 結論

平成27年度から29年度の各年度ごとに、前年の6月から当該年5月までの1年間にNCBI PubMedに収載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。これらの論文についてピアレビューを行い、16報の論文から25種のアレルゲンについて、総数86のエピトープ情報を新たにADFSに追加した。また、AllergenOnlineの登録アレルゲン(アミノ酸配列情報)に関するアップデートをADFSに反映させた。この情報更新により遺伝子組換え食品のアレルゲン性評価・予測方法であるADFSをより充実させることができた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

安達玲子
食物アレルゲンの表示制度と検査法、および多機能アレルゲンデータベースADFSについて
食品衛生研究 68巻2号 pp15-22 (2018)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 27-29年度ピアレビューによりエピトープ情報を収集した論文

1. Pahr S, Selb R, Weber M, Focke-Tejkl M, Hofer G, Dordić A, Keller W, Papadopoulos NG, Giavi S, Mäkelä M, Pelkonen A, Niederberger V, Vrtala S, Valenta R.
Biochemical, biophysical and IgE-epitope characterization of the wheat food allergen, Tri a 37.
PLoS One. 2014 Nov 4;9(11):e111483.
PMID: 25368998
2. Longo V, Costa MA, Cibella F, Cuttitta G, La Grutta S, Colombo P.
Multiple IgE recognition on the major allergen of the Parietaria pollen Par j 2.
Mol Immunol. 2015 Feb;63(2):412-9.
PMID: 25284812
3. Asam C, Batista AL, Moraes AH, de Paula VS, Almeida FC, Aglas L, Kitzmüller C, Bohle B, Ebner C, Ferreira F, Wallner M, Valente AP.
Bet v 1--a Trojan horse for small ligands boosting allergic sensitization?
Clin Exp Allergy. 2014 Aug;44(8):1083-93.
PMID: 24979350
4. Allergy. 2014 Dec;69(12):1617-28.
Devanaboyina SC, Cornelius C, Lupinek C, Fauland K, Dall'Antonia F, Nandy A, Hagen S, Flicker S, Valenta R, Keller W.
High-resolution crystal structure and IgE recognition of the major grass pollen allergen Phl p 3.
PMID: 25123586
5. Yang Y, Cao MJ, Alcocer M, Liu QM, Fei DX, Mao HY, Liu GM.
Mapping and characterization of antigenic epitopes of arginine kinase of Scylla paramamosain.
Mol Immunol. 2015 Jun;65(2):310-20.
PMID: 25728640
6. Mameri H, Brossard C, Gaudin JC, Gohon Y, Paty E, Beaudouin E, Moneret-Vautrin DA, Drouet M, Solé V, Wien F, Lupi R, Larré C, Snégaroff J, Denery-Papini S..
Structural Basis of IgE Binding to α - and γ -Gliadins: Contribution of Disulfide Bonds and Repetitive and Nonrepetitive Domains.
Agric Food Chem. 2015 Jul 29;63(29):6546-54..
PMID:26186140
7. Bublin M, Kostadinova M, Fuchs JE, Ackerbauer D, Moraes AH, Almeida FC, Lengger N, Hafner C, Ebner C, Radauer C, Liedl KR, Valente AP, Breiteneder H
A Cross-Reactive Human Single-Chain Antibody for Detection of Major Fish Allergens, Parvalbumins, and Identification of a Major IgE-Binding Epitope..
PLoS One. 2015 Nov 18;10(11):e0142625.
PMID:26579717
8. Saeed H, Gagnon C, Cober E, Gleddie S.
Using patient serum to epitope map soybean glycinins reveals common epitopes shared with many legumes and tree nuts.
Mol Immunol. 2016 Feb;70:125-33..
PMID:26766775
9. Han Y, Lin J, Bardina L, Grishina GA, Lee C, Seo WH, Sampson HA..
What Characteristics Confer Proteins the Ability to Induce Allergic Responses? IgE Epitope Mapping and Comparison of the Structure of Soybean 2S Albumins and Ara h 2..
Molecules. 2016 May 12;21(5)
PMID:27187334
10. Zhang Y, Zhu L, Li S, Zhang J, She T, Yan J, Bian Y, Li H
Identification of the major allergenic epitopes of Eriocheir sinensis roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses.
Mol Immunol. 2016 May 18;74:125-132.
PMID:27208437

11. Chen X, Negi SS, Liao S, Gao V, Braun W, Dreskin SC.
Conformational IgE epitopes of peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6.
Clin Exp Allergy. 2016 May 30.
PMID:27238146

 12. Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J.
The Sensitivity of Endodontic Enterococcus spp. Strains to Geranium Essential Oil.
Molecules. 2015 Dec 21;20(12):22881-9.
PMID: 26703546

 13. Sircar G, Jana K, Dasgupta A, Saha S, Gupta Bhattacharya S.
Epitope Mapping of Rhi o 1 and Generation of a Hypoallergenic Variant: A CANDIDATE MOLECULE FOR FUNGAL ALLERGY VACCINES.
J Biol Chem. 2016 Aug 19;291(34):18016-29.
PMID: 27358405

 14. Cui Y, Teng F, Yu L, Zhou Y, Wang N, Zhang C, Yang L.
Sequential epitopes of Dermatophagoides farinae allergens identified using peptide microarray-based immunoassay.
IUBMB Life. 2016 Oct;68(10):792-8.
PMID: 27481284

 15. Havenith H, Kern K, Rautenberger P, Spiegel H, Szardenings M, Ueberham E, Lehmann J, Buntru M, Vogel S, Treudler R, Fischer R, Schillberg S.
Combination of two epitope identification techniques enables the rational design of soy allergen Gly m 4 mutants.
Biotechnol J. 2017 Feb;12(2).
PMID: 27906504

 16. Yang Y, Zhang YX, Liu M, Maleki SJ, Zhang ML, Liu QM, Cao MJ, Su WJ, Liu GM.
Triosephosphate Isomerase and Filamin C Share Common Epitopes as Novel Allergens of Procambarus clarkii.
J Agric Food Chem. 2017 Feb 1;65(4):950-963...
PMID: 28072528
-

Table 2 27-29 年度新たに ADFS に追加したエピトープ情報

	Name	start	end	Sequence	Method	CType	Reference	UniProt acc.No
001	Tri a 37	2	31	KSCORSTLG RNCYNLCRAR GAQKLCAGVC R	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	22	51	AQKLCAGVC RCKISSGLSC PKGFFPKLAL E S	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	42	71	KGFPKLALE SNSDEPDIT E YCNLGCRRSS V C	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	62	90	CNLGORSSV CDYMNVAAD DEEMKLYVEN	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	82	111	EEMKLYVEN CADACVFCFN GDAGLPSLDA Y	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
002	Par j 2	32	61	EEACGKVVQD IMPCLHFVKG EEKEPSKECC	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	32	85	EEACGKVVQD IMPCLHFVKG EEKEPSKECC SGTKKLSSEV KTTEQKREAC KCIV	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	68	107	SEEV KTTEQKREAC KCIVRATKG I SGIKNELVAE VPKKCD	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	79	107	EAC KCIVRATKG I SGIKNELVAE VPKKCD	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	91	107	I SGIKNELVAE VPKKCD	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	91	133	I SGIKNELVAE VPKKCDIKTT LPPITADFD C SKIQSTIFRG YY	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
003	Bet v 1				NMR	C	PMID 24979350	P15494
004	Phl p 3				ELISA with amino acid mutation	C	PMID 25123586	Q69B42
005	Scy p ?	113	127	VDPDQKFVISTRVRC	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
	Scy p ?	127	141	CGRSMEGYFPNCLT	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
	Scy p ?	141	155	TEAQYKEMESKVSST	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
	Scy p ?	204	218	WPTGRGLYHNDNKT F	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
006	Tri a 21	21	31	VRVPVPLQLP	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	45	52	VQQQFPFG	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	75	84	YLQLQFPFPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	102	107	QSFPPQPYPQQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	239	250	QQQPSSQVFSQQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
007	Tri a ?	144	152	PQQPFPQPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P08453
	Tri a ?	44	54	LSQQPQTFPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P08453
008	Gad m 1				Phage library/NMR	C	PMID 26579717	Q90YK9
009	Gly m 6.0501.	214	222	KQGQHQQQE	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
	Gly m 6.0501.	226	236	GSVLSGFSKHFL	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
	Gly m 6.0501.	313	324	EEDQPRPDHPP	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
010	Gly m 6.0201.	121	129	QRPQDRHOK	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	130	141	VHRFREGDLIAV	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	136	153	GDLIAVPTGVAVWVMYNE	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	214	225	GSNILSGFAPEF	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	256	261	KGGLRV	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	283	291	QCVETDKGC	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
011	Ara h 2	22	30	RQWELQGD	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	31	39	RRCQQLER	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	43	51	RPCEQHLMQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	61	69	ERDPYSPSQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	70	78	DPYSPSPYD	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	88	99	QERCCNELNEFE	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	94	105	ELNEFENRCOM	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	115	123	NQSDRLQGR	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	121	132	QGRQEQQFKRE	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	130	138	KRELRLNPQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	139	150	QCGLRAPQRCDL	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	145	156	PQRCDLDES GG	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	012	Soy AL 1	39	50	NINPCEHIMEKI	peptide microarray	L	PMID 27187334
Soy AL 1		69	80	TMPGRINIRKK	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZN24
Soy AL 1		84	94	EEEEEGHMQKC	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZN24
Soy AL 1		99	110	SELKSPICQCKA	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZN24
013	Gly m 8 (Soy AL 3)	31	42	CRKQLQGVNLTP	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8 (Soy AL 3)	67	78	ILRTMRGRINYI	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8 (Soy AL 3)	102	113	SELRSKPCQCKA	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8 (Soy AL 3)	127	138	EKQKKMEKELJ	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
014	Eri s ?	181	208	NSEVIQEAYTAQMTQTPSKIKSHFTGS	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
	Eri s ?	237	255	FWWDDSHENHERK GENF	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
	Eri s ?	360	378	GDVIESSYSPNPQY GAL	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
015	Ara h 2				Phage Display Peptide Library	C	PMID 27238146	Q6PSU2
016	Ara h 6				Phage Display Peptide Library	C	PMID 27238146	Q647G9
017	Bos d 4	20	34	EQLTKCEVRELKDL	ELISA	L	PMID 26703546	P00711
	Bos d 4	120	134	INYWLAHKALCSEKL	ELISA	L	PMID 26703546	P00711
018	Gly m 4	43	46	NEVG	IgE-specific linear peptide microarray / random phage peptide display	L	PMID 27906504	C6T1G1
	Gly m 4	74	83	IDEANLGYSY	IgE-specific linear peptide microarray / random phage peptide display	L	PMID 27906504	C6T1G1
	Gly m 4	121	125	ETKGD	IgE-specific linear peptide microarray / random phage peptide display	L	PMID 27906504	C6T1G1
019	Pro c ?	16	30	NGDRAGIDSIISFMK	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
	Pro c ?	166	180	PVWAIGTGKTATPEQ	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
	Pro c ?	205	219	RIYGGSVTPGNCKE	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
020	Pro c ?	478	492	FKDRKDGSCYVSYVK	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	E0VB57
021	Rhi o 1	44	59	TGEYLTKQYFN SQRNN	ELISA	L	PMID 27358405	A0A097CKB4
	Rhi o 1	311	326	GAENWAGQYVVD CNK	ELISA	L	PMID 27358405	A0A097CKB4
022	Der f 1	46	53	SAYLAYRN	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	71	78	GCHGD TJP	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	99	110	AREQQCRPN SQ	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	179	186	GSTQGV D Y	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 2	32	39	KVMVDGCH	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
023	Der f 2	97	106	LVKGQQYDIK	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
	Der f 2	123	130	VTVKLIGD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
	Der f 4	92	105	DIHTRSGDEQQRFR	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
024	Der f 4	130	139	QSGLGTNGHH	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	248	255	SHPRHYE	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	284	291	ITNVRFN N	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	378	388	VGPPTD QHGNI	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	506	519	VGHDEFDAFVAYHI	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 7	49	56	MKVPDHAD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456
025	Der f 7	69	81	GELAM RNIEARGL	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456
	Der f 7	117	124	DLAYKLG D	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456

注) start, end: エピトープ配列の始点及び終点アミノ酸の番号
Ctype: エピトープのタイプ. L: linear, C: conformational