

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
分担研究報告書（令和2年度）

高精度アレルギー性予測システムの構築に必要な情報の収集

研究分担者 爲廣 紀正（国立医薬品食品衛生研究所）

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、アレルギー性予測解析法の1つとして運用・公開しているアレルギーデータベース（ADFS; Allergen Database for Food Safety）に、過去1年間で新たに報告されたアレルギー及びエピトープ情報を追加し、データベースの更新作業を行った。その結果、アレルギー及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報35、及び、10種のアレルゲンについて総数18のエピトープ情報が追加された。本年度の更新作業により、アレルギー及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は2,339となり、エピトープ既知のアレルゲン数は247であった。また、アレルギー予測評価システムの予測精度を向上させることを目的として、使用するAI学習情報の追加収集を行った。一方、ADFSサーバーのクロスサイトスクリプティング脆弱性を改修した再構築システムの導入を完了し、再公開に向けてペネトレーションテスト等を進めた。

研究協力者
安達 玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

現在、様々な遺伝子組換え食品が、生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている。組換え食品の分野では、植物だけでなく、動物を宿主とした開発も進んでおり、また最近では、遺伝子組換え植物同士を交配して、付与された機能をスタックすることにより得られるスタック品種も開発されている。しかし、これらのようにバイオテクノロジーを利用して得られた品種について、どのような意図しない形質変化が出現するかを研究している例は少ない。したがって、新たに得られる遺伝子組換え生物について、非意図的な影響等を考慮し、安全性評価の方法等を検討する必要がある。

バイオテクノロジー技術を用いて開発された遺伝子組換え食品のリスクの1つの可能性として、アレルギー性増大が考えられる。本研究では、アレルギー性解析法の1つとして国立医薬品食品衛生研究所で管理・公開している、アレルギー性予測機能を装備したアレルギー・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ギー性評価系に関する研究を行う。また、アレルギー予測システムにAIを搭載する事で、予測精度の飛躍的向上を試みる。

B. 研究方法

登録アレルギー（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ギーデータベース（AllergenOnline）における登録アレルギー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

2019年6月から2020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、アレルギーデータベース (ADFS) のデータに追加した。

C. 研究結果

登録アレルギー (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ギーデータベースである AllergenOnline は、登録アレルギー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ギー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ギーは平成 20 年度に AllergenOnline の登録アレルギーと統合し、その後も AllergenOnline のアップデートに伴って ADFS 登録アレルギーのアップデートを行っている。令和 2 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、キーワード検索により抽出された論文は 30 報であった。要旨を確認し、その中からアレルギー・エピトープ情報が記載されていると思われる 13 報を選択し、ピアレビューを行った。その結果、7 報の論文 (表 1) から 10 種のアレルギーについて、総数 18 のエピトープ情報を新たに追加した (表 2)。

上記のアレルギー及びエピトープ情報更新作業により、ADFS のアレルギー及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 2,339、エピトープ既知のアレルギー数は 247、構造既知のアレルギー数は 169、糖鎖付加アレルギー数は 127 となった。

AI 学習用データセットの準備

昨年度までに取得していたアレルギータンパク情報 (総数 2,038) については、食品安全・リスクアセスメントについて国際的に活動している米国環境保健科学研究所 (HESI: the Health and Environmental Sciences Institute) が包括的な既知あるいは推定アレルギータンパク配列のレポジトリ “COMprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE)” に公開した最新情報 (総数 2,248) に更新した。また、非アレルギータンパク情報は、昨年度までに収集してきた我が国で加

工食品へのアレルギー表示が義務付けされている特定原材料 7 品目 (卵、乳、落花生、そば、小麦、えび、かに) 並びに推奨されている原材料のうち 4 品目 (いくら、さけ、キウイフルーツ、大豆) に加え、新たに 10 品目 (じゃがいも、コメ、人参、トウモロコシ、マスタード、オリーブ、トマト、モモ、りんご、牡蠣) について UniProt からタンパク情報を入手・整理し、総タンパク数が 17,372 となった。これらのアレルギー・非アレルギーデータは、学習時により効率的なパターンマイニングを実行できるよう分子系統情報を整備した。

ADFS 脆弱性の対応

遺伝子組換え食品等のリスク評価のため生化学部で管理・運営してきたアレルギーデータベース ADFS は、システム老朽化を原因として不正なスクリプトを挿入することが出来る環境にあり、エンドユーザーは不正スクリプトを利用してサイバー攻撃 (クロスサイトスクリプティング) を受ける可能性があった。そこで、昨年度までに ADFS のプログラミングを java から php に変更し、OS は最新の RedHat8 にバージョンアップした。また相同検索ツールのプログラム (Blast、FASTA、PfTools) も全て最新のバージョンに更新した。そして本年度は、新サーバー機に改修した ADFS プログラムを導入し、通信データを暗号化するための SSL サーバー証明書の取得を行った。また、弊所ネット環境下におけるシステム検証および修正作業を進めた。さらに外部公開に先んじてペネトレーションテストを行い、検出された不具合について修正等を進めた (表 3)。

D. 考察

令和 2 年度においては、アレルギー及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報を 35 種追加、また、10 種のアレルギーについて総数 18 個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ギー性に関する評価・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新規遺伝子組換え食品のアレルギー性を、より高い精度で評価・予測することが可能となっている。また、これまでに進めてきたシステムの改修により、危惧されていたクロスサイトスクリプテ

イング脆弱性は修正された。また、ペネトレーションテストにより検出された脆弱性についても対応を進め、ユーザーの ADFS 利用に際してのセキュリティを向上させることができた。

E. 研究発表・業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 為広紀正、後藤健仁、吉田拓未、花田博幸、佐久間拓斗、安達玲子、竹内一郎、近藤一成 食の安全性確保に向けたアレルギー性予測機械学習モデルの開発. 第43回日本分子生物学会年会 (2020.12 オンライン)
- 2) **Norimasa Tamehiro**, Reiko Adachi, Kazunari Kondo: Functional food ingredients modulate mast cell signaling. JSA/WAO Joint Congress 2020 (2020.09.17-10.20)

表 1 令和元年度ピアレビューによりエピソード情報を収集した論文

1.	Zenker HE, Ewaz A, Deng Y, Savelkoul HFJ, van Neerven RJJ, De Jong NW, Wichers HJ, Hettinga KA, Teodorowicz M. Differential Effects of Dry vs. Wet Heating of β -Lactoglobulin on Formation of sRAGE Binding Ligands and sIgE Epitope Recognition. <i>Nutrients</i> . 2019 Jun 25;11(6):1432. PMID: 31242665
2.	Eichhorn S, Hörschläger A, Steiner M, Laimer J, Jensen BM, Versteeg SA, Pablos I, Briza P, Jongejan L, Rigby N, Asturias JA, Portolés A, Fernandez-Rivas M, Papadopoulos NG, Mari A, Poulsen LK, Lackner P, van Ree R, Ferreira F, Gadermaier G. Rational Design, Structure-Activity Relationship, and Immunogenicity of Hypoallergenic Pru p 3 Variants. <i>Mol Nutr Food Res</i> . 2019 Sep;63(18):e1900336. PMID: 31207117
3.	Tuppo L, Alessandri C, Giangrieco I, Ciancamerla M, Rafaiiani C, Tamburrini M, Ciardiello MA, Mari A. Isolation of cypress gibberellin-regulated protein: Analysis of its structural features and IgE binding competition with homologous allergens. <i>Mol Immunol</i> . 2019 Oct;114:189-195. PMID: 31376732
4.	L'Hocine L, Pitre M, Achouri A. Detection and identification of allergens from Canadian mustard varieties of <i>Sinapis alba</i> and <i>Brassica juncea</i> . <i>Biomolecules</i> . 2019 Sep 14;9(9):489. PMID: 31540036
5.	Cai ZL, Zhang Z, Luo WL, Hou YB, He YS, Chen JJ, Ji K. Identification of immunodominant IgE epitopes of the major house dust mite allergen Der f 24. <i>Int J Mol Med</i> . 2019 Nov;44(5):1888-1898. PMID: 31545417.
6.	Glesner J, Kapingidza AB, Godzwon M, Offermann LR, Mueller GA, DeRose EF, Wright P, Richardson CM, Woodfolk JA, Vailes LD, Wünschmann S, London RE, Chapman MD, Ohlin M, Chruszcz M, Pomés A.. A Human IgE Antibody Binding Site on Der p 2 for the Design of a Recombinant Allergen for Immunotherapy. <i>J Immunol</i> . 2019 Nov 1;203(9):2545-2556. PMID: 31554696
7.	San Segundo-Acosta P, Oeo-Santos C, Navas A, Jurado A, Villalba M, Barderas R. Ole e 15 and its human counterpart -PPIA- chimeras reveal an heterogeneous IgE response in olive pollen allergic patients. <i>Sci Rep</i> . 2019 Oct 21;9(1):15027. PMID: 31636292
8.	Zhang Z, Li XM, Xiao H, Nowak-Wegrzyn A, Zhou P. IgE-binding epitope mapping of tropomyosin allergen (Exo m 1) from <i>Exopalaemon modestus</i> , the freshwater Siberian prawn. <i>Food Chem</i> . 2020 Mar 30;309:125603. PMID: 31707198
9.	Takashima T, Taku T, Yamanaka T, Fukamizo T, Numata T, Ohnuma T. Crystal structure and biochemical characterization of CJP38, a β -1,3-glucanase and allergen of <i>Cryptomeria japonica</i> pollen. <i>Mol Immunol</i> . 2019 Dec;116:199-207. PMID: 31731097
10.	Nugraha R, Kamath SD, Johnston E, Karnaneedi S, Ruethers T, Lopata AL. Conservation Analysis of B-Cell Allergen Epitopes to Predict Clinical Cross-Reactivity Between Shellfish and Inhalant Invertebrate Allergens. <i>Front Immunol</i> . 2019 Nov 19;10:2676. PMID: 31803189
11.	Múnera M, Martínez D, Labrada A, Caraballo L, Puerta L. Identification of B Cell Epitopes of Blo t 13 Allergen and Cross-Reactivity with Human Adipocytes and Heart Fatty Acid Binding Proteins. <i>Int J Mol Sci</i> . 2019 Dec 4;20(24):6107. PMID: 31817065
12.	Bu G, Li T, Zhu T, Xi G. Identification of the linear immunodominant epitopes in the β subunit of β -conglycinin and preparation of epitope antibodies. <i>Int J Biol Macromol</i> . 2020 Jul 1;154:724-731. PMID: 32198043
13.	Nesbit JB, Schein CH, Braun BA, Gipson SAY, Cheng H, Hurlburt BK, Maleki SJ. Epitopes with similar physicochemical properties contribute to cross reactivity between peanut and tree nuts. <i>Mol Immunol</i> . 2020 May 19;122:223-231. PMID: 32442779

表2 令和元年度新たに ADFS に追加したエピトープ情報

	Name	start	end	Sequence	Method	CTYPE	Reference	UniProt acc.No
001	Ole e 15	44	55	ATQKKMQQVEN	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	L	PMID 30107732	A7L5V2
	Ole e 15	105	112	RLNTATTK	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	L	PMID 30107732	A7L5V2
002	Exo m 1	133	140	RSLSDEER	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	L	PMID 30107732	A7L5V2
	Exo m 1	143	152	ALENQLKEAR	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	L	PMID 30107732	A7L5V2
	Exo m 1	199	206	VVGNNLKS	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	L	PMID 30107732	A7L5V2
	Exo m 1	253	264	VDRLEDELVNEK	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	L	PMID 30107732	A7L5V2
	Exo m 1			R90 ,E164, Y267	Phage display/ Dot blotting/ ELISA	C	PMID 30107732	A7L5V2
003	Blo t 13	55	66	NVNDNGEPTLSS	ELISA/ lymphocyte proliferation/ cytokine profile analyses	L	PMID 30223257	V5QN77
	Blo t 13	116	125	VGSEPKDKGG	ELISA/ lymphocyte proliferation/ cytokine profile analyses	L	PMID 30223257	V5QN77
004	Gly m 5	133	141	NNYKYDSNAHT	ELISA/ lymphocyte proliferation/ cytokine profile analyses	L	PMID 30223257	V5QN77
	Gly m 5	149	160	LYNVHWDPKPRH	ELISA/ lymphocyte proliferation/ cytokine profile analyses	L	PMID 30223257	V5QN77
005	Ara h 1	95	103	FNIDVPNNS	ELISA/ lymphocyte proliferation/ cytokine profile analyses	L	PMID 30223257	V5QN77
	Ara h 1	39	47	LQRDATVSS	ELISA/ lymphocyte proliferation/ cytokine profile analyses	L	PMID 30223257	V5QN77
	Ara h 2	21	27	QVVVQTE	Peptide phage display/peptide microarray	L	PMID 30267550	Q07502
	Ara h 7	90	108	DRLMQRKDLDFEQYNLEM	peptide microarray/ alanine scanning mutagenesis	L	PMID 30430936	P14004
	Ara h 11	1	32	MVHLTKTLRFINNPGRK KFYYGLQGYNKYGLY	peptide microarray	L	PMID 31139345	A0A0K2GUJ4
006	Der p 2.0103	28	59	DISKISGDWYSILLASDIK EKIEENGSMRVFV	ELISA/ alanine scanning mutagenesis	L	PMID 30728436	H2B3G5
007	Der f 24.0101	44	49	TSLQKK	ELISA/ amino acid substitution	L	PMID 30807831	B7XC66

表3 ペネトレーションテストの結果

項目名	問題点の 影響度	問題点 概要	修正
1 サーバサイドのソースコードが表示される	高	サーバ側が対応していないHTTPメソッドを受け取ると例外が発生し、StackTraceが表示される。	済
2 ディレクトリリスティングが行える	中	ディレクトリに含まれるファイルの一覧を取得できるパスが存在する。	済
3 推奨されないTLS暗号スイートが使用されている事を確認しました	低	TLSによる暗号化通信の安全性が脅かされる可能性。	
4 暗号化セッション(https)内でSecure属性が設定されていないCookieを使用している	低	非暗号化セッションでCookieが送信された場合、第三者から盗聴される可能性。	済
5 Cookie発行時にSameSite属性が付与されていない	低	Cookieの漏洩やクロスサイト・リクエスト・フォージェリ一攻撃を許可する可能性。	済
6 Content-Security-Policyヘッダーが確認出来ない	低	クロスサイトスクリプティング攻撃を許可する可能性。	
7 X-Content-Type-Optionsヘッダーが確認できない	低	意図しないスクリプト等の実行を許可する恐れ。	済
8 Strict-Transport-Securityヘッダー確認できない	低	中間者攻撃を許可する可能性。	済
9 WebサイトでTRACEおよびTRACKHTTPメソッドが有効になっている	低	サイトにクロスサイトスクリプティングの脆弱性があった場合にクロスサイトトレーシングでの攻撃リスクが高まる可能性。BASIC認証でのユーザー名やパスワード、Cookieが漏洩する可能性。	済
10 HTTP応答ヘッダーにプラットフォームに関するバージョン情報が確認できる	低	攻撃者が攻撃を行う際のヒントやきっかけになる可能性。	済
11 脆弱性を含むバージョンの製品を使用している	低	脆弱性を攻撃者に利用される可能性。	
12 X-XSS-Protectionヘッダーが確認できない	低	古いブラウザの使用時にクロスサイトスクリプティング攻撃を許可する可能性。	済
13 X-Frame-Optionsヘッダーが確認できない	低	クリックジャッキング攻撃に利用される可能性。	済
14 アプリケーションエラー発生時にデバッグ情報が表示される	低	受信したパラメータ値について、適切な境界チェックが行われません。ユーザーの入力が必要なデータ型式に一致することを確認するための検証が行われていない。	済
15 Cookieがクライアントマシンに保存されていることを検出しました	情報	Cookieが適切に保存されている事を確認。	
16 GETメソッドでパラメータが送信されている事を確認しました	情報	機微な情報を含むリクエストを送付する場合にはPOSTメソッドを使用。	