

大豆たん白質糖鎖特異的 IgE 抗体の存在と植物性食品の交叉反応性

小川 正*・森山達哉・藤田千鶴子・富田響子

京都大学大学院農学研究科

Occurrence of IgE Antibody Recognizing Asparagine N-linked Glycan Moiety of Soybean Glyco-proteins and Its Cross-reactivity

Tadashi OGAWA, Tatsuya MORIYAMA, Chizuko FUJITA and Kyoko TOMITA

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

A major soybean allergen, Gly m Bd 30K is known as a glycoprotein having a typical oligo-mannose type glycan moiety of $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ backbone with the β 1-2 xylose branch, and/or β 1-2 xylose and α 1-3 fucose branches, which is located on Asn-170 residue. Patient's serum containing the allergen-specific IgE antibodies was fractionated by an affinity chromatography using horseradish peroxidase-immobilized column. The fraction absorbed on the column was found to contain the glycan specific IgE antibodies and the flow-through fraction from the column contained the IgE specific to peptide backbone. When the inhibition-blotting experiment was carried out using the small peptides bearing glycan moiety prepared from bromelain hydrolyzate, the dose-dependent inhibition of the binding between IgE and the allergen was observed. A contribution of glycan-specific IgE antibody on the RAST values was estimated to be about 70%, which is assumed to be one of the possible factors to give the false positive diagnostic results as to the causative foods, because the common glycan moiety will behave as a pan-allergen among the plant food stuffs. *Soy Protein Research, Japan* 4, 45-51, 2001.

Key words : food allergy, soybean allergen, glycoprotein, glycan moiety, radioallergosorbent test, cross-reactivity

大豆アレルギー患者血清中に存在する IgE 抗体が認識する大豆たん白質成分を、大豆アレルゲンの必要条件としてスクリーニングを実施する過程で、糖たん白質中の糖鎖が IgE 抗体の認識部位として機能していることを示唆する多くの事実を明らかにしてきた¹⁾。近

年、臨床的アレルギー症状の発症においても、糖たん白質中の糖鎖がエпитープとして抗原抗体反応に関与する事実がオリーブ花粉症の研究において示され²⁾、その原因アレルゲンの同定とエпитープの解析により、アスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖の関与が明らかとなっている。もし、これらの糖鎖がエイトープとして抗原抗体反応に関与するならば、糖鎖特異

*〒 611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

的IgE抗体は植物由来の多くの糖たん白質を共通抗原として広い交叉反応を示すことになる。ゆえに、RASTやMAST等の抗原抗体反応を基盤にした特異アレルゲンのスクリーニングに誤った結果を与える(false positive)ことになる危険性が指摘される。本研究では、大豆アレルギー患者血清中に糖たん白質糖鎖特異的IgE抗体が存在することと、その存在が患者の原因アレルギー食品の検出におけるRASTにどの程度の影響を与えているかを明らかにすることを目的として行った。

方 法

実験材料

大豆アレルゲン Gly m Bd 30K (Gm30K) は前報³⁾に従って調製した。パイナップルステムプロメライン(BL)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)およびオボアルブミン(OA)はSigma Chemical社より、アスコルビン酸オキシダーゼはBoehringer-Mannheim社より購入したものを使用した。

患者血清

ラジオアレルゴソルベントテスト(Radioallergo-sorbent test: RAST法)にて大豆に陽性と診断されたアレルギー患者(RAST Score>2:アトピー性皮膚炎を主症状とする)に対して本研究および治療に関するインフォームドコンセントを実施し、協力が得られた患者の血清を用いて本実験を行った。

Naドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(SDS-PAGE) およびイムノブロット

SDS-PAGEは前報に従って行った¹⁾。泳動後のたん白質は、ニトロセルロース膜上に転写後、抗HRP抗体、大豆Gm30Kモノクローナル抗体(F-5)および大豆アレルギー患者血清による免疫染色を行い、ECL法により検出した⁴⁾。

アスパラギン-N結合オリゴマンノース型糖鎖含有ペプチドの調製

大豆アレルゲン、Gly m Bd 30Kと同じアスパラギン-N結合オリゴマンノース型糖鎖を含むモデルタンパク質としてパイナップル由来のプロメライン(アレルゲンたん白質と同様パパインスーパーファミリーに属するたん白質)を用い、Lauriereらの方法⁵⁾に従ってプロナーゼにより加水分解した後、ゲル濾過法により低分子量糖ペプチド画分を調製した。糖鎖含有ペプチド濃度は糖鎖の構造から1糖鎖当たりキシロース1分子を含有することから、加水分解後の単糖組成の分析値からキシロース等量にて算出した。

HRP固定アフィニティーカラムの作製と糖鎖認識IgE抗体の分画

Pharmacia社製のTrap affinity column(NHS-activated column; 1 mL)を用い、使用説明書の指示通りにたん白質の固定を行った。まず、0℃で1 mM HClにて洗浄後、1 mgのHRPを含むカップリング用buffer(0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.0) 1 mLにて25℃、30分処理してHRPを固定化した。カラムの未反応の官能基はエタノールアミンでブロックした後、中性bufferで洗浄後クロマトに使用した。HRP

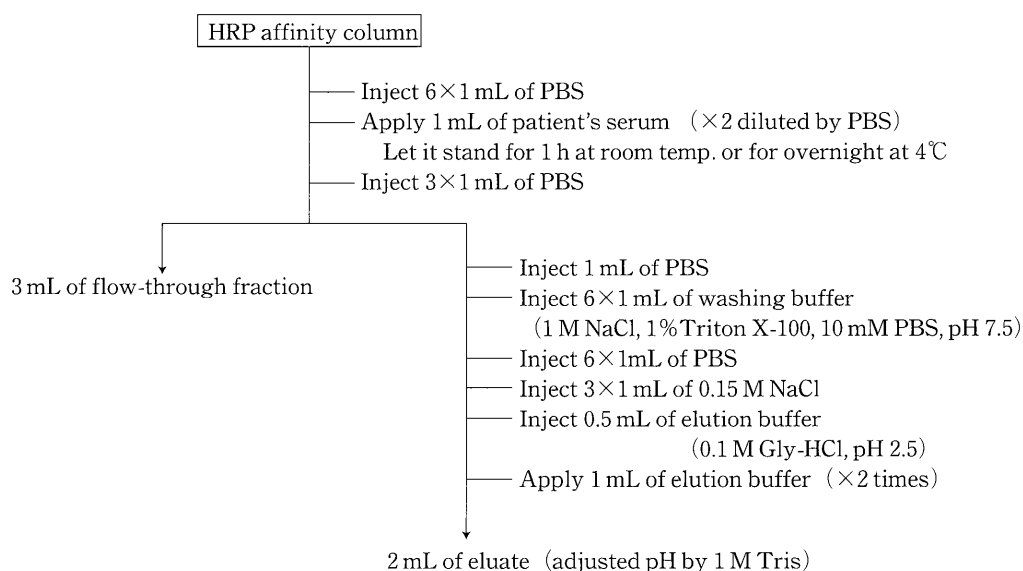


Fig. 1. Fractionation procedure of patient's serum by affinity column.

を含まないカップリング buffer で同様の処理をしたものをコントロールカラムとした。患者血清は Fig. 1 に示したスキームに従って、リガンド固定化カラムおよびコントロールカラムの両方を用いて分画し、それぞれのカラムに吸着した後溶出した画分 (eluate fraction) とカラムに吸着されない素通りの非吸着画分 (flow-through fraction) に分画した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による糖鎖認識 IgE 抗体とペプチド鎖認識 IgE 抗体量比の測定

ELISA は前報⁶⁾に従って行った。96 穴プレートに Gm30K アレルゲンを 3 $\mu\text{g}/\text{well}$ 固定化した後、2% スキムミルクを含む PBST にてブロッキングを行い、アフィニティークラムで分画した各画分中の患者血清 IgE 抗体を 1 次抗体として 2 時間反応させた後、2 次抗体として HRP 標識抗ヒト IgE 抗体を用いて 1 時間室温で反応後、OPD 発色試薬で 30 分反応後、492 nm の吸光度を測定した。

アスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖含有ペプチドによる阻害ブロッティング

Gm30K 3 μg (ca. 1 nmol) を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜上にプロットした。あらかじめ 0, 1, 2, 3 nmol (キシロース等量) のアスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖含有ペプチドを含む PBS 中にて室温で 1 時間インキュベートした 0.2 mL の患者血清 (1 次抗体) を用いて免疫染色した後、HRP 標識抗ヒト IgE 抗体 (2 次抗体) の結合を HRP 反応の ECL 発光法で測定し、デンストメーターにて求めたバンドより阻害度を解析した。

抗 HRP 抗体 (アスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖認識抗体) による RAST の阻害実験

臨床検査法として実用化されているアレルギー原因食品の検査法である CAP-RAST 法において、測定過程で 1 次抗体 (患者血清) 処理前にアレルゲンカラムを抗 HRP 抗体処理を行って糖たん白質中のアスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖をマスクすることにより、血清中の糖鎖特異的 IgE の結合を阻害し、その影響を除去した。本実験は、福山臨床検査センターにて行われた。

結果と考察

アフィニティークロマトグラフィーの各画分によるモデル糖たん白質のイムノブロット

Fig. 2 は本実験に使用したモデルたん白質の含有糖鎖構造を示したものである。Fig. 3 には大豆たん白質特異的 IgE 抗体を有する患者血清について、HRP をリガンドとするアフィニティークラムで分画した各画分を用いたイムノブロットの結果を示している。カラムに吸着した画分中には糖たん白質と結合する IgE 抗体を含み、キシロースあるいはキシロースとフコースの分枝を有するアスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖含有たん白質はすべて認識されていることを示している。対照に用いたオボアルブミンはキシロース分枝を持たないオリゴマンノース型糖鎖であり、患者血清は認識しない。この事実は、これらのたん白質間には 1 次構造 (アミノ酸配列) において全く相同性を示さない事実から糖鎖部分が共通エпитープとして

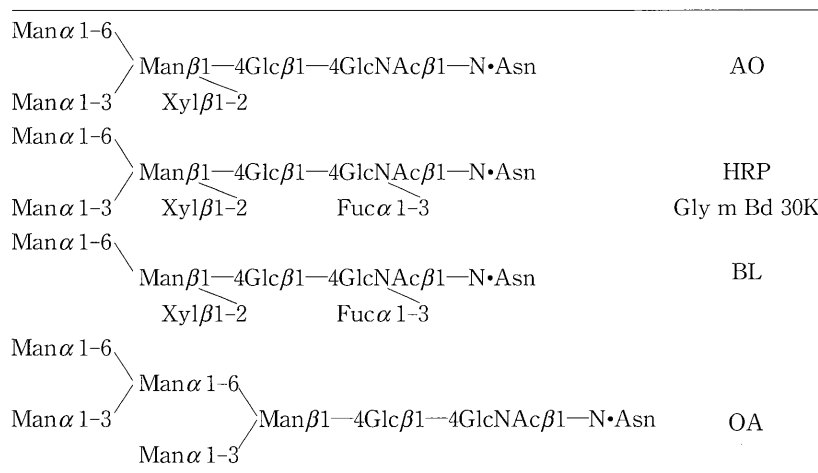


Fig. 2. Structure of asparagine-N-linked oligomannose type glycans of plant proteins and ovalbumin. AO, ascorbate oxidase; HRP, horse radish peroxidase; BL, bromelain; OA, ovalbumin

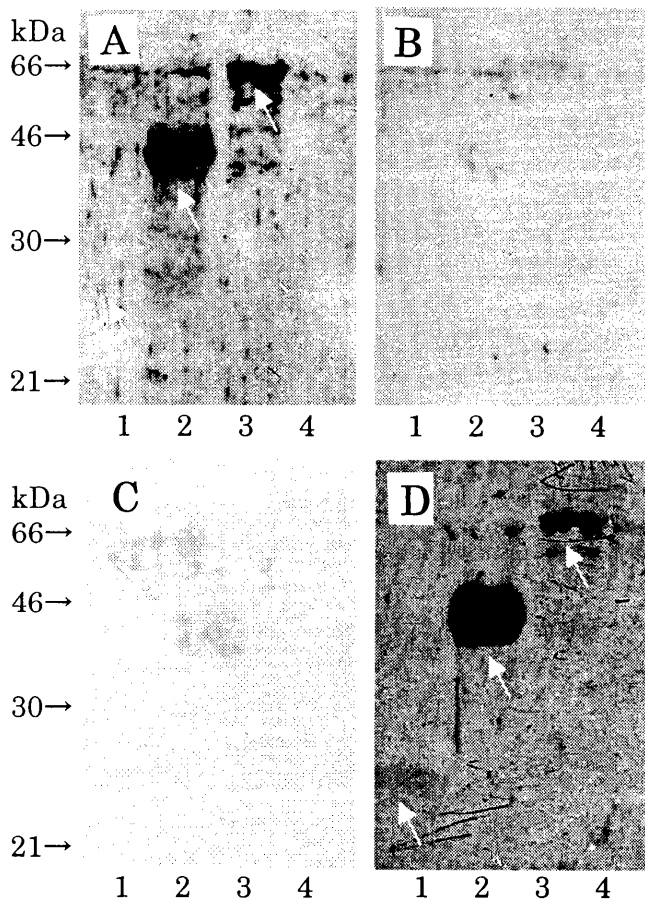
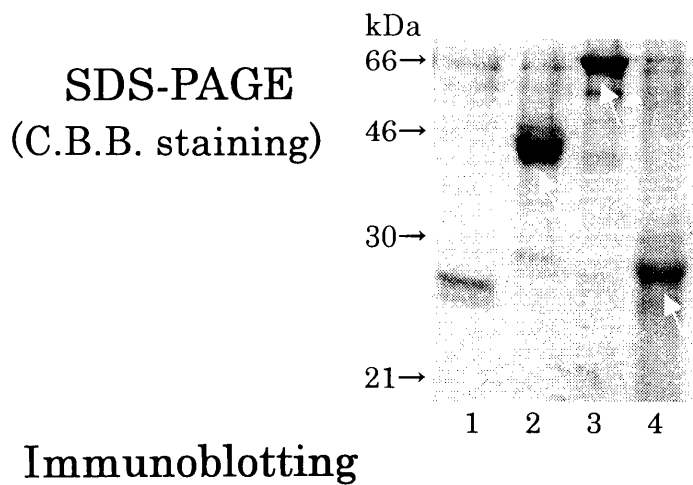


Fig. 3. SDS-PAGE and immunoblotting of glycoproteins with fractionated patient's serum.

A : Flow-through fraction from control column

B : Eluted fraction from control column

C : Flow-through fraction from HRP-conjugated column

D : Eluted fraction from HRP-conjugated column

Lane 1, bromelain ; lane 2, horseradish peroxidase ; lane 3, ascorbate oxidase ; lane 4, casein.

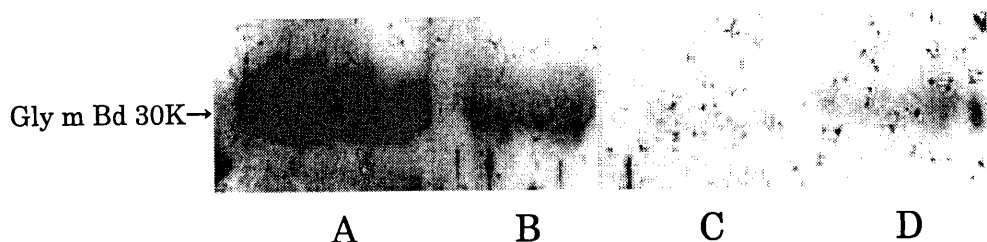


Fig. 4. Immunoblotting of Gly m Bd 30K with fractionated patient's serum.

- A : Flow-through fraction from control column
 B : Flow-through fraction from HRP-conjugated column
 C : Eluted fraction from control column
 D : Eluted fraction from HRP-conjugated column

機能していることを示唆している。

アフィニティークロマトグラフィーの各画分による Gm30K のイムノブロット

Fig. 4 は各画分中の IgE 抗体による Gm30K のイムノブロットを示している。図より明らかなように、アフィニティークラム吸着画分 (eluate fraction) のみならず非吸着画分 (flow-through fraction) にも Gm30K 認識抗体が存在する。即ち、非吸着画分中の IgE 抗体は Gm30K のペプチド部分にエпитーブを有する抗体であり、吸着画分中の Gm30K 結合 IgE 抗体は糖鎖特異的抗体である。両画分のイムノブロットの免疫染色強度の比は、両画分中の抗体の量比を反映している。

アスパラギン-N 結合オリゴマンノース型糖鎖含有ペプチドによる阻害イムノブロット

Fig. 5 は Gm30K と患者血清中の IgE の結合反応に及ぼす糖鎖ペプチドの影響を見たものである。患者血清を糖鎖含有ペプチドで前処理すると、濃度依存的に Gm30K との結合が阻害され、十分量のペプチドの添加で阻害は一定の値に収束することが示された。本実験に用いた患者血清中の糖鎖認識抗体は、Gm30K に結合する総 IgE 抗体のうち約 70% を占めることが明らかとなった。

Gm30K に対する糖鎖認識抗体およびペプチド鎖認識抗体の量比

アフィニティークラムにより分画した患者血清 IgE 抗体を用いた Gm30K の ELISA を試みた。96 穴プレートに Gm30K をコートした後、それぞれの画分中の Gm30K 認識 IgE 抗体を 1 次抗体として反応させ、その量を HRP 標識抗ヒト IgE 抗体で定量した。アフィニティークラム吸着画分と非吸着画分の 492 nm における吸光度の比から算出された糖鎖認識抗体とペプチド鎖認識抗体の量比は、70 : 30 と算出された。

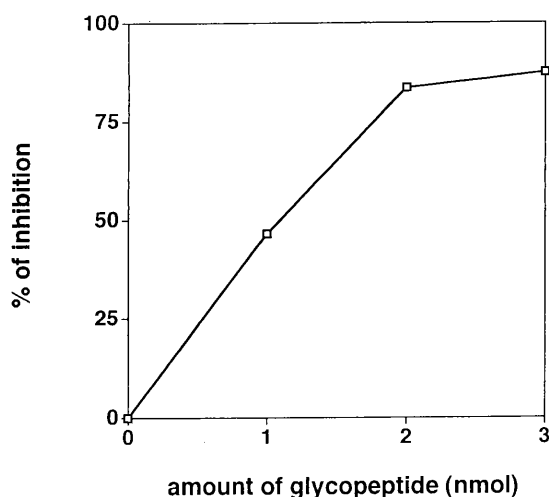


Fig. 5. Inhibition of binding reaction between Gly m Bd 30K and patient's serum with bromelain-derived glycopeptide. Details of the experiment are described in the text.

食物アレルギー原因食品のスクリーニングを目的とする臨床検査法の特異性の向上について

糖鎖特異的 IgE 抗体の存在が立証されたことは、糖鎖構造を同じくするすべての糖たん白質との交叉性が成立することを意味する。従って、その食品のたん白質特異的 IgE 抗体に依存した原因アレルゲンのスクリーニングは成り立たない。従来、複数の食品素材に対して非常に高い RAST score を与えるにも関わらず、皮膚テストなどの *in vivo* 検査と矛盾する結果を与え、また、実際のアレルギー惹起因子とはならない食品が特定されることが指摘されてきた。もし、糖鎖認識 IgE 抗体の反応が I 型アレルギー発症の最終段階である肥満細胞からの化学伝達物質の遊離を伴わないとすると上記の矛盾の原因の一端が説明可能となる。Fig.

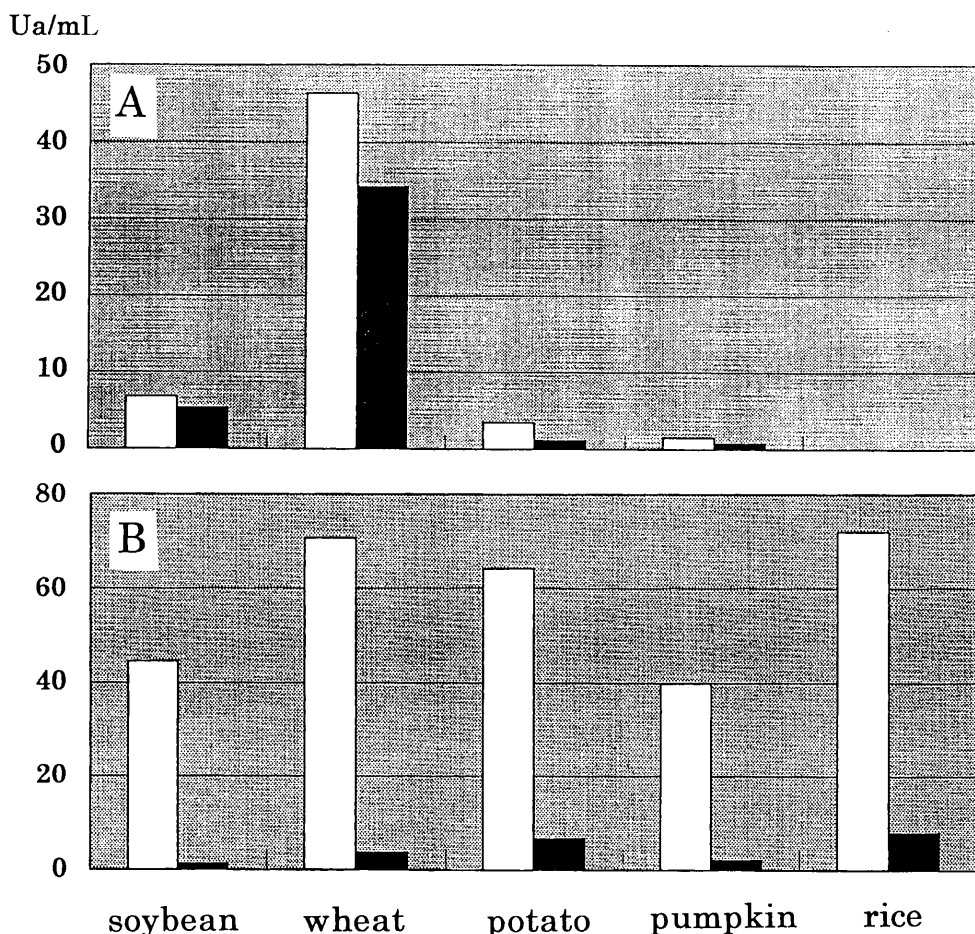


Fig. 6. CAP-RAST inhibition with anti-HRP antibodies. A, Patient 2013 ; B, Patient 2004. □, absence of anti-HRP antibodies ; ■, presence of anti-HRP antibodies.

6はA, B二人の患者血清による典型的なCAP-RASTの結果を示した。抗HRP抗体によるたん白質糖鎖のブロック処理を行った場合と非ブロック状態での5種の食品に対するRAST値を比較した。患者2013の場合、抗HRP抗体による阻害率は低く、小麦に対するRAST値は小麦たん白質が本患者の特異的アレルゲンであることを示している。一方、患者2004の場合、抗HRP抗体はすべての食品のRAST値を約80%と大幅に阻害し、しかもその阻害率もすべての食品に対して高い値を示した。現在のところ、セロリーアレルギー患者について糖たん白質糖鎖によるヒスタミンの放出が観察され、I型アレルギーの発症に関与している

とする報告⁷⁾と、一方では、オリーブ花粉症患者において糖鎖のアレルギー発症への関与はほとんど認められないとする報告⁸⁾もあり、糖鎖特異的IgEの産生とアレルギーの発症の因果関係は今のところ結論が得られていない。従って、Fig. 6Bの患者のようにRASTのみの結果で複合食物アレルギーを疑われた場合でも、真のアレルギー食品を特定することは困難なことを示している。この抗HRP抗体による阻害RAST法は、少なくとも共通抗原としての糖鎖の影響を回避し、真のアレルゲンたん白質と食品を特定しうる方法として有効であるといえる。

要 約

大豆アレルギー患者の中で Gly m Bd 30K を主要アレルゲンとする患者の血清中にアスパラギン-N結合オリゴマンノース型糖鎖を認識するIgE抗体が存在することを立証した。患者血清中には、Gly m Bd 30K たん白質のペプチド部分をエпитープとして認識するIgE抗体と Gly m Bd 30K の糖鎖部分を認識する糖鎖特異的抗体が3:7の比率で存在することを明らかにした。糖鎖認識抗体は、アスパラギン-N結合オリゴマンノース型糖鎖でキシロースあるいはキシロースおよびフコース側鎖を有するものを特異的に認識することから、多くの植物由来の糖たん白質が共通抗原となる。そのため、現在利用されている RAST 法を原理とする非侵襲性臨床検査法において、複数食品による感作と判断される患者については、現場における自動臨床検査システムに糖鎖をマスクする分析過程を導入することにより、原因食品の誤判定を回避しうることが可能であることを示唆した。

文 献

- 1) Hiemori M, Bando N, Ogawa T, Shimada H, Tsuji H, Yamanishi R and Terao J (2000): Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 238-245.
- 2) Batanero E, Villalba M, Monsalve RI and Rodriguez R (1996): Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins : Evidence of an epitope in the glycan moiety in the allergen. *J Allergy Clin Immunol*, **97**, 1264-1271.
- 3) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Kitamura K (1996) : Identification of soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biochem Biotech*, **57**, 1030-1033.
- 4) Samoto M, Fukuda Y, Takahashi K, Tabuchi K, Hiemori M, Tsuji H, Ogawa T and Kawamura K (1997) : Substantially complete removal of three major soybean allergenic proteins (Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K and α -subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biochem Biotech*, **61**, 2148-2150.
- 5) Lauriere M, Lauriere C, Chrispeels MJ, Johnson KD and Sturm A (1988) : Characterization of a xylose-specific antiserum that react with the complex asparagine-linked glycans of extracellular and vacuolar glycoproteins. *Plant Physiol*, **90**, 1182-1188.
- 6) Tsuji H, Bando N, Kimoto M, Okada N and Ogawa T (1993) : Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K. *J Nutr Sci Vitaminol*, **39**, 389-397.
- 7) Fotisch K, Altman F, Haustein D and Vieths S (1999): Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*, **120**, 30-42.
- 8) Veen MJ, Ree R, Aalberse R, Akkerdaas J, Koppelman SJ, Jansen HM and Zee JS (1997) : Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*, **100**, 327-334.