

<平成 27 年度助成>

魚類主要アレルゲン（パルブアルブミン）の アレルギー反応性の低減化に関する研究

小林 征洋

(東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門)

背景および目的

魚類アレルギーの主な誘起物質（アレルゲン）は、筋肉に存在するカルシウム結合タンパク質であるパルブアルブミンである。パルブアルブミンはその高い耐熱性から、アレルゲン性を低減することは困難であるとされてきた。これは患者の IgE 抗体が認識するアレルゲンの部位（IgE 結合エпитープ）がアレルゲンの一次構造上に存在し、パルブアルブミンが熱変性して立体構造が崩れても患者の抗体が結合できるため、アレルギーが発症すると考えられるからである。これらの知見は 1970 年代にヨーロッパで報告されており、魚類アレルギー患者は加熱調理により熱変性したパルブアルブミンによって、アレルギーの感作が成立するものと推定される。一方、我々は日本人の魚類アレルギー患者が認識するエпитープが、一次構造上ではなく立体構造上に存在することを初めて明らかにしている。生食文化のある日本では欧米と異なり、未変性のパルブアルブミンによってアレルギーの感作が起きると考えられる。そのため、加熱調理によりパルブアルブミンを熱変性することができれば、魚類アレルギー患者でも魚を摂取することが可能になると考えられる。しかし、アレルゲン性の低減化に関する知見は乏しく、とりわけ加熱処理に着目した報告はほとんどない。既に我々は 120℃の長時間加熱、または 140℃の短時間加熱を施した魚肉の IgE 反応性は消失することを見いだしている。そこで本研究では、魚類パルブアルブミンについて、加熱処理によるアレルゲン性の挙動と低アレルゲン化の機序を明らかにし、アレルゲン性の低減化技術の確立に際して有益な基礎データ

を蓄積することを目的とした。

結果および考察

20 種魚類の加熱処理による立体構造変化 および低アレルゲン化の確認

食用とされる魚類は日本だけでも数百種以上に及ぶにもかかわらず、加熱によるアレルゲン性の低減を調べた魚種はマサバしかない。また、日本人患者においては、少なくともマサバのパルブアルブミンの立体構造変化が IgE 反応性に影響を与えることも分かっている。そこで、カルシウム存在下で立体構造を認識する抗パルブアルブミン抗体を用いて、加熱がパルブアルブミンの立体構造に与える影響を調べるとともに、魚類アレルギー患者の血清を用いて、IgE 抗体に対する 20 魚種の加熱抽出液の反応性を調べた。20 種魚類を 100℃および 120℃で 60 分間加熱した粗抽出液を調製し、パルブアルブミンの立体構造を認識するマウスモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った（図示せず）。その結果、100℃加熱した場合にパルブアルブミンのバンドは消失または著しく弱くなり、120℃加熱の場合には全ての魚種でバンドが消失した。次に、上記の加熱抽出液に対して、パルブアルブミンを原因とする魚類アレルギー患者の血清を用いた ELISA を行ったところ、IgE 反応性は 60 分間加熱で著しく低下し、120℃加熱で消失した（図 1）。これらのことから、全ての魚種のパルブアルブミンは加熱処理により立体構造変化が起き、それに伴い IgE 反応性の低下が生じたものと予想される。

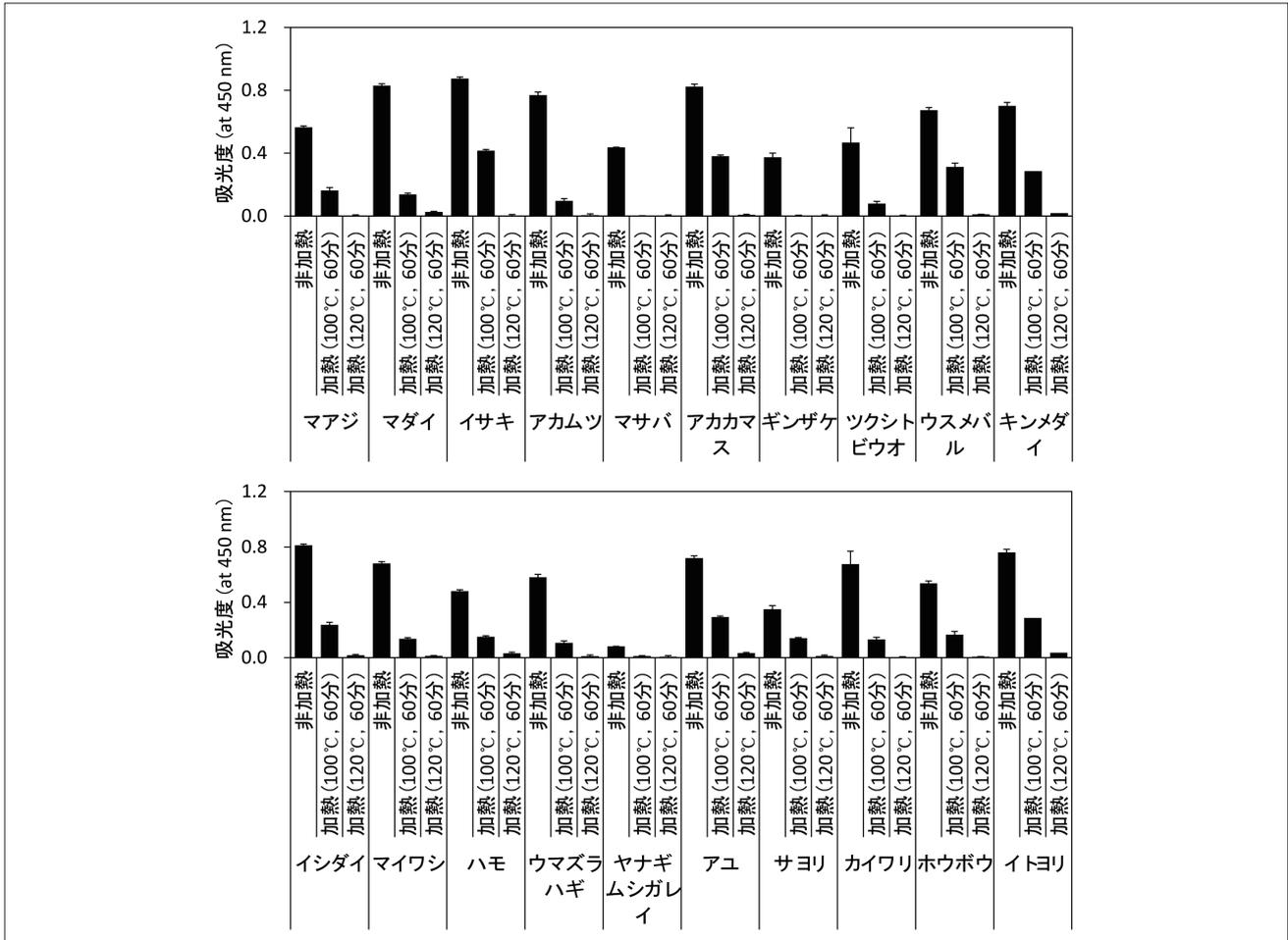


図 1. 非加熱ならびに 100℃または 120℃で 60 分間加熱した 20 種魚類抽出液に対するパルブアルブミンアレルギー患者の血清の IgE 反応性.

未変性パルブアルブミンの精製および加熱によるアレルゲン性の変化

上記の実験から、加熱処理がパルブアルブミンの IgE 反応性を低減できることが判明した。しかし、上記は抽出液を用いた検討であり、抽出液中のパルブアルブミン以外の成分が、IgE 反応性に影響を及ぼした可能性は否定できない。そこで、精製したパルブアルブミンを用いて、加熱処理の IgE 反応性に対する影響を調べる必要がある。しかし、パルブアルブミンの精製方法は、加熱により夾雑物を除いた後に液体クロマトグラフィーを行うのが一般的である。そこで、加熱処理を伴わない精製方法を確立した後に、加熱処理の IgE 反応性に対する影響を調べた。まず、魚肉抽出液を硫酸アンモニウム塩析に供してタンパク質を分画した後、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行って未変性パルブアルブミンを精製した。精製パルブアルブミンを 20℃

～ 140℃で 10 分間加熱し、魚類アレルギー患者の IgE 抗体との反応性を調べた (図 2)。その結果、IgE 反応性は 4℃～ 100℃までは穏やかに低下したが、120℃および 140℃加熱で IgE 反応性が消失した。上記のウエスタンブロッティングの結果と併せると、100℃加熱では熱変性が大きくは起きていな

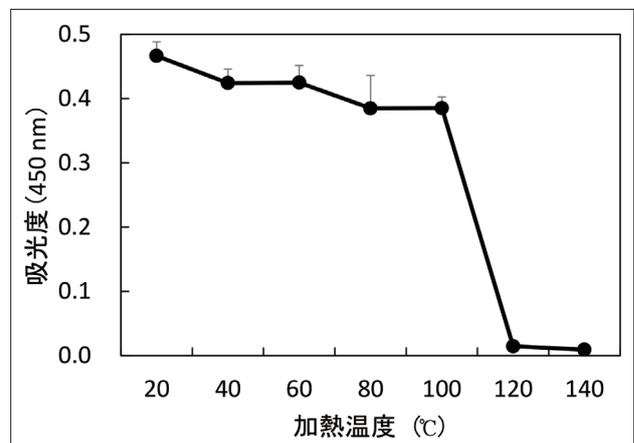


図 2. 20℃から 140℃で 10 分間加熱した精製マサバパルブアルブミンに対するパルブアルブミンアレルギー患者の血清の IgE 反応性.

い、もしくは変性は大きく起きるものの IgE 反応性に影響を与えるほどのものではない、のいずれかであることが考えられる。

パルブアルブミンの変性の確認

立体構造の変化を詳細に調べるため、パルブアルブミン分子の内部に埋没しているフェニルアラニン指標を、加熱処理により内部のフェニルアラニンが分子表面に露出するかを検討した。精製パルブアルブミンを 4℃ または 100℃ で 60 分間保温後、蛍光アミノ酸であるフェニルアラニン由来の蛍光発光から変性の度合いを調べた (図 3A)。その結果、100℃ 加熱は 4℃ 保温より強い蛍光を示した。そこで、40℃ から 140℃ で 10 分間加熱後、20℃ 加熱のフェニルアラニン由来の蛍光と比較した (図 3B)。その結果、80℃ までは蛍光強度に変化はなかったが、100℃ 以上の加熱では温度上昇依存的にフェニルアラニン由来の蛍光発光が強まることが確認された。

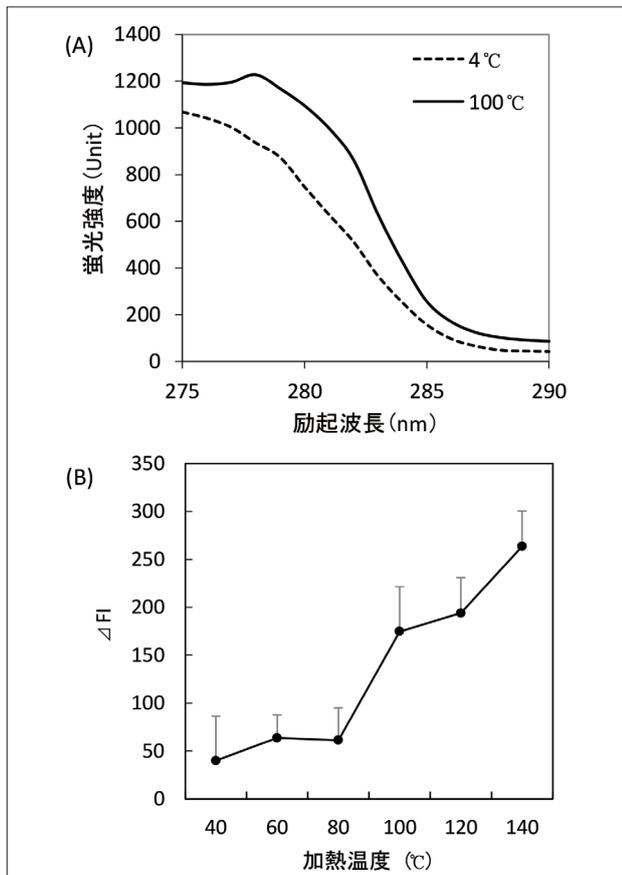


図 3. 4℃ または 100℃ で 60 分間保温した精製マサバパルブアルブミンのフェニルアラニン由来の蛍光発光 (A) . 各温度で加熱した精製マサバパルブアルブミンのフェニルアラニン由来の蛍光強度から 20℃ 保温の蛍光強度を差し引いた値 (ΔFI; B) .

これらのことから、パルブアルブミンは 100℃ 以上の加熱で熱変性が生じることが考えられる。

パルブアルブミンは、分子表面に露出している疎水性アミノ酸が存在するが、フェニルアラニンをはじめとする様々な疎水性アミノ酸は相対的に分子内部に配置しているものが多い。そのため、加熱変性が進行すればこれらの疎水性アミノ酸は分子表面に露出するものと予想される。そこで、疎水性物質に結合すると蛍光を発する蛍光指示薬 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (1,8-ANS) を用いて、パルブアルブミンの分子内部に配置されているフェニルアラニンをはじめとする疎水性アミノ酸が、立体構造の崩壊により分子外部へ露出するかを検討した。まず、1,8-ANS を精製パルブアルブミンと混合し、4℃ または 100℃ で 60 分間保温した後、蛍光強度を調べた (図 4A)。その結果、100℃ 加熱は 4℃ 保温したものよりも強い蛍光を発した。次に、40 ~ 140℃ で加熱し、20℃ 保温のパルブアル

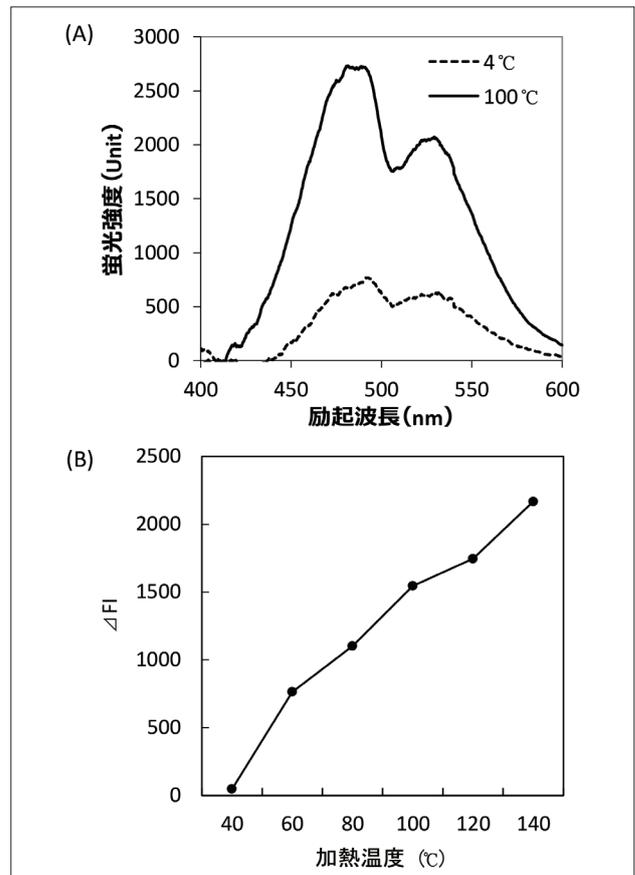


図 4. 4℃ または 100℃ で 60 分間保温した精製マサバパルブアルブミンに結合した 1,8-ANS 由来の蛍光発光 (A) . 各温度で加熱した精製マサバパルブアルブミンに結合した 1,8-ANS の蛍光強度から 20℃ 保温の蛍光強度を差し引いた値 (ΔFI; B) .

ブミンの蛍光強度と比較した（図 4B）。その結果、全ての温度帯で温度上昇依存的に蛍光発光が強くなった。IgE 反応性、フェニルアラニン由来の蛍光および 1,8-ANS の蛍光を測定した実験から、下記のことが考えられる。①パルブアルブミンの熱変性は 40℃以上で生じ、その程度は少なくとも 140℃まで温度が上昇するにつれて増大する。②パルブアルブミンのフェニルアラニンは 80℃までは分子内部に埋没しているが、100℃以上になると分子表面に露出するようになる。③患者血清の IgE 反応性は 100℃までの熱変性では影響を受けないが、120℃以上の加熱による熱変性によって、著しく低下する。

パルブアルブミン分子全体の熱変性は温度上昇にほぼ比例しているが、一部の構造は 100℃を境に著しく変化するものと予想される。おそらく、100℃を境に大きな構造変化が生じる箇所に、パルブアルブミンの IgE 結合エпитープが存在するのではないかと考えられる。パルブアルブミンはカルシウム結合タンパク質であり、カルシウムが結合している場合のみ IgE 反応性を示すことが分かっている。また、カルシウムの有無で立体構造は変化することも明らかになっている。そのため、100℃を境にカルシウムの保持ができなくなり、フェニルアラニンを含む一部の立体構造は変化するとともに、IgE 反応性が消失したものと考えられる。しかし、その際の立体構造の変化は、パルブアルブミン分子全体としては僅かであるため、1,8-ANS における蛍光強度は大きく変化しなかったものと考えられる。

パルブアルブミンのカルシウムイオンの保持の確認

パルブアルブミンの立体構造保持にはカルシウムの結合が重要である。そこで精製パルブアルブミンを 4℃または 100℃で保温後、カルシウム結合性蛍光試薬を用いて、蛍光強度からカルシウム保持の有無を調べた（図 5）。その結果、100℃加熱をしたパルブアルブミンの蛍光強度は 4℃保温と比較して弱く、加熱した場合にカルシウムの結合能が弱まっていることが判明した。カルシウム結合能の低下は僅

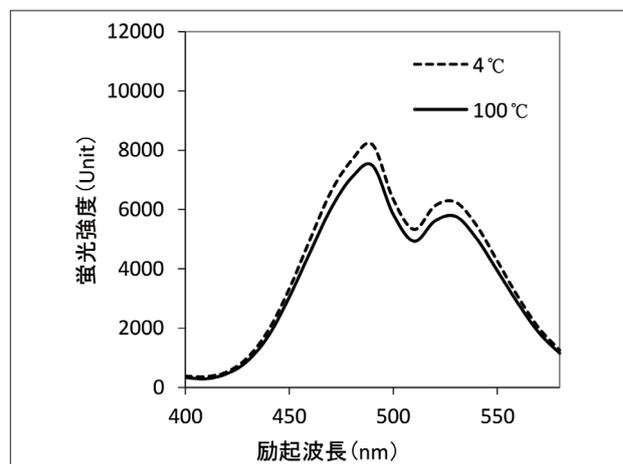


図 5. 4℃または 100℃で 60 分間保温した精製マサバパルブアルブミンが保持しているカルシウムの検出。

かであること、上記の実験で 100℃加熱をしたパルブアルブミンの IgE 反応性は、4℃と比較して著しい低下が見られなかったことを考慮すると、100℃加熱による熱変性は限定的であり、120℃以上の場合に特に IgE 結合エピトープの構造変化が大きく見られるものと考えられる。

結 論

加熱処理によるパルブアルブミンのアレルゲン性の低下は、熱変性による IgE 結合エピトープの構造変化に起因するものと結論付けられる。今回の研究成果が、アレルゲン性の低減化技術の基礎的知見になり、これまで医療機関で推奨されてこなかった減感作療法による食物アレルギーの根本治療に役立つことを期待したい。そのためにも今後、さらに加熱した際のパルブアルブミンのアレルゲン性の挙動と、低アレルゲン化の機序を明らかにする必要がある。

謝 辞

研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者の皆様に篤く御礼申し上げます。

Reduction in allergenicity of the major fish allergen, parvalbumin

Yukihiro Kobayashi

*Department of Marine Biosciences,
Tokyo University of Marine Science and Technology.*

Parvalbumin is a major fish allergen, which is reported to be highly thermostable. However, our previous study found a reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by heat treatment above 100 °C . In this study, the thermostabilities of 20 fish parvalbumins contained in extracts were first examined by subjecting the heated muscle extracts to western blotting and ELISA. As a result, an anti-parvalbumin monoclonal antibody recognizing the stereoscopic structure indicated that conformational changes in the parvalbumins accompanied heating at 100 °C or 120 °C , along with heating-related reductions in the IgE reactivities of 20 fish parvalbumins determined by ELISA using patient sera. Heating treatments at various temperatures supportively reduced the IgE-reactivities of Purified Pacific mackerel parvalbumin. Denaturation of purified Pacific mackerel parvalbumin was observed by monitoring the fluorescence derived from phenylalanine and probe to identify hydrophobic sites on the molecule surface. In addition to denaturation, Ca²⁺ binding ability was attenuated by heat treatment, as determined using a fluorescent calcium indicator. This study showed that the allergenicity of parvalbumin of various fish can be reduced by heat treatment at temperatures above 100 °C , at least in Japanese fish-allergic patients recognizing parvalbumin.