HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シロサケ卵中に含まれる主要アレルゲンの探索
Author(s)	久保, 友和; 渡辺, 一彦; 原, 彰彦; 清水, 裕; 佐伯, 宏樹
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 56(3), 55-59
Issue Date	2005-12
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22010
Type	bulletin (article)
File Information	56(3)_P55-59.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
56(3), 55-59, 2005.

シロサケ卵中に含まれる主要アレルゲンの探索

久保　友和[1)]・渡辺　一彦[2)]・原　　彰彦[3)]・清水　　裕[1)]・佐伯　宏樹[4,5)]

(2005年8月29日受付，2005年9月21日受理)

Identification of Major Allergen in Chum Salmon Roe

Tomokazu KUBO[1)], Kazuhiko WATANABE[2)], Akihiko HARA[3)],
Hiroshi SHIMIZU[4)] and Hiroki SAEKI[4,5)]

Abstract

Fish-roe-proteins were prepared from egg yolk of matured chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and their reactivity against immunoglobulin E (IgE) in fish-roe-allergic patients' sera was investigated using immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. Ten patients' sera were markedly reacted with the salt-soluble fraction of the salmon roe protein. Particularly, a marked reaction was observed in a pair of protein subunits (18 kDa and 20 kDa) with EVNAVK of the N-terminal sequence (1-6), which was coincided with a part of vitellogenin (the fish yolk precursor protein). These results indicate that the fragment of vitellogenin with oocyte growth would be one of the major allergen of fish-roe-allergy.

Key words: Chum salmon, Roe, Vitellogenin, Allergy, Allergen

背 景・目 的

現在日本では，食品アレルギーが大きな社会問題となっている。平成13-14年度の厚生労働省調査（海老澤，2004）によると，鶏卵や乳製品に次いで水産物に起因する食品アレルギーが多く報告されており，これは日本の食生活を反映した特徴といえる。さらに近年，魚卵の摂食によるアレルギー症例が多数確認されており（渡辺，2002），なかでもシロサケの加工卵であるイクラは，アレルギー物質表示制度における表示推奨品目に指定されている。しかしながらこれまで，魚卵中に含まれるアレルゲンタンパク質に関する情報はほとんどみあたらない。そこで本研究では，魚卵を摂食してアレルギー症状を呈した患者血清を用いてシロサケ卵中に含まれる主要アレルゲンの探索を試みた。

材料および方法

魚卵

シロサケ（*Oncorhynchus keta*），ニジマス（*Oncorhynchus mykiss*），イトウ（*Hucho perryi*），スケトウダラ（*Theragra chalcoramma*），アサバガレイ（*Lepidopsetta bilineata*），ホッケ（*Pleorogrammus azonus*），カラフトシシャモ（*Mallotus villosus*）から卵黄形成途上の卵を採取し，冷却した0.16 M NaClで洗浄後，直ちに－60℃に貯蔵した。ニシン（*Clupea pallasii*）とトビウオ（魚種不明）卵については，市場から塩漬加工卵を購入した。なお本論文では，塩蔵したシロサケ卵を「イクラ」と称し，生鮮卵と区別した。

試薬

後述するものを除いて和光純薬（株）あるいは関東化学（株）製の特級を用いた。

ヒト血清

イクラの摂取によってさまざまなアレルギー症状を呈した10名（1-26歳，男7，女3）とイクラを摂取しても過敏症状をおこさない4名の男性（22-42歳）の血液から，遠心分離によって血清画分を調製した（Table 1）。同表には，CAP-RAST（特異抗体検出法：ファルマシア社製）に

1) 北海道大学水産学部実習工場
(*Training Factory, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)
2) 渡辺一彦小児科医院
(*Watanabe Kazuhiko Pediatric Clinic*)
3) 北海道大学大学院水産科学研究院育種生物学講座
(*Laboratory of Aquaculture Genetics and Genomics, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University*)
4) 北海道大学大学院水産科学研究院生物資源利用学講座
(*Laboratory of Marine Products and Food Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University*)
5) Corresponding author: saeki@fish.hokudai.ac.jp

Table 1 Diagnostic information of human sera used in this study.

Number	Sex	Age	RAST*1 score	Symptoms*2	Dilution rate in experiments*3
Patient's sera					
P1	M	6	6	OAS	400
P2	M	3	2	Ur	5
P3	M	2	4	cUr	100
P4	F	1	3	An	5
P5	M	26	3	OAS	5
P6	F	1	3	An	5
P7	M	3	4	Ur	5
P8	M	7	5	OAS	200
P9	F	1	2	OAS	5
P10	M	3	4	Ur	100
Control sera					
C1	M	23	−	None	5
C2	M	24	−	None	5
C3	M	30	−	None	5
C4	M	42	−	None	5

*1, Determined by CAP-RAST(Pharmacia&Upjohn Inc., Japan).
*2, An : anaphylaxis ; cUr : contact urticaria ; OAS : oral allergy syndrome ; Ur : urticaria.
*3, Dilution rate of each samples in Western blotting and ELISA.

よって得た臨床的RASTスコアを併記した。各血清は，−60°C以下で2ヶ月から1年間貯蔵した後，解凍して直ちに等容量の0.2%アジ化ナトリウムを加えて4°Cで保管し，実験に供した。

魚卵タンパク質の分画

魚卵を解凍後，5倍重量の0.5 M NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 8.0)を加えてホモジナイズした後，40,000 gで30分間遠心分離し，この沈殿を不溶性画分 (I) として回収した。次に遠心上清を10倍量の蒸留水 (<5°C) に滴下し，得られた沈殿を15,000 gで30分間遠心分離して塩溶性画分 (S) とした。さらに，この遠心上清から浮上油層を除去後，冷却蒸留水中で充分に透析処理し，15,000 g で30分間の遠心分離によって得た上清を水溶性画分 (W) とした。

塩溶性タンパク質画分からのリポビテリン，β'-コンポーネントおよびホスビチンの精製

0.5 M NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 8.0)に溶解したシロサケ卵の塩溶性画分 (S) に67%飽和硫安を添加し，40,000 gで30分間遠心分離して沈殿画分を得た。これを0.5 M NaCl (pH 8.0)に透析して硫安を除去後，Sephacryl S-300HR カラム (ϕ16×600 mm : Amersham-Bioscience) に供してリポビテリン (Lv)，とβ'-コンポーネント (β'-c)をそれぞれ精製した(Hiramatsu and Hara, 1996)。溶出成分は280 nmの紫外部吸収を用いて検知し，Lowry法によってタンパク質を定量した。続いて上述の硫安分画における遠心上清を0.5 M NaCl (pH 8.0) に透析後，Sephadex G-75カラム (ϕ30×700 mm : Amersham-Bioscience) に供してホスビチン (Pv) を精製した。ゲルろ過フラクションにおけるPvの検出は，無機リンの定量によっておこなった(Gamst and Try, 1980)。

タンパク質組成の検討

タンパク質試料を2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)，2% 2-メルカプトエタノール，8 M尿素を含む20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し，沸騰水中で2分間加熱後，12.5%分離ゲルを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析 (Laemmli, 1970) に供した。タンパク質の染色には，3.75%硝酸アルミニウムを含むコマシーブリリアントブルーR250を用いた。

患者血清と各種タンパク質の反応

ウエスタンブロッティングとELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を併用して，イクラアレルギー患者血清中に含まれる魚卵タンパク質に反応する特異抗体 (Immunoglobulin E : IgE) を検出した。各患者血清は，150 mM NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で5-400倍に希釈してから実験に供した (Table 1)。

ウエスタン・ブロッティング：SDS-PAGE後のゲル中タンパク質成分を，セミドライブロッティング装置によってPVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写し，続いて3%カゼインと150 mM NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で10分間ブロッキングした後，膜に転写されたタン

パク質成分とヒト血清 (Table 1) を 4℃ で 18 時間反応させた．次にこの膜を 0.05% Tween 20 と 150 mM NaCl (pH 7.5) で 2 回，さらに 150 mM NaCl (pH 7.5) で 1 回それぞれ洗浄後，ペルオキシダーゼ修飾ヤギ抗ウサギ IgG (Bio-Rad 製：5000 倍希釈) と室温で 3 時間反応させた。最後に転写膜を上記と同様の方法で洗浄後，ECL ウエスタン・ブロッティング検出システム (Amersham-Bioscience 製) に供して，血清中の IgE と反応したタンパク質成分を検出した。

ELISA：試料タンパク質溶液をポリスチレン製 96 穴マイクロプレート (イワキ社製，3801-096) の各ウェルに加えた後，4℃ で一晩保持して固相化した。続いて，1% 牛血清アルブミン (BSA) あるいは 3% カゼイン (Merck 社製) でブロッキングをおこなった後，ヒト血清を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。この患者血清中の IgE と固相化したタンパク質抗原との反応性を，標識抗体としてペルオキシダーゼ修飾ウサギ抗ヒト IgE (DAKO 社製：2500 倍希釈) を用いて検討した。反応の強さは，*o*-フェニレンジアミン-0.015% 過酸化水素反応系によって各ウエルを発色させた後，492 nm における吸光度を測定して検討した。

結　　果

シロサケ成熟卵に含まれるタンパク質成分

シロサケ卵に含まれるタンパク質を S, W, I の各画分に分画し，これらの画分中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE 分析に供したところ (Fig. 1)，S 画分の主成分として Lv (重鎖と軽鎖)，β'-c および Pv がそれぞれ観察できた。一方 W 画分には，S 画分と同様に β'-c と Lv の他，35 kDa の成分とその他複数の成分が観察できた。また I 画分には，主成分として 45-50 kDa の 2 種類の成分が見いだされた。

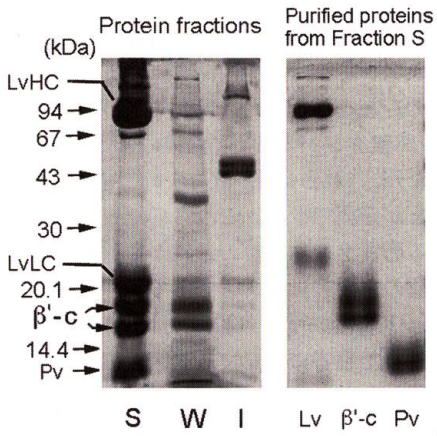

Fig. 1. SDS-PAGE patterns of chum salmon roe proteins. S : salt-soluble fraction ; W : water-soluble fraction ; I : insoluble fraction. LvHC : lypovitellin heavy chain ; LvLC : lypovitellin light chain ; β'-c : β'-component ; Pv : phosvitin.

イクラアレルギー患者の血清と各タンパク質画分の反応性

シロサケ卵の主要アレルゲンを明らかにするため，S, W, I の各タンパク質画分をウエスタンブロッティングに供し，続いてヒト血清中の IgE との反応性を検討した。まず，イクラを摂取してもアレルギー反応を呈さない健康人血清 (5 倍希釈) を各タンパク質画分と反応させても，シグナルは全く観察されなかった (結果は図示しない)。一方 Fig. 2 に示すように，イクラアレルギーと診断された 8 名の患者血清では，複数の魚卵タンパク質成分との反応を示すシグナルが確認でき，特に S 画分と W 画分の二成分 (18 kDa と 20 kDa) の間に明瞭な反応が観察された。これら二成分は電気泳動上で精製標品の β'-c と同じ移動度を示しており，さらに N 末端アミノ酸配列の 6 残基分は EVNAVK であった。この配列は，サクラマスやニジマスの β'-c と同一配列 (Hiramatsu et al., 2002) であった。これらの結果から，Fig. 2 において患者血清と強く反応した成分は β'-c と判断した。さらに P1 と P3 では Lv 重鎖に対する反応が，また P4, P7, P8 では W 画分の複数成分との反応が，さらに P4 では，I 画分中の主要成分 (45 kDa) に対する反応が観察された。

Fig. 2 によると，患者血清は共通して S 画分中の成分と明瞭な反応を示していた。そこで 10 名のイクラアレルギー患者の血清 (P1-P10) と 4 名の対照血清 (C1-C4) の S 画分に対する反応性を，ELISA によって比較検討した。結果を Fig. 3 に示すが，対照血清は全く反応性を示さなかったのに対して，すべての患者血清が S 画分と強く反応した。そして血清希釈倍率を考慮して比較すると，RAST スコアの高い P1, P3, P8, P10 は，S 画分と強く反応していることが確認できた。Fig. 2 と Fig. 3 の結果は，魚卵アレルギー患

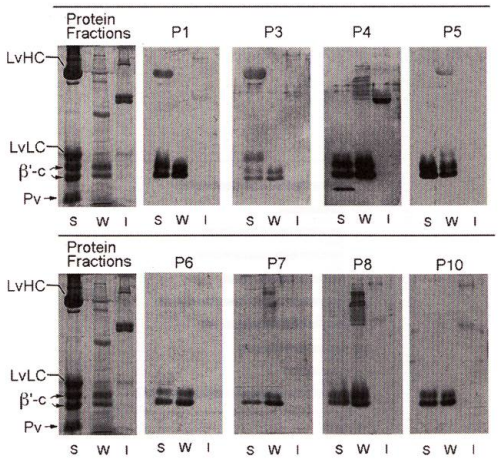

Fig. 2. Reactivity of egg yolk proteins to salmon-roe-allergic patients' sera.
S : salt-soluble fraction ; W : water-soluble fraction ; I : insoluble fraction. LvHC : lypovitellin heavy chain ; LvLC : lypovitellin light chain ; β'-c : β'-component ; Pv : phosvitin.

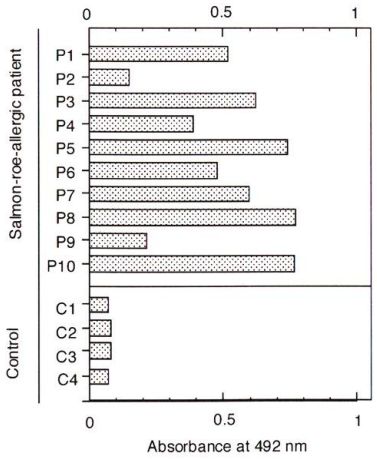

Fig. 3. Immunoreactivity of salmon-roe-allergic patients' sera to salt soluble yolk proteins by ELISA.

者の血清中には，S 画分に含まれるタンパク質に対する特異 IgE が共通して存在する可能性を示している。

イクラアレルギー患者の血清と塩溶性タンパク質画分の反応性

本来 β'-c は卵中で Lv や Pv とともに S 画分に存在している（原，1989）。そこでこれら三成分を精製後，Fig. 3 と同様に ELISA に供した。その結果，Fig. 4 に示すように，すべての患者血清において β'-c と特異的に反応する IgE の存在が確認でき，その反応性は P1 と P3 で観察された Lv との反応性よりも極めて強いものであった。一方，いずれの血清でも Pv に対する特異 IgE の存在は明瞭に確認できなかった。Fig. 4 および前述の Fig. 2 の結果は，β'-c がシロサケ成熟卵の主要アレルゲンであることを強く示唆している。

魚卵アレルギーの免疫学的交差性に関する検討

9 種の魚類から調製した魚卵タンパク質 S 画分を，患者

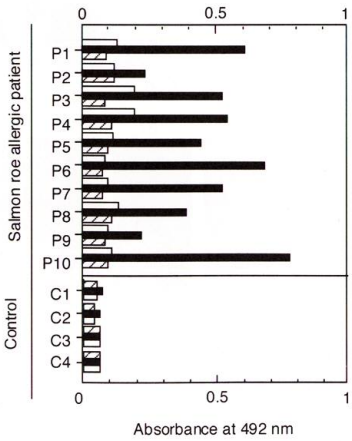

Fig. 4. Immunoreactivity of salmon-roe-allergic patients' sera to proteins in salt soluble fraction by ELISA.

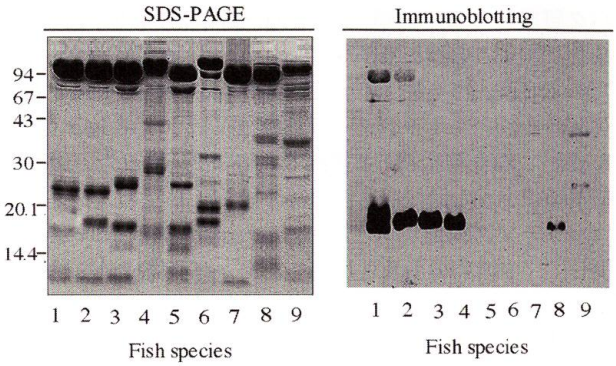

Fig. 5. Immunoreactivity of salmon-roe-allergic patients' serum to salt soluble yolk proteins prepared from 9 fish species.
1 : Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) ; 2 : Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ; 3 : Sakhalin taimen (*Hucho perryi*) ; 4 : Alaska pollack (*Theragra chalcoramma*) ; 5 : Flounder (*Lepidopsetta bilineata*) ; 6 : Atka mackerel (*Pleorogrammus azonus*) ; 7 : Processed Herrimg roe (*Clupea harengus harengus*) ; 8 : Capelin (*Mallotus villosus*) ; 9 : Pocessed flyingfish roe.

血清 P1 と反応させた Fig. 5 によると，P1 血清中の特異 IgE は，シロサケだけでなくニジマス，イトウおよびスケトウダラの β'-c との間でも強く反応した。さらに，極めてわずかではあるが，カラフトシシャモとトビウオについても反応するタンパク質成分が観察された。この結果は，魚類 β'-c 間に免疫学的交差性が存在する可能性を示している。

考　　察

肝臓で合成される卵黄タンパク質前駆物質ビテロジェニン（血液中に存在するメス特異タンパク質）は，血流を介して卵中に取り込まれた後，特異的に分解して卵黄タンパク質（Lv, β'-c, Pv）となることが知られている（Hiramatsu and Hara, 1996）。本研究では，供試した 10 名すべてのイクラアレルギー患者血清中に，β'-c と特異的に反応する IgE の存在を確認した（Fig. 4）。また一部の患者では，Lv 重鎖や卵膜タンパク質が含まれる I 画分との反応性も観察されたが，これらに比べて β'-c に対する反応性が著しく高いことが確認できた。これらの結果と魚卵全タンパク質に占める卵黄タンパク質の量比から判断すると，β'-c がシロサケ卵の主要アレルゲンであるものと思われる。

Makinen-Kiljunenra ら（2003）は，ニジマス卵でアレルギーを発症した患者にニジマス筋肉抽出物を投与しても過敏反応が現れないことを，プリックテストによって確認した。魚類アレルギーの主要アレルゲンはパルブアルブミンとコラーゲンであるが，これらのタンパク質は β'-c と免疫学的交差性がないと思われるので，魚卵アレルギーは，基本的に魚類アレルギーとは異なる症例として取り扱われるべきである。しかし，β'-c の前駆物質であるビテロゲニン

が魚類肝臓で合成され，血液中を経て卵黄に蓄積される事実から，卵黄タンパク質に抗体を持つヒトは，魚肉の喫食形態によっては血中ビテロジェニンを介したアレルギーを発症する可能性が否定できない。これについては，引き続いて検証が必要である。

本研究によると，イクラ患者血清中の β'-c に対する特異 IgE は，シロザケだけでなくイトウとニジマスなどのサケ科魚類，さらにはスケトウダラの β'-c と明瞭な免疫学的反応を示した。これらの結果は魚類間における β'-c の免疫学的交差性の存在を示すものであり，より多くのイクラアレルギー患者血清を用いた検討が必要である。また本研究で用いた 7 魚種のタンパク質試料は未調理の魚卵から精製したものであるが，今後は，塩漬処理や脂質の酸化に伴う過酸化物の影響や修飾反応の影響が魚卵タンパク質のアレルゲン性におよぼす影響を検討する必要がある。

謝　　辞

各種魚卵の採取にご協力をいただいた北海道大学北方生物フィールド科学センター水圏ステーション七飯淡水実験所の関係各位に御礼申し上げる。また本研究の一部は，財団法人北海道科学技術総合振興センター基盤的研究開発育成事業および秋山記念生命科学振興財団の助成によって行われた。ここに記して御礼申し上げる。

参 考 文 献

Gamst, O. and Try, K. (1980) Determination of serum-phosphate without deproteinization by ultraviolet spectrophotometry of the phosphomolibdic acid complex. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **40**, 483-486.

Hiramatsu, N. and Hara, A. (1996) Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **115A**, 243-251.

Hiramatsu, N., Hara, A., Hiramatsu, K., Fukada, H., Weber, G.M., Denslow, N.D. and Sullivan, C.V. (2002) Vitellogenin-derived yolk proteins of white pearch, *Morone Americana*: Purification, characterization and vitellogenin receptor binding. *Biol. Reprod.*, **67**, 655-667.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Makinen-Kiljunenra, S., Kiistala, R. and Varjonen, E. (2003) Severe reactions from roe without concomitant fish allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **91**, 413-416.

海老澤元宏 (2004) アレルギー物質を含む食品表示制度に関して：第 16 回食品の表示に関する共同会議 (厚生労働省審議会議事録) www.mhlw.go.jp/shingi/2004/05/s0531-8a.html.

渡辺一彦 (2002) 魚介類. pp. 245-257，中村晋・飯倉洋治 (編)，最新食物アレルギー，永井書店，大阪.