

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 252899

(P2003 - 252899A)

(43)公開日 平成15年9月10日 (2003.9.10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/76	ZNA	C 0 7 K 14/76	4 H 0 4 5
7/06		7/06	
7/08		7/08	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
			Q
		審査請求 未請求 請求項の数 3	O L (全 7 数)

(21)出願番号 特願2002 - 57150(P2002 - 57150)

(22)出願日 平成14年3月4日 (2002.3.4)

(71)出願人 000229519
日本ハム株式会社
大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号
(72)発明者 田辺 創一
広島県広島市西区草津新町1 - 19 - 3 - 1008
(72)発明者 西村 敏英
広島県東広島市八本松原町6440 - 1松岡住宅
2 - 211
(72)発明者 高畑 能久
茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番地 日本ハム株式会社中央研究所内
(74)代理人 100085486
弁理士 廣瀬 孝美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 家畜血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープ

(57)【要約】

【課題】 ウシ血清アルブミン又はヒツジ血清アルブミンのヒト又はペット動物に対する免疫学的反応性を有するエピトープ (ペプチド) 及び家畜血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープの決定方法を提供する。

【解決手段】 本発明の方法は、ヒト血清アルブミンと家畜血清アルブミンのアミノ酸配列を比較し、アミノ酸配列の異なる個所のペプチドを調製し、それらを免疫学的検査に付して、免疫学的反応性を有するペプチドを見出すことにより免疫学的反応性を有するエピトープを決定することによりなり、また係る方法により決定されたウシ血清アルブミン及びヒツジ血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記のアミノ酸配列又はその N 末端及び / 又は C 末端に 1 ～ 5 個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するウシ血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープ。

Ser-Pro-Asp-Leu-Pro-Lys-Leu-Lys-Pro-Asp-Pro-Asn-Thr-Leu-

Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-

Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-

Ala-Cys-Tyr-Thr-Ser-Val-Phe-Asp-Lys-Leu-Lys-His-Leu-Val-Asp-

Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-

Glu-Ser-Lys-

Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu-

Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-

Glu-Asn-Phe-Val-

【請求項 2】 下記のアミノ酸配列又はその N 末端及び / 又は C 末端に 1 ～ 5 個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するヒツジ血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープ。

Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-

Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-

Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-

Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-

Glu-Asn-Phe-Val-

【請求項 3】 家畜の血清アルブミンのアミノ酸配列と、ヒト又はペット動物の血清アルブミンのアミノ酸配列を対比し、アミノ酸配列の異なる個所のアミノ酸配列のペプチドを免疫学的検査に付して免疫学的反応性を試験し、免疫学的反応性を有するペプチドを免疫学的反応性を有するエピトープと決定する家畜血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープの決定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はウシ血清アルブミン（以下、BSA という）又はヒツジ血清アルブミン（以下、SSA という）のヒト又はペット動物に対する免疫学的反応性を有するエピトープ（ペプチド）及び家畜血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープの決定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、食物アレルギー患者が増加しており、所謂、5 大アレルギー（牛乳、卵、小麦、そば、落花生）が知られている。また、5 大アレルギーほどメジャーなアレルギーではないが、食肉もアレルギーを起こす場合がある。例えば、牛肉はアレルギー性を示す。そして、牛肉アレルギーの研究から、牛肉の主要なアレルギーは BSA であることが知られている。BSA は牛乳にも含まれているので、牛肉アレルギー患者は牛乳を摂取した場合にもアレルギーを発症する。同様に、牛乳ア

レルギー患者は牛肉を摂取した場合にもアレルギーを発症する。また、犬、猫などのペット動物は牛肉でアレルギーを生じることが知られている。アレルギーを検査する方法の一つとして、患者血清中の IgE 抗体を利用する免疫学的検査法がある。しかし、患者血清を大量に入手するのは難しいから、この方法の実施には限界がある。そこで、汎用的に実施可能な免疫学的検査法が必要とされている。また、免疫学的検査法に供する抗体としてはアレルギーを特異的に認識する抗体が望ましく、アレルギーを惹起する物質、その構成成分（多くの場合、蛋白質）又はそのアミノ酸配列（免疫学的反応性を有するエピトープ）を特定し、それを抗原として作製された抗体が望ましい。免疫学的反応性エピトープを特定する方法としては、1) アレルギーを酵素処理又は化学的処理により調製した限定分解物と患者 IgE 抗体の反応性を調べる方法、2) アミノ酸配列データベースを参照して合成したオーバーラップペプチドと患者 IgE 抗体の反応性を調べる方法などが知られているが、非常に手間のかかる効率の悪い方法であった。一方、上述のように、牛肉の主要なアレルギーは BSA であることが知られていたが、BSA 中の免疫学的反応性を有するエピトープについては知られていなかった。また、アレルギー性を示す蛋白質のアミノ酸配列中には、T 細胞のレセプターと結合し、T 細胞に免疫学的刺激を与えるエピトープの存在が言われているが、この BSA での検討はなされていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、従来のエピトープ決定方法はかなりの時間を必要とするものであった。係る問題から、発明者らは、家畜血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープ構造の新規な決定方法を検討した結果、ヒト血清アルブミンと家畜血清アルブミンのアミノ酸配列を比較し、アミノ酸配列の異なる個所のペプチドを調製し、それらを免疫学的検査に付して、免疫学的反応性を有するペプチドを見出すことにより免疫学的反応性を有するエピトープを容易に決定することができることを見出した。本発明は、係る方法により決定された BSA 及び SSA の免疫学的反応性を有するエピトープ並びに免疫学的反応性を有するエピトープの決定方法を提供するものである。なお、ここで免疫学的反応性とは、IgE 抗体（言い換えれば B 細胞）及び / 又は T 細胞のレセプターとの反応性のことである。

【0004】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決すべくなされた本発明は、

(1) 下記のアミノ酸配列又はその N 末端及び / 又は C 末端に 1 ～ 5 個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有する BSA の免疫学的反応性を有するエピトープ；

Ser-Pro-Asp-Leu-Pro-Lys-Leu-Lys-Pro-Asp-Pro-Asn-Thr-

r-Leu-
Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-
Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-
Ala-Cys-Tyr-Thr-Ser-Val-Phe-Asp-Lys-Leu-Lys-His-Leu-Val-Asp-
Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
Glu-Ser-Lys-
Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu-
Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-
Glu-Asn-Phe-Val-

(2) 下記のアミノ酸配列又はそのN末端及び／又はC末端に1～5個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するSSAの免疫学的反応性を有するエピトープ；

Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-
Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-
Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-
Glu-Asn-Phe-Val-

(3) 家畜の血清アルブミンのアミノ酸配列と、ヒト又はペット動物の血清アルブミンのアミノ酸配列を対比し、アミノ酸配列の異なる個所のアミノ酸配列のペプチドを免疫学的検査に付して免疫学的反応性を試験し、免疫学的反応性を有するペプチドを免疫学的反応性を有するエピトープと決定する家畜血清アルブミンの免疫学的反応性を有するエピトープの決定方法；である。

【0005】

【発明の実施の形態】 前述のように、牛肉の主要アレルゲンはBSAであることが知られている。Fiocchi等は皮膚のプリックテストで牛肉アレルギーの子供たち全員がBSAに反応することを報告している。しかしながら、今まで、その免疫学的反応性を有するエピトープに関する実際に役立つ情報はほとんど無かった。血清アルブミンは生化学的には最も広く研究され活用されている蛋白質の一つである。血清蛋白質中、約60%を占める。BSAとヒト血清アルブミン（以下、HSAという）のホモロジーは約76%であり、ジスルフィド結合の繰り返しパターンを厳密に保存している。血清の主要な構成物質がアレルゲンとして働くと言うことは驚くべきことである。

【0006】 そこで、BSAに対する牛肉アレルギー患者の免疫学的反応性を検討した。予備実験からBSAに感受性の牛肉アレルゲンの患者のIgE抗体はHSAと結合しないことが分かった。そこで、BSAとHSAのアミノ酸配列を詳細に比較したところ、アミノ酸配列の非常に異なる15のエピトープが見出された。そこで、これらのペプチドを合成し、食肉アレルギー患者のIgE抗体（言い換えれば、B細胞）との反応性及び末梢血単核球分画（言い換えれば、T細胞）との反応性を調べた。

【0007】 その結果、下記のアミノ酸配列又はそのN

末端及び／又はC末端に1～5個のアミノ酸、好ましくは相同性アミノ酸を付加したアミノ酸配列を有するペプチドがBSA分子中の免疫学的反応性を有するエピトープとして同定された。なお、上記の相同性アミノ酸とは、BSAのアミノ酸配列番号のうち、1) 下記のアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に位置する配列番号のアミノ酸であって、且つ2) BSAとHSAのアミノ酸配列に共通するアミノ酸をいう（SSAにおいても同様）。ここで、両末端に付加された1～5個のアミノ酸はプレートに繋ぐスパーサーの役目を有するもので、免疫学的反応性を有する限り、この部分を変更しても結合性に影響はなかった。

Ser-Pro-Asp-Leu-Pro-Lys-Leu-Lys-Pro-Asp-Pro-Asn-Thr-Leu-
Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-
Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-
Ala-Cys-Tyr-Thr-Ser-Val-Phe-Asp-Lys-Leu-Lys-His-Leu-Val-Asp-
Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-

20 Glu-Ser-Lys-
Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu-
Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-
Glu-Asn-Phe-Val-

これらのペプチドを抗原として調製した抗体は、牛肉アレルギー患者が食する食品中のBSAの検定に有用であり、牛肉アレルギー患者の食物アレルギーの防止に有用である。

【0008】 また、同様な方法で、SSAについて検討したところ、下記のアミノ酸配列又はそのN末端及び／又はC末端に1～5個のアミノ酸、好ましくは相同性アミノ酸を付加したアミノ酸配列を有するペプチドがSSA分子中の免疫学的反応性を有するエピトープとして同定された。

Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-
Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-
Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-
Glu-Asn-Phe-Val-

【0009】

【実施例】 以下、実施例に基づいて、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、以下に述べられる試験方法及び材料の概略は下記のとおりである。

【0010】 (1) 供試血清

インフォームドコンセントを得て採取した牛肉アレルギー患者12名（CAP-RASTスコア：食肉4～6；牛乳3～6）及び健常成人1名の血清を供試した。BSA（Sigma社製）を常法通りSDS-PAGEし、PVDF膜に転写し、該PVDF膜と供試患者血清を反応させ、抗ヒトIgE抗体を2次抗体とするウエスタンブロッティングを行ったところ、供

試患者血清はBSAと反応した。一方、同様に処理した供試健常成人血清はBSAと反応しなかった。

【0011】(2)ペプチドの合成

NCBI(National Center for Biotechnology Information)の蛋白質データベースを参照にして、BSAとHSAのアミノ酸配列を比較した。なお、BSAの配列についてはNCBIの登録番号229552と登録番号P02769(個々のデータが不完全なため)、HSAの配列についてはNCBIの登録番号5821846を元にした。表1に示すように、BSAのアミノ*

*酸配列に相当するペプチドをペプチドシンセサイザー(PSSM-8)で合成し、合成したペプチドを逆相HPLCにかけ、主要ピークを集め、凍結乾燥し、DMSO(ジメチルスルホキシド)に5mM濃度で溶解し-80で保存された。なお、表1において、便宜上、アミノ酸は常法に準じて1文字表記で示している(表2も同様)。

【0012】

【表1】

表1 BSAのアミノ酸配列を元にした合成ペプチドとHSAのアミノ酸配列の比較

ペプチド番号	合成した配列	HSAの相当する配列
No. 1	ESHAGCEKS	ESAENCCKS
No. 2	DDSPDLPKLKPDNTLC	DDNPNLPRLVRPEVDVNC
No. 3	CDEFKADEKKFWGKY	CTAFHDNEETFLKKY
No. 4	LLYANKYNGVFQEC	LLFFAKRYKAAFTC
No. 5	PKIETMREKVLTS	PKLDELDEGKASS
No. 6	EKDAIPEDLPPLIADF AEDK	ENDEMPADLPSLAADFVESC
No. 7	HPEYAVSVLL	HPDYSVVL
No. 8	PHACYISVFDKLKHLVDEP	PHECYAKVFDEFKPLMEEP
No. 9	NCDFEKLK	NCELFEOLG
No. 10	VGIRCCIKPESERM	VGSKCKHPEAKRM
No. 11	LSLILNRLC	LSVVLNQLC
No. 12	PVESKVT	PVSDRVT
No. 13	PKAFDEKLFT	PKEFNAETFT
No. 14	TLPDTEKQI	TLSEKERQI
No. 15	VMENFVAF	VMDDFAAF
No. 16	LVYSTQIAL	LYAASQAAL

下線が引かれているのは、BSAとHSAとの間で異なるアミノ酸残基
合成したペプチドは保存のためにDMSOに溶かされた(5mM)。

【0013】また、NCBIの蛋白質データベースを参照にして、BSAとSSAのアミノ酸配列を比較した。BSAのデータは2つの配列(登録番号229552とP02769)、SSAは登録番号113582を元にした。ここで分るように、BSAとSSAはペプチドNo.4以外は完全に同じエピトープを持っていた(表2参照)。また、ペプチドNo.4においても、免疫学的反応性を有するエピトープであるTvr-AI*

*a-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-は一致していた。更に、ここで見出したエピトープは、ウシとヒツジと同様に反芻動物であるヤギの免疫学的反応性を有するエピトープとしても用いることができる。

【0014】

【表2】

表2 BSAのアミノ酸配列を元にした合成ペプチドとSSAのアミノ酸配列の比較

ペプチド番号	合成した配列	SSAの相当する配列
No. 4	LLYANKYNGVFQEC	LLYANKYNGVFQEC
No. 7	HPEYAVSVLL	HPEYAVSVLL
No. 11	LSLILNRLC	LSLILNRLC
No. 14	TLPDTEKQI	TLPDTEKQI
No. 15	VMENFVAF	VMENFVAF

下線が引かれているのは、BSAとSSAとの間で異なるアミノ酸残基
合成したペプチドは保存のためにDMSOに溶かされた(5mM)。

【0015】また、同様にNCBIの蛋白質データベースを参照に、上述のBSAデータとペットである犬や猫の血清アルブミンのアミノ酸配列データを比較することにより、BSAとHSAの場合と同様に、犬や猫に対するBSAの免疫学的反応性を有するエピトープを見出すこと

ができる。

【0016】(3)合成ペプチドに対するIgE抗体の反応性
ペプチド溶液を4倍量の0.1M炭酸バッファー(pH9.6)で希釈し、その100μlをGregorius等の方法によりプレートのウェルに固定化し、200μlの1%BSAでブロッ

キングした後、患者血清を作用させた。ペプチドに結合したIgE抗体をビオチン化抗ヒトIgE抗体 (Kirkegaard & Perry Lab. Inc., U.S.A.) とストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体 (Boehringer Mannheim, Germany) と 0-フェニレンジアミン (和光製薬) で検出した。その結果を図 1 に示す。結論として、ペプチドは、牛肉アレルギー患者IgE抗体 (言い換えれば、該患者のB細胞) と免疫学的反応性を有することが判明した。

【0017】(4)合成ペプチドに対するT細胞の反応性 B細胞によるアレルギー特異的IgE抗体の産生はアレルギー特異的T細胞により制御されている。そこで、表 1 の合成ペプチドNo.11と牛肉アレルギー患者のT細胞との反応性を調べた。4名の牛肉アレルギー患者から採取した血液から常法に従って、末梢単核球分画を調製し、培養プレート(Nunc社製)に 1×10^5 個/ウェルで播種し、合成ペプチド存在下 (5.0 mM) 及び非存在下で培養し、5-プロモ-2'-デオキシウリジンの取り込み量を測定し、T細胞の増殖、即ちT細胞との反応性を調べた。その結果、該ペプチドは牛肉アレルギー患者のT細胞*

<110> Nippon Meat Packers, Inc.

<120> Immuno-reactive epitope of livestock serum albumin

<160> 9

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Ser-Pro-Asp-Leu-Pro-Lys-Leu-Lys-Pro
-Asp-Pro-Asn-Thr-Leu-

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Tyr-Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe
-Gln-

1 5 10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 4

Ala-Cys-Tyr-Thr-Ser-Val-Phe-Asp-Lys

*胞と反応することが確認された。

【0018】

【発明の効果】以上のように、本発明の免疫学的反応性を有するエピトープは、牛肉アレルギー患者のIgE抗体 (即ち、B細胞) と特異的に反応するので、BSAのアレルゲン検出用抗体作製のための抗原として活用することができる。また、本発明の免疫学的反応性を有するエピトープを指標として牛肉及び牛乳並びにこれらを含む加工食品の低アレルゲン化を図ることができる。更に、本発明の免疫学的反応性を有するエピトープには、T細胞とも特異的に反応するエピトープが存在する。このエピトープを指標として、牛肉及び牛乳並びにこれらを含む加工食品のT細胞への反応性の制御を図ることができる。また、本発明の免疫学的反応性を有するエピトープの決定方法によれば、簡便且つ迅速に家畜血清アルブミン中の免疫学的反応性を有するエピトープを決定することができる。

【0019】

【配列表】

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5
 Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
 1 5
 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 6
 Glu-Ser-Lys-
 1
 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7
 Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu-
 1 5
 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 8
 Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-
 1 5
 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 9
 Glu-Asn-Phe-Val-
 1 9

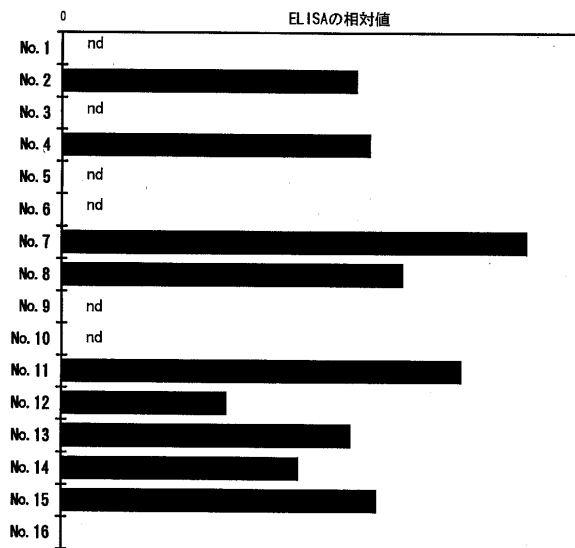
10

【図面の簡単な説明】

【図 1】合成ペプチドに対する I g E の結合性を示す図である。合成ペプチド (No.1 ~ 16) はイムノプレートに

固定され、希釈したプール血清を用いた ELISA に供した。なお、nd は非検出を意味する。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 高畑 能久
茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番地 日本
ハム株式会社中央研究所内

(72)発明者 森松 文毅
茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番地 日本
ハム株式会社中央研究所内
Fターム(参考) 4H045 AA11 BA13 BA14 BA15 BA16
BA17 CA42 DA70 DA86 EA01
EA50 FA10

专利名称(译)	具有家畜血清白蛋白免疫反应性的表位		
公开(公告)号	JP2003252899A	公开(公告)日	2003-09-10
申请号	JP2002057150	申请日	2002-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	日本火腿股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	日本火腿公司		
[标]发明人	田辺創一 西村敏英 高畑能久 森松文毅		
发明人	田辺 創一 西村 敏英 高畑 能久 森松 文毅		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/76		
FI分类号	C07K14/76.ZNA C07K7/06 C07K7/08 G01N33/53.D G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA42 4H045/DA70 4H045/DA86 4H045/EA01 4H045/EA50 4H045/FA10		
代理人(译)	广瀬高见		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供与人或宠物具有免疫反应性的牛血清白蛋白或绵羊血清白蛋白的表位（肽），以及测定具有家畜血清白蛋白的免疫反应性的表位的方法。本发明的方法比较人血清白蛋白和家畜血清白蛋白的氨基酸序列，制备处于不同氨基酸序列的肽，并对其进行免疫反应的免疫学测试。通过这种方法测定的牛血清白蛋白和绵羊血清白蛋白的免疫反应性表位。

