

コチニール色素中の主要 アレルゲンタンパク質の解析

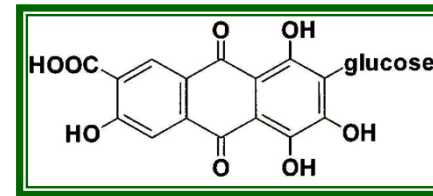


コチニール色素

- ◎ サボテン等に寄生するカイガラムシ科エンジムシ(*Coccus Cacti* L.)の雌の乾燥体から水・エタノール等で抽出される赤色色素
主たる色素はカルミン酸
- ◎ 食品、医薬品、化粧品、染料等に世界各地で使用



cochineal



carminic acid



◎ アレルギー誘発の報告

- ・ 吸入経由 ~ 色素製造業者の職業性喘息等
- ・ 皮膚接触経由 ~ (口紅による)唇の荒れ・出血、アナフィラキシー等
- ・ 飲食物経由 ~ 蕁麻疹、顔面腫脹、アナフィラキシー等
(飲食による発症の多くが成人女性)

飲食物経由のコチニール色素による アレルギーの報告

Kagi et al.,1994/ Kagi & Wuthrich,1996(女性1名)(campari)
Beaudouin et al.,1995/ Moneret-Vautrin,2000(女性1名)(yoghurt)
Wuthrich et al.,1997(女性5名)(campari)
Baldwin et al.,1997(女性1名)(iced lollipop)
Kume et al.,1997(女性1名)(campari,milk,cocktail)
Acero et al.,1998(男性1名)(sweet)*
DiCello et al.,1999(女性2名)(yoghurt,campari)
Chung et al.,1999(女性3名)(artificial club,juice,ice)
Yamakawa.,2004(女性3名)(campari,juice)
Kotobuki et al.,2007(女性1名)(fish cake)
Takeo et al.,2007(女性1名) (campari,milk,sosage)

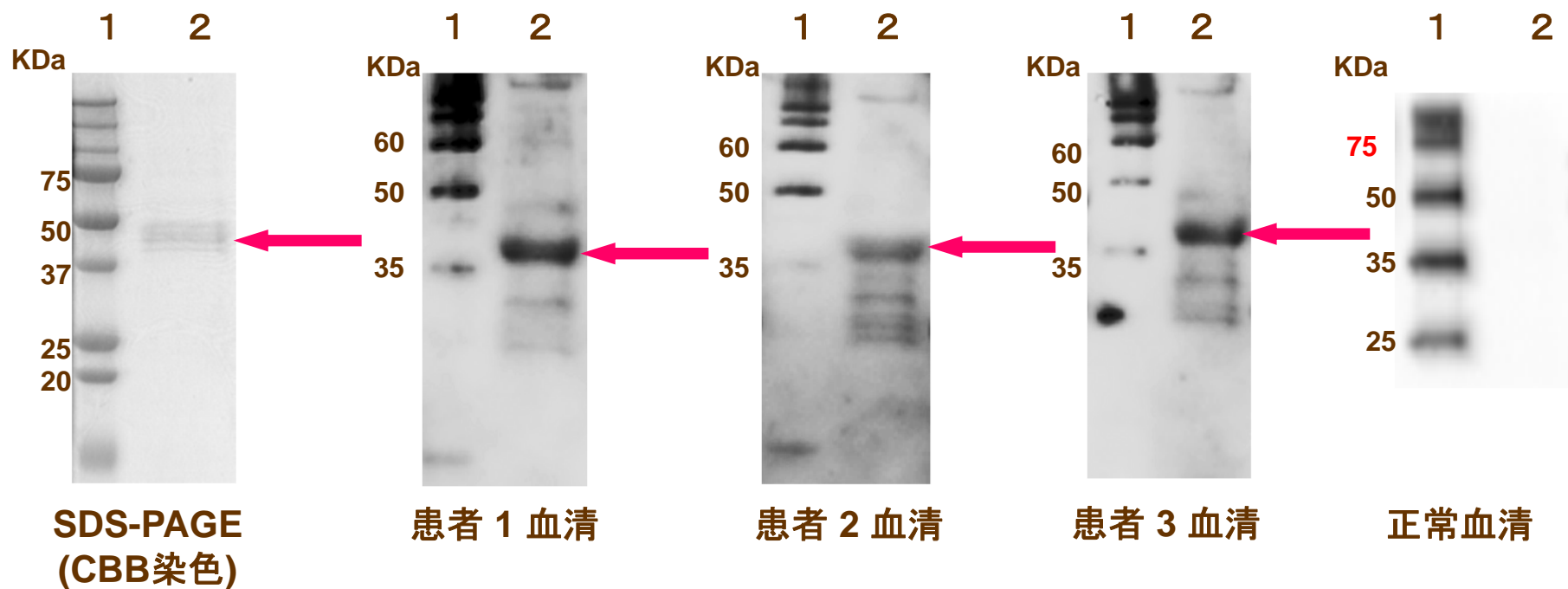
コチニール色素中のアレルギー原因物質として
40-50kDaのタンパク質が示唆されている



～ 本研究の目的 ～

エンジムシ抽出液中に含まれる
アレルギータンパク質を同定する

患者血清によるエンジムシ抽出液中の アレルギータンパク質の検出



試料番号

1 : 分子量マーカー

2 : エンジムシ抽出液

二次抗体 : HRP-label抗ヒトIgE マウス抗体


患者1 : 35歳女性 H10. カンパリオレンジを飲酒後発症
患者2 : 44歳女性 H14. カンパリオレンジを飲酒後発症
患者3 : 52歳女性 H14. イチゴジュースを飲用後発症

単離したcDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列

ATGCCAGTCAGAATGTTGTTTTCCATTCTTATATCTTTAATTTTAGTCTCCGTTGTCGTCGGAAATGAACATTATCCAAAAGTTTCTCCG 90
 M P V R M L F S I L I S L I L V S V V V G N E H Y P K V S P
 GCACAATTTAGTGCAGCATTTCACGGATATGAGCTCCCACAAAAGGA GTGTGCGAGCGGATGAAGTTGATTCTAATGAAGTAAAGTTCTAC 180
 A Q F S A A F H G Y E L P Q K E C R A D E V D S N E V K F Y
 CTGTATACAAGGCAAAATTTACATAAATATGAACTTCATACTGGATATAACTGTCAGTAAATCTTATGAATCTCTTCGAAATTCTACTTAC 270
 L Y T R Q N L H K Y E L H T G Y N C S N S Y E S L R N S T Y
 AATGTCCGCAAAGAAACCAAATTCTTGATTCATGCTTGGACACAATCACCTAAGGACATCAACGACATTATTTATATTTACCTGTATGCC 360
 N V R K E T K F L I H A W T Q S P K D I N D I I Y I Y L Y A
 GAAAACGTCAATGTGATCATGGTGGACTGGTCAATGTATTCGCAAACCTGTAECTATACAGCACCAGTTATGTGGTCATACCAAAGGTA 450
 E N V N V I M V D W S M Y S Q T C N Y N S T S Y V V I P K V
 GCGAAAGCTTTAAGTGATTTAATGAACTGCTAACTGGTTATGGGGCTGTCCCGCAAAGAAGTTCATGTTATTGGTTTTCTTCATGGT 540
 A K A L S D L M K L L T G Y G A V P Q K N F H V I G F L H G
 GCTCATATAGCTGGTATTGCTGGAAAATACATAAGCCCCTTAAGGATCTCACGTATCTCAGGATTGGACCCTGTCCGGCTATAATATCGAC 630
 A H I A G I A G K Y I S P L R I S R I S G L D P V G Y N I D
 GGTACTGCACTACCGGTGCTGCAAAATGGAGATGCTGACTTTATTGATGTAATCTACACTAGCATAGAATATTATGGTACCCAGAGACAA 720
 G T A L P V L Q N G D A D F I D V I Y T S I E Y Y G T Q R Q
 ATAGGTGACCTGTCCTTTTACCCTGATAGAGGTACTCATCCTCAAAAACAATGTCCGCCCGACCCTAATGAATGGGTCTGCAGTGCTCTA 810
 I G D L S F Y P D R G T H P Q K Q C P P D P N E W V C S A L
 GCAAGTATTAATATTGGCGAGAATCGATTACTTCACCTACGGCATTCTCAGCCATACGTTGCGATAATTATGTACAGTACCATGAAAGT 900
 A S I K Y W R E S I T S P T A F S A I R C D N Y V Q Y H E S
 CGCTGTCCAGGCCCTAATACAATATGGGCGAATATGCCAGTCGAAACGCACCATTGGTAAATATTACCTGAATACGAATCCTGAACCG 990
 R C P G P N T T M G E Y A S R N A P F G K Y Y L N T N P E P
 CCATACAGTCAATCGTAA 1008

●:シグナル配列、●:N1、●:N2、●:I1、●:糖鎖結合可能部位

P Y S Q S *

335アミノ酸からなる分子量概ね38KDaのタンパク質をコードしていた。
 4種の精製タンパク質の全てのN末端および内部配列を有していた  このタンパク質をCC38Kと命名
 ことから、精製タンパク質をコードしていると考えられる。

CC38Kとハチ phospholipase A₁の アミノ酸配列の比較

cochineal	1	M P V R M L E S I I I S I I I L V S V V V G N E H Y P K V S P A Q F S A A F H G Y E L P Q K E	GRADEVDSNEVKFY	60
Dol m 1.01	1	-----	RLIMFVGDPSSENELDRFVSVCPPSNDTV	28
Dol m 1.02	1	-----	-----GILPECKLVPEEI	13
Pol a 1	1	-----	-----MSPDCTFNEKDI	12
Ves v 1	1	-----	-----MEENMNLKYLLLFVYFVQVLNCCYGHGDPLSYELDRGPKCPFNSDTV	47
Ves m 1	1	-----	-----PKCPFNSDTV	10
cochineal	61	L Y T R Q N L H K Y E L H T G Y N C S N S Y E S L R N S T Y N V R K E T K F L I H A W T Q S P - - K D I N D I I Y I Y L	118	
Dol m 1.01	29	K M I F L T R E N R K H D F Y T L D T M N R H N E F K K S I I K - R P V V F I T H G F T S S A T E K N F V A M S E A L M	87	
Dol m 1.02	14	S F V L S T R E N R D G V Y L T L Q K L K N G K M F K N S D L S S K K V P F L I H G F I S S A T N K N Y A D M T R A L L	73	
Pol a 1	13	V F Y V Y S R D K R D G I I L K K E T L T N Y D L F T K S T I S - K Q V V F L I H G F L S T G N N E N F V A M S K A L I	71	
Ves v 1	48	S I I I E T R E N R N R D L Y T L Q T L Q N H P E F K K K T I T - R P V V F I T H G F T S S A S E T N F I N L A K A L V	106	
Ves m 1	11	S I I I E T R E N R N R D L Y T L Q T L Q N H P E F K K K T I T - R P V V F I T H G F T S S A S E K N F I N L A K A L V	69	
cochineal	119	Y A E N V N V I M V D W S M Y S Q T C N Y N S T S Y V V I P - - - - - K V A K A L S D L M K L L T G Y G A V P Q K N	171	
Dol m 1.01	88	H T G D F L I I M V D W R M A A C T D E Y P G L K Y M F Y K A A V G N T R L V G N F I A M I A K K L V E Q Y K V P M T N	147	
Dol m 1.02	74	D K D D I M V I S I D W R D G A C S N E F A L L K F I G Y P K A V E N T R A V G K Y I A D F S K I L I Q K Y K V L L E N	133	
Pol a 1	72	E K D D F L V I S V D W K K G A C N A F A S T K D A L G Y S K A V G N T R H V G K F V A D F T K L L V E K Y K V L I S N	131	
Ves v 1	107	D K D N Y M V I S I D W Q T A A C T N E A A G L K Y L Y S P T A A R N T R L V G Q Y I A T I T Q K L V K H Y K I S M A N	166	
Ves m 1	70	D K D N Y M V I S I D W Q T A A C T N E Y P G L K Y A Y P T A A S N T R L V G Q Y I A T I T Q K L V K D Y K I S M A N	129	
cochineal	172	F H V I G F L H G A H I A G I A G K Y I S P L R I S R - - - I S G L D P V G Y N I D G T A L P V - L Q N G D A D F I D V	227	
Dol m 1.01	148	I R L V G H S L G A H I S G F A G K R V Q E L K L G K F S E I I G L D P A G P S F K K N D C S E R I C E T D A H Y V Q I	207	
Dol m 1.02	134	I R L I G H S L G A Q I A G F A G K E F Q R F K L G K Y P E I I G L D P A G P S F K K K D C P E R I C E T D A H Y V Q I	193	
Pol a 1	132	I R L I G H S L G A H T S G F A G K E V Q K L K L G K Y K E I I G L D P A G P Y F H R S D C P D R L C V T D A E Y V Q V	191	
Ves v 1	167	I R L I G H S L G A H A S G F A G K K V Q E L K L G K Y S E I I G L D P A R P S F D S N H C S E R L C E T D A E Y V Q I	226	
Ves m 1	130	I R L I G H S L G A H V S G F A G K R V Q E L K L G K Y S E I I G L D P A R P S F D S N H C S E R L C E T D A E Y V Q I	189	
cochineal	228	I Y T S I E Y Y G T Q R Q I G D L S F Y P D R G T H P Q K Q C P P D P N E W V C S A L A S I K Y W R E S I T S P T A F S	287	
Dol m 1.01	208	L H T S S - N L G T E R T L G T V D F Y I N N G S N - Q P G C R Y I I G E - T C S H T R A V K Y F T E C I R R E C C L I	264	
Dol m 1.02	194	L H T S S - N L G T E R T L G T V D F Y I N D G S N - Q P G C T Y I I G E - T C S H T R A V K Y L T E C I R R E C C L I	250	
Pol a 1	192	I H T S I - I L G V Y Y N V G S V D F Y V N Y G K N - Q P G C N - - - E P - S C S H T K A V K Y L T E C I K H E C C L I	245	
Ves v 1	227	I H T S N - Y L G T E K I L G T V D F Y M N N G K N - Q P G C R F F S E - V C S H S R A V I Y M A E C I K H E C C L I	283	
Ves m 1	190	I H T S N - Y L G T E K I L G T V D F Y M N N G K N - N P G C R F F S E - V C S H T R A V I Y M A E C I K H E C C L I	246	
cochineal	288	A I R C D N - - Y V Q Y H E S R C P G P N T T - M G E Y A S R N A P F G K Y Y L N T N P E P P Y S Q S - - - -	335	
Dol m 1.01	265	G V P Q S K - - - N P Q P V S K C T R N E C V C V G L N A K K Y P K R G S F Y V P V E A E A P Y C N N N G K I I	317	
Dol m 1.02	251	G V P Q S K - - - N P Q P V S K C T R N E C V C V G L N A K E Y P K K G S F Y V P V E A K A P F C N N N G K I I	303	
Pol a 1	246	G T P W K K Y F S T P K P I S Q C R G D T C V C V G L N A K S Y P A R G A F Y A P V E A N A P Y C H N E G I K L	301	
Ves v 1	284	G I P K S K - - - S S Q P I S S C T K Q E C V C V G L N A K K Y P S R G S F Y V P V E S T A P F C N N K G K I I	336	
Ves m 1	247	G I P R S K - - - S S Q P I S R C T K Q E C V C V G L N A K K Y P S R G S F Y V P V E S T A P F C N N K G K I I	299	

Phospholipase A₁ 1 precursor (Allergen Dol m 1.01)(Accession Q06478) と高い相同性が認められた。

まとめ

- ◎ エンジムシ主要タンパク質を精製し、それらをコードするcDNAを単離した。(このタンパク質をCC38Kと命名)
- ◎ CC38Kのアミノ酸配列は、リパーゼ関連タンパク質、昆虫においてはハチのアレルゲンであるホスホリパーゼA₁と高い相同性を示した。
- ◎ 組換えCC38Kタンパク質が患者血清と免疫反応性を示すことを確認した。



以上の結果より、

CC38Kがコチニール色素中に存在する**主要アレルゲンタンパク質**であると推定した。また、CC38Kは、そのアミノ酸配列の特徴から、エンジムシの**分泌性リパーゼ様タンパク質**であると推定された。