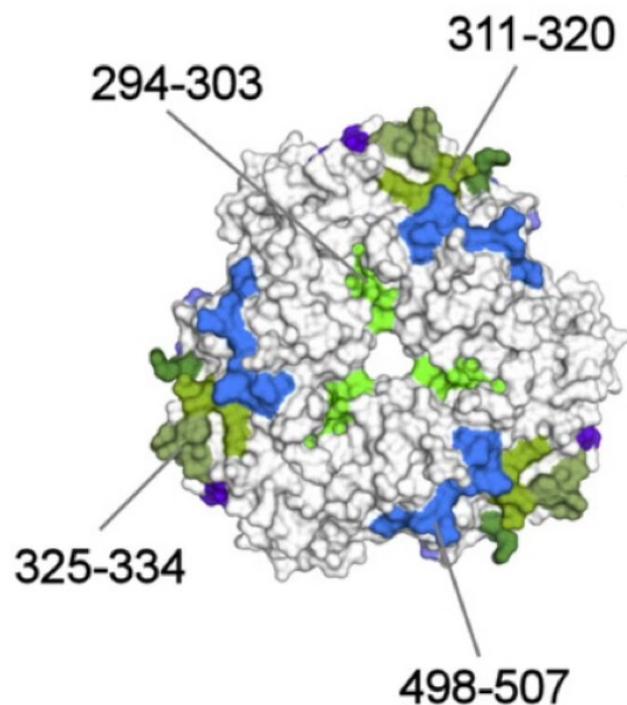


課題名

アレルギー誘発性を有する植物に由来するタンパク質の網羅的消化性評価



Ara h 1 エピトープの例

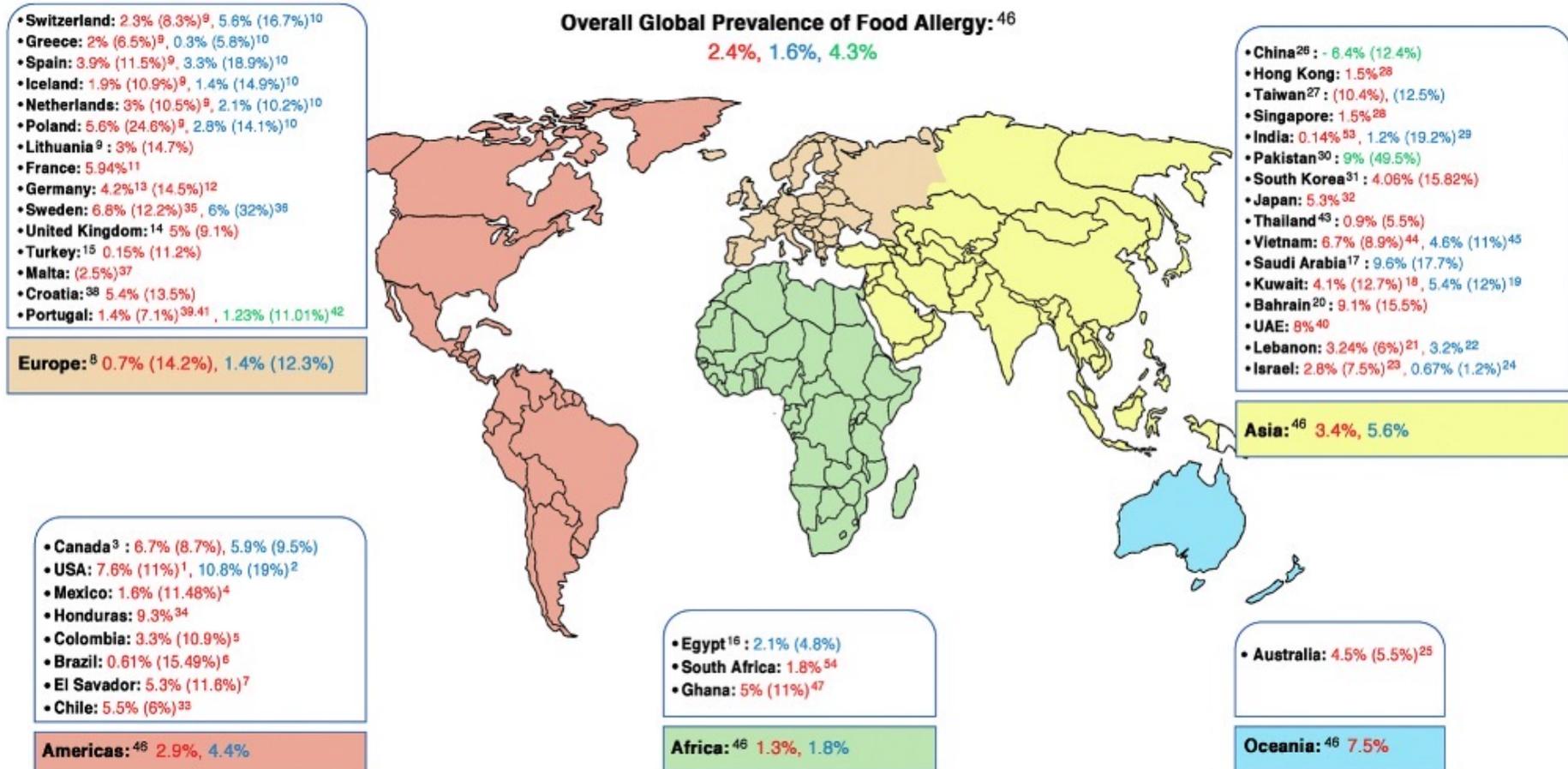
J. BIOL. CHEM. VOL.286,NO.45,pp.39318-39327

研究代表：児玉 浩明
(千葉大学 大学院園芸学研究院)

メンバー：
宮原 平 (千葉大学 大学院園芸学研究院)
西内 巧 (金沢大学 疾患モデル総合研究センター)

食物アレルギーの有病率

Bartha et al. (2024) J Allergy Clin Immunol. 153: 576-594



食物アレルギーの有病率：高い国では、10%を超える
この図の中では、日本は5.3%となっている。

この図の中では、日本は5.3%となっている。 ➡ 元になったデータ



生成AIによるイラスト

調査対象：川崎市の保育園児
食物アレルギーの有病率：5.3%

食物アレルギー上位5種

鶏卵（73%）

牛乳（29.3%）

ナッツ類（9.7%）

ダイズ（8.9%）

コムギ（6.5%）

Kaneko et al. (2021) Asian Pac J Allergy Immunol. 39: 117-123

各食物アレルギーの抗原の多くはタンパク質（以下に主要アレルゲンを示す）

鶏卵：オボムコイド（Gal d 1）

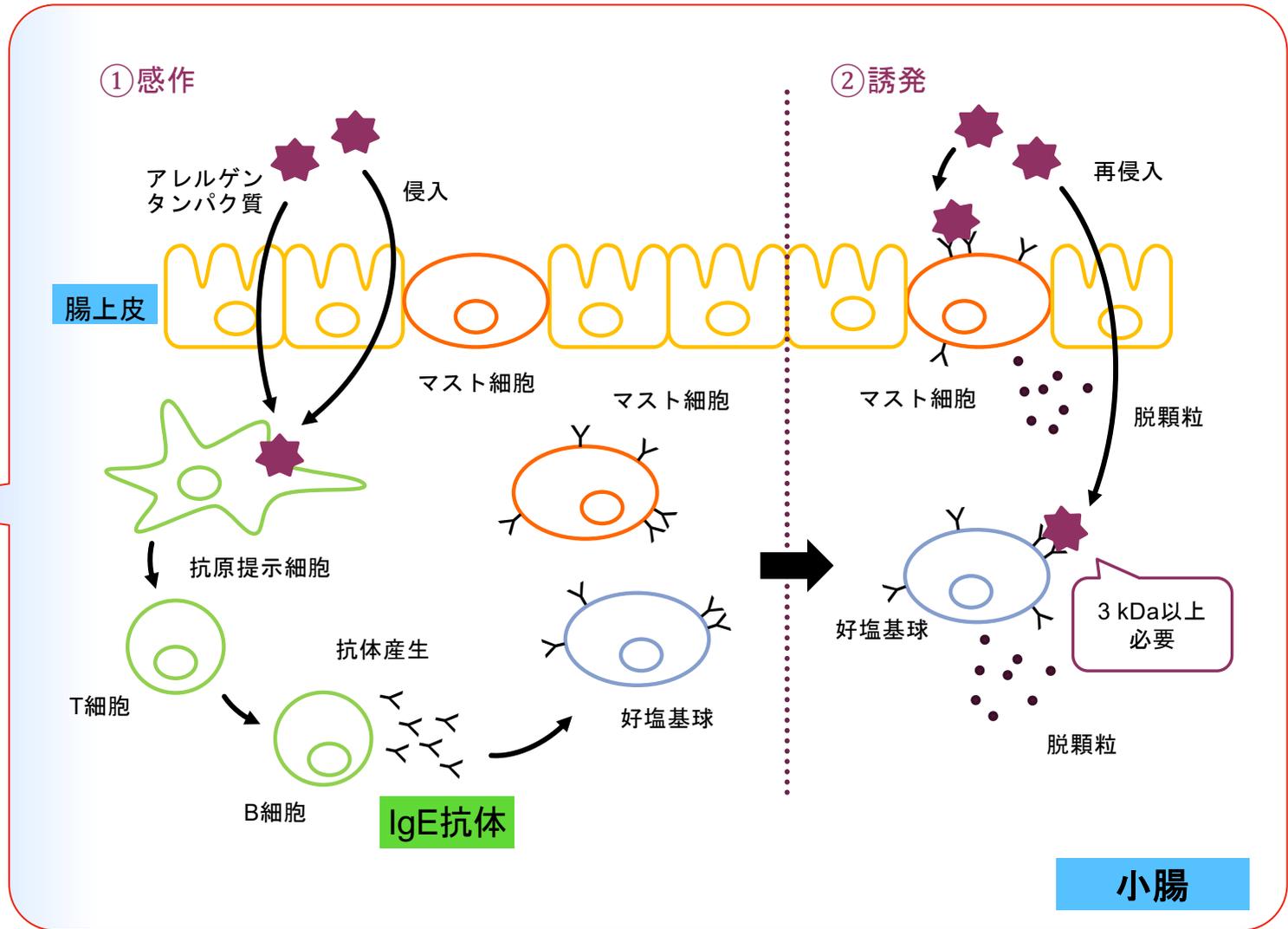
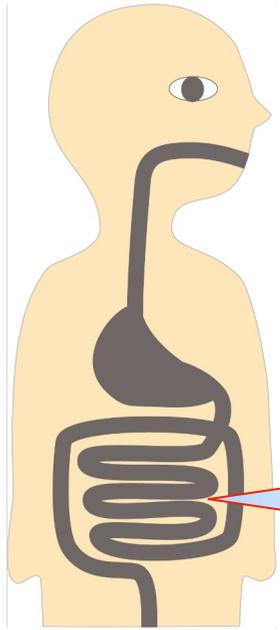
牛乳：カゼイン（Bos d 8）

ナッツ類：2Sアルブミン（Ara h 2 など）、クピン（Ara h 1 など）

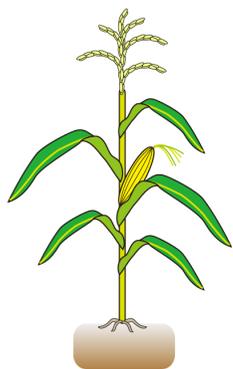
ダイズ：PR-10（Gly m 4）

コムギ： ω -5グリアジン（Tri a 19）

腸粘膜におけるアレルギー誘発機構



胃で十分に分解されれば、アレルギーは誘発されにくい。
3 kDa以下に分解されれば、アレルギーは誘発されにくい。



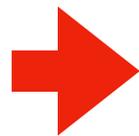
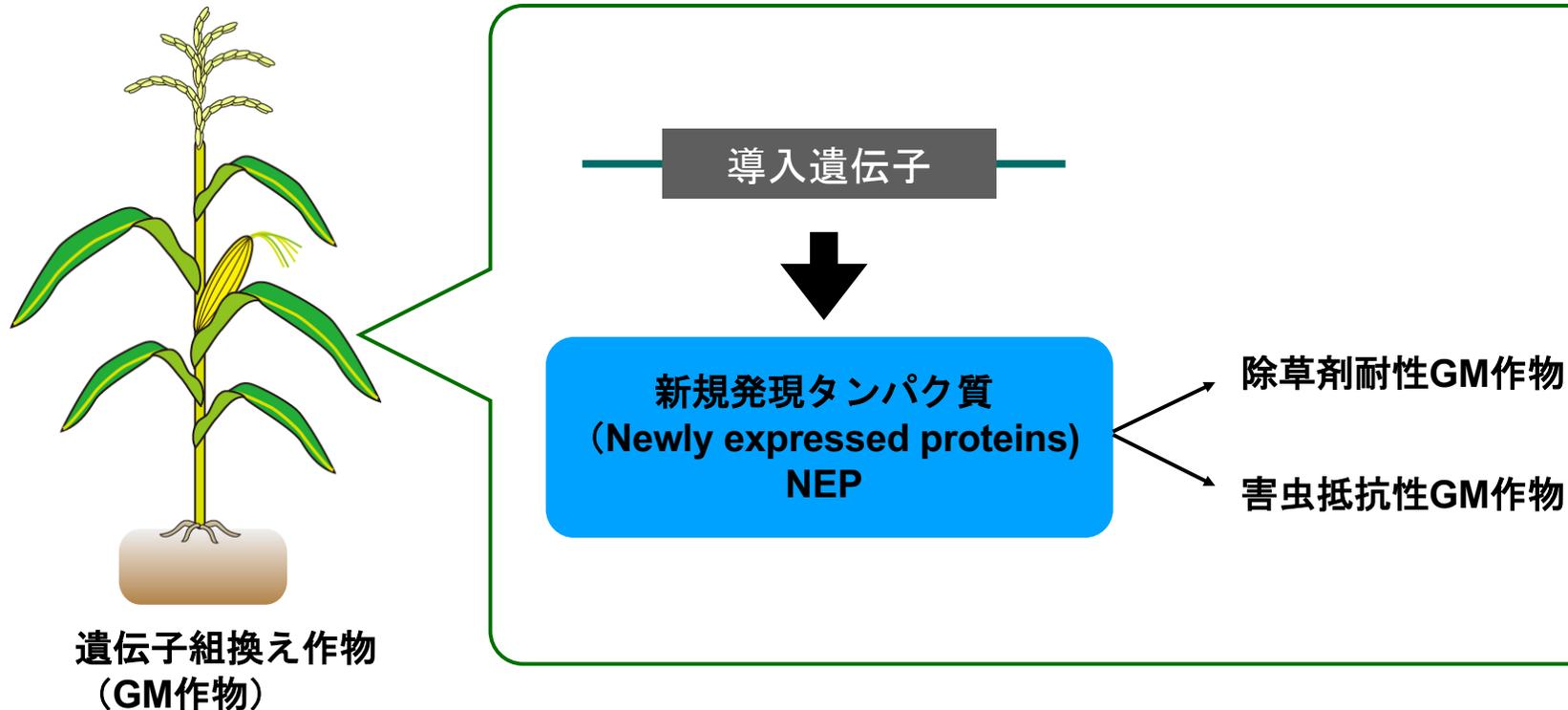
遺伝子組換え作物の食品・飼料の安全性審査の流れ



遺伝子組換え作物

	シングルイベントの承認数		
	Category 1	Category 2	Category 3
ジャガイモ	8	4	0
ダイズ	14	5	0
ビート	3	0	0
トウモロコシ	43	1	0
ナタネ	18	1	2
ワタ	22	0	0
アルファルファ	2	1	0
パパイヤ	1	0	0
カラシナ	1	0	0
総数 (126)	112	12	2

遺伝子組換え作物は、NEP（新規発現タンパク質）を作る



NEPの安全性の評価は重要

(アレルギー誘発性、タンパク質毒性)

遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針

第1 評価対象品目の概要

第2 食品健康影響評価において比較対象として用いる既存品種の性質に関する事項

第3 遺伝子組換え体の利用目的、利用方法及び既存品種との相違に関する事項

第4 挿入DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項

第5 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項

1 遺伝子導入に関する事項

2 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

3 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項

4 **遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項**

（1）導入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見。

（2）遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する知見

（3）遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

③ 加熱処理

（4）遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

（5）遺伝子産物(タンパク質)のIgE結合能に関する事項

5 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項

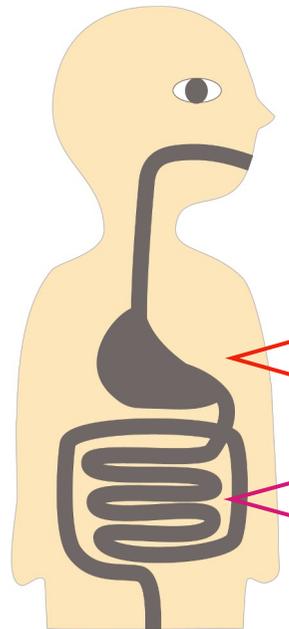
第6 第2から第5までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項



第5-4 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

判断基準：人工胃液で、3.5 kDa 未満にまで分解されること

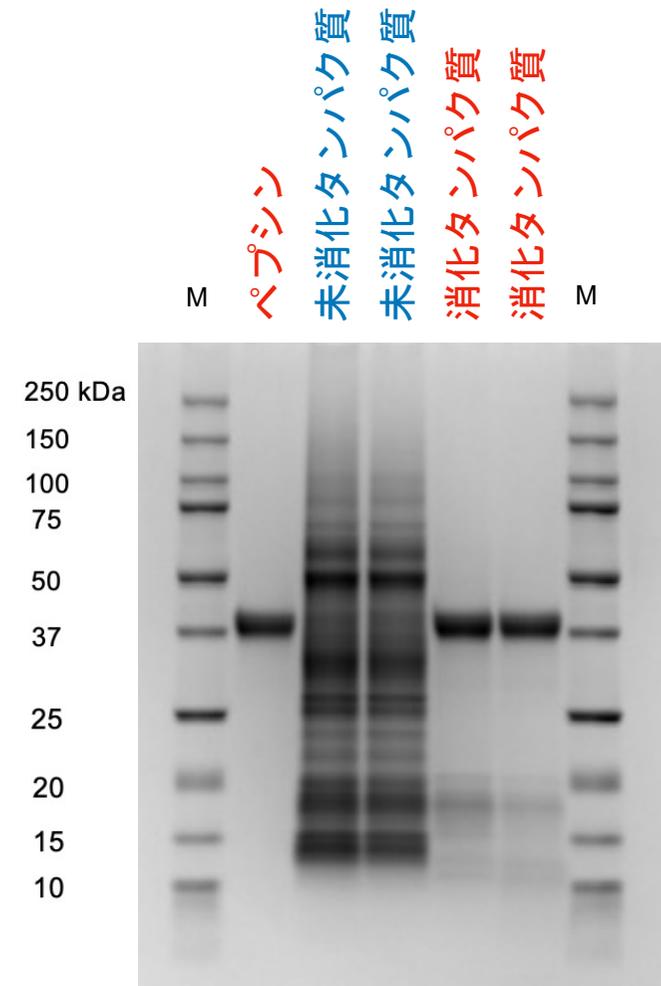


人工胃液に対する消化性試験
(ペプシン消化)

人工腸液に対する消化性試験
(パンクレアチン or トリプシン消化)



小腸の免疫機構への
暴露量の推定



第5-4 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

（4）遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

判断基準：80アミノ酸の配列に対して35%未満の相同性であること
一致する8つの連続するアミノ酸配列がないこと

アレルゲンとの アミノ酸配列 相同性	アレルギー誘発性可能性
80%以上	誘発する可能性 大
50%～80%	
35%～50%	
35%未満	誘発する可能性 極めて小さい

第5-4 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項
 (4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

ピーナッツ Ara h 2

25' WELQGD~~RR~~CQSQ~~LER~~ANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYGRDPYSPSQDPYSPSQDPDRRDPY
 * * **

タルウマゴヤシ 2S albumin

1" MARHNILLMASLLALVIFISQATATRKSDRPDERCRMQLQRLNLNHCEKHLMQRIQKEDG

85' SPSYDRRGAGSSQH~~QERCCNELNEFENNQRCMCEALQQIMENQSDRLQGRQQEQQFKRE~~
 * * * * * * * *

61" DVLRMRGINYQEE~~DLKEKCCNQLSEVNNKE-CRCNALQEIMENLSDRL-GKREMYEMERE~~

145' LRNL~~PQCGLRAPQRC~~DLEVESG
 * * * * *

119" VRNL~~PKRCNIPQSSECDLS~~FDQY

連続する8アミノ酸一致
 する配列はない

➡ こちらは Safe

全体としては、相同性：24.8% (35/141)

80アミノ酸の部分 (■) でみると、相同性：38.8% (31/80)

↓
 こちらは Out ➡ さらなるデータ要求の可能性

第5-4 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

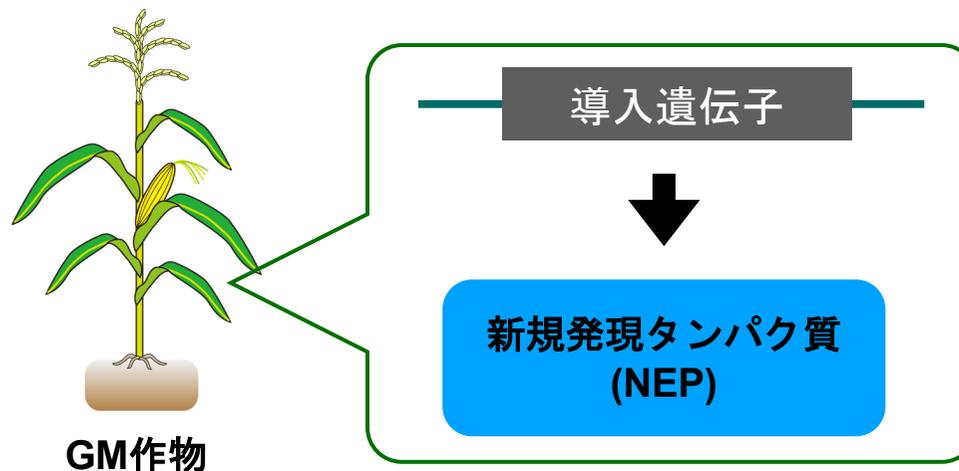
（3）遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

（4）遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

現在の評価指針では、GM作物のNEPは以下の基準で評価される。

①人工胃腸液試験で十分に消化されること

②NEPのアミノ酸配列が、アレルゲンタンパク質と相同性が低いこと



現在の評価指針では、NEPは以下の基準で評価される。

- ①人工胃腸液試験で十分に消化されること → 人工胃液、人工腸液で 3.5 kDa以下に分解
- 免疫原性の下限：3.5 kDa

問題点

→ 消化によるタンパク質の加水分解に対する食物アレルギーの安定性情報量は比較的乏しい

→ 人工胃腸液試験は、アレルギー誘発性の評価において「poor indicator」である
Herman et al. (2006) Environmental Health Perspectives 114: 1154-1157

→ ペプシン消化は評価するものの、パンクレアチン消化は国によっては要求されない

→ 食品安全委員会のリスク評価において
人工胃液では分解される必要があるが、人工腸液は、かならずしも分解される必要はない

この評価方法の妥当性について
長年、議論がある

端的には、人工胃腸液試験は
必須評価項目である必要はないのでは？



遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

- ① 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理
- ② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理
- ③ 加熱処理

評価基準

人工胃液、人工腸液で 3.5 kDa以下に分解

消化性テストは
必須の評価項目
から外してはどうか？

人工腸液試験の
必要性がわからない

消化性テストと相同性検索は、補完する関係（つまり相関）にあるのか？

遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

評価基準

80 アミノ酸ウィンドウサーチで、35%未満の相同性である
8 mer のアミノ酸配列完全一致はない

アレルゲンとの
構造相同性だけで
評価できるのでは？

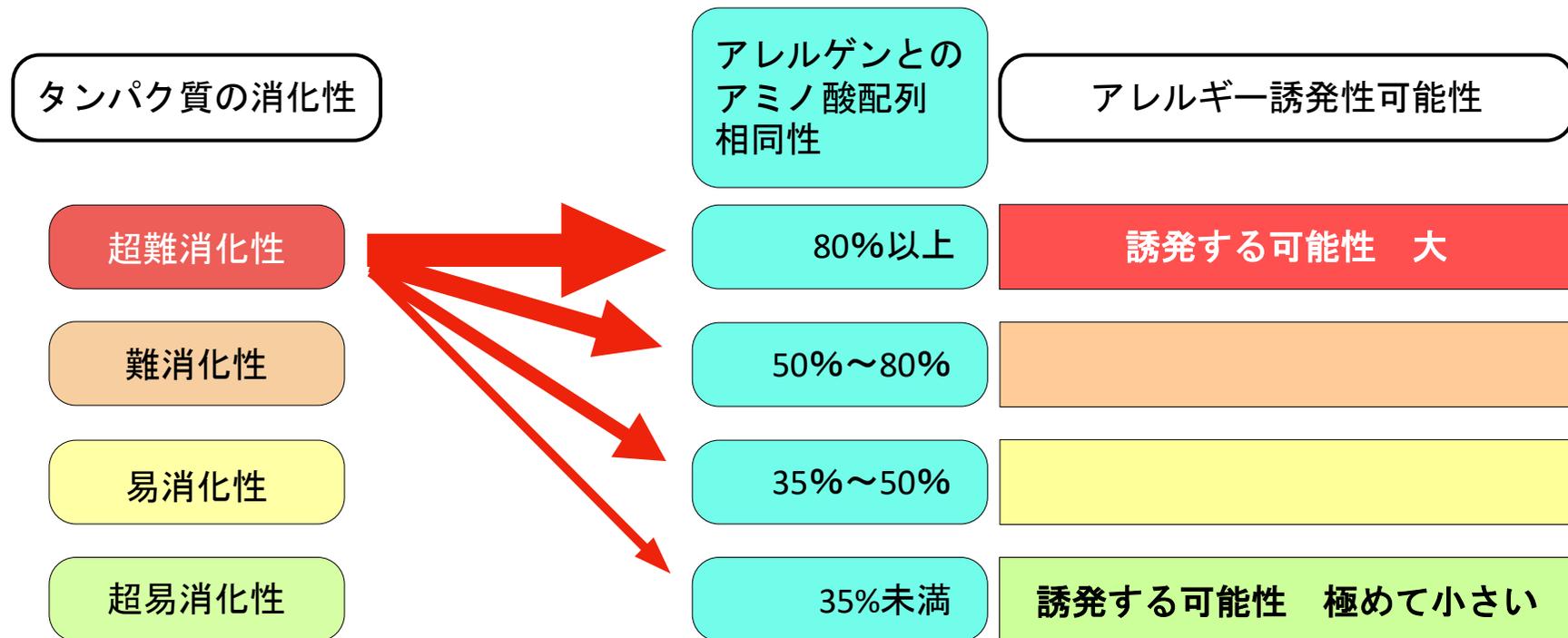
背景

遺伝子組換え食品で新たに発現するタンパク質（Newly Expressed Protein, NEP）の評価

消化性テストと相同性検索は、補完する関係（つまり相関）にあるのか？

➡ 調べられた例はない

仮説 アレルゲンタンパク質の消化性を調べても意味は限定的。



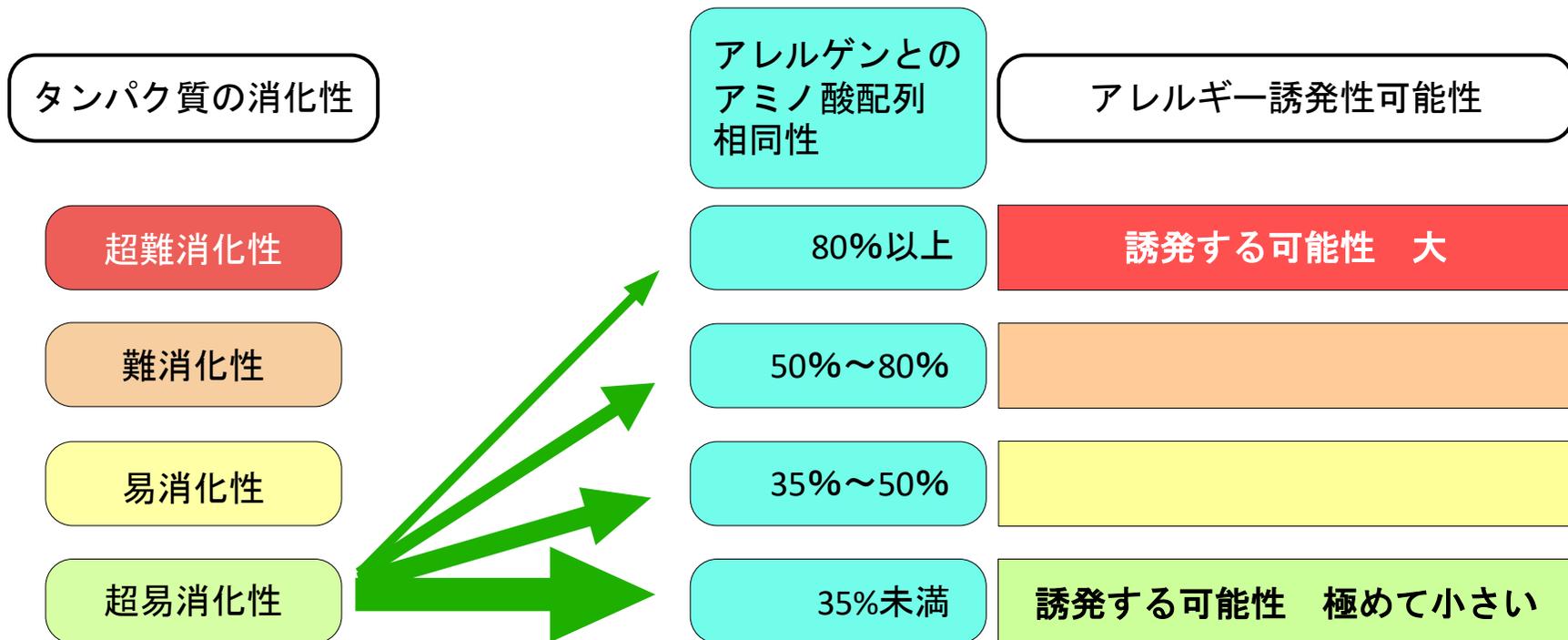
背景

遺伝子組換え食品で新たに発現するタンパク質（Newly Expressed Protein, NEP）の評価

消化性テストと相同性検索は、補完する関係（つまり相関）にあるのか？

➡ 調べられた例はない

仮説 アレルゲンタンパク質の消化性を調べても意味は限定的。



アレルゲンとして知られる食品

各タンパク質のペプシン消化、トリプシン消化による分解されやすさを指標化



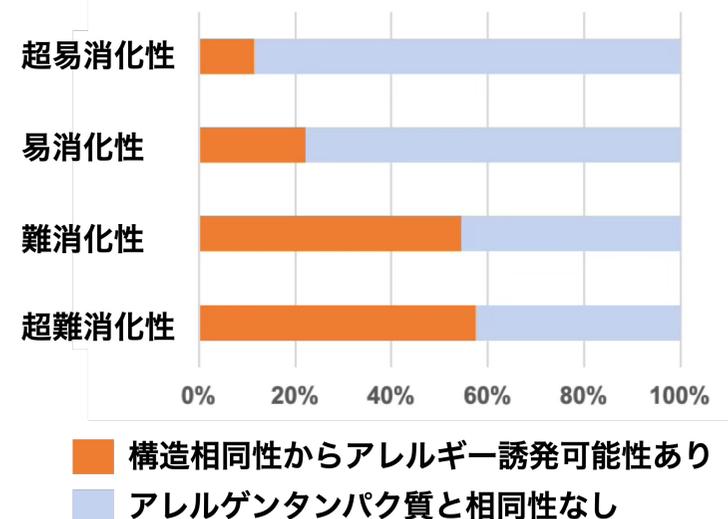
- 1) 超易消化性
- 2) 易消化性
- 3) 難消化性
- 4) 超難消化性



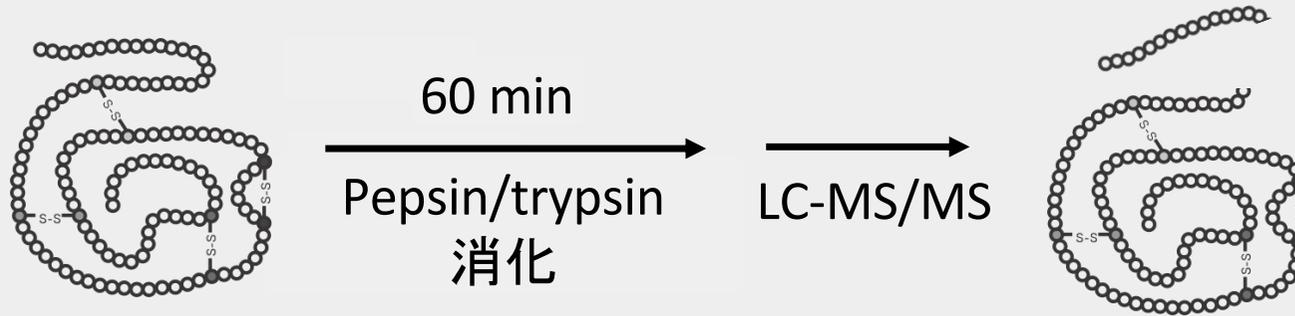
指標化された各タンパク質のアミノ酸配列についてアレルゲンデータベースとの照合を行う構造相同性検索 (80アミノ酸ウィンドウにおける35%以上の相同性、8merの一致)



消化性テストと構造相同性検索による判定と相関があれば (右図)、消化性テストに意味があるということになる

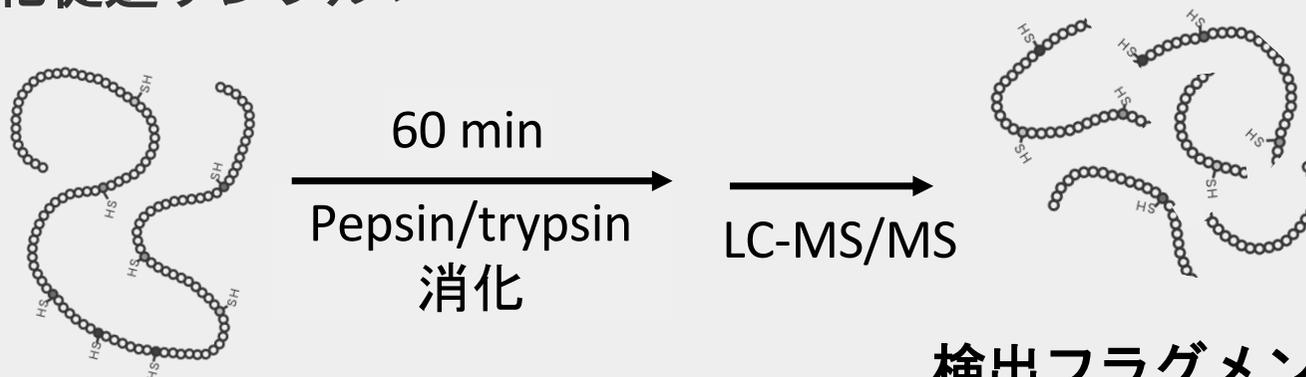


< 通常消化 サンプル >



↓ **変性剤** & 還元剤

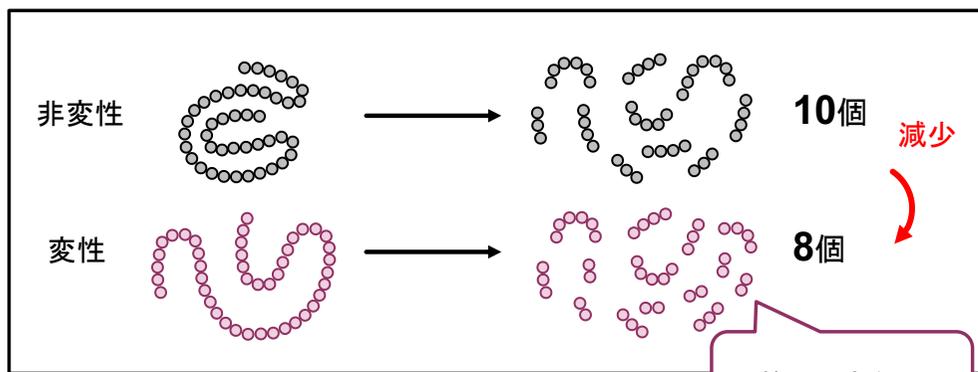
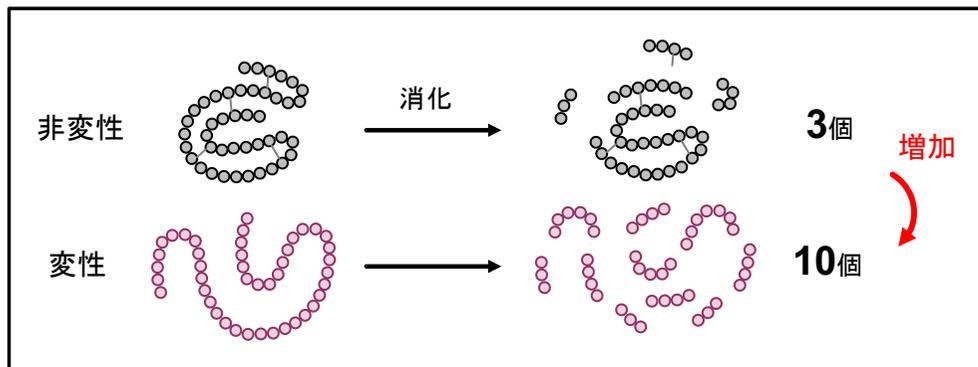
< 消化促進サンプル >



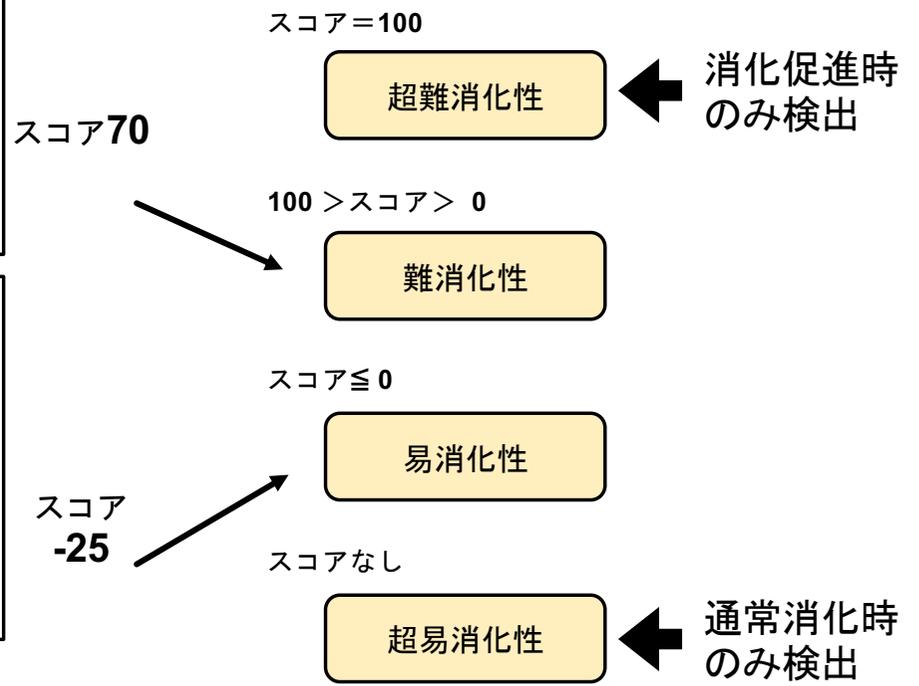
検出フラグメント数の
増加

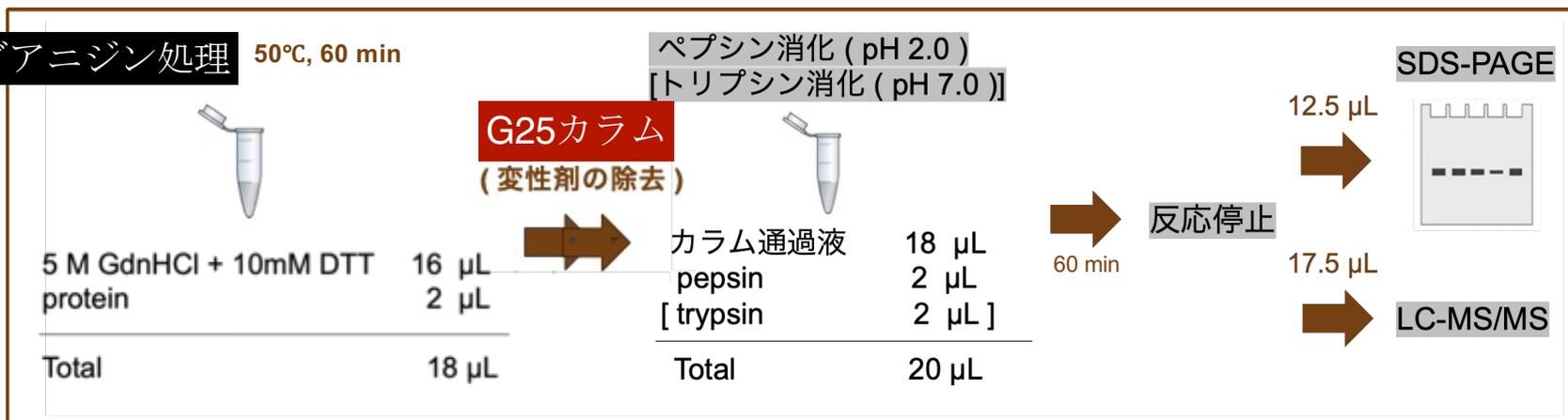
消化抵抗性スコア
 $= 100 - (A / B) \times 100$
A = 非変性消化時のペプチド配列数
B = 変性消化時のペプチド配列数

検出されたペプチド配列数

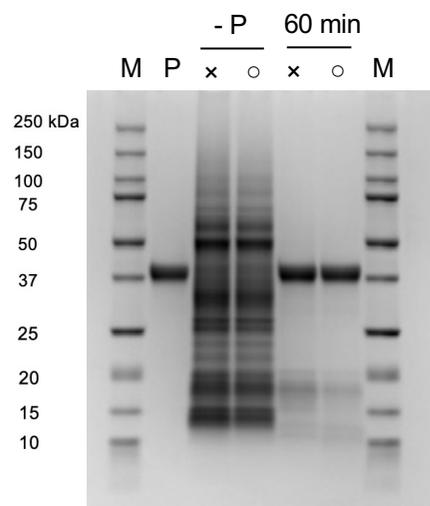


検出できない





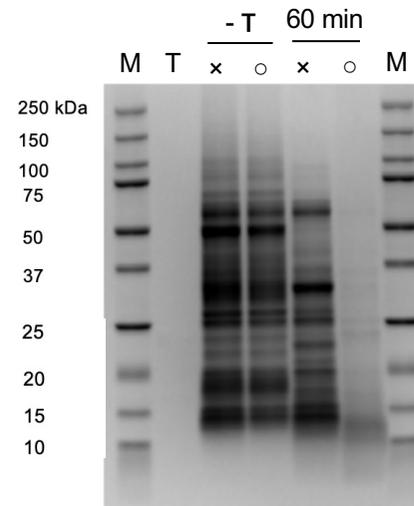
< ペプシン消化 >



通常消化

変性処理により消化促進

< トリプシン消化 >

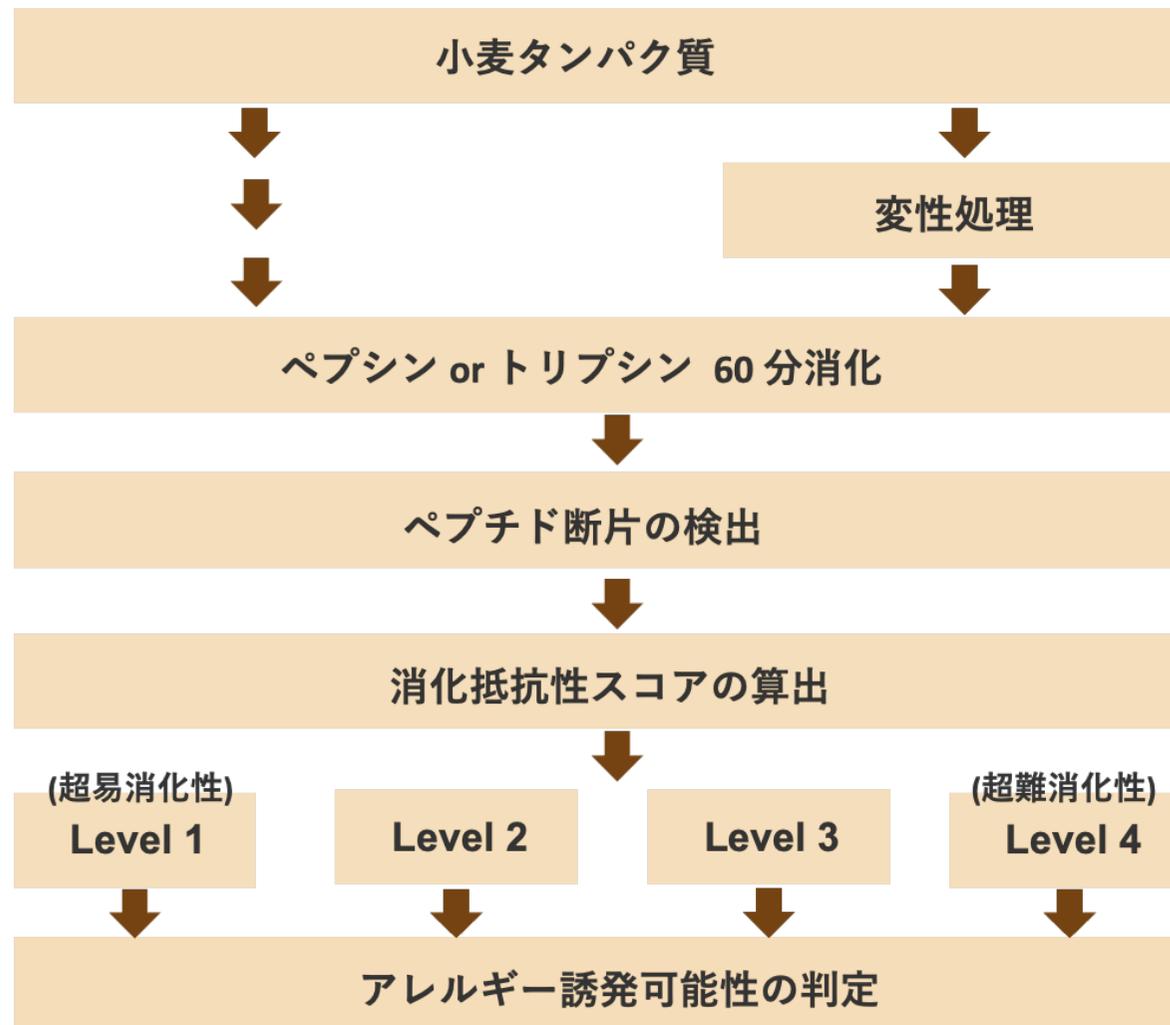


通常消化

変性処理により消化促進

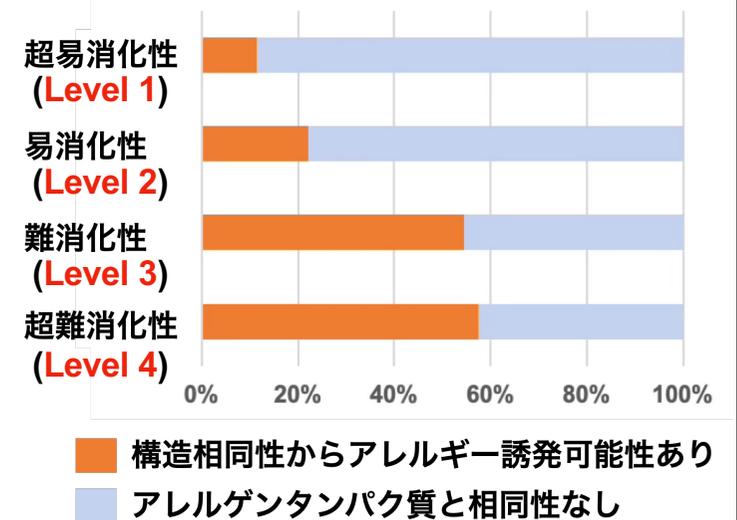
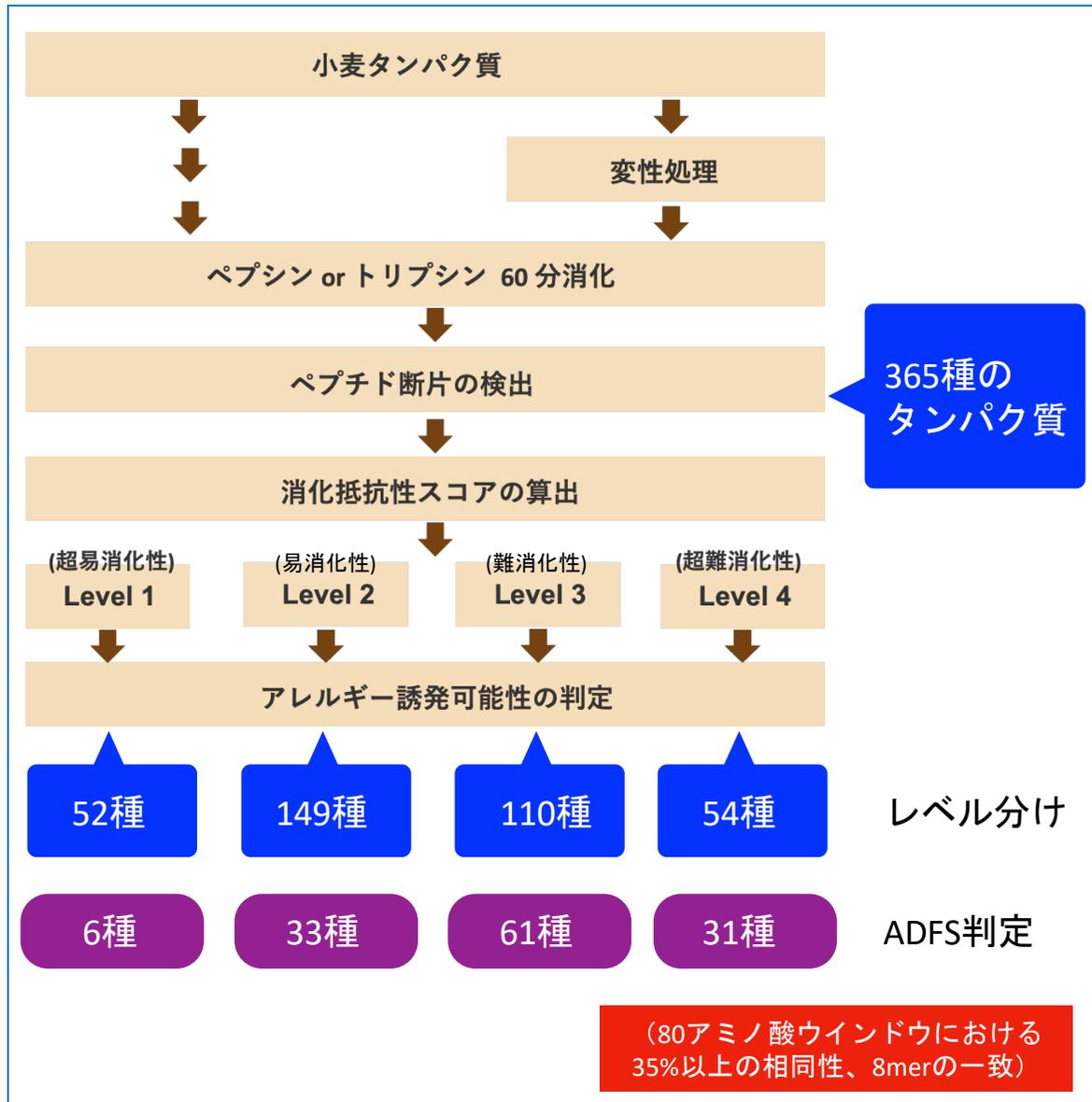
M : 分子量マーカー
P : ペプシン
T : トリプシン

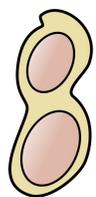
o : 塩酸グアニジン処理あり
x : 未処理



アレルゲンのデータベースサイト
Allergen Database for Food Safety
(<https://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>)
アレルゲン予測ツール

(80アミノ酸ウインドウ
における35%以上の相同
性、8merの一致)

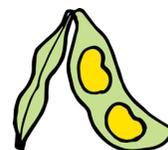




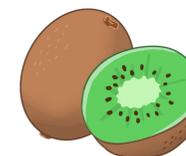
ピーナッツ



コムギ



ダイズ

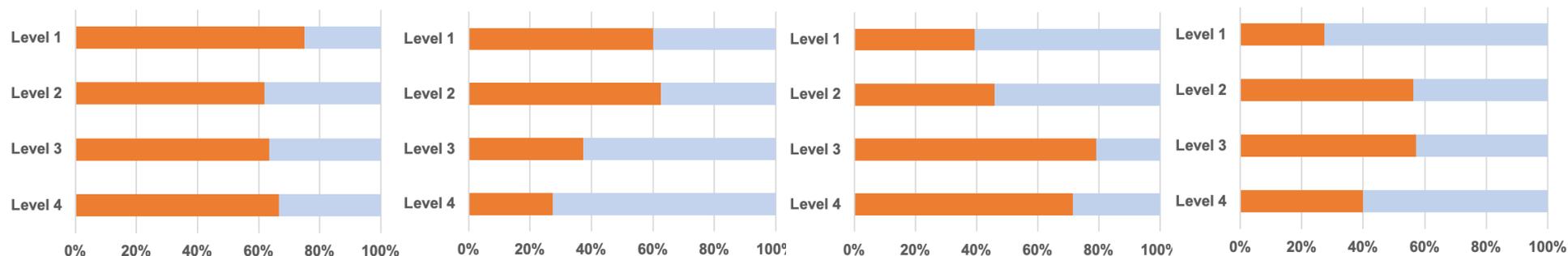


キウイ

ペプシン消化性とアレルギーとの相同性

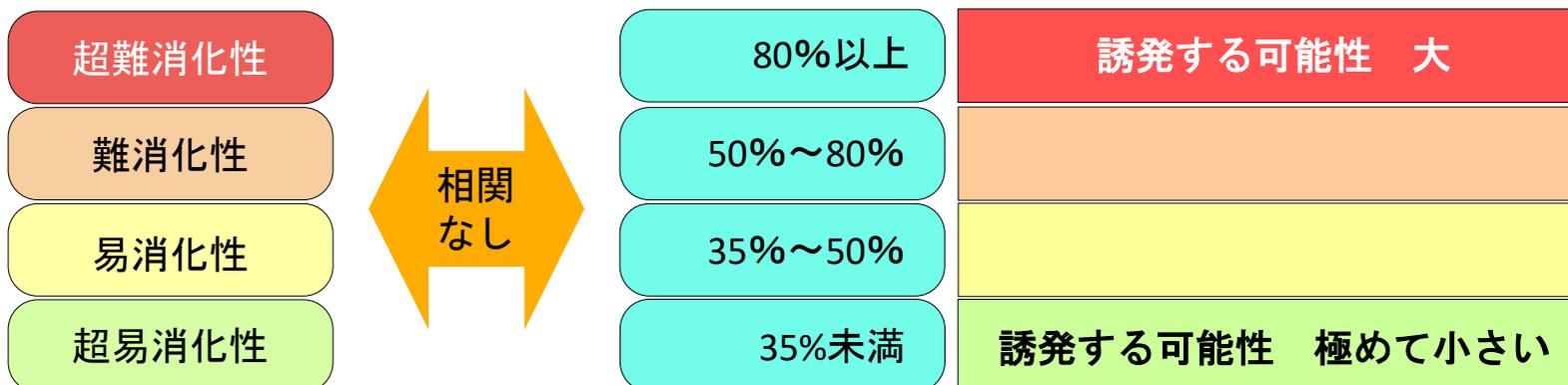
アレルギー誘発可能性あり

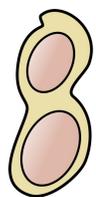
アレルギー誘発可能性なし



ペプシン消化性と既知アレルギーとの構造相同性には相関がない

相関係数：-0.2

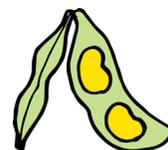




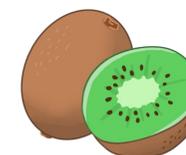
ピーナッツ



コムギ



ダイズ

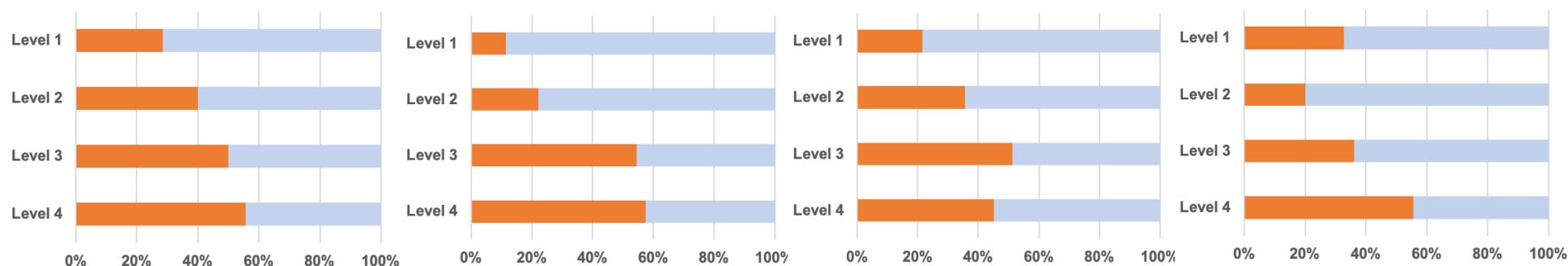


キウイ

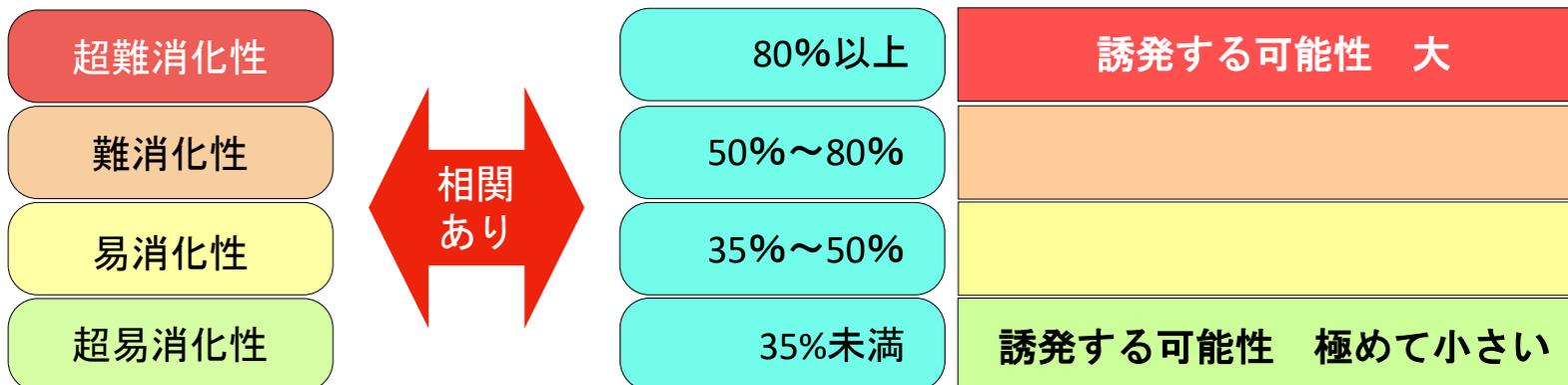
トリプシン消化性とアレルギーとの相関性

アレルギー誘発可能性あり

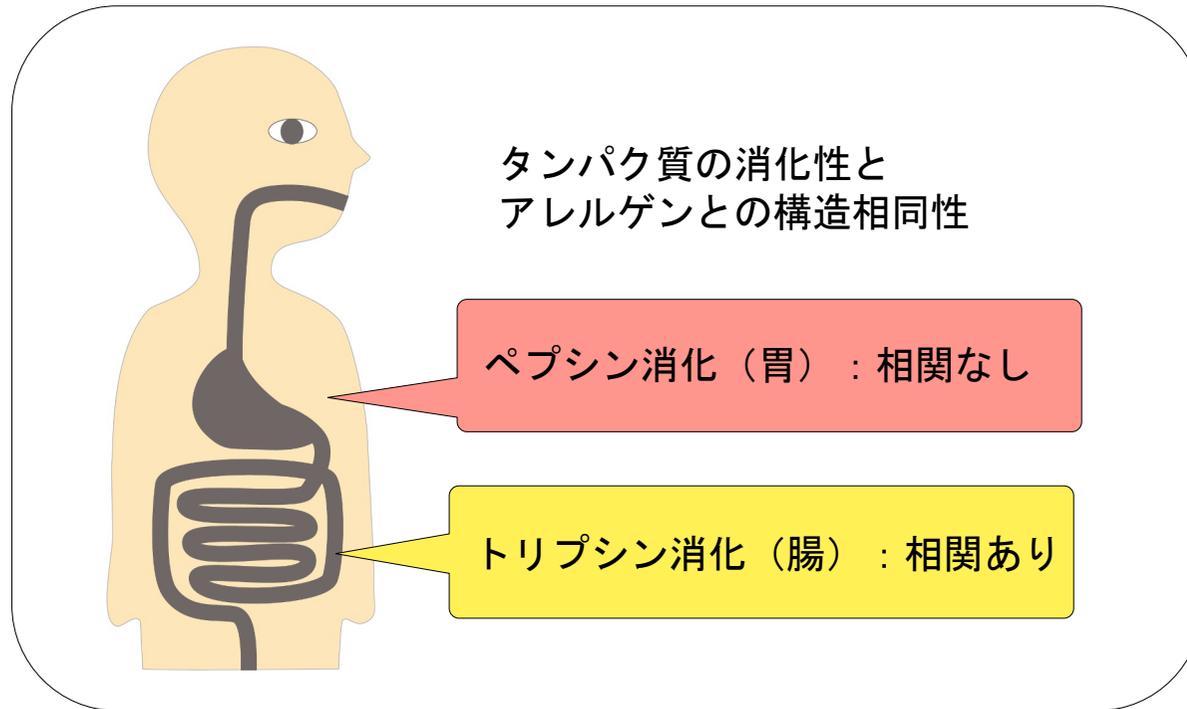
アレルギー誘発可能性なし



トリプシン消化性と既知アレルギーとの構造相関性に相関がある 相関係数：0.84



今回の研究成果



→ 小腸に「生のタンパク質」が届くのは、問題がある

研究成果から考察されること

腸管まで未変性の状態でタンパク質が届く条件が想定される場合、腸管での消化性が重要となる

想定例) 単一のタンパク質を一度に多量に摂取するケース

非常に固い物性に守られた状態で摂取するケース

ペプシン消化に抵抗性を示すタンパク質

腸管が未発達な幼児が摂取すると想定されるタンパク質

健康影響評価指針への提案

今後増えるであろう、精密発酵では、組換えタンパク質を一度に多く摂取する可能性がある

➡ そのようなGM食品では、人工胃液、人工腸液で、容易に分解されることを確認する必要

事業者への説明

GM食品の摂取形態を必要に応じて評価の際に考慮する必要がある

人工腸液試験がなぜ必要なのか、これまで明確な説明ができなかった。この知見により、その必要性を説明できると考えられる。

研究を実施させていただきまして
ありがとうございました。