

ウルトラポリホス

△食品添加物▽

△溶解性の大きい新型G発売中▽

安全性を国際的に保証されている添加物
縮合リン酸塩製剤

包装
(1kg×15)
15kg



株式会社 ポリホス化学研究所

大阪市東区内本町1丁目28
(三洋ビル)

電話 (941) 9 0 6 7

乳製品と免疫原性

(続)

大谷 元*

D. 牛乳タンパク質の抗原構造の解明へのアプローチ

牛乳アレルギーは、免疫原性タンパク質により生産された IgE, IgG, あるいは IgM クラスの抗体と抗原性物質との結合から始まることは、既に述べた通りである。抗体分子上の抗原結合部位は、図3に示した免疫グロブリンの基本構造において、N-末端域の可変部位と呼ばれるところにあるが、抗原上の抗体結合部位(抗原決定部位)は、タンパク質により異なり、大きく二つの型に分けられる²¹⁾。すなわち、その一つは一次構造上連続したアミノ酸残基からなるもので、一般に、一次構造依存型抗原決定部位(sequential site, あるいは continuous site)とよばれているもので、他の一つは一次構造上は離れているが、三次構造上近接したアミノ酸残基からなり、一般に、コンホメーション依存型抗原決定部位(conformational site, あるいは discontinuous site)と呼ばれているものである。しかし、たとえ一次構造依存型抗原決定部位といえども立体構造を有するタンパク質の構造上の一部であり、そのタンパク質分子の中で抗体と反応できる位置になければならず、大なり小なりコンホメーションの影響を受

*おたに・はじめ(信州大学農学部畜産学科)

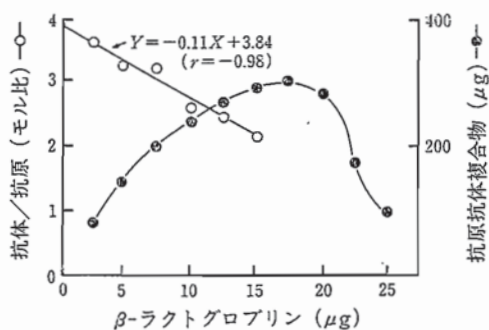


図4 β -ラクトグロブリンと β -ラクトグロブリンに対する家兎抗血清の定量沈降反応²²⁾

けることは言うまでもない。

牛乳中の主要タンパク質の一次構造は既に決定されていることから、これらタンパク質の抗原決定部位の数や位置を明らかにするという牛乳タンパク質の抗原構造の解明は、牛乳アレルギーの発症機構を知り、その予防や治療法を見出す上で重要な課題とされている。このことから、家兎 IgG 抗体を用いて筆者らが行った主要牛乳タンパク質の抗原構造に関する最近の成果を、以下に述べる。

(1) 牛乳タンパク質の抗原決定部位の数

完全に単離した牛乳タンパク質を動物に経口的に与えたり、筋肉内に注射すると、それと反応する複数種の抗体が生産される。この場合の複数種とは、IgG とか IgM とかいう抗体クラスが複数という意味ではなく、同じ IgG クラスの抗体でありながら免疫原に用いたタンパク質の構造上での結合位置や親和性が異なるという意味での複数種である。このような複数種の抗体は、牛乳タンパク質が1分子中に複数の抗原決定部位を持つために生じる現象である。このようにしてできた抗体は、近年のバイオテクノロジーの進歩により、細胞融合技術で得られる1個の抗原決定部位のみに対する抗体、すなわち、モノクローナル抗体に対して、ポリクローナル抗体と言われている。

ポリクローナル抗体では、免疫に用いる動物の個体差により各抗原決定部位に対する抗体の割合が一定とは限らず、抗原との親和性からみれば不均一な抗体の集合体である。このため、牛乳タンパク質の抗原構造の解析にポリクローナル抗体を用いるのはあまりよくないという考えもあるが、ポリクローナル抗体を用いたマッコウクジラミオグロビンや卵白リゾチームの抗原構造の解析結果より、抗原決定部

位として認識される位置は個体差によらず同じであることが示されており²³⁾、加えて、牛乳アレルギーなどの抗原構造の解析には、家兎やヒトより得たポリクローナル抗体を用いる方が、認識され易い抗原決定部位の位置や抗原決定部位の数を早く知ることができ、好都合な点も少なくない。

図4に、牛乳 β -ラクトグロブリンを6日間隔で10回家兎に筋肉内注射した時に得られるポリクローナル抗体とその免疫原との間で定量沈降反応を行った結果を示した²²⁾。この図において、抗原量をX軸に、形成される抗原抗体複合物より抗体と抗原との比を求めた値をY軸にとり、その時の抗原量を0にした時のY軸との交点の値が β -ラクトグロブリン1分子当たり結合する抗体分子数を表している。もちろん、2個の抗原決定部位が非常に近いところにある場合や、1個の抗原決定部位に抗体が結合することにより抗原のコンホメーションが変化し他の抗原決定部位に抗体が結合できなくなる場合もあることから、この場合の3.84という値は β -ラクトグロブリン1分子当たり結合する抗体の最少分子数、すなわち抗原決定部位の最少数である。また、抗原決定部位の数は整数でなくてはならないことから、抗原と抗体の親和性の弱い場合や抗原抗体複合物が完全に回収され難いことを考慮し、得られた値をくり上げてできる整数を抗原決定部位の最少数にするのが一般である。このことより、 β -ラクトグロブリンには、抗原決定部位は、少なくとも4個存在することになる。

一方、 β -ラクトグロブリンの場合と同様に、主要牛乳タンパク質の抗原決定部位の数を算出した結果を、表6に示した^{13, 22-25)}。

表6 主要牛乳タンパク質の抗原決定部位数

タンパク質	抗原決定部位の最少数
α S ₁ -カゼイン	6
β -カゼイン	6
κ -カゼイン	4
β -ラクトグロブリン	4
Lac- β -Lg ^a	5
S-カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリン	3 ^b
	4

a ; ラクトースとの加熱 β -ラクトグロブリン

b ; 抗 Lac- β -Lg 抗血清と S-カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリンの反応性から算出した場合

(2) 抗原決定部位の性質

牛乳タンパク質に限らず、タンパク質の抗原構造

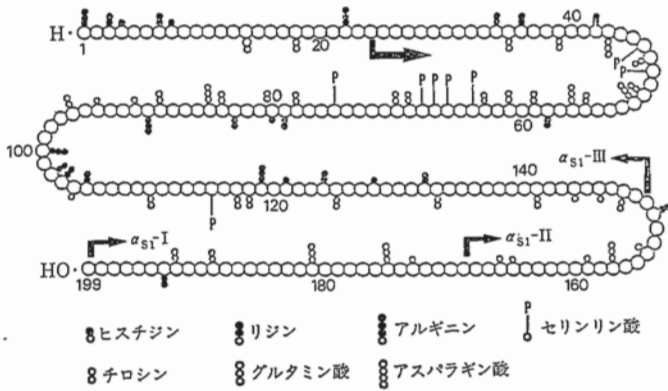


図5 牛乳 α_{S1} -カゼインBの一次構造 (本図は文献27に基づき作図した)

の解明には、もとの抗原性タンパク質のプロテアーゼや化学試薬による分解物より単離した種々のペプチドの抗原活性を調べる方法や、抗原性タンパク質中の特定のアミノ酸側鎖を化学修飾した時の高次構造の変化や抗体との結合能の変化から特定のアミノ酸残基の抗原構造における役割を知る方法、それらの結果に基づき抗原活性ペプチドを化学的に合成する方法、或いはまた、異種生物から単離した部分的にアミノ酸配列の異なる同種タンパク質の抗原性を比較する方法などが用いられている^{11,16,20)}。しかし、これらのいずれの方法を用いても一つの方法だけで抗原構造を完全に解明することは不可能であるが、抗原決定部位のおよその位置を知ったり、その性質づけをするには、これら各方法は有効である。

a. α_{S1} -カゼイン

牛乳 α_{S1} -カゼインは、図5に示す通り199個のアミノ酸残基 (変異体Aでは186個) と8~10個のリン酸残基からなる分子量約23,000のリンタンパク質である²⁷⁾。このタンパク質は、プロリン残基を17個も含むため α -ヘリックスやベーター構造のような規則構造をとり難いのに加えて、N-末端より46~75域にリン酸残基やカルボキシル基などの負の電荷を持つ親水性官能基が集中し、それ以外の部分は疎水性アミノ酸が多いという構造的特性を有している。

また、 α_{S1} -カゼインは、牛乳1 l当たり12~15 g含まれており²⁷⁾、牛乳中で最も多いタンパク質である。しかし、牛乳 α_{S1} -カゼインに相当するタンパク質は人乳には存在せず、ヒトに

としては免疫学的に異種性の高いタンパク質であり、牛乳アレルギーの原因物質の一つと考えられる。

α_{S1} -カゼインには、少なくとも6個の抗原決定部位が存在することは、表6に示した通りであるが、以下に述べるように、 α_{S1} -カゼインの種々の酵素的、化学的分解物には α_{S1} -カゼインに対する抗体と反応する低分子ペプチドが存在することから、それら抗原決定部位は一次構造依存型である。

α_{S1} -カゼインにキモシンやペプシンを作用させると α_{S1} -Iカゼイン (24~199)、 α_{S1} -IIカゼイン (24~169)、 α_{S1} -IIIカゼイン (24~150) が生成することは既に述べた。そこで、 α_{S1} -カゼインの抗原決定部位のおよその位置を知る目的で、 α_{S1} -カゼインのキモシン分解物より α_{S1} -Iカゼインを単離し、 α_{S1} -カゼインに対する抗血清との間で免疫二重拡散を行うと、 α_{S1} -Iカゼインにより形成される沈降線は α_{S1} -カゼインにより形成される沈降線と完全に融合し、両カゼインと α_{S1} -カゼインに対する抗体との反応性に違いのないことがわかる (図6)¹³⁾。このことは、定量沈降反応や酵素免疫測定法でも確認でき、 α_{S1} -カゼインの抗原決定部位は全て α_{S1} -Iカゼイン (24~199) 域に位置することを示している。しかし、 α_{S1} -カゼインのペプシン分解物より単離した α_{S1} -IIIカゼインと α_{S1} -カゼインに対する抗血清の反応では、免疫二重拡散において、 α_{S1} -カゼインとその抗血清との間に形成される沈降線とスパーを

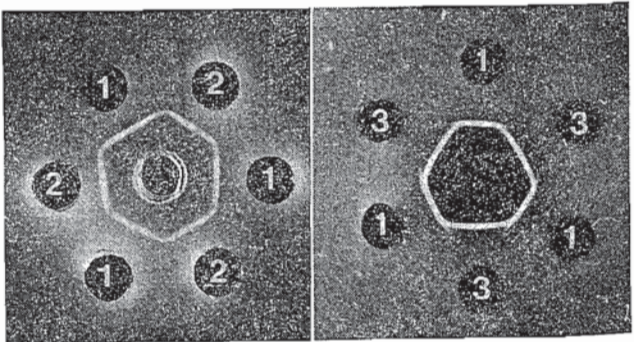


図6 α_{S1} -カゼイン、 α_{S1} -Iカゼインおよび α_{S1} -IIIカゼインと α_{S1} -カゼインに対する抗体の免疫二重拡散^{13,14)}
 1; α_{S1} -カゼイン, 2; α_{S1} -Iカゼイン, 3; α_{S1} -IIIカゼイン

形成し(図6), 図7に示すように, 酵素免疫測定法において α_{S1} -カゼインに対する IgG 抗体との反応性に低下が認められる。さらに, α_{S1} -IIIカゼインと α_{S1} -カゼインに対する抗体との定量沈降反応の結果より, α_{S1} -IIIカゼインの抗体結合数は4個と算出され, α_{S1} -カゼインの場合より2個少ない¹⁴⁾。すなわち, これらのことより, α_{S1} -カゼインの抗原決

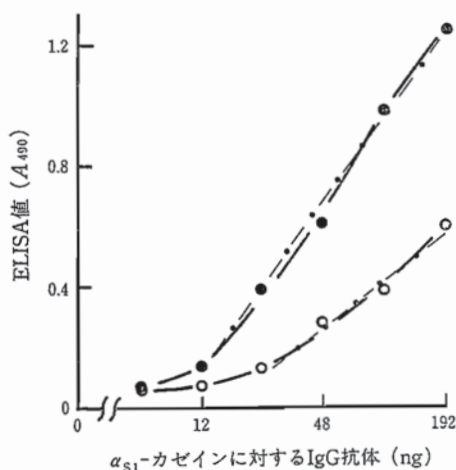


図7 α_{S1} -カゼインおよび α_{S1} -IIIカゼインと α_{S1} -カゼインに対する IgG 抗体の酵素免疫測定法における反応性¹⁴⁾
●; α_{S1} -カゼイン, ○; α_{S1} -IIIカゼイン

表7 α_{S1} -カゼインより単離した種々ペプチドと α_{S1} -カゼインに対する抗体の反応性^{28,29)}

ペプチド	抗原活性(%) ^a
1—199 (α_{S1} -カゼイン)	100.0
24—199 (α_{S1} -Iカゼイン)	90.0
24—150 (α_{S1} -IIIカゼイン)	56.0
1—23	0.0
1—54	19.4
55—60	3.8
61—123	31.4
124—135	10.0
136—196	20.3
197—199	0.0
136—151	2.4
152—193	12.1
165—199	11.4
180—199	1.6
194—199	1.1

a; 定量沈降反応またはその抑制反応により算出した。

定部位は1~23域には存在しないが, 24~150域には少なくとも4個, また, 151残基以降には少なくとも1個存在することになる。

臭化シアンや BNPS-スカトール [2-(2-nitrophenylsulphenyl)-3-methyl-3-bromindoleine] は, それぞれメチオニンやトリプトファンの関係したペプチド結合を, TPCK-トリプシンはリジンやアルギニンの関係したペプチド結合を, また, キモシンはフェニルアラニン, グルタミン酸, ロイシンなどの関係したペプチド結合を, それぞれ特異的に切断する²⁶⁾。そこで, これらの化学試薬やプロテアーゼを α_{S1} -カゼインや α_{S1} -カゼインより得たペプチドに作用させ, それら分解物より単離, 同定したペプチドと α_{S1} -カゼインに特異的な抗体との反応性を定量沈降抑制反応により調べた結果を表7に示した^{28,29)}。表より, α_{S1} -カゼインの151残基以降に位置する抗原決定部位は165~180域, あるいは180残基にさらに数残基加わった域にあることが示唆される。また, 1~150域では, 少なくとも24~54域, 61~123域, 124~135域には抗原決定部位が存在する。なお, ペプチド61~123は α_{S1} -カゼインに対する抗体との免疫二重拡散において沈降線を形成し, この域の抗原決定部位は複数個であることも確認されている²⁸⁾。

b. β -カゼイン

牛乳 β -カゼインは, 図8に示す通り209個のアミノ酸残基と4~5個のリン酸残基からなる分子量約24,000のリンタンパク質である²⁷⁾。 β -カゼインもプロリン残基を35個も持つことから, α_{S1} -カゼインと同様に, α -ヘリックスやベーター構造などの規則構

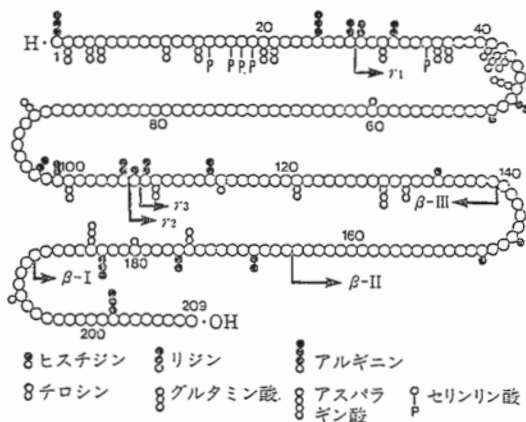


図8 牛乳 β -カゼインA²⁾の一次構造
(本図は文献27に基づき作図した)

造をとり難いに加え、N-末端から50残基に親水性アミノ酸が集中し、136残基以降に疎水性アミノ酸が集中したタンパク質である。

β -カゼインは、その分解物である γ -グループのカゼインとあわせると牛乳1 l当たり9~11 g含まれ、牛乳中では α_{s1} -カゼインに次いで多いタンパク質である²⁷⁾。この β -カゼインに相当するカゼインは人乳にも含まれており、人乳カゼインの主成分となっている。また、この人乳 β -カゼインの全一次構造が最近解明され、牛乳 β -カゼインよりアミノ酸残基数が3個多い212個のアミノ酸からなることが明らかにされている³⁰⁾。一方、牛乳 β -カゼインに対する家兎抗血清を予め人乳カゼインで吸収処理を行ない、牛乳 β -カゼインとの

間で定量沈降反応を行なうと、形成される沈降物量は未吸収の場合のわずかに27%しか低下せず、両者の抗原構造はかなり異なっている³¹⁾。このことは、 β -カゼインも牛乳アレルギーの原因物質になることを示唆している。

牛乳 β -カゼインも α_{s1} -カゼインの場合と同様に、キモシンやペプシンの作用を受けC-末端域の疎水性ペプチドを遊離し、 β -I (1~189,あるいは1~192), β -II (1~165,あるいは1~167), β -III (1~139,あるいは1~140) と呼ばれるN-末端域のペプチドへと変化する。また、 β -カゼインは牛乳中に存在するアルカリ性プロテアーゼやプラスミンの作用でN-末端域の親水性ペプチドを遊離し、 γ_2 -カゼイン (29~209), γ_2 -カゼイン (106~209), γ_2 -カゼイン (108~209) と呼ばれる γ -グループのカゼインに変わる。そこで、 β -カゼインのペプシン分解物より β -IIIを単離し、定量沈降反応により β -カゼインに対する抗血清との間に形成される沈降物量を算出すると、 β -カゼインの場合の約83%を示した³²⁾。また、 γ_2 -カゼインは β -カゼインとその抗体との定量沈降反応を約27%阻害し、それら β -III、

表8 β -カゼインより単離した種々ペプチドと β -カゼインに対する抗体の反応性^{23,32-36)}

ペプチド	抗原活性(%) ^a
1—209 (β -カゼイン)	100
1—139 (β -III)	83
106—209 (γ_2 -カゼイン)	27
1—93	36—52 ^b
94—102	10
103—109	10
110—144	16
145—156	1
157—185	14
186—209	2
1—60	27—35
61—93	0—10
1—25	16—22
26—93	12—24
49—93	0—12

a ; 定量沈降反応またはその抑制反応により算出した。

b ; 免疫に用いた家兎の個体差により反応性が異なる。

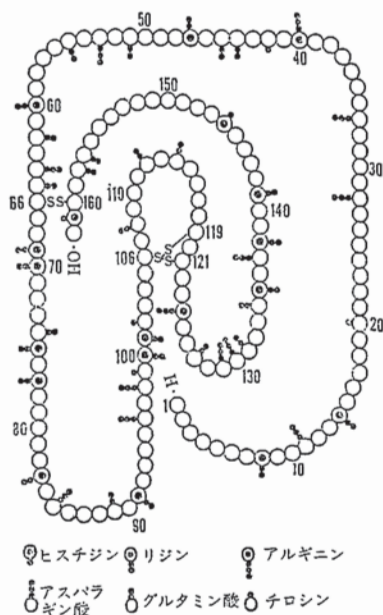


図9 牛乳 β -ラクトグロブリンAの一次構造

(本図は文献27に基づき作図した)
106番目のシステイン残基の半分は119番目のシステイン残基と、また残りの半分は121番目のシステイン残基とジスルフィド結合を形成している。

γ_2 -カゼインおよび β -カゼインと β -カゼインに対する抗体との免疫二重拡散において、 β -III由来の沈降線と γ_2 -カゼイン由来の沈降線はお互いに部分的に交差し、かつ、 β -カゼイン由来の沈降線とスパーを形成する³³⁾。 β -カゼインには少なくとも6個の抗原決定部位が存在するが(表6)、これらの結果から、 β -カゼインの抗原決定部位の多くはN-末端域(1~139残基)に位置するが、一部は140残基以降にあることが示唆される。

一方、 β -カゼインの臭化シアンやTPCK-トリプシン分解物、あるいはN-ブロムコハク酸イミド分解物より単離、同定したペプチドと β -カゼインに特異的な抗体との反応性を定量沈降抑制反応で調べると(表8)、それら低分子ペプチドのいくつかに反応性が認められ^{23,34-36)}、 β -カゼインの抗原決定部位は一次構造依存型である。また、それら抗原決定部位は、少なくとも1~25域、26~60域、61~93域、94~102域、103~109域、110~145域および157~185域には存在している。すなわち、 β -カゼインは親水域と疎水域がそれぞれ局在したタンパク質であるが、抗原決定部位は親水域にも疎水域にも広く分布して

いることになる。

c. β -ラクトグロブリン

牛乳 β -ラクトグロブリンは、図9に示す通り162個のアミノ酸残基からなる分子量約18,000のタンパク質であり、 α_{S1} -カゼインや β -カゼインと異なり、分子内ジスルフィド結合を2個持つ球状タンパク質である²⁷⁾。

β -ラクトグロブリンは、牛乳1 l当たり2~4 g含まれ、この量はホエータンパク質の約半分を占める²⁷⁾。また、牛乳 β -ラクトグロブリンに相当するタンパク質は人乳中には存在しないことに加え、このタンパク質はカゼインと比べて消化管に存在するペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどのプロテアーゼに対する分解性が低い^{37,38)}。さらに、牛乳アレルギー患者は β -ラクトグロブリンに対する感受性の高い患者の多いことが臨床的に認められている³⁹⁾。これらのことが、 β -ラクトグロブリンは牛乳アレルギー誘発の主因物質と言われる要因である。

β -ラクトグロブリンには少なくとも4個の抗原決定部位が存在することは既に述べたが、 β -ラクトグロブリンの分子内ジスルフィド結合を還元し、ヨード酢酸でメチル化するだけで、 β -ラクトグロブリンに対する抗体との反応性は著しく低下する⁴⁰⁾。また β -ラクトグロブリンは臭化シアンによる限定分解やペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどの基質特異性の異なるプロテアーゼ分解を受けると、いずれの場合も抗体との反応性を失う^{41,42)}。これらのことより、 β -ラクトグロブリンの抗原決定部位は、主にコンホメーション依存型と考えられ、先に述べた α_{S1} -カゼインや β -カゼインの場合のように抗原活性ペプチドの単離、同定での抗原決定部位の検索はむずかしい。

近年、種々のアミノ酸の側鎖と特異的に反応する化学試薬で修飾した13種の β -ラクトグロブリンと未処理 β -ラクトグロブリンに対する特異抗体との定量沈降反応における反応性(表9)や酵素免疫測

表9 各種化学修飾 β -ラクトグロブリンと抗 β -ラクトグロブリン抗体との定量沈降反応における反応性と円偏光二色性パラメータ²²⁾

修飾の種類	対象残基	修飾残基数	抗原抗体複合物量(%)	$[\theta]_{208}$	$[\theta]_{222}$	α -ヘリックス含量(%)
未処理	—	—	100.0	-4196	-5233	9.55 (100.0)
アセチル化	リジン, N-末端	15.3/16 (95.4%)	44.1	-4350	-4521	7.20 (75.4)
スクシニル化	リジン, N-末端	15.4/16 (96.3%)	35.7	-4232	-4060	5.67 (59.4)
N-エトキシホルミル化1	ヒスチジン	1.1/2 (55.8%)	46.2	-5089	-5117	9.16 (95.9)
N-エトキシホルミル化2	ヒスチジン	2.0/2 (100.0%)	46.2	-5657	-5051	8.95 (93.7)
2,4-ペンタジオン化	アルギニン	1.1/3 (36.7%)	89.6	-4531	-3642	4.30 (45.0)
ニトロフェニルスルフェニル化1	トリプトファン	1.1/2 (54.9%)	95.0	-5510	-4814	8.17 (85.5)
ニトロフェニルスルフェニル化2	トリプトファン	2.0/2 (100.0%)	88.2	-5573	-5013	8.82 (92.3)
ニトロ化1	チロシン	0.7/4 (17.5%)	44.2	-8785	-5363	9.98 (104.5)
ニトロ化2	チロシン	1.7/4 (42.5%)	38.4	-9284	-4884	8.40 (87.9)
ニトロ化3	チロシン	2.5/4 (62.5%)	39.1	-9784	-5172	9.35 (97.9)
カクロロ水銀安息香酸化	システイン	1.0/1 (100.0%)	90.7	-5276	-3937	5.27 (55.2)
S-カルボキシメチル化	システイン, シスチン	5.0/5 (100.0%)	7.7	-6577	-3240	2.97 (31.1)
アミド化	グルタミン酸, アスパラギン酸 C-末端	23.4/28 (83.6%)	15.4	-5316	-4165	6.02 (63.0)

定法による結果と円偏光二色性スペクトルの変化よりトリプトファン残基、システイン残基、および3残基存在するアルギニン残基のうち少なくとも1残基はβ-ラクトグロブリンの抗原構造に関係していないが、いくつかのアミノ基やカルボキシル基、および2残基存在するヒスチジン残基の1つは抗原構造に関係している可能性が示されている^{22,43)}。

d. 加熱β-ラクトグロブリン

既に述べた通り、乳製品はその製造過程に必ず熱処理を受ける。そのため、β-ラクトグロブリンのような球状タンパク質は熱変性を受け、そのタンパク質が本来有している抗原決定部位とは異なった新しい抗原決定部位が形成される可能性がある。事実、1966年、Bleumink and Berrens は、モデル的に調製したβ-ラクトグロブリンとラクトースのアミノカルボニル反応物が皮膚反応においてβ-ラクトグロブリンの数十倍のアレルゲン性を示すことを見出すと共に、UHT乳からもこのような高いアレルゲン性を持つアミノカルボニル反応物を単離している^{44,45)}。

最近、このようなβ-ラクトグロブリンとラクトースのアミノカルボニル反応物の抗原決定部位について、家兎より得た抗血清を用いて詳細に研究されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。すなわち、β-ラクトグロブリンとラクトースのアミノカルボニル反応物のアレルゲン性が増大する原因として、Berrens らはN-グリコシド結合の形成を推察したのにとどめたが⁴⁹⁾、ラクトースの代わりに種々の糖を用いてβ-ラクトグロブリンとのアミノカルボニル反応物を、また、β-ラクトグロブリンの代わりに血清アルブミンやオボアルブミンを用いてラクトースとのアミノカルボニル反応物をそれぞれ作成し、それらと、ラクトースとβ-ラクトグロブリンのアミノカルボニル反応物(Lac-β-Lg と呼ぶ)に対する抗体との反応性をモルモットを用いた受動性皮膚アナフィラキシー反応で調べることにより、アミノカルボニル反応により結合した糖残基が抗原部位に関係していることが示された⁴⁸⁾。

さらに、このことに加えて重要なことは、Lac-β-Lg にはβ-ラクトグロブリンが本来持つコンホメーション依存型の抗原決定部位に加えて、加熱によるβ-ラクトグロブリン自体の熱変性により新たに少なくとも3個の一次構造依存型の抗原決定部位が形成されていることが見出されたことである。この証明は、未加熱β-ラクトグロブリンに対する抗体

との反応性は既に述べた通りβ-ラクトグロブリンのジスルフィド結合を還元カルボキシメチル化することにより著しく低下するにもかかわらず、Lac-β-Lg や UHT乳から単離したβ-ラクトグロブリンに対する抗体はこのS-カルボキシメチル化β-ラクトグロブリン(SCM-β-Lg)と強く反応することやβ-ラクトグロブリンの化学的、酵素的分解物の中にLac-β-Lg に対する抗体と反応するペプチドが存在することに基づいている^{24,47,50)}。

一方、Lac-β-Lg に存在する一次構造依存型の抗原決定部位の位置は、α_{SI}-カゼインやβ-カゼインの場合と同様の方法により調べることができる。Lac-β-Lg に対する抗体とSCM-β-Lg の定量沈降反応におけるβ-ラクトグロブリンの化学的、酵素的分解物より単離、同定した種々のペプチドの阻害活性を表10に示した^{24,51-53)}。これより、Lac-β-Lg 中のβ-ラクトグロブリン自体の熱変性により新たに認識された一次構造依存型の主要抗原決定部位は、β-ラクトグロブリンの一次構造上41~61域、61残基目のトリプトファン付近および125~145域に在ることがわかる。

他方、Lac-β-Lg において認識された一次構造依存型抗原決定部位は、β-ラクトグロブリンの変性度合いや変性条件にかかわらず、変性したβ-ラクトグロブリンには不変的に存在するものかどうかは興味あるところである。そのため、SCM-β-Lg に対

表10 β-ラクトグロブリンより単離した種々ペプチドとLac-β-Lg に対する抗体の反応性^{24,51-53)}

ペプチド	抗原活性(%) ^a
1-162 (S-カルボキシメチル化β-ラクトグロブリン)	100
1-7	2
8-24	0
25-107	55-60 ^b
108-145	24-32
146-162	2
1-65	52
25-40	2
41-107	56
25-61	30
62-107	5
108-124	2
125-145	28

a ; 定量沈降反応またはその抑制反応により算出した。

b ; 免疫に用いた家兎の個体差により反応性が異なる。

表11 β -ラクトグロブリンより単離した種々ペプチドと S-カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリンに対する抗体の反応性²⁵⁾

ペプチド	抗原活性(%) ^a
1-162 (S-カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリン)	100.0
1-7	0.0
8-24	0.6
25-107	45.4
108-145	22.7
146-162	38.8
1-65	19.9
25-40	0.0
41-107	42.1
25-61	19.9
62-107	24.1
108-124	1.4
125-145	20.0
25-61, 62-107, 125-145および146-162の混合	94.8

a ; 定量沈降反応またはその抑制反応により算出した。

する抗血清を作成し、天然 β -ラクトグロブリンと反応する抗体を除去後 SCM- β -Lg と定量沈降反応を行い、S-カルボキシメチル化により新しく形成された抗原決定部位数を算出すると4個になる(表6)。この値は、Lac- β -Lg に対する抗体と SCM- β -Lg との反応性で算出される加熱変性で出来た抗原決定部位の数より1個多い。また、天然 β -ラクトグロブリンと反応する抗体を除去した SCM- β -Lg に対する抗体と SCM- β -Lg との定量沈降反応における β -ラクトグロブリン誘導ペプチドの阻害活性を表11に示した²⁵⁾。この結果を、先に述べた Lac- β -Lg の結果(表10)と比べると、C-末端域ペプチドの抗原活性に差がみられる。図9に示した β -ラクトグロブリンの一次構造からわかるように、 β -ラクトグロブリン分子内のジスルフィド結合は66残基と160残基、106残基と119残基、あるいは121残基の間で形成されている。このことから、SCM- β -Lg ではジスルフィド結合が完全に破壊され、Lac- β -Lg の構造よりも、より unfolding な状態となり、Lac- β -Lg では認識されにくかった部位が抗原決定部位として認識されるようになったものと考えられる。

いずれにしても、 β -ラクトグロブリンでは、このタンパク質が本来持っているコンホメーションが破壊されることにより、一次構造依存型抗原決定部位が新しく認識されるようになることは確かである。

表12 アミノ酸の親水性度²⁹⁾

アミノ酸	親水性値	アミノ酸	親水性値
リジン	3.0	アラニン	-0.5
アルギニン	3.0	ヒスチジン	-0.5
アスパラギン酸	3.0	システイン	-1.0
グルタミン酸	3.0	メチオニン	-1.3
セリン	0.3	バリン	-1.5
アスパラギン	0.2	イソロイシン	-1.8
グルタミン	0.2	ロイシン	-1.8
グリシン	0.0	チロシン	-2.3
プロリン	0.0	フェニル	-2.5
スレオニン	-0.4	アラニン	-3.4
		トリプトファン	

それ故、乳製品中での β -ラクトグロブリンの熱変性度合いに応じて新しく認識される抗原決定部位が牛乳アレルギーを複雑にしているものと思われる。なお、 β -ラクトグロブリンは、このような加熱による新しい抗原構造の形成に加え、ペプシンやトリプシンによる消化過程においても新しい抗原構造を形成することが知られている^{17, 54-58)}。

さて、先にも述べた通り、牛乳タンパク質の抗原構造の解明の目的は、種々の牛乳タンパク質の抗原決定部位に関する情報を蓄積し共通点を見出し、それに基づいて免疫原性の低い乳製品を開発し、牛乳、乳製品の本来持つ高い栄養価をより完全なものにするところにある。

最近、Hopp and Woods は、表12に示したようにアミノ酸に親水性度を設定し、マッコウジラミオグロビンや卵白リゾチームなど十数種の抗原決定部位の位置の知られているタンパク質について、N-末端アミノ酸から順に6残基ずつ親水性度の平均を求めその値をアミノ酸配列順序にそってプロットすると、抗原決定部位は親水性度の高い位置、すなわちリジンやグルタミン酸などの親水性アミノ酸の集中した場所にある傾向を見出し、タンパク質の抗原決定部位を迅速に予測する上での一次構造に基づく親水性度分析の有効性を指摘している²⁹⁾。上で述べた α _{S1}-カゼイン、 β -カゼイン、およびラクトーシとの加熱 β -ラクトグロブリンにおいて、抗原決定部位の存在することが示されたペプチドの中で比較的分子量の低いものについて、そのアミノ酸配列を表13に示した。これら抗原活性ペプチドの多くには、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸などが近接した部分があることがわかる。そこで、Hopp and Woods の設定したアミノ酸の親水性度に基づ

表13 牛乳タンパク質由来の抗原活性ペプチド

1.	α_{S1} -カゼイン
	²⁴ Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-Ser-Lys-Asp-Ile
	-Gly-Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Met ⁵⁴
	¹²⁴ Lys-Gln-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met ¹³⁵
	¹⁶⁵ Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-Asp-Ile ¹⁸²
2.	β -カゼイン
	¹ Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu
	-Ser-Ile-Thr-Arg ²⁵
	²⁶ Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-
	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr ⁶⁰
	⁹⁴ Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met ¹⁰²
	¹⁰³ Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met ¹⁰⁹
	¹⁵⁷ Phe-Pro-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys-Ala
	Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Asp-Met ¹⁸⁵
3.	β -ラクトグロブリン (Lac- β -Lg)
	⁴¹ Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys ⁶⁰
	⁵⁵ Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-Trp-Glu-Asn-Asp-Glu ⁶⁵
	¹²⁵ Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Pro-
	¹⁴⁵ Met

き、 α_{S1} -カゼイン、 β -カゼインおよび β -ラクトグロブリンの親水性度分析を行い、抗原活性ペプチドの位置を図示した(図10)。

図より、ラクトースとの加熱 β -ラクトグロブリンでは抗原活性ペプチドの付近は親水性度が相対的に高く Hopp and Woods の提案を支持しているが⁶⁹⁾、 α_{S1} -カゼインや β -カゼインでは親水性度の低い場所に位置するペプチドにも抗原活性がある。このことより、牛乳タンパク質の一部の抗原決定部位では、マッコウジラミオグロビンや卵白リゾチームなどと同様に、リジンやグルタミン酸などが重要な役割を果たしているが必ずしもそれらの関係したもばかりではないことがわかる。このことは、 α_{S1} -カゼインや β -カゼインは親水域と疎水域が局在し、且つ α -ヘリックスや β -シート構造などの規則構造が少ないことに起因しているのかもしれない。いずれにしても、タンパク質の抗原決定部位の最小単位はアミノ酸残基で5~7個であることから、これら抗原決定部位のさらに詳細な位置づけが待たれる。

おわりに

母乳栄養児の感染症罹患率や死亡率は、人工栄養児のそれらと比べて低いことは古くから知られていたところである。近年、感染免疫学の急速な進歩により、母乳の免疫学的意義が徐々に解明されてきた。母乳には、sIgA、補体、ラクトフェリン、リゾチーム、マクロファージ、多核白血球、小リンパ球などの特異的、或いは非特異的免疫因子が多く含まれ、それらが気道や腸管での局所免疫に働き、乳児の感染やアレルギー感作の防御に従事している。

しかし、人工栄養児に限らず母乳栄養児においても牛乳アレルギー症状が見出されているのも事実である。乳児期での牛乳アレルギーは加齢とともに、最近、文明病と騒がれている花粉やカビなどによる吸入性アレルギーにかかり易い体質にするといわれている。

母乳を与えられない乳児や母乳でアレルギー症状を起こす乳児たちのためだけでなく、乳幼児期における健康食品の観点からも、免疫原性のない乳製

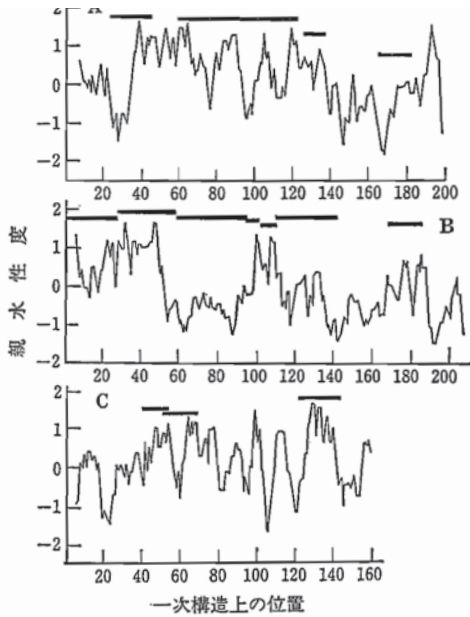


図10 α_{s1} -カゼイン, β -カゼインおよび β -ラクトグロブリンの親水性度分析と抗原活性ペプチドの位置

A; α_{s1} -カゼイン, B; β -カゼイン, C; β -ラクトグロブリン, ■■■; 抗原活性ペプチドの位置

品の開発は、牛乳の持つ高い栄養価を有効に利用するうえで重要な課題と考えられる。

文 献

- 1) 館野幸司, 岸 菊子, 子供の食物性アレルギー, pp. 22-46, 女子栄養大学出版部 (1981)
- 2) C. Cunningham-Rundles, W. E. Brandeis, R. A. Good and N. K. Day, *J. Clin. Invest.*, 64, 272 (1979)
- 3) R. J. Levinsky, *Proc. Nutr. Soc.*, 44, 81 (1985)
- 4) H. S. Kaufman and J. R. Hobbs, *Lancet*, 2, 1061 (1970)
- 5) P. Martinez-Resa, C. Alvarez-Moreno, F. Hermida and A. Chordi, *J. Dairy Sci.*, 52, 1 (1969)
- 6) 大谷 元, 鶴田文三郎, 日畜会報, 50, 623 (1979)
- 7) M. W. Steward, *Outline Studies in Biology-*

- Hall, London (1976)
- 8) 大谷 元, 鶴田文三郎, 酪科食研, 32, A15 (1983)
- 9) P. McLaughlan, K. J. Anderson, E. M. Widdowson and R. R. A. Coombs, *Arch. Dis. Child.*, 56, 165 (1981)
- 10) L. M. J. Heppell, A. J. Cant and P. J. Kilshaw, *Brit. J. Nutr.*, 51, 29 (1984)
- 11) M. Z. Atassi, *Immunochemistry of Proteins*, Vol. 2, pp. 77-264, Plenum Press, New York (1977)
- 12) F. Takahashi, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 44, 241 (1973)
- 13) H. Otani, K. Takayama and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 40, 24 (1985)
- 14) H. Otani, K. Takayama and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 40, 69 (1985)
- 15) R. R. A. Coombs and P. G. H. Gell, *Clinical Aspects of Immunology*, p. 761, Blackwell Scientific Publications, London (1975)
- 16) 鶴田文三郎, 大谷 元, 日畜会報, 54, 759 (1983)
- 17) 鶴田文三郎, 大谷 元, 新しい食品蛋白質の開発と実用化 (食品蛋白質応用研究会編), p. 77, テクノアイ出版部 (1985)
- 18) P. J. Kilshaw and A. J. Cant, *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 75, 8 (1984)
- 19) S. L. Bohna and D. C. Heiner, *Allergies to Milk*, p. 23, Grune and Stratton, New York (1980)
- 20) J. W. Gerrard and M. Shenassa, *Ann. Allergy*, 50, 375 (1983)
- 21) M. Z. Atassi and J. A. Smith, *Immunochemistry*, 15, 609 (1978)
- 22) H. Otani, T. Uchio and F. Tokita, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2531 (1985)
- 23) H. Otani, S. Iwasaki and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 39, 396 (1984)
- 24) H. Otani, S. Morita and F. Tokita, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56, 67 (1985)
- 25) 大谷 元, 細野明義, 日本農芸化学会昭和61年度大会講演要旨集, p. 178 (1986)
- 26) M. Z. Atassi, *Immunochemistry of Proteins*, Vol. 1, pp. 1-161, Plenum Press, New

- York (1977)
- 27) W. N. Eigel, J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. M. Farrel, V. R. Harwalkar, R. Jenness, R. M. Whitney, *J. Dairy Sci.*, 67, 1599 (1984)
- 28) H. Otani, F. Takahashi and F. Tokita, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 607 (1986)
- 29) 大谷 元, 高山幸司, 鍋田文三郎, 日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨集, p. 394 (1985)
- 30) R. Greenberg, M. L. Groves and H. J. Dower, *J. Biol. Chem.*, 259, 5132 (1984)
- 31) H. Otani, S. Higashiyama and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 39, 65 (1984)
- 32) H. Otani, S. Iwasaki and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 39, 211 (1984)
- 33) H. Otani, S. Higashiyama and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 39, 291 (1984)
- 34) H. Otani, S. Higashiyama and F. Tokita, *Milchwissenschaft*, 39, 469 (1984)
- 35) 大谷 元, 峯 芳徳, 細野明義, 日本畜産学会第78回大会講演要旨, p. 161 (1986)
- 36) 大谷 元, 峯 芳徳, 細野明義, 日本農芸化学会昭和61年度大会講演要旨集, p. 175 (1986)
- 37) H. Otani, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 52, 689 (1981)
- 38) 大谷 元, 小田康弘, 細野明義, 鍋田文三郎, 酪科食研, 29, A97 (1980)
- 39) E. Lebenthal, *Pediatr. Clin. North. Am.*, 22, 827 (1975)
- 40) 大谷 元, 鍋田文三郎, 日畜会報, 51, 17 (1980)
- 41) 鍋田文三郎, 大谷 元, 酪科食研, 30, A77 (1981)
- 42) 大谷 元, 日畜会報, 52, 47 (1981)
- 43) 大谷 元, 鍋田文三郎, 日畜会報, 54, 699 (1983)
- 44) E. Bleumink and L. Berrens, *Nature*, 212, 541 (1966)
- 45) E. Bleumink and E. Young, *Int. Arch. Allergy*, 34, 521 (1968)
- 46) 大谷 元, 鍋田文三郎, 日畜会報, 51, 711 (1980)
- 47) H. Otani and F. Tokita, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 53, 293 (1982)
- 48) H. Otani and F. Tokita, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 53, 344 (1982)
- 49) L. Berrens and E. Bleumink, *Int. Arch. Allergy*, 28, 150 (1965)
- 50) H. Otani, S. Morita and F. Tokita, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 55, 287 (1984)
- 51) H. Otani, S. Morita and F. Tokita, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56, 341 (1985)
- 52) H. Otani, S. Morita and F. Tokita, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56, 987 (1985)
- 53) 大谷 元, 辻志保子, 細野明義, 日本畜産学会第78回大会講演要旨, p. 161 (1986)
- 54) J. R. Spies, M. A. Stevan and W. J. Stein, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 50, 82 (1972)
- 55) H. Otani and F. Tokita, Proceedings of the Vth World Conference on Animal Production, Vol. 2, p. 657 (1983)
- 56) 大谷 元, 鍋田文三郎, 酪科食研, 35, A13 (1986)
- 57) 大谷 元, 鍋田文三郎, 酪科食研, 35, 印刷中 (1986)
- 58) 大谷 元, 鍋田文三郎, 酪科食研, 35, 印刷中 (1986)
- 59) T. P. Hopp and K. R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 3824 (1981)