

## 無細胞タンパク質合成系を用いた免疫寛容原抗原作製研究

逢阪江理 首藤喬一 二神 真 中村健治 森本 聡 黒野美夏 宮岡俊輔

Engineering of the Allergen for Immunotherapy in Wheat-germ cell-free protein synthesis system

OHSAKA Eri, SUTOH Kyouichi, FUTAGAMI Shin, NAKAMURA Kenji, MORIMOTO Satoshi, KURONO Mika and MIYAOKA Syunsuke

近年、食物アレルギー患者が増加し、重大な問題となっている。これに対応するため、免疫療法に用いることのできる免疫寛容原を作製し、アレルギーの発症を抑えようとする試みがなされている。

そこで、近年開発された無細胞タンパク質合成技術により、甲殻類アレルギーの治療に用いるための免疫寛容原となる抗原を作製した。

キーワード：甲殻類アレルギー、トロポミオシン、免疫寛容原

## はじめに

近年、食物アレルギー患者が増加し、重大な問題となっている。そのうち、甲殻類に対するアレルギーは、アナフィラキシーショックのような重篤な症状を引き起こすことが知られており、その患者の割合は、年齢が高くなるにつれて増加する傾向にある<sup>1)</sup>。

エビアレルギーの原因たんぱく質（アレルギー）として、ブラウンシュリンプのトロポミオシン（Pen a 1）が同定されている<sup>2)</sup>。トロポミオシンは筋原繊維たんぱく質の1種であり、他の甲殻類だけでなく、軟体動物やダニなどの昆虫などにも普遍的に存在し、お互いに交叉反応性があるため、無脊椎動物の pan-allergen と言われている。

一般に、食物アレルギー患者に対する治療の基本は食事療法であり、患者は原因食物を厳格に避けなければならない。しかし近年、意図的にアレルギー構造を修飾することによって、免疫療法に有効なアレルギーを作製しようとする試みがある<sup>3)</sup>。アレルギーの T 細胞エピトープをコードする塩基配列は保存したまま IgE エピトープを破壊したアレルギーは、IgE エピトープ結合能が減弱しているため安全に投与できるうえ、Th2 の優位な状態から、Th1 の方向へ偏倚させることができる。トロポミオシンに関してはリコンビナントアレルギーの作製はまだ行われておらず、その開発が待たれるところである。

そこで、トロポミオシンに関して分析調査を行い、IgE 結合能を抑え免疫療法に用いることができるリコンビナント Pen a 1 を、無細胞タンパク質合成技術を用いて作製し、食物アレルギーの中でも特に難治性である甲殻類アレルギー治療に用いることができる抗原の作製を行うこととした。

## 実験方法

## 1. たんぱく質の抽出

大正エビに 30mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) を 2 倍量加え、バイオミキサーで 2 分間ホモジナイズし、12000×g、10 分間、4℃で遠心分離後、上清をたんぱく質粗抽出液とした。

## 2. たんぱく質の定量

Micro BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) を使用して、ピニンコニン酸法 (BCA 法)<sup>4)</sup>で行った。反応は 60℃・1 時間とし、562nm の吸光度を測定し定量した。また、標準たんぱく質には、ウシ血清アルブミン (BSA) を使用した。

## 3. SDS-PAGE

エビたんぱく質粗抽出液または合成たんぱく質溶液を 12.5~17.5%アクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後、Coomassie 染色を行い、たんぱく質を検出した。

## 4. イムノプロット

たんぱく質を SDS-Page で分画し、nitrocellulose (以下 NC) 膜 (Bio-Rad Laboratories) へ電氣的に転写した。pH7.4 の Phosphate-buffer saline (以下 PBS) で 3 回洗浄後、0.1%Tween20 を含む PBS (以下 PBST) に溶解した 5% Skim milk (ナカライテススク (株)) で blocking 処理を行った。ついで、PBST により 3 回洗浄後、5%Skim milk PBST で 10~20 倍希釈した血清を 4℃で一晩反応させ、再度 PBST で 3 回洗浄し、5000 倍希釈 HRP 標識抗ヒト IgE 抗体 (KPL) を室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、ECL Western Blotting Detection Regents (Amersham Bioscience) を用いて化学発光法により X 線フィルム (Amersham Bioscience) に露光、現像した。

## 5. 競合 ELISA

たんぱく質溶液 (0.1~0.2 μg/ml) を 96 穴の ELISA プレート (NUNC) に 50 μl/well ずつ分注し、室温で 3 時間振

こうした。PBST で5回洗浄(200  $\mu$  l/well)後、PBST に溶解した5% Skim milk で blocking 処理(200  $\mu$  l/well)を2時間行った。ついで、PBST により5回洗浄(200  $\mu$  l/well)後、5%スキムミルク PBST で25、100倍希釈した血清(50  $\mu$  l)と4℃で3時間反応させておいた阻害たんぱく質(50  $\mu$  l)の混合液100  $\mu$  lを加え、4℃で一晩静置した。その後 PBST で5回洗浄(200  $\mu$  l/well)し、PBST で2000倍希釈したHRP 標識抗ヒトIgE抗体を室温で2時間反応させた。PBST で5回洗浄(200  $\mu$  l/well)後、TMB 発色(KPL)を行い、1 mol/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100  $\mu$  l/wel)で反応を停止させた後、各 well の450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

ELISA は各試料について少なくとも3回行い、データはすべて平均値で示した。

## 6. 血清

各試験には、エビアレルギーを持つヒト血清を PlasmaLab International 社より購入し、試験に用いた。

## 7. たんぱく質の合成

たんぱく質の合成は、愛媛大学・遠藤研究室で開発された無細胞たんぱく質合成技術を用い、(1)重層法<sup>5)</sup>、または、(2)全自動たんぱく質合成装置・Protomist DT を使用して行った。

## 8. エビを用いたトロポミオシンのアレルギー性の確認

大正エビ(バナメイ種)のたんぱく質を抽出し、SDS-Page でたんぱく質を分離した。また、たんぱく質中のトロポミオシンのアレルギー性を、血清を用いてイムノブロット法で確認した。

## 9. トロポミオシンをペプシン分解した場合のアレルギー性の確認

大正エビ(バナメイ種)から抽出したたんぱく質を、pH3.0 0.1%ペプシンで0、30、60、120分間分解した後、たんぱく質を抽出し、SDS-Page でたんぱく質を分離した。また、たんぱく質中のトロポミオシンのアレルギー性を、血清を用いてイムノブロット法で確認した。ブランクとして、ペプシンを加えずに反応を行ったものを用いた。

## 10. Pen a 1 の調査、作製およびアレルギー性の確認

Pen a 1 の全アミノ酸配列をアメリカのデータベース(SDAP - Structural Database of Allergenic Proteins)で入手し、愛媛大学が用いている小麦発現用のコドン(表1)を用いて、cDNA に変換した(表2)。今後の遺伝子操作のため、5末端には XhoI で切断できる配列を3末端には BamH I で切断できる配列を挿入した。設計したcDNA は GenScript 社に依頼して作製した。作製したcDNA から愛媛大学の無細胞たんぱく質合成技術を用いて、重層法により Pen a 1 の合成を行った。合成した Pen a 1 を電気泳動法により分離し、血清を用いて、イムノブロット法により Pen a 1 を検出し、アレルギー性の確認を行った。ブランクには、cDNA の無い条件で行ったたん

ぱく質合成による生成物を用いた。対照には、大正エビから抽出したたんぱく質を用いた。

表1 コドン表

アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン
Phe	TTC	Gln	CAG
Leu	CTG	Asn	AAC
Ile	ATC	Lys	AAG
Val	GTC	Asp	GAC
Ser	AGC	Glu	GAG
Pro	CCC	Cys	TGC
Thr	ACC	Arg	CGC
Ala	GCC	Gly	GGC
Yyr	TAC	Met	ATG
His	CAC	Trp	TGG

表2 Pen a 1 の cDNA

5'-ctcgcagATGGACGCCATCAAGAAGAAGATGCAGGCCA  
TGAAGCTGGAGAAGGACAACGCCATGGACCGCGCCGA  
CACCTGGAGCAGCAGAACAAGGAGGCCAACAACCGC  
GCCGAGAAGAGCGAGGAGGAGGTCCACAACCTGCAGA  
AGCGCATGCAGCAGCTGGAGAACGACCTGGACCAGGT  
CCAGGAGAGCCTGCTGAAGGCCAACATCCAGCTGGTC  
GAGAAGGACAAGGCCCTGAGCAACGCCGAGGGCGAG  
GTCGCCGCCCTGAACCGCCGCATCCAGCTGCTGGAGG  
AGGACCTGGAGCGCAGCGAGGAGCGCCTGAACACCG  
CCACCACCAAGCTGGCCGAGGCCAGCCAGGCCGCCG  
ACGAGAGCGAGCGCATGCGCAAGGTCCTGGAGAACCG  
CAGCCTGAGCGACGAGGAGCGCATGGACGCCCTGGAG  
AACCAGCTGAAGGAGGCCCGCTTCCTGGCCGAGGAGG  
CCGACCGCAAGTACGACGAGGTCGCCCGCAAGCTGGC  
CATGGTCGAGGCCGACCTGGAGCGCGCCGAGGAGCG  
CGCCGAGACCGGCGAGAGCAAGATCGTCGAGCTGGAG  
GAGGAGCTGCGCGTCTCGGCAACAACCTGAAGAGCC  
TGGAGGTCAGCGAGGAGAAGGCCAACCAGCGCGAGGA  
GGCCTACAAGGAGCAGATCAAGACCCTGACCAACAAG  
CTGAAGGCCGCCGAGGCCCGCGCCGAGTTCGCCCGAG  
CGCAGCGTCCAGAAGCTGCAGAAGGAGGTCGACCGCC  
TGGAGGACGAGCTGGTCAACGAGAAGGAGAAGTACAA  
GAGCATCACCGACGAGCTGGACCAGACCTTCAGCGAG  
CTGAGCGGCTACtaagatcc-3'

## 11. Pan a 1 のエピトープペプチドの作製およびアレルギー性の確認

エピトープペプチドをコードしたベクターを、以下の方法で構築した。

(1)プライマーのベクターへの組み込み

Pen a 1のエピトープは5ヶ所に分かれて点在していることが分かっている<sup>6)</sup>。そこで、Pen a 1の5ヶ所のエピトープ部分をコードしたInverse PCR用のプライマーを(Ept1~5 anti, sense、表3)作製した。これらのプライマーは表4の制限酵素で末端が切れるようになっている。これらのプライマーと愛媛大学が作製したpEU-GST (TEV)ベクターを用いてInverse PCR反応を行い、プライマーの組み込みおよび増幅を行った。その後フェノール・クロロホルム処理で精製した後、各制限酵素(表4)を用いて切断し、1%アガロースゲルで電気泳動をしてベクターを回収した後ライゲーションを行い、エピトープ部分をコードしたベクターを構築した。

表3 各エピトープ部分のプライマー

Primer	seq. (5'-3')
Ept1	Sen GAGAACCAGGTCCAGGAGAGCCTGCTGAAG GCCTAATTTGTATAGAATTTACGGC
	Ant GAGAACCTGGTCCAGGTCGTTCTCCAGCTG CTGCATGCGCTTCTGCAGGTTGTGGACCTC CTCGCCCTGGAAGTACAGGTTT
Ept2	Sen GAGAAGATCTGAGGAGCGCCTGAACACCGC CTAATTTGTATAGAATTTACGGC
	Ant GAGAAGATCTCTCCAGGTCCTCCTCCAGCAG CTGGATGCGGCGGTTTCAGGGCGGCGACCTC GCCGCCCTGGAAGTACAGGTTT
Ept3	Sen GAGAATCGATCTCTGAGCGACGAGGAGCGC ATGGACGCCCTGGAGAACCAGCTGAAGTAA TTTGTATAGAATTTACGGC
	Ant GAGAATCGATTCTCGCCCTGGAAGTACAGG TTC
Ept4	Sen GAGATCTAGAGGTCTAATTTGTATAGAATT TACGGC
	Ant GAGATCTAGACTCTTCAGGTTGTTGCCGA CGACGCGCAGCTCCTCCTCCAGCTCGACGA TCTTGCTCTCGCCGTTGCCCTGGAAGTACA GGTTC
Ept5	Sen GAGAGTCGACCGCTGGAGGACGAGCTGGT CAACGAGAAGGAGAAGTACAAGAGCATCAC CGACGAGCTGGACCAGACCTTCAGCGAGCT GTAATTTGTATAGAATTTACGGC
	Ant GAGAGTCGACCTCCTTCTGCAGCTTCTGGA CGCTGCCCTGGAAGTACAGGTTT

表4 制限酵素

Primer	制限酵素
Ept1	SexA I
Ept2	Bgl II
Ept3	Cla I
Ept4	Xba I
Ept5	Sal I

## (2)ベクターの大量合成

大腸菌にベクターを形質転換し、アンピシリン濃度100 μg/ml (Amp100)のLB寒天培地で培養した後、発

生したコロニーのうち10個程度をAmp100 LB寒天培地に釣り菌し、マスタープレートを作成した。発生したそれぞれのコロニーをSP6、SPA1868プライマーを用いてPCR法によりエピトープ部分を増幅し、その後、表4の制限酵素を反応させ、正しく切断されたものを選択し塩基配列を確認した。そのうち、ベクター導入が確認されたコロニーをAmp100 LB培地50mlで37℃において16~18時間培養し、Maxi-V500 Ultrapure Plasmid Extraction System (VIOGENE)を用いてプラスミドを抽出し、フェノール・クロロホルム処理で精製した後、Protomist DTによりエピトープペプチドを合成した。合成したエピトープペプチドのアレルゲン性を競合ELISA法を用いて調査した。

## 12. エピトープを欠損させたPan a 1 (BSP-NEP)の作製

免疫寛容原の候補として、Pen a 1のエピトープ部分を欠損させたリコンビナントPan a 1(以下、BSP-NEP)を、以下の方法で合成した。

Pen a 1のアミノ酸配列からエピトープ部分を除き、表1を用いて、cDNAに変換した(表5)。今後の遺伝子操作のため、5'末端にはXhoIで切断できる配列を3'末端にはBamH Iで切断できる配列を挿入した。設計したcDNAはGenScript社に依頼して作製した。作製したcDNAはpUC57ベクターに組み込まれていた。合成たんぱく質をグルタチオンカラムにより精製するために、BSP-NEPをコードしたcDNA部分をpUC57からpEU-GST(TEV)ベクターに次の方法で組み換えた。

表5 BSP-NEPのcDNA

5'-ctcgagATGGACGCCATCAAGAAGAAGATGCAGGCCA  
TGAAGCTGGAGAAGGACAACGCCATGGACCGCGCCGA  
CACCCCTGGAGCAGCAGAACAAGGAGGCCAACAACCGC  
GCCGAGAAGAGCGAGGAGGAGGACCAGGTCCAGGAG  
AGCCTGCTGAAGGCCAACATCCAGCTGGTCGAGAAGG  
ACAAGGCCCTGAGCAACGCCGAGGGCGAGCTGAACAC  
CGCCACCACCAAGCTGGCCGAGGCCAGCCAGGCCGC  
CGACGAGAGCGAGCGCATGCGCAAGGTCCTGGAGAAC  
AAGGAGGCCCGCTTCTGCGCCGAGGAGGCCGACCGC  
AAGTACGACGAGGTGCGCCGCAAGCTGGCCATGGTTCG  
AGGCCGACCTGGAGCGCGCCGAGGAGCGCGCCGAGA  
CCGGCAACAACCTGAAGAGCCTGGAGGTCAGCGAGGA  
GAAGGCCAACCAGCGCGAGGAGGCCCTACAAGGAGCAG  
ATCAAGACCCTGACCAACAAGCTGAAGGCCCGCCGAGG  
CCCGCGCCGAGTTCGCCGAGCGCAGCGTTCGAGCTGA  
GCGGCTACTaaggatcc-3'

## (1)ベクターの切断およびゲル回収

BSP-NEPをコードしたpUC57ベクターとpEU-GST(TEV)ベクターをそれぞれXhoIとBamH Iを反応させ、反応物を1%アガロースゲルに電気泳動し、BSP-NEPをコードしたcDNA部分と切断された

pEU-GST(TEV)ベクターをゲルから切り出して回収した。

(2) pEU-GST(TEV)ベクターへの組み込み

(1)で切り出した BSP-NEP 断片と切断された pEU-GST(TEV)ベクターをライゲーションし、BSP-NEP の cDNA 部分を pEU-GST(TEV)ベクターに組み込んだ。

組み替えたベクターを用いて、エピトープペプチドと同様の方法で、大腸菌の形質転換からたんぱく質の合成までを行った。

## 結果と考察

### 1. エビを用いたトロポミオシンのアレルゲン性の確認

SDS-Page でたんぱく質を分離したところ、少なくとも、11種類たんぱく質が観察されたが、血清は、トロポミオシンと思われる分子量38kDaのたんぱく質のみに反応し、トロポミオシンがアレルゲン性を有することが確認された。

### 2. トロポミオシンをペプシン分解した場合のアレルゲン性評価

SDS-Page による結果を図1に示す。分子量 38kDaあたりのたんぱく質がトロポミオシンである。トロポミオシンは、ペプシンにより分解されてはいるが、120 分間分解しても残っていることが分かる。また、25kDaあたりのたんぱく質のバンドが増加しているが、ペプシンにより分解されたペプチドであると考えられる。

イムノブロット法により血清を反応させたものを図2に示す。ペプシンによる分解時間長くすればするほどトロポミオシンは減少しているが、分解されたペプチドも血清と反応しており、アレルゲン性を持っていることが分かった。よって、トロポミオシンは、ペプシン分解されてもエピトープ部位は分解されない、強いアレルゲン性を持ったたんぱく質であるということが分かった。

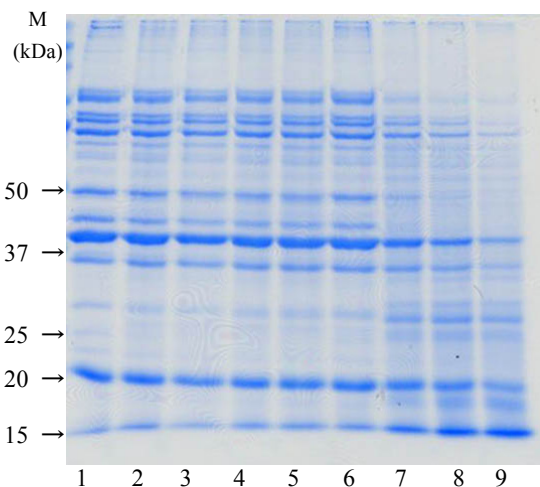


図1 エビ抽出たんぱく質のペプシン分解 (1: エビたんぱく質抽出物、2~5: それぞれペプシンがない条件での 0、30、60、120 分間反応、6~9: それぞれペプシン分解条件下での 0、30、60、120 分間反応による生成物)

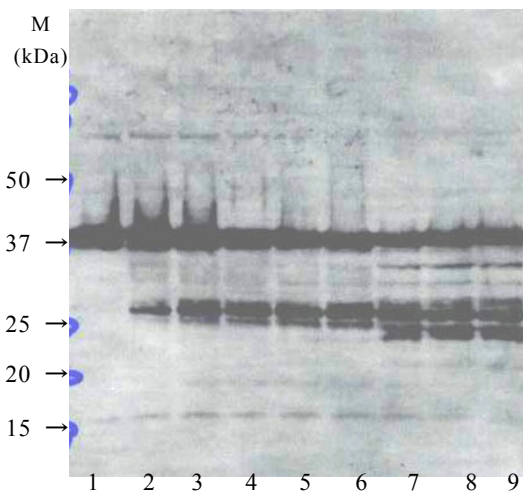


図2 ペプシン分解物の血清との反応 (1 エビたんぱく質抽出物 2~5 はそれぞれペプシンがない条件での 0、30、60、120 分間反応、6~9 はそれぞれペプシン分解条件下での 0、30、60、120 分間反応による生成物)

### 3. Pen a 1 の調査、作製およびアレルゲン性の確認

Pan a 1 と軟体動物、貝類、ダニ類のトロポミオシンのアミノ酸シーケンスは高い相同性があった。また、ブラウンシュリンプのトロポミオシン中のエピトープと同じアミノ酸配列を持つ部分が、これらの生物に高い割合で存在し、この部位がこれらの生物でもエピトープになる可能性があることが分かった。この部分を改変させることで、甲殻類以外にも用いることのできる免疫寛容原を作製できる可能性があると思われる。

GenScript 社より入手したベクターを用い、Pan a 1 の合成を行ったが、電気泳動法では合成 Pan a 1 を確認できなかった。そこで、血清を用いてイムノブロット法を行ったところ、37kDa に血清と反応するたんぱく質が合成できていることが分かった(図3)。よって、目的の Pan a 1 は、設計した cDNA により確かに合成できており、アレルゲン性を有していることが確認できた。

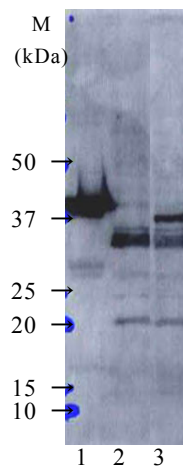


図3 合成 Pen a 1 と血清との反応性 (1: エビたんぱく質抽出物、2: cDNA の無い条件下のたんぱく質合成反応液、3: Pen a 1 cDNA 存在下でのたんぱく質合成反応液)

#### 4. Pen a 1 のエピトープペプチドの作製およびアレルギー性の確認

合成した各エピトープペプチドのたんぱく質濃度は、それぞれ、Ept1：76 ( $\mu\text{g/ml}$ )、Ept2：69、Ept3：64、Ept4：55、Ept5：120 であった(表5)。これらの合成ペプチドを用いて、エピトープペプチドのアレルゲン性を調査した。アレルゲン性の調査は、Pen a 1 に対する競合 ELISA 試験で行った。ここで、試験条件は、固定化する Pen a 1 の濃度を  $0.2\mu\text{g/ml}$ 、反応させる血清は、100 倍希釈したものを使用した。

Pen a 1 で競合させた場合、固定化濃度と同じ  $0.2\mu\text{g/ml}$  で IgE 結合阻害が見られ、十分な発色の低下がみられた。これに対し、各エピトープとも、ペプチドの濃度は、 $200\mu\text{g/ml}$  であり、Pen a 1 の時の 100 倍の濃度で反応させているにもかかわらず、競合による Pen a 1 の IgE 結合阻害は見られなかった(図4)。このことは、提案されているエピトープ部分には、実は IgE 結合性がなく、別の部分に本当のエピトープがある可能性が考えられる。しかし、むしろ、今回合成したペプチドが IgE 抗体との結合しなかったのは、抗体との結合が、直接結合するエピトープ部の配列だけではなく、周囲の立体構造などの周辺環境も重要な因子であったため、エピトープ部のみでは結合しなかったのではないかと考えられるが、確認はできておらず、明確な結論は得られていない。しかし、結果として、エピトープ部分のみのペプチドはすべて IgE 結合性がほとんどなく、各エピトープの IgE 結合性を評価することができなかった。

表5 合成ペプチドの濃度

	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ept1	76
Ept2	69
Ept3	64
Ept4	55
Ept5	120

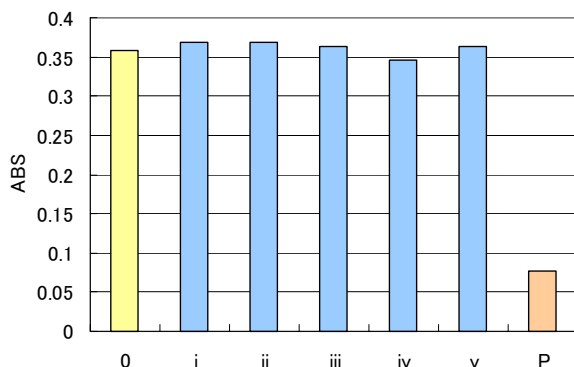


図4 競合 ELISA によるエピトープの IgE 結合性の分析 (0:競合させなかったもの、i~V:  $20\mu\text{g/ml}$  の Ept1~Ept5 のペプチドで競合反応を行ったもの、P:  $0.2\mu\text{g/ml}$  の Pen a 1 で競合反応を行ったもの)

#### 5. エピトープを欠損させた Pan a 1 の作製

当初の計画では、エピトープペプチドの IgE 結合性の結果をもとに、変異させる箇所をなるべく抑えつつ、アレルギー性を十分に低下させたリコンビナントアレルゲンを作製しようと考えていた。しかし、エピトープペプチドの ELISA 試験の結果から、各エピトープ部の IgE 結合性に関する明確な情報が得られなかった。そこで、免疫寛容原の候補として、エピトープ部を全て欠損させた Pen a 1 (BSP-NEP) を合成し、そのアレルギー性を評価した。アレルギー性の調査は、Pen a 1 に対する競合 ELISA 試験で行った。また、試験条件は、固定化する Pen a 1 の濃度を  $0.1\mu\text{g/ml}$ 、反応させる血清は、25 倍希釈したものを使用した。

Pen a 1 で競合させた場合、固定化濃度と同じ  $0.1\mu\text{g/ml}$  でも IgE 結合阻害が見られ、十分な発色の低下がみられた。一方、BSP-NEP は、100 倍の  $10\mu\text{g/ml}$  まで上げて、競合による Pen a 1 の IgE 結合阻害はあまり見られなかった(図5)。この結果、作製した BSP-NEP は、あまり IgE 結合性を持たないことが分かった。このように、Pen a 1 のエピトープ部を欠損させることにより、予想通り IgE 結合性を低下させることができた。今回作製した BSP-NEP は、免疫寛容原の候補となりうると考えられる。

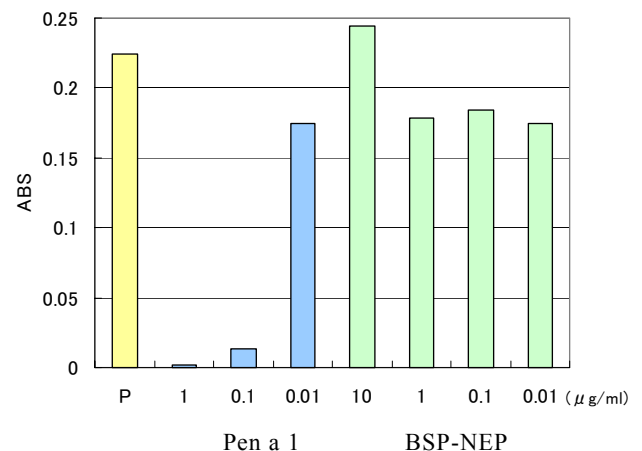


図5 競合 ELISA による BSP-NEP の IgE 結合性の分析 (P:競合させなかったもの Pen a 1: Pen a 1 で競合反応を行ったもの BSP-NEP: BSP-NEP で競合反応を行ったもの)

## ま と め

甲殻類アレルギーの免疫寛容原となるたんぱく質を作製した。

1. 大正エビのたんぱく質を抽出し、血清を用いてイムノブロットを行ったところ、血清は、トロポミオシンに反応した。これにより、トロポミオシンがアレルギーであることが確認できた。
2. エビのトロポミオシンはペプシンで分解されにくく、

また、分解されたトロポミオシンペプチドもエピトープ部位を保持しており、トロポミオシンは強いアレルゲン性を持ったたんぱく質であることが分かった。

3. 合成した Pen a 1 を電気泳動法により分離し、血清を用いて、イムノブロット法でトロポミオシンを検出したところ、電気泳動法だけでは合成トロポミオシンを確認できなかったが、イムノブロット法により確認することができた。よって、Pen a 1 が、設計した cDNA により、確かに合成できており、アレルゲン性を有していることが分かった。
4. エピトープ部のペプチドをそれぞれ合成し、競合 ELISA によりその IgE 結合性を分析した。しかし、どのエピトープペプチドも競合阻害がみられず、各エピトープの IgE 結合性を評価することができなかった。
5. エピトープ部を全て欠損させた Pen a 1 (BSP-NEP) を合成し、競合 ELISA により、そのアレルゲン性を評価した。その結果、ほとんど競合阻害はみられず、IgE 結合活性を低下させたリコンビナントアレルゲンを作製できた。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導頂いた愛媛大学・無細胞生命工学研究センター・遠藤研究室の澤崎達也助教授、土持政照氏（現 株式会社セルフリーサイエンス）ならびに松岡和弘氏をはじめ研究室各位に深く感謝致します。

なお、本研究は、平成 16 年度～平成 18 年度バイオ産業創出支援事業・無細胞タンパク質合成系を用いた免疫寛容原抗原作成研究費で実施したものである。

## 文 献

- 1)厚生省食物アレルギー対策検討委員会（代表 飯倉洋治）：平成 9 年度報告書，(1998).
- 2)Daul, C. B, Salattery, M., Reese, G., Lehrer, S. B. . . : Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*)allergen as the muscle protein tropomyosin, Int Arch. Allergy Immunol., **105**, 49-55 (1994).
- 3)Bannon, G. A., Cockrell, G., Connaughton, C., West, C. M., Helm, R., Stanley, J. S., King, N., Ravjohn, P., Sampson, H. A., Burks, A. W. :Engineering, Characterization and in vitro Efficacy of Major Peanut Allergens for Use in immunotherapy, Int Arch. Allergy Immunol., **124**, 70-72 (2001).
- 4)Smith, P. K., *et al.*: Measurement of protein using bicinchoninic acid, J. Biol. Chem., **150**, 76-85 (1985).
- 5)Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Tsuchimochi, M., Kamura, N., Ogasawara, T., Kuroita, T., Endo, Y. : A bilayer cell-free

protein synthesis system for high-throughput screening of gene products, FEBS lett., **514**, 102-105 (2002).

- 6)Ayuso, R., Lehrer, S. B., Reese, G. :Identification of Continuous, Allergenic Regions of the Major Shrimp Allergen Pen a 1(Tropomyosin), Int Arch. Allergy Immunol., **127**, 27-37 (2002).