

# 食物アレルギー・卵白オボムコイドの 不均一性とアレルギー性

## その 1. 卵白から 3 種類のオボムコイドの分離

廣瀬 優子, 木戸 詔子

### Heterogeneity and Allergenicity of the Major Food Allergen, Albumen Ovomuroid 1. Separation of Three variants of Ovomuroid from Albumen

Yuko Hirose and Shoko Kido

Ovomuroid (OVM), one of the major allergens in egg white, consists of several variants with different carbohydrate contents. The relationship between its heterogeneity and allergenicity has not been clarified. Here we described a simple method to obtain three variants of ovomuroid having different, apparent molecular weight on SDS-PAGE, namely OVM-H, OVM-M and OVM-L. When egg white was applied to a CM-toyopearl 650M column, OVM-H was first eluted followed by OVM-M and OVM-L. The isoelectric points estimated by disc electrophoresis were 4.4 for OVM-H, 4.2 for OVM-M and 4.1-3.7 for OVM-L. All variants were identified by using the monoclonal antibody specifically recognizing the carbohydrate moiety of ovomuroid. Furthermore, by using the same column we succeeded to isolate other albumen proteins in their pure form, such as ovalbumin, ovalbumin Y, ovoglobulin G2, ovoglobulin G3, ovotransferrin and lysozyme. Ovalbumin, the other major allergen in egg white is difficult to obtain without the concomitant presence of ovomuroid.

鶏卵は栄養価が高く、食品機能性が高いため、様々な加工食品に広く使われている。成長期の子どもにとって、卵はタンパク質の重要な供給源であるにもかかわらず、乳幼児のなかには高い割合で卵アレルギー患者が存在し、卵を含む多くの加工食品も排除しなければならない場合がある。卵白タンパク質中、オボムコイド、オボトランスフェリンおよびオボアルブミンが主要アレルギーと報告されているが、リゾチーム、オボムシンにもアレルギー活性があり、その他にも約 10 種類のアレルギーが放射性免疫電気泳動法で証明されている<sup>1,2)</sup>。オボムコイドは、卵白タンパク質の約 11% を占めている。分子量は 28kDa で、アミノ酸残基 186 個からなる 1 本のペプチドに 4 本あるいは 5 本の糖鎖を含み、糖含有量は約 22% に達する<sup>3)</sup>。オボムコイド 1 分子に 3 個のドメインを持ち、各ドメイン間には 3 個の S-S 結

合が存在している<sup>3)</sup>。この特異的な分子構造によりオボムコイドは熱に対する抵抗性が高く、また、それ自身がトリプシンインヒビター活性を持ち、腸内消化酵素に対しても抵抗性が高い。このことから卵白タンパク質の中でもオボムコイドは、消化機能の未熟な小児が経口摂取した場合、抗原性が高いため鶏卵アレルギーは発症しやすいと考えられている<sup>4)</sup>。

オボムコイドの等電点は、一般に 4.1 とされている。しかし、Feeney ら<sup>5)</sup>により、オボムコイドの電気泳動は不均一性を示し、ペプチド鎖には相違がなく糖鎖の組成により等電点 3.8 ~ 4.4 に数種分布すると報告されているが、詳細についてはよくわかっていない。そこで、等電点の異なる各種オボムコイドを分離し、その物理化学的な性質だけではなく、アレルギー活性との関係について調べることにした。また予備実験から、市販のオボムコイドに不均一性がみられるだけでなく、入手した数社の市販

オボアルブミンすべてにオボムコイドが混入していることが判明した。卵白アレルゲンの詳細な解析を行うためにオボアルブミン画分からこれら性質の異なるオボムコイドを完全に分離しておく必要がある。そこで本報では、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて各種オボムコイドを分離するとともにオボムコイドフリーのオボアルブミンを分離する方法を確立することにした。

## 実験方法

### 1. 供試料

京都市内の養鶏所から入手した産卵当日の新鮮卵から卵白を分離して用いた。

### 2. イオン交換クロマトグラフィー

卵白は 2 枚のガーゼで濾し、卵白と同量の 0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8 を加えて均一液とした後、徹底的に同緩衝液に対して透析を行った。透析中に析出したオボムシンを 8,000rpm, 4°C, 15 分の遠心で除去し、得られた上清を同緩衝液で 5 倍希釈したものを卵白イオン交換用試料とした。CM-トヨパール 650M イオン交換体（東ソー株式会社）を充填した 1.6×20cm のカラムを使用し、クロマトグラフィーを行った。0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8 で平衡化を行い、卵白イオン交換用試料を吸着後、緩衝液のイオン強度や pH を徐々に上げ、分画容量 3.5ml, 流速 80ml/hr で溶出した。タンパク質の溶出ピークの検出には、280nm の UV モニターを用いた。

### 3. ポリアクリルアミド電気泳動

既報に準じ<sup>6)</sup>、10 倍希釈の卵白-1%SDS（卵白コントロール）溶液を調製し、卵白タンパク質の標準マーカーとして用いた。Laemmli らの方法<sup>7)</sup>に準じ、12.5%ポリアクリルアミドゲルを調製し、既報に従い SDS- 電気泳動を行った<sup>8)</sup>。また、Reisfield らの方法<sup>9)</sup>に準じ、7%ポリアクリルアミドゲルを用いて既報に従い<sup>10)</sup>、トリス-グリシン緩衝液、pH 9.1 を用いてディスク電気泳動を行った。分離したオボムコイドの等電点を調べるために等電点マーカーとして、オボムコイド（フナコシ株式会社, WOR, TRL), Bowman-Birk 大豆トリプシンインヒビター（フナコシ株式会社, WOR, TRL), オボインヒビター（Sigma 社, タイプ IV-O), オボトランスフェリン（Sigma 社, タイプ IV）を用いた。

タンパク質の検出には、クマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) 染色を、また、糖の検出には、過ヨウ素酸-シッフ (PAS) 染色を用いた。イオン交換クロマトグラフィーより分離したタンパク質の

純度検定には 5 $\mu$ g 相当量を、また、糖の検出にはタンパク質 10 $\mu$ g 相当量を用いた。

## 4. タンパク質の定量

Lowry らの方法<sup>11)</sup>に従い、1%SDS 存在下で牛血清アルブミン (Sigma 社, A-7638) をスタンダードとして、750nm での吸光度の測定から求めた。

## 実験結果および考察

### 1. CM-トヨパール 650 M イオン交換クロマトグラフィーによる各種オボムコイドの分離

CM-トヨパール 650M イオン交換体と酢酸緩衝液を使用したバッチ法による予備実験から、卵白タンパク質中、等電点の最も低いオボムコイドのみが 0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8 で選択的にイオン交換体に吸着することが示唆された。そこで、図 1 に示すように CM-トヨパール 650M イオン交換体のカラムに、0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8 で透析した 10 倍希釈卵白調製試料を吸着後、同緩衝液で溶出させ、その後イオン強度や pH を徐々に上げ、等電点の低い順に卵白タンパク質を溶出した。なお、等電点 6 以上のタンパク質は 2.0M 食塩を含む 0.2M リン酸緩衝液、pH7.0 を使用して一気に溶出した。図 1 の矢印で示したピーク a~f を分取し、全卵白タンパク質を含む、10 倍希釈の卵白-1%SDS 溶液をコントロールとし、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、ピーク a~f 溶出した卵白タンパク質を分析した。0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8 で溶出した素通り画分のピーク a には CBB で染色されるタンパク質は存在しなかった。ピーク b は拡散した溶出パターンを示したので、図 1 に示すように b1~b3 の 3 画分に分取し泳動したところ、b1~b3 に明らかに移動度の異なる 2 種のタンパク質が溶出していた。ピーク c は、さらに低分子のタンパク質が溶出していた。これらのタンパク質は卵白コントロールとの比較からオボムコイド（以下 OVM と表わす）に相当すると思われた。そこで、SDS-電気泳動を行った後、PVDF 膜に転写し、OVM の糖鎖を認識するモノクローナル抗体<sup>12)</sup>とアルカリフォスファターゼを用いた免疫染色で交差反応を調べたところ、ピーク b~c に溶出した 3 種のタンパク質はいずれも陽性反応を示したことから等電点の異なる OVM と判明した。SDS-電気泳動の結果、見掛け上の分子量の大きい順に、ピーク b1 から b3 にかけて溶出した 2 種類の OVM を OVM-H および OVM-M とし、ピーク c に溶出した OVM を OVM-L と表すことにした。ピーク d はオボアルブミンであることが分かった。ピーク e はオボグロブリン

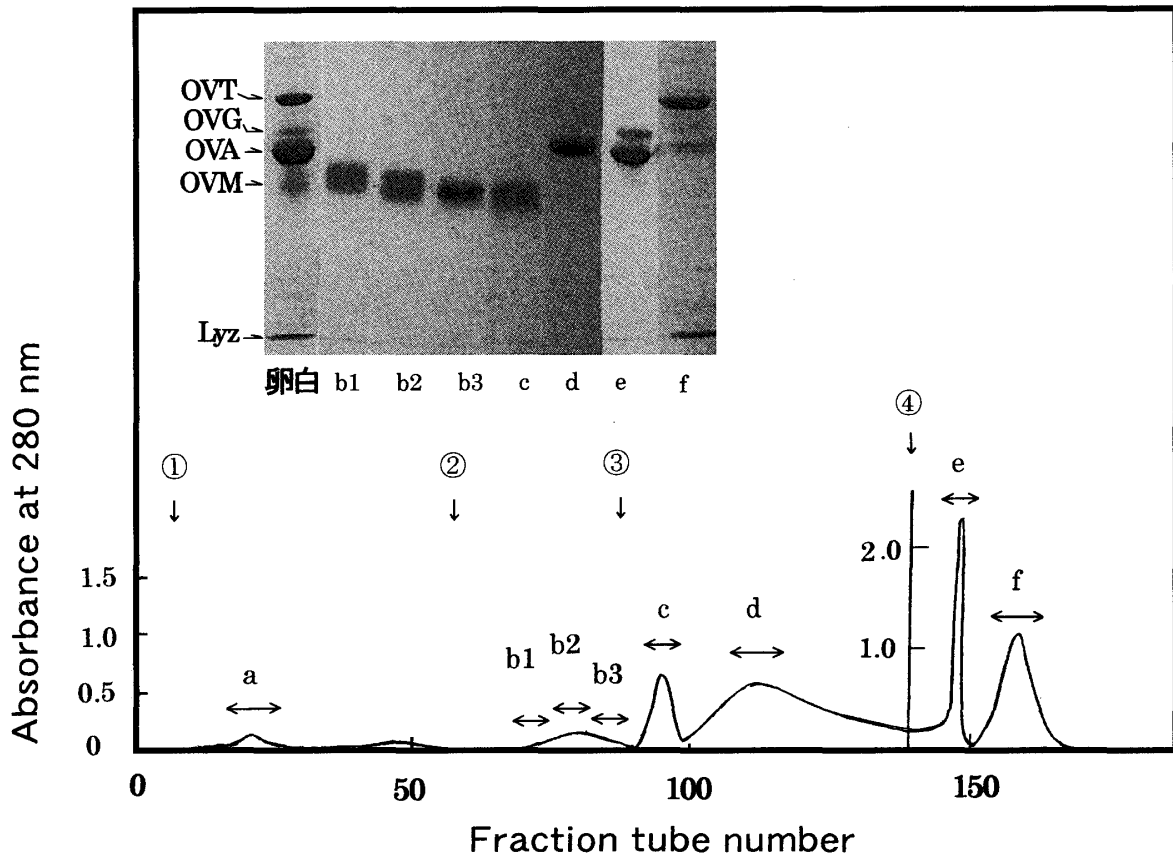


図1 CM-トヨパールイオン交換クロマトグラフィーによる卵白タンパク質の分離

0.1M 酢酸緩衝液, pH3.8 で平衡化を行い, 産卵当日の卵から調製した卵白イオン交換用試料 25ml を 1.6×20cm カラムにかけ, 上部に示した図の矢印の位置で順次緩衝液① 0.1M 酢酸緩衝液, pH3.8 ② 0.1M 酢酸緩衝液, pH4.3, ③ 0.1M 酢酸緩衝液, pH4.5 および④ 2M NaCl-0.2M リン酸緩衝液, pH7.0 を用いて溶出し, 280nm の UV モニターで溶出パターンを得た。

↔で示したピーク a~f に溶出した卵白タンパク質を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用した SDS-電気泳動にかけ, CBB 染色を行った。電気泳動パターンの上に 10 倍希釈の卵白-1% SDS 溶液, タンパク質 15μg 相当量をコントロールとして示した。卵白の主要タンパク質であるオボトランスフェリン (OVT), オボグロブリン (OVG), オボアルブミン (OVA), オボムコイド (OVM) およびリゾチーム (Lyz) に相当するバンドを泳動パターンの上に矢印で示した。

ンが溶出していたが, この画分には, ピーク d で溶出しきれなかった残りのオボアルブミンがかなり混入していた。ピーク f には主としてオボトランスフェリンとリゾチームが溶出していた。

図1のイオン交換クロマトグラフィーの結果をふまえ, まずピーク b~c に溶出した3種類の OVM を完全に分離する方法を検討することにした。種々の検討を行った結果, 図2に示すように, 0.1M 酢酸緩衝液, pH3.8 の素通り画分(図1から省略)が溶出した後, pH4.3 のイオン強度を 0.05M, 0.07M および 0.1M と変化させ溶出することによりピーク a, ピーク b およびピーク c を得た。さらに pH4.5 の 0.06M でピーク d を, 0.08M で小さなピーク e が溶出した後に大きなピーク f を得た。電気泳動の結果, ピーク a と b のそれぞれに2つのバンドを検出

したが, 今回はこれを完全に分離することができなかった。図1の3種類の OVM の移動度から考えて, ピーク a と b には, OVM-H, ピーク c には OVM-M, ピーク d には OVM-L が溶出していた。ピーク e には図1のイオン交換クロマトグラフィーでは分離されなかったタンパク質が溶出していた。これは, オボアルブミンよりもやや移動度が大きく, オボアルブミンとは明らかに区別された。しかし, OVM の電気的性質から考えて理論的にはピーク e に溶出したタンパク質が OVM であるとするれば, 電気泳動で OVM-L よりもさらに移動度は大きくなるはずである。そこで, OVM の糖鎖を認識するモノクローナル抗体との交差反応性を調べた結果, 陽性であったので, SDS-電気泳動の見掛け上の分子量から OVM-UH と命名し, 他の OVM との性質を比較し

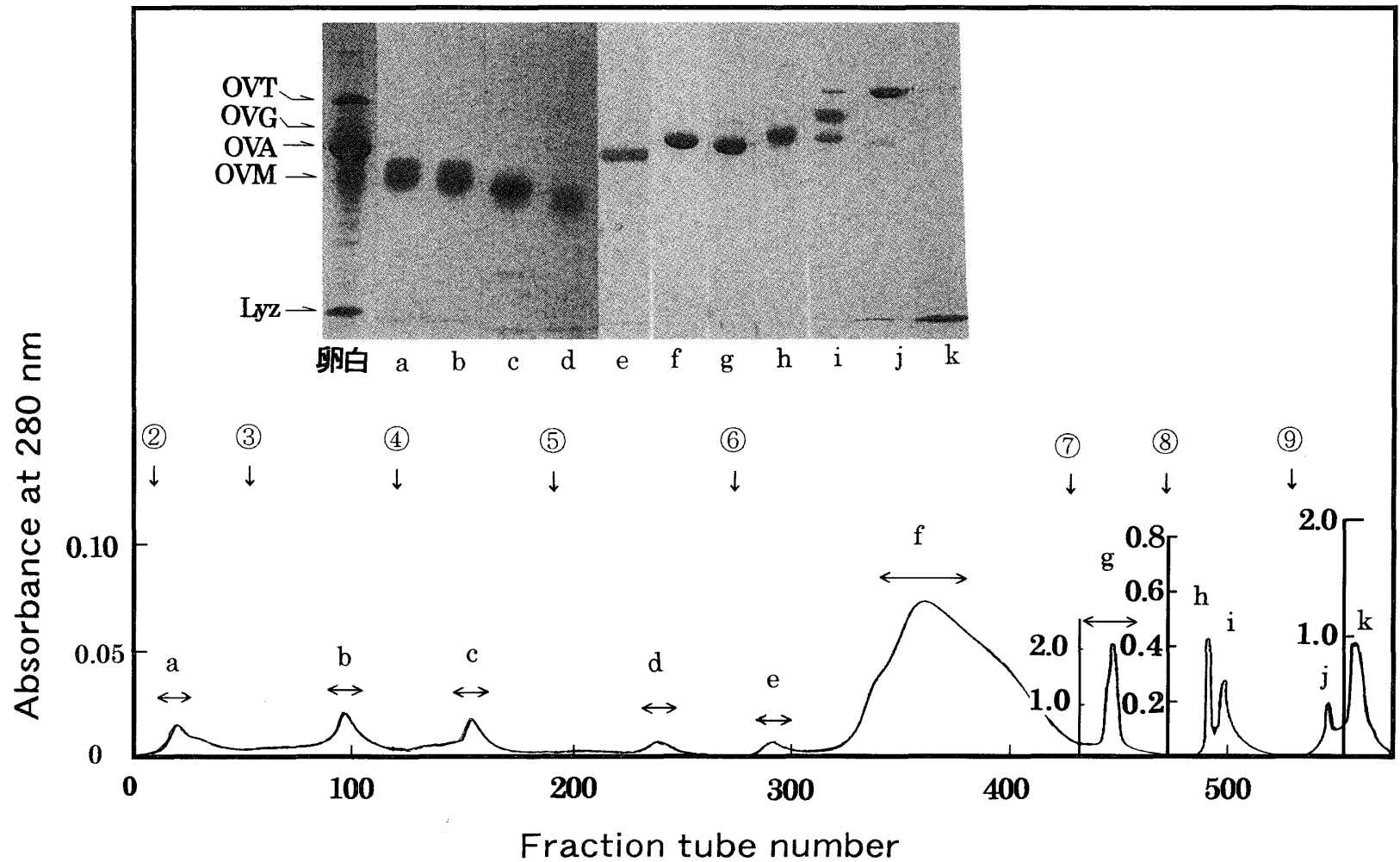


図2 CM- トヨパールイオン交換クロマトグラフィーによる各種オボムコイドおよび主要タンパク質の分離

図1に示したカラムを用い、0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8で平衡化を行い卵白イオン交換用試料25mlを吸着後、図の上部の矢印で示した位置で順次緩衝液①0.1M 酢酸緩衝液、pH3.8(素通り画分のため図からは省略した)、②0.05M 酢酸緩衝液、pH4.3、③0.07M 酢酸緩衝液、pH4.3、④0.1M 酢酸緩衝液、pH4.3⑤0.06M 酢酸緩衝液、pH4.5、⑥0.08M 酢酸緩衝液、pH4.5、⑦0.2M 酢酸緩衝液、pH4.6、⑧0.3M NaCl-0.2M 酢酸緩衝液、pH4.6、および⑨0.6M NaCl-0.2M 酢酸緩衝液、pH4.6を用いて溶出し、280nmのUVモニターで溶出パターンを得た。矢印で示したピークa~kに溶出した卵白タンパク質5 $\mu$ g相当量を図1に準じてSDS-電気泳動を行った。

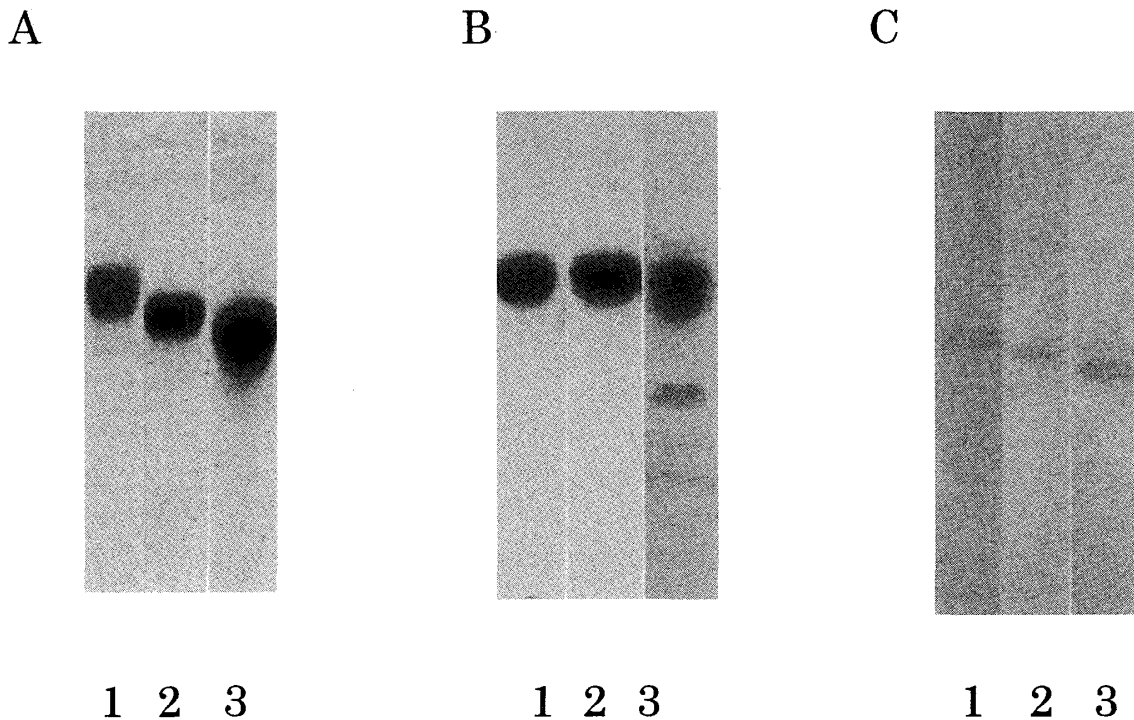


図3 各種オボムコイドの SDS-電気泳動パターン  
 図2に示すイオン交換クロマトグラフィーのピーク b～d に分離精製した各種オボムコイドの SDS-電気泳動の結果を示した。

A, 還元剤存在下で行った CBB 染色; B, 還元剤非存在下で行った CBB 染色; C, 還元剤存在下で行った PAS 染色の結果を示した。A, B および C の各泳動パターンは左からそれぞれピーク b に溶出した OVM-H (1), ピーク c に溶出した OVM-M (2) およびピーク d に溶出した OVM-L (3) の泳動結果を示した。ゲルは 12.5% 均一ゲルを用い, CBB 染色にはタンパク質 5 $\mu$ g 相当量を, PAS 染色にはタンパク質 10 $\mu$ g 相当量を用いた。

た。その結果, PAS 染色において他の OVM のような染色強度はなかったことから, OVM とは異なることが予想されたので, N 末端からのアミノ酸配列を解析した結果, OVM-UH はオボアルブミン Y であることが判明した<sup>14)</sup>。ピーク f は卵白主成分のオボアルブミンであった。さらに残りの卵白主要タンパク質を分離するために 0.2M 酢酸緩衝液, pH 4.6 と同緩衝液に食塩を 0.3M と 0.6M をそれぞれ添加して順次溶出した。ピーク g にはピーク f で溶出しきれなかったオボアルブミンが溶出し, ピーク h にオボグロブリン G3, ピーク i にオボグロブリン G2, ピーク j にオボトランスフェリン, ピーク k にリゾチームが溶出していた。

以上の結果から, CM- トヨパールイオン交換体を使用し, 酢酸緩衝液の pH とイオン強度を徐々に上昇させることで, 卵白主要タンパク質をほぼ完全に分離することができた。

次に, 図2のイオン交換クロマトグラフィーのシステムで3つの画分に分離した OVM-H, OVM-M および OVM-L の SDS-電気泳動を行った。図3の A および B に示すように, 12.5% ポリアクリルアミドゲ

ルを使用し, 還元剤存在下と非存在下で行った。その結果, 2-メルカプトエタノール存在下では, OVM-L, OVM-M, OVM-H の順に移動度が大きかったが, 2-メルカプトエタノール非存在下では, 移動度にはあまり変化がなかった。一般的にタンパク質 1g 当たりに SDS 1.4g が結合するといわれている<sup>13)</sup>。そのため SDS-電気泳動での移動度はタンパク質の表面電荷状態に影響されることなく, タンパク質の分子量の大きさに依存して移動すると考えられている。しかし, 既に報告したように<sup>10)</sup>, タンパク質の表面電荷が + または - に偏っている場合は, 見かけ上の移動度が大きく変化することがある。OVM の中で, OVM-H の移動度が最も小さくなったのは, 分子表面に - の電荷が多いために SDS との相互作用が弱くなり, その結果, 見かけ上の移動度が小さくなっている可能性が考えられる。これらのことから, 各種 OVM 分子内の 9 個の S-S 結合がすべて結合しているときと S-S 結合が開裂しているときには, OVM 表面の荷電状態に差が生じ, SDS の結合が通常と異なるものと推察した。

次に, 図3A および B の 2 倍量のタンパク質濃度

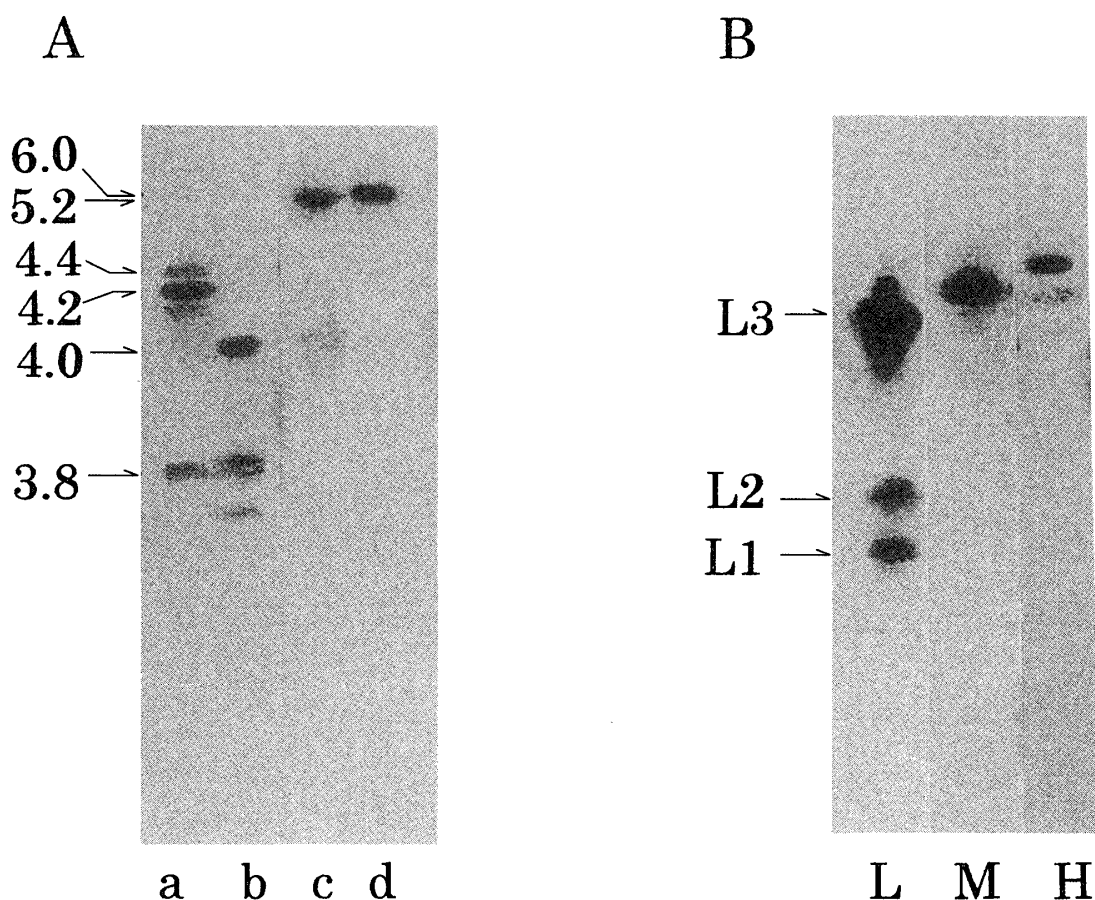


図4 各種オボムコイドのディスク電気泳動パターン

AおよびBは、還元剤存在下で、それぞれタンパク質5 $\mu$ g相当量を用いてディスク電気泳動を行った。ゲルは7%ポリアクリルアミドゲルを使用した。

A, 等電点マーカーa, オボムコイド (pI3.8 ~ 4.4) ; b, Bowman-Birk 型大豆トリプシンインヒビター (pI4.0) ; c, オボインヒビター (pI5.2) ; d, オボトランスフェリン (pI6.05) のディスク電気泳動パターン。

B, 図2のイオン交換クロマトグラフィーで分離した各種OVM-L, OVM-MおよびOVM-Hのディスク電気泳動パターン。OVM-L画分には明らかに移動度の異なる3種類のバンドが存在したので移動度の大きいものからL1, L2およびL3として示した。

を用い図3Aと全く同じ条件でSDS-電気泳動を行い、PAS染色による糖含量の比較を行った(図3C)。OVM-L, OVM-MおよびOVM-Hはすべて陽性反応を示し、その中で、OVM-Lが強く染色された。OVMには、糖鎖が4個あるものと5個あるものが報告されているので、OVM-Lは5本の糖鎖を持つタイプである可能性が示唆された。

次に、図2に示したイオン交換クロマトグラフィーのピークfに分離したオボアルブミン画分について、1ngのOVMまで検出可能なOVMモノクローナル抗体<sup>12)</sup>を用いてOVMの混入を調べた結果、陽性反応が見られず、高純度のオボアルブミンを得ることができた。市販のアルブミンは、いずれも卵白タンパク質のアレルゲン解析には無視できないOVMが混入していたので、この純化したオボア

ルブミンを使用することにより明確な卵白アレルゲン性の解析が可能となった。

## 2. 各種オボムコイドの電気的性質の分析

Feeneyら<sup>5)</sup>の分析結果から、OVMは等電点3.8~4.4に数種類分布しており、この不均一性はペプチドに依存したものではなく、糖鎖の性質の相違によるものと結論している。OVMは20~25%の糖を含み、糖はN-アセチル-グルコサミン12.5~15.4%、マンノース4.3~4.7%、ガラクトース1.0~1.5%およびN-アセチルノイラミン0.4~4.0%から構成されており<sup>13)</sup>、特にシアル酸の含有量は、10倍の相違があることが報告されている<sup>15)</sup>。従って、OVMの電気泳動での不均一性はシアル酸の含有量に依存していることが推察される。図2のCM-トヨパールイオン交換体クロマトグラフィーで分離した

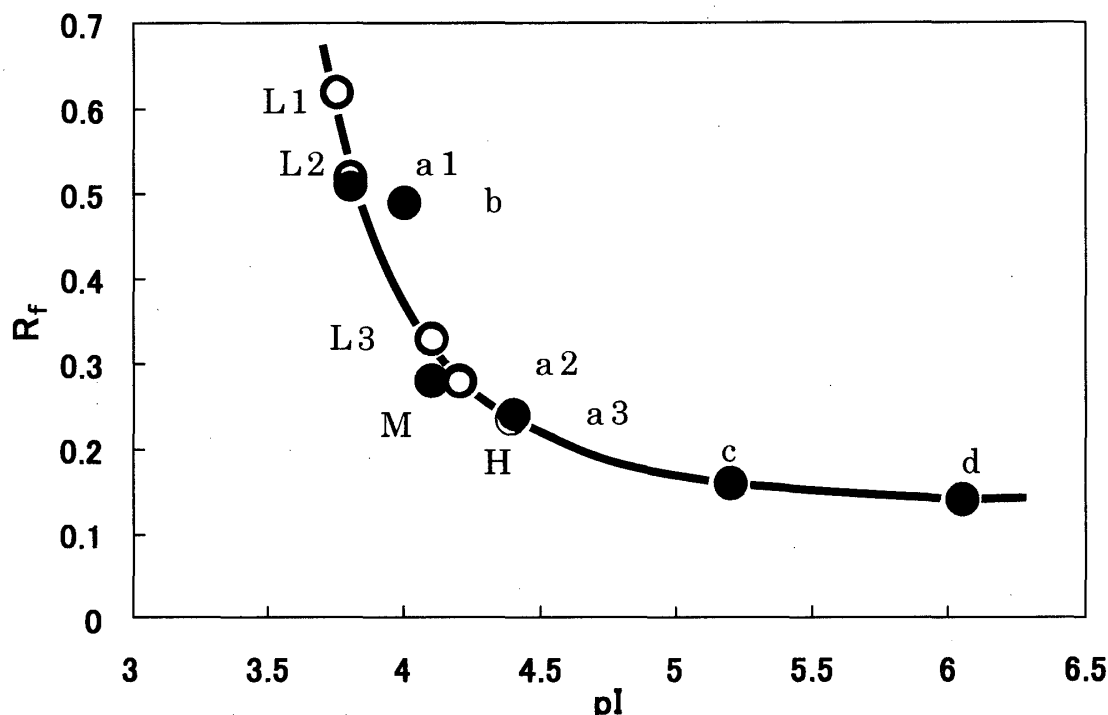


図5 イオン交換クロマトグラフィーで分離した OVM-H, OVM-M および OVM-L の等電点測定  
 図4に示したディスク電気泳動の等電点マーカーa~dの等電点と移動度の関係から等電点測定カーブを作成し(●), 図2のイオン交換クロマトグラフィーで分離した OVM-L 画分中の L1, L2, L3, 並びに OVM-M および OVM-H の移動度(○)からそれぞれの等電点を求めた結果, 3.7, 3.8, 4.1, 4.2 および 4.4 であった。

各種 OVM は等電点の低い順に溶出していると考えられる。そこで次にディスク電気泳動を既報<sup>10)</sup>に準じて行い, 各種オボムコイドの電気的性質を調べた(図4)。市販の既知の等電点マーカーを用い, 電気泳動の移動度と等電点の関係から等電点測定カーブを作成し, 図5に示した。図4Bのディスク電気泳動の結果から, 本研究で分離した OVM-L, OVM-M および OVM-H の移動度から等電点を求めた。OVM-L には, 図4Bに示すように L1, L2, L3 のバンドが検出され, 等電点 4.1 の L3 が OVM-L 画分の殆どを占めており, その他に等電点 3.8 の L2, 等電点 3.7 の L1 も混在していた。また, OVM-M は等電点 4.2, OVM-H は等電点 4.4 であった。

## 要 約

卵白タンパク質の中で最も抗原性が高いオボムコイドは電気泳動で不均一性を示すことが報告されているが, その詳細はよく分かっていない。そこで, CM-トヨパール 650M イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて卵白から各種オボムコイドを分離し, それらの性質を分析するとともに, 卵白主要タンパク質の分離を試みた。0.1M 酢酸緩衝液, pH 3.8 で平衡化したカラムに卵白タンパク質を吸着後,

同緩衝液のイオン強度や pH を徐々に上げ, 等電点の低いタンパク質から溶出した。SDS-電気泳動および OVM モノクローナル抗体による解析の結果, 3 種類の OVM を分離することができた。SDS-電気泳動で見かけ上の分子量の大きい順に OVM-H, OVM-M, OVM-L と表した。0.05M~0.07M 酢酸緩衝液, pH4.3 で OVM-H, 0.1M 酢酸緩衝液, pH4.3 で OVM-M, 0.06M 酢酸緩衝液, pH4.5 で OVM-L を分離した。その後, 0.08M 酢酸緩衝液, pH4.5 で 2 つのピークを得, 先のピークにオボアルブミン Y, 続いて溶出した後ろのピークにはオボアルブミンを得た。さらに, 0.3M 食塩を添加した 0.2M 酢酸緩衝液, pH4.6 でオボグロブリンを分画し, 0.6M 食塩添加でオボトランスフェリンとリゾチームを分離することができた。

分離した 3 種の OVM は還元剤存在下では見かけ上の移動度に差が見られたが, 還元剤非存在下では, あまり移動度に差は見られなかった。次に市販の既知の等電点マーカーを用い, ディスク電気泳動を行い, 各種オボムコイドの電気的性質を調べた。OVM-L には, L1, L2, L3 のバンドが検出され, 等電点は 4.1 が中心で, その他に 3.8 や 3.7 も混在していた。また, OVM-M の等電点は 4.2, OVM-H

は等電点 4.4 であった。

以上の結果から本研究で 3 種の OVM を分離し、等電点 3.7, 3.8, 4.1, 4.2, 4.4 の 5 種の OVM の存在を明らかにした。また、このイオン交換クロマトグラフィーのシステムで OVM モノクローナル抗体に陽性反応を示さないオボムコイドフリーのアルブミンを得ることができた。

## 文 献

- 1) D. R. Hoffman: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 481 (1983)
- 2) E. Holen and S. Elsayed: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **91**, 136 (1990)
- 3) 加藤郁之進: 化学と生物, **26**, 295 (1988)
- 4) J. Bernhisel-Broadbent, H. M. Dintzis and H. A. Sampson: *Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 171 (1997)
- 5) R. E. Feeney, D. T. Usuga and H. Maeda: *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 124 (1967)
- 6) S. Kido, M. Janado and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **78**, 261 (1975)
- 7) U. K. Laemmli: *Nature*, **277**, 680 (1970)
- 8) S. Kido and Y. Doi: *Poult. Sci.*, **6**, 476 (1988)
- 9) R. A. Reisfield, U. Lewis and D. E. Williams: *Nature (London)*, **195**, 281 (1962)
- 10) S. Kido, A. Morimoto, F. Kim and Y. Doi: *Biochem. J.*, **286**, 17 (1992)
- 11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 12) J. Hirose, S. Ito, N. Hirata, S. Kido, N. Kitabatake and H. Narita: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1438 (2001)
- 13) J. A. Reynolds and C. Tanford: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **66**, 1002 (1970)
- 14) 廣瀬潤子, 土居幸雄, 木戸詔子, 北嶋直文, 成田宏史: 日本農芸化学会, 大会要旨集, 114 (2002)
- 15) R. Montgomery: *The Carbohydrate Vol. IIB* (ed. W. Pigman and D. Horton), **655**, Academic Press (1970)