

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6879514号
(P6879514)

(45) 発行日 令和3年6月2日(2021.6.2)

(24) 登録日 令和3年5月7日(2021.5.7)

(51) Int. Cl. F 1
C 0 7 K 14/78 (2006.01) C 0 7 K 14/78

請求項の数 3 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2018-508069 (P2018-508069)	(73) 特許権者	501168814 国立研究開発法人水産研究・教育機構 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目1 番地25
(86) (22) 出願日	平成29年3月28日(2017.3.28)	(73) 特許権者	000252252 和興フィルタテクノロジー株式会社 東京都千代田区鍛冶町一丁目8番3号 神 田91ビル3階
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/012623	(74) 代理人	100121441 弁理士 西村 電平
(87) 国際公開番号	W02017/170541	(74) 代理人	100154704 弁理士 齊藤 真大
(87) 国際公開日	平成29年10月5日(2017.10.5)		
審査請求日	令和1年12月13日(2019.12.13)		
(31) 優先権主張番号	特願2016-63157 (P2016-63157)		
(32) 優先日	平成28年3月28日(2016.3.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維状タンパク質の抗原性を被覆した組成物及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エビ由来のトロポミオシンと、マルトペンタオース又はマルトヘプタオースとを結合させた複合体を含有する、エビ由来のトロポミオシンの抗原性を被覆した組成物。

【請求項2】

エビ由来のトロポミオシンと、マルトペンタオース又はマルトヘプタオースとをメイラード反応させることを特徴とする、エビ由来のトロポミオシンの抗原性を被覆した組成物の製造方法。

【請求項3】

前記トロポミオシン及びマルトペンタオース、又はマルトヘプタオースの混合物を6時間以上乾燥加熱してメイラード反応をさせる請求項2記載のエビ由来のトロポミオシンの抗原性を被覆した組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、線維状タンパク質の抗原性を被覆した新規な組成物及びその製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、例えばスギ花粉アレルギー等の球状タンパク質と例えばガラクトマンナン等の多

糖類とをメイラード反応させて、球状タンパク質の抗原構造をマスキングするものが考えられている（例えば特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2006-340658号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、複雑な高次構造を持たない例えばエビ由来のトロポミオシン等の線維状タンパク質に対しては、その有効性は明らかになっていない。実際、本願発明者が、ガラクトマンナンとトロポミオシンとをメイラード反応させても、その抗原構造の低減化を見い出すことはできていない。

【0005】

一方で、本願発明者は、線維状タンパク質の抗原性の低減化を図るべく、種々の検討を行った。その中で、線維状タンパク質の抗原性を低減化することのできる糖類を見い出した。

【0006】

本発明は、本願発明者の上記知見に基づいてなされたものであり、線維状タンパク質の抗原性を被覆した新規の組成物を提供することをその主たる課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

すなわち本発明に係る線維状タンパク質の抗原性を被覆した組成物は、線維状タンパク質とマルトオリゴ糖とを結合させた複合体を含有することを特徴とする。

ここで、前記線維状タンパク質が、例えばエビ由来のトロポミオシンであることが望ましい。

また、前記マルトオリゴ糖の分子サイズが、五糖（5分子の単糖で生成されるオリゴ糖）のマルトペンタオース（分子量約829）から七糖のマルトヘプタオース（分子量約1153）の間であることが望ましい。

【0008】

さらに本発明に係る線維状タンパク質の抗原性を被覆した組成物の製造方法は、線維状タンパク質とマルトオリゴ糖とをメイラード反応させることを特徴とする。

ここで、前記線維状タンパク質及びマルトオリゴ糖の混合物を6時間以上乾燥加熱してメイラード反応をさせることが望ましい。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、線維状タンパク質とマルトオリゴ糖とをメイラード反応により結合させることにより、線維状タンパク質の抗原性を低減化することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】乾燥加熱によるPen_j1のSDS-PAGE解析の結果（panel A）、Dot blot解析の結果（panel B）及びIgE抗体との結合度の結果（panel C）である。

【図2】Pen_j1及びグルコースの複合体のSDS-PAGE解析の結果（panel A）、Dot blot解析の結果（panel B）及びIgE抗体との結合度の結果（panel C）である。

【図3】Pen_j1及びD(+) - マルトトリオースの複合体のSDS-PAGE解析の結果（panel A）、Dot blot解析の結果（panel B）及びIgE抗体との結合度の結果（panel C）である。

【図4】Pen_j1及びマルトペンタオースの複合体のSDS-PAGE解析の結果（

panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

【図5】Pen j 1及びマルトヘプタオースの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

【図6】Pen j 1及びガラクトマンナンの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下に本発明を詳述する。

【0012】

本実施形態に係る線維状タンパク質の抗原性を被覆した組成物は、線維状タンパク質とマルトオリゴ糖とを結合させた複合体を含有するものである。

【0013】

線維状タンパク質としては、エビ由来のトロポミオシンを用いることが考えられる。このエビ由来のトロポミオシンは、分子量約35kDaであり、 α -ヘリックス構造に富む線維状タンパク質である。なお、トロポミオシンは、甲殻類、軟体動物、昆虫等において高い相同性があり、高頻度に交叉性を示す。

なお、その他の線維状タンパク質としては、コラーゲン、ミオシン、ケラチン、エラスチンなども考えられる。

【0014】

マルトオリゴ糖としては、マルトペンタオース又はマルトヘプタオースを用いることが考えられる。

【0015】

本実施形態の線維状タンパク質の抗原性を被覆した組成物は、線維状タンパク質であるトロポミオシン及びマルトオリゴ糖であるマルトペンタオース又はマルトヘプタオースの混合物を6時間以上乾燥加熱してメイラード反応をさせることで製造することができる。

【0016】

具体的な製造方法は次のとおりである。

トロポミオシン/マルトペンタオース(マルトヘプタオース)のモル比が、エピトロポミオシン：糖=約1：50となる量のトロポミオシン及びマルトペンタオース(マルトヘプタオース)を、水に混合溶解し、水溶液中のトロポミオシンの合計含量が0.1質量%となるようにして必要量のマルトペンタオース(マルトヘプタオース)を含有させて調製する。得られた水溶液を凍結乾燥することにより粉末化する。得られた粉末を温度50～80℃、より好ましくは55～65℃、相対湿度30～50%、より好ましくは30～40%の条件下で、6時間以上、メイラード反応させることにより本発明の複合体を製造することができる。

【0017】

本実施形態では、タンパク質1分子に対して最大何分子の糖が結合できるかを調べ(アミノ酸配列から予測)、両分子の構造や分子量から反応効率予測をして、その上でモル比で何：何にするかを設定している。エピトロポミオシン及びマルトオリゴ糖は分子量がほぼ均一なのでこれが可能となる。今回のエピトロポミオシンの場合では分子表面に露出したりジン残基(糖と結合しうるアミノ酸残基)が25個あり、オリゴ糖の反応効率が高いことを考慮してエピトロポミオシン1分子中のリジン残基(25残基)に対して2倍の50分子のオリゴ糖を加える設定としている。すなわちトロポミオシン1モル：オリゴ糖50モルとしている。モル比やモル濃度での溶液調製では物質(分子量)が異なれば1モル当たりの質量も変わるので溶液の質量%は一定ではない。ただし、タンパク質の溶解度や均一性に係わる溶液の粘性等を考慮して、水溶液中のタンパク質の合計含量は0.1%程度が適切である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

[実施例]

エビ由来のトロポミオシンに対する糖修飾のエピトープ被覆効果についての実験結果について説明する。

エビ由来のトロポミオシンは、クルマエビ加食部より、非加熱条件下で抽出し、等電点沈殿法、硫酸分画及びイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

【 0 0 1 9 】

生成されたトロポミオシン (Pen j 1) のメイラード型糖修飾には、単糖としてグルコース、マルトオリゴ糖としてD (+) - マルトトリオース、マルトペンタオース、マルトヘプタオース、多糖としてガラクトマンナンを使用した。

【 0 0 2 0 】

低分子量の糖類 (ガラクトマンナン以外) は、Pen j 1 : 糖 = 1 : 5 0 となるように混合し、ガラクトマンナンは重量比でPen j 1 の10倍となるように混合し、恒温恒湿器内で60℃、相対湿度35%の条件の下で、乾燥加熱した。糖修飾の確認は、SDS - PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法) 解析にて行い、エピトープ被覆効果の評価は患者血清を用いてDot blot解析で行い、IgE抗体との結合度を測定した。

【 0 0 2 1 】

なお、SDS - PAGE解析は、一般的に行われるLaemmliの方法に従って行った。0.1%タンパク質溶液に同量のサンプル処理液を加えたものを泳動用サンプルとした。泳動用ゲルは、プレキャストゲルe - PAGE L (ゲル濃度12.5%、アトー株式会社、東京) を使用した。電気泳動はEz Run泳動用緩衝溶液(アトー株式会社)を用いて、20mAで泳動させた。泳動後、タンパク質をEz Stain Aqua (アトー株式会社) でクマシー染色した。

【 0 0 2 2 】

また、複合体の抗原性評価はDot blot解析にて行った。PVDF membrane (Hybond - p、GEヘルスケア・ジャパン株式会社、東京) をメタノールに浸して親水化させた後に1xPBSに浸し洗浄した。乾燥させたPVDF membraneに各サンプルを10µlずつスポットした。PVDF membraneを乾燥させた後に5%のECL Prime Blocking Reagentを含むPBSTween 20に浸して室温で1時間振盪しブロッキングした。ブロッキングしたPVDF membraneをPBSですすいだ後にPBS - Tween 20で洗浄した。洗浄したPVDF membrane上にPBS - Tween 20で50倍希釈したエビ陽性患者血清 (22515 - JH) を2ml加え室温にて1時間反応させた。反応後PBSTween 20にて洗浄した後、PBSTween 20で4,000倍希釈したanti Human IgE Antibody - HRPを2ml加え、1時間反応させた後、PBS - Tween 20にて洗浄し、発光基質 (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent、GEヘルスケア・ジャパン株式会社) をPVDF membrane上加えて、5分間反応させた。抗原抗体反応による化学発光はChemiDoc XRS+ (Bio - Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて撮影した。このDot blot解析を、エビ陽性患者血清を変えて (22429 - HL、22596 - AW) 同様に行った。

【 0 0 2 3 】

さらに、IgE抗体との結合度の測定は、ChemiDoc XRS+で撮影したDot blot解析画像に対しデシントメトリ解析を行い各スポットの濃度を数値化した。各スポット内の8か所の平均値を求め、さらに同複合体間の平均値を算出して複合体ごとの結合度とした。各混合物の乾燥加熱0時間を100%として、乾燥加熱時間ごとの結合度をグラフにプロットし、増減の有意差をt検定による統計処理で判定した。なお、図4及び図5における「***」は、p値が0.005未満であることを示し、「**」は、p値が0.01未満であることを示し、「*」は、p値が0.05未満であることを示

10

20

30

40

50

している。

【0024】

図1は、乾燥加熱によるPen_{j1}のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

図2は、Pen_{j1}及びグルコースの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)である。

図3は、Pen_{j1}及びD(+)-マルトトリオースの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

10

図4は、Pen_{j1}及びマルトペンタオースの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

図5は、Pen_{j1}及びマルトヘプタオースの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)及びIgE抗体との結合度の結果(panel C)である。

図6は、Pen_{j1}及びガラクトマンナンの複合体のSDS-PAGE解析の結果(panel A)、Dot blot解析の結果(panel B)である。

【0025】

図2に示すように、Pen_{j1}及びグルコースの複合体では、乾燥加熱3時間後にPen_{j1}の分子量に数kDaの増加が確認されたが、それ以降のサンプルは不溶化が激しく解析不能であった。同様に、図3に示すように、Pen_{j1}及びD(+)-マルトトリオースの複合体では全ての乾燥加熱サンプルで不溶化が起こった。

20

【0026】

図4及び図5に示すように、Pen_{j1}及びマルトペンタオースの複合体、Pen_{j1}及びマルトヘプタオースの複合体では、1日後から14日後にかけてPen_{j1}の高分子化が確認された。図6に示すように、Pen_{j1}及びガラクトマンナンの複合体では、3日後から14日後にかけて35kDa付近から約200kDaを超えるものまでの広範囲に及ぶPen_{j1}の高分子化が確認された。

【0027】

また、図4及び図5に示すように、Pen_{j1}及びマルトペンタオースの複合体、Pen_{j1}及びマルトヘプタオースの複合体では、乾燥加熱後6時間経過時から、anti-Pen_{j1} IgE抗体との結合率が有意に低下し、未修飾エビトロポミオン(100%)に対して約40%にまで低減することができた。

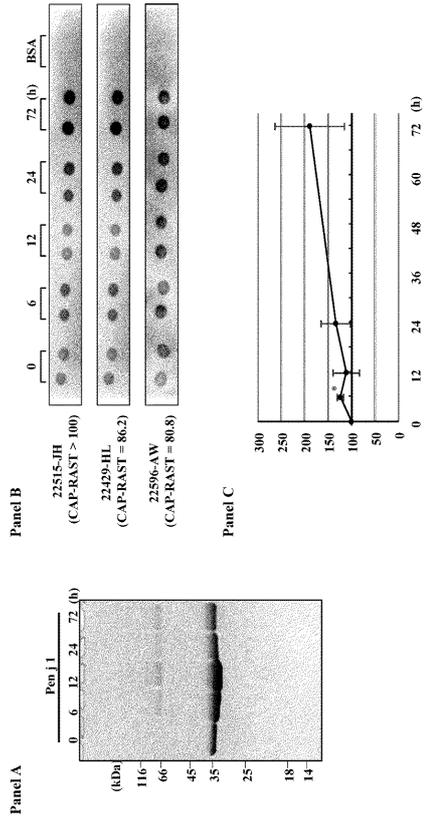
30

【産業上の利用可能性】

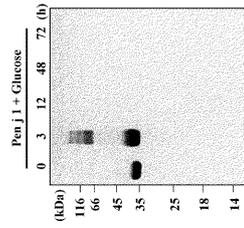
【0028】

本発明によれば、線維状タンパク質とマルトオリゴ糖とをメイラード反応により結合させることにより、線維状タンパク質の抗原性を低減化することができる。

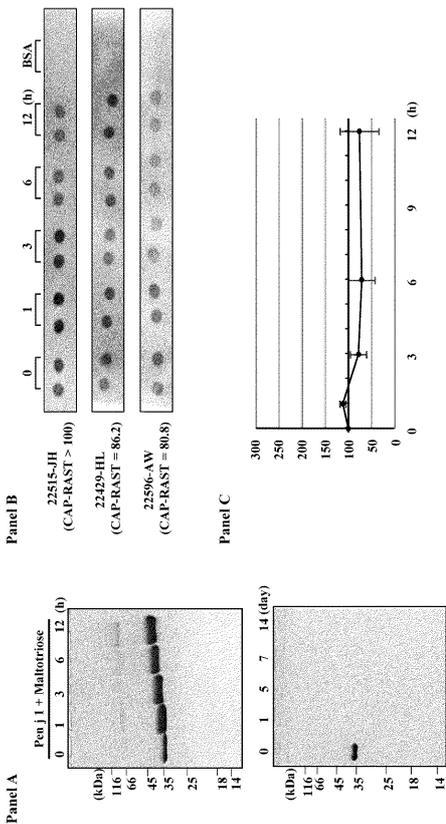
【 図 1 】



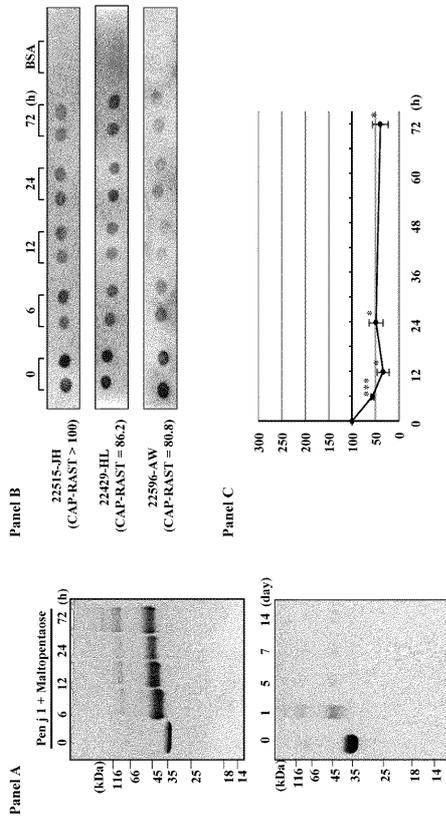
【 図 2 】



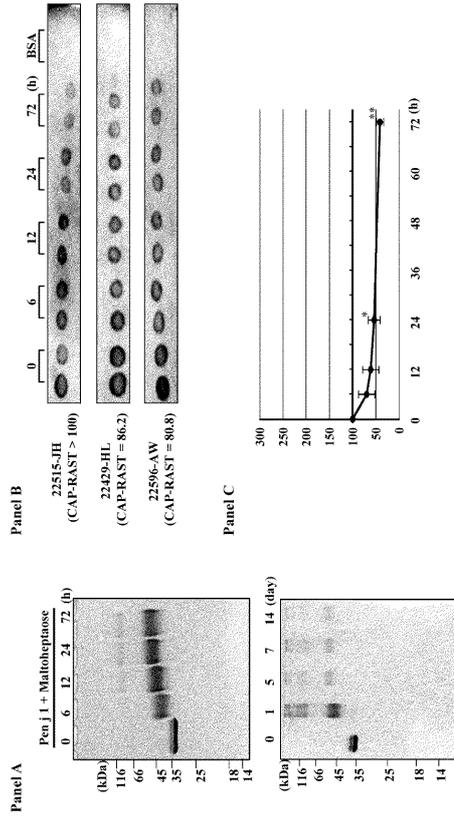
【 図 3 】



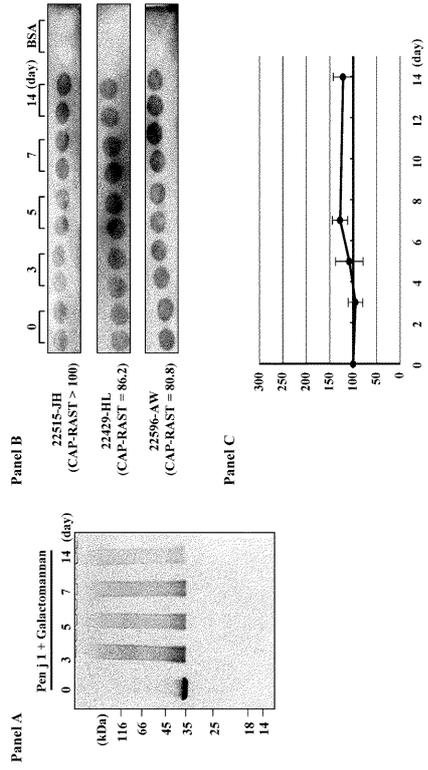
【 図 4 】



【 5 】



【 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 臼井 将勝

山口県下関市永田本町2-7-1 国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校内

(72)発明者 宮 崎 泰幸

山口県下関市永田本町2-7-1 国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校内

(72)発明者 齊藤 章

東京都千代田区鍛冶町一丁目8番3号 和興フィルタテクノロジー株式会社内

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 菰田俊一, エビ・カニアレルギーのはなし, 日本食品保蔵科学会誌, 2015年, Vol. 41, No.

4, pp. 165-170

ZHANG, Ming et al., Glycation of a lactalbumin with different size saccharides: Effect on protein structure and antigenicity, INT. DAIRY J., 2014年, Vol. 34, pp. 220-228

PEDROSA, Maria et al., Shellfish Allergy: a Comprehensive Review, Clinic. Rev. Allerg. Immunol., 2015年, Vol. 49, pp. 203-216

NAKAMURA, Atsushi et al., Effect of Maillard Reaction on Allergenicity of Scallop Tropomyosin, J. Agric. Food Chem., 2005年, Vol. 53, pp. 7559-7564

NAKAMURA, Atsushi et al., Changes in Allergenicity and Digestibility of Squid Tropomyosin during the Maillard Reaction with Ribose, J. Agric. Food Chem., 2006年, Vol. 54, pp. 9529-9534

SHEN, Hai Wang et al., Purification, characterization and immunoreactivity of tropomyosin, the allergen in Octopus fangsiao, Process Biochem., 2014年, Vol. 49, pp. 1747-1756

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

A23L 2/00 - 35/00

CAPLUS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JSTPLUS / JMEDPLUS / JST7580 (JDreamIII)

PubMed