

Auto2D® による 2 次元ゲル電気泳動法の 食物アレルギー研究への応用

多様なタンパク質源から迅速なアレルゲンタンパク質の分離・同定を可能にする
自動 2 次元ゲル電気泳動

近年、世界中に大勢のアレルギー患者がみられ、その数は増え続けており、特に食物由来のアレルゲンの検出と同定の重要性はますます高まっています。2 次元ゲル電気泳動法 (2D-E) は、アレルゲンコンポーネントの免疫検出法に必要な高度なタンパク質分離に従来から使用されています。一方で、この伝統的な分離プロセスには時間と技術的習熟が必要で手間がかかるのが課題でした。メルクの Auto2D® システムは、完全自動の 2 次元ゲル電気泳動を 1 ～ 2 時間で実施し、迅速かつ信頼性のある結果を得ることができます。Auto2D® システムが多様なアレルギーのアレルゲンタンパク質の同定に適していることを、本稿に示します。

緒言

アレルギーは全世界共通の健康問題となっています。3 つの主要なアレルゲン物質の起源として食物 (世界人口の推定約 4% が罹患)、医薬品 (世界人口の推定約 10% が罹患)、および花粉 (世界人口の推定約 10 ～ 30% が罹患)¹⁻³ が挙げられます。アレルギー反応は IgE 介在性免疫反応によるもので、従来からプリックテストで検査されています。一方で、アレルゲン検査と診断は分子学的手法によっても実施されます¹。放射性アレルゲン吸着試験 (RAST) および酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) の 2 法は、特定のアレルゲンに対する IgE を検出して定量するために使用する方法ですが、RAST や ELISA にはタンパク質の分離ステップがないため、抗体と食物試料成分間の交差反応により、偽陽性となる例もあります¹。

ゲル電気泳動法は、広く普及しているタンパク質の分離法です。一般的な 1 次元ゲル電気泳動では分子量に基づいてタンパク質を分離し、2 次元ゲル電気泳動では、さらに等電点 (pI) に基づいた分離を先に行うことで、より高度にタンパク質を分離します。分離

度が上がれば、研究者は、特に、異なるアレルギー源性を有する可能性があるアイソフォームなど、分子量が近似するタンパク質を区別できます。2 次元ゲル電気泳動法は技術的変動も少ないため、アレルゲン同定など、ヒトの健康に関連する研究のための良い選択肢となっています⁴。

2 次元ゲル電気泳動を行ってから、それを免疫検出することで、多様な起源由来のさまざまなアレルゲンタンパク質が同定されています。花粉の研究では、この技法を使用して、レッドオークの花粉から新規 IgE 結合タンパク質を同定するとともに、野草抽出物から、1 種のアレルゲンに属する複数のアイソフォームなど、臨床的に重要な知見が得られています^{5,6}。2 次元ゲル電気泳動法は、主要なピーナッツアレルゲンファミリーについて深く掘り下げた研究で、さまざまなピーナッツ品種を比較するために使用され、また、天然および遺伝子組み換えのダイズ間でアレルゲンに差がないことを確認する目的でも使用されています^{7,8}。

本稿では、4 種 of 食物 (3 種の植物起源 (ダイズ、クルミ、ソバ) および 1 種の動物起源 (イクラ)) 由来のアレルゲン検出において、Auto2D® ゲル電気泳動システムの有用性を示します。患者血清を用いた免疫検出により、Auto2D® システムを用いて、特異的なアレルゲンを特定することができました。ダイズおよびイクラサンプルから、SDS-PAGE により得られた単一バンドを、Auto2D® システムにより、主要な既知アレルゲンに対応する複数の個別タンパク質スポットに分離することができました。以上の結果が示すのは、Auto2D® システムはアレルゲン同定に使用でき、所要時間と必要な専門的スキルを低減しながら、高品質で信頼性のある結果を得ることができるということです。

実験と結果

市販のダイズ 2.5 g を蒸留水 25 mL に一晩浸漬し、ミルで粉碎してガーゼを用いて絞り、ダイズ抽出液を得ました。タンパク質濃度は、豆乳と同程度 (約 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) でした。次に、サンプル 30 μg を Auto2D[®] による分析に供し、15 μg を従来の SDS-PAGE に供しました。Auto2D[®] システムを用いた 2D-E は、1 次元目に IEF Chip pH3-10NL、2 次元目に PAGE Chip 12.5% を選択し、サンプルの分離は標準的なプログラム (pH3-10NL M) で行いました。電気泳動後、1D SDS-PAGE および Auto2D[®] のゲル中のタンパク質を Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色しました。それとは

別に同サンプルの 2D-E を Auto2D[®] で行い、セミドライブロットティングにより Immobilon[®]-P ブロットティングメンブレン上に転写しました。免疫検出のために、ブロットティングメンブレンは 5% NFDm 含有 PBS-T でブロッキングしました。ブロッキング後、ダイズアレルギー患者の血清 (International Bioscience, Inc.) をブロッキング溶液で 20 倍に希釈し、メンブレンに添加し、穏やかに攪拌しながらインキュベートしました。そのメンブレンを PBS-T で洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した HRP コンジュゲート二次抗体と反応させ、標準的な化学発光検出を行いました。

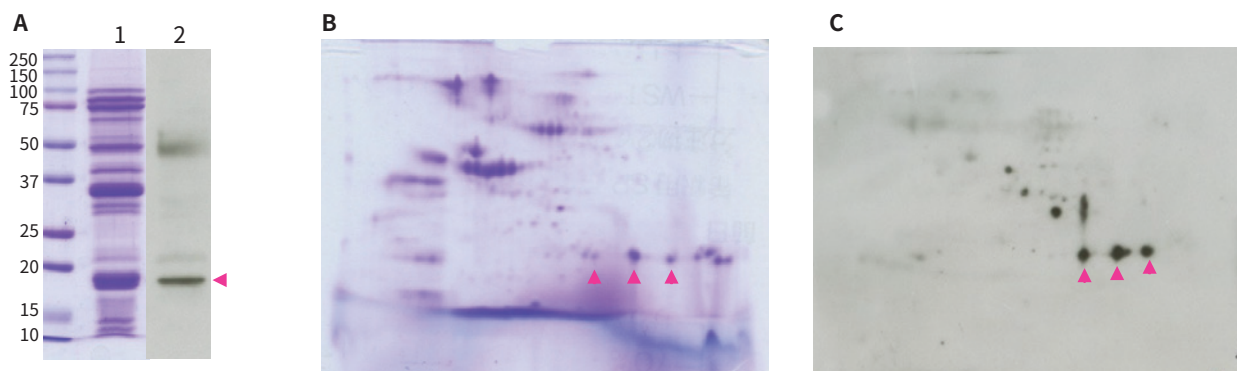


図 1. ダイズ抽出物の 2D-E 分離と患者血清を用いた免疫検出

SDS-PAGE (A : 15 μg)、および Auto2D[®] システム (IEF Chip : pH3-10NL、PAGE Chip : 12.5%、Tris-Glycine Reagent Kit を使用) (B、C : 30 μg) によりダイズタンパク質抽出物を分離した。ゲル中の全タンパク質を CBB で染色した (A-1、B)。ダイズアレルギー患者の血清を用いて免疫検出を行った (A-2、C)。SDS-PAGE の主要バンドに対応する Gly m 6 (主要ダイズアレルゲン成分) と考えられるスポットは、約 18 kDa (赤色矢印) で検出された。

他の各抗原は、以下の条件でそれぞれ調製しました。ソバ粉は、ジエチルエーテルで脱脂して、coca buffer (85 mM NaCl、32.7 mM NaHCO_3 、42.5 mM フェノール) で処理し、PBS で透析しました。さらに、1 次元目の IEF プロセスに影響する可能性がある塩とイオン不純物を除去するため、ProteoExtract[®] Protein Precipitation Kit を用いてソバ抽出物を処理しました。クルミは乳鉢ですりつぶして、Mammalian Cell Lysis Kit (MCL1、シグマ) を用いてタンパク質の抽出を行いました。イクラ組織は 1M KCl-PBS を加えてホモジネートしました。クルミとイクラ抽出物はゲルろ過スピナラムにより脱塩しました。タンパク質サンプルは脱塩法により、Rehydration Solution (8M 尿素、2 M チオ尿素、4% CHAPS、50 mM DTT、0.02 % 両性電解質) に直接溶解もしくは交換しました。

各調製サンプルのタンパク質を BCA または Bradford タンパク質アッセイにより定量しました。ブレインストールされた標準的な Auto2D[®] プログラム (pH3-10NL M)、または通常の SDS-PAGE によりタンパク質サンプルの分離を行いました。できるだけ広範囲の分離領域をカバーできるように 1 次元目のゲルチップとして

IEF Chip pH3-10NL、2 次元目のゲルチップとして PAGE Chip 12.5 % を選択しました。電気泳動後、Auto2D[®] ゲル内で分離されたタンパク質を ReadyBlue[®] ゲル染色剤 (Coomassie Brilliant Blue) または SYPRO[™] Ruby ゲル染色剤で染色しました。免疫検出用に別途調製した Auto2D[®] ゲルをチップから取り出し、ウェット転写装置 (KS8452、オリエンタルインスツルメント) を用いて Immobilon[®]-P ブロットティングメンブレンに転写しました。タンパク質を転写した PVDF メンブレンのブロッキングを、SuperBlock[™] ブロッキングバッファーを含む PBS を用いて 1 時間行いました。患者の血清を 0.1% BRIJ を含む PBS を用いて 30 倍に希釈し、4°C で一晩振とうして、メンブレンと反応させました。上述の希釈バッファーで洗浄後、2,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ (AP) コンジュゲート抗ヒト IgE 抗体 (SeraCare) を二次抗体として添加し、室温で 3 時間インキュベートしました。洗浄後、メンブレンを AP 反応バッファー (100 mM NaCl および 5 mM MgCl_2 を含む 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 9.5)) で平衡化して、標的タンパク質を発色させて検出するために 1 コンポーネントタイプの BCIP/NBT 基質 (SeraCare) と反応させました。

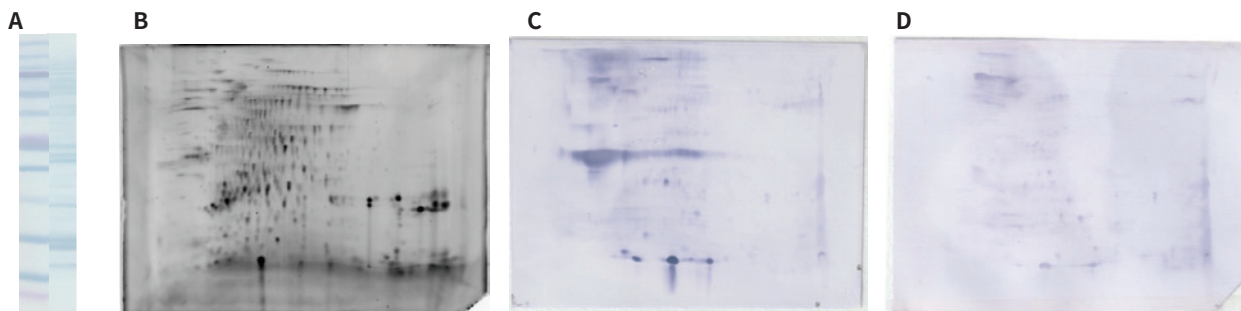


図2. クルミ抽出物の2D-E分離とアレルギー患者の血清を用いた免疫検出

クルミタンパク質抽出物をゲルろ過スピンカラムで脱塩して Rehydration Solution で平衡化し、SDS-PAGE (A) および Auto2D® システム (IEF Chip : pH3-10NL、PAGE Chip : 12.5%、Tris-Glycine Reagent Kit を使用) (B、C、D : 10 μ g) により分離した。クルミ抽出物の全タンパク質を、メンブレン上ではアミドブラック (A) 2D-E ゲルは SYPRO™ Ruby ゲル染色剤 (B) を用いて検出した。また、転写膜は患者の血清 (C) とアレルギーのない血清 (陰性対照、D) を用いて免疫検出した。

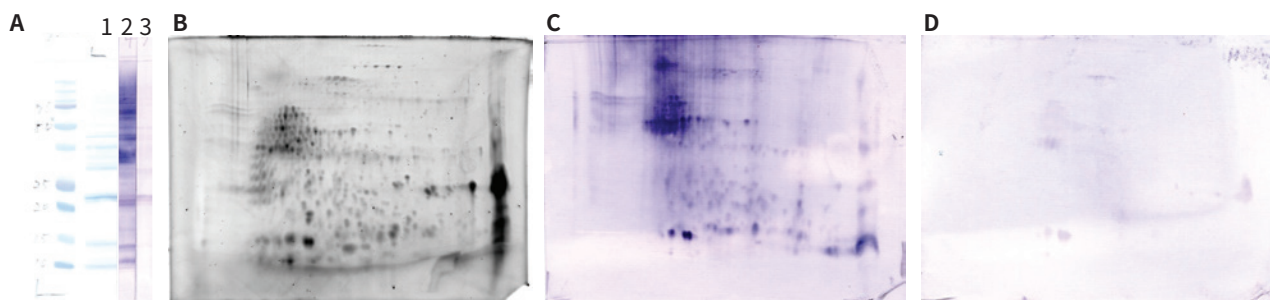


図3. ソバアレルギー患者の血清を用いた免疫検出

ProteoExtract® Protein Precipitation Kit で処理したソバタンパク質サンプルを Rehydration Solution に溶解し、SDS-PAGE (A) および Auto2D® システム (IEF Chip : pH3-10NL、PAGE Chip : 12.5%、Tris-Glycine Reagent Kit を使用) (B、C、D : 10 μ g) により分離した。ソバ抽出物の全タンパク質をメンブレン上ではアミドブラックを用いて (A-1)、ゲルは SYPRO™ Ruby (B) を用いて可視化した。また、免疫検出は患者の血清 (A-2 および C) とアレルギーのない血清 (陰性対照、A-3 および D) を用いて行った。

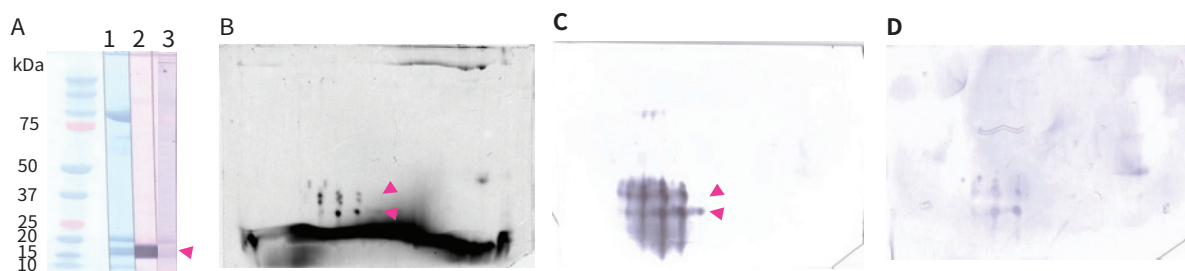


図4. イクラアレルギー患者の血清を用いたブローディングによるアレルギー成分の分離および免疫検出

イクラタンパク質抽出物をゲルろ過スピンカラムで Rehydration Solution に溶媒を交換し、Auto2D® システム (IEF Chip : pH3-10NL、PAGE Chip : 12.5%、Tris-Glycine Reagent Kit を使用) (B、C、D) および SDS-PAGE (A) により分離した。イクラ抽出物の全タンパク質をメンブレン上ではアミドブラックを用いて (A-1)、ゲルでは ReadyBlue® ゲル染色試薬 (B : 35 μ g) を用いて可視化した。患者の血清 (A-2 および C : 10 μ g) とアレルギーのない血清 (陰性対照、A-3 および D : 10 μ g) を用いた免疫検出も示す。15 ~ 20 kDa 付近のスポット (赤色矢印) がイクラの主要アレルギー成分の β '-component (2 つのサブユニットで構成される 35 kDa-vitellogenin-fragment) であると考えられる。

ウェスタンブロット画像を全タンパク質検出画像と比較し、アレルギーを示す血清中の IgE と反応するタンパク質スポットを特定しました。アレルギー誘発性成分を同定するため、重なったスポットは通常ゲルから切り出し、ゲル内で酵素消化して、フラグメント化し、そのペプチドフラグメントを質量分析装置により分析します。2D-E は優れた分解能を示し、1D-E で単一バンドとして見えるものの中

に多種のタンパク質が存在することを示すことができました。これらのデータが示すとおり、アレルギー血清を用いた 2D 免疫検出によって、より少ないステップでアレルギーコンポーネントを高度に分離・特定し、その後のマスペクトル分析により、容易に同定できることが示唆されました。

考察

2次元ゲル電気泳動法は、アレルゲンタンパク質を分離・同定するために使用される一般的なタンパク質分離法です。Auto2D® システムは、この技法により高品質な結果を得るために必要な時間と専門的スキルを低減できるように設計されています。本稿では、4種の食品由来のタンパク質サンプル中のアレルゲンコンポーネントを2D-E免疫検出することにより、アレルギー研究におけるAuto2D® システムの有用性を確認しています。さらに、私たちは、ダイズとイクラサンプルそれぞれの既知の主要アレルゲンを、1次元SDS-PAGEで検出される単一バンドから、Auto2D® システムを用いて複数のスポットに分離することができました。ダイズサンプルについては、Gly m 6 (グリシニン：既知の主要アレルゲンタンパク質)⁹の塩基性サブユニットに対応する18 kDaのバンドをさらに分離して、3つのスポットを検出しました。イクラサンプルについては、 β^1 -Component (ピテロゲニン：これもまた既知の主要アレルゲンタンパク質)¹⁰の2つのサブユニットに一致する16～18 kDaのバンドを分離して、複数のスポットとして検出しました。全体として、これらの結果から、Auto2D® システムは、従来の2次元ゲル電気泳動法に対して、アレルゲン免疫検出のための迅速で信頼性のある代替法として有効であることが示唆されました。

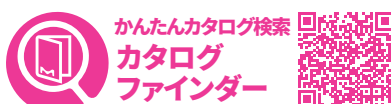
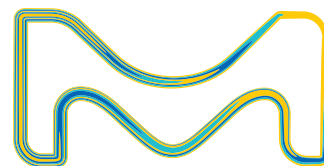
その他の情報とリソースについては、Auto2D® 自動2次元電気泳動装置技術情報ページ：[SigmaAldrich.com/auto2d](https://sigmaaldrich.com/auto2d)をご覧ください。

謝辞

ダイズデータを提供してくださった森山達哉教授（近畿大学農学部）およびクルミ、ソバ、イクラのデータを提供してくださった近藤康人教授（藤田医科大学ばんだね病院）に感謝いたします。

References

1. De Angelis, Maria, Raffaella Di Cagno, Fabio Minervini, Carlo Giuseppe Rizzello, and Marco Gobbetti. "Two-Dimensional Electrophoresis and IgE-Mediated Food Allergy." *Electrophoresis* 31, no. 13 (July 2010): 2126–36. <https://doi.org/10.1002/elps.201000101>.
2. "WAO White Book on Allergy | World Allergy Organization." Accessed July 24, 2023. <https://www.worldallergy.org/wao-white-book-on-allergy>.
3. Schmidt, Charles W. "Pollen Overload: Seasonal Allergies in a Changing Climate." *Environmental Health Perspectives* 124, no. 4 (April 2016): A70–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.124-A70>.
4. Pallen, Catherine, Claire Friry-Santini, Corinne Herouet-Guichene, and Annabelle Capt. "Technical Variability of 2D Gel Electrophoresis – Application to Soybean Allergens." *Toxicology Reports* 1 (September 16, 2014): 734–42. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.09.002>.
5. Huerta-Ocampo, José Ángel, Alejandra Valenzuela-Corral, María Del Refugio Robles-Burgueño, Ana María Guzmán-Partida, Miguel Ángel Hernández-Oñate, Luz Vázquez-Moreno, Gandhi F. Pavón-Romero, and Luis M. Terán. "Proteomic Identification of Allergenic Proteins in Red Oak (*Quercus Rubra*) Pollen." *The World Allergy Organization Journal* 13, no. 3 (March 2020): 100111. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100111>.
6. Corti, Valeria, Angela Cattaneo, Angela Bachi, Renato E. Rossi, Giorgio Monasterolo, Clara Paolucci, Samuele E. Burastrero, and Massimo Alessio. "Identification of Grass Pollen Allergens by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Serological Screening." *Proteomics* 5, no. 3 (February 2005): 729–36. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401038>.
7. Mamone, Gianfranco, Luigia Di Stasio, Salvatore De Caro, Gianluca Picariello, Maria Adalgisa Nicolai, and Pasquale Ferranti. "Comprehensive Analysis of the Peanut Allergome Combining 2-DE Gel-Based and Gel-Free Proteomics." *Food Research International* (Ottawa, Ont.) 116 (February 2019): 1059–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.045>.
8. Batista, Rita, Isabel Martins, Paul Jenó, Cândido Pinto Ricardo, and Maria Margarida Oliveira. "A Proteomic Study to Identify Soya Allergens--the Human Response to Transgenic versus Non-Transgenic Soya Samples." *International Archives of Allergy and Immunology* 144, no. 1 (2007): 29–38. <https://doi.org/10.1159/000102611>.
9. Hou, Dick Home-je, and Sam Kow-Ching Chang. "Structural Characteristics of Purified Glycinin from Soybeans Stored under Various Conditions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, no. 12 (June 1, 2004): 3792–3800. <https://doi.org/10.1021/jf035072z>.
10. Shimizu Yutaka, Hideki Kishimura, Gaku Kanno, Atsushi Nakamura, Reiko Adachi, Hiroshi Akiyama, Kazuhiko Watanabe, Akihiko Hara, Motohiro Ebisawa, and Hiroki Saeki. "Molecular and Immunological Characterization of β^1 -Component (Onc k 5), a Major IgE-Binding Protein in Chum Salmon Roe." *International Immunology* 26, no. 3 (March 2014): 139–47. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxt051>.



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2024年6月時点の情報です。Merck, the vibrant M, Millipore, Sigma-Aldrich, Supelco, Milli-Q, SAFC and BioReliance are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original Lit No. is MK_AN12749EN Ver. 1.0.

メルク株式会社

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140