

《総説》

牛乳アレルゲンの IgE エピトープ

内藤宙大 山田千佳子 和泉秀彦

はじめに

乳幼児期における食物アレルギーの原因食品として牛乳の割合は高く、全年齢を対象としても牛乳は鶏卵に次いで2番目に多い原因食品である¹⁾。一方で、牛乳はタンパク質、脂質、および糖質をバランス良く含み、特にリン酸カルシウム含量が高いことが知られている²⁾。そのため、牛乳を除去していた牛乳アレルギー患者において、身長への影響や骨密度の低下が報告されている^{3,4,5)}。また、母乳（人乳）中には免疫グロブリン（IgA, IgG, IgM）やラクトフェリン、リゾチームなどの感染防御成分を含む⁶⁾。しかし、 β -ラクトグロブリン（ β -LG）やカゼイン（CN）は牛乳中に多量に含むものの、人乳中にはほとんど含まれないため、ヒトにとって異種性が高く、アレルゲンになりやすいとされる。この総説では牛乳中のアレルゲン性タンパク質について、IgE 抗体認識エピトープ（以下、エピトープ）部位を中心に構造や特性を解説する。

牛乳タンパク質の構造と特性

牛乳中のタンパク質は、pH4.6付近で沈殿するカード（curd）とその上清のホエイ（whey）に大別される。カードに含まれる CN 画分は牛乳タンパク質の約80%を占める。残りの約20%がホエイであり、その約半分が β -LG、約20%が α -ラクトアルブミン（ α -LA）である。CN は4つの CN 成分（ α s1-, α s2-, β -, κ -CN）から成り、牛乳中では30~300nm の粒径を持つミセルとして存在する^{7,8,9)}。これらの CN 成分は全く異なるタンパク質であり、CN 成分間は相同性が低く¹⁰⁾、それぞれのもつ特性は異なる。

筆者らは、牛乳アレルギーの診断時には各種混合物として検査される CN を、CN 成分ごとに特異的 IgE 抗体価を解析した。まず、牛乳に対して、牛乳アレルギー患者血清中の IgE 抗体を使用したイムノブロットによりアレルゲンを定性解析したところ、CN、 β -LG、 α -LA が検出された（Fig. 1A）。さらに、牛乳から α s1-、 β -

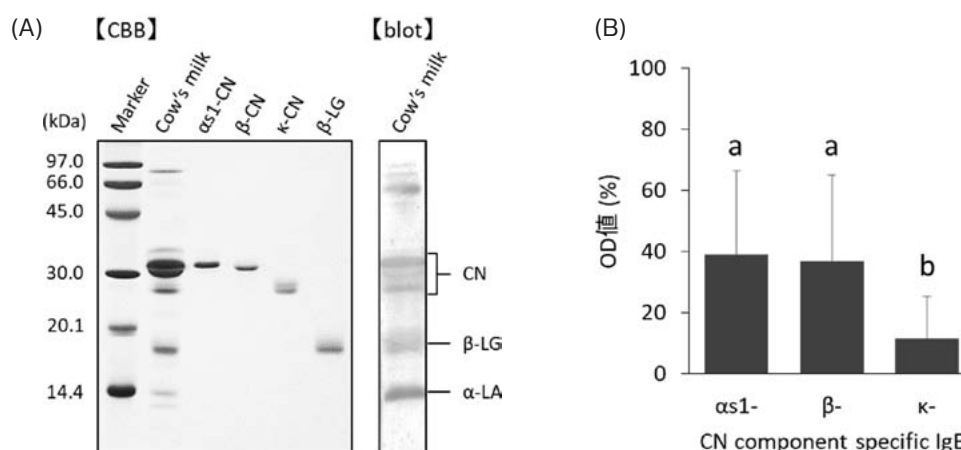


Fig. 1 Immunoblot analysis showing IgE-binding proteins in cow's milk. CBB-stained SDS-PAGE gel showing the composition of proteins (A left). Proteins recognized by IgE in patient's serum with cow's milk allergy (A right). B showing casein specific IgE levels from patient's sera with cow's milk allergy (n=39). Significant differences are indicated by different lowercase letters (a, b) and determined by one-way ANOVA tests ($p < 0.001$).

κ -CN を分離し、特異的抗体価を ELISA にて測定した (Fig. 1 B)。 α s1-CN 特異的 IgE 抗体価が高かった患者 1 名を対照 (100%) としたとき、 α s1-, β -, κ -CN の吸光度 (mean \pm SD) は、それぞれ 39.01 ± 27.44 、 36.70 ± 28.35 、 $11.56 \pm 13.73\%$ であり、 κ -CN に比べ α s1-, β -CN により強く感作することが示唆された。これらのタンパク質について以下にまとめた。

カゼイン

ウシ α s1-CN は 8 残基のリン酸化 Ser を持ち、199 残基からなるタンパク質である (Fig. 2) ¹⁰⁾。多くの哺乳動物で同定されているが、牛乳と人乳中の α s1-CN の相同性は 31.9% であり (Table 1) ^{10,11,12)}、ウシ α s1-CN はヒトにとって異種性が高いタンパク質だと考えられる。山羊乳中では α s1-CN の割合は少ないが、ウシ α s1-CN と相同性が高いために、山羊乳やそれを原料とするシェーブルチーズもアレルギー症状を呈する可能性がある。また、牛乳中において、ウシ α s1-CN は CN 成分の中で最も多く含む。さらに、これまでに、Chatchatee らはアミノ酸 (amino acid: AA) 17-36、39-48、69-78、83-102、109-120、123-132、139-154、159-174、173-194 がヒト IgE 抗体によって認識されると報告したように ¹³⁾、エピトープ部位が多いことも特徴の一つである。また Nakajima-Adachi らは C 末端領域の AA181-199 がエピトープ部位だと示した ¹⁴⁾。さらに、AA19-30、93-98、141-150 (Spurgin

ら、1996) ¹⁵⁾、AA6-20、11-25、126-140、171-185 (Cong ら、1999) ¹⁶⁾、AA28-50 (Cerecedo ら、2008) ¹⁷⁾ もエピトープ部位だと報告された。これらのように、ウシ α s1-CN は含有量が多いことや、エピトープ部位が多岐にわたることからアレルギー性が高いとされている。また、 α s1-CN は立体構造をとらない上に、 β -CN とともに分子内に Cys を持たないため加熱による抗原性の変化は期待できない。さらに、Caco-2 細胞を使用した細胞内輸送の研究では、消化管プロテアーゼによる分解を受けやすい CN は、 β -LG や OVA に比べ細胞内での分解は受けにくいということが明らかとなった ¹⁸⁾。また、 α s1-CN の AA8-22、80-90、91-100 を含む断片を保持したまま Caco-2 細胞を通過するということも示された ¹⁸⁾。

ウシ α s2-CN は、11 残基のリン酸化 Ser と 2 残基の Cys を持ち、207 残基からなるタンパク質である (Fig. 2) ¹⁰⁾。 α s2-CN は人乳中には存在しないタンパク質である。これまでに AA83-100、143-158、157-172、165-188 ¹⁹⁾、AA1-20、13-32、67-86、181-207 (Cerecedo ら、2008) がエピトープ部位だと報告されてきた。しかし、牛乳中における割合は少なく、これまで α s1-CN と一括りにされ α -CN として解析されてきた。そのため、 α s2-CN に焦点を当てた研究が少なく、アレルギー性については不明である。

ウシ β -CN は、5 残基のリン酸化 Ser を持ち、209 残基からなるタンパク質である (Fig. 2) ^{10,20)}。ヒツジ、ヤギおよびヒトの β -CN と

Table 1 Cow's milk proteins

Protein name	IUIS name	Conc. (g/L)	AA length	MW (kDa)	pI	Homology (vs. cow)		
						Sheep	Goat	Human
Caseins	Bos d 8	—	—	20-30	—	—	—	—
α s1-Casein	Bos d 9	12-15	199	23.6	4.9-5.0	88.3	87.9	31.9
α s2-Casein	Bos d 10	3-4	207	25.2	5.2-5.4	89.2	88.3	—
β -Casein	Bos d 11	9-11	209	24	5.1-5.4	92.0	91.1	56.5
κ -Casein	Bos d 12	3-4	169	19	5.4-5.6	84.9	84.9	53.2
α -Lactalbumin	Bos d 4	1-1.5	123	14.2	4.8	97.2	95.1	73.9
β -Lactoglobulin	Bos d 5	3-4	162	18.3	5.3	95.1	95.1	—
Serum albumin	Bos d 6	0.1-0.4	583	67	4.9-5.1	92.4	71.2	76.6
Immunoglobulin	Bos d 7	0.6-1.0	—	160	—	—	—	—

ウシ β -CN の相同性は、それぞれ92.0、91.1および56.5である (Table 1)¹¹⁾。エピトープ部位として、AA1-16、45-54、55-70、83-92、107-120、135-144、149-164、167-184、185-208 (Chatchatee ら、2001)²¹⁾、AA25-50、52-74、154-173 (Cerecedo ら、2008)¹⁶⁾ が示された。伊藤らは、ヒト好塩基球活性化試験により、 β -CN のアレルゲン性は α -CN よりも高いと報告

した²²⁾。

γ -CN は β -CN の分解産物であり、 γ 1-、 γ 2-、及び γ 3-CN はそれぞれ β -CN の AA29-209、106-209、108-209に対応する。

κ -CN は糖鎖を持ち、ミセルの外側を覆うように存在する。 α s1-、 α s2-、 β -CN はカルシウムで凝集沈殿するが、 κ -CN はこれらの凝集体を可溶化する働きを持つ。また、チーズの製造に用いら

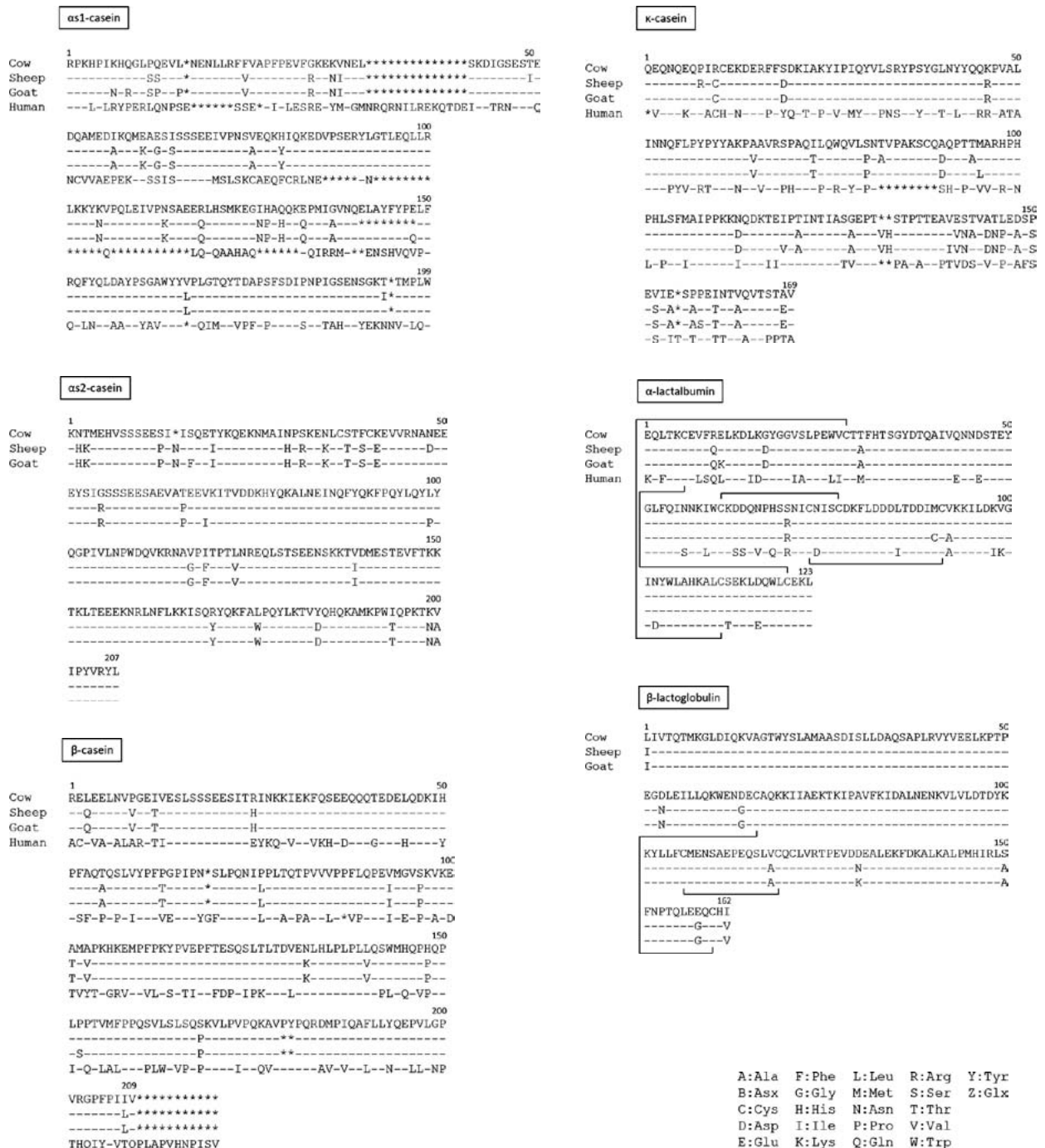


Fig. 2 Amino acid sequences of major milk allergens.

れるレンネット(キモシン)は、 κ -CN の Phe-105 と Met-106の間を特異的に切断する。その結果、ミセルの疎水性が高まり凝集沈殿しチーズの原型となる。 κ -CN の分解物のうち、Phe-105を含む N 末端側のペプチドをパラ- κ -CN、Met-106を含む C 末端側のペプチドをグリコマクロペプチドといい、親水性のグリコマクロペプチドが切り離されることで、カゼインミセルの表面の疎水性が2倍になることが分かっている⁹⁾。また、パラ- κ -CN よりもグリコマクロペプチドに対して IgG1 抗体を産生しやすいということが動物実験レベルで明らかとなっている²³⁾。

さらに、分子内に Cys を持ち (Fig. 2)^{20,24)}、加熱によりホエイタンパク質と SS 結合を形成することが報告されている^{25,26)}。そのため、ホエイタンパク質の他にも他食品との相互作用も期待される。ウシ κ -CN は169残基からなるタンパク質であり、ヒツジ、ヤギおよびヒトの κ -CN との相同性は、それぞれ84.9、84.9および53.2である (Table 1)¹¹⁾。これまでに、AA9-26、21-44、47-68、67-78、95-116、111-126、137-148、149-166 (Chatchatee ら、2001)²¹⁾、AA34-53 (Cerecedo ら、2008)¹⁶⁾ がエピトープ部位だと示された。

カゼインホスホペプチド(CPP)は、腸内に残存し、リン酸カルシウムの不溶化を阻止し、カルシウムの吸収を促進する²⁷⁾。CPP は CN の分解物であり、一部はトリプシンの消化物としてその一次構造も明らかにされている²⁸⁾。 α s1-CN の AA43-79、 α s2-CN の AA1-32、46-70、および β -CN の AA1-28が同定され、いずれの CPP も Ser-Ser-Ser-Glu-Glu の基本構造の C 末端あるいは N 末端側に直接もしくは数残基おいて Ser を持つ AA 配列を含むペプチドである。いずれのペプチドもこれまでに報告されたエピトープ部位を含む。

ホエイ

ウシ α -LA は、123残基からなり、分子内に8残基の Cys を持ち、それらが4組のジスルフィド結合 (AA6-120、28-111、61-77、73-91) を形成する (Fig. 2)²⁹⁾。4つの α -ヘリックス構

造 (AA5-11、23-34、86-98、105-111) と3つの₃₁₀-ヘリックス構造 (AA18-20、78-80、115-118) を持つタンパク質³⁰⁾で、リゾチームとの相同性が見られる³¹⁾。ヒツジ、ヤギおよびヒトの α -LA とウシ α -LA の相同性は、それぞれ97.2、95.1および73.9である (Table 1)¹¹⁾。エピトープ部位として AA1-19、15-34、45-64、60-79、90-109、105-123 (Hochwallner ら、2010)²⁹⁾、AA1-16、13-26、47-58、93-102 (Järvinen ら、2001)³²⁾ が示された。

ウシ β -LG は、162残基からなり、分子内に5残基の Cys を持ち、そのうち4つがジスルフィド結合 (66-160、106-119) を形成し立体構造をとる (Fig. 2)^{33,34)}。分子内に9つの β -シート構造 (AA16-27、41-50、52-61、66-76、80-84、89-99、101-110、116-124、146-151) と1つの α -ヘリックス構造 (AA130-140) をもつ球状タンパク質である³⁵⁾。血液中のレチノール結合タンパク質との相同性がある。 β -LG は、消化性が低く、人乳中には存在しないことから異種性が高くアレルゲンになりやすい。これまでに、AA58-77 (Cerecedo ら、2008)¹⁶⁾、AA1-16、31-48、47-60、67-78、75-86、127-144、141-152 (Järvinen ら、2001)³²⁾ がエピトープ部位として示された。

ウシ血清アルブミン (BSA) は、主要なアレルゲンではないが、免疫グロブリンとともに牛肉中にも含まれるため、それらに反応する牛乳アレルギー患者は、牛肉に対してもアレルギー症状を呈する可能性がある¹¹⁾。しかし、BSA や免疫グロブリンは加熱によりアレルゲン性が低下する³⁶⁾。

また、Natel らは2D-イムノブロット法により α s2-CN、 κ -CN、BSA、IgG およびラクトフェリン (LF) に対して、牛乳アレルギー患者血清 (20検体) 中の IgE 抗体が、それぞれ90、50、45、95および50%の割合の検体で反応するという結果を示した³⁷⁾。一方で、主要アレルゲンである α s1-CN、 β -CN、 β -LG および α -LA に対して IgE 抗体の反応した割合は、それぞれ55、15、45および0%であり、これまで主要アレルゲンとされてこなかったタンパク質が、主要アレルゲンと同等もしくはそれ以上の割合で反応した。

他にも乳中には、乳脂肪球皮膜 (milk fat globule membrane, MFGM) タンパク質、酵素類などのタンパク質が存在するが、アレルギー性は報告されていない。また、乳糖との反応により生成した乳糖付加 β -LG (Lac-LG) を用いて、ウサギを免疫したところ、乳糖と反応させた血清アルブミンやオボアルブミンのような異種の乳糖付加タンパク質に対する抗体も産生されると、大谷と鍋田が報告した^{38,39)}。つまり、タンパク質に付加された乳糖がハプテン様抗原として免疫系に認識されていることを示唆している。

まとめ

牛乳中のタンパク質とヒツジやヤギの乳中のタンパク質の相同性は高いが、人乳中のタンパク質とは相同性が低く、牛乳はヒトにとって異種性が高いことが明らかである。すなわち、牛乳に感作してしまうとヒツジやヤギの乳にもアレルギー反応を呈する可能性がある。

最近では、IgG4抗体がアレルギー反応に対して抑制性の働きをもつ抗体だと考えられている。想定される抑制機序は、IgG4抗体がアレルギーと結合し、肥満細胞上のIgE抗体とアレルギーの結合を防ぐという機序と、アレルギーと結合したIgG4抗体が肥満細胞上の抑制モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM) をもつ受容体であるFc γ RIIbを介して、脱顆粒に対する抑制性のシグナルが働くという機序である。どちらの機序であってもIgG4抗体エピトープとIgE抗体エピトープを比較する必要がある、IgG4抗体エピトープの解析が注目されている。このように、アレルギーのエピトープだけでも未だに不明な点が多く、今後様々な研究が必要とされる。

参考文献

- 1) 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会. 食物アレルギー診療ガイドライン2016. 協和企画. 2016
- 2) 文部科学省: 日本食品標準成分表2015年版 (七訂).

- 2015
- 3) Mukaida K, Kusunoki T, Morimoto T, et al. The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. *Allergol. Int.* 2010; 59: 369-374.
- 4) Nachshon L, Goldberg MR, Schwartz N, et al. Decreased bone mineral density in young adult IgE-mediated cow's milk-allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 134: 1108-1113.
- 5) Jensen VB, Jørgensen IM, Rasmussen KB, et al. Bone mineral status in children with cow milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004; 15: 562-565.
- 6) 山内恒治, 久原徹哉. 腸管免疫と乳タンパク質. *ミルクサイエンス*. 2008; 56: 199-208.
- 7) Waugh DF, Creamer LK, Slattery CW, et al. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, 1970; 9: 786-795.
- 8) Walstra P. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 1990; 73: 1965-1979.
- 9) 小野伴忠. 乳タンパク質におけるカルシウム動態とその応用. *ミルクサイエンス*. 2005; 54: 53-62
- 10) Ah-Leung S, Bernard H, Bidat E, et al. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy*. 2006; 61: 1358-1365.
- 11) Restani P, Ballabio C, Di Lorenzo C, et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 395: 47-56.
- 12) König S, Altendorfer I, Saenger T, et al. Ser71 of α s1-casein is phosphorylated in breast milk — Evidence from targeted mass analysis. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61: 1700496.
- 13) Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, et al. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α s1-casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107: 379-383.
- 14) Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Ise W, et al. Determinant analysis of IgE and IgG4 antibodies and T cells specific for bovine α s1-casein from the same patients allergic to cow's milk: Existence of α s1-casein-specific B cells and T cells characteristic in cow's-milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 101: 660-671.
- 15) Spuerger P, Mueller H, Walter M, et al. Allergenic epitopes of bovine α s1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy*. 1996; 51: 306-312.
- 16) Cong YJ, Yi H, Qing Y, et al. Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes on α s1-casein by

- alanine scanning analysis. *J Dairy Sci* 2013; 96: 6870–6876
- 17) Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122: 589–594.
- 18) Busse PJ, Järvinen KM, Vila L, et al. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine α s2-casein in cow's milk allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002; 129: 93–96.
- 19) Sakurai N, Nishio S, Akiyama Y, et al. Apical-to-basolateral transepithelial transport of cow's milk caseins by intestinal Caco-2 cell monolayers: MS-based quantitation of cellularly degraded α - and β -casein fragments. *J. Biochem*. 2018; 1–13
- 20) Järvinen KM, Geller L, Bencharitiwong R, et al. Presence of functional, autoreactive human milk-specific IgE in infants with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2012; 42: 238–247.
- 21) Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, et al. Identification of IgE and IgG binding epitopes on β - and κ -casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31: 1256–1262.
- 22) 伊藤靖典, 下村真毅, 徳永郁香, 他. 日本人牛乳アレルギー児における好塩基球活性化試験を用いた β -カゼインの即時型アレルギー性についての検討. *アレルギー*. 2014; 63: 1330–1337.
- 23) Morin S, Bernard H, Przybylski-Nicaise L, et al. Allergenic and immunogenic potential of cow's milk β -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Mol Nutr Food Res*. 2011; 55: 1700–1707.
- 24) Bai WL, Yin RH, Dou QL, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a yak (*Bos grunniens*) κ -casein cDNA from lactating mammary gland. *Mol Biol Rep*. 2011; 38: 2711–2718.
- 25) Hae Dong Jang and Harold E Swaisgood. Disulfide bond formation between thermally denatured β -lactoglobulin and κ -casein in casein micelles. *J Dairy Sci* 1990; 73: 900–904
- 26) Anema SG. On heating milk, the dissociation of κ -casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. *J Dairy Res*. 2008; 75: 415–421.
- 27) Naito H, Kawakami A, and Imamura T. In vivo formation of phosphopeptide with Calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agric Biol Chem* 1972; 36: 409–415.
- 28) Manson W, Annan WD. The structure of a phosphopeptide derived from β -casein. *Arch Biochem Biophys*. 1971; 145: 16–26.
- 29) Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, et al. Visualization of clustered IgE epitopes on α -lactalbumin. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125: 1279–1285.
- 30) Polverino de Laureto P, Scaramella E, Frigo M, et al. Limited proteolysis of bovine α -lactalbumin: Isolation and characterization of protein domains. *Protein Sci*. 1999; 8: 2290–2303.
- 31) Brew K, Castellino FJ, Vanaman TC, et al. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *J Biol Chem*. 1970; 245: 4570–4582.
- 32) Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, et al. IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001; 126: 111–118.
- 33) Halliday JA, Bell K, and Shaw DC. The complete amino acid sequence of feline β -lactoglobulin II and a partial revision of the equine β -lactoglobulin II sequence. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1077: 25–30.
- 34) Loch JI, Molenda M, Kopeć M, et al. Structure of two crystal forms of sheep β -lactoglobulin with EF-loop in closed conformation. *Biopolymers*. 2014; 101: 886–894.
- 35) Song CY, Chen WL, Yang MC, et al. Epitope mapping of a monoclonal antibody specific to bovine dry milk: involvement of residues 66–76 of strand D in thermal denatured β -lactoglobulin. *J Biol Chem*. 2005; 280: 3574–3582.
- 36) Werfel SJ, Cooke SK, and Sampson HA. Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 293–300.
- 37) Natale M, Bisson C, Monti G, et al. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol Nutr Food Res*. 2004; 48: 363–369.
- 38) 大谷 元, 鴫田 文三郎. 乳糖存在下における加熱 β -ラクトグロブリンの天然および二次的抗原性. *日本畜産学会報*. 1980; 51: 711–716.
- 39) 大谷 元, 鴫田 文三郎. β -ラクトグロブリンとラクトースの褐変反応物中の糖部分の抗原性への寄与. *日本畜産学会報*. 1982; 53: 344–350.