

小麦 Lipid Transfer Protein に対する 酵素免疫測定法の確立

山口 (村上) 友貴絵, 枝 裕子, 本庄 勉*, 成田 宏史

Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Lipid Transfer Protein from Wheat

Yukie Murakami-Yamaguchi, Yuko Eda, Tsutomu Honjoh and Hiroshi Narita

Human serum showing high IgE contents to wheat reacted with about 9kDa protein in crude extract of wheat flour on Western analysis. The 9kDa protein was purified from the extract by ammonium sulfate precipitation and anion-exchange, cation-exchange, and hydrophobic chromatography successively. The N-terminal amino acid sequence of this protein was determined to be homologous to non-specific Lipid Transfer Protein (LTP). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was constructed with rabbit polyclonal IgG raised against this protein. The detection limit of this ELISA was 5 ng/ml for wheat LTP and the cross-reactivity to barley LTP was negligible. Since 2002 in Japan, commercial ELISAs for gliadin were noticed ministerially to use for the determination of the content of wheat proteins in foods. It is difficult for the noticed ELISA to be applied to fermented foods because of proteolysis of gliadin. However, LTP could be determined in soy sause and wheat-supplemented beer by our ELISA for LTP. It was shown that LTP is an appropriate target protein for the determination of ingredient contents even in fermented foods because of its proteolysis-resistant nature.

(Received September 3, 2005)

1. 緒 言

近年、アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになり、これを未然に防ぐために表示を通じた消費者への情報提供の必要性が高まってきた。このため 2001 年 3 月に「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」が公布され、2002 年の 4 月から、重篤または症例数の多い卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目を特定原材料として、これらを含む旨の食品への表示が義務化された。これに伴い、11 月には厚生労働省からこれらを定量する方法として森永生科学研究所¹⁾および日本ハム²⁾が開発した ELISA 法が通知法とし認定さ

れた (食発第 1106001 号)。現在のところ、これらの ELISA 法により 10 µg/ml または 10 µg/g 含有レベル以上の特定原材料を含有する食品について表示が義務づけられている³⁾。しかしながら、現行の通知法には相同性の高いタンパク質同士の交差性の問題、発酵食品のようにタンパク質が加水分解された食品については、実際添加されている量よりも低い値しか定量できないことなどいくつかの問題点がある。ペプチドでも大きさによっては感作・発症が起こる場合もあり、特に小麦はパンや醤油、味噌など幅広い発酵食品に添加されていることが多いので、今後はペプチドも含めた定量が必要となってくる。

LTP (lipid transfer protein) は分子量約 9kDa の低分子量タンパク質で、植物に広く分布する。立体構造は 8 個のシステイン残基による 4 対のジスルフィド結合のため安定であり、温度や pH の変化、ペプチン消化に対して抵抗性をもつ。LTP は当初その脂

質結合能からこのように命名されたが、現在ではクチン（クチクラの主成分、脂肪酸の重合物質）の分泌・蓄積に関連する植物の防御タンパク質（PRP: pathogenesis related protein）の一つである PR-14 として知られている⁴⁻¹⁰⁾。一方、LTP は穀類、果物、ナッツ類のアレルゲンとしても知られており、特に種間で一次構造の相同性が高いため、汎アレルゲンとして注目されている^{11,12)}。

本研究では LTP のプロテアーゼ耐性に着目し、その免疫学的定量系の確立を試み、発酵食品中の小麦使用量の評価系としての有効性に検討を加えることを目的として行った。

II. 試料と方法

1. 試料

大麦 LTP は当研究室で純化したものを用いた。小麦粉は日清フーズ製粉社製の小麦全粒粉を用いた。小麦グリアジンキット³⁾、抗小麦 LTP ウサギ抗血清およびペルオキシダーゼ標識抗小麦 LTP ウサギポリクローナル抗体、小麦 LTP 固定化カラムは森永生科学研究所から供与された。ヒト血清（小麦に対する IgE 値が 0~17.8 IU/ml の検体）は米国 CristalChem 社から購入した。その他の試薬は特に断らない限り市販特級試薬を用いた。

2. 方法

1) 粗精製

小麦粉 150g に 5 倍量の蒸留水を加え、マグネチックスターラー（SW-400N-1, NISSIN 社製）で攪拌しながら 4°C で一晩抽出した。溶液を遠心管に移し、10,000×G, 4°C, 20 分間、遠心分離（CF15R, 日立工機社製）を行った。上清を別の容器に移し取り、その上清に 40% 飽和硫酸アンモニウム濃度になるように、硫酸アンモニウムを加え、4°C で一時間マグネチックスターラー（HW-15, KOIKE 社製）で攪拌し、一晩放置した。溶液を遠心管に移して、10,000×G, 4°C, 20 分間、遠心分離を行い、上清画分が 80% 飽和硫酸アンモニウム濃度になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で 1 時間マグネチックスターラーを用いて攪拌し、その後一晩放置した。溶液を遠心管に移し、10,000×G, 4°C, 20 分間、遠心分離を行った。沈殿を回収し、透析チューブ（分画分子量 3500, スペクトラム社製）に入れ、20mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.6 に対して 4°C で透析を行った。透析した溶液を遠心管に移し、遠心分離を行い、上清に粗精製画分を得た。

2) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

陰イオン交換樹脂（Q-セファロース, 10ml, アマーシャム社製）を直径 1.6cm, 高さ 5cm のカラム管に詰め、20mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.6 を 1ml/min で流し平衡化を行った。そこに上記で得られた粗精製液をアプライし、その後平衡化緩衝液でカラムを洗浄し、非吸着画分を試験管に取り分けた。その後 1M 塩化ナトリウム/20mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.6 でカラムを洗浄し、吸着画分を試験管に取り分けた。

3) 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

陽イオン交換樹脂（トヨパール CM 650M, 9ml, 東ソー社製）を直径 1.6cm, 高さ 4.5cm のカラム管に詰め、20mM リン酸緩衝液 pH5 を 1.17ml/min で流し平衡化を行った。陰イオン交換カラムの非吸着画分に 6M-HCl を加え pH を 5 に調整した溶液をアプライし、平衡化緩衝液でカラムを洗浄し、非吸着画分を試験管に取り分けた。その後平衡化緩衝液中の塩化ナトリウムの濃度 0.1M から 0.35M のグラジェント溶出を行った。

4) 疎水クロマトグラフィー

疎水性クロマト樹脂（トヨパール Butyl 650M, 5ml, 東ソー社製）を直径 1.6cm, 高さ 2.5cm のカラム管に詰め、1.6M 硫酸アンモニウム/20mM リン酸 buffer pH7 を 1ml/min で流し平衡化を行った。陽イオン交換カラムの溶出画分を終濃度 1.6M になるように硫酸アンモニウムを加え、そのサンプルをアプライし、その後平衡化緩衝液でカラムを洗浄し、非吸着画分を試験管に取り分けた。その後平衡化緩衝液中の硫酸アンモニウム濃度を 1.6M から 0M のグラジェント溶出を行った。

5) SDS-PAGE

NuPAGE 10%Bis-Tris Gel（インビトロジェン社製）を用い、CROSSPOWER1000（アトー社製）80 mA の定電流、還元剤存在下において電気泳動を行った。ゲルはクマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。

6) アミノ酸配列の解析

精製 LTP 画分をプロテインシーケンサー（ProCise 491HT, アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、N 末側の解析を行った。

7) タンパク質の定量

牛血清アルブミン（SIGMA 社製）を標準品として、DC プロテインアッセイ（BIO-RAD 社製）を用い、655 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定し（Model 3550, BIO-RAD 社製）、

定量した。

8) ウェスタン解析

小麦粗抽出液 (タンパク質として 10 μ g) を SDS-PAGE に供し, 電気泳動を行った後, ゲル上のタンパク質を 170mA の定電流で 90 分間ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (BIO-RAD 社製) に転写し, 5% スキムミルクを含む PBS によるブロッキングを室温で 1 時間行った。その後, PBS で 3 回洗浄し, 0.1% BSA/0.05% Tween20/TBS 溶液で 10 倍に希釈したヒト血清を室温, 1 時間で反応させた。次に, TBS で 1 回, Tween20-TBS で 5 回, TBS で 1 回洗浄し, 0.1% BSA-Tween20-TBS 溶液で 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト免疫グロブリン E 抗体 (American Qoalex) で室温, 1 時間の反応を行った。その後, TBS で 1 回, Tween20-TBS で 5 回, TBS で 1 回洗浄し, アルカリフォスファターゼ発色キット (ナカライテスク社製) による発色を行った。

9) 抗小麦 LTP ウサギポリクローナル抗体の精製

抗小麦 LTP ウサギ抗血清 1ml を 20mM リン酸緩衝液 pH7.0 により 2 倍希釈後, 1ml の小麦 LTP 固定化カラムにアブライシ, 同緩衝液により残りの素通り画分を溶出させ, 次に 0.1M グリシン-塩酸緩衝液 pH2.3 を用いて吸着画分を分取した。回収した画分を PBS に対して透析後 4°C で保存した。

10) サンドイッチ ELISA

試薬, 方法は森永小麦グリアジン定量キットに従った¹⁾。純化した抗小麦 LTP ポリクローナル抗体を 5 μ g/ml 固相化したプレートの各ウェルに小麦 LTP を 0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ng/ml / 希釈液または大麦 LTP を 0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000, 30000, 100000, 300000, 1000000 ng/ml / 希釈液 50 μ l ずつ添加し, 37°C で 1 時間放置した。洗浄液で 6 回洗浄後, 希釈液で 3000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗体を 50 μ l ずつ添加し, 37°C で 1 時間放置した。洗浄液で 6 回洗浄後, TMB100 μ l 添加し, 室温で 20 分間反応させ, 反応停止液 (小麦グリアジンキット, 森永社製) 100 μ l 添加により反応停止を行い, 450nm における吸光度を測定した。

11) 加工食品の定量

通知法に従い, 食品 1g に対して希釈液 (小麦グリアジンキット, 森永社製) 19ml 加え, ミルサー (ミルサー 700G, 岩谷産業社製) 10 秒間 \times 3 の抽出を行い, その混合液を遠心管に移し, 3,000 \times G, 4°C,

20 分間, 遠心分離を行った。遠心上清をろ過し (No.2, アドバンテック社製), そのろ液を食品サンプルとした¹⁾。

III. 結果および考察

1. ヒト血清中 IgE との反応性

まず, ヒト血清の小麦抽出液中のタンパク質に対する反応性について, ウェスタン解析を行った (図 1)。用いたヒト血清中の小麦に対する IgE の値を表 1 に示した。血清 No. ①~⑤は何らかのアレルギー臨床症状のある検体であり, ⑥⑦に関しては, コントロールとして健常人の検体を用いた。小麦抽出液において LTP は 12kDa, 50kDa のタンパク質に次いで存在比率が高いと思われるが, 血清との反応性は, No. ⑥⑦を除いては, 12kDa, 38kDa および 50kDa のタンパク質が強い反応を示し, LTP に相当するタンパク質にも反応性があったことから, 小麦アレルゲンとして LTP は無視できないタンパク質であることが示唆された。⑥においては 12kDa が⑦においては 14kDa 付近のタンパク質が反応しているが, どちらの提供者もアレルギー症状がないことから, それらのタンパク質はアレルゲンになりにくい可能性があることが推測された。また, 血清中にそのタンパク質に対する IgE が存在している場合でも, 必ずしも臨床症状が出るとは限らないことが報告されていることから¹³⁾, 特異的 IgE とアレルギーの発症が直接関係付けられないことも考えられた。また, No.

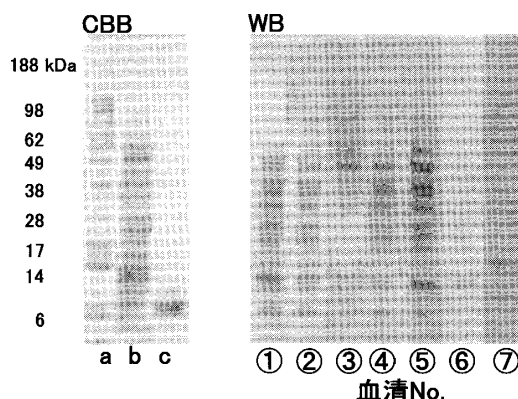


図 1 ヒト血清を用いたウェスタン解析
左側は, a: マーカー, b: 小麦抽出液 (タンパク質として 10 μ g), c: 小麦 LTP 3 μ g をそれぞれ電気泳動後 PVDF 膜に転写し, CBB 染色による検出を行った。右側は小麦抽出液 (タンパク質として 10 μ g) を転写後, 表 1 に示した①~⑦のヒト血清に対する反応性を検討した。

表1 ヒト血清中抗小麦 IgE

血清 No.	抗小麦 IgE IU/ml
①	17.8
②	5.7
③	5.4
④	2.9
⑤	—
⑥	—
⑦	—

—: 非測定

①～⑤は何らかのアレルギー臨床症状があり、小麦以外の食品に対しても IgE が検出されている。⑥⑦はコントロールとして健常人の血清を用いた。

⑤では小麦に対する IgE は測定されていないが、リンゴ、モモなど果物に対する IgE が検出されている。冒頭でも述べたが、LTP は穀類の他果物アレルゲンとして注目されているタンパク質であり、互いに交差性が非常に高いことが問題となっている⁷⁾。このため、⑤のような検体の場合、果物だけでなく穀類にも反応する可能性があることは注意すべき点であろう。

2. 小麦粉からのLTPの精製

小麦粉に 5 倍量の蒸留水を加え一晚抽出を行い、遠心分離により上清区を回収した。抽出液に硫酸アンモニウムを 20～80% 飽和濃度加えて分画を行った結果、大麦 LTP から予想される小麦 LTP と

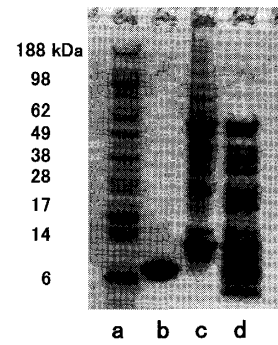


図2 粗抽出画分の調製

実験方法に述べた手順で塩析した試料を SDS-PAGE 分析した。a: 分子量マーカー, b: 大麦 LTP 2 μg, c: 40% 飽和硫酸沈殿区 25 μg, d: 40% 飽和硫酸上清区 25 μg

考えられる分子量 9kDa の画分は 40～60% 飽和濃度以上で沈殿することが確認できたため、40% 飽和濃度加えて沈殿区を除き、その上清区を粗精製画分とした (図2)。なお、LTP は分子量が小さいため、透析チューブ、SDS-PAGE 用のゲルは通常のものでは巧く行かなかった。種々試した結果、それぞれスペクトラム社、インビトロジェン社のものが良好な結果を与えた。

得られた粗精製画分を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画を行った。20mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.6 で平衡化した Q-セファロースカラムに粗抽出画分を吸着後、1M 塩化ナトリウム/20mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.6 によるステップワ

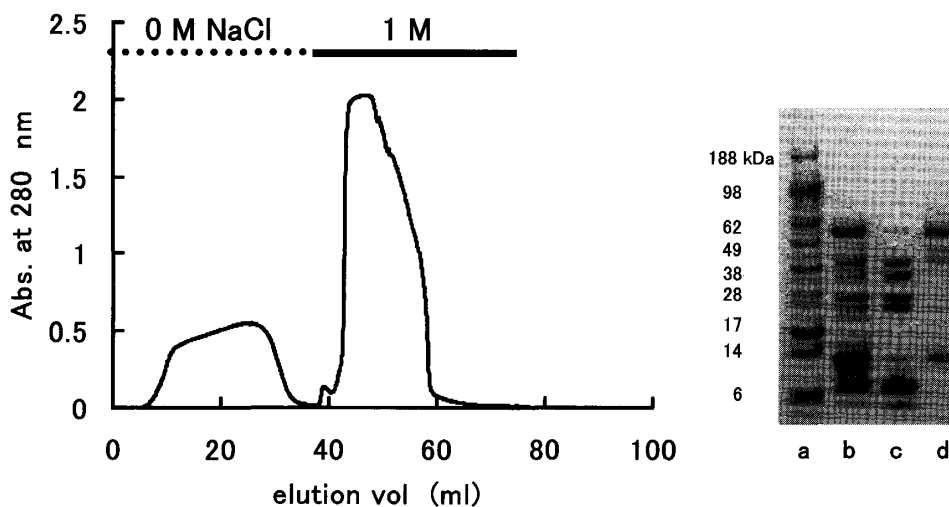


図3 陰イオン交換クロマトグラフィー

クロマトグラフィーの条件は実験方法に示した。分画したタンパク質の確認を SDS-PAGE により行った。a: 分子量マーカー, b: 小麦粗精製画分 25 μg, c: 素通り画分 10 μg, d: 吸着画分 10 μg

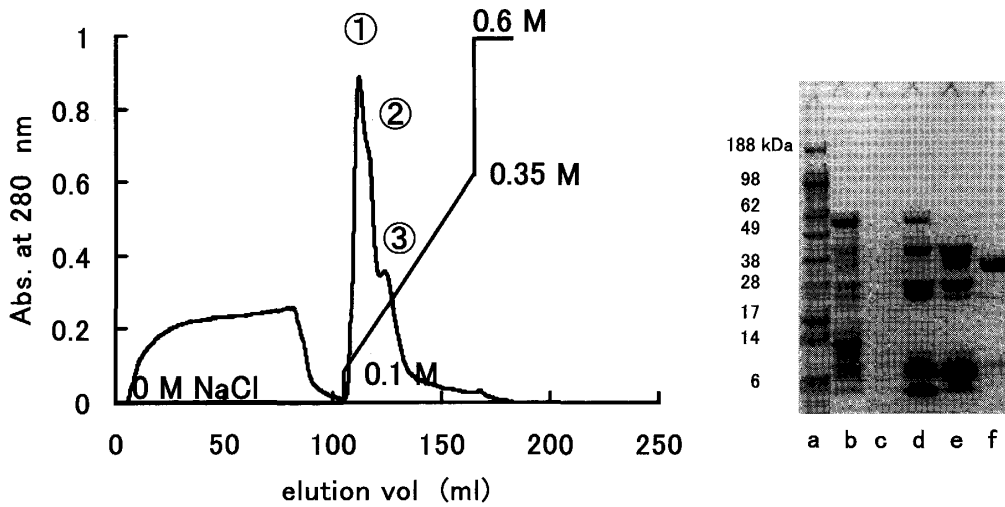


図 4 陽イオン交換クロマトグラフィー
 クロマトグラフィーの条件は実験方法に示した。分画したタンパク質の確認を SDS-PAGE により行った。a : 分子量マーカー, b : apply 10 μ g, c : CM-素通り画分 3 μ g, d : CM-① 10 μ g, e : CM-② 10 μ g, f : CM-③ 5 μ g

イズ溶出後、SDS-PAGE を行った結果を図 3 に示した。LTP は素通り画分に回収され、塩基性タンパク質であることと一致した。次にこの素通り画分を pH 5 に調整し、陽イオン交換カラムに供した (図 4)。塩化ナトリウムの濃度 0.1M から 0.35M のグラジェント溶出を行った結果、CM-①、②のピークに 9kDa 付近のタンパク質が確認できたので、両者を合わせて回収した。さらに、この画分に終濃度 1.6M になるように硫酸アンモニウムを加え、pH を 7 に調整し、疎水性カラムにアプライし、硫酸アンモニウム

濃度 1.6M から 0M のグラジェント溶出を行った (図 5)。SDS-PAGE においては Butyl-①、②、③のいずれも LTP を含むが、②と③には高分子側にバンドが見られたため、①のピークのみを回収し、LTP 画分とした。

3. 精製LTPの評価

上記の Butyl-①画分をプロテインシーケンサーに供し、N 末端のアミノ酸配列の解析を行ったところ、ID(X)GHVDSLVRP(X)LSYVQ なる配列が得られた。これは P. Sodano らが報告している小麦 LTP のアミ

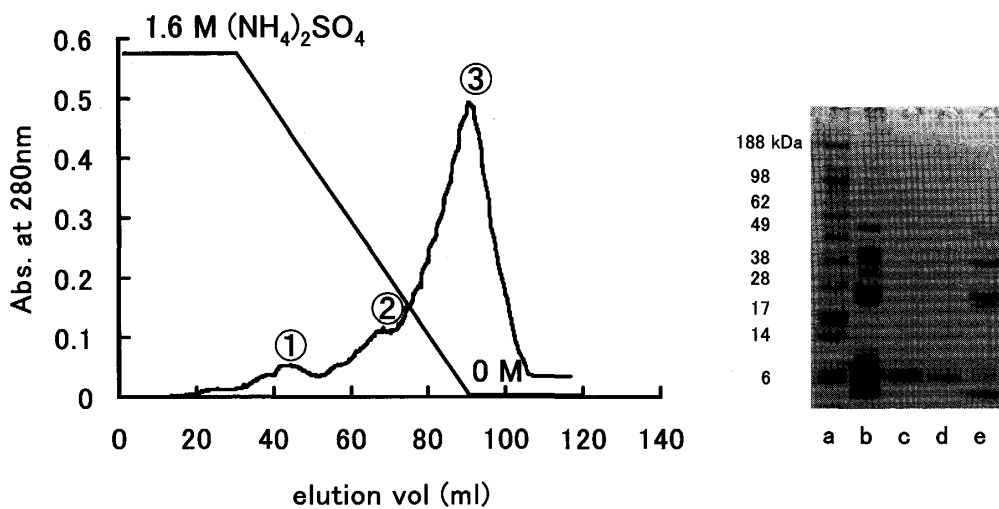


図 5 疎水性クロマトグラフィー
 クロマトグラフィーの条件は実験方法に示した。分画したタンパク質の確認を SDS-PAGE により行った。a : 分子量マーカー, b : apply 10 μ g, c : Butyl-① 1 μ g, d : Butyl-② 1 μ g, e : Butyl-③ 5 μ g

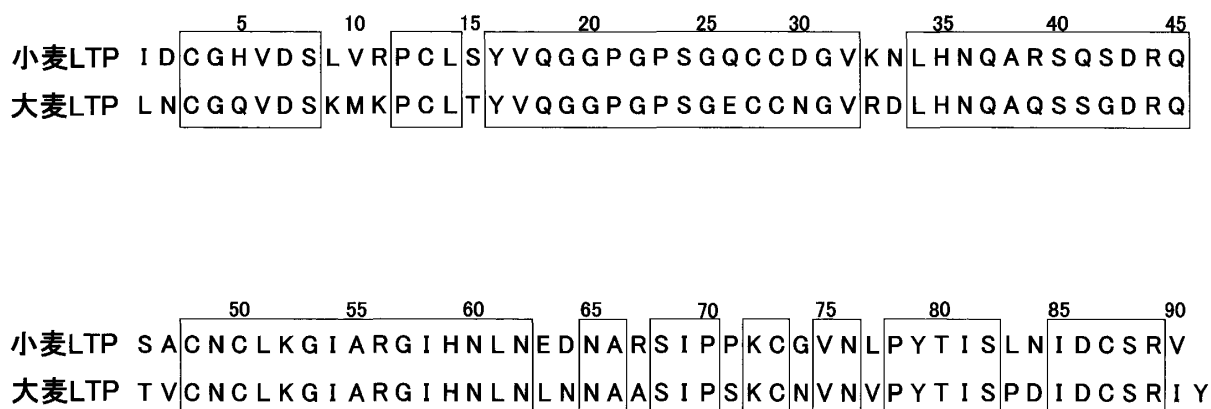
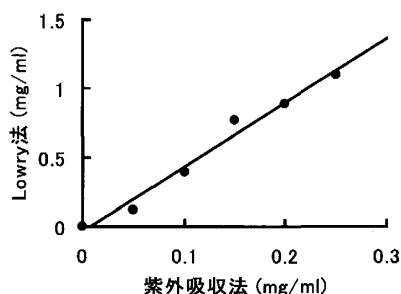


図6 アミノ酸配列
小麦LTPと大麦LTPの配列において相同性のある箇所を四角で囲んだ。

ノ酸配列と一致したため⁵⁾, Butyl-①画分を小麦LTPであると同一化した(図6)。

精製小麦LTPを用い、E1%=10とした紫外吸収法とウシ血清アルブミンを標準としたLowry法で小麦LTP濃度を測定した結果を図7に示した。紫外吸収法で測定したLTP濃度はLowry法と比較して約5分の1と大幅に低く、LTPの280nmにおけるE1%=2.2程度であることが示された。この結果は小麦LTPが構成アミノ酸としてトリプトファンを持たず、チロシンが2残基しか存在しないことに起因していると考えられる。

最終的に小麦粉1.5kgから74mgのLTPが回収できた。これは水抽出タンパク質の0.08%に相当した。しかしながら、Butyl-②, ③画分にもほぼ当量のLTPが存在すること、回収率約50%と仮定すると、小麦粉タンパク質中のLTP含量は0.3%位になるのではないだろうか。



$$\text{Lowry法} = 4.67 \times \text{紫外吸収法} - 0.0394$$

図7 紫外吸収法およびLowry法によるLTPの定量
E1%=10とした紫外吸収法と牛血清アルブミンを標準としたLowry法で小麦LTP濃度を測定した。

4. サンドイッチELISAの構築

次に精製小麦LTPをウサギに免疫後採血し抗血清を回収し、小麦LTP固定化カラムを用いて、IgG画分の精製を行った。さらに純化した抗体とそれをペルオキシダーゼ標識抗体を用いて、小麦LTPに対するサンドイッチELISAを構築したところ(図8)、検量線の立ち上がりが数ng/mlと感度の高い定量系を確立することができた。また、図6にみられるように小麦LTPと大麦LTPのアミノ酸配列は非常に高い相同性を有することから、この抗体の大麦LTPに対する交差反応性について検討した。しかし、検量線の立ち上がりは約1000倍異なり、この定量系に

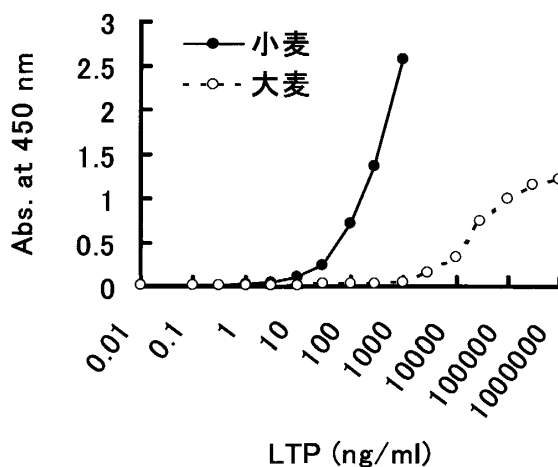


図8 抗小麦LTPポリクローナル抗体の大麦LTPに対する交差反応性
精製抗体を固相化後、抗原として小麦LTP(●), 大麦LTP(○)を反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗小麦LTPポリクローナル抗体を用いて発色させた。

表 2 加工食品の定量

サンプル名	LTP 定量系		グリアジン定量系
	小麦 LTP	小麦タンパク質	小麦タンパク質
	ng/g	μg/g	μg
醤油			
A	—	—	—
B	167	56	—
C	—	—	—
D	219	73	—
ビール			
A	—	—	0.16
B	259	86	1.80

—: 検出限界以下

試料の調製は実験方法に記した。LTP 定量系における小麦タンパク質への換算は、小麦 LTP 定量値を精製の回収率から算出した小麦タンパク質中の LTP 推定存在比率である 0.003 で割って算出した。

における大麦 LTP に対する交差性はほとんど無視できることが示された。

次に、本定量系を用いて加工食品中の LTP の定量を試みた (表 2)。比較として現在、卵、乳、落花生、そば、と並んで表示義務化されている小麦定量系の通知法である、森永生科学研究所製の小麦グリアジンキットによる定量を行った。現在の小麦定量系ではグリアジンをターゲットとしているため、発酵過程を経る食品中では加水分解され、正確な値を出すことが困難である。本庄等は、発酵食品中に小麦が実際には 12mg/ml 使用されているにもかかわらず、この ELISA による測定値は 19ng/ml と、ペプチドまで分解されると反応性は数 100 万分の 1 程度にまで下がることであると報告している¹⁾。一方、LTP はプロテアーゼ消化耐性が強いと言われているため、発酵食品中でも残っていることが期待された¹⁴⁾。表 2 に示したように、通知法 ELISA では、ビールのような発酵度の低い食品では定量可能であるが、醤油のような熟成期間の長い食品になると、ほとんど定量できないことが確認できた。なお、ビール a は普通の大麦ビールであるが、ビール b は最近流行の小麦添加ビールである。従って、通知法 ELISA でビール a が定量出来ているのは、大麦に対する交差反応性のためと考えられる。一方、小麦 LTP 定量系では、醤油でも定量可能であるうえ、ビール a では検出限界以下であり、ビール b では小麦タンパク質換算した値で、通知法より約 50 倍高い値が得られた。つまり、本法は通知法 ELISA より大麦に対する交差反応性が低く、かつ醤油のような発酵食品にも

応用可能な小麦使用量の評価系であることが示された。今後さらに定量分析例を増やして、本法の有効性を明らかにしていきたい。

また、従来、小麦においてはグリアジンを始めとする比較的高分子量のアレルゲンが注目されている。しかしながら、図 1 に示したように食物アレルギー患者血清中には LTP に対する IgE も少なからず存在する。血清中に特異的 IgE が存在すること、実際にその抗原がアレルゲンとしてアレルギー発症に関与しているかは直接関係付けられないこともあるが¹³⁾、今後は小麦アレルゲンとして LTP を解析していく必要もあるだろう。

LTP は古くから研究されてきたタンパク質であるが、最近になって、植物生理学的には細胞刺激因子として^{15,16)}、タンパク質化学的にはビールの泡の安定化因子として¹⁷⁾、新しい翻訳後修飾の例として¹⁸⁾、さらにドラッグデリバリーの担体として¹⁹⁾、益々研究が発展してきている。これらの研究の進展には LTP の由来、部位特異的あるいは共通抗体が非常に有用なツールとして必要となってくる。我々は現在その目的を達成するためにモノクローナル抗体の作製を遂行中である。

(平成 17. 9. 3. 受付)

引用文献

- 1) T. Honjoh, S. Muraok, S. Mamekoshi and M. Sakai: *Food and Food Ingredients J Jpn.*, 206, 13–22 (2002)
- 2) Y. Takahata and F. Morimatsu: *Food and Food*

- Ingradients J Jpn.*, 206, 23–32 (2002)
- 3) 太田裕見等編:「食品の適性表示マニュアル」第 1 節 アレルギー表示, 45–74, サイエンスフォーラム (2003)
 - 4) J. C. Kader: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 627 (1996)
 - 5) S. Tassin, W.F. Broekaert, D. Marion, D.P. Acland, M. Ptak, F. Vovelle and P. Sodano: *Biochemistry.*, 37, 3623–3637 (1998)
 - 6) F. Garcia-Olmedo, A. Molina, A. Segura and M. Moreno: *Trend Microbiol.*, 3, 72–74 (1995)
 - 7) N. Buhut, J. P. Douliez, A. Jacquemard, D. Marion, V. Tran, B. F. Maume, M. L. Milat, M. Ponchet, V. Mikes, J. C. Kader and J. P. Blein: *FEBS Letter.*, 509, 27–30 (2001)
 - 8) K. Hoffmann-Sommergruber, A. Molina, A. Segura and M. Moreno: *Int Arch Allergy Immunol.*, 122, 155–166 (2000)
 - 9) K. F. Lin, Y. N. Liu, S. T. D. Hsu, D. Samuel, C. S. Cheng, A. M. J. J. Bonvin and P. C. Lyu: *Biochemistry.*, 44, 5703–5712 (2005)
 - 10) S. Tassin, W.F. Broekaert, D. Marion, D.P. Acland, M. Ptak, F. Vovelle and P. Sodano: *Biochemistry.*, 37, 3623–3637 (1998)
 - 11) D. Marion, J. P. Douliez, M. F. Gautier and K. Elmorjani: in E. N. C. Mills and P.R. Shewry eds.; *Plant Food Allergy*, (Blackwell Publishing) 57–69 (2004)
 - 12) 小川 正: 化学と生物, 40, 643–652 (2002)
 - 13) 海老澤元宏: 食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究; 食物アレルギーの診断に関する研究, 平成 13 年度研究報告書, 4–6 (2002)
 - 14) K. L. Larsen and J. R. Winther: *FEBS Letter.*, 488, 145–148 (2001)
 - 15) Z. Wang, W. Xie, F. Chi and C. Li: *FEBS Letter.*, 579, 1683–1687 (2005)
 - 16) N. Buhot et al.: *Molecular Biolog of the Cell.*, 15, 5047–5052 (2004)
 - 17) S. N. V. Nierop, D. E. Evans, B. C. Axcell, I. C. Cantrell and M. Rautenbach: *J Agric Food Chem.*, 52, 3120–3129 (2004)
 - 18) K. Lindorff-Larsen, M. H. Lerche, F. M. Poulsen, P. Roepstorff: *J Biol Chem.*, 276, 33547–33553 (2001)
 - 19) C. Pato, M. D. Borane, G. L. Baut, P. L. Pape, D. Marion and J. P. Douliez: *Biochem Pharmacol.*, 62, 55–5560 (2001)