



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사학위 논문

우리나라 소아에서의 땅콩과 대두의  
교차 알레르겐 성분 규명

아주대학교 대학원

의학과

전계리

우리나라 소아에서의 땅콩과 대두의  
교차 알레르겐 성분 규명

지도교수 이 수 영

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

전 계 리

전계리의 의학 박사학위 논문을  
인준함.

심사위원장 박 해 심 인

심 사 위 원 김 규 언 인

심 사 위 원 김 해 영 인

심 사 위 원 장 영 주 인

심 사 위 원 이 수 영 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 12월 21일

## 우리나라 소아에서의 땅콩과 대두의 교차 알레르겐 성분 규명

**배 경 :** 땅콩과 대두는 같은 콩과식물에 속하는 주요 알레르기 식품으로, 외국의 경우 최근 땅콩의 주요 알레르겐인 *Ara h 3*와 대두의 glycinin이 IgE와 결합한 epitope을 공유한다는 보고들이 있다. 또한 우리나라 환자들 중에도 혈청검사를 시행해 보면, 땅콩과 대두 단백질에 대한 특이 IgE치가 동시에 높은 환자들이 흔히 발견된다.

**목 적 :** 연구자들은 땅콩 특이 IgE가 높은 환자 혈청을 이용하여 western blot inhibition test와 아미노산 염기서열분석을 통하여 땅콩과 대두의 교차 알레르겐을 동정하고, 동정된 알레르겐으로부터 IgE와 결합한 epitope을 규명함으로써 추후 임상 및 기초 연구에 이용하고자 본 연구를 시행하였다.

**재료 및 방법 :** 국내산 땅콩 조항원을 pI값에 따라 분리한 후, SDS-PAGE를 수행하여 분자량을 기준으로 다시 분리하였다. 분리된 땅콩항원을 국내산 대두항원으로 inhibition한 땅콩 알레르기 환자의 혈청을 이용하여 western blot inhibition test를 시행하였고, 동시에 양성 대조 blot은 대두항원을 억제하지 않은 혈청으로 시행하였다. 그리고 각각의 blot을 비교하여 반응이 억제된 단백질 분획을 분리하여 N-terminal amino acid sequencing을 수행하였다. 여기서 얻은 아미노산 서열 결과를 protein database에 넣어서 해당 단백질을 동정하였다. 이 후 동정된 땅콩 단백질의 아미노산 염기서열과 대두의 염기서열 비교분석으로부터 예상 IgE binding epitope을 합성한 후, 환자 혈청을 이용한 epitope inhibition IgE ELISA와 epitope direct IgE ELISA

방법으로 땅콩과 대두에서의 공통 IgE binding epitope를 규명하였다.

**결 과 :** 땅콩 단백질 중 38 kDa과 23 kDa의 분획에 대한 IgE 결합반응이 대두항원에 의하여 확실히 억제되었으며, 이를 정제하여 N-terminal amino acid sequencing을 시행하여 database에 검색한 결과 38 kDa과 23 kDa 분획 모두 *Ara h* 3로 확인되었다. 이들 중 아직까지 IgE binding epitope가 보고되어져 있지 않은 23 kDa의 땅콩 단백질 분획을 대두단백과의 아미노산 염기서열 비교분석을 통하여 2개의 예상 IgE binding epitope을 제작하였으며 환자혈청을 이용한 epitope inhibition-IgE ELISA와 epitope direct ELISA방법을 통하여 예상한 2개의 IgE binding epitope 중 하나가 몇몇 환자들에 한하여 땅콩과 대두의 공통 IgE binding epitope로 확인되었다.

**결 론 :** 우리나라 소아의 혈청 특이 IgE를 이용한 연구 결과 땅콩의 *Ara h* 3와 대두의 glycinin사이에 공통의 IgE binding epitope들이 여러 개 존재함을 알 수 있었으며 그 중 한 개의 IgE binding epitope을 규명할 수 있었다.

**핵심 되는 말 :** 땅콩 알레르기, 대두 알레르기, 교차반응, IgE binding epitope

## 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림 차례 .....	v
표 차례 .....	vi
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
A. 환자혈청 .....	3
B. 땅콩과 대두 항원의 추출 .....	3
C. 땅콩과 대두의 항원교차성을 알아보기 위한 대두의IgE ELISA inhibition test .....	3
D. 땅콩조항원의 2-D 전기영동과 soybean-inhibited peanut sensitive patient sera의 IgE immunoblotting .....	5
E. 땅콩항원 중 대두에 억제된 protein spot의 아미노산 염기서열 분석 .....	6
F. 분석된 아미노산 염기서열 동정 및 IgE 결합 예상 peptide의 합성 .....	7
G. 대두와 예상된 IgE binding epitopes의 ELISA inhibition test .....	7
H. Peptide specific-IgE direct ELISA .....	7
III. 결 과 .....	9
A. 땅콩에 대한 대두항원 IgE ELISA inhibition test .....	9
B. 대두단백으로 억제된 땅콩알레르기 환자의 혈청을 이용한 땅콩 단백질의 IgE immunoblot .....	9
C. 대두단백으로 억제된 땅콩단백들 중 38 kDa과 23 kDa의 단백질편의 아미노산 염기서열분석과 protein database 검색결과 .....	10

D. 대두 단백질로 억제된 땅콩 단백질 중 38 kDa과 23 kDa의 단백질 절편 N-terminal 부위의 아미노산 염기서열분석과 단백질 데이터베이스 검색 결과 .....	10
E. 땅콩에 대한 대두항원과 예상된 2개의 IgE binding epitope의 IgE ELISA inhibition test .....	11
F. 예상된 2개의 epitope의 환자개인별 direct IgE ELISA .....	12
IV. 고찰 .....	25
V. 결론 .....	32
참고문헌 .....	33
ABSTRACT .....	38



## 그림 차례

Fig. 1 Serial profile of IgE ELISA to peanut using sera from peanut sensitive patients .....	14
Fig. 2 IgE ELISA inhibition to peanut, soybean and buckwheat using sera from peanut sensitive patients .....	15
Fig. 3 Peanut-IgE immunoblot using sera from soybean-inhibited peanut sensitive patient sera and noninhibited peanut sensitive patient .....	16
Fig. 4 Peanut-IgE immunoblot using sera from soybean-inhibited peanut sensitive patient sera and noninhibited peanut sensitive patient ..	17
Fig. 5 Protein database search of peanut 38, 23 kDa fragment .....	19
Fig. 6 SDS-PAGE of peanut allergen( <i>Ara h 3</i> ) .....	20
Fig. 7 Amino acid sequence alignment of peanut 23 kDa fragment N-terminal and soybean .....	21
Fig. 8 IgE ELISA inhibition to epitope #1, 2 using sera from peanut sensitive patients .....	23
Fig. 9 IgE ELISA results to epitope #1, 2 using sera from peanut and soybean sensitive patients .....	24

## 표 차례

Table 1 Laboratory data of peanut and soybean sensitive patients and normal patients .....	13
Table 2 Amino acid partial sequences of the soybean-inhibited peanut protein .....	18
Table 3 N-terminal sequences of <i>Ara h3</i> .....	20
Table 4 Amino acid sequences of the synthesized peptides .....	22

## I. 서 론

식품알레르기는 특정식품에 감수성을 지닌 개인이 원인 식품을 섭취함으로써 식품단백에 대한 IgE 매개성 혹은 non-IgE 매개성 면역반응으로 소화기, 피부 및 호흡기 등의 표적장기에 다양한 증상을 나타내며 심한 경우에는 아나필락시스 반응을 초래할 수 있는 흔한 알레르기 질환이다<sup>2</sup>. 식품알레르기의 발생빈도는 성인에서 약 2%, 3세 미만 소아에서 약 8%로 특히 성인에 비해 소아에서 빈번하게 나타나며, 특히 생후 1년 이내에 발생률이 가장 높다<sup>2</sup>. 알레르기 반응을 일으키는 흔한 원인식품으로는 인종이나 지역, 연령 등에 따라 차이가 있지만 대체로 소아에서 계란, 우유, 대두, 밀가루 등이 있으며 연장아나 성인에서는 땅콩, 견과류, 생선, 어패류 등 좀 더 많은 원인으로 알려져 있다<sup>2, 3</sup>. 이러한 식품알레르기를 일으키는 주요 알레르겐의 대부분은 수용성 당단백으로 분자량은 약 10,000 - 60,000 dalton으로, 흡입성 항원과는 달리 위장관을 통과하는 동안 소화효소, 세균, 독소 등에 의해 변형될 가능성이 많고, 장점막에 머무르는 시간이 길어서 아나필락시스 반응뿐만 아니라 지연형 과민반응을 일으키는 경우도 많다<sup>3</sup>.

알레르기 반응을 흔히 일으키는 식품 중 땅콩과 대두는 식물성 단백을 얻을 수 있는 대표적인 음식으로 이 중 대두단백은 최근 식품가공의 기술발달로 다양한 식용부산물 및 첨가물로 용도가 증가추세에 있는 반면 식품으로부터 완전히 제거하기 힘들어 더욱 주의가 필요하다. 또한 땅콩과 대두는 분류상 같은 콩과식물에 속하며 서로 많은 특징들을 공유하고 있어 다른 견과류(tree nuts)에 비해 교차반응이 더 빈번하리란 것을 짐작할 수 있다<sup>4</sup>. 실제로 *in vitro* IgE-binding assay에서는 땅콩과 대두의 교차반응에 관한 많은 연구들이 수행되고 있는데 땅콩 알레르기가 있는 환자들의 혈청에서 대

두를 포함한 콩과류 식물 단백질과 광범위한 IgE 결합관계가 있는 것이 보고되었고, 특히 땅콩의 주요 알레르겐인 *Ara h3* 와 대두의 glycinin 이 IgE epitope을 공유한다고 알려져 있다<sup>5, 7</sup>. 그러나 땅콩과 대두 알레르기는 임상적인 반응은 조금 다른 양상으로 나타나며 교차반응을 보였던 epitope과 임상증상과의 연관성에 대해서는 여러 연구들이 많이 수행되어지고 있다.

최근 외국에서는 땅콩 알레르기가 있는 환자가 대두를 섭취함으로써 아나필락시스가 발생한 사례가 보고되었으며<sup>6</sup>, 우리나라 환자들 중에도 혈청학적 검사를 시행해 보면, 땅콩과 대두 단백질 특이 IgE가 동시에 높은 환자들 이 흔히 발견된다. 이와 같이 대두 알레르기는 식품 아나필락시스의 원인으로 과소평가되어 있어 천식과 땅콩알레르기가 있는 연장아나 성인에서 심한 증상을 일으킬 가능성이 있으므로 주목해야한다.

이에 본 연구의 목적은 땅콩 특이 IgE가 높은 환자 혈청을 이용하여 IgE western inhibition blot, 아미노산 염기서열분석을 통해 땅콩과 대두의 공통 알레르겐을 동정하고 이로부터 땅콩과 대두의 공통 IgE binding epitope을 밝히고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### A. 환자혈청

아주대학교병원 소아과에 내원한 소아 환자들 중 ImmunoCAP (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden)으로 검사한 결과, 땅콩( $f_{13} > 0.7$  kU<sub>A</sub>/L)과 대두( $f_{14} > 0.7$  kU<sub>A</sub>/L)에 대한 특이 IgE의 수치가 높은 환자들 (group 1)을 대상으로 하였으며 음성대조군으로는 땅콩과 대두에 모두 정상인 환자( $f_{13}, f_{14} < 0.3$  kU<sub>A</sub>/L)들을 group 2로 나누었다(Table 1).

### B. 땅콩과 대두 항원의 추출

땅콩과 대두의 조항원은 연구자들의 이전의 연구에서와 동일한 방법으로 제조하였다<sup>4, 29</sup>. 이를 약술하면 땅콩(국내 자연산)과 대두(국내 자연산)의 가루를 얻어 ether로 탈지방화한 후 4°C에서 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)에 1:10 w/v으로 4°C에서 24시간동안 저으면서 보관한 후 10,000 rpm, 4°C에서 1시간동안 원심 분리하였다. 여기에서 상층액을 얻어 3차 증류수에 48시간 동안 투석 (pore size cut-off : 3.5 kDa) 하였다. 이 후 -70°C에서 동결 건조시킨 후 항원가루를 얻었고, 얻어진 조항원의 단백질농도는 Bio-rad Bradford protein assay kit (Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 측정하였다. 표준항원으로는 BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

### C. 땅콩과 대두의 항원교차성을 알아보기 위한 대두의 IgE ELISA 억제 시험

실제 땅콩과 대두의 항원교차의 정도를 알아보기 위하여 땅콩에 대한 대두의 IgE inhibition ELISA을 시행하였다. 우선 각각의 땅콩항원과 환자혈청의 최적 반응 농도를 알아보기 위하여 땅콩항원과 환자혈청을 점차적으로 농도를 달리하여 ELISA를 시행하였다. 땅콩항원은 10  $\mu\text{g}/\text{well}$ 부터 0.1  $\mu\text{g}/\text{well}$ , 환자혈청은 1:300부터 1:500 v/v의 농도로 시행하였다. 각각의 땅콩항원을 coating buffer (0.1 M Carbamate buffer, pH 9.6, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 희석한 후 Maxisorb<sup>®</sup> Immuno-ELISA Plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 4°C, 16시간동안 부착시킨 후 0.05% PBS-Tween 20으로 3번 세척하였다. 이후 불필요한 반응을 억제하기 위하여 assay diluent (10% fetal bovine serum in PBS, pH 7.0)로 37°C에 2시간동안 반응하였다. 이를 또 0.05% PBS-Tween 20으로 다시 3회 세척한 후 일련의 농도로(1:300, 1:400, 1:500) 희석된 환자혈청을 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C에서 2시간동안 반응하였다. 이를 5회 세척 후 biotinylated human anti-IgE (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 을 1:4,000으로 blocking solution으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응한 후 이를 다시 5회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (BD PharMigen, San Diego, CA, USA) 을 1:2,000으로 희석하여 실온에서 15분간 반응한 후 이를 7회 세척하였다. 그 후 TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine; BD PharMigen)을 첨가하여 암실에서 5분간 반응시킨 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 반응을 중지한 후 450 nm에서 흡광도를 읽었다.

ELISA 결과 각각의 항원과 항체의 반응이 흡광도 1.5 ~ 2.0 사이의 적절한 반응을 보인 조건을 택하여 ELISA inhibition test를 시행하였으며, 억제제로는 800  $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도를 stock solution으로 사용하여 6.25  $\mu\text{g}/\text{well}$ 까지

희석하여 사용하였다. ELISA inhibition 시행 과정 중 환자혈청을 각각의 농도로 희석된 억제제와 실온에서 2시간동안 미리 반응시킨 후 사용하였고, 이외의 과정은 상기와 동일하였으며 얻어진 흡광도로 다음의 공식에 의하여 억제정도를 구하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{UninhibitedOD} - \text{InhibitedOD}}{\text{UninhibitedOD}} \times 100$$

#### D. 땅콩 조항원의 2-D 전기영동과 soy-inhibited peanut patient sera의 IgE immunoblotting

땅콩 조항원을 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 하여 IPG DryStrip rehydration buffer (8M Urea, 0.4% DTT, 1% CHAPS)에 1:1(v:v) 동량으로 섞은 후 IPGphor strip holder (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)에 옮긴 후 Immobiline<sup>TM</sup> IPG DryStrip 7cm(pH 3-10, pH 4-7)을 그 위에 놓았다. IPG DryStrip cover fluid (Amersham Bioscience)을 첨가하여 증발을 막고 상온에서 14시간동안 방치하여 sample을 gel속으로 rehydration을 수행하였다. Rehydration된 각 Immobiline<sup>TM</sup> IPG DryStrip을 Ettan<sup>TM</sup> IPGphor (Amersham Bioscience)에 3시간동안 전기 영동하였다. 전기 영동한 Immobiline<sup>TM</sup> IPG DryStrip을 equilibration buffer (8M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 1% DTT in 0.05M Tris-HCl, pH 8.8)에 20분 동안 반응한 후 Novex<sup>®</sup> 4-20% Tris-Glycine gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 얹고 125 V로 2시간 30분 동안 전기 영동하였다. 이 때 표지자로는 SeeBlue Plus 2 prestained Marker (Invitrogen)을 사용하였다.

전기 영동한 gel을 PVDF membrane (Millipore Co., Bedford, MA, USA)에 50V로 전이시켰다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 PVDF membrane에

5% BSA-PBS(pH7.5)을 첨가하여 4시간동안 반응하였다. 그 후 0.05% PBS-Tween-20으로 10분씩 3번 세척한 다음 대두 항원으로 4시간 동안 inhibition시킨 PN 환자혈청 (1:40 dilution)을 넣어 4°C에서 14시간 이상 반응하였다. 이 때 양성대조군으로는 억제제를 포함시키지 않은 환자혈청을, 음성대조군으로는 5% BSA-PBS을 반응시킨 환자혈청을 사용하였다. 각각 환자혈청 및 5% BSA-PBS로 반응한 PVDF membrane을 다시 세척액으로 세척한 다음 biotin이 부착된 human anti-IgE (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 1:4000으로 희석하여 각각의 PVDF membrane을 반응하였다. 이를 다시 세척한 후 streptavidin-alkaline phosphate (BD PharMingen)을 1:2000으로 희석하여 반응시킨 후 Sigma *FAST*<sup>TM</sup> BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium)로 발색하였다.

#### **E. 땅콩항원 중 대두에 억제된 protein spot의 아미노산 염기서열 분석**

땅콩 단백질 중 대두에 억제된 땅콩단백의 band를 식별하기 위하여 양성혈청대조군에는 나타나지만 억제시킨 환자혈청대조군에는 보이지 않은 spot을 Image Analyser (Bio-rad)로 분석하였다. 이 후 억제된 protein spot의 아미노산 염기서열 분석을 위하여서는 위의 방법으로 전이된 PVDF membrane을 glacial acetic acid가 없는 stain solution으로 1분간 염색을 하고, 역시 glacial acetic acid가 없는 destain solution으로 30분간 탈색을 하여 원하는 spot을 잘라내어 한국기초과학연구원 (Korea Basic Science Institute, Seoul, Korea)에 의뢰하여 Procise 492 cLC Protein sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)로 분석하였다.



## F. 분석된 아미노산 염기서열 동정 및 IgE 결합 예상 peptide의 합성

분석하여 나온 아미노산 염기서열을 protein database ([www.ncbi.nlm.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.gov/blast))에서 검색하여 땅콩 단백질 중 어떤 단백질인가를 동정하였다. 이렇게 동정된 땅콩 단백질과 대두 단백질의 아미노산 염기서열 비교분석을 통해 homology가 높은 2부위를 땅콩과 대두의 IgE binding common epitope로 예상하였다(Fig. 7). 그리고 이 예상부위를 A&PEP (Yeongi-gun, Korea)에 의뢰하여 펩타이드를 합성하였다(Table. 4)

## G. 예상된 IgE binding epitopes의 면역 효소 억제 시험

땅콩과 대두의 교차반응정도를 알아보기 위한 대두의 IgE ELISA inhibition 실험 시의 조건과 동일하게 시행하였으며, 억제제로는 예상 epitope들을 800 µg/well의 농도를 stock solution으로 사용하여 6.25 µg/well 까지 희석하여 사용하였다. IgE ELISA inhibition 시행 과정 중 환자혈청을 각각의 농도로 희석된 억제제와 실온에서 2시간동안 미리 반응시킨 후 사용하였고, 그 이외의 과정은 대두 단백질의 면역 효소억제 실험과정과 동일하게 수행하였으며 얻어진 흡광도로 다음의 공식에 의하여 억제정도를 구하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{UninhibitedOD} - \text{InhibitedOD}}{\text{UninhibitedOD}} \times 100$$

## H. Epitope specific-IgE direct ELISA

합성된 각 epitope들이 환자개인혈청과 반응하는지를 ELISA 방법으로 확인하였다. 이를 약술하면, 각 epitope들을 coating buffer (0.1M Carbamate buffer, pH 9.6, Sigma)에 5 µg/ml의 농도로 희석한 후 Maxisorb

Immuno-ELISA Plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 4°C, 16시간동안 부착시킨 후 0.05% PBS-Tween 20으로 3번 세척하였다. 이후 불필요한 반응을 억제하기 위하여 assay diluent (10% Fatal bovine serum in PBS, pH 7.0)로 37°C에 2시간동안 반응하였다. 이를 또 3회 세척한 후 환자혈청을 1:20으로 희석하여 well당 100  $\mu$ l씩 넣고 4°C에서 16시간 이상 반응하였다. 다음날 5회 세척 후 biotin이 부착된 human anti-IgE(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 1:1,000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응한 후 이를 다시 5회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (BD PharMigen)을 1:1,000으로 희석하여 실온에서 30분간 반응한 후 이를 6회 세척하였다. 그 후 TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine; BD PharMigen)을 첨가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu$ l을 넣어 반응을 중지한 후 450 nm에서 흡광도를 읽었다.

### III. 결 과

#### A. 땅콩에 대한 대두항원의 IgE ELISA inhibition test

땅콩 단백질과 땅콩 환자 혈청의 최적반응을 보이는 적정농도를 구하기 위하여 여러 농도의 땅콩 단백질과 땅콩 환자 혈청을 이용하여 ELISA를 시행한 결과, 그 중 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 땅콩항원과 1:400 v/v로 희석한 환자혈청을 이용하여 시행한 경우가 흡광도 1.5 ~ 2.0 사이의 가장 적절한 항원항체반응을 보였다 (Fig 1). 위의 조건으로 대두 단백을 억제제로 사용하여 inhibition ELISA를 시행한 결과 땅콩과 대두의 환자들의 pooled sera에 땅콩 단백질 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 억제한 경우에는 95%가 억제되는 반면, 동량의 대두 단백질로 억제한 경우에는 21%만이 억제되었다. 또한 땅콩 단백질 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 억제한 경우에는 91%가 억제되는 반면 동량의 대두단백으로는 15%만이 억제되어 inhibition ELISA 실험 결과만으로는 다소의 교차반응이 의심되었다. 음성 대조군으로 사용한 메밀 단백질에는 거의 억제되지 않았으며 농도에 따른 차이가 없었다(Fig. 2).

#### B. 대두단백으로 억제된 땅콩환자혈청을 이용한 땅콩 단백질의 IgE Immunoblot

땅콩과 대두 단백질의 교차반응성에 대한 많은 보고와는 달리 면역 효소 억제 시험 결과 다소의 교차 반응이 의심되는 땅콩 단백질과 대두 단백질의 교차 반응하는 단백을 동정하기 위해 IgE immunoblot 실험을 수행하였다. 그 결과 땅콩 알레르기 환자 혈청을 이용한 땅콩 단백질의 IgE immunoblot과 미리 대두 단백질에 의해서 억제된 땅콩 알레르기 환자 혈청을 이용한 땅콩 단

백의 IgE immunoblot의 image 비교 결과에서는 많은 땅콩 단백질이 대두 단백질에 의해 억제되어 사라지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3 & 4).

### C. 대두 단백질로 억제된 땅콩 단백질 절편들 중 38 kDa과 23 kDa의 단백질 절편 N-terminal 부위의 아미노산 염기서열분석과 단백질 데이터베이스의 검색결과

대두 단백질에 의해 억제되어 사라진 땅콩 단백질의 IgE immunoblot의 절편들 중 38 kDa과 23 kDa의 땅콩 단백질의 N-terminal sequencing을 시행하여 각 절편의 N-terminal 부위를 아미노산 염기서열 분석한 결과는 Table 2와 같다.

분석된 38 kDa과 23 kDa의 땅콩 단백질 절편의 아미노산 염기서열을 protein database(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)에 검색한 결과, 땅콩의 주요 알레르겐 *Ara h 3* (Genbank Accession # AAT39430 : glycinin)의 단백질 절편의 일부로 동정되었다 (Fig. 5).

땅콩 주요 알레르겐의 하나인 *Ara h 3*는 SDS-PAGE상에서 proteolytic processing이 일어나 여러 단백질 절편들로 나뉘어 각각의 여러 단백질 절편 양상을 나타내는 것으로 보고되고 있는데<sup>31</sup>, 대두 단백질에 의해 억제된 땅콩 단백질의 38 kDa과 23 kDa은 SDS-PAGE상에서 나타나는 *Ara h 3*의 여러 단백질 절편들 중 각각 45 kDa과 25 kDa에 해당하는 단백질 절편으로 예상되어진다(Fig. 6 & Table 3).

### D. 땅콩 주요 알레르겐 *Ara h 3*의 23 kDa 단백질부위와 대두 단백질의 아미노산 염기서열의 homology 비교 분석 및 예상 IgE binding epitope의

## 합성

대두단백에 의해 억제된 38 kDa과 23 kDa의 땅콩단백절편 중 38 kDa의 땅콩 단백질 절편에 대한 아미노산 염기서열 분석과 문헌 검색 결과 이들 절편 내에는 이미 땅콩 단백질과 대두 단백질의 공통 IgE binding epitope가 보고되어 있었다<sup>32</sup>. 그래서 본 연구자는 아직까지 땅콩과 대두의 공통 IgE binding epitope가 보고되어 있지 않은 23 kDa의 땅콩 단백질의 아미노산 염기서열을 대두 단백질의 아미노산 염기 서열 비교 분석을 통하여 그 homology가 67% 이상 높은 2개의 부위를 23 kDa 땅콩 단백질 절편 내에 존재할 수 있는 땅콩 단백질과 대두 단백질의 공통 IgE binding epitope으로 예상하였다(Fig. 7). 그래서 이 예상 IgE epitope를 제작 합성하였으며 그 아미노산 염기서열은 Table 4와 같다.

### **E. 땅콩에 대한 대두항원과 예상된 2개의 IgE binding epitope의 IgE inhibition ELISA**

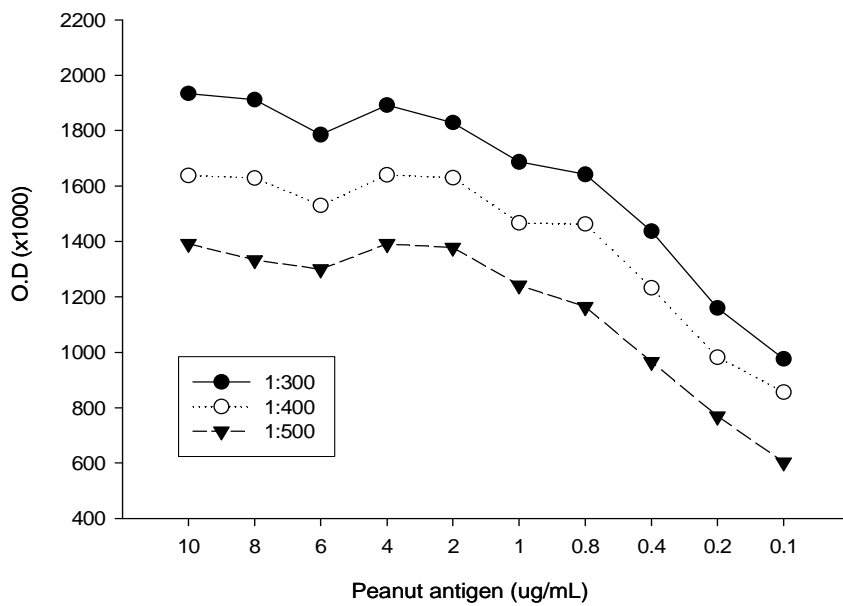
땅콩 단백질과 땅콩 환자 혈청과의 최적반응을 보이는 적정농도인 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 땅콩 단백질과 1:400으로 희석한 땅콩 환자 혈청의 조건으로 대두 단백질과 땅콩 단백질의 염기 서열로부터 예상 합성된 2개의 epitope를 억제제로 사용한 IgE inhibition ELISA를 시행한 결과, 억제제 100  $\mu\text{g}$ 을 사용한 경우, epitope #1에서는 25.15%, epitope #2에서는 9.45%가 억제되었다. 따라서 땅콩 단백질의 23 kDa의 아미노산 염기서열로부터 예상되어 합성된 2개의 IgE binding epitope중 epitope #1은 대두 단백질과는 낮은 정도로 교차반응이 있고 epitope #2는 교차반응이 거의 없음을 알 수 있었다(Fig. 8).

## F. 예상된 2개의 epitope의 환자개인별 direct IgE ELISA

억제 반응 시험에서 낮은 정도의 교차반응이 일어난 epitope에 대해서 실제로 반응이 일어나는지를 알아보기 위하여 epitope direct IgE ELISA 시행하였다. 그 결과 정상군의 반응을 1로 환산하였을 때 epitope #1의 경우는 17명의 환자들 중 7명이 정상군에 비해 2배 이상의 반응을 보였으며 epitope #2의 경우는 17명의 환자들 중 8명의 환자가 정상군에 비해 2배 이상의 반응정도를 보였으며 특히 JSH (f13 :25.1 / f14 : >97.9), CSW (f13 : 11.2 / f14 :>100), KJB (f13 : >100 / f14 : 8.43)등의 경우 정상군에 비해 6배 이상의 높은 반응을 보였다(Fig. 9).

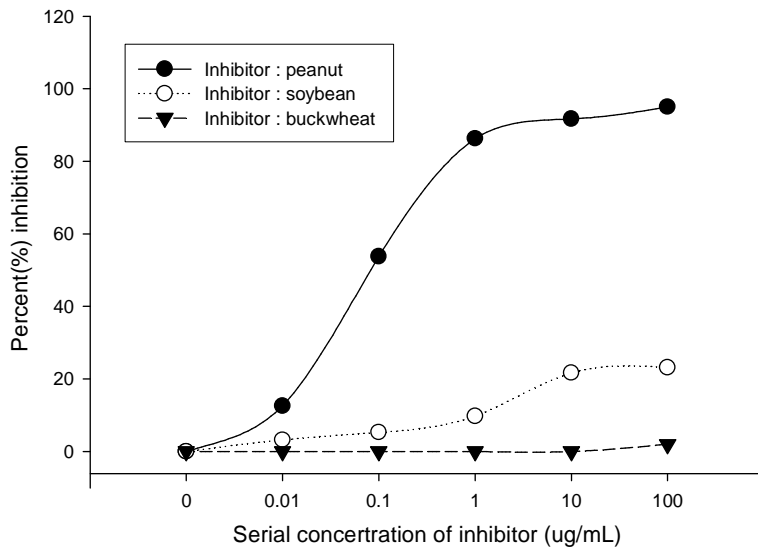
**Table. 1. Laboratory data of Peanut and Soybean hypersensitive patients(G1) and normal patients(G2)**

	Name	Sex	Age (Month)	F13(Peanut)	F14(Soybean)	
G1	1	KGH	M	12	11.6	28.3
	2	KNJ	F	7	2.38	40.3
	3	KMK	F	6	13.3	54.6
	4	KSW	M	9	8.2	16.2
	5	KCY	M	8	2.72	4.28
	6	RSJ	F	9	15.5	10.9
	7	MJH	F	12	11.5	19.7
	8	LSW	F	15	14.5	71.1
	9	YBC	M	93	12.4	11.8
	10	JSH	M	18	25.1	97.9
	11	CSW	M	4	11.2	>100
	12	KJB	M	8	>100	8.43
	13	KCN	F	36	32.1	0.67
	14	PSH	M	27	>100	45.6
	15	LDG	M	15	78.3	33.7
	16	LSH	F	14	>100	>100
	17	JYS	F	14	36.1	12.1
G2	1	GHS	F	9	0.3	0.3
	2	KDH	F	32	0.3	0.3
	3	KMK	F	44	0.3	0.3
	4	KWY	M	33	0.3	0.3
	5	PMH	F	60	0.3	0.3
	6	JSY	F	25	0.3	0.3

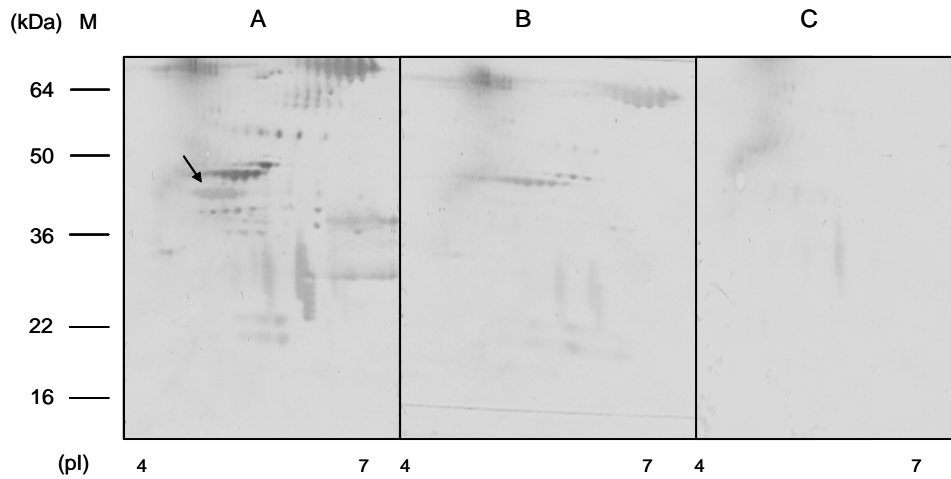


**Fig. 1. Serial Profile of IgE ELISA to peanut using sera from peanut sensitive patients.**

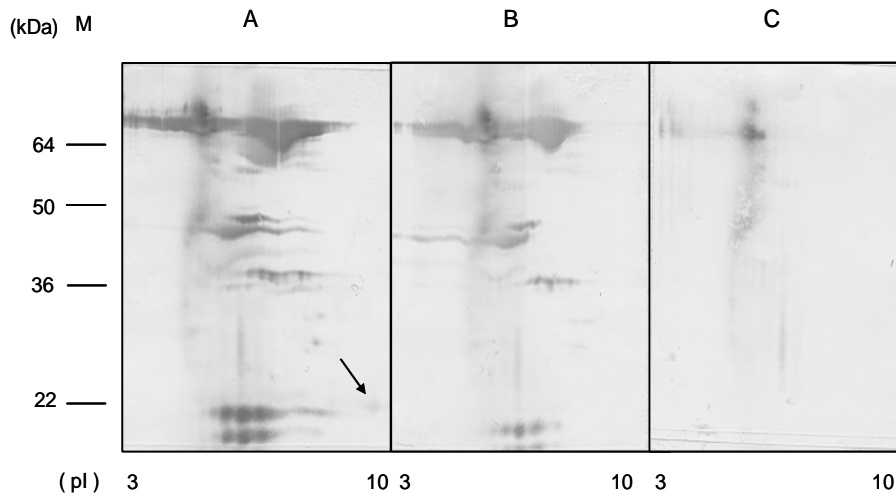




**Fig. 2. IgE ELISA Inhibition to peanut, soybean, and buckwheat using sera from peanut sensitive patients. The results were expressed as percent(%) inhibition.**



**Fig. 3. Peanut-IgE immunoblot using sera from soybean-inhibited peanut sensitive patient sera and noninhibited peanut sensitive patient.** The arrow is soybean-inhibited peanut protein spot (38 kDa), A: non-inhibited peanut hypersensitive patient blot, B: soybean-inhibited peanut hypersensitive patient blot, C: normal patient blot, M: molecular weight standard (Novex SeeBlue Plus 2), kDa: kiloDalton.



**Fig. 4. Peanut-IgE immunoblot using sera from soybean-inhibited peanut sensitive patient sera and noninhibited peanut sensitive patient.** The arrow is soybean-inhibited peanut protein spot (23 kDa), A: non-inhibited peanut hypersensitive patient blot, B: soybean-inhibited peanut hypersensitive patient blot, C: normal patient blot, M: molecular weight standard (Novex SeeBlue Plus 2), kDa: kiloDalton.

**Table. 2. Amino acid partial sequence of the soybean-inhibited peanut protein**

(MW : molecular weight, kDa : kiloDalton).

---

MW	Amino acid sequence
38 kDa	Val-Thr-Phe-Arg-Gln-Gly-Gly-Glu-Glu-Asn-Glu-X-Gln-Phe-Gln-Arg-Leu-Asn-Ala-Gln (VTFRQGGEENEXQFQRLNAQ)
23 kDa	Gly-Ile-Glu-Glu-Thr-Ile-X-Thr-Ala-Ser-Val-Lys-Lys-Asn-Leu-Gly-Arg-Ser-Ser-Asn-Pro- Asp-Ile-Tyr-X-Pro-Gln-Ala-Gly (GIEETIXTASVKKNLGRSSNPDIYXPQAG)

---

A. Peanut (*Arachis hypogae*) 38 kDa fragment

```
>gi|47933675|gb|AAT39430.1| glycinin [Arachis hypogaea]  
Length=510
```

```
Score = 35.0 bits (79), Expect = 0.90, Method: Composition-based stats.  
Identities = 19/20 (95%), Positives = 19/20 (95%), Gaps = 0/20 (0%)
```

```
Query 1  VTFRQGGEENEXQFQRLNAQ 20  
         VTFRQGGEENE QFQRLNAQ  
Sbjct 19  VTFRQGGEENECQFQRLNAQ 38
```

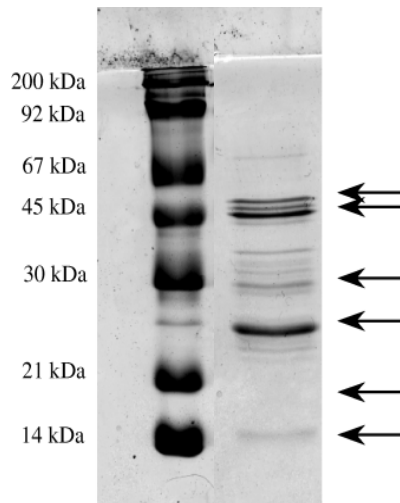
B. Peanut (*Arachis hypogae*) 23 kDa fragment

```
>gi|47933675|gb|AAT39430.1| glycinin [Arachis hypogaea]  
Length=510
```

```
Score = 53.5 bits (127), Expect = 2e-06, Method: Composition-based stats.  
Identities = 26/29 (89%), Positives = 27/29 (93%), Gaps = 0/29 (0%)
```

```
Query 1  GIEETIXTASVKKNLGRSSNPDIYXPQAG 29  
         GIEETI +ASVKKNLGRSSNPDIY PQAG  
Sbjct 325 GIEETICSASVKKNLGRSSNPDIYNPQAG 353
```

**Fig. 5 Protein database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) search of peanut (*Arachis hypogae*) 38 kDa, 23 kDa fragment**



**Fig. 6 SDS-PAGE of peanut allergen (*Ara h3*)**

**Table. 3. N-terminal sequences of *Ara h3***

Descriptions	Mw of polypeptide (kDa)	N-terminal Sequence	Alignment (amino acid residue)
	45	VTFRQ	1-5
	42	<u>VTFRQ</u>	1-6
<i>Ara h 3</i>	28	EEDQ	311-314
	25	<u>GIEETI</u>	326-331
	16	REFS	217-220
	14	ISFRQ	1-5

*Koppelman SJ et al., Allergy 58(00):1144, 2003*

Peanut	GIEETICTASVKK	NLGRSSN	PDIYNPQAGS	LRSVNELDLPILGWLGLSAQHGTIYR
	GI ETICT	N G S	PDIYNPQAGS	LD P L L LSAQ G
Soybean	GIDETICTMRLRQ	NIGQNSS	PDIYNPQAGS	ITTATSLDFPALWLLKLSAQYGLRK

Peanut	NAMFVPHYTLNA	HTI	VVAL	NGRAHVQVVDSNGNRVYDEELQEG
	NAMFVPHYTLNA	I	AI	NGRA VQVV NG RV D ELQEG
Soybean	NAMFVPHYTLNANS	I	IYAI	NGRALVQVVNCNGERVFDGELQEG

**Fig. 7. Amino acid sequence alignment of peanut (*Arachis hypogae*) 23 kDa fragment N-terminal & soybean (*Glycine max*) (box; predicted epitopes)**

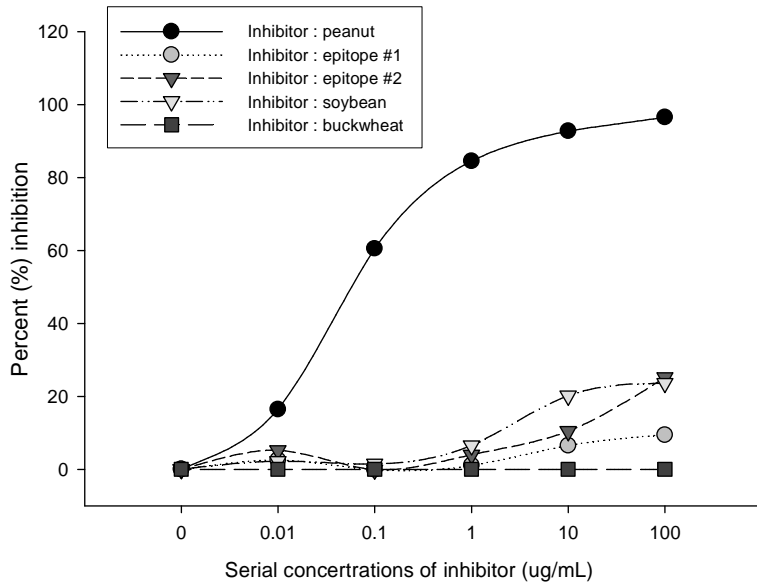
**Table. 4. Amino acid sequences of the synthesized peptides**

---

Epitope No.	Amino acid sequence
#1	Asn-Leu-Gly-Arg-Ser-Ser-Asn-Pro-Asp-Ile-Try-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ser (NLGRSSNPDIYNPQAGS)
#2	Asn-Ala-Met-Phe-Val-Pro-His-Try-Leu-Asn-Ala-His-Thr-Ile-Val-Val-Leu (NAMFVPHYTLNAHTIVVAL)

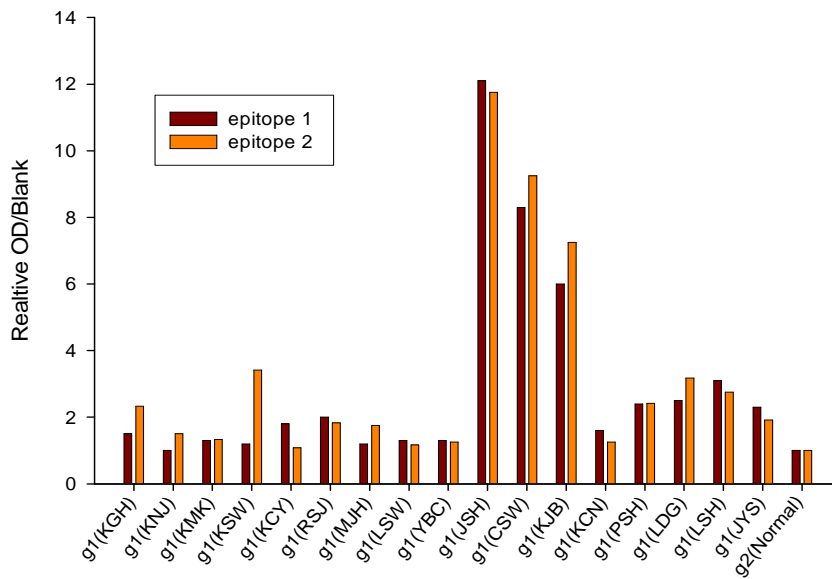
---





**Fig. 8. IgE Inhibition ELISA to epitope #1, 2 with peanut sensitive patients.**

The results were expressed as percent (%) inhibition.



**Fig. 9. IgE ELISA results to epitope #1, 2 with peanut and soybean sensitive patients.**  
 (g1: peanut and soybean sensitive patients, g2: normal patients).

## IV. 고 찰

식품알레르기를 포함한 알레르기질환에서 원인이 되는 항원들 사이에 공통항원이 존재하여 교차반응을 일으킨다는 것은 널리 알려진 사실이다. 이러한 교차반응은 항원에 접촉한 과거력이 없어도 *in vitro*에서 양성 반응을 나타내거나 임상증상을 나타낼 수 있어 알레르기 검사결과의 판독과 회피요법을 포함한 치료에 주의가 요망된다<sup>2, 7</sup>. 교차반응은 대개 같은 과(family) 사이에서 존재하는 경우가 대부분으로 같은 콩과 식물인 땅콩과 대두에서 일어나는 경우가 많이 보고되고 있다<sup>8</sup>. 땅콩과 대두는 식품알레르기의 가장 흔한 원인 중 하나이며 식물성 단백질의 주된 공급원으로 널리 쓰이는 공통점을 지니지만 식품알레르기의 임상 양상은 대체로 뚜렷한 차이를 보인다고 알려져 있다. 땅콩 알레르기는 연장아나 성인에서 주로 문제가 되며 매우 심한 임상양상을 나타내며 최근 구미에서는 그 발생빈도가 증가추세에 있다. 땅콩 알레르기로 유발되는 증상으로는 다른 식품 알레르기와 마찬가지로 피부증상, 호흡기증상, 위장관 증상으로 주로 나타나는데 특히 소아보다 천식이 있는 성인에서 아나필락시스 등의 심한 증상이 더 자주 나타난다. 땅콩 알레르기의 유병률은 영국의 경우 birth cohort study에서 4세 미만 소아의 약 1%정도로 보고되고 있다<sup>9</sup>. 땅콩 알레르기로 내원한 경우 대개 소아보다 성인에서 호흡곤란, 혈관부종, 인두압박감등의 심한 증상이 더 흔하게 발생한다고 하며 자연경과 상 대개 소실되지 않는다<sup>26</sup>. 반면, 대두알레르기는 상대적으로 임상 증상이 심하지 않으며 유병률도 낮다고 알려져 있다<sup>2, 10</sup>. 한국인의 경우는 다양한 알레르기 증상으로 내원한 10세 이상 환자 1425명을 대상으로 한 다기관 공동연구에서 대두는 알레르기 증상을 일으킨 가장 흔

한 원인이 되는 10가지 식품중 하나에 속하며 1.8%의 감작률을 보였다. 대두는 비교적 이른 나이에 접하게 되는 식물 단백질로, 주로 우유 알레르기가 있는 영아에서 대체식품의 형태로 체내에 일찍 감작된다<sup>10, 11</sup>. 특히 한국인에게 있어서는 일상 식단에서 빠질 수 없는 두부, 간장, 된장 등의 주된 원료이며 최근엔 다양한 형태로 각종식품의 첨가물 혹은 단백질 공급원으로 널리 사용되고 있다. 대두 알레르기의 임상양상은 그 범위가 넓어 영아시기의 위장관염부터 피부, 호흡기 등 여러 장기의 IgE매개형 반응까지 다양하게 나타나지만 땅콩알레르기와는 달리 아나필락시스 등의 심한 치명적인 증상은 보고된 바가 드물다<sup>24</sup>. 대부분의 식품알레르기는 일정기간이 지나면 임상양상이 호전되는 것이 보통으로 대두 알레르기의 경우 영유아시기에 일시적인 알레르기 증상을 주로 일으키다 3세 이후에 소실되는 경향이 있으나 땅콩, 견과류 등의 일부 식품의 경우에는 관해가 드물어 성인까지 지속되는 경우가 대부분이다<sup>1, 9, 10</sup>. 이러한 차이로 인해 주로 증상이 심하고 나이가 들어서도 관해가 잘 되지 않는 땅콩 알레르기에 비해 대두 알레르기는 과소평가되어 온 바가 크다. 그러나 땅콩과 대두는 이 같은 차이에도 불구하고 단백질 특이 IgE가 검사 상 정도의 차이는 있지만 동시에 증가되어 있는 경우가 많다<sup>11</sup>. Barnett 등<sup>13</sup>은 땅콩 알레르기가 있는 혈청을 이용한 RAST와 RAST inhibition test에서 대두를 포함한 다른 콩과 식물단백에도 광범위한 IgE 항체 결합을 보였다고 한다. 본 연구에서도 땅콩 알레르기 환자의 혈청에서 대두항원을 억제제로 사용하여 IgE ELISA inhibition test를 시행한 결과 20.0%가 억제되어 두 항원간의 교차반응이 어느 정도 있음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 실험실 결과와는 달리 실제 땅콩과 대두에 공통으로 반응하여 증상을 일으키는 경우는 굉장히 적어 땅콩알레르기가 있는 환자에

서 다른 콩과식물의 섭취를 회피하는 제한식이에는 논란이 있었다<sup>13, 14</sup>.

Bernhisel-Broadbent<sup>15</sup>의 연구에서도 피부반응검사에서 콩과식물에 1가지 이상 양성을 보인 69명의 심한 아토피피부염 환아를 대상으로 개방유발시험 혹은 이중맹검유발시험을 시행한 결과 땅콩알레르기 환아의 6.5%만이 대두단백에 약한 반응을 보였다. 반대로 8명의 대두 알레르기 환아들은 대체로 땅콩에 임상적인 반응을 나타내지 않아 콩과식물에 알레르기가 있다고 해서 다른 모든 콩과식물의 섭취제한은 바람직하지 않다고 하였다. 그러나 최근 스웨덴에서는 심한 땅콩 알레르기가 있는 여아에서 2.2%농도의 대두단백이 함유된 햄버거를 먹고 천식발작으로 사망한 사건이 있었다<sup>6</sup>. 이 여아는 과거력 상 대두 단백질에 노출 시 알레르기 반응을 경험한 적이 없는 환아였고, 땅콩 알레르기 환자에서 대두 아나필락시스로 사망에 이르게 된 매우 드문 경우였다. 이를 계기로 스웨덴에서는 1993년부터 3년간 식품알레르기로 인한 심각한 반응을 보인 경우를 조사하였는데 증례 61개 중 45례가 땅콩, 대두, 견과류로 인한 반응이었으며 이중 4례가 사망을 포함한 치명적인 경우였다고 보고하였다<sup>6</sup>. 이 보고에 따르면 땅콩, 대두, 견과류에 심한 반응을 보인 환자에서 IgE 항체 수치와 피부반응 검사를 시행할 수 있었는데 이들 모두 땅콩에 고농도의 IgE 항체가와 대두에 중등도의 IgE 항체를 가진 것으로 나타났다. 이에 본 연구에서는 본원에 내원한 10세 이하 소아에서 immunoCAP 검사 상 땅콩과 대두의 기준치가 0.3 kU<sub>A</sub>/L이상인 환자 17명의 혈청으로 두 항원간의 교차반응을 확인하고 공통된 epitope을 규명하고자 하였다.

땅콩은 약 30여 가지의 단백을 가지며 이 중 주요 단백질으로는 *Ara h* 1(vicillin family of seed storage protein, 63.5 kDa), *Ara h* 2(conglutin

family of seed storage protein, 17.5 kDa), 그리고 *Ara h 3*(glycinin family of seed storage protein, 60 kDa)이 알려져 있다<sup>13, 15</sup>. 이들 세 가지 주요 알레르겐은 대체로 땅콩에 과민반응을 보이는 환자혈청의 약 45~90%에서 IgE 결합을 보인다고 알려져 있다. 이 중 *Ara h 1*은 아토피피부염과 식품 알레르기를 가진 소아에서 주요 땅콩 단백질항원으로 여겨지는데, *Ara h 3*나 대두의 Gly G1에 비해 고농도의 IgE epitope이 존재하여 땅콩알레르기의 심한 증상을 일으키는 원인이 되는 주요항원으로 추측 된다<sup>18, 31</sup>. *Ara h 2*는 trypsin inhibitor와 동질성을 지니며 같은 기능을 한다고 알려져 있으며 특히 고온의 기름으로 가열하거나 굽는 경우 trypsin inhibitor activity가 3~6 배 증가하여 조리 방식에 따른 땅콩의 알레르기 특성 변화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. *Ara h 3*은 glycinin storage protein family로 대두 glycinin과 동질성을 지닌다<sup>13</sup>. 대두단백은 땅콩과 달리 주요 알레르겐이 그리 특징적이지 않은데, 대두의 glycinin은 다른 여러 콩과류 식물 씨의 저장 단백질의 주된 구성원으로 30~36 kDa의 acidic subunit과 20 kDa의 basic subunit으로 구성되어 있으며 이 중 acidic subunit이 주된 IgE 결합부위라고 알려져 있다<sup>11, 19, 20</sup>. 대두단백은 원심분리기의 침강계수에 따라 2S, 7S, 11S 분획으로 구분되며 이 중 11S는 저장단백질인 glycinin으로 대부분 구성되어 있으며 그 중 G1의 epitope이 최근 땅콩의 *Ara h 3*의 IgE epitope과 유사한 것으로 알려져 있다<sup>7</sup>. 따라서 동식물 분류상 같은 과 사이에 존재하는 경우가 대부분으로 알려져 있어 알레르기를 일으키는 원인 항원들 간의 교차반응을 찾아서 공통된 IgE epitope을 밝혀내는 연구가 최근 활발하다.

Herian등<sup>25</sup>의 연구에서 땅콩과 대두에 알레르기가 있는 성인의 혈청으로 immunoblot을 시행한 결과 50~60 kDa부위에 여러 개의 단백질편이 나타났

으나 대두알레르기만 있는 환자의 혈청에서는 20 kDa부위에 유일하게 강한 IgE결합을 보였다고 보고하였다. Eigenmann등<sup>4</sup>은 대두단백으로 미리 억제 한 땅콩 알레르기환자의 혈청을 땅콩단백으로 immunoblot을 시행한 결과 땅콩 특이 IgE항체가 7개의 단백질편(46, 29, 25, 19, 17, 14, 5 kDa)으로 나타났고 땅콩단백으로 미리 억제한 대두알레르기환자의 혈청을 대두항원으로 immunoblot을 시행한 결과 대두 특이 IgE가 46 kDa과 21 kDa으로 규명되었다. 즉, cross-reacting 항체를 흡착시킨 후 땅콩에 결합한 IgE항체가 73%로 감소된 결과로 보아 땅콩과 대두항원 간에 광범위한 교차반응이 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 대두항원의 IgE ELISA inhibition test시 땅콩 단백질 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 억제한 경우에는 91%가 억제되는 반면 동량의 대두단백으로는 15%만이 억제되어 inhibition ELISA 실험 결과만으로는 다소의 교차반응이 의심되었다. 위의 실험에서 땅콩 단백질과 대두 단백질의 교차 반응하는 단백을 동정하기 위해 IgE immunoblot 실험을 시행하여 땅콩 알레르기 환자 혈청을 이용한 땅콩 단백질의 IgE immunoblot과 미리 대두 단백질에 의해서 억제된 땅콩 알레르기 환자 혈청을 이용한 땅콩 단백질의 IgE immunoblot의 image 비교에서 땅콩 알레르기환자의 혈청에서 관찰되던 여러 개의 항원 띠가 대두항원에 의해 억제된 땅콩 환자의 혈청에서는 소실되어 사라진 것으로 관찰되어 두 항원사이에 다소간의 교차반응이 있음을 확인할 수 있었다. 그 중 두드러지게 대두항원에 의해 억제되어 사라진 땅콩 단백질의 IgE immunoblot 중 분자량 38 kDa와 23 kDa의 항원에 해당하는 단백질 절편을 아미노산 염기서열 분석을 통해 검색한 결과 땅콩의 주요 알레르겐인 *Ara h* 3의 절편인 것으로 확인되었다. 본 연구에서 아미노산 염기 서열 분석을 통해 동정된 38 kDa과 23 kDa의 땅콩 단백질 절편 중 아직 보고되지 않은 23

kDa 부위의 땅콩 단백질 절편 내에 존재할 수 있는 공통 IgE binding epitope을 예상하고 대두 단백질과의 아미노산 염기서열비교 분석을 통하여 그 homology가 67% 이상 높은 2개의 부위를 IgE binding epitope로 제작하였다(epitope #1, #2). 제작된 2개의 epitope이 실제 땅콩 알레르기 환자의 혈청과 반응 정도를 보기 위해 이를 억제제로 사용한 IgE inhibition ELISA를 시행한 결과, 억제제 100  $\mu$ g을 사용한 경우, epitope #1에서는 25.15%, epitope #2에서는 9.45%가 억제되었다. 즉, epitope #1과 #2를 억제제로 사용한 IgE ELISA inhibition test에서 epitope #1은 대두를 억제제로 사용한 IgE ELISA inhibition test에서와 비슷한 정도의 억제반응을 보였지만 epitope #2의 경우 억제 정도는 미미하였다. 따라서 억제 반응 시험에서 낮은 정도의 교차반응이 일어난 epitope에 대해서 실제로 반응이 일어나는지를 알아보기 위하여 환자 개별혈청을 이용한 epitope direct IgE ELISA를 시행하였다. 그 결과 음성대조군에 비해 2배 이상의 반응을 보인 경우가 epitope #1의 경우는 17명의 환자들 중 7명이, epitope #2의 경우는 17명의 환자들 중 8명의 환자가 정상군에 비해 2배 이상의 반응정도를 보여 개별혈청에 대한 IgE ELISA에서는 예상된 epitope에 비교적 높은 반응을 보였다. 이는 환자 개개인이 가지는 항원의 epitope에 대한 반응 부위가 다르기 때문에 이런 결과를 보일 것이라 추측할 수 있고 특히 정상군에 비해 6배 이상의 높은 반응정도를 보인 JSH (f13 :25.1 / f14 : >97.9), CSW (f13 : 11.2 / f14 : >100), KJB (f13 : >100 / f14 : 8.43)등의 경우 땅콩과 대두에 대한 CAP-RAST 수치가 다른 환자들에 비해 비교적 높은 환자들이었다 (Fig. 9). 이와같은 결과에서 대두 glycinin단백과 교차 반응을 일으키는 땅콩 *Ara h 3*의 23 kDa부위의 IgE binding epitope #1과 epitope #2를 예상할



수 있었고 이를 억제제로 한 땅콩 알레르기 환자의 pooled sera의 IgE inhibition ELISA에서는 epitope #2가 억제반응이 거의 나타나지 않았지만 개별 환자 혈청과의 direct ELISA에서는 epitope #2와 IgE 결합이 47%(8/17)에서 음성 대조군에 비해 2배 이상의 반응을 보였다. 즉, 이전 연구에서 알려진 바와 같이<sup>7</sup> 대두의 glycinin과 공통으로 IgE와 반응한다고 알려진 땅콩단백이 주로 *Ara h* 3의 분획임을 다시 확인할 수 있었고 특히 외국의 연구에서 알려지지 않은 23 kDa부위의 epitope이 땅콩과 대두에 대한 IgE 수치가 높은 일부 소아에서 두 항원간의 공통된 IgE binding epitope임을 예상할 수 있었다. 그러나 아직은 실험 대상 환자의 숫자가 적고 땅콩 알레르기가 연장아나 성인에서 많음을 감안하여 좀 더 넓은 연령층을 대상으로 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

결론적으로 본 연구를 통하여 연구자는 외국의 사례와 유사하게 우리나라 소아에서도 땅콩과 대두의 공통 알레르겐인 땅콩의 *Ara h 3*와 대두의 단백질의 glycinin을 동정할 수 있었으며, 또한 아직까지는 외국뿐만 아니라 국내에서 보고되어 있지 않은 땅콩의 주요 알레르겐인 *Ara h 3*와 대두의 glycinin에 내재되어 있을 수 있는 새로운 공통 IgE binding epitope를 예상할 수 있었다. 하지만 많은 수의 땅콩 및 대두에 IgE의 수치가 높은 환자들을 대상으로 추가적인 실험이 필요하다.

## 참고문헌

1. 김세훈, 강혜련, 김경목, 김태범, 김선신, 장윤석, 김철우, 반준우, 김윤근, 조상현, 박해심, 이종명, 민경엽, 홍천수, 김능수, 김유영 : 알레르기 증상으로 내원한 한국인에서의 음식물 알레르겐에 대한 감작율 조사: 다기관 공동연구. *천식 및 알레르기 학회지* 23(3):502-515, 2003
2. Sampson HA : Food Allergy *JAMA* 278:1888-1894, 1997
3. Kajossari M : Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. *Acta Paediatr Scand* 71:815-819, 1982
4. Sicherer SH, Sampson HA, Burks AW: Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma. *Allergy* 55(6):515-21, 2000
5. Eigenmann PA, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA: Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 98:969-78, 1996
6. Foucard T, Malmheden Yman I: A study on severe food reactions in Sweden - is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis?. *Allergy* 54(3):261-5, 1999
7. Beardslee TA, Zeece MG, Sarath G, Markwell JP: Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int Arch Allergy Immunol* 123(4):299-307, 2000
8. Xiang P, Beardslee TA, Zeece MG, Markwell J, Sarath G: Identification

and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. *Arch Biochem Biophys* 408:51-7, 2002

9. Pons L, Ponnappan U, Hall RA, Simpson P, Cockrell G, West CM, Sampson HA, Helm RM, Burks AW: Soy immunotherapy for peanut-allergic mice: Modulation of the peanut-allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 114(4):915-21 2004
10. Park CW, Kim GI, Lee CH: A comparison study on allergen components between Korean (*Arachis fastigiata* Shinpung) and American peanut (*Arachis hypogaea* Runner). *J Korean Med Sci* 15(4):387-92, 2000
11. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA: Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest* 103(4):535-42, 1999
12. Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J: Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol*. 12(1):59-64, 2001
13. Barnett D, Bonham B, Howden ME: Allergenic cross-reactions among legume foods - an *in vitro* study. *J Allergy Clin Immunol* 79:433-438, 1987
14. De Leon MP, Glaspole IN, Drew AC, Rolland JM, O'hehir RE, Suphioqlu C : Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clin Exp Allergy* 33(9):1273-80, 2000

15. Bernhisel-Broadbent J, Tayer S, Sampson HA : Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 83:435-440, 1989
16. Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Martin EM : Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol* 6:39-43, 1995
17. Bannon GA, Cockrell G, Connaughton C, West CM, Helm R, Stanley JS, King N, Rabjohn P, Sampson HA, Burks AW : Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 124(1-3):70-2, 2001
18. Sampson HA, Mendelson LM, Losen JP : Fatal and near -fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 327:380-384, 1992
19. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA : Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h3. *J Clin Invest* 103:535-542, 1999
20. Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu YL, Hirano H, Nishikawa K : Identification of the soybean allergenic protein, Gly mBd 30k, with the soybean seed 34kDa oil-body associated protein. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1030-1033, 1993
21. Boch SA, Atkins FM, Sampson HA : Allergenic cross-reactivity among legume foods. *J Allergy Clin Immunol* 82:310-312. 1988

22. Burks AW, Brollks JR, Sampson HA : Allergenicity of major component proteins of soybean determined by ELISA and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol* 81:1135-1142, 1988
23. Rabjohn P, West CM, Connaughton C, Sampson HA, Helm RM, Burks AW, Bannon GA : Modification of peanut allergen Ara h 3: effects on IgE binding and T cell stimulation. *Int Arch Allergy Immunol* 128(1):15-23, 2002
24. Magnolfi CF, Zani G, Lacava L, Patria MF, Badare M : Soy allergy in atopic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77:197-201, 1996
25. Herian AM, Taylor SL, Bush RK : Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92:193-198, 1990
26. Barnett D, Baldo BA, Howden MEH : Multiplicity of allergens in peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 72:61-68, 1983
27. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Crockrell G, Helm RM : Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 90:962-969, 1992
28. Hourihane JO, Kilburn SA, Daen P, Warner JO : Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin Exp Allergy* 27:634-639, 1997

29. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brein T : Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol* 88:172-179, 1991
30. Shin DS, Compadre CM, Maleki SJ, Kopper RA, Sampson H, Huang SK, Burks AW, Bannon GA : Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h 1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem* 273:13753-13759, 1998
31. Koppelman SJ, Knol EF, Vlooswijk RA, Wensing M, Knulst AC, Hefle SL, Gruppen H, Piersma S : Peanut allergen Ara h 3 : isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* 58(11):1144-1151, 2003
32. Beardslee TA, Zeece MG, Sarath G, Markwell JP : Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int Arch Allergy Immunol* 123:299-307, 2000

-ABSTRACT-

## Identification and Analysis of Peanut and Soybean Cross Reacting Allergens in Korean Children Sensitive to Peanut

Gye-Ree Jeon

Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor, Soo-Young Lee)

**Background:** Peanut and soybean are among the most prevalent allergens of food hypersensitivity. They both belong to legume family and share high similarity in many parts of their seed storage proteins.

the clinical manifestations of allergy to peanut and soybean are generally quiet distinct. And also, there are many cases of allergic patients with high level of soybean-IgE without clinical soybean allergy, especially in patients with high level of peanut-IgE.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the IgE binding proteins in both species, with a goal of identifying homologous epitopes of peanut and soybean protein that can potentially elicit serious allergic



reactions.

**Methods:** Sera were obtained from 17 patients with high levels of peanuts and soybean specific IgE antibodies by ImmunoCAP(Pharmacia Diagnostics). Unabsorbed sera and sera adsorbed to remove cross-reacting antibodies were assayed for specific IgE binding to peanut or soybean immunoblots. SDS-PAGE and peanut-IgE immunoblotting with soybean-inhibited peanut allergy patient sera and non inhibited patient sera were performed. The spot membrane containing the peptides was analysed by Procise 492 cLC Protein sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA). Peptide synthesis of predicted Peanut-Soy common IgE binding epitopes were performed and then predicted epitope IgE ELISA to peanut hypersensitive patient's sera were performed.

**Results:** IgE inhibition ELISA test using peanut sensitized sera showed significant inhibitions by soybean protein at 800ug concentration. Using the ELISA inhibition test, there are some degree(25.15%) of cross reactivity between epitope #1 and soybean antigens was noted. The results of IgE inhibition immunoblot with peanut hypersensitive patients' sera inhibited to soybean glycinin disappeared several protein bands, especially two bands was prominent(38 kDa, 23 kDa). A search for sequence homology to the protein spots revealed that significant homology to peanut *Ara h 3*.

**Conclusion:** This study has identified a common IgE-binding epitope site present with the peanut *Ara h 3*(38 kDa, 23 kDa) and soybean glycinin

proteins. This site could contribute to the cross-reactions observed in sera between peanut- and soybean-sensitive individuals.

**Key words** : Peanut allergy, Soybean allergy, Cross reacting allergen, IgE binding epitope