

令和元年6月25日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21496

研究課題名（和文）新規果物アレルゲンGRPの特性を明らかにする

研究課題名（英文）Characterization of a novel fruit allergen GRP

研究代表者

岡崎 史子 (okazaki, fumiko)

龍谷大学・農学部・講師

研究者番号：10756745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規果物アレルゲンであるGibberellin Regulated Protein (GRP) を従来から重篤なアレルギーを引き起こすことが知られていたLipid Transfer Protein (LTP) と比較しながら解析することで、GRPの特性を明らかにした。特に、LTPが皮に局在している一方でGRPが果肉にも多いという結果は、アレルギー患者の食生活に直接かかわる重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人モモアレルギーの重症マーカーであるGRPのリコンビナント抗原を作製して免疫学的に評価した結果は、今後の臨床検査法開発の基礎的データとなる。また、サンドイッチELISAを作製し、定量したことで明らかになったモモやモモ加工品中のGRP含有量は、食物アレルギー患者の食生活に直接的に活用できる。さらには現在、卵、乳、小麦アレルギーの治療として普及しつつある経口免疫寛容を果物で行うにあたっての有益な情報となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we characterized the novel fruit allergen Gibberellin Regulated Protein (GRP) by analyzing GRP in comparison with Lipid Transfer Protein (LTP), which was conventionally known to cause severe allergic symptoms.

研究分野：食生活学

キーワード：食物アレルギー 果物アレルギー アレルゲンコンポーネント GRP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、卵、牛乳といった原因食品名で表現されてきたが、実際にアレルギーを誘発するのは食品中のタンパク質である。近年では、アレルゲンをタンパク質レベルで解析する「アレルゲンコンポーネント」という概念が広まり、いくつものアレルゲンタンパク質が同定されている。また、果物アレルギーは、子どもに多い卵や牛乳のアレルギーと異なり、成長してから発症し、さらには対象となる果物が増えていくという特徴を持っている。我々は代表的な果物アレルゲンである Lipid Transfer Protein (LTP) の研究過程で、新規アレルゲン Gibberellin Regulated Protein (GRP) を発見した。両者は共に塩基性の低分子量タンパク質であるため分離が難しく、これまでの解析では LTP に GRP が隠れてしまっていた。

2. 研究の目的

本研究では、LTP と比較しながら GRP をタンパク質レベルで解析し、GRP により引き起こされる臨床症状を明らかにし、さらには患者の食習慣も考慮して検討することで、GRP をアレルゲンコンポーネントの1つとして確立し、食物アレルギーの予防や検査・治療につながる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

抗体カラムを用いた抗原の大量調製

種を除いた白桃にプロテアーゼ阻害剤等を含む溶媒を加えてミキサーにかけ、粉碎抽出を行った。その後、遠心分離した上清画分にカルボキシメチル樹脂を加え 4 で一晚攪拌吸着させた。樹脂をカラムに詰め、洗浄した後に 0.5 mol/L NaCl/20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 5 により吸着画分を溶出させた (CM 抽出画分)。既得の抗 GRP mAb をリガンド固定化用カップリングカラムに結合させたイムノアフィニティーカラムを作製し、モモ CM 吸着画分よりモモ GRP を純化した。

リコンビナント GRP・LTP の作製

モモの果実から抽出した total RNA を逆転写し cDNA を作製した。その cDNA から、PCR で GRP・LTP のクローニングを行った。大腸菌発現系で使用するベクターには、pGEX-6p-2 vector を選択し、目的タンパク質を GST 融合タンパク質として発現させ、Glutathion Sepharose で精製後、PreScission Protease で GST を切り離した。*P.pastoris* の発現系で使用するベクターには pPIC9K を選択し、分泌タンパク質として培地中に発現させ、カルボキシメチル樹脂で濃縮した。

抗原の免疫学的評価

96 穴マイクロプレートに各抗原を固相化し、一次抗体として患者血清、二次抗体として酵素標識抗ヒト IgE を反応させた。基質を発色させることで、患者血清中 IgE の各抗原に対する反応性を評価した。

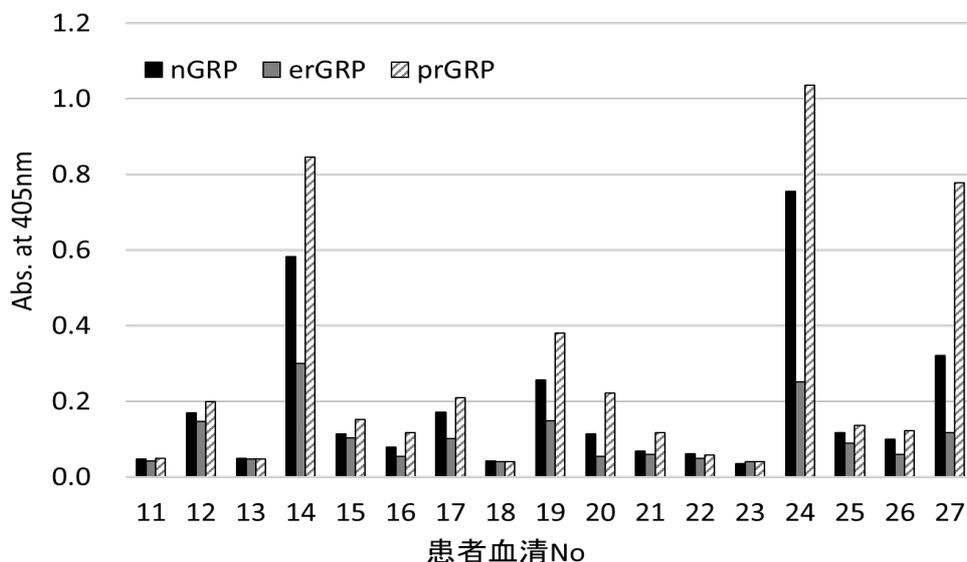
桃 GRP・LTP の定量

既得の抗モモ GRP mAb 14 種類と抗モモ LTP mAb 8 種類を用いて、サンドイッチ ELISA の組み合わせを検討し、最も感度がよいものを定量に用いた。まず、96 穴マイクロプレートに固相抗原を固相化し、ブロッキングしたのちにサンプルを反応させる。続いて、酵素標識した抗体を反応させ、基質を発色させることでサンプル中の GRP、LTP の濃度を定量する。

4. 研究成果

リコンビナント GRP・LTP の作製と免疫学的評価

コンポーネント検査に使われる抗原の多くはリコンビナントである。実際の食物からコンタミネーションのない抗原を調製することは手間が多く難しいうえ、自然界のもの由来となるとロット差も大きくなるため、世界中に均質な抗原を安定供給するためにはリコンビナントの方が適している。モモ GRP は 63 アミノ酸中に 12 個もシステインがあり、6 対のジスルフィド結合 (S-S 結合) が立体構造に大きく影響している。リコンビナント抗原作製時の第一選択である *E.coli* の系では、正しい S-S 結合をもった抗原の作製が難しいため、酵母のタンパク質発現系として汎用されている *P.pastris* を用いて GRP を分泌させることで、正しい立体構造を持った GRP の作製を目指した。*E.coli* と *P.pastris* で作製した GRP (erGRP、prGRP) と、モモから純化した GRP (nGRP) で患者血清中 IgE の反応性を比較したところ、やはり、*P.pastris* で作製したもの (prGRP) の方が、モモから純化したものと近い反応性を示した。



リコンビナントGRPに対するモモGRP陽性患者血清中IgEの反応性

桃 GRP・LTP の定量

作製したモモ GRP、LTP に対するサンドイッチ ELISA を用いて様々なモモ使用加工食品を定量した結果は表のとおりである。LTP は植物の表層で働く生体防御タンパク質と知られている通り、皮に局在しているが、GRP は果肉にも多いことが明らかになった。日本人のモモアレルギー患者において LTP 陽性例は極めて少ないが、GRP のアレルギー登録後もヨーロッパからの LTP に関する報告は多く、LTP が重症マーカーであることも事実である。日本人は、モモなどの果物を食べる時に皮をむくことが多いが、欧米では皮ごと食べることが多いため、この食習慣の違いが感作コンポーネントの違いにつながっていると推察される。さまざまな品種のモモを測定したところ、品種差や個体差が大きかった。皮膚テストや、経口負荷試験などを実施する際には、果実中の含有量も考慮する必要がある。また、GRP、LTP ともに加工食品中にも残存しておりこれらがアレルギーとなっている場合は注意が必要である。さらには、LTP は葉にも多く存在することが明らかになり、モモの葉エキス含有化粧水からも、非常に薄い濃度ではあるが LTP が検出された。日本人の LTP の感作率は非常に低い、食品を使用した化粧品が普及している昨今において、注意する必要があると考える。

	Pru p 3 (ng/ml・g)	Pru p 7 (ng/ml・g)
皮	40500	3400
果肉	600	23400
果汁1%飲料	45	15
果汁30%飲料	2900	4700
缶詰(シロップ)	1600	2200
缶詰(果肉)	2500	8400
葉	211000	3900
モモ葉エキス含有化粧水1	1.55	-
モモ葉エキス含有化粧水2	2.58	-
モモ葉エキス含有化粧水3	2.19	-
モモ葉エキス含有化粧水4	0.11	-
モモ葉エキス含有化粧水5	-	-
モモ葉エキス含有化粧水6	-	-
モモ葉エキス	0.3	0.08
乾燥モモ葉煎じ液	357	-

交差反応性の解析 - GRP アレルギー患者が注意すべき食品の探索 -

既得のモノクローナル抗体の交差反応性から、モモと同じバラ科果物であるリンゴ、スモモ、ウメだけでなく、オレンジなどの種の離れた果物にも GRP が存在することが明らかになった。今後、それぞれの果物に含まれる GRP の量やアレルギー性を明らかにしていきたい。また、本研究では GRP、LTP の低アレルギー化方法を確立することができなかったため、引き続き研究を重ねることで、GRP が重篤なアレルギー症状を引き起こす原因を解明しつつ、患者さんの QOL の向上に貢献したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yamanaka M, Kato A, Moriyama T, Okazaki F, Momma K, Narita H : Food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to pickled Japanese apricot. : Allergol Int. 2019 Mar 28. pii: S1323-8930(19)30031-0. (査読有)
doi: 10.1016/j.alit.2019.02.009.

Mori Y, Okazaki F, Inuo C, Yamaguchi Y, Masuda S, Sugiura S, Fukuie T, Nagao M, Tsuge I, Yosikawa T, Yagami A, Matsunaga K, Fujisawa T, Ito K, Narita H, Kondo Y; Fruits Allergy Component Study Group, Japan. : Evaluation of serum IgE in peach-allergic patients with systemic reaction by using recombinant Pru p 7 (gibberellin-regulated protein). : Allergol Immunopathol (Madr). : 2018 Sep - Oct;46(5):482-490. (査読有)
doi: 10.1016/j.aller.2018.02.007. Epub 2018 May 18.

岡崎史子、成田宏史、食物アレルギーの新展開 - コンポーネント解析から二重暴露仮説へ -、化学と生物 (査読なし)、54(6) 377-378 2016年6月

〔学会発表〕(計 2 件)

成田宏史、河合菜月、岡崎史子、谷内昇一郎、西野昌光、笹井みさ、犬尾千聡、森雄司、近藤康人、トマトアレルギーのコンポーネント解析 GRP は重症マーカーか?、第 67 回日本アレルギー学会学術大会、2018 年

岡崎史子、日浦奈美、山口友貴絵、成田宏史、モノクローナル抗体を用いた免疫学的評価系による桃アレルギー Pru p 3 と Pru p 7 の比較解析、第 71 回日本栄養・食糧学会大会 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

食物アレルギーのすべて(担当:共著, 範囲:食物アレルギー(果物・野菜))、岡崎史子、成田宏史、診断と治療社、2016 年 10 月

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。