

令和 2 年 5 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01972

研究課題名(和文)花粉関連食物アレルギー症候群における新規アレルゲンの交差構造の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cross-reactive structure of novel allergens in pollen-food allergy syndrome

研究代表者

丸山 伸之 (Maruyama, Nobuyuki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90303908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：「花粉関連食物アレルギー症候群」は、花粉アレルゲンと食物アレルゲンと交差反応によってアレルギー症状を発症する疾患である。本研究では、gibberellin-regulated proteinに着目して「花粉関連食物アレルギー症候群」に関わる抗原の解析を行った。果物アレルギーの患者中に gibberellin-regulated proteinに感作されている患者群が存在することを報告した。さらに、その患者群において臨床的にヒノキ科花粉に対するアレルギーとの関連が見られるとともに、ヒノキ科花粉と果物との間に gibberellin-regulated proteinによる交差反応が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、「花粉関連食物アレルギー症候群」の症状を引き起こす新規な食物アレルゲンを gibberellin-regulated proteinに着目して解析するとともに、その根本の原因となる花粉アレルゲンを同定し、それらのアレルゲンの交差反応を起こす構造領域を解明する。特に、スギやヒノキなどのヒノキ科の花粉に着目して解析を行うことにより、国民病と呼ばれる花粉症と食物アレルギーとの関係を示唆する結果を得たことから、社会的にインパクトのある研究成果と考えられるとともに、新たな視点からの食品素材の低アレルゲン化等への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：“Pollen-food allergy syndrome” is a disease that develops allergic symptoms due to cross-reactivity between pollen and food allergens. In this study, we analyzed gibberellin-regulated protein as the allergens involved in “pollen-food allergy syndrome”. We reported that there was a group of patients sensitized to gibberellin-regulated protein among the patients with fruit allergy. In addition, the patients in the group was clinically associated with cypress pollen allergy. Analysis of specific IgE antibodies in patients sera showed cross-reactivity between cypress pollen and fruits.

研究分野：アレルゲン分子学

キーワード：花粉 食物 アレルゲン 果物 交差反応 タンパク質構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「花粉関連食物アレルギー症候群」は、様々な花粉に対してアレルギー症状を起こす人々が、本疾患の根本の原因となる花粉アレルゲンとタンパク質の構造が類似する食物アレルゲンを摂取したときに、それらの交差反応によってアレルギー症状を発症する疾患である。特に、果物類や野菜類に対するアレルギーにおいて頻度が高い。重篤なアレルギー症状を起こすことも報告されているため、世界的に大きな問題となっている。本疾患は、成人において果物・野菜類を摂取してアレルギー症状を示すことが多く、カバノキやイネ科の雑草などの花粉が原因となることが知られている。

これまで、カバノキやイネ科の雑草などの花粉が原因となる「花粉関連食物アレルギー症候群」の原因アレルゲンとして pathogenesis-related protein、profilin などが報告されている。これらのアレルゲンは、多くの果物・野菜類アレルギーにおいて原因となることが報告されている。一方、近年、モモなどの果物アレルギーにおいて gibberellin-regulated protein が原因抗原として報告された。また、臨床症状との解析から、全身のアレルギー症状を伴う患者において、その原因として gibberellin-regulated protein の関与が示唆されている。

本研究では、「花粉関連食物アレルギー症候群」の症状を引き起こす食物アレルゲンを gibberellin-regulated protein に着目して解析するとともに、その根本の原因となる花粉アレルゲンを同定し、それらのアレルゲンの交差反応を起こす構造領域を解明する。特に、スギやヒノキなどのヒノキ科の花粉に着目して解析を行うことにより、国民病と呼ばれる花粉症と食物アレルギーとの関係を明らかにできるため、社会的にインパクトのある研究成果が得られるとともに、食品素材の低アレルゲン化等への貢献が期待される。

2. 研究の目的

花粉症に罹患している人々が、花粉症の原因抗原と類似するタンパク質を含む食物を摂取することによりアレルギー症状を発症する「花粉関連食物アレルギー症候群」が世界的に増加している。大規模な「花粉関連食物アレルギー症候群」の感作源となる花粉と食物アレルゲンの解析から、pathogenesis-related protein、profilin などのアレルゲンでは説明できない「花粉関連食物アレルギー症候群」の患者が存在している可能性が考えられた。本研究では、pathogenesis-related protein、profilin などのアレルゲンでは説明できない「花粉関連食物アレルギー症候群」の原因抗原として gibberellin-regulated protein に着目し、本疾患の根本の原因となる花粉アレルゲンと、症状を引き起こす直接の原因となる食物アレルゲンを解析する。特に、スギやヒノキなどのヒノキ科の花粉との交差について解析するとともに、それらの交差反応の原因となるアレルゲンの領域を解明することにより、食品素材の低アレルゲン化等への貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 患者血清

国立病院機構相模原病院アレルギー科において臨床的な精査を行い、果物・野菜類アレルギーの確定診断がなされた患者血清を本研究に用いた。

1) 組換えモモ gibberellin-regulated protein の調製

本研究において、「花粉関連食物アレルギー症候群」に関わる候補タンパク質として gibberellin-regulated protein に着目し、その組換えタンパク質を調製した。モモの gibberellin-regulated protein に対する遺伝子を人工合成し、酵母発現ベクター pPICZ の分泌のためのリーダー配列の下流に挿入した。ピキア酵母に形質転換後、抗生物質により選抜した。選抜後のコロニーを培地に移植して前培養を行った後スケールアップし、メタノールで誘導しながら、24-72 時間培養した。培養後の培地に対して抗 gibberellin-regulated protein 血清を用いて発現を確認した。培地を硫酸により濃縮し、中性の緩衝液により透析した。さらに、中性条件下で陰イオン交換カラムにより透析後の試料を供し、未吸着画分を回収した。回収した試料を酸性条件の緩衝液に置換したのち、陽イオン交換カラムに供し、吸着したタンパク質について食塩を含む酸性条件の緩衝液により溶出させた。溶出後の試料をゲルろ過クロマトグラフィーに供し、gibberellin-regulated protein の画分を回収し、SDS-PAGE と質量分析により純度などを確認した。

2) ヒノキ科花粉 gibberellin-regulated protein の調製

スギやヒノキなどのヒノキ科花粉を粉碎後、緩衝液を加えて抽出し、透析後、陽イオン交換カラムに供した。食塩を含む酸性の緩衝液を用いて吸着タンパク質を溶出した。溶出した試料をゲルろ過クロマトグラフィーに供し、抗 gibberellin-regulated protein 血清により検出された画分を回収した。質量分析により、精製したタンパク質の配列を同定した。

3) 組換えヒノキ科花粉 gibberellin-regulated protein の調製

ヒノキ科花粉から精製した gibberellin-regulated protein と推定されるタンパク質に対する遺伝子を人工合成し、組換えモモ gibberellin-regulated protein の調製と同様の方法でピキア酵母を用いて発現させ、培地に分泌した組換えタンパク質を各種クロマトグラフィーにより精製した。

4) 変異型モモ gibberellin-regulated protein の調製

同定したヒノキ科 gibberellin-regulated protein とモモ gibberellin-regulated protein

との共通する一次構造に着目し、その配列をグリシン残基に置換した変異型モモ gibberellin-regulated protein を設計した。変異型モモ gibberellin-regulated protein をコードする遺伝子を人工合成し、ピキア酵母による発現系を構築した。野生型と同様の方法で変異型モモ gibberellin-regulated protein を調製した。

5) gibberellin-regulated protein に対する特異的 IgE 抗体価の測定

酵素標識したヒト IgE 抗体に対するモノクローナル抗体と蛍光基質を用いた酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) により、モモ及び花粉 gibberellin-regulated protein と結合する IgE 抗体量を測定した。具体的には、マイクロプレートにアレルゲンを吸着させ、ウェル内で患者血清と反応させ、洗浄後、酵素標識した IgE 抗体に対する 2 次抗体と結合後に、基質と反応させてマイクロプレートリーダーを用いて定量した。ImmunoCAP 法により特異的 IgE 抗体価を測定した血清により標準曲線を作成し、各アレルゲンに対する ELISA 法による実測値を計算した。

4. 研究成果

モモ gibberellin-regulated protein に対する組換えタンパク質の調製を行った。大腸菌発現系、酵母発現系、昆虫細胞発現系、哺乳細胞発現系など様々な発現系を用いて、タグを付加したモモ gibberellin-regulated protein の調製を試みたが、可溶性として調製することは可能であったが、予備的に行った血清との反応性が非常に低かった。また、大腸菌発現系により調製したものをウサギに免疫して、抗モモ gibberellin-regulated protein 血清を作成した。さらに、酵母によりタグを付加しない組換えタンパク質に対する発現系の構築を行ったところ、患者血清に対する反応性が認められた。そこで、酵母発現系で調製したタグのない gibberellin-regulated protein を患者血清の解析に使用することにした。

66 名の果物アレルギーの患者血清に対し、gibberellin-regulated protein に対する特異的 IgE 抗体価を測定したところ、23 名の患者において抗体が検出された ($0.35\text{kU}_E/\text{L}$ を cut off 値)。血清に検出された患者には、スギ花粉と果物との交差反応によるアレルギー症候群が疑われる患者が多く含まれていた。

スギ及びヒノキ花粉から抗モモ gibberellin-regulated protein 血清との反応性を指標に、gibberellin-regulated protein の精製を試みた。抽出液を陽イオン交換カラムに供した後に、カラムから溶出画分に抗モモ gibberellin-regulated protein 血清に反応する、分子量 7-9kDa 程度のタンパク質が検出された。この画分をゲルろ過クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーなどにより精製を試みるとともに、抗モモ gibberellin-regulated protein 血清に反応する SDS-PAGE でのバンドを質量分析に供し、その構成タンパク質を解析した。ヒノキ科花粉からの純度が高い精製物が得られたので、特異的 IgE 抗体の測定に用いた。

ヒノキ花粉 gibberellin-regulated protein に対して、果物アレルギーの患者血清の特異的 IgE 抗体価を解析し、モモ gibberellin-regulated protein に感作されているほぼすべての患者を含む 28 名の患者において抗体が検出された ($0.35\text{kU}_E/\text{L}$ を cut off 値)。ヒノキ花粉 gibberellin-regulated protein に対する特異的 IgE 抗体価とモモ gibberellin-regulated protein に対する IgE 抗体価との相関を解析したところ 0.828 の相関係数を示した。さらに、他の花粉タンパク質が混入する可能性をなくすため、ヒノキ花粉 gibberellin-regulated protein の組換えタンパク質を酵母発現系により調製した。この組換えタンパク質を用いて、果物アレルギーの患者血清の特異的 IgE 抗体価を解析したところ、ヒノキ花粉から調製した gibberellin-regulated protein と同様の特異的 IgE 抗体価の傾向を示した。それらの相関を解析したところ、相関係数 0.946 と高い相関を示した。

ヒノキ花粉 gibberellin-regulated protein とモモ gibberellin-regulated protein の一次構造のアライメントから共通性の高い領域が見られた。その領域に存在する 5 つのアミノ酸残基をグリシン残基に置換した変異型モモ gibberellin-regulated protein を調製した。野生型モモ gibberellin-regulated protein と同様に酵母において変異型モモ gibberellin-regulated protein を培地に分泌させた。野生型と同様の発現レベルで変異型 gibberellin-regulated protein は分泌されていたことから、分泌タンパク質を含む培地より野生型と同様の条件で変異型 gibberellin-regulated protein を精製した。変異型モモ gibberellin-regulated protein を用いて果物アレルギーの患者血清の特異的 IgE 抗体価を解析したところ、ほとんどの患者血清で特異的 IgE 抗体は検出されなかった。このことは、5 つのアミノ酸残基の置換により、モモ gibberellin-regulated protein の抗原性が失われた可能性を示唆している。

本研究において、変異型モモ gibberellin-regulated protein の置換したアミノ酸残基はジスルフィド結合を形成していると領域に存在しているとともに、gibberellin-regulated protein の分子表面に位置すると予想される。今後、詳細な立体構造の解析とともに、さらに多くの gibberellin-regulated protein の変異型タンパク質を解析することにより、本タンパク質のアレルゲン性に関わる構造が明らかになるであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 丸山 伸之 |
| 2. 発表標題 アレルギーコンポーネントとその意義 |
| 3. 学会等名 第54回小児アレルギー学会学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nobuyuki Maruyama |
| 2. 発表標題 Allergen components and its clinical application |
| 3. 学会等名 WISC 2019（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 福富 友馬 (Fukutomi Yuma) (30463110) | 独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・診断・治療薬開発研究室・室長 (82710) | |