

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K14040

研究課題名(和文) GRPはなぜ重篤な果物アレルギーを引き起こすのか

研究課題名(英文) Characteristics of GRP that cause severe fruit allergy

研究代表者

岡崎 史子(okazaki, fumiko)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号：10756745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Gibberellin regulated protei (GRP)は重篤な果物アレルギーを引き起こすアレルゲンとして注目されているが、その詳細は明らかになっていなかった。本研究では、モノクローナル抗体(mAb)のテクニックを用いて、交差反応性の解析を行うことでGRPアレルギー患者が注意すべき食品を明らかにした。続いて、加熱した果物でも症状を引き起こすことが知られているGRPの低アレルゲン化方法を見出した。さらには、これまでに成功しているモモやリンゴ以外の各種GRPの純化や新規抗GRPmAbの作製を行うことで、網羅的なGRPの免疫学的解析を行うための基盤を作った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの食物アレルギー治療は原因食品を食べない「徹底的な原因食物の除去」が主であったが、現在は食べられる範囲までは食べる「必要最小限の除去」が推奨されている。そのため、アレルゲンをタンパク質レベルで解析する「コンポーネント解析」は、効果的な治療や安全・安心な喫食のために欠かせない。本研究では、重篤な果物アレルギーの原因として注目されているGRPについて、GRPアレルギー患者が注意すべき食品を明らかにすることができた。また、今回見出したアレルゲン性を低下させる方法を応用できれば、GRPアレルギー患者が果物を安心して食べられる可能性を広げることができると思う。

研究成果の概要(英文)：Gibberellin regulated protei (GRP) has attracted attention as an allergen that causes severe fruit allergy, but its details have not been elucidated. In this study, we clarified foods that GRP-allergic patients should be careful of by analyzing cross-reactivity using monoclonal antibody (mAb) techniques. Subsequently, we found a method for reducing allergenicity of GRP, which is known to cause symptoms even in heated fruit. Furthermore, by purifying various GRPs other than peach and apple, which have been successful so far, and preparing novel anti-GRP mAb, we have established a foundation for comprehensive immunological analysis of GRPs.

研究分野：食生活学

キーワード：果物アレルギー 食物アレルギー コンポーネント解析 果物-花粉アレルギー症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでのアレルギー治療は原因食品を食べない「徹底的な原因食物の除去」が主であったが、現在は食べられる範囲までは食べる「必要最小限の除去」が推奨されている。また、特に植物性の食品においては、多様な食品によって症状が誘発される、花粉症患者が果物に対してもアレルギー反応をおこす、といった交差反応性も問題になっている。したがって、個々のアレルギー患者にとって、食品中のどのタンパク質が原因か、そのタンパク質がどの程度含まれているか、他の植物性食品にも交差反応を示すのかなど、アレルゲンをタンパク質レベルで解析する「コンポーネント解析」は、効果的な治療や安全・安心な喫食のために欠かせない。

### 2. 研究の目的

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。申請者は代表的な植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 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。そこで本研究では、「GRP がなぜ重篤なアレルギーを引き起こすのか」という謎を明らかにすることを目的とし、申請者の強みであるモノクローナル抗体技術を駆使して両者を明確に分離し、GRP のアレルゲンタンパク質としての特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

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 -

#### 1) 抽出液の調整

近隣のスーパーマーケットで、アレルゲン登録されているモモ(コントロール用)、オレンジの他に果物・野菜、穀類、種実類、豆類等を含む 23 種類の食品を購入した。食品に加えてスギ、ヒノキの花粉を購入した。各食品の可食部と花粉に抽出溶媒(2 mM EDTA、10 mM N,N-ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム、3 mM NaN<sub>3</sub>)を加えてミキサーで粉碎し、抽出液とした。

#### 2) SDS-PAGE

抽出液を SDS-PAGE サンプルバッファーと混和したのち 100 で 10 分間加熱した。遠心分離(10,000rpm、23、10分)し、油層を除く上清を回収し、SDS-PAGE のサンプルとした。スタンダードにはプレジジョン Plus プロテイン™ブルースタANDARD (BIO-RAD) を使用した。WIDE RANGE Gel Preparation Buffer(4x) for PAGE (ナカライテスク)を用い、分離ゲルのアクリルアミド濃度 10%、濃縮ゲル 3%のゲルを作成した。電気泳動にはミニプロティアン® Tetra セル (BIO-RAD) を使用方法に従い、パワーサプライに接続後 200V 定電圧で 30 分~40 分行った。タンパク質の染色には CBB ステイン ワン Super (Ready To Use) (ナカライテスク)を用いた。

#### 3) ウェスタン解析

SDS-PAGE を行ったゲル上のタンパク質を、クリアトランス® SP PVDF メンブレン 疎水性 0.2 μm (富士フイルム和光純薬株式会社)にトランスブロット Turbo™ 転写システム (BIO-RAD) を使用し 25V 定電圧 20 分間セミドライ方式で転写した。転写後のメンブレンを、5%スキムミルクを含むりん酸緩衝生理食塩水 (PBS) (ナカライテスク)で 1 時間ブロッキングした。PBS で洗浄後、1 次抗体には抗 GRP mAb 培養上清を室温で 1 時間反応させた。T-TBS にて洗浄後、2 次抗体には HRP 標識抗マウス IgG (American Qualex Antibodies) を室温で 1 時間反応させた。T-TBS で洗浄後、基質にイムノスター Zeta (富士フイルム和光純薬株式会社)を使用し、CCD イメージャー Amersham Imager 600 (GE Healthcare Bio-Sciences) で検出した。

#### GRP の低アレルゲン化方法の検討

まず、加熱によりモモ GRP のアレルゲン性の低下する可能性を検討するために、純化したモモ GRP を 1 mg/ml に調製し、100 (5分・10分・20分・30分・60分)で加熱を行った。

次に、プロテアーゼによる低アレルゲン化の可能性を検討した。ミキサーでモモを粉碎し、プロテアーゼを多く含む 12 食品(塩こうじ、味噌、納豆、マイタケ、ショウガ、胃腸薬、イチジク、ナシ、メロン、パパイヤ、キウイ、パイナップル)をそれぞれ粉碎したものを 1 : 1 になるよう混合し、40、2h 反応させた。GRP を加熱することによるプロテアーゼの影響の変化を検討するために、モモを粉碎後、100、10 分加熱したのもでも同様の実験を行った。いずれも、反応後に上述の SDS-PAGE と抗モモ GRP モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットングにより評価した。

#### 各種 GRP の純化

GRP の存在が明らかになったもののうち、イチゴ、オレンジ、トマト、キウイフルーツ、ヒノキ花粉、ブタクサ花粉 GRP の純化を行った。いずれも、0.5M NaCl を含む抽出溶媒(2 mM EDTA、10 mM N,N-ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム、3 mM NaN<sub>3</sub>)とともに粉碎抽出後、遠心上

清を陽イオン交換クロマトグラフィーにかけて粗精製したのちに、抗モモ GRPmAb を用いた抗体カラムにかけて純化を行った。

#### 抗 GRPmAb の作製

純化したトマト GRP をマウスに免疫し、mAb の作製を行った。最終免疫の3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞と P3U1 の細胞融合を行った。細胞融合後、HAT 培地に懸濁し、96 穴プレート（住友ベークライト）に播種し、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37 °C に設定されたインキュベーターで培養した。細胞融合から 2 週間後、培養上清中に産生された抗体とトマト GRP との反応性を固相 ELISA により確認した。抗体活性が見られたウェルの細胞を限界希釈法にてクローニングし、2 週間培養した後にコロニーが確認できたウェルを選択して、再度スクリーニングを行った。抗体活性が見られた細胞は、2 次クローニングとして 2% HFCS を添加した RPMI (+) に浮遊させ限界希釈法にしたがって 96 穴プレートに播種した。コロニーが確認できたら、スクリーニングを行い、トマト GRP に特異的な mAb 産生細胞を樹立した。ブタクサ花粉 GRP についても同様の方法で mAb を作製した。

#### 4. 研究成果

##### 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 -

コントロールとしてのモモを含めて、果物・野菜、穀類、種実類、豆類、花粉の 27 種類をサンプルとして抗 GRPmAb17 クローンを用いたウェスタンブロッティングを行い、GRP の有無を調べた。17 クローンのうち、10 クローンの mAb が複数の植物性食品に交差反応を示した。反応した食品・花粉の数が最も多かったクローンの結果を示す（図 1）この抗体は桃 GRP に対する mAb であるが、同じバラ科のりんごやいちごのみならず、パプリカや小麦粉、花粉にいたるまで広く GRP が存在すること、また、それらに共通するエピトープがあることが明らかになった。

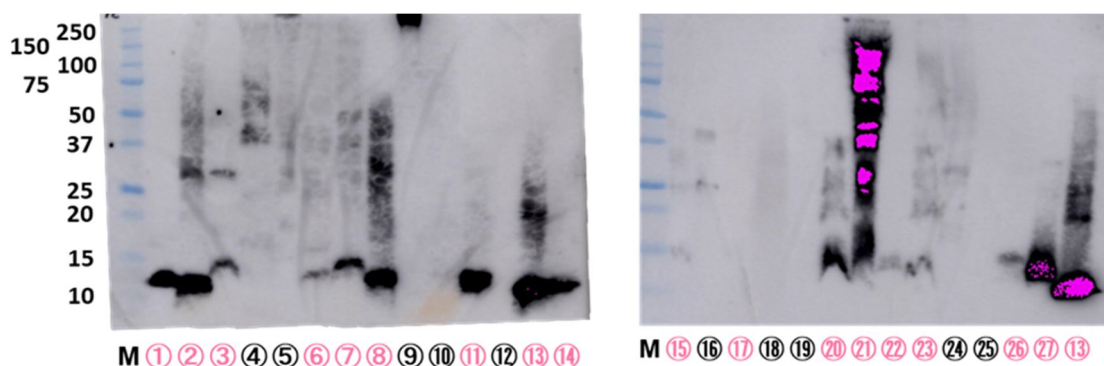


図 1 植物性食品における交差性の検討

M は分子量マーカー、いちご、オレンジ、キウイ、きゅうり、こめ、じゃがいも、トマト、なし、パイナップル、パプリカ、ピオーネ、マンゴー、もも、りんご、  
⑮アーモンド、⑯カシューナッツ、⑰くるみ、⑱ゴマ、⑲小麦粉、⑳そば粉、㉑ダイズ、  
㉒バナナ、㉓ピスタチオ、㉔ピーナッツ、㉕やまいも、㉖スギ花粉、㉗ヒノキ花粉

##### GRP の低アレルゲン化方法の検討

SDS-PAGE にて、加熱によりモモ GRP のアレルゲン性の低下する可能性を検討したところ、加熱時間が長くなるほど、GRP のバンドが薄くなり、高分子側にバンドが増えることが確認できた。（図 2 A）また、3 種の抗 GRPmAb を用いたウェスタンブロッティングでは、いずれの抗体においても加熱時間が長くなるほど、GRP のバンドが薄くなることが分かった。（図 2 B,C,D）モノクローナル抗体の反応性だけでアレルゲン性を評価することはできないものの、長時間の加熱によって複数のエピトープが変化することを明らかにした。これは、タンパク質の重合による影響である可能性が考えられる。果実の調理において 100 °C で 30 分以上加熱するケースは少ないが、低アレルゲン化の可能性を見出せた。一方で、この現象が純化した GRP だけでおこるものなのか、食品の状態であっても起こるものなのかはさらなる検討が必要である。

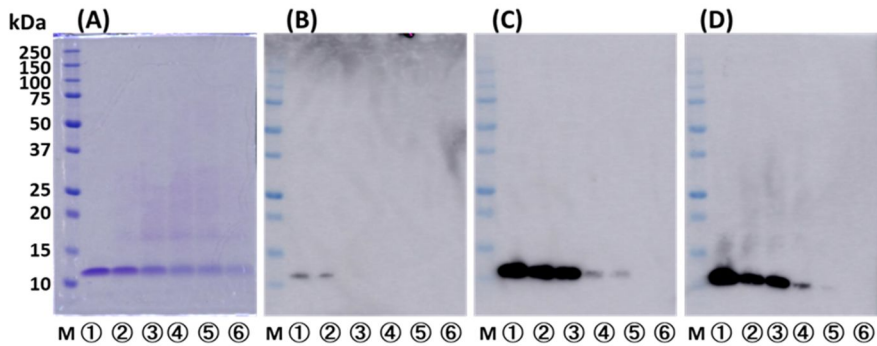


図2 GRPの加熱による影響

M: 分子量マーカー 未処理、 100 5min、 100 10min、 100 20min、 100 30min、 100 60min

さらに、食品中のプロテアーゼによる低アレルゲン化の方法を検討した結果、「味噌・納豆・マイタケ・ショウガ・イチジク、キウイ、しょうが、パイナップルに含まれるプロテアーゼにより、モモ GRP が消化されること、あらかじめモモを加熱しておくプロテアーゼが作用しやすいことが示唆された。(図3)

GRP は加熱や消化に強いとされているが、長時間の加熱やプロテアーゼ処理によりアレルゲン性を低下できる可能性をみいだした。今後は、実際にこれらの方法によってモモ GRP アレルギー患者血清中 IgE の反応性が低下するかについても明らかにしていきたい。

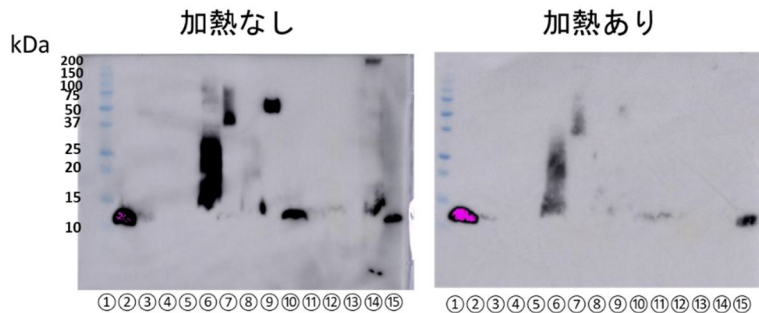


図3 食品中プロテアーゼによる GRP の消化

分子量マーカー、モモ+水、モモ+塩麹、モモ+味噌、モモ+納豆、モモ+マイタケ、モモ+ショウガ、モモ+胃腸薬、モモ+イチジク、モモ+ナシ、モモ+メロン、モモ+パパイア、モモ+キウイ、モモ+パイナップル  
p.c peachGRP

#### 各種 GRP の純化

##### 1) 抽出条件の検討

熟度と塩濃度による抽出効率の比較をおこなったところ、熟している方が GRP 量が多いこと、NaCl 濃度が 0M から 0.5M まで右肩上がり上昇したが、それ以降の抽出量に差は見られないことが明らかになった。そこで、スーパーで購入後、追熟させたキウイをサンプルとし、0.5M NaCl を含む抽出溶媒を用いてキウイ GRP を抽出した。

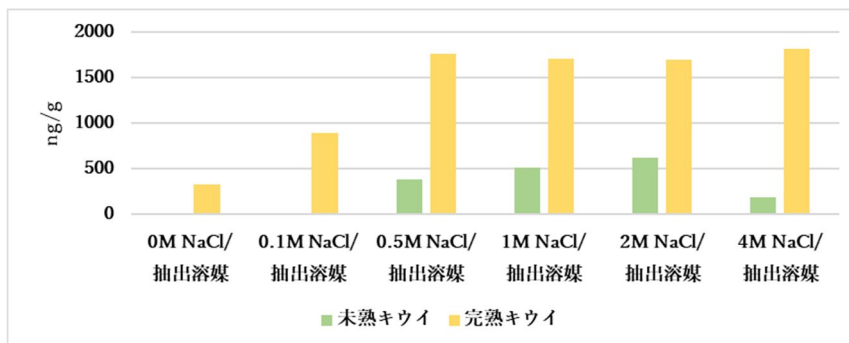


図4 熟度と塩濃度による抽出効率の比較 (モモ GRP 当量)

12 種類 (抽出溶媒 6 種類 × キウイ 2 種類) の抽出液を作製し、モモ GRP を検量線としてサンドイッチ ELISA を行い、キウイ GRP 量をモモ GRP 当量として定量した。

キウイを等量の抽出溶媒とともにミキサーで粉碎後、遠心上清をカルボキシメチル樹脂 (CM) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにかけた。各画分をサンプルとして SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングを行い GRP が溶出している範囲を確認した。(図 5) CBB 染色では、キウイ抽出液や遠心上清に比べてキウイ CM 素通り画分のバンドやタンパク質量が減少していた。また、ウエスタンブロッティングでは、キウイ抽出液と遠心上清、キウイ CM 吸着画分でバンドが検出され、キウイ CM 素通り画分にはバンドが検出されなかった。したがって、キウイ GRP が CM 樹脂に吸着されていることが示唆された。キウイ GRP の溶出が確認できた範囲をひとまとめにして、キウイ粗精製画分とした。

抗体カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、各吸着画分を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングで確認した。(図 6) CBB 染色では、キウイ粗精製画分と抗体カラム素通り画分のバンドにほとんど違いが見られないが、ウエスタンブロッティングでは、キウイ粗精製画分で確認されたバンドが抗体カラム素通り画分では検出されなかった。このことから抗体カラムにキウイ GRP が吸着したことがわかる。また、CBB 染色では抗体カラム吸着画分のみバンドが確認されたが、ウエスタンブロッティングでは抗体カラム吸着画分とでバンドが検出された。キウイ GRP が純化されたことを確認できた範囲をひとまとめにし、キウイ GRP 精製画分とした。

イチゴ、オレンジ、トマト、ヒノキ花粉、ブタクサ花粉の GRP についても、同様の方法で純化に成功した。

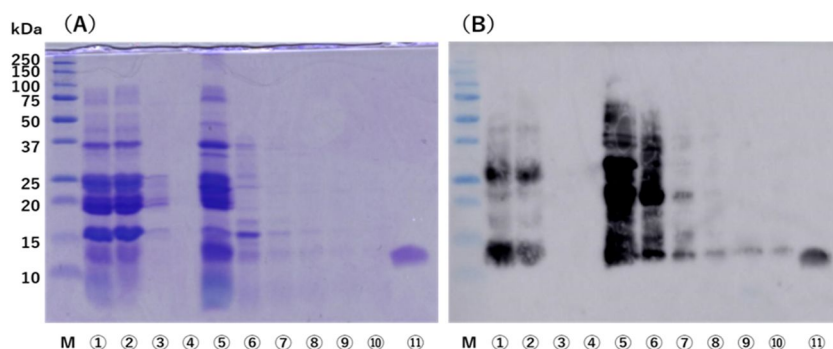


図 5 陽イオン交換クロマトグラフィー

12% アクリルアミドゲルを用いて非還元状態で SDS-PAGE を行い、(A) CBB 染色、(B) 抗モモ GRP mAb を用いたウエスタンブロッティングを行った。

M: 分子量マーカー、キウイ抽出液、遠心上清、キウイ CM 素通り画分、～キウイ CM 吸着画分、ポジティブコントロール (モモ GRP)

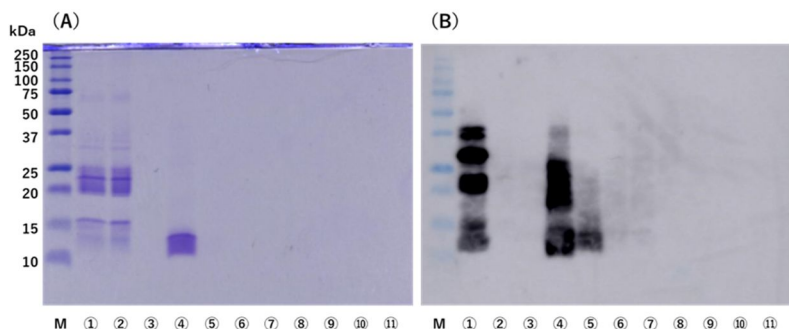


図 6 アフィニティークロマトグラフィー

(A) CBB 染色、(B) 抗モモ GRP mAb を用いたウエスタンブロッティング

M: 分子量マーカー、キウイ粗精製画分、抗体カラム素通り画分、～吸着画分 (は PBS で 5 倍希釈した。)

#### 抗 GRPmAb の作製

トマト GRP、ブタクサ花粉 GRP に対する mAb を定法にしたがって作製した結果、それぞれ 5 クローン、6 クローンの抗体産生細胞を樹立することができた。現在、それぞれの抗体の解析をすすめているところである。すでに樹立している、モモ GRP、リンゴ GRP に対する mAb と比較することで、GRP のアレルゲン性の違いの原因等を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 OKAZAKI Fumiko, MOMMA Keiko, HIRAKAWA Yuki, KAWAI Natsuki, YAMAGUCHI-MURAKAMI Yukie, ADACHI Reiko, MORI Yuji, KONDO Yasuto, NARITA Hiroshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Determination of Severe Peach Allergens, Gibberellin-Regulated Protein, and Lipid Transfer Protein, Using Monoclonal Antibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.68.221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inuo Chisato, Okazaki Fumiko, Shiraki Rie, Tanaka Yutaka, Momma Keiko, Kondo Yasuto, Narita Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Generalized allergic reaction in response to exercise due to strawberry gibberellin-regulated protein: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy, Asthma & Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13223-022-00692-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fumiko Okazaki, Yukie Yamaguchi-Murakami, Akihiro Itai, Hiroshi Narita
2. 発表標題 Development of sandwich ELISAs for determination of Pru p 3 and Pru p 7
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chisato Inuo, Fumiko Okazaki, Rie Shiraki, Keiko Momma, Yasuto Kondo, Hiroshi Narita
2. 発表標題 Generalized allergic reaction due to strawberry gibberellin-regulated protein (GRP): a case report
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------