

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K02118

研究課題名（和文）新規果物・野菜重症アレルギーコンポーネントGRPの基盤解析

研究課題名（英文）Fundamental Analysis of Novel Fruit and Vegetable Severe Allergen Component GRP

研究代表者

門間 敬子（Momma, Keiko）

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：70397561

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）：モモ重症アレルギーであるGibberellin-regulated protein (GRP) は植物間で保存性が高く、モモ以外の果物・野菜においてもGRPを原因物質としたアレルギーが報告されている。さらにヒノキ科花粉にもGRPが存在することが報告されアレルギーとの関係が重要視されている。本研究では抗モモGRPモノクローナル抗体の交差反応性を利用して、様々な果物、野菜、花粉からGRPを純化すると共に果物・野菜中のGRP含有量を測定し、アレルギー性を検証した。またスギ花粉GRPに対するモノクローナル抗体を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果物アレルギーは、若年以降に発症することが多く完治しにくい。また1割程度は重篤な症状を示す。モモ重症アレルギーであるGibberellin-regulated protein (GRP)は植物間で保存されていることから、他の果物・野菜における存在量を明らかにすることで、アレルギー患者のQOLの向上に寄与することができる。また純化したGRPは患者のアレルギーの責任抗原の特定に役立てられる。さらに得られた抗体を用いて花粉症との関連について研究を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：Gibberellin-regulated protein (GRP), a severe allergen of peach, is highly conserved among plants, and allergic reactions to GRP as a causative agent have been reported in fruits and vegetables other than peach. Furthermore, GRP has been reported to be present in cypress pollen, and its relationship to allergy has been emphasized. In this study, we purified GRP from various fruits, vegetables, and pollens and measured the GRP content in fruits and vegetables using the cross-reactivity of anti-peach GRP monoclonal antibodies, and verified their allergenicity. Furthermore, monoclonal antibodies against cedar pollen GRPs were generated.

研究分野：食品科学

キーワード：食物アレルギー 重症果物アレルギー GRP モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

近年増加傾向にある果物アレルギーは、若年以降に発症することが多く完治しにくい。果物アレルギーは一般に口腔の痒みなど局所的で軽症なケースが多いが、1割程度は重篤な症状(アナフィラキシーショック)を示す。また花粉-食物アレルギー症候群に見られるように相同性の高いタンパク質が種を超えて交差反応することが知られている。そこで「アレルギー食品」ではなく、アレルゲンとしての原因タンパク質から考えるコンポーネント解析(Component-resolved diagnostics)の概念が重要となっている。当研究室でモモ重症アレルゲンとして見出された Gibberellin-regulated protein (GRP)は植物間での相同性が非常に高く、モモ以外にも、ウメ(Allergol. Int. 68, 524-526, 2019)、トマト(小児科臨床. 72, 1667-1670, 2019)など複数の果物で GRP が責任抗原と考えられる症例が報告されている。またトウガラシの GRP が重症アレルゲンであることが示唆されており(消費者庁平成 30 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査報告書)、GRP を原因とする食物アレルギーは従来考えられてきたよりもはるかに多い可能性がある。しかし、抗菌ペプチド snakin1 として知られているジャガイモ GRP は、抗モモ GRP 抗体と交差反応し、リンゴやトマトより多く含まれるにも関わらず、重症アレルギーは知られておらず、その理由は明らかになっていない。

また近年イトスギ花粉のコンポーネントである BP14 だけでなく、ヒノキ科花粉にも GRP が存在することなど報告され、花粉症との関連からも世界的にも重要なアレルゲンとして認識されている。

2. 研究の目的

本研究では GRP のアレルゲンとしての特性を明らかにし、患者の QOL の向上に寄与するため、以下の実験を行う。これまでに当研究室で取得している抗モモ GRP に対する複数のモノクローナル抗体を用いて、(1) 果物・野菜より GRP を精製し、アレルゲン性を測定する。(2) 果物・野菜に存在する GRP 量を測定する。さらに加熱調理の影響をみるため、果物・野菜を加熱し GRP の検出される GRP 量を測定する。(3) アレルゲン性の解析に資するために組換え GRP の発現系を構築し、組換え GRP を精製する。(4) RT-qPCR により mRNA の発現量を測定する。(5) スギ花粉から抗モモ GRP モノクローナル抗体を用いて GRP を精製し、花粉 GRP に対するモノクローナル抗体を作製し、存在量の測定やエピトープ解析に用いる。

3. 研究の方法

(1) 果物・野菜抽出液は等重量の抽出液(2 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 10 mM ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム, 3 mM ナトリウムアザイド, 1M NaCl)とミキサーで懸濁した後、遠心により上清を得た。pH が低い場合は pH 5 以上に調整した。サンドイッチ ELISA は 2 種の抗モモ GRP モノクローナル抗体を用い、2 次抗体は HRP ラベルしたものを用いた。精製したモモ GRP を用いて検量線を作成し、モモ当量として GRP 量を求めた。ジャガイモは茹で、電子レンジ、オートクレーブ加熱により食べられる状態にまで加熱し、モモは 170 度のオーブンで 30 分間加熱し、同様に抽出液を調整し GRP を検出した。

(2) 果物・野菜抽出液は(1)と同様に調整した。CM トヨパールに吸着、NaCl で溶出した溶液を抗モモ GRP モノクローナル抗体を用いて作成した抗体カラムにかけ、pH を下げて

溶出した後中和した。精製したタンパク質は 12.5% SDS-PAGE で純度を確認した。精製度が低い場合は再度 CM トヨパール、抗体カラムによる精製を繰り返した。

(3) モモ、ナシ、ブドウよりアイソスピンプラント RNA (ニッポンジーン)を用いて mRNA を調整し、RevertraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO)により cDNA を調整した。これを鋳型とし、酵母発現用ベクター pPICZ の挿入部位の配列を N 末及び C 末側に付加しそれぞれの遺伝子を PCR で調整した。精製に抗体カラムを用いるため、タグはつけず、シグナルペプチド配列のすぐ後ろに GRP 配列を挿入した。この PCR 産物を In fusion 法により発現ベクターに挿入し、酵母を形質転換した。酵母を培養し、メタノールにより発現分泌させた。培地を CM トヨパール及び抗体カラムにより精製した。

(4) モモ GRP の内部配列に対して 110bp を増幅する 2 つのプライマーを合成し、モモの皮および実より (3) と同様に cDNA を調整し、アクチンを対象として RT-qPCR により mRNA 発現量を測定した。季節による発現量の変化を測定した。またサンドイッチ ELISA により GRP 量を測定した。

(5) スギ花粉はヤミゾ花粉研究会より購入し、(1) と同様に抽出液を調整し、CM トヨパール及び抗体カラムによりスギ花粉 GRP を精製した。得られたスギ花粉 GRP でマウスを免疫し、常法によりモノクローナル抗体を作成した。

4. 研究成果

(1) 果物・野菜 GRP 量の測定

モモと同じバラ科のウメではモモと同様に $\mu\text{g/g}$ レベルで多くの GRP が存在していた。ウメは砂糖を加えて 100 以上に加熱しジャムにしても GRP は 50% 残存していた。またサクランボ、イチゴにも数百 ng/g の GRP が検出された。同じバラ科のリンゴ、ナシでは検出量はやや低かった。ブドウは品種によって含有量の違いが大きく、一般に紫色のブドウよりも緑色のブドウの方が多くの GRP を含有していた。すでにアレルゲンとしての報告のあるオレンジ以外にもグレープフルーツやみかんでも多くの GRP が検出された。またトマトよりもミニトマトに GRP が多く含まれていた。さらにトマトと同じナス科のナスでは GRP はほとんど検出されなかったが、成熟した黄色ピーマンや、赤トウガラシには $\mu\text{g/g}$ オーダーの GRP が含まれていた。ジャガイモを加熱調理すると、GRP の検出量は茹で、電子レンジ、オートクレーブ加熱で約 15%、7%、0.1% にまで減少したが、モモではやや増加が見られた。

(2) 果物・野菜からの GRP の精製

ブドウで GRP がアレルゲンと疑われる症例があったため、ブドウから GRP を精製した。ブドウ由来 GRP は患者血清との反応を示し、またモモ GRP との間で競合が見られた。またジャガイモ、ウメ、ピーマン、ニンジンから GRP を精製した。

(3) 組換え GRP の発現精製

これまで組換え GRP は C 末に His-tag を付けて発現精製していたが、そのために反応性が低くなる可能性がある。そこで当研究室では抗モモ GRP モノクローナル抗体カラムで精製できることから、アミノ酸の付加のない形で発現させるため In fusion 法による組換えを行い発現ベクターを作成した。モモ GRP、ナシ GRP、ブドウ GRP を酵母で発現精製し、抗体との反応性解析や CD 測定による構造解析を行ったところ、天然の GRP と同等の反応性を示した。今後エピトープ解析や患者血清との反応に用いることができると考えている。

(4) モモ GRP の発現量は 5 月、6 月の未熟期には少なかったが、成熟に伴って増加した。また皮よりも実によく発現していた。モモ GRP の mRNA 発現量とタンパク質量は相関性が見

られた。

(5) スギ花粉由来の GRP とモモ GRP の相同性は 70% である。抗モモ GRP モノクローナル抗体カラムを用いて精製することができた。これはモモ GRP と共通するエピトープを持つことを示している。精製したスギ花粉 GRP は、N 末端分析の結果予想配列と一致し、すでに報告されている通り SDS-PAGE では分子量は約 14kDa となった。精製スギ花粉 GRP でマウスを免疫し、6 つのモノクローナル抗体を取得した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 -
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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Natsuki, Hirakawa Yuki, Matsumoto Shinya, Itai Akihiro, Matsunaga Kayoko, Narita Hiroshi, Momma Keiko	4. 巻 86
2. 論文標題 Expression analysis of gibberellin-regulated protein in peach by reverse transcription-quantitative PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Yuji, Okazaki Fumiko, Momma Keiko, Narita Hiroshi, Kondo Yasuto	4. 巻 50
2. 論文標題 Investigation of the sensitization rate for gibberellin-regulated protein in patients with Japanese cedar pollinosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergologia et Immunopathologia	6. 最初と最後の頁 89 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15586/aei.v50i2.440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Takae, Shimojo Naoshi, Nakamura Masashi, Matsunaga Kayoko, Nakata Joon, Tagami Kazunori, Momma Keiko, Narita Hiroshi, Kondo Yasuto	4. 巻 33
2. 論文標題 A case of food dependent exercise induced anaphylaxis due to grape gibberellin regulated protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pai.13850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 原田 晋、成田 宏史、門間 敬子、矢上 晶子、中村 政志、大野 史晃、下條 尚志、松永 佳世子、岩井 優依、中村 順子、岡崎 史子	4. 巻 64
2. 論文標題 症例 Gibberellin-regulated proteinを感作抗原とし、モモ・イチジク摂取後にアナフィラキシー症状を発現した1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 皮膚科の臨床	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18888/hi.0000003331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門間敬子、平川由紀、岡崎史子、河合菜月、板井章浩、松永佳世子、成田宏史
2. 発表標題 重症果物アレルギーGibberellin Regulated Proteinの交差反応性ELISAによる定量
3. 学会等名 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門間敬子、平川由紀、岡本(河合)菜月、織田昌幸、成田宏史
2. 発表標題 加熱調理による重症果物アレルギーGibberellin Regulated Proteinの変動
3. 学会等名 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本(河合)菜月、平川由紀、松本晋也、森本哲也、板井章浩、成田宏史、門間敬子
2. 発表標題 重症果物アレルギーGibberellin Regulated Protein のRT-qPCRおよび交差反応性ELISAによる季節変動解析
3. 学会等名 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二村恭子、鈴木加余、下條尚志、大野史晃、中村政志、成田宏史、門間敬子、松永佳世子、矢上晶子
2. 発表標題 モモ・サクランボによる 小児FDEIAの一例
3. 学会等名 日本小児皮膚学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門間敬子、平川由紀、河合菜月、板井章浩、成田宏史
2. 発表標題 重症果物アレルギーGibberellin Regulated ProteinのRT-qPCRによる発現解析
3. 学会等名 栄養食糧学会
4. 発表年 2021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
---------	---------