

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450164

研究課題名(和文) スギ花粉-トマト 共通アレルゲンの解析

研究課題名(英文) Analysis of Japanese cedar pollen and tomato fruit common allergens

研究代表者

新本 洋士 (Shinmoto, Hiroshi)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号：50355301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉症患者末梢血B細胞から樹立したヒト-マウスハイブリドーマから、スギ花粉アレルゲンCry j2およびトマト抽出液に結合するIgM抗体を分泌する3株を選別した。Cry j2のアミノ酸配列をもとに合成したペプチドに対する結合試験により、ふたつの抗体は一次構造上に抗体結合部位を持たないことが判明した。これに対して14-404-117抗体はCry j2のアミノ酸配列101～140の範囲に結合し、抗体が認識するCry j2の中心的抗体結合配列はFKVDであった。FKVD配列を持つトマトタンパク質を検索したところ、アスコルビン酸化酵素、セリン/スレオニンプロテインキナーゼに同じ配列が存在した。

研究成果の概要(英文)：We established EBV-transformed B-cells from peripheral blood lymphocytes from several patients allergic to Japanese cedar pollen secreting antibodies against cedar pollen and tomato allergens. These EBV transformed B-cells were fused with mouse myeloma SP2/O3 cells. Icosa, deca, and alanine substituted peptides were synthesized based on the amino acid sequence of cedar pollen allergen Cry j2 on the multi-pin apparatus for the epitope analysis. Several human-mouse hybridoma clones secreting human monoclonal IgM class antibodies to cedar pollen and tomato extracts were obtained. Three of them were secreting antibodies to Cry j2. A clone 404-117 bound to icosa-peptides from Cry j2. Detailed analysis with shorter and alanine substituted peptides suggested that tetra or penta peptides were linear epitope. An analysis of sequence database of tomato fruit proteins showed that several proteins had Cry j2 linear epitope in the molecules.

研究分野：食品機能化学

キーワード：スギ花粉症 口腔アレルギー症候群 トマト 抗体 エピトープ ペプチド

1. 研究開始当初の背景

口腔アレルギー症候群(Oral Allergy Syndrome, OAS) (果実野菜過敏症)は野菜や果物のような農産物を摂取した際、主に口腔粘膜に限定して起こる即時型アレルギー症状である。症状は口唇、口腔内、喉の腫れやかゆみ、掻痒感、水疱などである。さらには鼻炎に類似した鼻水や結膜充血などが見られることもある。時には全身症状を引き起こし、皮膚の蕁麻疹、咳、喘息、呼吸困難、腹痛、下痢、アナフィラキシーショックを引き起こすこともある。

一般的な食物アレルギーの発症機構では、アレルギー性を保持したまま腸管に達したアレルギータンパク質が腸管から吸収され、患者にアレルギータンパク質に反応する状態(感作)を引き起こすと考えられている。ところが、OASを引き起こす果実等の農産物のアレルギータンパク質の多くは消化酵素感受性で、消化液で分解されてしまうため、アレルギー性を維持したまま腸管から吸収されるとは考えられない。OASを引き起こす最初の感作の原因となるのは、OASを引き起こす農産物そのものではなく、他の樹木由来の花粉によると考えられている。

スギなど、特定の樹木の花粉を吸入することにより、鼻腔や口腔におけるアレルギー感作が成立する。その後、花粉アレルギーと交差反応を示すアレルギータンパク質を含む農産物を摂取することにより、当該農産物中のアレルギータンパク質が口腔粘膜と接触し、OASを引き起こす。

筆者らはこれまで、アレルギー患者の末梢血リンパ球から抗体分泌細胞を分離し、培養液中に分泌される抗アレルギー抗体の特異性を検討してきた。このなかで、スギ花粉症患者のB細胞の中には、トマト抽出物に対する抗体分泌細胞がしばしば見られることを発見した。このことは、スギ花粉アレルギーとトマトアレルギーに共通なエピトープが存在する可能性を示唆している。これまで、患者血清を用いたアレルギー解析は多々行われてきたが、患者から抗体分泌細胞を分離する試みはほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、花粉症患者から樹木花粉と果実の双方に結合性を持つ抗体を分泌するB細胞クローンを樹立し、分泌される抗体がアレルギーをどのように認識するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

スギ花粉症患者の末梢血リンパ球をエプスタイン-バールウイルス感染によって形質転換し、ヒトBリンパ芽球様細胞を樹立する。つぎにスギ花粉アレルギータンパク質に対する抗体分泌細胞を検索するとともに、トマトアレルギータンパク質に対する抗体分泌細胞も検索する。

得られたアレルギータンパク質に対する抗体との反応性を指標に、アレルギータンパク質の単離精製を行う。出発材料はスギ花粉および新鮮なトマトを用いる。精製されたアレルギータンパク質の部分アミノ酸配列を解析し、データベース上に登録された既知のタンパク質との相同性を検索し、アレルギータンパク質を決定するとともに、合成ペプチドライブラリーを用いてB細胞エピトープの同定を行う。

4. 研究成果

(1) 平成 26 年度

スギ花粉アレルギー患者数人の末梢血の抗スギ花粉抗体を簡易キットを用いて測定し、抗体価の高い患者#14を選別した。患者#14からあらためて採血し、希釈した血液から密度勾配遠心によって単球画分を分離した後、シクロスポリン存在下でEpstein-Barr ウイルスを感染させて複数のBリンパ芽球様細胞(BLC)を含む96グループの細胞群を得た。このような細胞は培養液中で数十回まで増殖しながら抗体を分泌することができる。

スギ花粉抽出液、市販の数種の栽培種トマト抽出液、本学農場で栽培されたトマト抽出液を抗原として酵素免疫測定法(ELISA)を用いてBLCが分泌する抗体との反応性を測定したところ、トマト品種による反応性の差異が認められた。なかでも農場において有機的に栽培された品種と強く反応する抗体分泌細胞が存在することが明らかになった。

スギ花粉抽出液と国産トマトの標準品種と考えられる桃太郎抽出液に共通して反応した抗体分泌細胞を選択し、スギ花粉抽出液を抗原としたトマト抽出液での抗体の結合競争阻害試験、あるいはその逆の阻害試験を行い、それぞれに濃度依存的阻害が見られたことから、スギ花粉抽出液とトマト抽出液には共通のアレルギーが存在することが推論された。

(2) 平成 27 年度

新たに抗スギ花粉抗体高陽性患者#15から末梢血リンパ球を分離し、シクロスポリン存在下でEpstein-Barr ウイルスを感染させ、172グループのBリンパ芽球様細胞群(BLCs)を得た。この中からスギ花粉およびトマト果実抽出液双方に反応性のある抗体分泌細胞2群を選抜し、マウス骨髄腫細胞株と細胞融合を行った。前年度から引き続き細胞融合後の選択培養条件の検討を行い、BLCを低濃度のウアバイン存在下で死滅される条件を設定することに成功した。細胞融合の結果、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ2クローンを樹立することができた。すでに保有しているスギ花粉アレルギータンパク質Cry j1およびCry j2に反応するヒトモノクローナル抗体3種とともに抗原特異性を検討したところ、トマト果実抽出液に反応する抗体は、いずれもCry j2に結合

することが判明した。

Cry j2 の一次構造を元に、20 アミノ酸、10 アミノ酸ずつのオーバーラップを含むペプチド群を固相合成し、固相ペプチド ELISA によって抗体の結合性を調べたところ、4 種のヒトモノクローナル抗体のうち、ペプチドに結合したものの 1 クローンのみであった。結合したペプチド配列から 10 アミノ酸、8 アミノ酸、6 アミノ酸長のオーバーラップペプチドを合成し、コアとなる短いペプチド配列の存在が推測された。このようは配列と同一性を持つトマト果実アレルゲンの検索を行ったが、類似配列は見つかっていない。

固相ペプチド ELISA 陰性であった 3 クローンについては、Cry j2 の立体構造を認識しているものと推定された。今後、立体構造上に存在するエピトープを明らかにする解析方法の導入が必要である。

(3) 平成 28 年度

スギ花粉症患者末梢血 B 細胞から樹立したヒト-マウスハイブリドーマから、スギ花粉抽出液およびトマト抽出液に結合する IgM クラス抗体を分泌する 3 株 (14-404-117, 15-38-403 および 15-85-7-13) を選別し、詳しく特異性を調べたところ、いずれの抗体もスギ花粉アレルゲンタンパク質 Cry j2 に結合した。

Cry j2 のアミノ酸配列をもとに、固相法で 20 アミノ酸長、10 アミノ酸シフトペプチドを合成し、3 種類の抗体が結合する配列を検索した。15-38-403 および 15-85-7-13 抗体はいずれのペプチドにも反応しなかったことから、一次構造上に抗体結合部位を持たないと推定した。14-404-117 抗体は Cry j2 のアミノ酸配列 101~140 の範囲に結合した。そこで 10 アミノ酸長 2 アミノ酸シフトのペプチドを合成し、結合する配列を決定した。決定した配列をもとに、さらに短い 8 アミノ酸長、6 アミノ酸長、4 アミノ酸長ペプチドを合成して 14-404-117 抗体の結合を調べたところ、HFTFKVDG の配列中から合成した 4 アミノ酸長のいくつかのペプチドに結合した。HFTFKVDG のアミノ酸を 1 残基、あるいは連続する 2 残基ずつアラニンに置換したペプチドを合成して 14-404-117 抗体の結合を調べたところ、FKVD のいずれかがアラニンに置換された時に抗体の結合性が著しく低下することを認めた。このことから、14-404-117 抗体が認識する Cry j2 の中心的抗体結合部位(コアエピトープ)は FKVD 配列であると結論した。

スギ花粉症患者の一部はトマトによる口腔アレルギー症候群 (OAS) を発症する。そこでトマトタンパク質に 14-404-117 抗体が結合するコアエピトープが存在するかを検索したところ、アスコルビン酸酸化酵素、セリン/スレオニンプロテインキナーゼに同じ配列が存在した。これらのタンパク質が OAS に関与しているか否かの解明が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

S.Chiba, H.Yokoyama, A.Kumazawa, M.Shimoto, Y. Naganawa, H. Shinmoto, Epitope analysis of Japanese cedar pollen allergen Cry j2 with a human IgM class monoclonal antibody 404-117, *Human Antibodies*, **25**, 17-21 (2017)

[学会発表](計 8 件)

R.Suzuki, C.Kitagawa, Y.Otsu, Y.Morikami, Y.Naganawa, H.Shinmoto, Human B-lymphoblastoid cells secreting antibodies against Japanese cedar pollen and tomato allergens, The 27th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 11/11-14/2014 International Conference Center (Kitakyushu, Fukuoka)

横山晴香,熊澤文音,長縄康範,新本洋土, 抗スギ花粉アレルゲン Cry j2 ヒトモノクローナル抗体の樹立,日本動物細胞工学会 2015 年度大会,07/09-10/2015 東北大学(宮城県仙台市)

千葉星矢,横山晴香,鈴木玲子,北川千波,長縄康範,新本洋土, 抗トマトアレルゲン抗体分泌ヒトハイブリドーマ樹立の試み,日本動物細胞工学会 2015 年度大会,07/09-10/2015 東北大学(宮城県仙台市)

S.Chiba, H.Yokoyama, Y. Naganawa, H.Shinmoto, Human monoclonal IgM antibodies against Japanese cedar pollen and tomato fruit, Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology, 02/23-24/2016 Tsukuba University (Tsukuba, Ibaraki)

千葉星矢,横山晴香,長縄康範,新本洋土, スギ花粉アレルゲン Cry j2 のエピトープ解析,日本食品科学工学会平成 28 年度関東支部大会,03/05/2016 日本大学(神奈川県藤沢市)

S.Chiba, H.Yokoyama, Y.Naganawa, H.Shinmoto, Generation of Human-mouse hybridomas secreting antibodies to tomato and Japanese cedar pollen allergens, 2016 World Congress on In Vitro Biology, 6/11-15/2016 San Diego, U.S.A.

S.Chiba, H.Yokoyama, Y.Naganawa, H.Shinmoto, Homology analysis of a B-cell linear epitope of Japanese cedar pollen allergen Cry j2 in tomato protein, The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 11/09-12/2016 International Conference Center (Kobe, Hyogo)

S.Endo, S.Chiba, Y.Nishikawa, H.Yokoyama, Y.Naganawa, H.Shinmoto,

Specificity of human mono- and oligo-clonal antibodies against several tomato cultivars, The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 11/09-12/2016 International Conference Center (Kobe, Hyogo)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新本 洋士 (Shinmoto Hiroshi)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号：50355301