

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06074

研究課題名(和文)ヒノキ科植物由来花粉-食物アレルギー症候群原因抗原ペプチドBP14の解析

研究課題名(英文) Analysis of an allergen of cypress BP14 involved in pollen food associated syndrome

研究代表者

相沢 智康 (AIZAWA, Tomoyasu)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：40333596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒノキ科植物の花粉症の原因抗原としてヨーロッパトスギから同定されたGRPファミリーペプチドBP14を対象とし、花粉症が原因となって誘発される花粉-食物アレルギー症候群(PFAS)との関連を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を進めた。次世代シーケンサーでの解析によりBP14遺伝子の同定に成功し、WHO/IUISのデータベースにアレルゲンCup s 7として登録した。この組換え蛋白質発現系を用いて、患者血清に対する反応性の検討、NMR法による立体構造解析等を進め、そのエピトープに関する議論を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたBP14(Cup s 7)に関する知見は、新規診断技術の開発や花粉症・食物アレルギーの治療への応用にもつながる基礎研究となることが期待される。花粉症が原因となって引き起こされる食物アレルギーであるPFASのうち、ヒノキ科植物が関連するものについては、特に未知の点が多い。また、PFASの研究には、原因蛋白質の詳細な立体構造解析は重要な基礎情報となるが、その立体構造解析例は極めて少ない。このため、本研究の成果はヒノキ科植物のPFAS研究の進展だけでなく、PFASそのものに関する基礎、臨床両研究分野においても重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We proceeded with the study of an allergenic protein, BP14 derived from European cypress. BP14 is thought to be the cause of pollen-food allergy syndrome (PFAS). We succeeded in identifying the BP14 gene by analysis with a next-generation sequencer. This sequence was registered as an allergen Cup s 7 in the WHO / IUIS database. By using recombinant Cup s 7 protein, the reactivity with patient serum was examined, and the three-dimensional structure was analyzed by the NMR method.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：アレルゲン 花粉 果実 GRP BP14 Cup s 7 ペプチド 立体構造

1. 研究開始当初の背景

スギやヒノキなどのヒノキ科の樹種は、南極を除いた全地球の大陸に分布しており、約 160 種におよぶ。これらの植物の花粉は高いアレルギー性を持つことが知られており、重要なアレルギー疾患に関連する。日本でスギ(*Cryptomeria japonica*)やヨーロッパ地中海地域でのホソイトスギ(*Cupressus sempervirens*)に対する花粉アレルギーに代表されるように、花粉への曝露が高い地域においては、人口の 30%以上に重大な影響を及ぼすとも言われている。アレルギー性鼻炎、慢性咳嗽、喘息などの症状により、時に免疫療法を必要とするほど、患者の生活への影響は大きい。さらに、これらの花粉のアレルゲンが食物である果物等の植物に含まれるアレルゲンと交差反応を引き起こし、花粉-食物アレルギー症候群(PFAS)の原因となることも知られており、大きな問題となっている。

このようなヒノキ科植物由来の花粉症の原因となる代表的なアレルゲンとして、従来からよく知られる 4 つのタンパク質グループを含む、約 15 種のタンパク質が報告されている。このうち、ホソイトスギの花粉から、見かけの分子量が 14kD の BP14 抗原が新規に発見され、その正体がジベレリン調節タンパク質(GRP)の一種であることを、我々の国際共同研究グループが報告した。約 60 残基のうち 12 個ものシステインがジスルフィド結合を有するという特徴的なペプチドである GRP ファミリーは、幅広い植物種に高度に保存され、ストレス、花粉成熟、ホルモクロストーク、レドックスホメオスタシスおよび抗菌活性など、生体防御に深く関与すると考えられている。GRP が、モモ、柑橘類、ザクロ等の果実においてアレルギー誘発性であることはすでに報告されていたが、花粉が引き金となって発症する食物アレルギー-PFAS の原因となることは、我々の国際共同研究グループが世界で初めて報告した。南フランスではホソイトスギ花粉症患者の約 50%が BP14 に感作していたことなどから、これが重要なアレルゲンの 1 つとなっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、免疫学的研究を進めてきたフランスグループとの連携により、我々が専門とするタンパク質科学的手法を用いて GRP ファミリーの分子レベルでのアレルギー誘発機構について解明することを目的とした。BP14 が属する GRP ファミリー分子は植物界に幅広く保存されており、植物が原因となる他のアレルギー疾患においても主要な抗原の 1 つとなっている可能性が高いにも関わらず未知の点が数多く残されている。よってこの研究の進展は、新規診断検査技術の確立や花粉症治療薬への応用などに結びつく可能性があり、幅広い学術分野はもちろん、社会への大きな波及効果も期待されるものである。

3. 研究の方法

BP14 の遺伝子クローニングとその配列を元にした遺伝子組換えペプチドの作製について検討を進めた。ホソイトスギ由来の BP14 については、その部分アミノ酸配列が決定されていたが、その遺伝子配列は完全には同定されていなかった。特に GRP はパラログが多いことが知られており、そのクローニングには困難も予想された。そこで、通常の縮重プライマーを用いたクローニングに加え、次世代シーケンサーを用いた花粉に対する RNA-Seq 等により、ホソイトスギの BP14 およびそのパラログ遺伝子の網羅的同定および花粉中の発現量に関する検討を行った。また、得られた遺伝子情報を用いて、GRP ファミリーへの応用実績のある酵母をもちいた大量発現系を用いて、遺伝子組換えペプチドを調製した。

また、BP14 の立体構造解析情報もエピトープの同定にむけた基礎情報として極めて有用であることから、組換えペプチドを活用することで、すでに他の GRP で成果をあげている NMR 法による立体構造決定についての検討を進めた。

4. 研究成果

まず、ホソイトスギの RNA-Seq による BP14 およびそのホモログの遺伝子同定及び同定遺伝子の組換えペプチドの発現系の構築に関する検討を進めた。ホソイトスギの雄花および花粉から mRNA を抽出し RNA-Seq を行い、得られた遺伝子配列に対して GRP ファミリーをクエリーとした BLAST サーチを行うことで GRP ホモログの網羅的な同定を試みた。他の植物の GRP でも報告されている通り、ホソイトスギからも多数の GRP パラログ遺伝子が同定された。このことが、縮重プライマーを用いた BP14 遺伝子のクローニングが困難であったことの一因であったと推定された。多数の GRP パラログ遺伝子配列の中から、すでにペプチドレベルで部分決定されている BP14 と完全に同一の領域を持つ遺伝子を同定した。RNA-Seq により同定された配列の正確性を確認するため、この配列をイトスギ mRNA より直接クローニングするための PCR プライマーを作製しその配列の再確認を行った。この配列は、RNA-Seq で決定された配列と完全に一致することを確認した。

次に、同定された BP14 配列を元にして、遺伝子組換えタンパク質発現系の構築について検討を進めた。これまでの研究から、12 個のシステインが 6 本のジスルフィド架橋を持つ GRP につ

いては、発現後のリフォールディングを必要とする大腸菌発現系と比較して、酵母を利用した分泌発現系を用いることで効率的なタンパク質生産が期待された。そこで、メタノール資化に関連した強力なタンパク質発現プロモーターが利用可能な *Pichia pastoris* を宿主とした分泌発現系の構築を行った。BP14 遺伝子の分泌シグナル領域を除いた配列は、天然から生成された BP14 の部分配列と比較すると、その N 末端側にさらに数残基の付加が見られた。他の GRP との相同性の比較検討の結果も踏まえて、成熟型のタンパク質は全長 63 アミノ酸残基からなると推定し、この領域を対象に、酵母由来の分泌シグナルを用いて発現系の構築を進めた。その結果、酵母培養培地中への BP14 の分泌発現を tricin SDS-PAGE により確認し、培養槽を用いた高密度培養でも、非常に効率的に BP14 が培地中に分泌されることを確認した。培地中に分泌した BP14 を対象としてイオン交換クロマトグラフィー及び逆相 HPLC による精製法の検討を進めた。培地中に分泌された BP14 の精製、分析の結果、野生型のジスルフィド架橋を有する分子のみではなく、誤ったジスルフィド架橋を有する多数の分子が分泌していると考えられた。そこで、MALDI-TOF MS 法、CD 法、NMR 法を用いて、野生型の立体構造を形成していると考えられる分子を含む画分の精製条件を詳細に検討し、純度の高い遺伝子組換え BP14 の精製に成功した。

次にこの遺伝子組換え BP14 を用いて、ヨーロッパのホソイトスギ花粉症患者の血清中の IgE に対する反応性の検討を進めた。Western blotting 解析の結果、組換え BP14 は、イトスギ花粉中に含まれる BP14 と同一の分子量のバンドを示し、患者血清中の IgE に対して反応性を示した。また、花粉中の BP14 に対する結合阻害実験においても、組換え BP14 は天然由来の BP14 に対して明確な阻害能を有していた。また、立体構造を形成している組換え BP14 は結合能を示したが、還元型の BP14 は結合能を有しなかったことから、患者血清中の抗 BP14 抗体は、主に立体構造認識抗体であると予想された。また、得られた組換え BP14 を用いて、モモ (Pru p7)、ザクロ (Pun g 7)、柑橘類 (Cit s 7) 等の他の果実由来 GRP に対する反応性を検討した結果から、BP14 がこれらの果実に対する PFAS 発症の原因となっている可能性が高いことが推定された。これらの結果から、我々が RNA-Seq の結果をもとにして同定した BP14 の全長の配列を WHO/IUIS のデータベースにアレルゲン Cup s 7 として登録した。

得られた Cup s 7 の組換えタンパク質発現系を用いて、NMR による立体構造解析の検討を進めた。組換え発現系を用いることで、安定同位体標識を行った試料の調製を進め、効率的な NMR 解析を目指した。その結果、良好な NMR スペクトルを得て、全アミノ酸残基の信号帰属、立体構造決定を行う事に成功した (図 1)。さらに立体構造を元にしたエピトープ予測、アレルゲン性を持つ果実由来の GRP との相同性の比較、そのホモロジーモデリングによる立体構造比較等をおこない、PFAS の原因となるエピトープ領域候補の予測を進めた (図 2)。今後、これらの研究成果を基盤とすることで、MMR 法での相互作用解析や変異体作製によるエピトープ領域の詳細な決定など PFAS の原因解明につながる研究の展開が期待できる。

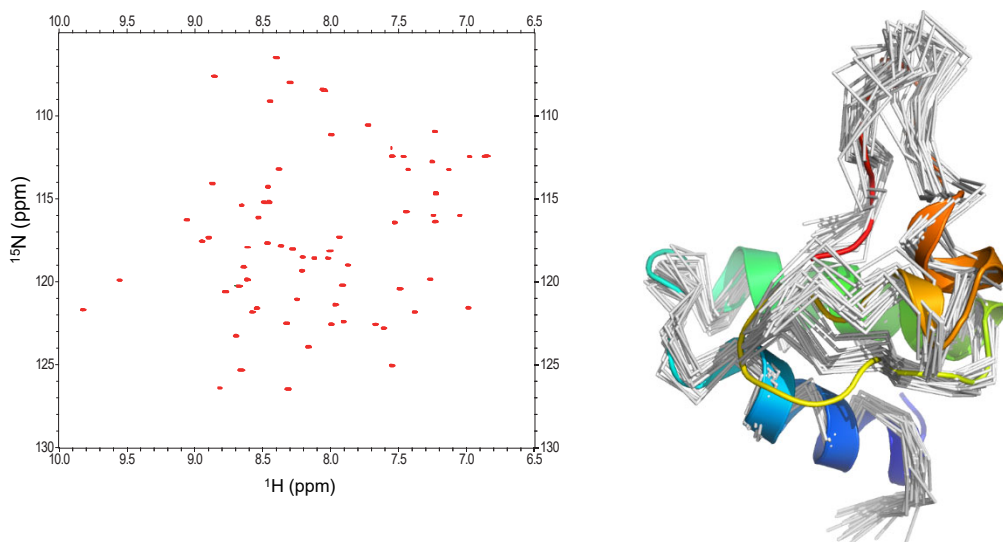


図 1 左： ^{15}N 標識 Cup s 7 の ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトル
右：Cup s 7 の NMR 立体構造

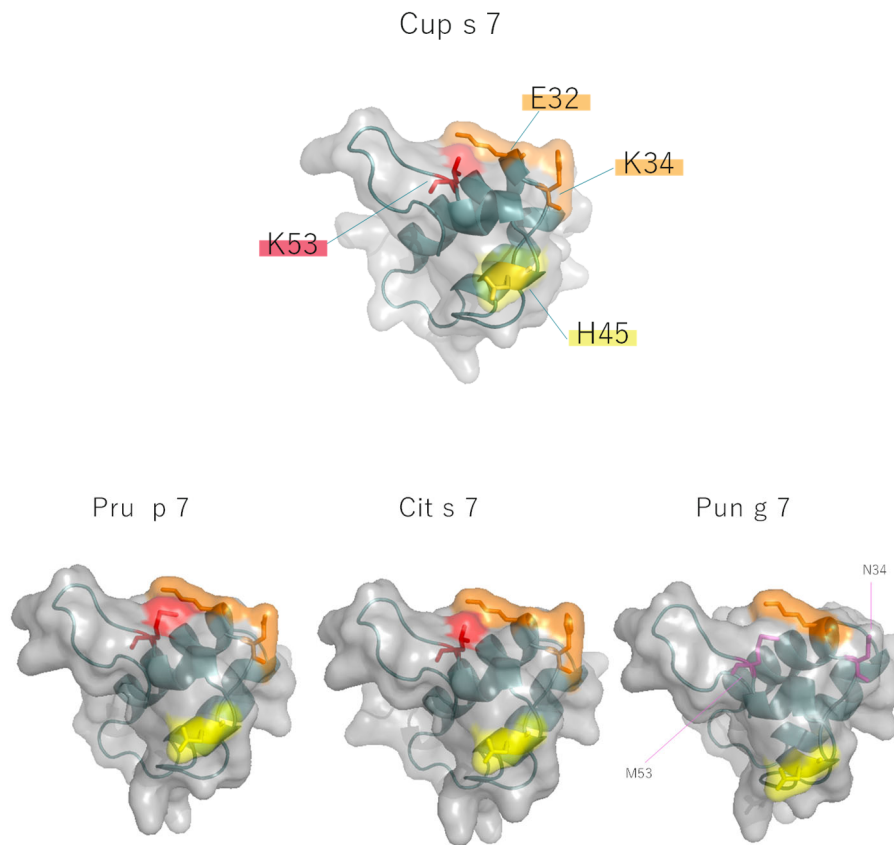


図2 Cup s 7のエピトープである可能性が高いと予測される領域と果実由来アレルゲンのホモロジーモデリング構造上での保存性
 他のアレルゲンと交差性が異なると報告のある Pun g 7 での残基の保存性が異なる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Poncet P, Aizawa T, Senechal H.	4. 巻 49
2. 論文標題 The subtype of Cupressaceae pollinosis associated with Pru p 7 sensitization is characterized by a sensitization to a cross-reactive gibberellin-regulated protein in cypress pollen: BP14.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Allergy	6. 最初と最後の頁 1163-1166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cea.13418.	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 該当する

1. 著者名 相沢智康	4. 巻 40
2. 論文標題 ホソイトスギ由来花粉関連食物アレルギー症候群原因抗原Cup s 7の解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 150-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Senechal H, Keykhosravi S, Couderc R, Selva MA, Shahali Y, Aizawa T, Busnel JM, Arif R, Mercier I, Pham-Thi N, Charpin DA, Poncet P.	4. 巻 11
2. 論文標題 Pollen/Fruit Syndrome: Clinical Relevance of the Cypress Pollen Allergenic Gibberellin-Regulated Protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy Asthma Immunol Res	6. 最初と最後の頁 143-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4168/aair.2019.11.1.143.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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			
フランス	パスツール研究所			