

<平成 27 年度助成>

果物・野菜のアレルゲンコンポーネント解析 — 代表的なアレルゲン LTP と新規アレルゲン GRP を中心に —

岡崎 史子

(龍谷大学 農学部食品栄養学科)

諸言

近年、食物アレルギー患者は増加傾向にあり、我々にとって身近であるにもかかわらず、謎の多い疾病である。未だに根治療法が確立されておらず、原因食品を食べない「除去」が第一の治療となっている。

果物・野菜のアレルギーは一般にあまり知られていないが、「平成 23 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査」によると、原因食品のうち 4% を果物類が占めている¹⁾。果物アレルギーに多い特徴として、①成長してから発症する、②発症する果物が増えていく、③花粉症を合併していることが多い、という 3 点があげられる。乳児・幼児期早期の食物アレルギーは、消化機能や免疫機能の発達と共に 8～9 割が治る一方で、成長してから発症する食物アレルギーは完治が難しいため、果物も注意すべきアレルゲンである。また、近年、少しずつではあるが野菜アレルギーの報告も増えてきている。

これまで食物アレルギーは、卵、牛乳といった原因食品名で表現されてきたが、実際にアレルギーを誘発するのはその食品中のタンパク質である。そこで、アレルゲンをタンパク質レベルで解析・診断する component-resolved diagnosis (CRD) が提唱され、アレルゲンタンパク質の同定が注目されるようになった。その中でも、Lipid Transfer Protein (LTP) は重篤な症状を誘発するうえに、あらゆる植物に相同性高く保存されているため、交差反応しやすい「汎アレルゲン」として論文が多数報告されてきた。我々はモモ LTP の研究過程で、LTP 画分中に Gibberellin Regulated Protein (GRP) というアナフィラキシーを引き起こす新たなアレルゲンが混在していることを発見した²⁾。GRP は LTP 同様に低分子量ながらシステインが多い塩基性のタンパク質である (Fig. 1)。それゆえに、通常のアレルゲン精製方法で完全に両者を分離することが困難であった。本研究では、モノクローナル抗体 (mAb) を用いたアフィニティク

| Lipid Transfer Protein | | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | |
|------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------|
| モモ | I T C G Q V S S L A P C I P Y V R G G G A V P P A - C C N G I R N V N N L A R T T P D R Q A A C N C L K Q L S A S V P G V N P N N A A A L P G K C G V S - I P Y K I S A S T N C A T V K | | | | | | | | | | | Identities |
| リンゴ |T.....G...N.....T I . S A T N . A G . I S G K N T | | | | | | | | | | | 74/91(81%) |
| オレンジ |G.....G F L . S . . P I . M P V . S L . A A T A A G . I . N L . L G A I T D . S K . R | | | | | | | | | | | 62/91(68%) |
| トマト | ..SS.FNG.I..LS.VK.K..T..R..KSLYSI.K..A.H.GV.S..MAAS.S.IDFGK..G..V..KNI.F..PKVD.S.K.R | | | | | | | | | | | 49/92(52%) |
| ジャガイモ | LS.E.T.G...L.LQ.S.PIG-G..G.VKLLGA.K.PE.KT.T..SAAN.IK.IDTGK.G..V..I..P..D.S.K.Q | | | | | | | | | | | 45/91(49%) |
| ジャポニカ米 |N.AVG..LT.A.S.S.A..V.SLKSA..A..RT..NAARGIK.L.AG..SI.K.....T.....ID.S.R.R | | | | | | | | | | | 53/92(58%) |
| シロイヌナズナ |T.A...S..LG.LSK.V..P..A.VKKL.GM.Q.....Q..R..Q---SAAK...SL.SG..K.....I..P..T.....I | | | | | | | | | | | 56/91(62%) |

| Gibberellin Regulated Protein | | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
|-------------------------------|--|---|----|----|----|----|----|----|------------|
| モモ | G S S F C D S K C G V R C S K A G Y Q E R C L K Y G G I C E K C - H C V P S G T Y G N K D E C P C Y R D L K N S K G - - - N P K C P | | | | | | | | Identities |
| リンゴ | ..P.....K.....E D | | | | | | | | 59/63(95%) |
| オレンジ | .D.....A.....R E D D H - - - K | | | | | | | | 55/63(87%) |
| トマト | .D.....N.....R D E L H K - - - G | | | | | | | | 54/63(86%) |
| ジャガイモ |K L L A D E K H K - - - K S | | | | | | | | 52/63(83%) |
| ジャポニカ米 | .D F G K S R H D D V A S N A M T T G H . A R K R | | | | | | | | 44/63(70%) |
| シロイヌナズナ | D.....G G N R D N N Y M - - - T S | | | | | | | | 51/63(81%) |

Fig.1) LTP、GRP のアミノ酸配列

ロマトグラフィーを使ってモモ LTP、GRP を完全に純化し、両者を比較しながら解析を進めることで、モモ GRP の特質を明らかにするとともに、GRP が果物・野菜の汎アレルゲンである可能性を探ることを目的とした。

実験方法

1. モモ LTP、GRP の精製

モモ（山梨白鳳）の種を除き、2 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、10mmol/L ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム、3 mmol/L アジ化ナトリウムを含む抽出溶媒（モモ：溶媒＝1：1（W/V））および 2% ポリビニルピロリドンを加え、ミキサーにより粉碎抽出を行った。その後、ガーゼでろ過し、遠心分離（10,000 × g、4℃、10 分間）により上清を回収した。上清画分にトヨパール CM 樹脂（TOYOPEARL CM 650M、東ソー）を加え、4℃で一晩攪拌吸着させた後、遠心分離（10,000 × g、4℃、10 分間）により樹脂を回収し、カラムに詰め、20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 5 により樹脂を洗浄した。その後、0.5 mol/L NaCl/20 mmol/L、リン酸緩衝液 pH 5 により吸着画分を溶出させた（CM 吸着画分）。

既得の抗 LTP mAb、抗 GRP mAb をそれぞれリガンド固定化用カップリングカラム（HiTrap NHS-activated HP Columns、GE Healthcare）に結合させ、イムノアフィニティーカラムを作製した。これを用いて、モモ CM 吸着画分より LTP、GRP をそれぞれ純化し、SDS-PAGE、ウェスタンブロットニングにて確認した（データ省略）。

2. 定量用試料溶液の調製

加工食品固形試料は、4 倍量（W/V）の PBS を加えて均質化し、モモ果実は皮と可食部に分けてそれぞれに 2 倍量（W/V）の既出の抽出溶媒と 2% PVPP を加え均質化した。それらを遠心分離（3,000 × g、4℃、20 分間）したのち上清を回収し、ろ過（No.2、Advantec）したろ液を試料溶液とした。液体試料は

そのままを試料溶液とした。

3. サンドイッチ ELISA

抗モモ GRP mAb を 5μg/mL 固相化したプレートに、モモ GRP（0～1000 ng/mL）を標準溶液として 50μL ずつ添加し、37℃で 1 時間放置した。試料溶液も適宜希釈後、同様に反応させた。なお、変性剤の影響を調べるために、モモ GRP を 0.1 M 亜硫酸ナトリウム、0.6% SDS、それぞれもしくは両者の存在下で 5 分加熱処理した後、20 倍希釈して ELISA に供した。その後、ペルオキシダーゼ標識抗モモ GRP mAb を 50μL ずつ添加し、37℃で 1 時間放置後、ELISA POD 基質 TMB キット（ナカライテスク）を用いて発色させ、主波長 450 nm、副波長 595 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。LTP についても同様に、抗モモ LTP mAb を用いてサンドイッチ ELISA を行った。

結果・考察

1. サンドイッチ ELISA の構築

先行研究にて取得済みの LTP、GRP に対する mAb を用いて、それぞれサンドイッチ ELISA を構築したところ、どちらも 1ng/mL 程度から検出可能であった。また、LTP、GRP ともに 100℃、20 分間の加熱によっても定量値が大きく低下することはなく、非常に熱安定性の高いタンパク質であることが明らかになった（Fig. 2）。これらの定量系は食品中のアレルゲンを定量することを想定している。そこで、現在市販されている特定原材料のアレルゲン検査で用いられている条件に合わせて、亜硫酸ナトリウムと SDS 存在下で定量したところ、ほとんど測定できなかった³⁾。変性剤のうちどちらが影響しているか調べた結果、SDS の影響は少ないが、亜硫酸 Na の存在により測定できなくなっていることが分かった（Fig. 3）。この理由としては、亜硫酸ナトリウムの還元作用の影響が想定される。LTP、GRP ともに、分子量が小さいにもかかわらずジスルフィド結合が多い（LTP:約 9kD、4 対、GRP:約 7kDa、6 対）（Fig. 1）。

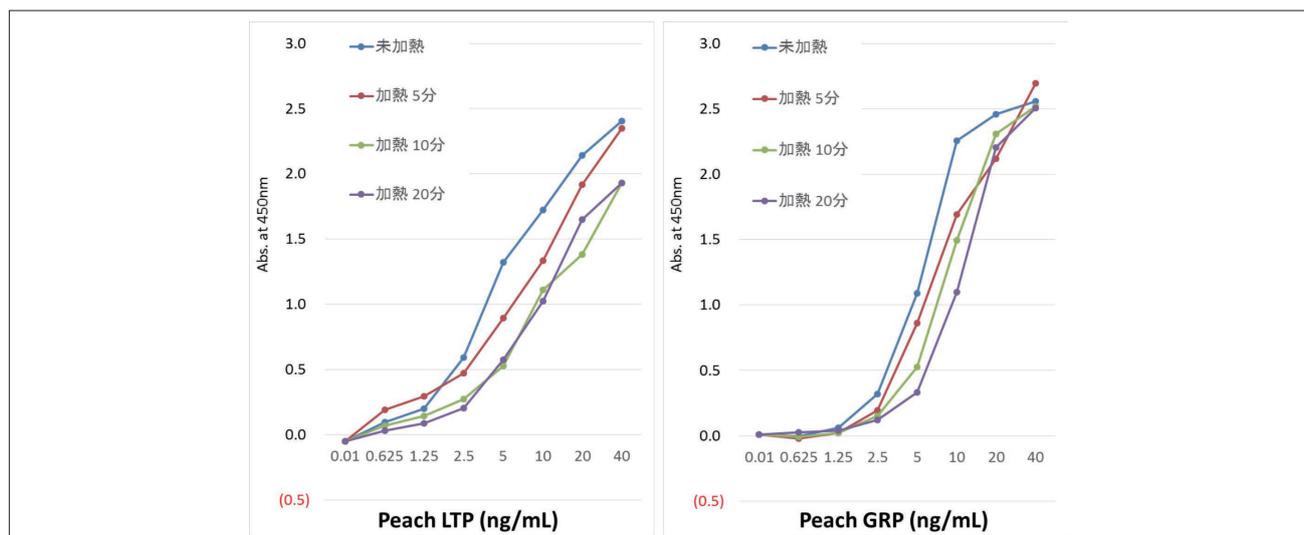


Fig.2) 加熱が定量値に与える影響

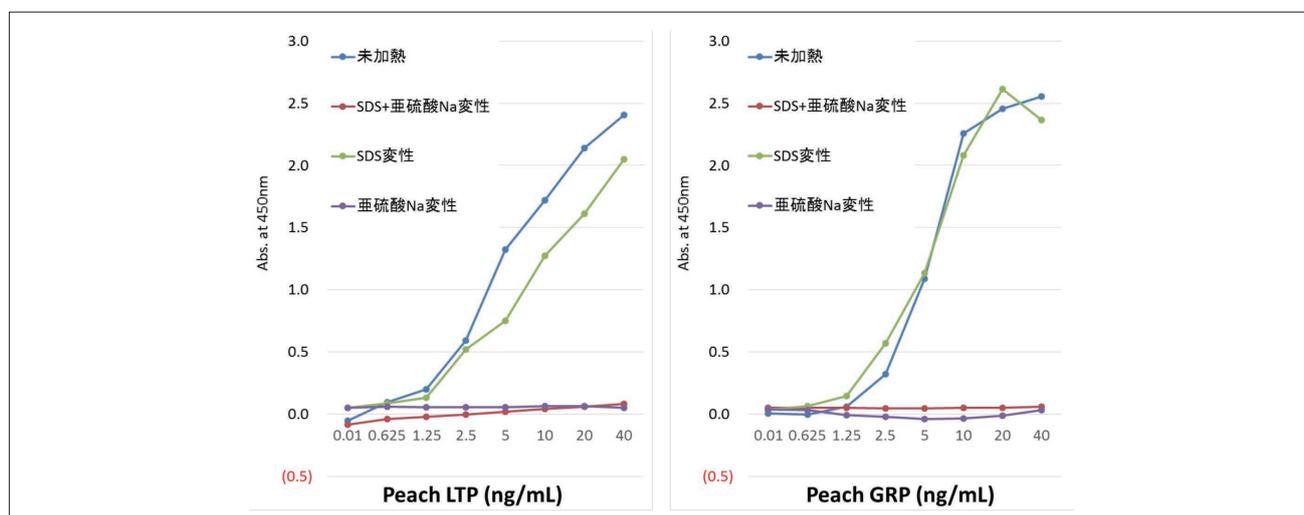


Fig.3) 変性剤が定量値に与える影響

そのため、熱変性しにくい強固な立体構造を保っているが、亜硫酸 Na により還元されジスルフィド結合が切れると立体構造が大きく崩れるため、高次構造認識の抗体が反応できなくなっていると考えられる。亜硫酸 Na は食品添加物として汎用されているため、この現象を応用することで LTP、GRP のアレルギー性を低減できる可能性も示唆された。

2. モモ使用加工品中 LTP・GRP の定量

構築したモモ LTP、GRP の定量系を用いて、モモ果実やモモ使用加工食品、モモ葉の LTP、GRP の定量を行った (Fig. 4)。LTP は植物の表層組織で生体防御に関わっていることが知られており、モモの果

実においても皮に圧倒的に多く存在していることが確認できた。一方で、GRP は可食部に多かった。モモ使用加工食品では、果汁 1% の飲料や缶詰のシロップでも LTP、GRP ともに定量可能であり、現在の通知法の条件とは異なるが、モモ使用量の評価に応用できるものであることが示された。また、民間療法で使用されることのあるモモの葉に、特に LTP が高濃度で存在することが明らかになった。近年、食物アレルギーの感作経路として「経皮感作」が注目されている。そこで、モモの葉エキスを使用した化粧品等の定量を行った (Fig. 5)。その結果、モモの葉エキス含有化粧品の 6 商品中 4 商品から、0.11ng/ml ~ 2.58ng/ml の LTP が検出された。自家製化粧

| | LTP ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{g}$) | GRP ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{g}$) |
|----------|---|---|
| 皮 | 40.5 | 3.4 |
| 可食部 | 0.6 | 23.4 |
| 果汁1%飲料 | 0.045 | 0.015 |
| 果汁30%飲料 | 2.9 | 4.7 |
| 缶詰(シロップ) | 1.6 | 2.2 |
| 缶詰(果肉) | 2.5 | 8.4 |
| 葉 | 211.0 | 3.9 |

Fig.4) モモ使用食品中 LTP、GRP の定量

| | LTP $\text{ng}/\text{ml}\cdot\text{g}$ | GRP $\text{ng}/\text{ml}\cdot\text{g}$ |
|--------------|---|---|
| モモ葉エキス含有化粧水1 | 1.55 | - |
| モモ葉エキス含有化粧水2 | 2.58 | - |
| モモ葉エキス含有化粧水3 | 2.19 | - |
| モモ葉エキス含有化粧水4 | 0.11 | - |
| モモ葉エキス含有化粧水5 | - | - |
| モモ葉エキス含有化粧水6 | - | - |
| モモ葉エキス | 0.3 | 0.08 |
| 乾燥モモ葉煎じ液 | 357 | - |

Fig.5) モモの葉エキス配合化粧品中 LTP、GRP の定量

品作製用に販売されていた桃の葉エキスの原液では、LTP : 0.3ng/ml、GRP : 0.08ng/ml が検出された。自家製桃の葉エキス作製用に販売されていた乾燥モモの葉を添付書類にしたがって煎じた液では、357ng/ml の LTP が検出された。いずれも低濃度ではあるが、モモの葉エキスは、皮膚バリアが低下しているときに使用されることが多いため、注意が必要であると考え。

3. モモの状態別 LTP・GRP の定量

LTP は植物の感染特異タンパク質 (pathogenesis-related protein) として知られており、植物の生体防御に関わっている。GRP についての統一された見解はないが、植物にとっての生体防御タンパク質であるという報告や、植物の成長、果実の成熟に関わっているという報告があるため、モモ果実を、未熟、完熟、過熟、病気・虫食いに分類してそれぞれ定量を行った (Fig. 6, 7) ^{4~6)}。過熟や病気・虫食いのサンプルで GRP が多い傾向がみられた。同様に LTP

も測定したところ、皮の LTP 量も、過熟、病気・虫食いのサンプルで多かった。モモの果実は、熟した後、過熟状態になるまでの期間が短いため傷病との区別は難しいが、LTP、GRP とともに熟すとともに多くなることは明らかになった。

そこで糖度との関連を調べるために、完熟に分類したモモ 4 個の可食部を細かく切り分けてそれぞれ抽出し、糖度と GRP の量の関連を調べた (Fig. 8)。LTP は皮に圧倒的に多く、可食部には少ないので検討しなかった。個体間で糖度と GRP 量の関連はみられなかったが、個体内では、GRP 量が比較的多い 30、31 では、糖度と GRP の量に高い正の相関がみられた。植物の生長や果実の成熟には、日照、気候、物理的的刺激、微生物感染、収穫後の保存状態など、あらゆる因子が影響するために条件をそろえることが難しく、この結果から糖度と GRP 量の関連について述べることはできないが、果実の成熟との関連が示唆された。

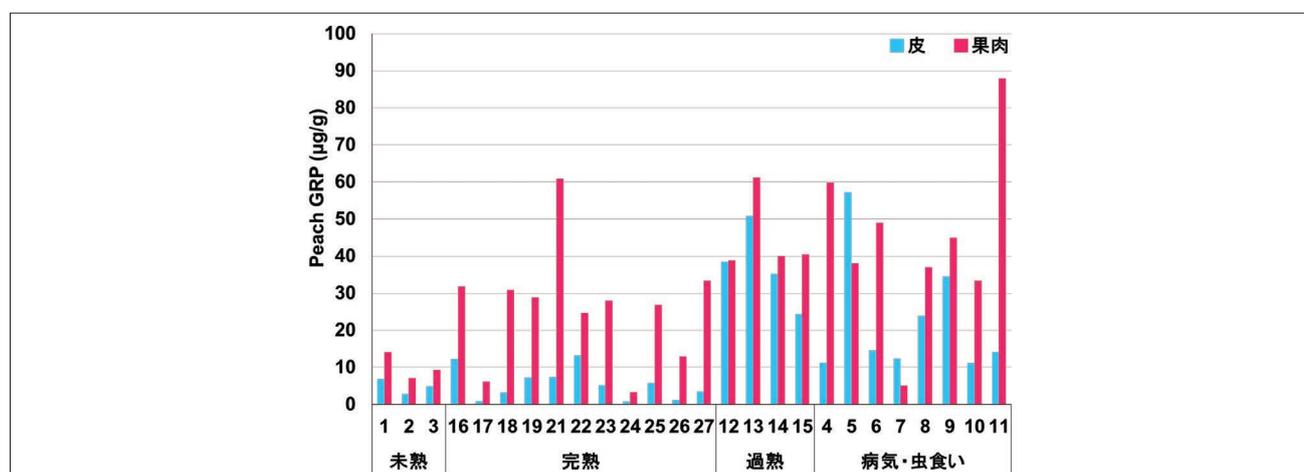


Fig.6) 状態別モモ果実中 GRP の定量

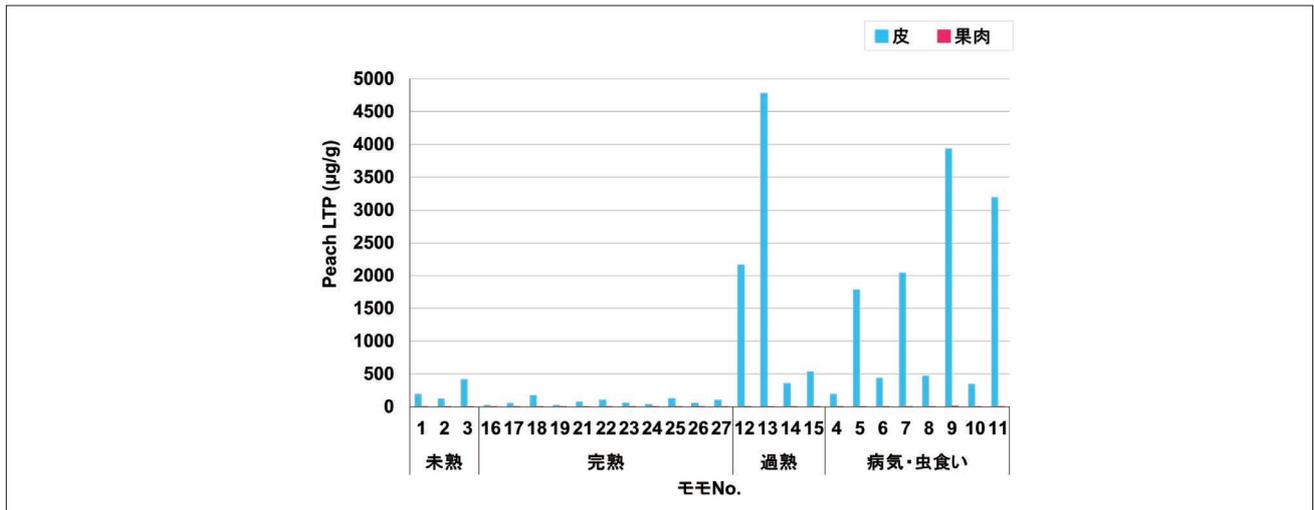


Fig.7) 状態別モモ果実中LTPの定量

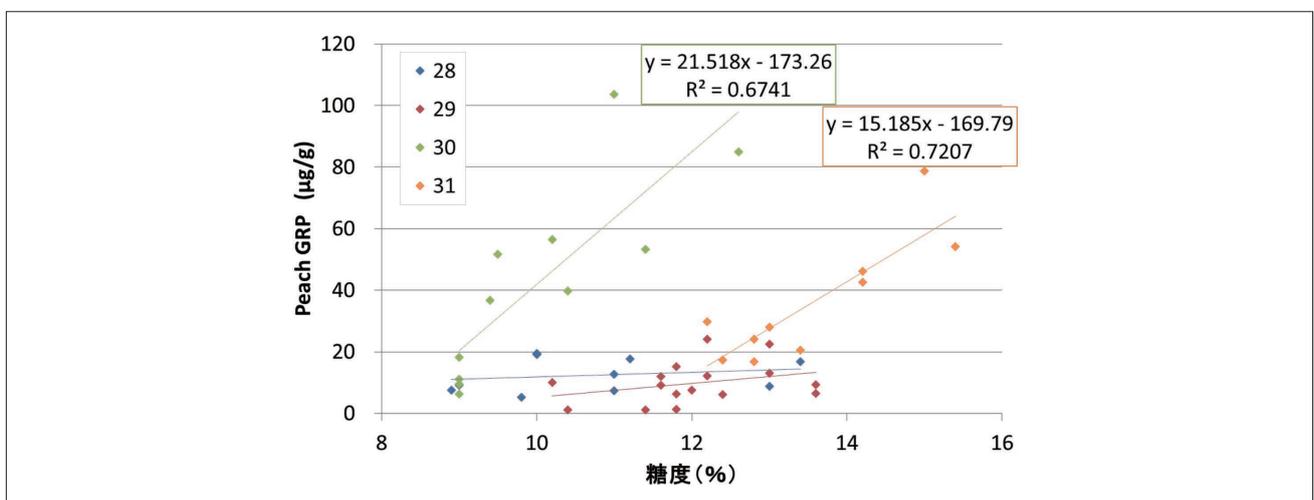


Fig.8) モモ果肉の糖度とGRP量の関係

まとめ、今後の展望

近年、GRPの植物における機能に関する報告が増えてきている。あらゆる植物に相同性高く保存されていることから考えても、植物にとって重要な働きをしているタンパク質であることが予想される。実際に、GRPの抗微生物活性を利用した遺伝子組み換え植物の開発などの報告もある⁷⁾。従って、GRPが遺伝子組み換え食品として商業利用される前に、GRPのタンパク質としての性質やアレルギー性を明らかにしていくことは、重要であると考えている。また、本研究で用いたモノクローナル抗体カラムがリンゴ、ブドウ、トマト、ジャガイモなどの広範なGRPの純化にも応用できることが判明しているの

で、今後は、GRP研究を果物のみならず野菜やイモ類へと拡大していきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆さまに心より感謝致します。貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。引き続き本研究を進め、成果を還元できるよう精進してまいります。

参考文献

- 1) 食物アレルギーの診療の手引き 2014、研究代表者 海老澤元宏
- 2) Inomata N, Okazaki F, Moriyama T, Nomura Y, Yamaguchi Y, Honjoh T, Kawamura Y, Narita H, Aihara M.(2014) Identification of peamaclein as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 112 (2):175-177.
- 3) アレルギー物質を含む食品に関する表示について (平成 25 年 9 月 20 日付け消食表第 257 号)
- 4) Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F. (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.*12(1):16-23.
- 5) Nahirñak V, Almasia NI, Fernandez PV, Hopp HE, Estevez JM, Carrari F, Vazquez-Rovere C.(2012) Potato snakin-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism, and cell wall composition. *Plant Physiol.*158 (1):252-63.
- 6) Moyano-Cañete E, Bellido ML, García-Caparrós N, Medina-Puche L, Amil-Ruiz F, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R. (2012) FaGAST2, a strawberry ripening-related gene, acts together with FaGAST1 to determine cell size of the fruit receptacle. *Plant Cell Physiol.* 54(2):218-36.
- 7) Almasia NI, Bazzini AA, Hopp HE, Vazquez-Rovere C. (2008) Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Mol Plant Pathol.* 9(3):329-38.

Allergen component analysis of fruit and vegetables -the representative allergen LTP and the novel allergen GRP-

Fumiko Okazaki

*Department of Food and Science and Human Nutrition, Faculty of Agriculture
Ryukoku University*

Summary

The number of reports appearing on food allergies concerned with component-resolved diagnosis (CRD) has been increasing. In particular, CRD is useful for the clinical type classification of plant allergies, as they often have common allergens. Recently, we have found that severe symptoms in patients allergic to peaches were not only related to lipid transfer protein (LTP), but also to gibberellin-regulated protein (GRP), in Japan. The aim of this study was to characterize peach GRP via a comparison to peach LTP.

It is quite difficult to separate the LTP and GRP proteins completely using conventional procedures, due to their similar chemical characteristics. Therefore, LTP and GRP were purified using immunoaffinity column chromatography, constructed using the respective monoclonal antibodies. For the determination of peach LTP and GRP, sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assays were also developed using the respective monoclonal antibodies. Both peach LTP and GRP displayed strong heat stability, but were easily denatured by reducing agents. While GRP was mainly localized in peach pulp, LTP was localized in the peel. Peach leaves were also rich in LTP, but contained little GRP. Finally, the concentrations of LTP and GRP in over-ripe peaches were higher than in immature peaches.