

<平成 28 年度助成>

## リンゴ OAS アレルゲンである Mal d 1 mRNA 発現量の リンゴ品種間の違いについて

—日本で栽培されている品種についての網羅的解析—

沖嶋 直子

(松本大学 人間健康学部 健康栄養学科)

### 緒 言

口腔アレルギー症候群 (OAS) は野菜や果物を食べると口腔、咽頭内に限局した症状を示す食物アレルギーの一種である<sup>1)</sup>。OAS は種々の花粉症やラテックスアレルギーに合併する<sup>2)</sup>が、シラカンバ花粉症患者に合併するリンゴ OAS が最も多い。日本では、北海道のシラカンバ花粉症患者の約 7 割がリンゴ OAS を伴うことが報告されている<sup>3)</sup>。さらに近年、本州でもハンノキやオオバヤシャブシ等のハンノキ属花粉症に伴うリンゴ OAS が報告されている<sup>4,5)</sup>ことから、今後、日本全国においてリンゴ OAS 患者の増加が懸念される。

日本や欧州のうち中欧から北欧におけるリンゴ OAS の主要アレルゲンは Mal d 1 であり、Mal d 1 とシラカンバ花粉主要抗原である Bet v 1 とが交差性を示す<sup>1)</sup>。欧州では、ゴールデンデリシャス (GD) は Mal d 1 量が多くほぼ全ての OAS 患者が症状を示すこと、サンタナは Mal d 1 量が少なく半数の患者は症状を示さず食べられる<sup>6-11)</sup>ことが明らかである。しかし、日本では同様の調査結果は皆無で、海外でも栽培されているふじ他数品種を除き、日本栽培種に関する情報は全くない。欧州における Mal d 1 定量結果から、Mal d 1 量の少ない日本栽培種が見いだせれば、国内のリンゴ OAS 患者の半数程度はリンゴが生食できるようになると考えられる。

これらの背景から、本研究では日本で栽培されているリンゴ品種によるアレルゲン性の違いを明らかにすることを目的として、Mal d 1 mRNA 量を定量し品種間比較した。

### 方 法

#### 1. 試料

2017 年 1～3 月、および 8～12 月に長野県松本市内とその近郊の小売店や直売所で購入した長野県産のリンゴ 23 品種の他、こうたろうは松本市内で自家用に栽培されたものを試料とした。試料に用いたリンゴ品種の情報を表 1 に示す。

#### 2. リアルタイム PCR による Mal d 1 mRNA の 相対定量

##### (1) RNA 抽出および逆転写

RNAqueous Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に RNA Isolation AID (Thermo Fisher Scientific) を併用して RNA を抽出した。SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用し、40ng/ 反応で逆転写を行った。

##### (2) Mal d 1.01 および Mal d 1.02 の定量

Botton らの論文<sup>12)</sup>を参考に、Mal d 1.01 および 1.02 の mRNA 発現量を相対定量した。25 $\mu$ L/ ウェルの反応系で Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR System (Thermo Fisher Scientific) にて Mal d 1.01 および 1.02 の mRNA 発現量を分析した。レポーター蛍光色素には PowerUP SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、同時に分析したユビキチンの Ct 値から  $\Delta$ Ct 値を求め、 $2^{-\Delta Ct}$  から相対定量値を求めた。

表1 分析を行ったリンゴ品種一覧

| 品種          | 掛け合わせ                            | 品種       | 掛け合わせ                    |
|-------------|----------------------------------|----------|--------------------------|
| ふじ (サンふじ)   | 国光×デリシャス                         | 昂林       | ふじの自然交雑実生                |
| ぐんま名月       | あかぎ(GDの自然交雑実生)×ふじ                | トキ       | 王林 (GD×印度) ×ふじ           |
| シナノゴールド     | GD×千秋 (東光 (GD×印度) ×ふじ)           | 新世界      | ふじ×あかぎ(GDの自然交雑実生)        |
| シナノスイート     | ふじ×つがる (GD×紅玉)                   | ジョナゴールド  | GD×紅玉                    |
| あいかの香り      | ふじの自然交雑実生                        | シナノピッコロ  | GD×千秋                    |
| ピンクレディー     | レディーウィリアムス×GD                    | 陽光       | GD×不明                    |
| こうたろう       | ふじ×はつあき (紅玉×GD)                  | 千秋       | 東光 (GD×印度) ×ふじ           |
| つがる (サンつがる) | GD×紅玉                            | シナノホッペ   | あかね (紅玉×ウースター・ペアメイン) ×ふじ |
| シナノレッド      | つがる (GD×紅玉) ×ビスタベラ               | こうとく     | 東光 (GD×印度) の自然交雑実生       |
| きおう         | 王林 (GD×印度) ×はつあき (紅玉×GD)         | 王林       | GD×印度                    |
| 紅玉          | 偶発実生                             | ホワイトスイート | 不明                       |
| 秋映          | 千秋 (東光 (GD×印度) ×ふじ) ×つがる (GD×紅玉) | 北斗       | ふじ×陸奥 (GD×印度)            |

### 3. 統計解析

日本での生産、消費が最も多いサンふじを対照として t 検定にて有意差検定を行った。解析には SPSS ver. 20 (IBM, Armonk, NY, USA) を使用した。

## 結 果

### 1. リアルタイム PCR による Mal d 1 mRNA の相対定量

ユビキチンを内在性コントロール遺伝子とした相対定量の結果、Mal d 1.01 発現量がサンふじと比較して有意に低かったのはあいかの香り、こうたろう、サンつがる、シナノレッド、きおう、秋映、昂林、トキ、新世界、シナノピッコロ、千秋、シナノホッペ、王林、ホワイトスイートで、有意に高かったのはこうとくであった (図1)。Mal d 1.02 発現量がサンふじと比較して有意に低かったのはシナノゴールド、あいかの香り、こうたろう、サンつがる、秋映、昂林で、有意に高かったのはシナノレッド、紅玉、トキ、新世界、ジョナゴールド、陽光、千秋、こうとく、ホワイトスイート、北斗であった (図2)。

## 考 察

Mal d 1 にはその mRNA 配列やタンパク質の 1 次構造がわずかに異なるバリエーションが多数存在する<sup>13)</sup>が、今回は発現量がとくに多い Mal d 1.01 および 1.02<sup>12, 13)</sup>の定量を行った。

日本では、病原菌やウイルスによる感染や虫害を防ぐために果物に袋をかけて栽培するが、リンゴは果皮を鮮やかな赤色にしたり糖度を増したりするため無袋栽培することがあり、無袋栽培された品種はその名称の前に「サン」がつく。Mal d 1 は病原菌抵抗タンパク質 PR-10 ファミリーであることから<sup>14)</sup>、無袋栽培された方が病原菌等の害を受けやすく、Mal d 1 mRNA 発現量が高くなると予想していた。しかし、サンふじは最も発現量が高かったこうとくの半分程度の発現量であり、サンつがるはサンふじと比較して有意に低かった。この結果から、無袋栽培による病原菌感染の影響よりも品種の違いが Mal d 1 量に影響する可能性が考えられた。欧州において、ゴールデンデリシャスの Mal d 1 発現量が高いことが報告されていたことから<sup>6-8)</sup>、ゴールデンデリシャスの子孫に相当する品種は Mal d 1 発現量が高いと予想しリンゴの掛け合わせを調べた(表1)。しかし、今回分析したリンゴ品種においては紅玉および昂林以外の 22 品種が GD を親や祖父母に持つ

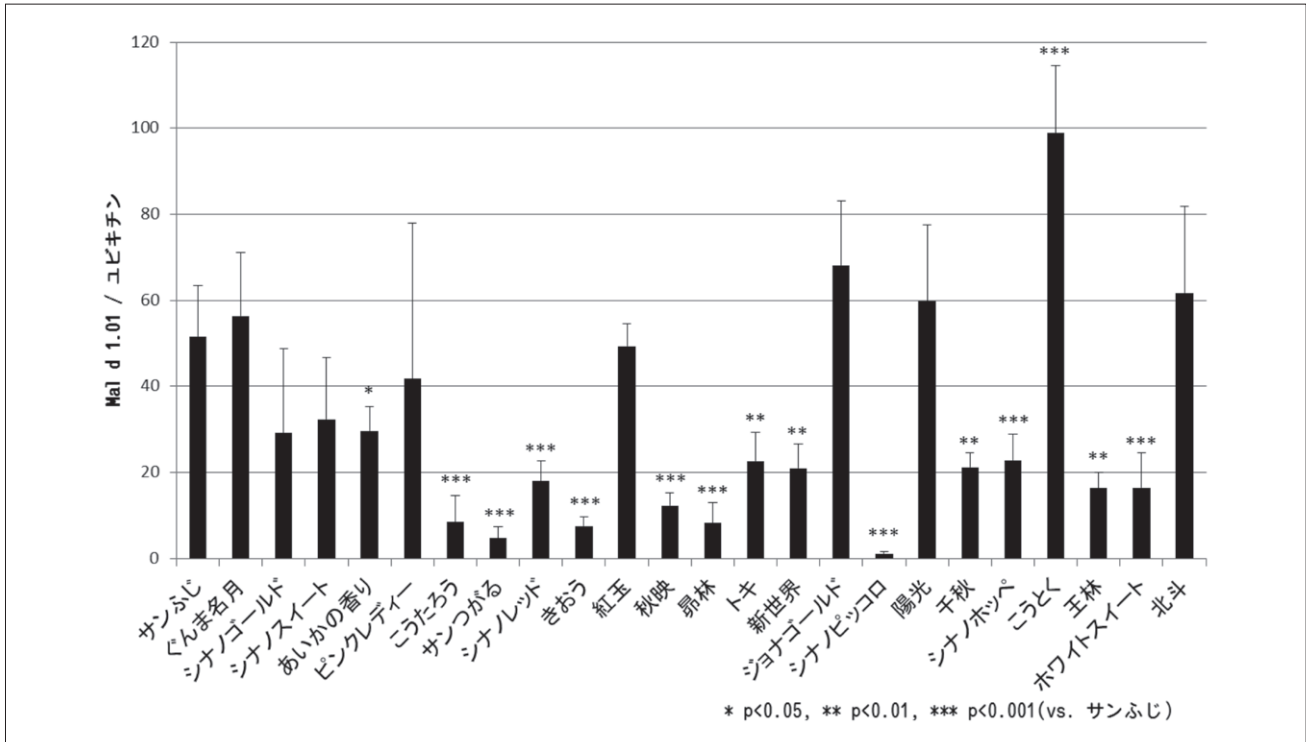


図1 Mal d 1.01 相対定量値

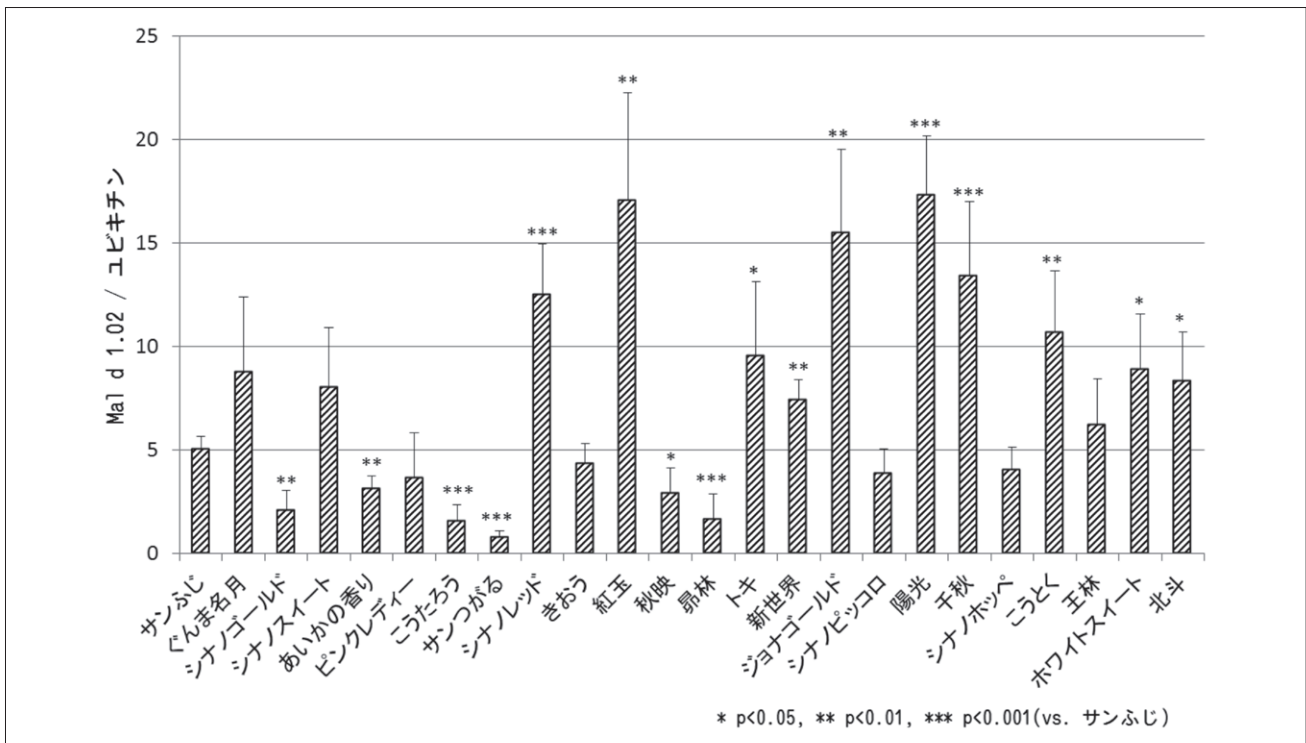


図2 Mal d 1.02 相対定量値

品種であり、このうち、こうとくのみが Mal d 1.01 および 1.02 のいずれにおいても発現量が有意に高かった他は、シナノレッド、シナノゴールド、トキ、新世界、陽光、千秋、こうとくにおいて Mal d 1.02

発現量のみサンふじと比較して有意に高かった。また、こうたろう、サンつがる、秋映では Mal d 1.01、1.02 ともサンふじと比較して有意に低かった。今回の mRNA 定量結果から、ゴールデンデリシャスの子

孫では Mal d 1.02 の発現量が高くなる品種が多く見られた反面、Mal d 1.01 発現量はこうとく 1 品種のみ高いことが明らかとなった。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、助成いただいた公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 中丸裕爾, 日本耳鼻咽喉科学会会報, 117, 702-703 (2014)
- 2) 朝倉光司, 口咽科, 18,291-6 (2006)
- 3) 山本哲夫ら, 日本耳鼻咽喉科学会会報 111, 588-593 (2008)
- 4) 守田亜希子ら, アレルギー, 57, 138-146 (2008)
- 5) 加藤泰輔, 日本小児アレルギー学会誌, 29, 676-684 (2015)
- 6) Sancho et al., J.Agric.Food Chem., 54, 5917-23 (2006)
- 7) Matthes et al., J.Agric.Food Chem., 57, 10548-53 (2009)
- 8) Schmitz-Eiberger et al., Food Chem., 127, 1459-64 (2011)
- 9) Vlieg -Boerstra et al., Allergy, 66, 491-8 (2011)
- 10) Bolhaar et al., J.Allergy Clin. Immunol., 116, 1080-6 (2005)
- 11) Koostra et al., Ann.Allergy Asthma Immunol., 99, 522-5 (2007)
- 12) Botton et al., J.Agric Food Chem., 56, 6707-6716 (2008)
- 13) Pagliarani et al., BMC Plant Biol., 13;51 (2013)
- 14) Breiteneder and Ebner, J.Allergy Clin. Immunol., 106, 27-36 (2000)

## **Differences of Apple OAS Allergen Mal d 1 mRNA Expression Level in Apples Cultivated in Japan**

**Naoko OKISHIMA**

*Department of Human Health Science, Faculty of Human Health Science,  
Matsumoto University*

Oral allergy syndrome (OAS) is a type 2 food allergy in which symptoms are localized in the oral cavity. In both Hokkaido and Europe, there are many patients with birch pollen allergy who concomitantly develop apple OAS, and the number of *Alnus* pollinosis patients with concomitant apple OAS has recently been increasing in Honshu. Varietal differences in allergens have been clarified in Europe. However, most cultivars are not common between Europe and Japan, and there is no information regarding the allergens of varieties cultivated in Japan, with the exception of several varieties cultivated overseas, such as Fuji. With this background, we compared the mRNA levels of Mal d 1.01 and Mal d 1.02, which are high among the main allergens of apple OAS (Mal d 1), using apple varieties cultivated in Japan, and especially in Nagano Prefecture.

Using 24 varieties of apples produced in Nagano Prefecture as samples, relative quantification was performed using real-time PCR. Compared with that in Sun Fuji, the Mal d 1.01 mRNA expression level was significantly lower in 15 varieties, including Aika No Kaori, but was significantly higher in Koutoku. The Mal d 1.02 mRNA expression level was significantly lower in 6 varieties, including Shinano Gold, and significantly higher in 10 varieties, including Shinano Red.

As Mal d 1 is a pathogen-resistance protein, we hypothesized that the expression level increases in varieties that are not cultivated in bags, although it was not high in Sun Fuji or Sun Tsugaru. We next investigated the association of crossbreeding with Mal d 1 mRNA expression level. Among descendent varieties of Golden Delicious with high allergenicity, the Mal d 1.01 expression level was significantly higher in Koutoku, but was not significantly different from, or significantly lower than that in Fuji. Regarding the Mal d 1.02 expression level, the crossbred varieties were divided into those with significantly higher or lower expression levels.