

研究課題名	「花粉関連食物アレルギー症候群」における原因抗原のエピトープ構造解析と低アレルゲン化食品の開発基盤		
フリガナ	マルヤマ ノブユキ		
代表者名	丸山 伸之		
所属機関（機関名） （役職名）	京都大学大学院農学研究科 教授		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	福富 友馬 (フクトミ ユウマ)	国立病院機構相模原病院 室長	患者血清の収集と臨床評価
本助成金による発表論文、学会発表	1) 日本農芸化学会 2021 年度大会 2021 年 3 月 21 日 花粉関連食物アレルギー症候群における gibberellin-regulated protein の交差要因の解析 蕭喬丹, Cabanos Cerrone, 福富友馬, 丸山伸之 2) 日本農芸化学会近畿支部第 519 回講演会 2022 年 2 月 5 日 スギ花粉との交差反応に関与するモモ gibberellin-regulated protein のエピトープ解析 蕭喬丹, 石井翠, Cabanos Cerrone, 福富友馬, 丸山伸之		

研究結果要約

大規模に収集した果物類アレルギー患者の血清から gibberellin-regulated protein (GRP) 陽性を示す患者を選抜し、本研究に使用した。スギ及びヒノキ花粉中に GRP に対するウサギ抗血清と反応するタンパク質を検出し、スギおよびヒノキ花粉中に GRP が存在していることを示した。Cry j 7 (スギ GRP) と Pru p 7 (モモ GRP) の交差反応性を検討するために、組換え型 Pru p 7 および組換え型 Cry j 7 を調製し、競合的に ELISA を行った。Cry j 7 で患者血清に対し前処理を行うことにより、Pru p 7 に対する患者血清中の IgE 抗体結合性が低下したことから、Cry j 7 と Pru p 7 は交差反応する可能性が示唆された。さらに、Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応に影響を及ぼすアミノ酸残基を同定するため、Cry j 7 と Pru p 7 との間で共通するアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異型 Pru p 7 を作製した。それらの患者血清中の IgE 抗体との結合性を野生型と比較したところ、IgE 結合性が低下した複数の変異体が見出された。また、還元条件下での熱変性処理により、Pru p 7 の血清中の IgE 抗体との結合性が低下した。以上のことから、ヒノキ科花粉と果物類との交差に関わる GRP のアミノ酸残基を特定するとともに、GRP の高次構造がエピトープ形成に影響することを示した。

研究目的

「花粉食物アレルギー症候群」は、花粉と食物のアレルゲン間での交差反応によって起こるアレルギーである。花粉が一次感作源とされており、生の野菜や果物を摂取した際に症状が出る頻度が高い。口腔アレルギーを示すことが多いが、全身症状を示すこともある。「花粉食物アレルギー症候群」の原因となる代表的なアレルゲンは感染特異的タンパク質-10(pathogenesis-related protein: PR-10)やプロフィリンである。PR-10 やプロフィリンは一次構造の保存性が高いことから植物間で立体構造が類似し、交差反応しやすいとされている¹⁾。最近、GRP が「花粉食物アレルギー症候群」の原因アレルゲンである可能性が指摘されている²⁾。GRP は snakin/GASA プロテインファミリーに属する抗菌ペプチドで、植物において病原菌に対する防御などに寄与するとされる³⁾。GRP は分子量 7-8kDa であり、12 個のシステイン残基から成る 6 個のジスルフィド結合をもつ²⁾。これらのジスルフィド結合によって GRP は熱や消化酵素に対する耐性を持つ²⁾。モモ(Pru p 7)、ウメ(Pru m 7)、オレンジ(Cit s 7)、ザクロ(Pun g 7)の GRP が果物類のアレルゲンと報告されている。これらの GRP 間におけるアミノ酸配列同一性は非常に高く、Pru p 7 は Pru m 7 と同一のアミノ酸配列をもつ⁴⁾。さらに、スギ花粉においても Cry j 7 が報告され⁵⁾、アミノ酸配列の類似性から、ヒノキ科花粉と果物の GRP 間で交差反応し「花粉食物アレルギー症候群」を引き起こす可能性が考えられている⁶⁾。

本研究では、大規模に収集した果物類アレルギー一患者血清を対象に GRP に感作されている陽性検体を選抜する。また、スギ及びヒノキ花粉に含まれる GRP に対する抗ウサギ血清を作製し、そられの花粉中での存在について検討し、比較する。さらに、スギ・ヒノキ花粉と果物類アレルギーでの GRP の交差反応を検証するために、それぞれの組換えタンパク質を作製するとともに、選抜する GRP 陽性検体を用いて、スギ及びヒノキ花粉と果物類の GRP の交差反応を解析する。交差反応に関与する可能性があるアミノ酸残基への変異導入や、構造変化による血清との反応性への影響について解析する。

上記により、「花粉食物アレルギー症候群」における交差反応の原因となる GRP の抗原性の要因やエピトープを解明することを目的とする。

研究計画及び研究手法

項目 1. 果物類アレルギー患者の原因抗原の解析

100 名以上の果物類アレルギーの確定診断がなされた患者の血清を保存している。これらの患者血清について、GRP 感作を示す果物類アレルギー患者を選抜する。測定には、酵素標識したヒト IgE 抗体に対するモノクローナル抗体と蛍光基質を用いた酵素結合免疫吸着法を用いる。

項目 2. スギ及びヒノキ花粉 GRP の解析

Cry j 7 をウサギに免疫して、Cry j 7 に対する抗血清を調製している。スギ及びヒノキ花粉よりタンパク質を抽出し、等量の抽出液に対して

GRP に対するウサギ抗血清を用いてウェスタンブロットを行い、スギ及びヒノキ花粉中の GRP 量を検証する。

また、GRP に対するウサギ抗血清との反応性を指標に花粉からの粗抽出液についてカラムクロマトグラフィーを行い、GRP を精製する。精製物に対して質量分析を行い、花粉中の GRP であることを確認する。

項目 3. 果物類 GRP 陽性患者における果物及び花粉 GRP の交差反応の解析

Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応性を検証するために精製した Cry j 7 と Pru p 7 を用いて競合 ELISA 試験を行う。そのため、Cry j 7 と Pru p 7 をメタノール資化性酵母により発現させ、クロマトグラフィーにより精製する。Pru p 7 陽性患者血清に対し Cry j 7 を用いて前処理した血清と未処理の血清について ELISA 法により特異的 IgE 抗体価測定を行い、Pru p 7 に対する IgE 結合性の違いを比較する。

項目 4. 「花粉食物アレルギー症候群」における GRP の交差エピトープ構造解析

交差反応には、果物類 GRP とスギ・ヒノキ花粉 GRP 間で共通性の高いエピトープが存在する必要がある。両 GRP についてアライメント上で一致するアミノ酸残基を置換した様々な組換えタンパク質(変異体)を調製し、それらに対して GRP 陽性患者血清中の特異的 IgE 抗体量を測定する。結合量が減少する変異体において置換した

アミノ酸残基を指標にして、IgE 抗体との結合および交差反応に関わる GRP のアミノ酸残基を同定する。類似タンパク質の立体構造データに基づいて GRP のホモロジーモデルを作製し、交差反応に寄与するエピトープの構造を特定する。

項目 5. 交差エピトープ構造を破壊するための加工・調理条件に関する基盤解析

果物類は、未加熱で食するとともに、加熱処理や酸処理などを行うことも多い。果物類 GRP の加熱処理において、果物類 GRP が構造変化を起こす条件を明確にする。さらに、その条件下で構造変化と果物類アレルギーの患者血清中の IgE 抗体との結合能について解析することにより、抗原性と加工・調理との関係について基礎的知見を得る。

結果と考察

項目 1. 果物類アレルギー患者の原因抗原の解析

100 名以上の果物アレルギー患者血清を用いて GRP に対する特異的 IgE 抗体を測定し、20-30 名の患者に特異的 IgE 抗体を検出した。これらの血清を本研究に使用した。

項目 2. スギ及びヒノキ花粉 GRP の解析

ヒノキ花粉およびスギ花粉より陽イオン交換カラムを用いて GRP を部分精製し、ウサギ抗 GRP 血清を用いたウェスタンブロッティングにおいてスギ及びヒノキ花粉の分画物からウサギ抗血清と反応するバンドを検出した。さらに、陽

イオン交換カラムからの溶出分画をゲル濾過カラムによって精製した。溶出画分に対してウェスタンブロッティングを行い、GRP と予想される SDS-PAGE でのバンドについて質量分析を行ったところ、ヒノキ科花粉の GRP である Cup s 7 および Jun a 7 に含まれる配列を同定した。また、Cry j 7 にも類似した配列が含まれていた。このことは、ヒノキ花粉にも他のヒノキ科 GRP と類似した一次構造をもつ GRP が含まれていることを示している。

項目 3. 果物類 GRP 陽性患者における果物類及びスギ花粉 GRP の交差反応の解析

組換え型 Cry j 7 及び Pru p 7 をメタノール資化性酵母により発現させた。発現タンパク質はイオン交換カラム及びゲル濾過カラムを用いて精製した。精製タンパク質について質量分析により Cry j 7 と Pru p 7 であることを確認した。精製した Cry j 7 及び Pru p 7 についてゲル濾過クロマトグラフィーでの溶出時間を比較したところ、共に分子量より予想される時間に溶出され、単量体として溶液中に存在していることが示唆された。Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応性を検証するために精製した競合 ELISA 試験を行った。Pru p 7 陽性を示す果物アレルギー患者血清に Cry j 7 を加えて 4℃で一晩インキュベートした。処理した血清および未処理血清(コントロール)を用いて ELISA 試験を行い、Pru p 7 に対する血清中の IgE 抗体の結合性の比較を行った。その結果、前処理した血清では未処理血清よりも IgE 結合

性が低下していた。このことは、Cry j 7 が患者血清中の GRP 特異的 IgE 抗体と結合することにより、Pru p 7 の血清中の IgE 抗体への結合が阻害されたことを示している。以上のことから、Cry j 7 と Pru p 7 は血清学的に交差反応する可能性が考えられた。

項目 4. 「花粉食物アレルギー症候群」における GRP の交差エピトープ構造解析

Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応に影響を及ぼすアミノ酸残基を調べるために、Cry j 7 と Pru p 7 の共通アミノ酸残基を一残基ずつアラニン残基に置換した変異型 Pru p 7 を約 20 種類設計した。それらについて野生型と同様の方法により組換えタンパク質を発現及び精製した。精製した全ての変異型は SDS-PAGE において野生型とほぼ同じ位置にバンドを示し、ウェスタンブロッティングにおいても野生型と同様に発色した。会合状態の確認のために変異型 Pru p 7 についてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、野生型との比較を行った。3 種類の変異型は野生型とほぼ同じ時間に溶出されたが、その他の多くの変異型は野生型よりも少し早く溶出された。変異型 Pru p 7 の二次構造を比較するために円偏光 2 色性測定を行った。8 種類の変異型は野生型とほぼ同じスペクトルを示したが、それ以外の変異型は野生型とは異なるスペクトルを示した。変異型 Pru p 7 について果物アレルギー患者血清を用いた ELISA 測定を行い、野生型と比較した。いくつかの変異型は野生型と比べて IgE 抗体結合性が著しく低下し

ていた。IgE 抗体結合性が低下した変異型は患者によって異なっており、IgE 抗体結合に寄与するアミノ酸残基が患者間で異なっていることが示唆された。野生型と比較した変異型の平均 IgE 抗体結合率を算出した。野生型と比較して IgE 抗体結合率が約 60-80%を示す変異型、IgE 抗体結合率が大きく低下した変異型が複数見出された。これらの変異型のアミノ酸残基は Cry j 7 と Pru p 7 について交差反応に寄与すると考えられる。また、これらのアミノ酸残基は Pru m 7、Pun g 7、Cit s 7 にも保存されていたことから、GRP の抗原性に重要な残基であることが示唆された。特定されたアミノ酸残基は Cry j 7 と Pru p 7 だけでなく、ヒノキ科花粉 GRP と果物 GRP の交差反応に寄与するエピトープである可能性が示唆された。

項目 5. 交差エピトープ構造を破壊するための加工・調理条件に関する解析

加工や調理によりタンパク質は変性し、構造が変化すると考えられる。変性によりアレルゲンの抗原性が変化する可能性があるため、Pru p 7 が変性することにより IgE 結合性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。Pru p 7 には多くのジスルフィド結合が存在することから、ジスルフィド結合を還元するメルカプトエタノール存在下において 90℃で 30 分間熱処理した。その後、熱処理した Pru p 7 と未処理 Pru p 7(コントロール)を用いて、Pru p 7 陽性を示す果物アレルギー患者血清中の IgE 抗体に対する結合性を比較し

た。還元条件下で熱処理した Pru p 7 では未処理 Pru p 7 と比較して血清中の IgE 抗体への結合性が著しく低下した。このことから、Pru p 7 の IgE 抗体結合性には高次構造形成が大きく影響しており、加熱などの加工などの条件によっては GRP の抗原性を低下できる可能性が示唆された。

上記の GRP のエピトープの解析結果について、必要に応じて変異体を追加して専門誌への論文投稿を検討している。

今後の研究活動について

本研究により、スギ・ヒノキ花粉と果物 GRP 間の交差反応に関わるエピトープに寄与するアミノ酸残基を概ね同定できたため、所期の成果は達成したと考えている。

今後の課題の一つとして、GRP の関与する「花粉関連食物アレルギー症候群」について明らかにするために、一次感作に関するスギ・ヒノキ花粉に対する抗原解析が必要であると考えている。また、加工・調理の条件と GRP の抗原性についても重要な課題であり、さらに解析が必要であると考えている。加工による GRP の変性・巻き戻りの分子機構やジスルフィド結合の寄与などを解析することにより、GRP の抗原性を失活させる調理や加工条件を精密に制御することが可能になると考えている。

以上のように、本課題は引き続き必要性の高い重要な研究課題であると考えている。

参考文献

- 1) Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016; 27: 1–250
- 2) Tuppo L, Alessandri C, Pomponi D, Picone D, Tamburrini M, Ferrara R, et al. Peamaclein – A new peach allergenic protein: similarities, differences and misleading features compared to Pru p 3. *Clin. Exp. Allergy* 2013; 43: 128-140
- 3) Nahirñak V, Rivarola M, Almasia N, Barón M, Hopp H, Vile D, et al. Snakin-1 affects reactive oxygen species and ascorbic acid levels and hormone balance in Potato. *PLoS One* 2019; 14(3): e0214165
- 4) Inomata N Gibberellin-regulated protein allergy: Clinical features and cross-reactivity. *Allergol. Int.* 2020; 69: 11-18
- 5) Ehrenberg A, Klingebiel C, Östling J, Larsson H, Mattsson L, Vitte J, et al. Characterization of a 7 kDa pollen allergen belonging to the gibberellin-regulated protein family from three Cupressaceae species. *Clin. Exp. Allergy* 2020; 50(8): 964-972
- 6) Klingebiel C, Chantran Y, Arif-Lusson R, Ehrenberg A, Östling J, Poisson A, et al. Pru p 7 sensitization is a predominant cause of severe, cypress pollen-associated peach allergy *Clin. Exp. Allergy* 2019; 49(4): 526-536