

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580150

研究課題名（和文）花粉症と関連する主要農作物中のクラス 2 食物アレルギーの変動解析

研究課題名（英文）Analysis of changes of pollenosis-related class-2 allergen levels in major agricultural products.

研究代表者

森山 達哉（MORIYAMA TATSUYA）

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：60239704

研究成果の概要（和文）：花粉症に関連するクラス 2 食物アレルギーとして、Betv1 ホモログ、プロフィリン、ソーマチンライクプロテインをクローニングし、発現タンパク質から汎用性の高い抗体を作成した。これらを用いて、大豆や野菜、果物などの主要な農作物における品種間、栽培方法、加工法、調理法などの違いによるアレルギー性の変化・変動を解析した。これらの条件によってアレルギーレベルは大きく変動することが明らかとなった。また、農作物による食物アレルギーの原因抗原の探索も行った。

研究成果の概要（英文）：The major pan-allergens, Betv1 homolog, profilin, and thaumatin-like protein, were cloned and expressed in bacteria. Obtained recombinant allergen proteins were used for antibody production. Produced antibodies were used for the analysis of changes of these pollenosis-related class 2 allergen levels in major agricultural products. These allergen levels were drastically changed for the variation of species, methods of culture, processing methods, cooking methods. In addition, causative allergens were determined in the various agricultural products.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アレルギー、農作物、変動解析、花粉症、食物アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、花粉症との交差反応に由来する食物アレルギー（クラス 2 食物アレルギー）が増加し、社会問題となっている。このアレルギーは花粉アレルギーと構造が似ている野菜・果物・穀類などの農作物中のアレルギー

分子の摂取によって引き起こされる。これは従来の古典的な食物アレルギー（クラス 1 食物アレルギー）とは発症機構や症状、原因食品などが大きく異なる。たとえば、クラス 1 食物アレルギーでは、乳幼児で多発し、成長とともに治癒してゆくことが多い。しかし、

クラス2食物アレルギーでは、基本的には治療は困難とされる。また、このクラス2食物アレルギーは花粉症を発症したヒトに発症しうるものであるため、花粉症が国民病と言われるほど増加している現代では、今後ますます増加することが容易に想像される。このクラス2食物アレルギーは、症状としては主に口腔内アレルギー症候群 (Oral Allergy Syndrome: OAS) と呼ばれるものが中心であり、口腔内が痒くなったり、なかには気道狭窄や顔面浮腫などの重篤な症状も引き起こすこともある。このような新たな食物アレルギーは、その存在そのものが未だ十分に認知されていない。また、原因となる花粉症と発症する野菜果物との対応や原因となるアレルゲンに関しても十分に理解されているとは言えない状況である。更には品種、栽培方法、加工等がこのクラス2の食物アレルゲンタンパク質の変動に与える影響等についてはほとんど不明である。

これまでに申請者らは、これらのクラス2食物アレルゲンを中心に、多様な農作物アレルゲンの探索を行ってきた。その結果、多くの農作物アレルゲンが感染特異的タンパク質 (PR-proteins) と呼ばれる一群のタンパク質グループに分類されることが明らかになってきており、植物が感染や虫害、環境ストレスなどに晒されると発現を増大させることが明らかとなってきた。このように、農作物アレルゲンはその環境によって大きく変動することが示唆される。またいくつかの代表的なアレルゲン、特に汎アレルゲンと呼ばれる種間で共通性の高いアレルゲンに関して、ダイズを中心に抗体作製を行いつつあり、得られた抗体を用いた検出定量系によって、これらのアレルゲンレベルは栽培方法や品種間で大きく変動することが予備的な検討結果から示唆された。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの研究を進展させ、我が国で消費される主要な農作物について、汎アレルゲンである主要アレルゲン候補分子 (プロフィリン、Betv1 ホモログ、lipid transfer protein(LTP)、ソーマチンライクプ

ロテイン) を網羅的にクローニング、発現させ特異抗体を得る。それらの特異抗体を得た後、検出・定量系を構築し、品種間差異、栽培環境 (病虫害被害の有無) による変動、加工法による変動などの種々の変動解析を行う。また、これらの主要な農作物による食物アレルギーに関して、その原因となるアレルゲンについて、抗原提供やイムノプロットティングなどによって明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 主要農作物のクローニング・発現・精製

主要農作物の汎アレルゲン (Betv1 ホモログ、プロフィリン、ソーマチンライクプロテイン) の遺伝子情報をパブリックデータベースから入手し、オープンリーディングフレーム (ORF) を含む領域を増幅しうるプライマーを設計し、各種農作物由来の cDNA をテンプレートとしてこれらの主要アレルゲン分子の cDNA 断片を PCR にて増幅し、T/A クローニングする。T/A クローニングしたのち、His タグ融合タンパク質として発現できる発現用ベクター (pET30 系) にサブクローニングし、目的アレルゲン分子を大腸菌において His タグ融合タンパク質として発現させた。またシャペロンを共発現させたコンピテントセルなどを用いてコンフォメーションを正しく形成させることによって可溶性状態での発現を促進させる工夫を行った。

発現を前提にした PCR による T/A クローニングでは、正確な塩基配列の増幅が重要なため、校正活性 (Proof reading 活性) に優れた DNA ポリメラーゼを使用した。(TAKARA Bio 社製 PrimeStar™ など)

発現した His タグ融合アレルゲン分子は、キレートカラムを用いてアフィニティー精製した。また混入タンパク質が多い場合は、イオン交換カラムやゲルろ過 HPLC カラムなどを用いて最終精製を行った。なお、パタチンや LTP などの農作物中に含有量が多いアレルゲン分子の場合は、原料の農作物中から抽出後、硫酸分画や数種のカラム等を用いて精製を行った。

### (2) 主要農作物汎アレルゲンに対する抗体の作成

発現・精製させたアレルゲン候補分子について、マウス、モルモット、ウサギなどの動物に免疫することにより特異抗血清を得た。作製する抗体はモノクローナル抗体ではなく、ポリクローナル抗体とする。その理由は、モノクローナル抗体では手間や経費がかかることその他、モノクローナル抗体の場合は品種間での分子多様性に対して反応性を失う可能性がある点と、ポリクローナル抗体の場合は類縁作物間で広く使用できる可能性が

あるからである。あえて多くの農作物にて使用できるように、汎用性の高い抗体を得た。

得られた抗血清の力価を抗原を固相化した ELISA プレートを用いて評価し、十分に力価が上がった抗血清を採取した。得られた抗血清はイムブロットリング法によっても反応性・特異性を確認した。また、得られた抗血清の一部はプロテインGカラムを用いたアフィニティークラムによって IgG 精製した。

### (3) 主要アレルゲンの検出・定量系の構築

得られた抗体を用いて、イムブロットリングの手法により実際の農作物中での該当アレルゲンを検出する条件を検討した。検出には感度の高い化学発光法を用いた。また、より定量性に優れた検出系として知られている近赤外蛍光ラベル抗体を用いた近赤外蛍光検出法についても検討を行った。

定量に関しては、IgG 精製した抗体をペルオキシダーゼまたはビオチン標識し、これを用いてサンドイッチ ELISA 系を構築した。基本的にはすべての解析アレルゲンに対して、ELISA 系の構築ができることが好ましいが、得られた抗体の特性などから、ELISA 系の構築が困難な場合がある。その際は、イムブロットリングや抗原固相化 ELISA (直接 ELISA) の手法で半定量する系を用いた。

### (4) アレルゲンの変動解析

構築されたアレルゲンの検出定量系を用いて、種々の状態の農作物のアレルゲンレベルの変動解析を行った。以下に示すような条件での変動解析を検討した。

#### (病虫害被害)

農家から、病虫害の被害を受けた農作物を入手し、それらの作物中のアレルゲンレベルを先述した方法により測定し、被害の程度とアレルゲンの変動について半定量的に解析した。

#### (品種間差異)

市販品または農家や農業試験場などから提供された様々な品種の農作物に関して、そのアレルゲンレベルを比較した。

#### (成熟過程)

農作物の登熟過程における各種アレルゲンレベルの変動を解析するために、未成熟での作物、および完熟作物、さらに過完熟作物についてアレルゲンレベルの解析を行った。

#### (保存・加工調理方法)

保存温度や各種保存条件の違いによるアレルゲンの変動を解析した。また、殺菌や発酵、破碎・粉砕、加熱などさまざまな加工形態によるアレルゲンレベルの変動を解析した。また、味噌などの発酵食品でのアレルゲンの変化や、クラス 2 食物アレルゲンでは、口腔内での消化性が発症リスクに反映されることから、可溶性サンプルにおけるアレル

ゲンの変動を中心に解析した。また酢を用いた処理によりアレルゲン性が変動するかどうかとも検討した。

### (5) 主要農作物による食物アレルギーの原因抗原の解析

これらの主要な農作物による食物アレルギーに関して、その原因となるアレルゲンについて、発現させたリコンビナント抗原の提供や原因食品によるイムブロットリングや ELISA などによって明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 主要農作物の汎アレルゲン検出用の抗体の作成

発現させた汎アレルゲンのリコンビナントを抗原としてウサギやモルモット、マウスなどに免疫することにより、大豆や野菜、果物などの主要な農作物における汎アレルゲンとして、Betv1 ホモログやプロフィリン、ソーマチンライクプロテインなどを検出する抗体を作成することができた。

### (2) 変動解析

ダイズの Betv1 ホモログを検出する抗体を用いて、サヤエンドウや三度マメ、インゲン豆、シカクマメなどの各種サヤ豆におけるホモログ分子の検出、変動解析を行った。その結果、これらのサヤ豆にもダイズの Glym4 類似の Betv1 ホモログが存在し、その存在はサヤに多いこと、また、虫害被害や日陰で育てたものなどで増加することが判明した。また、トマトにおいてプロフィリンは成熟よりも未熟の方が多く判明した。反対にソーマチンライクプロテインでは、未熟に対して完熟になることによって劇的にアレルゲンが増加することが判明した。

大豆の虫害被害に関しては、感染特異的タンパク質ファミリー (PR-10) に属する Betv1 ホモログである Glym4 は、虫害被害で劇的に増加することが明らかとなった。しかしながら、プロフィリンに関しては変化が無いあるいはむしろ少し減少する可能性が示唆された。このように病虫害ストレスによって、著しく増加するアレルゲンもあれば、ほとんど変化が無いもの、むしろ微減するものなど、アレルゲンの種類ごとに変動する様式が異なることが明らかとなった。

品種に関しては、大豆やトマト、などに関して汎アレルゲンの品種間差異を検討した。その結果、品種間で 2 倍以上の差異があることが示唆された。極低品種の探索に関しては現在も引き続き検討している。

加工法による変動では、とくに発酵食品である味噌の種類による各種アレルゲンの変化を検討した。その結果、発酵熟成期間の短い味噌では比較的アレルゲンが残存する傾向が見られたが、発酵熟成期間の長い色の濃い味噌ではいずれのアレルゲンも極めて少

ないことが判明した。特に豆味噌では少なかった。その他、大豆加工食品ではクラス2食物アレルギーリスクが、破碎後遠心上清におけるクラス2アレルギーレベルを検出することにより検証できることが示唆された。この結果、豆乳や一部の柔らかい豆腐などにクラス2アレルギー分子が可溶性の状態が存在し、リスクが高いことが明らかとなった。

調理法ではとくに、酢によって加工することで可溶性のクラス2アレルギーが不溶化したことから、アレルギー性は低下することが示唆された。

(3) 主要農作物による食物アレルギーの原因抗原の解析

ゴボウのアレルギー候補として、SOD やペルオキシダーゼを同定した。また、とうふやもやしによる OAS では、豆乳の場合と同様に Glym4 が関与することを示唆した。また、一部の大豆アレルギーでは、Glym4 が関与するクラス2食物アレルギーと、7S グロブリンなどが関与するクラス1食物アレルギーの両方が関係する例が存在することが明らかとなった。また、大豆の OAS 例では、Glym4 のみならず Glym3 も原因抗原となり得ることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

①森山達哉「植物性食品素材による新たな食物アレルギーリスク」明日の食品産業, 2012(11), 36-42 (2012) 審査無

②森山達哉「モモのアレルギーはどこまでわかっているのか」食生活, 106(7), 41-45 (2012) 審査無

③吉田珠英、近藤享子、石黒直子、森山達哉、川島 眞「豆乳による口腔アレルギー症候群の2例」皮膚科の臨床, 54, 418-422 (2012) 審査有

④飯島茂子、森山達哉, 「クラス1およびクラス2の両方が関与したと考えた豆乳によるアナフィラキシーの1例」Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology, 5(5)439-449 (2011) 023208865 審査有

⑤森山達哉「大豆アレルギーの多様性と味噌の低アレルギー性の検証」日本醸造協会誌 (Journal of the Brewing society of Japan), 106(10), 645-655 (2011) 11278524 審査有

⑥原田 晋、田中 功、有津 崇、田中 昭、森山達哉「ピーナッツアレルギー：果物類の O A S および豆乳アレルギーとの合併例」

皮膚科臨床 33, (5)479-482, (2011), 審査有

⑦森山達哉, 小川 正: "食物アレルギーの多様性とそのリスク低減化戦略" 食品工業 53(12), 75-87 (2010), 審査無

⑧小川 正, 森山達哉: "食物アレルギーの現状と対策-大豆アレルギー除去食品の創出と流通機構の構築" 生活衛生 54(2), 93-105 (2010), 審査無

⑨石川博康, 熊野高行, 角田孝彦, 森山達哉: "牛蒡アレルギーの同定" 日本皮膚科学会雑誌 120(11), 2219-2222 (2010), 審査有

〔学会発表〕(計4件)

①末森祐輔、木下恵利、矢野えりか、崎川貴文、財満信宏、森山達哉、河村幸雄「大豆クラス2食物アレルギー Glym4 の精製、特性解析及びモノクローナル抗体作製」日本農芸化学会大会、2013年3月27日(宮城)

②森山達哉「リコンビナント・アレルギー及び抗アレルギー抗体を用いた抗原解析」第24回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 2012年5月12日(大阪)

③末森祐輔、近重順帆、矢野えりか、村瀬浩、水野雅敏、森山達哉、河村幸雄: 「大豆クラス2食物アレルギー Glym3 の多様性と特性解析」2010年度日本農芸化学会関西支部大会、2010年10月3日(奈良)

④足立厚子、井上友介、金澤典子、松尾正文、佐々木祥人、森山達哉: 「大豆アレルギーにおける大豆プロフィリン Glym3 の関与について」第22回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010年5月9日(京都)

〔図書〕(計1件)

①森山達哉、小川 正: "低アレルギー化大豆加工食品の開発(免疫機能性食品の基礎と応用)" シーエムシー出版、4 (2010)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 達哉 (MORIYAMA TATSUYA)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号: 60239704

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: