
総 説

植物起源の食物アレルギー : Lipid Transfer Protein の アレルギー性と生物学的特性

山口 (村上) 友貴絵, 中村 美幸, 廣瀬 潤子*,
本庄 勉**, 成田 宏史

Plant-Derived Food Allergens: Allergenicity and Biological Properties of Lipid Transfer Protein

Yukie Murakami-Yamaguchi, Miyuki Nakamura, Junko Hirose,
Tsutomu Honjoh and Hiroshi Narita

The most important allergens in young children are derived from animal foods. Therefore, researches of food allergy are mainly developed on hen's eggs and cow's milk. On the other hand, new types of allergy such as pollen allergy, latex allergy and oral allergy syndrome have recently been increasing. These allergies are characteristically caused by plant allergens and seen in adults. In the former case, sensitization and induction are usually caused by a same allergen (Type I food allergy). However, they are caused by different antigens with cross-reactivity in the latter case (Type II food allergy). This review first focuses on cross-reactivity of plant allergens to explain the increase of the Type II food allergy and then summarizes the information and our data about the major plant allergen, Lipid Transfer Protein.

(Received September 15, 2007)

はじめに

乳幼児期における食物アレルギーは多くの場合、動物由来 (鶏卵と牛乳) であり、従来の主要食物アレルギーの研究はこれらを中心に展開されてきた。一方、近年増加しつつある花粉症、ラテックスアレルギー、口腔アレルギー症候群 (OAS) などの新しいアレルギーは、植物由来のアレルゲンによって大人で発症する事が多い。また、前者では通常感作と誘発が同じ抗原である (I 型食物アレルギー) が、後者では感作と誘発が異なる場合が多く (II 型食物

アレルギー)、交差反応性が重要なファクターとなっているのが特徴である。本稿では、植物アレルギーの交差反応性を中心に新しいアレルギーの増加について考察すると共に、代表的な植物アレルギーである脂質輸送タンパク質 (Lipid Transfer Protein) に関する最近の知見ならびに我々の研究室の成果を総説する。

1. 植物アレルギー

1. ラテックスアレルギーと感染特異的タンパク質

果物・野菜類に対するアレルギー反応は、大部分の症例がラテックスゴムまたは花粉類との交差反応を示すことが多く、前者に対してラテックス-果物症候群、後者に対して花粉-食物アレルギー症候群の名称が用いられる場合もある。ラテックスには

京都女子大学食物栄養学科食品学第一研究室

* 滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻

** (株) 森永生科学研究所

用語説明 本稿で使用する用語についてまとめたものを示す。

口腔アレルギー症候群 (OAS: Oral Allergy Syndrome)

果物、野菜などを摂取したときに、口腔粘膜あるいはその周囲の粘膜組織に生じるアレルギー症状。口唇、口腔、咽頭などに刺激感を伴い、重篤な場合は呼吸困難などの呼吸器障害を起こす。

交差反応性

ある特定の抗原を認識する抗体が、その抗原と類似する構造を持つ別の抗原を認識すること。

ラテックスアレルギー

医療関係従事者が、ラテックス製の手袋の使用が原因でラテックス中のタンパク質により感作を受けてアレルギー症状が現れたことが発端。蕁麻疹、喘息発作、アナフィラキシーショックなどの即時型アレルギー反応。

PR タンパク質

植物は生育環境の変化（病原菌の感染や傷害、植物ホルモンを含めた化学物質や重金属の適用、オゾンなどの大気汚染物質、紫外線や厳しい生育環境）に基づく様々なストレスを受けた場合、自己防衛のため植物特有の生体防御反応を起こす。この過程で誘導されるタンパク質群。

汎アレルギー

多くの植物細胞あるいは動物細胞に共通して含まれ、幅広い交差反応性の原因となるようなアレルギー。

多くのアレルギータンパク質（ゴムの樹木 *Hevea Brasiliensis* に因んで Hev b として分類される）が含まれており、表 1 に現在までに WHO-IUIS（世界保健機関—国際免疫学会連合）によって正式に登録されているラテックスアレルギーを示した²⁾。一方、植物には生体防御タンパク質の 1 つで、ウィルスや細菌の感染により病的状態に陥った時に誘導される pathogenesis-related-protein (PR タンパク質) という一連のタンパク質がある。これらは、感染特異的タンパク質とも呼ばれるが、今日では感染の他に化学的、物理的な刺激によって誘導されるものまで含めて、各種のストレスにより誘導されるタンパク質群が包括的に PR タンパク質と呼ばれている。表 2 に PR タンパク質の分類と対応する植物（食物）抗原を示した²⁾。ゴムの採取法から考えれば容易に理解できるが、Hev b タンパク質と PR タンパク質の多くは共通している。

例えば、ラテックスの主要抗原中で果実類と交差性を有するものとしてクラス I 型キチナーゼが挙げられる。クラス I 型キチナーゼは様々な植物中に存在し、細胞壁の構築に関与するタンパク質である。クリ・アボカド・バナナのキチナーゼの N 末端キチン結合性ドメインはラテックスアレルギーの Hev b 6.02 であるヘベインと 70～80% の相同性を示しており³⁾、そのためにクラス I 型キチナーゼはラテッ

クス—果物症候群に関連した重要な汎アレルギーと認識されている。クラス I 型キチナーゼは PR タンパク質の一種でもあり、PR-3 群に分類されている⁴⁾。

また、花粉—食物アレルギー症候群の主要抗原としては Bet v 1 が代表格である。Bet v 1 はシラカバ花粉の主要アレルギーであり、リンゴ Mal d 1, サクランボ Pru av 1, セロリ Api g 1 などの果物野菜抗原と交差反応性を示すことにより、口腔アレルギー症候群発症の原因ともなっている⁵⁾。中でも、リンゴの感作の特異性が高いとされている⁶⁾。さらに Bet v 1 は PR タンパク質に属しており、PR-10 群に分類されている^{7,8)}。

最後に野菜・果物アレルギーの代表的な原因抗原として Lipid transfer protein (LTP) をあげる。LTP はバラ科果物における重要なアレルギーとして同定されたタンパク質であり^{9,10)}、リンゴ Mal d 3, モモ Pru p 3, サクランボ Pru av 3, プラム Pru s 3 さらにはセロリ、ヨモギ、トマト、トウモロコシ、大麦（ビール）などの野菜・穀類のアレルギーとして広く同定されている。LTP はラテックスアレルギーの一種 (Hev b 12) として、さらに PR タンパク質の一種 (PR-14) としても分類されている^{11,12)}。後述するが LTP の植物間における相同性は非常に高く (図 1), LTP がアレルギーの場合複数の食物に反応して症状がより重篤になることが多い。

表1 ラテックスアレルギーの一覧 (WHO-IUIS より)
WHO-IUIS (世界保健機関-国際免疫学会連合) によって正式に登録されているラテックスアレルギーを示した。

抗原	分子量 (kDa)	生理的な役割
Hev b 1	14.6	ゴムラテックスの生合成に関与
Hev b 2	34-36	生体防御タンパク質 (PR-2)
Hev b 3	24	ゴムラテックスの生合成に関与
Hev b 4	100-115	Hev b 1 と相同性 生体防御タンパク質
Hev b 5	16	ソバ・キウイ等と交差
Hev b 6.01	20	アボカドと交差
Hev b 6.02	4.7	HCW に関連 ゴム・ラテックスの凝集に関与 アボカド・バナナと交差
Hev b 6.03	14	HCW に関連 生体防御タンパク質 (PR-4)
Hev b 7.01	46	障害誘導性タンパク質と相同性 生体防御タンパク質, 天然ゴム生合成の阻害 馬鈴薯・トマト・アボカド等と交差
Hev b 8	14	構造タンパク質 バナナと交差
Hev b 9	46	糖分解酵素
Hev b 10	25.8	クラスIII型キチナーゼ
Hev b 11	32	生体防御タンパク質 (PR-3) バナナ・アボカドと交差
Hev b 12	9	生体防御タンパク質 (PR-14) 脂質輸送タンパク質

HCW: health care worker (医療従事者)

2. 交差反応性の意味

ではなぜ植物においてはこのような種を超えた広範な交差反応性が見られるのであろうか?すでに述べたように, PR タンパク質は植物が環境からの様々なストレスに応答して作り出す生体防御タンパク質である。したがって, PR タンパク質の機能発現は植物にとっては極めて重要であり, そのために必要な構造は進化の過程で種を超えて植物内に保存されて来た可能性がある。その共通構造がアレルギーにおける交差反応のエピトープ (抗原決定基) となっているわけである。そうすると, 最近の新しいアレルギーの増加は単にアレルギーに対して医師や患者が敏感になってきただけであらうかという疑問が生じる。例えば, リンゴ, アボカド, バナナ, トマト, キウイなどは熟成を促進するため, 追熟ホルモンとしてエチレン処理を施すことがあり, 前述のクラスI型キチナーゼはエチレン処理によって誘導される事がわかっている¹³⁾。またクラスI型キチナーゼが多いと病害虫に対する抵抗性を付与できるため, 品

種改良や遺伝子操作によってこのタンパク質の高発現株が選ばれている。つまり, 病原菌・害虫・農薬・気候・品種改良・遺伝子組み換えなどの環境変化 (ストレス) に植物が応答して PR タンパク質を誘導産生するとともに, 環境破壊によって傷ついた植物が子孫を残そうと花粉量を増やし, 広範な交差反応性をもったアレルギーの絶対量自体の増加を経て, 新しいアレルギーの増加につながっているのではないだろうかと考えられる。スギは環境の悪化に自らの生命の危機を感じ, 種を保存するために大量の花粉を飛ばす。その花粉でヒトはアレルギーになる。アレルギー反応がヒトの悲鳴であるとするれば, それはスギの悲鳴, ひいては地球の悲鳴であるのかもしれない。

II. 脂質輸送タンパク質: Lipid transfer protein (LTP)

先に述べたようにLTPの交差反応性は植物アレルギーの特徴を代表するものであり, LTPは植物生理

表 2 感染特異的タンパク質と帰属するアレルゲン
 推奨されている感染特異的タンパク質 (PR タンパク質) の分類と対応する植物抗原を示した。

分類	分子量 (kDa)	性質 (起源植物名 ; アレルゲン登録名)
PR-1	15 ~ 17	未知
PR-2	25 ~ 35	抗カビ性, クラス I, II, III型 β -1,3- グルカナーゼ (ラテックス ; Hev b 2)
PR-3	25 ~ 35	抗カビ性, クラス I, II, IV型キチナーゼ (アボカド ; Pers a 1, ラテックス ; Hev b 11)
PR-4	13 ~ 15	抗カビ性, クラス I, II型キチナーゼ (ラテックス ; Hev b 6)
PR-5	22 ~ 24	抗カビ性, ソウマチン様タンパク質
PR-6	6	(サクランボ ; Pru av 2, リンゴ ; Mal d 2)
PR-7	69	プロテアーゼインヒビター
PR-8	28	エンドプロテアーゼ クラス III型キチナーゼ (ラテックス, ヘパミン)
PR-9	39 ~ 40	ペルオキシダーゼイソ酵素
PR-10	17 ~ 18	未知, Bet v 1 相同タンパク質 (シラカバ花粉 ; Bet v 1, ヘーゼルナッツ ; Cor a 1, リンゴ ; Mal d 1, サクランボ ; Pru av 1, モモ ; Pru p 1, アンズ ; Pru ar 1, ナシ ; Pyr c 1, セロリ ; Api g 1, ニンジン ; Dau c 1)
PR-11	41 ~ 43	クラス I 型キチナーゼ
PR-12	5	ディフェンシン
PR-13	14	チオニン
PR-14	9 ~ 12	非特異的脂質輸送タンパク質 (Lipid transfer protein: nsLTP) (リンゴ ; Mal d 3, モモ ; Pru p 3, オレンジ ; Cit s 3, アプリコット ; Pru ar 3, チェリー ; pru av 3, ダイズ ; Gly m 19, ラテックス ; Hev b 12)

学的, タンパク質化学的, 免疫学的, 食品化学的に極めて興味ある研究対象となっている¹⁴⁾。そこで, 以下では, LTP に関する最近の報告にわれわれの研究成果を加えて, LTP の構造・機能上の特徴などを解説する。

1. LTP

脂質は植物生理学的に多くの重要な機能を示し, 生物や無生物的なストレスに対して植物器官内にクチン (空気中に生育する植物の器官に存在する脂肪酸ポリエステルや脂肪酸アルコール, オキシ脂肪酸から成る疎水性重合体で, その間にはロウ物質がぎっしり詰まっている) やスベリン (フェノール化合物, グリセロール, 二価脂肪酸, オキシ脂肪酸の誘導体からなる複雑な重合体) のような保護組織を形成する。また, 脂質やその誘導体は細胞から送り出されるシグナルと関係しているため細胞内外の脂質交換が必要となってくる。親水性である細胞内外間における脂質移動は, 脂質結合性のタンパク質やリポタンパク質などによって行われる。

LTP は脂質結合能を有することから, 当初細胞内

膜脂質の輸送に関係する低分子の疎水性タンパク質グループとして同定された¹⁵⁾。動物ではリン脂質などに対して特異的に結合するタンパク質も報告されているが, 植物 LTP の脂質結合特異性は低いため, 正式には非特異的脂質輸送タンパク質 (nonspecific LTP: nsLTP) と呼ばれる。図 2 に LTP による脂質輸送活性の定量法を示した¹⁶⁾。しかしながら, LTP は植物の外層に存在していること, シグナルペプチドを伴ったプレタンパク質として生合成されることが判明したため, 現在では細胞外脂質であるクチンやスベリンの形成や病原菌の侵入に対する植物の保護に関係していると推測されている¹⁷⁾。

一方, 近年 LTP が細胞膜表層のエリシチン受容体と結合し, その生物活性を調節していることがわかってきた¹⁸⁾。エリシチンは植物病原菌 *phytophthora* 属と *pythium* 属によって分泌される分子量 10kDa の単量体タンパク質であり, この受容体を介した複雑な情報伝達カスケードを刺激して植物を活性化させる事ができる¹⁹⁻²²⁾。エリシチンには LTP とアミノ酸配列の相同性はない。しかし, 3 対の S-S 結合によ

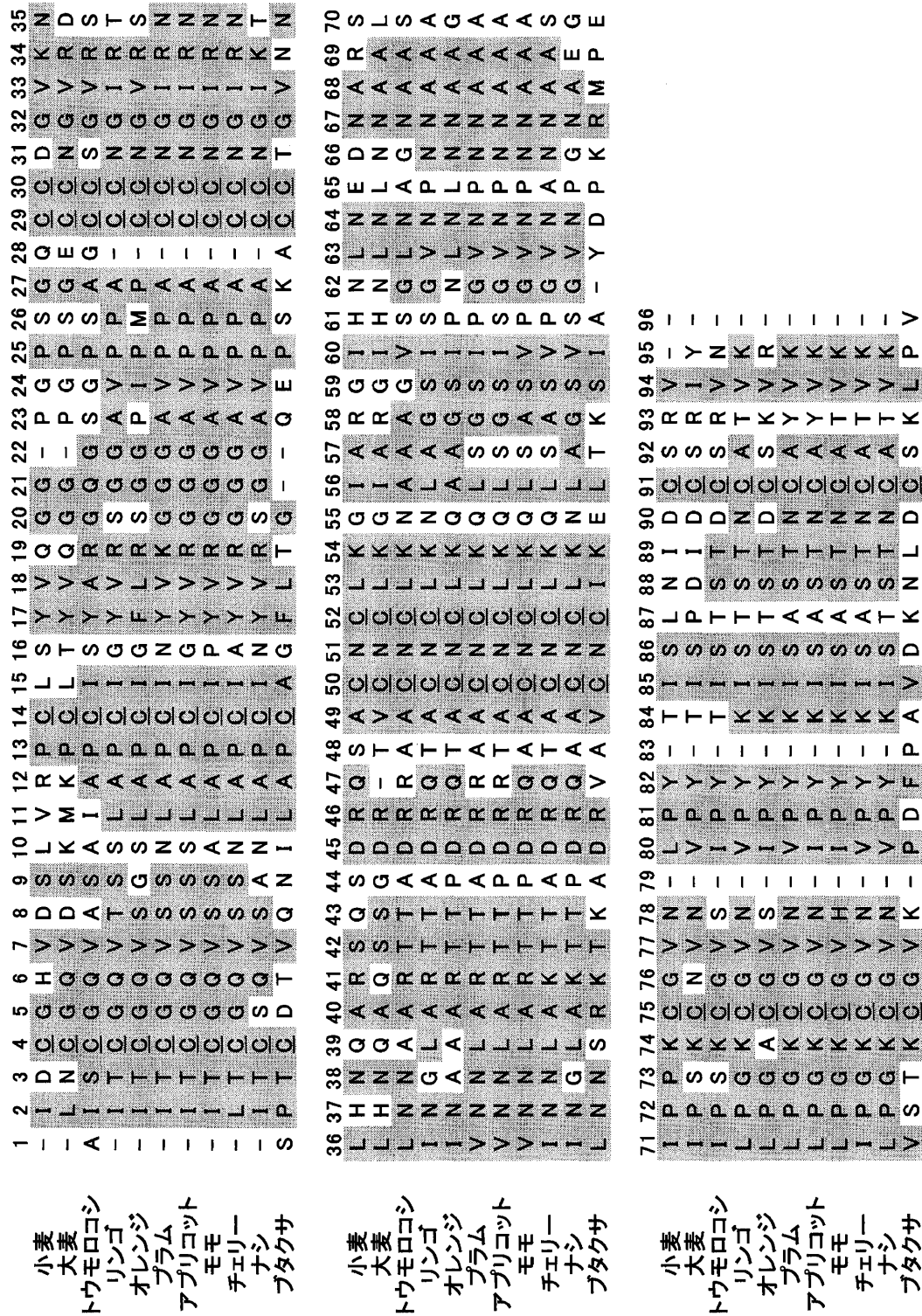


図 1 LTP1 および LTP1 様タンパク質のアミノ酸配列
植物に存在する LTP1 および LTP1 様タンパク質のアミノ酸配列を示した。システインに下線を入れ、同系列のアミノ酸をグレーで塗りつぶした。

て作られる安定な α -ヘリックス構造が、LTP のような疎水性の高い空洞を形成しているため、この空洞部分にステロール類や脂肪酸を特異的に結合することができる²³⁻²⁶。またこの部分が受容体との結合部位であり、後述する LTP1 のヘリックス構造とちょうど重ね合わせることが可能である。

さらに最近では LTP と脂質成分の複合体が病原菌に対する耐性を誘導する活性をもっている可能性²⁷、LTP がカルモジュリン結合活性をもっていること²⁸などが明らかになり、LTP の生理機能に関してはまだまだ今後の研究に任されているところが大きい。LTP は単なる脂質の運び屋ではなく、植物

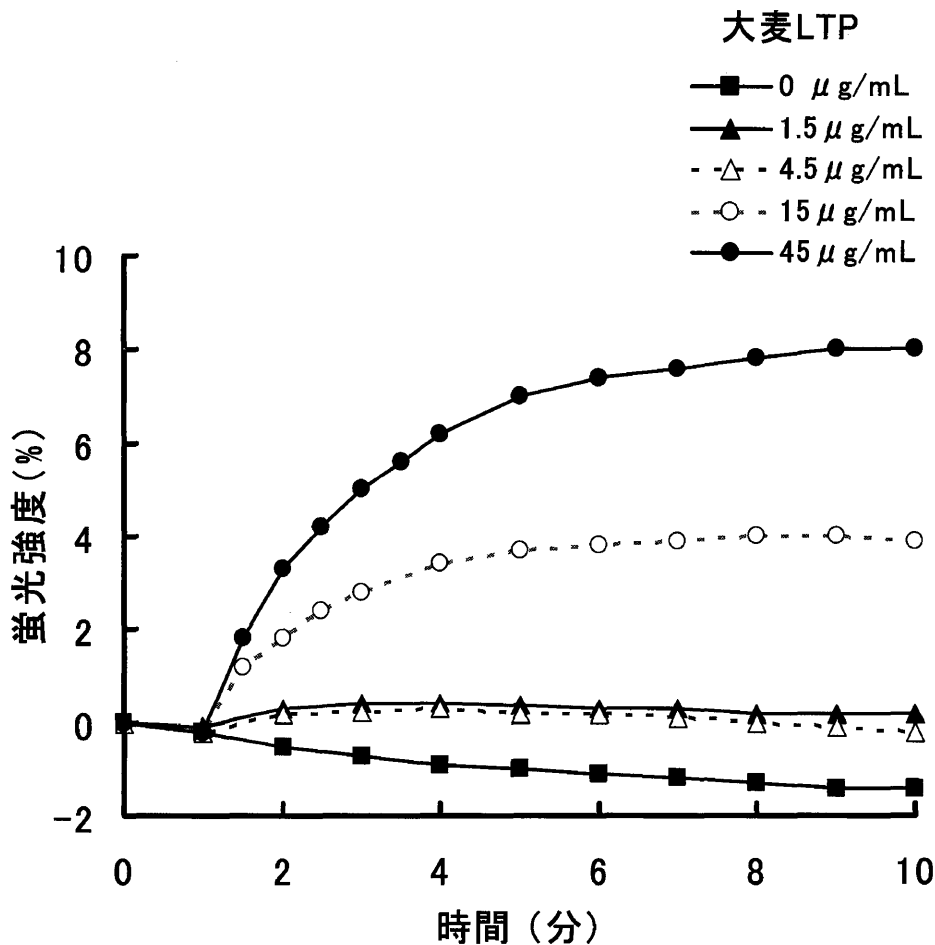


図2 脂質転移活性の測定

Paridon らの方法により大麦から精製した LTP の脂質転移活性を測定した¹⁶⁾。蛍光ラベルされた donor vesicle (1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl) sn-glycero-3-phosphocholine) と蛍光ラベルのない acceptor vesicle (L- α -ホスファチジルコリン) を調製し、その中に純化した大麦 LTP を添加して経時的に蛍光強度の測定を行った。doner 中では消光しているが、acceptor に運ばれると蛍光が生ずる。LTP の濃度増加に伴い蛍光強度の上昇がみられることにより、脂質輸送活性が測定できる。

細胞を活性化する調節因子であるようだ。

ここで見逃してはならないのは、LTP がアレルゲンとしてヒトの細胞に対して過敏な反応を引き起こす現象と、微生物が分泌するエリシチンに対する植物細胞の応答のホモロジーである。つまり、ここに LTP がアレルゲンとなりやすい理由があるのかもしれないし、LTP のエリシチン受容体に対する結合能の分析やそのメカニズムの解析が新たなアレルゲンのスクリーニング法の開発やアレルギー発症のメカニズムの解明に役立つかもしれない。

2. LTPの構造

LTP には分子量約 9kDa の LTP1 と、分子量約 7 kDa の LTP2 と呼ばれる異なる分子量タイプが同定されている²⁹⁻³¹⁾ (表 3, 図 1)。これらは全ての植物の種や果肉、葉、根、花、花粉などの器官に存在す

る。LTP1 と LTP2 はシステインの配列において共通部分があり (図 3)、それらのシステインは全てが S-S 結合に関与している。もう一つの一次構造上共通の特徴はトリプトファンが存在しないことである。一方、両者はシステイン配列以外の部分における相同性は低い。LTP2 よりも LTP1 の方が存在量が多く、研究データも多い。

タマネギの種子に存在する抗菌性の Ace-AMP1 は LTP と同じシステイン配列を持つ³²⁾。しかし、最も類似する LTP1 との相同性は 25% であり (システインは除く)、2 つのトリプトファンが存在するので、LTP1 様タンパク質であると考えられている。同様に、カベイラクサの花粉アレルゲンである Par J1 と Par J2 も LTP1 様タンパク質であると考えられている。これまでにアレルゲンとして同定されている

表 3 同定されている植物 LTP

現在同定されている植物の LTP の学名, データベース省略名, アレルゲン登録名および LTP タイプを示した。

植物名	学名	データベース登録名	アレルゲン登録名	LTP タイプ
小麦	<i>Triticum aestivum</i>	NLTA_WHEAT	Tri a 14	LTP1
大麦	<i>Hordeum vulgare</i>	NLT1_HORVU		LTP1
トウモロコシ	<i>Zea mays</i>	NLTP_MAIZE	Zea m 14	LTP1
米	<i>Oryza sativa</i>	NLTP1_ORYSA		LTP1
リンゴ	<i>Malus domestica</i>	NLTP_MALDO	Mal d 3	LTP1
オレンジ	<i>Citrus sinensis</i>	NLTP_CITSI	Cit s 3	LTP1
プラム	<i>Prunus domestica</i>	NLT1_PRUDO	Pru d 3	LTP1
アプリコット	<i>Prunus armeniaca</i>	NLT1_PRUAR	Pru ar 3	LTP1
モモ	<i>Prunus persica</i>	NLT1_PRUPE	Pru p 3	LTP1
サクランボ	<i>Prunus avium</i>	NLTP_PRUAV	Pru av 3	LTP1
ブドウ	<i>Vitis vinifera</i>	NLTP4_VITSX	Vit v 1	LTP1
ナシ	<i>Pyrus communis</i>	NLTP_PYRCO	Pyr c 3	LTP1
ブタクサ	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	NLT6_AMBAR	Amb a 6	LTP1
ヨモギ	<i>Artemisia vulgaris</i>	NLTP_ARTVU	Art v 3	LTP1
オリーブ	<i>Olea europaea</i>	ALL_OLEEU	Ole e 7	LTP1
カベイラクサ	<i>Parietaria judaica</i>	NL21_PARJU	Par j 1	LTP-like
		NL11_PARJU	Par j 2	LTP-like
アブラナ	<i>Brassica rapa</i>			LTP2

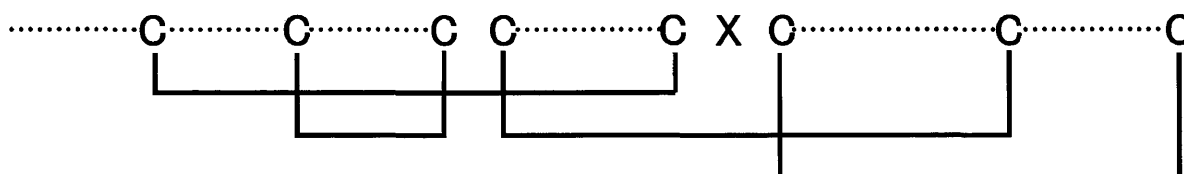


図 3 LTP の S-S 結合位置
LTP に存在するシステインの S-S 結合部位を示した。

LTP はほとんどが LTP1 グループであるが^{10,33-40)}, アブラナ花粉だけが LTP2 であると報告されている⁴¹⁾。共通に存在するシステイン配列は LTP と相同性のない植物アレルゲンである疎水性タンパク質の大豆タンパク質 (HPS) や 2S アルブミン^{42,43)} や穀類の α-アミラーゼインヒビター⁴⁴⁾ にもみられ, これらはそれぞれの植物における主要アレルゲンとされている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。以上のことから, 新規の植物アレルゲンとなり得るかどうかは, LTP とアミノ酸配列において相同性があることよりもむしろ, LTP と同じシステイン配列の存在が重要であると考えられる。

小麦, ライ麦, 米, 大麦 LTP1 の三次構造は核磁気共鳴や X 線構造解析によって決定されている。構造の特徴として, 4 本のらせんと 4 対の S-S 結合によって安定に保たれたサクソフォン状の折りたたみ

構造があげられる。この構造の内部にはトンネル状の空洞部分が存在している (図 4), その部分は疎水性アミノ酸で占められている。疎水性アミノ酸はペプシンによる切断部分なので, 疎水性アミノ酸が酵素の影響を受けにくい位置にあることは重要である。このような構造を持つため, LTP1 はペプシン消化に対する抵抗性が高い^{48,49)}。LTP1 の空洞部分はスフィンゴ脂質やプロスタグランジン, アンホテリシン B などの疎水性分子と結合しやすい^{50,51)}。また, この結合には C 末端近傍のチロシンが関与しているため, 空洞部分に疎水性分子が結合した場合, トリプシンやキモトリプシンに対して抵抗性を示す⁵²⁾。このように, この特徴的な折りたたみ構造が LTP に対して低分子のアレルゲンタンパク質としての重要な特徴である熱安定性, プロテアーゼ抵抗性を付与

している^{48,53}。これに対して LTP2 の高次構造はまだ解明されていない。

前述したタマネギ種子から単離された抗菌作用のあるタンパク質である Ase-AMP³²⁾ は LTP1 と同じ折りたたみ構造を持っているが⁵⁴、システイン配列を除いてアミノ酸配列は LTP1 と異なり脂質結合能はない。従って、LTP が持つ脂質結合能自体はアレルギー性とは無関係のようである。

III. LTP に関する我々の成果

2002 年の 4 月から、食物アレルギーの発症数、重篤度などを考慮し、特定原材料 5 品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）については、すべての流通段階での表示が義務付けられた（「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」）。これに伴い、11 月には厚生労働省からこれらを定量する方法として森永生科学研究所⁵⁵⁾ および日本ハム⁵⁶⁾ が開発した

ELISA法が通知法として認定された（食発第 1106001 号）。しかし、当初の通知法には抗原の変性状態、抽出効率が考慮されておらず、発酵食品のように加水分解を受けたタンパク質に対する定量性が低いという問題点があった。これに対して本研究室では、卵白タンパク質であるオボムコイドをターゲットとして免疫学的定量系の確立を試みた。オボムコイドは 3 個の類似した構造をもつドメインから構成されていて、各ドメインに 3 対の S-S 結合が存在しているため、熱やトリプシンに対して抵抗性がある。この性質に着目して、変性剤存在下で使用可能な ELISA 系を確立し、より抽出効率のよい検出系の開発に成功している^{57,58)}。

一方、これまでに述べてきたように、LTP は植物共通に存在する汎アレルギーンとして注目されており、構造上の特徴から熱安定性が高いことや消化酵素に対する抵抗性の高いことが性質としてあげられている。また、低分子で可溶性であるため食品からの抽出が容易であることが予測できる。そこで我々は一昨年、小麦 LTP に着目してポリクローナル抗体を用いた発酵食品中の小麦使用量の評価系を確立した⁵⁹⁾。本法による発酵食品の定量結果を表 4 に示す。比較として、通知法である森永生科学研究所製の小麦グリアジンキットによる定量を行った。この定量系は発酵過程を経る食品中ではグリアジンが加水分解されている場合が多いため、正確な値を出すことが困難である。ビール A は普通の大麦ビールであるが、ビール B は小麦添加ビールである。通知法では大麦に対する交差反応性のため、ビール A に定量値が出てしまう。一方、小麦 LTP 定量系ではビール A

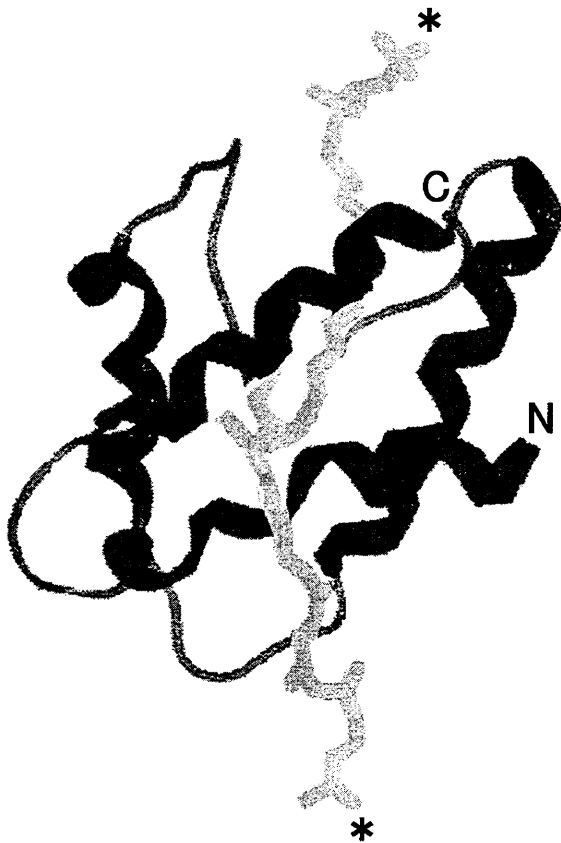


図 4 LTP の三次構造

小麦 LTP1 の三次構造を示した。4 本の α -ヘリックス構造から成り、中心部分には疎水性アミノ酸で占められたトンネル状の空洞が存在する。その空洞部分に 2 つのリゾホスファチジルコリン (*) が結合している。
(N: N 末端, C: C 末端)

表 4 発酵食品中小麦 LTP の定量
小麦 LTP 定量系と通知法小麦グリアジンキットを使用して発酵食品を定量した結果を示す。

サンプル名	小麦タンパク質 (μg/g)	
	LTP 定量系	グリアジン定量系
醤油		
A	—	—
B	56	—
C	—	—
D	73	—
ビール		
A	—	0.16
B	86	1.80

—：検出限界以下

では検出限界以下で測定できないが、ビール B では小麦タンパク質換算した値で通知法より約 50 倍高い値が得られた。その上、醤油でも定量可能である。つまり、本法は通知法 ELISA より大麦に対する交差反応性が低く、かつ醤油のような発酵食品にも応用可能な小麦使用量の評価系であることが示された。さらに我々は小麦 LTP に対するモノクローナル抗体を作製し、より特異性が高く、量的に安定な定量系を確立中である (特願 2005-348804)。なお、通知法は現在では我々のオボムコイドの系同様、変性剤存在下で定量するように改良されている⁶⁰⁾。

大麦に含まれる LTP はビールの泡の安定性に寄与するなど、ビールの品質に重要なタンパク質であり、加熱やタンパク質分解酵素に耐性を持つビールアレルギーとして問題となっている^{61,62)}。そこでまず、食物アレルギー患者血清の大麦 LTP に対する IgE の存在をウェスタン解析により調べた (図 5)。抽出された大麦タンパク質の中でも LTP が最も強く反応を示したことから、LTP が強い抗原性を示すことを確認できた。また、大麦 LTP に対するポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA を構築し、様々な国のビール中の大麦 LTP の定量を行った (図 6)。同

じ国でも LTP 量にはバラつきがあり、製造国と LTP 量との関連性は見られなかった。麦芽含有量の異なるビールを測定した結果を図 7 に示す。麦芽の含まれないビール D では大麦 LTP 量は検出限界以下だったが、大麦麦芽 45% と表示されている C では 100% 含有の A に対して約半分と、麦芽含有量に比例する結果となった。しかし、同じ麦芽含有量 100% の A と B では、LTP 量に差が出ているが、これは実際の麦芽使用量と製造工程が両社で異なるためではないかと考えられる。このように、LTP 定量値が麦芽の使用量によって明らかに変化を示したことから、本定量系はビールに含まれる大麦 LTP 量を正確に示す評価系であり、さらには、ビールの品質管理への応用が可能ではないかと考えている。実際、あるビールに関して同一品の製造日の違い、工場間、ロット間での違いはほとんどみられなかった。また、消費者からあるビールを飲んだら蕁麻疹が出たとのクレームに対して本法による同ロットビールの LTP 量の正常性を伝え、少なくとも主要ビールアレルギーに関して異常はないとの科学的根拠を示すことができた。本法に関しても現在モノクローナル抗体化が進行している。

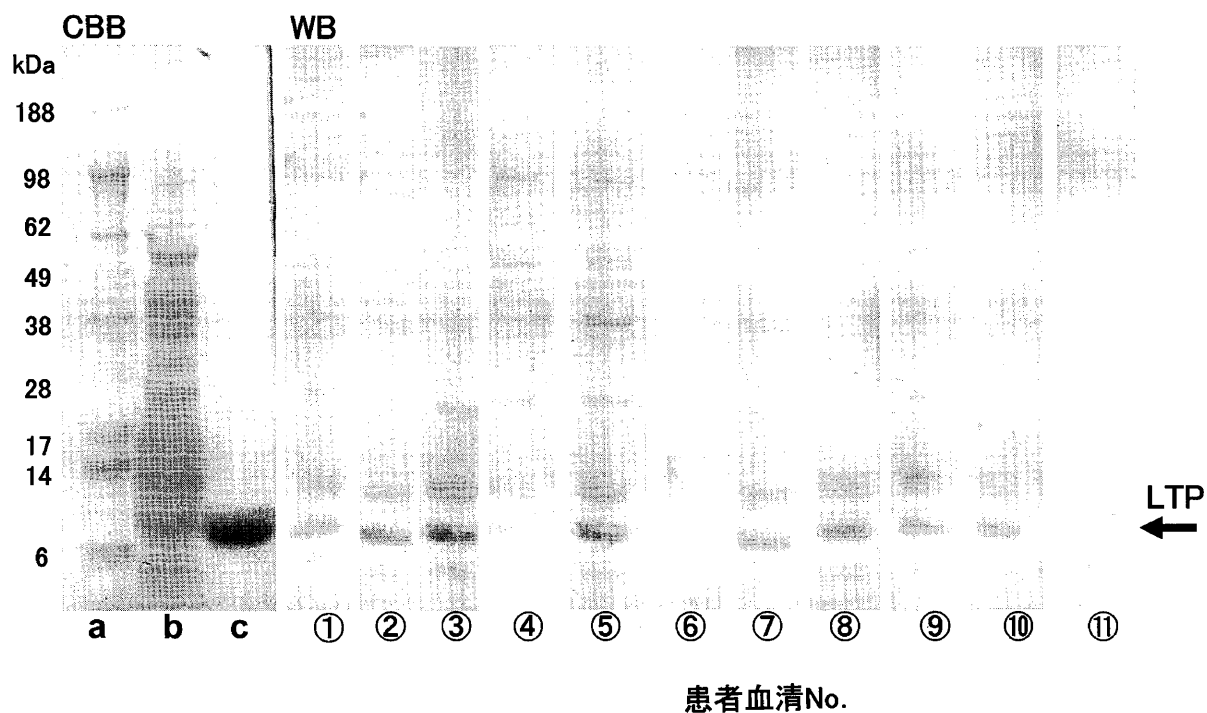


図 5 大麦 LTP の抗原性 (ウェスタン解析)

左側は a: 分子量マーカー, b: 大麦抽出液 (タンパク質として 10 μ g), c: 大麦 LTP (タンパク質として 2 μ g) をそれぞれ電気泳動後 CBB 染色による検出を行った。右側は大麦抽出液 (タンパク質として 10 μ g) を PVDF 膜に転写後、アレルギー患者血清に対する反応性を調べた。

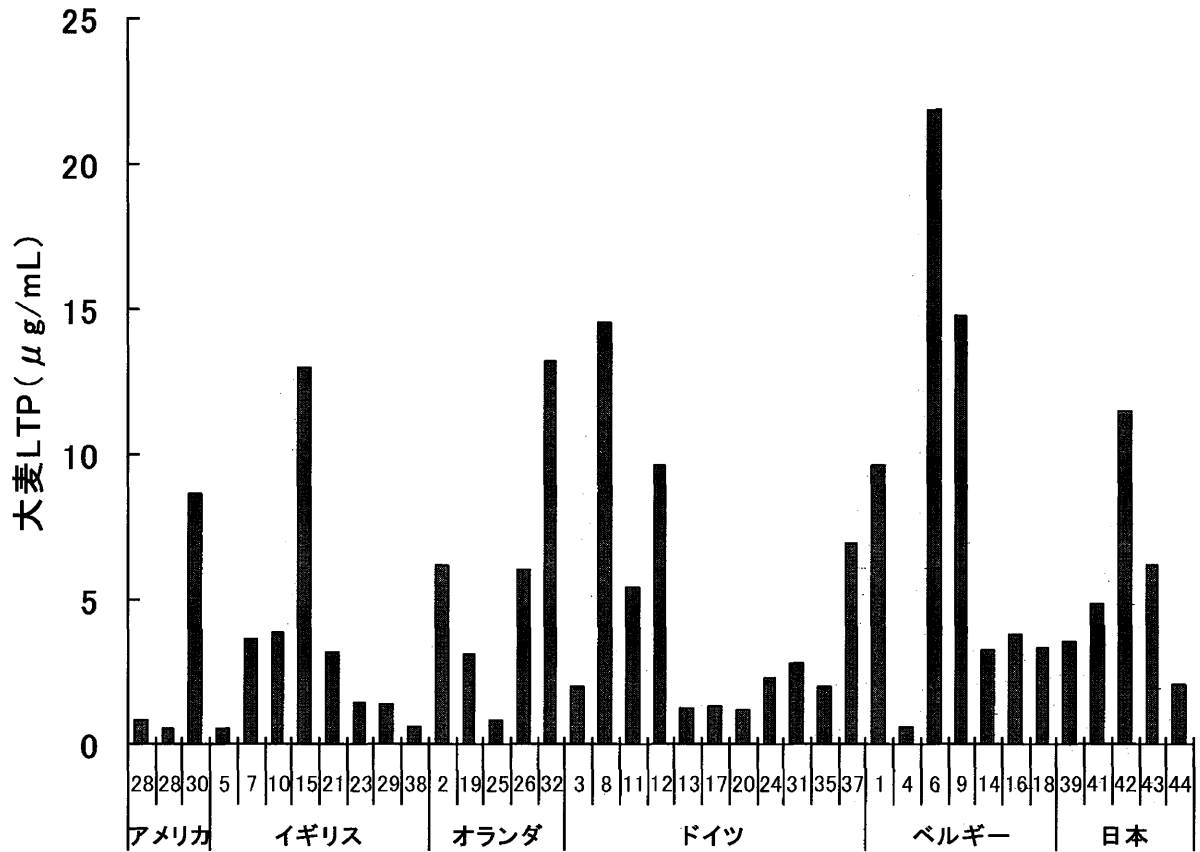


図 6 ビールの定量

抗大麦 LTP ポリクローナル抗体 ELISA 定量系において、大麦 LTP を標準品として検量線を作成し、市販ビール中の大麦 LTP の定量を行った。

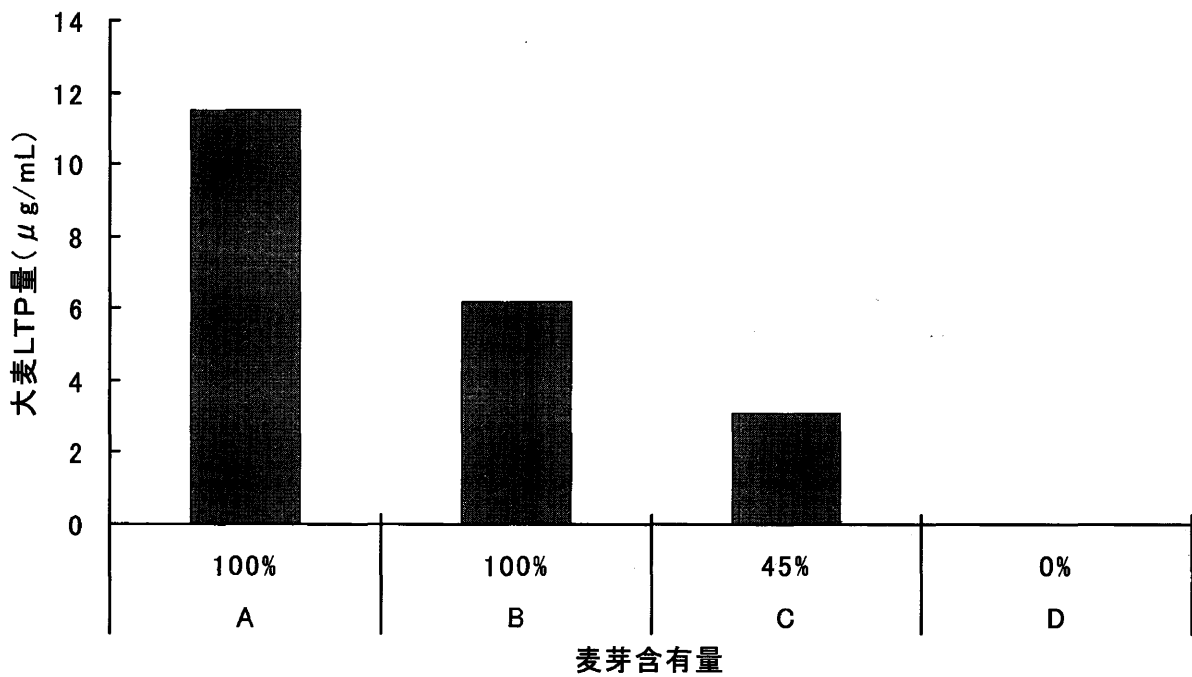


図 7 麦芽含有量の異なるビールの定量

抗大麦 LTP ポリクローナル抗体 ELISA 定量系において、大麦麦芽含有量表示の異なる市販ビール中の大麦 LTP の定量を行った。

先に述べた食品への表示義務項目 5 品目以外に、表示推奨項目として 20 品目が挙げられている。この中に、オレンジ、キウイ、バナナ、モモ、リンゴの 5 つの果物が挙げられている。リンゴ LTP は、モモ、プラム、サクランボなどのバラ科果実類と高い相同性、交差性を示し、重要なアレルゲンとなっていることは先に述べた通りである¹⁵⁾。また推奨項目に挙げられている果実の中でリンゴは、加工食品に使用されることが比較的多い。オレンジは柑橘類の中でも、生のまま食することも多く、ジュースやジャムにも利用頻度が高い。オレンジ LTP の研究に関しては、モモ LTP に対するウサギ抗血清がオレンジ LTP に交差し、オレンジを摂取して何らかのアレルギー症状が出る患者血清においてオレンジ LTP を認識する IgE が存在するという報告があり⁶³⁾、オレンジ LTP とバラ科果実 LTP との関係は興味深いところである。そこで本研究室でも果物アレルゲンの解析、あるいは食品中のアレルゲン定量を目的として、現在リンゴおよびオレンジ LTP の純化に成功し、これらに対するモノクローナル抗体の作製が遂行中である。

LTP は果物、野菜、穀類など植物共通に存在するタンパク質である。最終的には LTP をターゲットとした総合的な食品、アレルゲン評価系へと拡大していきたいと考えている。

謝 辞

本研究室における LTP プロジェクトの遂行に関与下さった滋賀県立大学廣瀬潤子助教、本学ラボラトリースタッフ木津久美子さん、本学院生中村美幸さん、LTP 関係卒研究生(三島真由子さん、井口智恵さん、枝裕子さん、松井藍さん、山本ひろ美さん、芝田沙織さん、中原絵実さん、佐藤利香さん)並びに株式会社森永生科学研究所、サントリー株式会社に厚く御礼申し上げます。

(平成 19. 9. 15. 受付)

引用文献

- 1) T. Yagami: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **128**, 271–279 (2002)
- 2) 池澤善郎, 大砂博之: アレルギー **51**, **8**, 591–604 (2002)
- 3) S. Wagner and H. Breiteneder: *Biochem. Soc. Transaction*, **30**, 935–940 (2002)
- 4) H. Breiteneder and C. Radauer: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **113**, 821–830 (2004)
- 5) M. Wensing, J. H. Akkerdaas, W. A. van Leeuwen, S. O. Stapel and C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110**, 435–442 (2002)
- 6) R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S. Amato and D. Zanoni: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**, 427–432 (2003)
- 7) 矢上 健: アレルギーの臨床, **20**, 854–860 (2000)
- 8) T. Yagami, Y. Hashima, A. Nakamura, H. Osuna and Z. Ikezawa: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 752–762 (2000)
- 9) R. Scachez-monge, M. Lombardero, F. J. Garcia-Selles, D. Barber and G. Salcedo: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 514–519 (1999)
- 10) E. A. Pastrello, L. Farioli, V. Pravettoni, C. Ortolani and M. Ispano: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 520–526 (1999)
- 11) 小川 正: アレルギー・免疫, **8**, 902–909 (2001)
- 12) 小川 正: 化学と生物, **40**, 643–652 (2002)
- 13) R. Scachez-monge, C. Blanco, A. D. Perales, et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 190–195 (2000)
- 14) D. Marion, J. P. Douliez, M. F. Gautier and K. Elmorjani: *Plant Food Allergen*, ed. F. N. C. Mills and S. P. W. Shewry. Oxford: Backwell Publishing, 57–69 (2004)
- 15) J. C. Kader: *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 627 (1996)
- 16) P. A. Van Paridon, T. W. J. Godella, Jr. and K. W. A. Wirts: *Biochimica et Biophysica Acta*, **943**, 76–86 (1988)
- 17) E. A. Meijer, S. C. De Vries, P. Sterk, et al.: *Mol. Cell Biochem.*, **123**, 159–166 (1993)
- 18) N. Bihot, J. P. Douliez, A. J. Jacquemard, et al.: *FEBS Letter.*, **509**, 27–30 (2001)
- 19) D. Wenderhenne, M. N. Binet, J. P. Blein, et al.: *FEBS Letter.*, **374**, 203–207 (1995)
- 20) H. Osman, S. Vauthrin, V. Mikes, et al.: *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 2825–2834 (2001)
- 21) P. Ricci, P. Bonnet, J. C. Hunet, et al.: *Eur. J. Biochem.*, **183**, 555–563 (1989)
- 22) F. Panabieres, M. Ponchet, V. Allasia, et al.: *Phytophthora spp. Mycol. Res.*, **101**, 1459–1468 (1997)
- 23) V. Mikes, M. L. Milat, M. Ponchet, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **245**, 133–139 (1998)
- 24) V. Mikes, M. L. Milat, M. Ponchet, et al.: *FEBS Letter.*, **416**, 190–192 (1997)
- 25) S. Vauthrin, M. L. Milat, M. Ponchet, et al.: *Bio-*

- chem. Biophys. Acta.*, 1419, 335–342 (1999)
- 26) H. Osman, V. Mikes, M.L. Milat, et al.: *FEBS Letter.*, 489, 55–58 (2001)
- 27) N. Buhot, et al.: *Molecular Biolog of the Cell.*, 15, 5047–5052 (2004)
- 28) Z. Wang, W. Xie, F. Chi and C. Li: *FEBS Letter.*, 579, 1683–1687 (2005)
- 29) J. P. Douliez, T. Michon, K. Elmorjani and D. Marion: *J. Cereal. Sci.*, 32, 1–20 (2000)
- 30) J. P. Douliez, C. Pato, H. Rabesona, D. Molle and D. Marion: *Eur. J. Biochem.*, 268, 1400–1403 (2001)
- 31) F. P. Monnet, W. Dieryck, F. Boutrot, P. Joudrier and M. F. Gautier: *Triticum Plant Sci.*, 161, 747–755 (2001)
- 32) B. P. Cammue, K. Thevissen and M. Hendriks: *Plant Physiol.*, 109, 445–455 (1995)
- 33) R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F. J. Garcia-Siles, D. Barber and G. Salcedo: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103, 514–519 (1999)
- 34) E. A. Pastrello, V. Pravettoni L. Farioli, et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104, 1099–1106 (1999)
- 35) E. A. Pastrello, C. Ortolani, C. Baroglio, et al.: *Biol. Chem.*, 380, 1315–1320 (1999)
- 36) E. A. Pastrello, F. P. D'Ambrosio, V. Pravettoni, et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1051, 371–377 (2000)
- 37) E. A. Pastrello, L. Farioli, V. Pravettoni, et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, 744–751 (2000)
- 38) A. Coni, L. Farioli, D. Fortunato, C. Ortolani, et al.: *J. Chromatogr. B.*, 756, 123–751 (2000)
- 39) E. A. Pastrello, L. Farioli, V. Pravettoni, et al.: *J. Chromatogr. B.*, 756, 95–103 (2001)
- 40) E. A. Pastrello, L. Farioli, A. M. Robio, C. Trambaioli, A. Coni, V. Pravettoni, et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 145–146 (2001)
- 41) K. Toriyama, K. Hanaoka, T. Okada and M. Watanabe: *FEBS Lett.*, 424, 234–238 (1998)
- 42) F. Baud, E. Pebay-Peyroula, C. Cohen-Addad, S. Odani and M. S. Lehmann: *J. Mol. Biol.*, 231, 877–887 (1993)
- 43) M. Rico, M. Bruix, C. Gonzales, R. I. Monsalve and R. Rodriguez: *Biochemistry*, 35, 15672–15682 (1996)
- 44) Y. Oda, T. Matsunaga, K. Fukuyama, T. Miyazaki and T. Morimoto: *Biochemistry*, 36, 13503–13511 (1997)
- 45) R. Gonzalez, J. Vateia, J. Carreira and F. Polo: *Lancet.*, 346, 48–49 (1995)
- 46) E. A. Pastrello, C. Pompei, V. Pravettoni, et al.: *Allergy*, 5, 45–47 (2001)
- 47) A. Armentia, R. Sanches-Monge, L. Gomez, D. Barber and G Salcedo: *Clin Exp Allergy*, 23, 410–415 (1998)
- 48) R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, et al.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122, 20–32 (2001)
- 49) K. Lindorff-Larsen and J. R. Winther: *FEBS Lett.*, 488, 145–148 (2001)
- 50) S. Tassin-Moindrot, A. Caille, J. P. Douliez, D. Marion and F. Vovelle: *Eur. J. Biochem.*, 267, 1117–1124 (2000)
- 51) C. Pato, M. Le Borgne, G. Le Baut, P. Le Page, D. Marion and J. P. Douliez: *Eur. J. Biochem.*, 62, 555–560 (2001)
- 52) O. Brenna, C. Pompei, C. Ortolani, V. Pravettoni, L. Farioli and E. A. Pastorello: *J. Agric. Food Chem.*, 48, 493–497 (2000)
- 53) J. D. Astwood, J. N. Leach and R. L. Fuch: *Nat. Biotechnol.*, 14, 1269–1273 (1996)
- 54) S. Tassin, W. F. Broekaert and D. Marion: *Nat. Biotechnol.*, 37, 3623–3637 (1998)
- 55) T. Honjoh, S. Muraoka S. Mamekoshi and M. Sakai: *Food and Food Ingredients J. Jpn.*, 206, 13–22 (2002)
- 56) Y. Takahata and F. Morimatsu: *Food and Food Ingredients J. Jpn.*, 206, 23–32 (2002)
- 57) J. Hirose, N. Kitabatake, A. Kimura and H. Narita: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 371–378 (2004)
- 58) J. Hirose, Y. Murakami-Yamaguchi, M. Ikeda, N. Kitabatake and H. Narita: *Cytotechnology*, 47, 145–149 (2005)
- 59) 山口 (村上) 友貴絵, 枝裕子, 本庄 勉, 成田宏史: 本誌, 60, 7–14 (2005)
- 60) Y. Watanabe, K. Aburatani, T. Honjoh, et al.: *J. Immunol. Methods*, 300, 115–123 (2005)
- 61) R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S. Amato and R. V. Ree: *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 87, 65 (2001)
- 62) G. G. Casado, J. F. Crespo, J. Rodriguez and G. Salcedo: *J. Allergy Clin Immunol.*, 108, 647–649 (2001)
- 63) O. Ahrazem, M. D. Ibabez, G. Lopez-Torreion, et al.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 137, 201–210 (2005)