

研究ノート

キウイアレルゲンの免疫学的検出

近藤徹弥*¹、鳥居貴佳*²、半谷 明*²、児島雅博*³、
北川絵里奈*⁴、石原健吾*⁴、松田 幹*⁵

Immunological Detection of Kiwi Allergen

Tetsuya KONDO*¹, Takayoshi TORII*², Akira HANYA*², Masahiro KOJIMA*³
Erina KITAGAWA*⁴, Kengo ISHIHARA*⁴ and Tsukasa MATSUDA*⁵

Food Research Center*¹*²*³ Department of Food and Nutrition, School of Life Studies, Sugiyama
Jogakuen University*⁴ Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of
Bioagricultural Sciences, Nagoya University*⁵

キウイの主要アレルゲンであるアクチニン (Act) の免疫学的測定法を開発するため、Act 特異的抗体を作製した。ウェスタンブロット (WB) 解析において、抗 Act ポリクローナル抗体はキウイジュース中の Act を特異的に認識した。ELISA 法を用いて 10 種類の果汁に対する交差反応性を検討した結果、ヘイワード種のキウイのみを認識した。さらに、モノクローナル抗体産生細胞株を 5 株樹立した。この内 1 株の細胞株から得られた抗体は、各種果汁に対する WB 解析において、Act のみを特異的に認識した。

1. はじめに

我が国における食物アレルギー有病率は総人口の約 1~2%と考えられ、深刻な社会問題となっている。食物アレルギーの原因物質として、牛乳、卵、小麦、ソバのタンパク質以外にも果実に含まれるタンパク質がしばしばアレルギーを引き起こす。例えばキウイは、アレルギー事故事例が多く、食品衛生法に基づくアレルギー物質として表示が望ましいとされている。そこで、本研究では、キウイの主要アレルゲン¹⁾であり、果汁中タンパク質の 40~50%を占めているアクチニン (Act) の免疫学的測定法を確立するため、Act 特異的モノクローナル抗体を作製することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 アクチニンの精製

ヘイワード種のキウイを剥皮後、ホモジナイズしてキウイジュースを調製した。ジュースから、硫酸分画、及び各種カラムクロマトグラフィーを経て、3 つの画分を分取した。各画分を同濃度混合したものをマウスへの投与抗原、並びに抗体産生細胞スクリーニング時の混合 Act として使用した。

2.2 抗アクチニン抗体の作製

抗 Act 抗体を作製するために、BALB/c マウス (6 週齢、雌) 2 匹に、混合 Act を腹腔投与した。抗体価の上昇したマウスより採血し、その遠心分離上清を抗 Act ポ

リクローナル抗体 (pAb) とした。また、抗体価の上昇したマウスの脾臓から B 細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。融合細胞は HAT 培地を用いて選抜し、限界希釈培養法によるクローニングを繰り返して、抗 Act モノクローナル抗体 (mAb) 産生細胞株を樹立した。

2.3 タンパク質の電気泳動

タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli 法にて行った。15%ゲルを用いて泳動後、CBB R-250 によりタンパク質を染色した。

2.4 アクチニンの免疫学的検出法

ウェスタンブロット (WB) 法による Act の検出は以下のように行った。SDS-PAGE 後のゲルを PVDF 膜に転写した後、ブロッキング剤によるブロッキング、一次抗体 (抗 Act 抗体) との反応、二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG モノクローナル抗体) との反応、さらに発色反応を経て、Act を検出した。

ELISA 法には直接吸着法を用いた。すなわち、Maxisorp ELISA plate (Nunc 製) の各ウェルに試料溶液中のタンパク質を固定後、一次抗体との反応、二次抗体との反応、さらに発色反応を行い、各ウェルの吸光度を測定した。混合 Act の吸光度を元に試料溶液中の Act 量を求めた。

3. 実験結果及び考察

*1 食品工業技術センター 応用技術室 (現分析加工技術室) *2 食品工業技術センター 応用技術室 (現保蔵包装技術室) *3 食品工業技術センター 応用技術室 (現発酵バイオ技術室) *4 椋山女学園大学 生活科学部 *5 名古屋大学大学院 生命農学研究科

3.1 アクチニジンの精製

Act はシステインプロテアーゼの 1 種である。そこでプロテアーゼ活性を指標として精製を繰り返し、最終的に 3 つの活性画分 (画分 1~3) を得た。図 1A に示したように、いずれの画分も SDS-PAGE 上で 31 kDa の分子量を持つ単一バンドを示した。SDS-PAGE 上のバンドを切り出して、MS/MS 解析を行った結果、3 つの画分ともに Act と同定された。これらの画分の酸性 Native-PAGE の結果、複数のバンドが認められること、さらにキウイの Act には等電点が僅かに異なるアイソザイムが少なくとも 6 種存在している²⁾、ことから、得られた 3 画分には複数の Act が含まれていると考えられた。

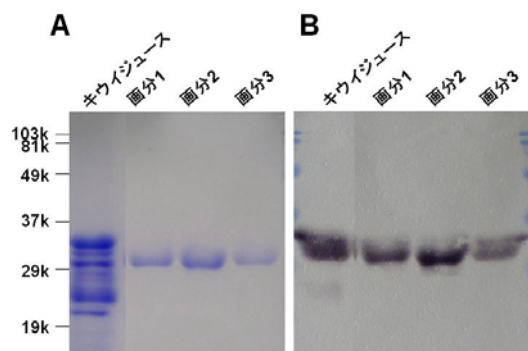


図 1 キウイジュース及び Act の SDS-PAGE 像 (A) 及び WB 像 (B)

3.2 抗アクチニンポリクローナル抗体の特性評価

pAb を一次抗体として、キウイジュース及び 3 つの Act 画分の WB を行った。キウイジュースでは、複数のタンパク質バンドが SDS-PAGE 上で確認されたが (図 1A)、WB において、Act の分子量である 31kDa 付近のみが発色した (図 1B)。また、pAb は、3 つの Act 画分のいずれも認識した。つぎに、pAb の様々な果物に対する交差反応性を調べた。果物として、ヘイワード種のキウイ、Act を含んでいないとされている 2 種類のキウイ (ゴールドキウイ、レインボーレッド)、Act と相同性が高いプロテアーゼを含んでいるイチジク、パイナップル、マンゴーやその他の果物 (ブドウ、バナナ、リンゴ、ミカン) の 10 種類を対象とした。各果物の果汁を ELISA に供したところ、ヘイワード種のキウイのみ発色した (データ省略)。これらのことから、pAb が 10 種類の果実のタンパク質の中で Act のみを特異的に認識することがわかった。

3.3 抗アクチニンモノクローナル抗体の交差反応性

5~12 回のクローニングにより、5 株の mAb 産生細胞株を樹立した。この内、2 株の細胞の各培養上清をモノクローナル抗体 (mAb137、及び mAb145) として用い、これらの mAb を用いる時の WB 条件 (抗体濃度やブロッキング条件) を最適化した。最適化した方法を用いて、

mAb137 と mAb145 の各種果汁に対する交差反応性を調べた (図 2)。mAb137 は、ヘイワード種キウイに存在する Act へのみ特異的に反応した (図 2B)。一方、mAb145 は Act だけでなく、ゴールドキウイ、パイナップル及びバナナともわずかに反応した (図 2C)。

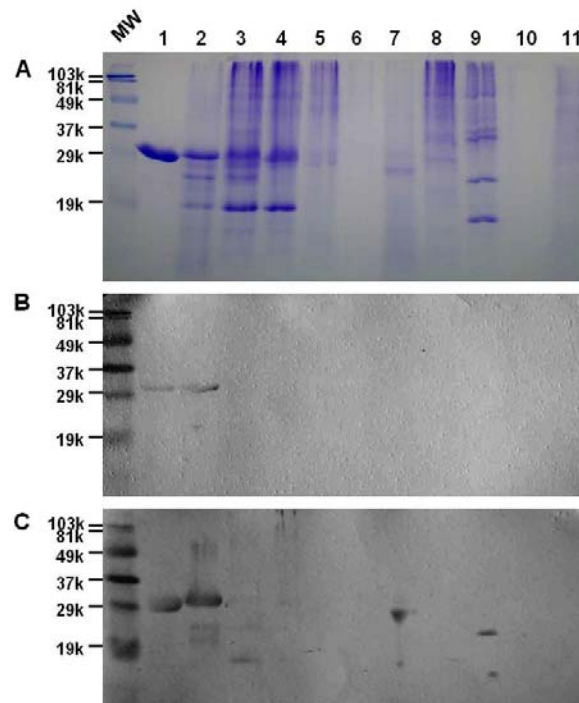


図 2 各種果汁の SDS-PAGE 像 (A) 及び WB 像 (B: mAb137, C: mAb145)

(MW: 分子量マーカー, レーン 1: 混合 Act, 2: ヘイワードキウイ, 3: ゴールドキウイ, 4: レインボーレッドキウイ, 5: イチジク, 6: ブドウ, 7: パイナップル, 8: マンゴー, 9: バナナ, 10: リンゴ, 11: ミカン)

4. 結び

キウイの主要アレルゲンである Act を特異的に認識する抗体を作製した。今後は、本抗体を用いて、食品中のキウイタンパク質の検出の可否やキウイアレルゲンの低減化処理の効果について、検証を行っていきたい。

付記

本研究の一部は、「地域新生コンソーシアム研究開発事業 (経済産業省)」により行われた。

文献

- 1) E.A.Pastorello, *et al.*: *J.Allergy Clinical Immunol.*, **101**, 531(1998)
- 2) S. Sugiyama, *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1994(1996)