



Identification of a 17 kDa protein that is a potentially novel antigen of lettuce-associated respiratory allergy in farmers

吉岡, 潤哉

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8866号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490091>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Identification of a 17 kDa protein that is a potentially novel antigen of lettuce-associated respiratory allergy in farmers

農家におけるレタス関連呼吸器アレルギーの新規抗原となりうる
タンパク (17 kDa) の同定

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科呼吸器内学分野 平田 健一 教授)

吉岡 潤哉

<背景>

レタスによる職業性皮膚炎や、レタス摂取による全身性の有害反応の存在が報告されている。口腔アレルギー症候群やアナフィラキシーの症例では、Lac s 1 lipid transfer protein (9 kDa)、16 kDa、thaumatin-like protein family (26 kDa)、aspartyl protease (35 kDa、45 kDa) などの多くのアレルギー性タンパクが同定されており、これらのタンパクは、主にレタスの葉から同定されている。我々は、以前にレタス栽培農家における職業性呼吸器アレルギーについて報告し、レタスの芯の切離断端から出る白色液に含まれる EP-1 like protein (51 kDa) が原因抗原の1つであることを明らかにした。そして、レタスの葉液から抽出したエキスとレタスの芯の切離断端から出る白色液から抽出したエキスをウエスタンブロット法で比較し、レタスの葉液から抽出したエキスとレタスの芯の切離断端から出る白色液では、血清に結合した IgE 結合バンドの位置に大きな違いがあることを明らかにした。さらに ELISA 法の結果からも、患者の血清はレタス葉液よりもレタス白色液に反応しやすく、陰性対照の血清はいずれも反応しないという傾向が支持された。

同研究では、レタス関連呼吸器アレルギー患者の患者血清とレタス白色液の IgE 抗体を用いたウエスタンブロット法では、50%以上の患者血清で 51 kDa の共通バンドが認められた。一方で 13 例中 3 例では 17 kDa の共通バンドが確認された。

<目的>

レタス関連呼吸器アレルギー患者の血清とレタス白色液のウエスタンブロットで確認された 17 kDa のタンパクに焦点をあて、レタス関連呼吸器アレルギーの新規抗原の同定を試みた。

<方法>

レタスの収穫および包装時に出現する呼吸器アレルギー症状のあるレタス農家 13 名が本研究に参加した。収穫したばかりのレタス (*L. sativa*, var. *capitata*) の茎を切離し、断面に溜まった白色液を集め、蒸留水に溶かして液状にした。レタス白色液と患者血清の反応をウエスタンブロット法、ELISA 法で確認した。さらに 17 kDa の共通のタンパクを質量分析で解析した。そして大腸菌を使用し、融合タンパク質のクローニング、発現、精製を行った。精製した 17 kDa のタンパクを使用し、レタス白色液で阻害ウエスタンブロットを実施した。

<結果>

レタス関連呼吸器アレルギー患者とレタス白色液のウエスタンブロットでは、13 名中 3 名で 17 kDa の共通の IgE 結合バンドが検出された。一方、陰性コントロールの血清では IgE 結合バンドは観察されなかった。レタス白色液に対する抗原抗体反応を検証するため、患者の血清とレタス白色液の反応を ELISA にて確認すると 3 名の患者の特異的 IgE 値は、陰性コントロールよりも高かった。さらに、これら 3 名の特異的 IgE 値と 17 kDa のバンドが検出されなかった患者の特異的 IgE 値を Mann-Whitney の *U* 検定を用いて比較した。これら 3

名の特異的 IgE 値 [中央値, (四分範囲)] は、0.065 (0.044-0.067) であり、17 kDa のバンドが検出されなかった患者の IgE 値は 0.021 (0.017-0.0301) であった。これら 3 名の特異的 IgE 値は 17 kDa のバンドが検出されなかった患者の特異的 IgE 値と比較して高い傾向にあった ($p=0.11$)。Coomassie Brilliant Blue 染色で確認された 17 kDa のバンドをゲルから除去し、質量分析計で分析してレタスラテックスアレルゲンのペプチド配列を同定した。その後、NanoLC-MS/MS を実施し多数の内部ペプチドの配列を取得し、Mascot ソフトウェアを用いて *L. sativa* ゲノムデータベースを検索してタンパクの同定を行った。解析の結果、17 kDa のタンパクが kirola-like protein と同定された。大腸菌を使用し、融合タンパク質のクローニング、発現、精製を行った同タンパクと患者血清の反応をレタス白色液による阻害ウエスタンブロットにて確認してみたが、現時点でこのタンパクに対する阻害効果は観察されなかった。

<考察>

以前、我々はレタスに関連する呼吸器アレルギーを患う患者の血清を用い、レタスの白色液中に分泌される EP1-like protein (51 kDa) がアレルゲンであることを同定した。今回我々は、kirola-like protein (17 kDa) が農家におけるレタス関連呼吸器アレルギーを引き起こす可能性のある新規アレルゲンであることを見出した。kirola protein は緑色または黄色のキウイフルーツの果肉に多く含まれる 17 kDa のタンパクであるとされている。キウイフルーツアレルギーの 10% が、kirola protein に特異的な IgE を産生する。

今回の論文の限界を以下に示す。レタス関連呼吸器アレルギー患者 13 人中 3 人で患者血清とレタス白色液でのウエスタンブロットで 17 kDa の共通バンドを検出した。しかし、既報の 51 kDa のタンパクと比較するとウエスタンブロット法で陽性と判定された患者の割合が低かったことから、レタス関連呼吸器アレルギーの主な抗原とは考えにくい。我々の以前の研究では、レタス白色液がレタス関連呼吸器アレルギーを引き起こすことをプリックテストおよび特異的吸入チャレンジ試験によって *in vivo* で証明した。精製した 17 kDa のタンパクでは *in vitro* ではレタス関連呼吸器アレルギーの抗原である可能性が示されたが、倫理的な観点から精製した 17 kDa のタンパクを用いたチャレンジテストを実施することができなかったため、精製した 17 kDa のタンパクがレタス関連呼吸器アレルギーの原因抗原であることを *in vivo* で証明することはできていない。また精製した 17 kDa のタンパクを使用し、レタス白色液での阻害ウエスタンブロットを実施したが阻害できず、精製した 17 kDa のタンパクがレタス関連呼吸器アレルギー抗原であると証明できていない。その原因は、レタス白色液に含まれるタンパク質の量も少なかったことも一因であると考えている。また、レタス白色液に含まれる kirola-like protein と精製した kirola-like protein との反応性の違いも原因の一つかもしれない。

<結論>

レタス関連呼吸器アレルギーの新規抗原となりうる 17 kDa タンパクを同定した。今後の研究でこの新規タンパクを精製し、レタスアレルギーの診断に役立てたい。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3361 号	氏 名	吉岡 潤哉
論 文 題 目 Title of Dissertation	<p>Identification of a 17 kDa protein that is a potentially novel antigen of lettuce-associated respiratory allergy in farmers</p> <p>農家におけるレタス関連呼吸器アレルギーの新規抗原となりうるタンパク (17 kDa) の同定</p>		
審 査 委 員 Examiner	<p>主 査 Chief Examiner 野津 寛元</p> <p>副 査 Vice-examiner 小川 沙</p> <p>副 査 Vice-examiner 久保 亮治</p>		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

<背景>

レタスによる職業性皮膚炎や、レタス摂取による全身性の有害反応の存在が報告されている。口腔アレルギー症候群やアナフィラキシーの症例では、Lac s 1 lipid transfer protein (9 kDa)、16 kDa、thaumatin-like protein family (26 kDa)、aspartyl protease (35 kDa、45 kDa) などの多くのアレルゲン性タンパクが同定されており、これらのタンパクは、主にレタスの葉から同定されている。我々は、以前にレタス栽培農家における職業性呼吸器アレルギーについて報告し、レタスの芯の切離断端から出る白色液に含まれる EP-1 like protein (51 kDa) が原因抗原の1つであることを明らかにした。そして、レタスの葉液から抽出したエキスをレタスの芯の切離断端から出る白色液から抽出したエキスをウエスタンブロット法で比較し、レタスの葉液から抽出したエキスをレタスの芯の切離断端から出る白色液では、血清に結合した IgE 結合バンドの位置に大きな違いがあることを明らかにした。さらに ELISA 法の結果からも、患者の血清はレタス葉液よ

りもレタス白色液に反応しやすく、陰性対照の血清はいずれも反応しないという傾向が支持された。

同研究では、レタス関連呼吸器アレルギー患者の患者血清とレタス白色液の IgE 抗体を用いたウェスタンブロット法では、50%以上の患者血清で 51 kDa の共通バンドが認められた。一方で 13 例中 3 例では 17 kDa の共通バンドが確認された。

<目的>

レタス関連呼吸器アレルギー患者の血清とレタス白色液のウェスタンブロットで確認された 17 kDa のタンパクに焦点をあて、レタス関連呼吸器アレルギーの新規抗原の同定を試みた。

<方法>

レタスの収穫および包装時に出現する呼吸器アレルギー症状のあるレタス農家 13 名が本研究に参加した。収穫したばかりのレタス (*L. sativa*, var. *capitata*) の茎を切離し、断面に溜まった白色液を集め、蒸留水に溶かして液状にした。レタス白色液と患者血清の反応をウェスタンブロット法、ELISA 法で確認した。さらに 17 kDa の共通のタンパクを質量分析で解析した。そして大腸菌を使用し、融合タンパク質のクローニング、発現、精製を行った。精製した 17 kDa のタンパクを使用し、レタス白色液で阻害ウェスタンブロットを実施した。

<結果>

レタス関連呼吸器アレルギー患者とレタス白色液のウェスタンブロットでは、13 名中 3 名で 17 kDa の共通の IgE 結合バンドが検出された。一方、陰性コントロールの血清では IgE 結合バンドは観察されなかった。レタス白色液に対する抗原抗体反応を検証するため、患者の血清とレタス白色液の反応を ELISA にて確認すると 3 名の患者の特異的 IgE 値は、陰性コントロールよりも高かった。さらに、これら 3 名の特異的 IgE 値と 17 kDa のバンドが検出されなかった患者の特異的 IgE 値とを Mann-Whitney の *U* 検定を用いて比較した。これら 3 名の特異的 IgE 値 [中央値, (四分範囲)] は、0.065 (0.044-0.067) であり、17 kDa のバンドが検出されなかった患者の IgE 値は 0.021 (0.017-0.0301) であった。これら 3 名の特異的 IgE 値は 17 kDa のバンドが検出されなかった患者の特異的 IgE 値と比較して高い傾向にあった ($p=0.11$)。Coomassie Brilliant Blue 染色で確認された 17 kDa のバンドをゲルから除去し、質量分析計で分析してレタスラテックスアレルギーのペプチド配列を同定した。その後、NanoLC-MS/MS を実施し多数の内部ペプチドの配列を取得し、Mascot ソフトウェアを用いて *L. sativa* ゲノムデータベースを検索してタンパクの同定を行った。解析の結果、17 kDa のタンパクが kirola-like protein と同定された。大腸菌を使用し、融合タンパク質のクローニング、発現、精製を行った同タンパクと患者血清の反応をレタス白色液による阻害ウェスタンブロットにて確認してみたが、現時点でこのタンパクに対する阻害効果は観察されなかった。

<考察>

以前、我々はレタスに関連する呼吸器アレルギーを患う患者の血清を用い、レタスの白色液中に分泌される EP1-like protein (51 kDa) がアレルギーであることを同定した。今回我々は、kirola-like protein (17 kDa) が農家におけるレタス関連呼吸器アレルギーを引き起こす可能性のある新規アレルギーであることを見出した。kirola protein は緑色または黄色のキウイフルーツの果肉に多く含まれる 17 kDa のタンパクであるとされている。キウイフルーツアレルギーの 10% が、kirola protein に特異的な IgE を産生する。

今回の論文の限界を以下に示す。レタス関連呼吸器アレルギー患者 13 人中 3 人で患者血清とレタス白色液

でのウェスタンブロットで 17 kDa の共通バンドを検出した。しかし、既報の 51 kDa のタンパクと比較するとウェスタンブロット法で陽性と判定された患者の割合が低かったことから、レタス関連呼吸器アレルギーの主な抗原とは考えにくい。我々の以前の研究では、レタス白色液がレタス関連呼吸器アレルギーを引き起こすことをプリックテストおよび特異的吸入チャレンジ試験によって *in vivo* で証明した。精製した 17 kDa のタンパクでは *in vitro* ではレタス関連呼吸器アレルギーの抗原である可能性が示されたが、倫理的な観点から精製した 17 kDa のタンパクを用いたチャレンジテストを実施することができなかったため、精製した 17 kDa のタンパクがレタス関連呼吸器アレルギーの原因抗原であることを *in vivo* で証明することはできていない。また精製した 17 kDa のタンパクを使用し、レタス白色液での阻害ウェスタンブロットを実施したが阻害できず、精製した 17 kDa のタンパクがレタス関連呼吸器アレルギー抗原であると証明できていない。その原因は、レタス白色液に含まれるタンパク質の量がも少なかったことも一因であると考えている。また、レタス白色液に含まれる kirola-like protein と精製した kirola-like protein との反応性の違いも原因の一つかもしれない。

<結論>

レタス関連呼吸器アレルギーの新規抗原となりうる 17 kDa タンパクを同定した。今後の研究でこの新規タンパクを精製し、レタスアレルギーの診断に役立てたい。

本研究成果は農家の人たちが高頻度に苦しむレタスアレルギーのアレルゲンタンパクの同定を試みた意義深い研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。