

果実のアレルゲン低減化加工技術の開発

斎藤 美貴・恩田 匠・深澤 親房

Development of the technology to reduce the allergen of fruits

Miki SAITO, Takumi ONDA and Chikafusa FUKAZAWA

要 約

山梨県産モモ果実における、モモ主要アレルゲンタンパク質Pru p3 (分子量9kDa) の検索を行った。供試モモ果実試料から、タンパク質の抽出と粗精製を行った結果、分子量約9kDaのタンパク質を検出した。N末端アミノ酸配列解析の結果、本タンパク質は、Pru p3であることが分かった。本研究により、日本産のモモ果実のアレルゲンタンパクが存在することが初めて明らかになった。

Abstract

A survey was conducted on the existence of Pru p3 protein (9-kDa), which is the major allergen of peach, on the peach produced in Yamanashi prefecture. As a results of extraction and partially purification of the proteins from tested peach sample, ca. 9.0-kDa. Protein was detected on tricine-SDS-PAGE analysis. N-terminal amino acid sequence analysis revealed that the ca. 9.0-kDa. protein was identify as Pru p3. This is the first report dealing with allergen of peach produced in Japan.

1. 緒 言

食物アレルギー患者は年々増加の一途をたどり、アレルギーは国民病とさえ言われている。厚生労働省では平成13年から特に重篤なアレルギー症状を引き起こす「特定原材料5品目」と「特定原材料の準じる食品」として20品目を指定し、注意を喚起している。この「特定原材料に準じる食品」には5種類の果物があり、山梨県の特産果実であるモモも含まれている。モモは県内の多くの食品メーカーが飲料や菓子の原材料として使用し、土産品などとして販売している特産品であるが、今後のアレルギー患者の増加と共にモモのイメージが低下する可能性がある。

欧州のモモの主要アレルゲンはPastorelloらにより分子量9000のタンパク質 (Pru p3) であることが報告されている。しかしながら、日本のモモに関してアレルゲンを調査した報告はなく、山梨県産のモモに関して、その有無を確かめることは非常に重要であると考えられた。

また、アレルギーの原因物質 (アレルゲン) はタンパク質であり、加工によってアレルゲンを低減化させる可能性がある。そこで、モモアレルギー患者にもモモを加工品として提供できるようなアレルゲン低減化加工技術開発のための基礎データを得ることを目的とした。

2. 実験方法

2-1 供試料

山梨県内で栽培されている浅間白桃の適熟果を使用した。

2-2 実験方法

2-2-1 タンパク質抽出および精製

モモを果肉と果皮に分けてタンパク質の抽出を行なった。果肉は湿重量の1/10量の緩衝液 (pH5.0) を加え、ブレンダーミキサーで均一化した。この抽出液を2枚のガーゼで濾過し、濾液を10,000rpmで20分間、4℃で遠心分離を行った。上清を分取し、60%飽和となるように硫酸 (硫酸アンモニウム) を添加して、4℃で一晩放置した。15,000rpmで30分間、4℃で遠心分離後、上清を除いて、沈殿を少量の緩衝液 (pH5.0) で溶解した。この溶液に硫酸を20%飽和になるように添加し、20%飽和硫酸を含む緩衝液 (pH5.0) で平衡化させた疎水性クロマトグラフ用カラム (フェニルトヨパール650M:東ソー) に添加した。カラムに非吸着画分を採取後、10%、5%、0%飽和硫酸とした緩衝液 (pH5.0) および蒸留水で溶出される画分を順次採取し、透析膜 (Spectra/Pro 1:限界分子量8000) に入れ、緩衝液 (pH6.0) 中で透析を行なった。十分に脱塩した試料を-80℃のフリーザーで凍らせた後、凍結乾燥を行ない、タンパク質を濃縮した。

果皮に関しては湿重量に対して2倍量の緩衝液 (pH5.0)

中でブレンダーミキサーを用いて均一化後、果肉と同様な操作でタンパク質を抽出したが、疎水クロマトグラフでの精製は行わず、硫酸沈殿後の溶液を透析した。

抽出および精製に用いた緩衝液はすべてマッキルベイン広域緩衝液であった。

2-2-2 トリシン-SDS電気泳動

果皮と果肉から抽出したタンパク質試料をトリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル (SPU-15S, ATTO社製) を使用し、付属品の泳動バッファー (トリストリシン系) を用いてトリシン-SDS電気泳動を実施した。分子マーカーにはレインボーマーカーキット (アマシャムバイオサイエンス) を用いた。泳動終了後のゲルは固定液 (25%メタノール, 7.5%酢酸) に30分間浸漬してタンパク質を固定後、CBB(Coomassie brillrant blue)染色して検出した。

2-2-3 N末端アミノ酸解析

電気泳動後のゲルからタンパク質をセミドライ式電気的プロテイン装置 (AE-6677, ATTO社製) を用いて、PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜に転写した。PVDF膜をCBBで染色後、目的のバンドをメスで切り出し、プロテインシーケンサー (Protein sequencer 491, アプライドバイオシステム社製) で、エドマン分解法によりタンパク質のN末端のアミノ酸配列を解析した。

3. 結果および考察

3-1 タンパク質のトリシンSDS-電気泳動

モモの果実には多糖やポリフェノールなどの夾雑物質が多く含まれるため、それらを除く必要があった。そこで、疎水性カラムを用い、抽出したタンパク質を精製してから電気泳動を行なった。その結果、果肉においてはいずれの画分においても分子量9000付近のタンパク質は認められなかった (図1)。

一方果皮では、分子量9000付近のタンパク質の存在が確認された (図2)

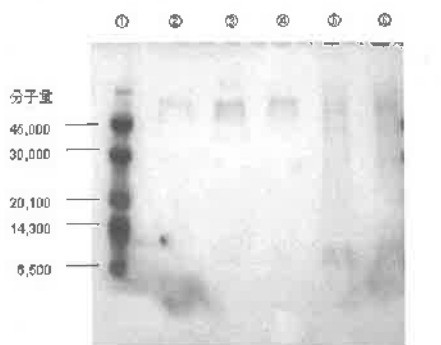


図1 果肉のタンパク質電気泳動結果
 ①分子量マーカー ②未濾り画分
 ③10%飽和硫酸沈出画分 ④6%飽和硫酸沈出画分
 ⑤0%飽和硫酸沈出画分 ⑥残留水沈出画分

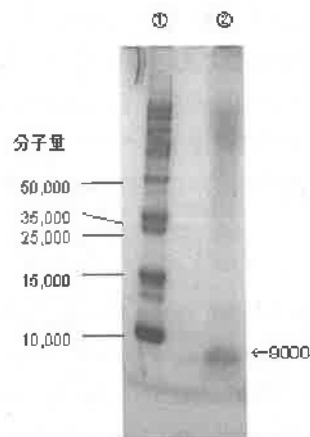


図2 果皮のタンパク質電気泳動結果
 ①分子量マーカー ②: 梨白桃

3-2 タンパク質のN末端アミノ酸解析

DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている Pru p3 の N 末端アミノ酸配列と本研究でモモ果皮に認められた分子量9000付近のタンパク質のN末端アミノ酸配列の解析結果を表1に示した。10アミノ酸残基が一致したことからこのタンパク質はPru p3と同定された。

表1 N末端アミノ酸配列解析結果

Pru p3 : Ile-Thr-Cys-Gly-Gln-Val-Ser-Ser-Ser-Leu
分子量9000: Ile-Thr- X -Gly-Gln-Val-Ser-Ser-Ser-Lcu
Xはエドマン法で分析出来ないアミノ酸を示す。

3-3 アレルゲン低減化方法

モモの主要アレルゲンであるPru p3は果肉には殆ど含まれず、果皮に存在していることが本研究で明らかになった。そこで、Pru p3を除去する条件を検討した。pHを4~7に調整したマッキルベイン緩衝液中に果皮を浸漬したところ、pH4と5で抽出が確認できた。従って、アレルゲンは弱酸性溶液に可溶化しやすく、浸漬するだけで抽出されると判断できた。また、このpH領域はモモのpHに近いいため、穏和な条件でアレルゲンの除去が可能になると考えられる。以上のことから、果肉を弱酸性の溶液に浸漬すると果皮から移行したアレルゲンを抽出 (除去) でき、アレルゲン低減化の可能性が高いことがわかった。

4. 結 言

1. 山梨県産のモモ (浅間白桃) についてモモの主要アレルゲンであるPru p3の有無を電気泳動で確認したところ、果皮においてPru p3に相当する分子量 (9000) のタンパク質のバンドが認められた。
2. Pru p3に相当する分子量 (9000) のタンパク質を同定するために、N末端アミノ酸配列の解析を行った。

この結果10残基がPru p3と一致したことから、果皮に Pru p3が存在することが明らかになった。

3. アレルゲンは弱酸性溶液に可溶化しやすく、果肉を弱酸性の溶液に浸漬するとアレルゲンを抽出（除去）できる可能性が高いことが示唆された。

参考文献

- 1) Elide A.Pastorello, Laura Farioli, Valerio Pravettoni, Claudio Ortolani, Marco Ispano, Mara Monza, Chiara Baroglio, Elisabetta Scibola, Raffaella Ansaloni, Cristoforo Lncorvaia and Amedeo Conti : J Allergy clin immunol, 103 (No1) , P521-526. (1999)