
研究報文

Lipid Transfer Protein に対する モノクローナル抗体を用いた リンゴ使用量の評価系の確立

岡崎 史子, 山口(村上) 友貴絵*, 中村 美幸, 廣瀬 潤子**, 成田 宏史

Evaluation of Apple Content with Monoclonal Antibodies Specific to Lipid Transfer Protein

Fumiko Okazaki, Yukie Yamaguchi, Miyuki Nakamura,
Junko Hirose, Hiroshi Narita

In order to establish evaluation system for apple content in foods, monoclonal antibodies were raised against apple lipid transfer protein (LTP). A sandwich-type of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed by using two of the five monoclonal antibodies obtained. This ELISA showed a practical working range of 0.03-10 ng/mL for apple LTP and no cross-reactivity with other fruits tested except plum. LTP could be determined with this ELISA in peel selectively and in foods with apple labeling such as apple juice, vegetable juice and even in curry roux.

(Received September 15, 2012)

I. 緒言

近年, アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害が増加している。これを予防するため, 2002 年 4 月から食物アレルギーの発症数, 重篤度などを考慮し, 卵, 乳, 小麦, そば, 落花生の 5 品目が表示義務特定原材料として指定された (2008 年 6 月にえび, かにの 2 品目が追加指定)。2002 年 11 月には, 厚生労働省からアレルギー物質を含む食品の検査法が通知され, 定量検査法としては Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) が採用された (現在は消費者庁の所管となっている)¹⁾。実際の検査においては, ELISA 法により 10 μ g/mL または 10

μ g/g 以上の特定原材料タンパク質が検出された場合には, 必要に応じて製造記録確認・確認検査等を行い, 適正な表示となるよう措置がなされる。一方, 特定原材料に準ずる 18 品目については, 現在消費者庁を中心に定量法の確立プロジェクトが進行している。本研究はそのプロジェクトの一環として, 表示推奨品目の中でも摂取頻度が高く加工品への利用が多いリンゴに対する免疫学的評価系の確立を目的として行った。

ターゲットタンパク質としては, Lipid Transfer Protein (LTP) を選択した。LTP は分子量約 9kDa の分泌タンパク質で, 分子内に存在する 8 つのシステイン残基はすべて S-S 結合を形成しており, 安定な高次構造を持つため, 加熱や消化酵素に対して耐性を示す²⁾。タンパク質としてのこのような特徴はアレルギー性の高さに寄与している³⁾。また, LTP のアミノ酸配列はさまざまな植物で高い相同性

京都女子大学家政学部食物栄養学科

*京都栄養医療専門学校

**滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科

をもっているため、LTPは汎アレルギーンとして知られている。本研究では上述の目的達成のために、他の果物に交差せず、リンゴLTP特異的に反応するモノクローナル抗体(mAb)を作製し、これを用いたリンゴLTPの定量系の確立を試みた。

II. 方法

1. リンゴLTPの精製

まず、Björksténらの方法を参考にリンゴ抽出液を作製した⁴⁾。具体的には、リンゴ(サンつがる)3200g(13個)の種を除き、2 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、10 mmol/L ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム、3 mmol/L アジ化ナトリウムを含む抽出溶媒3200 mLとポリビニルポリピロリドン2%(w/v)を加えて粉碎し、攪拌機(Yamato LT400)により4℃で一晩抽出を行った。その後、ガーゼろ過し、遠心分離(10,000×g, 4℃, 10分間)により上清を回収した。上清画分にトヨパールCM樹脂(東ソー, TOYOPEARL CM 650M)を20 mL加え4℃で一晩攪拌吸着させた後、遠心分離(10,000×g, 4℃, 10分間)により樹脂を回収してカラムに詰め、20 mmol/L リン酸緩衝液pH 5により樹脂を洗浄した。0.5 mol/L NaClを含む20 mmol/L リン酸緩衝液pH 5により吸着画分を溶出させた(CM吸着画分)。その後、ゲルろ過クロマトグラフィー(Amersham Biosciences, Sephadex G-50, 内径1.5×110 cm)によりLTP画分を得た。

タンパク質の定量は、牛血清アルブミン(SIGMA)を標準品として、DCプロテインアッセイ(BIO-RAD)を用い、655 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(Model 3550, BIO-RAD)により測定した。

2. LTPの同定

精製の各段階において、まずはSDS-PAGEによる解析を行った。ゲルはNuPAGE 10%Bis-Tris Gel(インビトロジェン)を用い、CROSSPOWER1000(アト)80 mAの定電流、還元剤存在下において泳動した。ゲルはクマシーブリリアントブルー R-250で染色した。

また、ゲルろ過のPeak③、Peak④についてはプロテインシーケンサー(Procise 491HT, アプライドバイオシステムズ)を用いて、N末側の解析を行った。

3. mAbの作製

mAbの作製を初めとする免疫学的手法に関しては、基本的にKhöler G. と Milstein C. 及び森下と成

田の方法に従った^{5) 6)}。

8週令の雌BALB/cマウスの腹腔内に抗原としてリンゴLTP画分50 μgと完全フロイントアジュバント(Freund's complete adjuvant, Difco)とのエマルジョン(1容:1容)を投与した。2, 4, 6週間後、上述抗原20 μgと不完全フロイントアジュバント(Freund's incomplete adjuvant, Difco)とのエマルジョン(1容:1容)を腹腔内に投与し、さらに2週間後抗原10 μgを含むPBS(150 mmol/L 塩化ナトリウムを含む10 mmol/L リン酸緩衝液pH 7.4)を腹腔内に投与した。その3日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出してこれをほぐし、基本培地(RPMI-1640培地に100 mmol/L ピルビン酸ナトリウム、結晶ペニシリンGカリウム1万単位/L、ストレプトマイシン10mg/Lを加えた培地)に懸濁した後、脾臓細胞を遠心分離で回収した。

この脾臓細胞と10%ウシ胎仔血清添加基本培地(以下、血清添加培地と記す)で培養した対数増殖期のマウスミエローマ細胞P3U1を10:1の比率になるように混合し、基本培地で2回洗浄した。遠心分離により細胞を回収し、細胞ペレットに平均分子量1500の50%ポリエチレングリコール溶液(Roche)1 mLを1分かけて添加し、その後1分間静置した。さらに20 mLの基本培地を10分間かけて添加して細胞液を希釈した後、遠心分離により細胞を回収した。この細胞を40 mLのHAT培地(4×10⁻⁷ mol/L アミノプテリン、1.6×10⁻⁵ mol/L チミジン、および1×10⁻⁴ mol/L ヒポキサンチンを含む血清添加培地)に懸濁し、96穴プレート4枚に分注し、湿度100%、炭酸ガス5%、37℃で培養を開始した。培養開始の翌日、HAT培地を各ウェルに100 μL添加し、以後2ないし3日ごとに半量の培地を新たなHAT培地と交換し、培養を続けた。その結果、ほとんどのウェルでハイブリドーマの増殖が認められた。

細胞融合後、得られたハイブリドーマから目的とする抗体産生細胞を選択するため、固相ELISAによりスクリーニングを行った。リンゴLTP画分を2 μg/mLでELISA用マイクロプレート表面に固相化後、1%BSA/PBSによりブロッキングした。一次反応としてハイブリドーマ培養上清を反応させ、続いてアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(カッペル)との反応後、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムにより検出し、405 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(Model 3550, Bio-Rad)を用いて測定した。

スクリーニングで陽性を示した株については、限

界希釈法により2回のクローニングを行うことでmAb産生細胞を樹立した。クローニング時には、増殖培地として血清添加培地に増殖因子としてORIGEN (IGEN) を10%になるように添加したものをを用いた。

樹立したmAb産生細胞が培養上清中に分泌するmAbについて、その免疫グロブリンのサブクラスを、マウスmAbアイソタイピングキット (Amersham) を用いて調べた。

mAbを大量調製するために、マウスに腹水ガンを誘導した。まず、0.5mLの2, 6, 10, 14-Tetramethylpentadecane (プリスタン, 和光純薬工業) をBALB/cマウスの腹腔内に投与し、投与3~10日後に 1×10^7 個のmAb産生細胞を腹腔内に移植した。その約2週間後に腹水を採取し、細胞を遠心分離後(10,000 × g, 4℃, 5分)上清を回収し、プロテインGセファロース (Amersham) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりmAbを純化した。

さらに、抗体にペルオキシダーゼを直接標識することにより、酵素標識mAbを作製した⁷⁾。

4. ウエスタン解析

モモ、キウイフルーツ、オレンジについてもリンゴと同様の方法でCM吸着画分を作製した。各果物CM吸着画分(タンパク質として5 μg)のSDS-PAGEを行った後、ゲル上のタンパク質をポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (BIO-RAD) に転写し、5%スキムミルクを含むPBSによるブロッキングを室温で1時間行った。その後、抗リンゴLTP mAb (ハイブリドーマ培養上清) と室温、1時間で反応させた。次に、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (American Qualex) で室温、1時間の反応を行い、発色はアルカリフォスファターゼ発色キット (ナカライテスク) により行った。

5. サンドイッチ ELISA

ELISA用96穴マイクロプレート (NUNC) に5 μg/mL抗リンゴLTP mAbを50 μL添加し、37℃で1時間放置後、1%BSA/PBSによりブロッキングした。続いて、リンゴLTP (0~100 ng/mL) または試料溶液を50 μLずつ添加し、37℃で1時間放置した。その後、ペルオキシダーゼ標識抗リンゴLTP mAbを50 μLずつ添加し、37℃で1時間放置し、テトラメチルベンジジンを基質として検出し、反応停止液(1 mol/L硫酸)添加後、主波長450 nm、副波長655 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

6. LTP 定量用抽出液の調製

生の果物(リンゴ, オレンジ, バナナ, キウイフルーツ, モモ, スモモ, ナシ)は、褐変を防ぐ目的で、リンゴLTP精製時に用いた抽出溶媒をサンプルと同重量加えて粉碎し、一晚抽出を行った。これを2倍希釈抽出液とした。カレールーは、ホモジナイザーで均質化した後1gを量りとり、PBS19 mLを混合して一晚振とう抽出を行った。これを20倍希釈抽出液とした。各抽出液を遠心分離(3,000 × g, 4℃, 20分間)して上清を回収し、ろ過(No.2, Advantec)したろ液を試料溶液とした。ジュースはそのまま試料溶液とした。なお、皮と可食部に分けた定量では、リンゴを食べるときの下処理と同様に包丁でむいた皮と、皮と芯を除いた可食部をそれぞれサンプルとした。

Ⅲ. 結果および考察

1. 精製リンゴLTPの評価

生リンゴから抽出を行い、最終的にゲルろ過クロマトグラフィーで分取した画分(図1-1)をSDS-PAGEに供した結果、Peak③に分子量9 kDa付近の単一タンパク質、Peak④にそれより少し小さい単一タンパク質の2種類を確認した(図1-2)。Peak③のN末端アミノ酸配列を解析したところ、IT (X) GGVTTSSLAP (X) IGYVRSRGなる配列が得られた。これはSánchez-Mongeらが報告しているリンゴLTPのN末端アミノ酸配列と一致したため、この画分がリンゴLTPであると同定した⁸⁾。一方Peak④のN末端アミノ酸配列としてGSPFQDSK (X) GVR (X) SKAGYKという配列が得られたので、ホモロジー検索を行った結果、Segurらが報告しているジャガイモsnakin-1と高い相同性を示した⁹⁾。snakin-1はジ

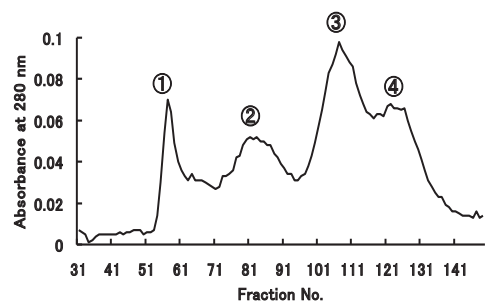


図1-1 ゲルろ過クロマトグラフィーによるLTPの分離

リンゴCM吸着画分を、セファデックスG50を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにかけ、LTPの精製を行った。

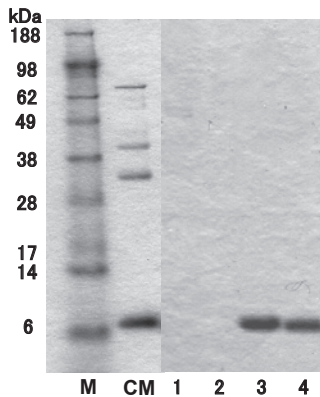


図 1-2 ゲルろ過による各ピークの解析
ゲルろ過の 4 つの各ピークに対し、10%均一ゲルを用いて還元状態における SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った。
M：分子量マーカー，CM：リンゴ CM 吸着画分 (5 μ g/lane)，1：ピーク① (2 μ g/lane)，2：ピーク② (2 μ g/lane)，3：ピーク③ (2 μ g/lane)，4：ピーク④ (2 μ g/lane)

ベレリンにより発現が制御されているタンパク質で、微生物に対する抵抗性をもつことが報告されているが、高次構造や生理機能については不明である⁹⁾。

2. 抗リンゴ LTP mAb の果物間における交差反応性

3 匹の免疫マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合後、最終的に 5 個 (1G, 7D, 11G, 12E, 12H) の mAb 産生ハイブリドーマを樹立した。いずれの mAb も IgG1 κ であった。これらの細胞をプリスタン処理したマウスに接種することで腹水ガンを誘導し、採取した腹水からプロテイン G により IgG 画分を回収した。得られた精製抗体の表示推奨品目に含まれる果物間における交差反応性を検討した。リンゴ、モモ、キウイフルーツ、オレンジの CM 吸着画分をタンパク質として 5 μ g 用いて SDS-PAGE を行った結果、いずれの果物でも 9 kDa 付近にタンパク質のバンドが認められた (図 2A)。ウェスタン解析の結果では、得られた抗体はすべてリンゴ LTP に強く反応を示したが、7D についてはモモに対しても若干交差した (図 2 B ~ F)。なお、バナナも表示推奨品目に含まれているが、CM 吸着画分を得られなかったためサンプル化できなかった。バナナ LTP のアミノ酸配列は、他の果物の LTP と比べてかなり違うので交差する可能性は低いと考えられた。事実、後述のサンドイッチ ELISA でもバナナには交差しなかった。

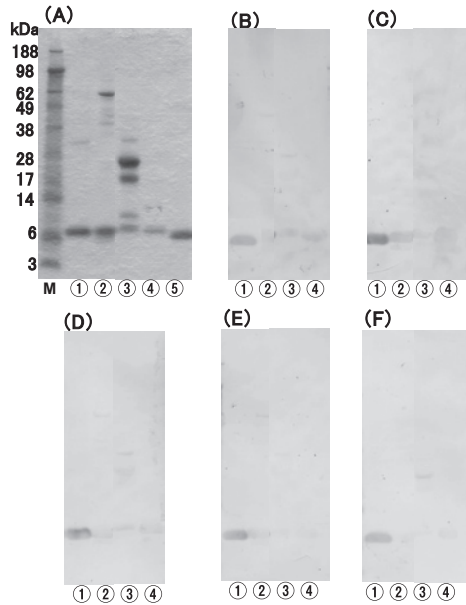


図 2 モノクローナル抗体の果物間における交差反応性

(A)：各果物の CM 吸着画分に対し、10%均一ゲルを用いて還元状態における SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った。(B) ~ (F)：これを mAb 1D (B)、7D (C)、11G (D)、12E (E)、12H (F) を用いてウェスタン解析を行った。
M：分子量マーカー，①：リンゴ，②：モモ，③：キウイフルーツ，④：オレンジ 各 CM 吸着画分 (5 μ g/lane)，⑤：リンゴ LTP (3 μ g/lane)

3. サンドイッチ ELISA の構築

5 種類の純化した抗体とそれぞれの酵素標識抗体を用いて、リンゴ LTP に対するサンドイッチ ELISA の組み合わせを検討した結果、2 通りの ELISA 系が成立したが、固相：12H、標識抗体：7D の組み合わせの方が感度が高く、検出範囲は 0.03 ~ 10 ng/mL であった (図 3)。

まず、本定量系の果物間における交差反応性を検証した (表 1)。アレルゲン表示推奨果物に対しては交差しなかった。酵素標識抗体として用いている 7D は、ウェスタンブロットングではモモへの交差がみられたが、リンゴ特異的でモモに交差しない 12E を固相抗体とすることで、7D の特異性の甘さを無視できるサンドイッチ ELISA を構築できた。リンゴと同じバラ科果物に属するスモモに対しては交差性が認められたが、アレルゲン表示対象外であること、加工品としての使用が稀であることから、許容できるものと考ええる。なお、当然のことではあ

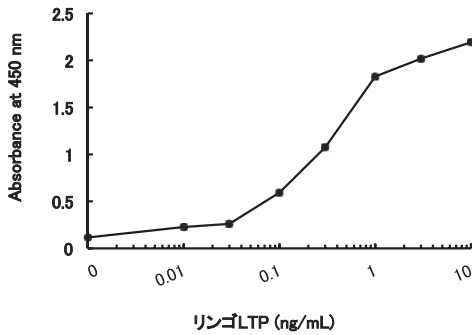


図3 リンゴLTPに対するサンドイッチELISAの標準曲線

固相抗体：12H, ペルオキシダーゼ標識抗体：7Dの組み合わせにおいて、リンゴLTPに対する検量線を作成した。

るが、本定量系はアレルギー表示義務化特定原材料の7品目とは反応しなかった。

次に、品種の違う種々のリンゴLTPの定量を試みた(表2)。現在市場で販売されている品種は古種を掛け合わせた新種で多く占められており、消費者の嗜好や害虫対策のために品種改良が繰り返されている。紅玉、千秋、旭、スターキングは古種であり、ジョナゴールド、アルプス乙女、シナノスイートは古種を掛け合わせた新種と呼ばれる品種である。LTP含量を比較すると各品種間では10倍異なるものもあったが、古種と新種による差はほとんどみられなかった。食品成分表に表記されているリンゴのタンパク質量は0.2% (アミノ酸組成によるタンパク質量では0.1%) であり、濃度に換算すると1~2 mg/gである。リンゴ果実のLTP定量結果を約10 μg/gとすると、リンゴタンパク質の1/100~1/200程度をLTPが占めると考えられる。アレルギー表示においては、タンパク質量として10 μg/g以上使用されているかどうかを評価する必要があるが、LTP量として0.1 ng/mLから定量できる本定量系では、リンゴタンパク質量に換算しても10 ng/g程度から検出することができるので、十分な感度が得られたと考えている。

リンゴは、完熟後保存期間が長くなるとLTPの減少がみられると報告されている¹⁰⁾。本実験のサンプルとして用いたリンゴが収穫後どれくらいの時間を経過しているかは不明であるため、LTP含量を比較することは難しい。また追熟ホルモンであるエチレンの増加によりLTPが増加すること、エチレン生成量は品種間で大きな差があることから、植物ホル

	食品名	LTP (μg/g)
表示推奨果物	リンゴ	10.79
	オレンジ	-
	バナナ	-
	キウイフルーツ	-
バラ科植物	モモ	-
	スモモ	4.27
	ナシ	-

- : 検出限界以下

表1 抗リンゴLTPサンドイッチELISAの果物間の交差反応性

サンドイッチELISAの果物間の交差反応性を、各果物中のLTPを定量し果物1g当たりのLTP量を調べることで確認した。リンゴはジョナゴールドを用いた。

	食品名	LTP (μg/g, ml)
古種	紅玉	8.41
	千秋	14.21
	旭	3.99
	スターキング	10.11
新種	ジョナゴールド	9.27
	アルプス乙女	31.21
	シナノスイート	15.02
	100%リンゴジュース(ふじ)	2.52
	野菜ジュース	0.12
	カレールウ	0.01

表2 食品中のリンゴLTP

異なる品種のリンゴ及びリンゴ使用表示のある加工食品中のLTP含量をサンドイッチELISAで定量し、食品1gあるいは1ml当たりのLTP量で示した。

モンとの関連も興味を持たれるところである^{11), 12)}。

その他、リンゴを含むとの表示のあるジュースやカレールウは製造中に加熱工程があるにも拘わらずLTPの定量が可能であった。果物は生の状態で摂取することが多いが、ジャムやケーキなど加熱加工食品にも広く使用されている。果物の主要アレルギーであるPR-10に属するタンパク質やプロフィリンは加熱するとアレルギー性が劇的に低下すると言われている¹³⁾。しかし、LTPは180℃の高温加熱処理を行ってもアレルギー性を維持していること、またリンゴLTPが加熱によりリンゴ中の糖類と結合して糖化され、アレルギー性が保持されていると報告されていることから、LTPは果物加工食品の中で追跡するのに適したアレルギータンパク質であるといえよう^{14), 15)}。

また、LTPは植物の表層で生体防御タンパク質として働いていると考えられている。そこで果実にとっての表層である皮と可食部にわけてそれぞれ抽出し、LTP量を定量してみたところ、皮に局在して

いることが分かった (表 3)。リンゴの加工品には、ジュース、缶詰、ジャムなどがあり、加工品用のリンゴの約 90 % がジュース用である。リンゴジュースは、除芯後皮付きのままクラッシャーで破碎され、搾汁機にかけられ原果汁にされる。LTP は水で抽出されやすいタンパク質であるため、ジュースなど皮ごと加工されるものに関しては検知できると考えられる。しかし、皮を除いてから加工するものに関しては、LTP 定量の結果から実際のリンゴの使用量を適正に評価できない可能性がある。また、植物は栽培条件によって個体差が大きい可能性が考えられるため、数多くのサンプルを定量し、今回確立したリンゴ LTP の評価系がアレルギー表示におけるリンゴ使用量の評価に適しているかどうか、さらなる検証をしていきたいと考えている。

品種	LTP (μg/g)	
	皮	可食部
ジョナゴールド	20.18	0.04
陽光	12.47	0.03
北斗	10.83	-
サンふじ	4.99	0.02
玉林	10.08	-

- : 検出限界以下

表 3 部位別リンゴ LTP の定量
リンゴを皮と可食部に分けて抽出し、それぞれの LTP 含量をサンドイッチ ELISA で定量し、皮、可食部それぞれ 1g 当たりの LTP 量で示した。

要約

食品中のリンゴ使用量の評価系を確立するために、リンゴ Lipid Transfer Protein (LTP) に対するモノクローナル抗体を作製した。得られた 5 抗体のうちの 2 抗体を用いてサンドイッチ ELISA を確立することに成功した。この定量系は LTP を 0.03 ~ 10 ng/ml で検出可能であり、すももには交差するものの、特定原材料表示推奨品目に含まれる他の果物には交差せず、リンゴ LTP 特異的であった。リンゴを皮と可食部にわけて抽出し、この定量系で定量したところ、LTP は皮に局在していることが確認できた。また、リンゴジュースや野菜ジュース、カレールーなどの、リンゴ使用加工食品においても LTP を定量することができた。

引用文献

1) 消費者庁次長通知：アレルギー物質を含む食品の検査方法について (平成 22 年 9 月 10 日 消

食表第 286 号)

- 2) Kader J. C.: *Plant Mol. Biol.*, **47**, 627-654 (1996)
- 3) Kondo Y. and Urisu A.: *Allergol. Int.*, **58**, 485-91 (2009)
- 4) Björkstén F., Halmepuro L., Hannuksela M., Lahti A.: *Allergy*, **35**, 671-677 (1980)
- 5) Khöler G. and Milstein C.: *Nature.*, **256**, 495-497 (1975)
- 6) 森下恵美, 成田宏史: 本誌, **47**, 1-18 (1992)
- 7) Nakane PK, Kawaoi A.: *J. Histochem Cytochem.*, **22**, 1084-91 (1974)
- 8) Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D, Salcedo G: *J. Allergy Clin Immunol.* **103**, 514-519 (1999) .
- 9) Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**:16-23 (1999)
- 10) Sancho AI, Foxall R, Rigby NM, Browne T, Zuidmeer L, van Ree R, Waldron KW, Mills EN.: *J. Agric Food Chem.* **54**, 5098-5104 (2006)
- 11) Jung HW, Kim W, Hwang BK.: *Plant Cell Environ.*, **26**, 915-928 (2003)
- 12) Harada T, Sunako T, Wakasa Y, Soejima J, Satoh T and Niizeki M.: *Theor Appl Genet*, **101**, 742-746 (2000)
- 13) Kondo Y. and Urisu A.: *Allergol. Int.*, **58**, 485-91 (2009)
- 14) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Falagiani P.: *J. Allergy Clin Immunol.*, **112**, 1009-1011 (2003)
- 15) Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S: *Allergy*, **60**, 1262-1268 (2005)