

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究経過報告書

研究課題	メロン・ククミシンの特性と果実特異的発現機構の解析
研究種別	<input type="checkbox"/> 共同 <input checked="" type="checkbox"/> 個人
研究組織	山形 裕士（農学部・教授）研究代表者
キーワード	(1) メロン (2) ククミシン (3) 口腔アレルギー症候群 (4) アレルゲン (5) 果実特異的発現 (6) プロモーター

1. 2019年度の研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

メロン果実の果汁中に存在するセリンプロテアーゼであるククミシン (67 kDa) は、果汁タンパク質の 15%を占める主要タンパク質で、果実特異的に発現・蓄積する。我々はこれまでにククミシンの酵素学的特性や構造を解析し、ククミシンの合成、分泌、活性化機構や果実特異的遺伝子発現調節機構を分子レベルで解明してきた。本研究計画では新たにメロン果実摂食アレルギー症の診断・治療の基盤とすることを目的に、食物アレルゲンとしてのククミシンの特性を解明する。また、形質転換植物を用いてククミシン遺伝子プロモーターの果実特異的発現能を解析する。

1. メロン・ククミシンの食物アレルゲンとしての特性解析

メロン果実の摂食により口腔アレルギー症候群 (OAS) と呼ばれる食物アレルギー症を発症する場合がある。この原因となるアレルゲンタンパク質は国外においていくつか報告されており、ククミシンが主要アレルゲンとする報告もあるが詳細は不明で抗原決定基 (エピトープ) も未同定である。OAS は花粉症と関連していることから OAS のアレルゲンは植生や環境により異なることが推察されるが、我が国においてはメロン果実由来のアレルゲンタンパク質に関する研究報告はない。本研究では本学学生を主対象にメロンアレルギーに関するアンケート調査を実施し、OAS 有症者の血清を採取する。また、メロン果実からのククミシンの効率的精製法を確立するとともに、果実中のアレルゲンタンパク質を生化学的、免疫学的手法で解析し、主要アレルゲンを探索する。

2. 形質転換植物におけるククミシン遺伝子プロモーターの機能解析

ククミシンはメロンの若い果実に特異的に発現し果汁中に分泌して大量に蓄積される。ククミシン遺伝子のプロモーターは、外来性遺伝子を植物に導入し、果汁中に有用物質を分泌・蓄積する技術に利用可能と期待される。本プロモーターの機能を解析しククミシンの果実特異的発現の分子機構を解明するため、ククミシンプロモーター::GUS レポーター融合遺伝子を導入したトマト形質転換株から GUS 高発現株を選抜する。さらに、GUS の発現部位を調べる。

2. 研究成果の概要(1 ページ程度)

1. メロン・ククミシンの食物アレルギーとしての特性解析

プリンスメロン (*Cucumis melo* L. var. Prince) を 2019 年 6 月から 8 月に堂農場で栽培し、受粉後約 10 日の未熟果実と約 50 日の完熟果実を収穫した。

本学農学部学生に対して食物アレルギーに関するアンケート調査を実施したところ、回答者 205 人のうち 12 人 (男性 7 人、女性 5 人) がメロンの摂食による OAS (口腔アレルギー症候群) の有症者であった (有症率 6.2%)。その内同意が得られた 6 人 (男性 4 人、女性 2 人) から病院にて採血し血清を分離保存した。

完熟メロンの果芯部、果肉、外果皮の各部位由来のタンパク質粗抽出液に対するメロン摂食起因性 OAS 有症者 6 名の血清の抗原抗体反応を ELISA で調べたところ 3 名の血清が果芯部と果肉由来のタンパク質に対して陽性反応を示したが、外果皮由来タンパク質には 6 名全員が陰性であった。OAS の有無や症状の強さと、血清中 IgE とメロン由来タンパク質の反応性は必ずしも相関しないことが示唆された。

次に果芯部タンパク質中のアレルギーを SDS-PAGE とウエスタンブロッティング分析で探索した。OAS 無症者血清中 IgE と反応するタンパク質は検出されなかったのに対し、ELISA 陽性者 3 名の血清は共通して 67, 54, 36 kDa タンパク質と抗原抗体反応を示した。特に 67 kDa の native 型ククミシンが最も強く反応した。54kDa と 36 kDa のタンパク質はククミシンの自己消化産物であると考えられた。

一方、タンパク質精製用液体クロマトグラフィーシステム (ÄKTA pure25) を用いたゲル濾過及び陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、ククミシンの効率的精製法を確立し、電気泳動的にほぼ均一な標品を得た。上記の ELISA 陽性者の血清 IgE はいずれも精製ククミシン (67 kDa) と強く反応した (図 1)。メロン果実中にはククミシン以外のアレルギーも報告されているが、以上の結果はククミシンが主要なアレルギーであることを強く示唆している。今後は引き続きククミシン分子中のエピトープの同定を進める計画である。

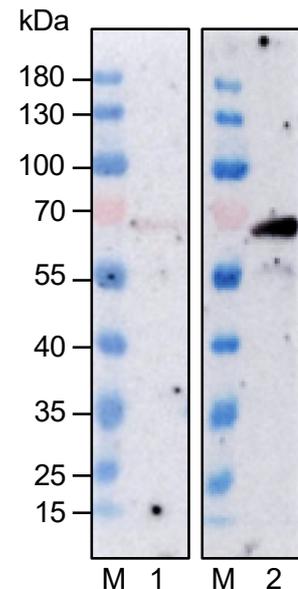


図 1. 精製ククミシンと血清 IgE の抗原抗体反応。
M: マーカー, 1: コントロール血清, 2: OAS 有症者血清

2. 形質転換植物におけるククミシン遺伝子プロモーターの機能解析

トマト (*Micro-Tom*) にククミシンプロモーター::*GUS* レポーター融合遺伝子を導入した pSTR121 株、ククミシンプロモーター::ククミシンシグナルペプチド::*GUS* レポーター融合遺伝子を導入した pSEC121 株を数世代栽培し、導入遺伝子を PCR で確認してホモ体を選抜した。さらに、その中から *GUS* 活性の強い株を選抜して発現解析に供した。

pSEC121 導入株では、トマトの果汁に強い活性が検出された。このことからククミシンのシグナルペプチドがトマトにおいても外来遺伝子産物の果汁への分泌に機能したことが示唆された。pSTR121 株における *GUS* の発現部位を *GUS* 染色により調べたところ、10 株中 7 株の果実において胎座組織と外果皮周辺の維管束が青色に呈色し強い *GUS* 発現が観察された (図 2)。これらの結果、ククミシンの発現部位は、既に報告した種子周辺の胎座組織だけでなく、外果皮の維管束にも強い発現能を持つことが示唆された。しかし、形質転換株における *GUS* の発現量はメロンにおけるククミシンの発現量よりもかなり低いので、今後は導入した有用遺伝子産物の多量発現株作出に向けた技術開発が期待される。



図 2. 形質転換トマト pSTR121 株の *GUS* 染色