

卵アレルギー発症に鶏卵白中 L-PGDS が及ぼす影響と その作用機序の解明

岡山県立大学保健福祉学部・助教 鈴木 麻希子

■ 緒言

近年、乳幼児を中心に食物アレルギー患者の増加が社会問題となっている。鶏卵は乳幼児にとって最良のタンパク質源となると同時に食物アレルギー原因食品の第一位に上げられる。そのため、卵アレルギー児にとっては、重大な栄養問題が生じるだけでなく、激しいアレルギー反応発症時には、生死に関わることも珍しくない。我々は鶏卵白中に患者血清 IgE 抗体と反応する新規なタンパク質を見だし、これを Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) と同定した¹⁾。近年のオボアルブミン (OVA) を用いたアレルギーモデルマウスは、OVA をアジュバントと共に腹腔投与後、OVA を 50mg/mouse で経口投与している。しかしながら、これは、乳幼児が鶏卵 1 個から摂取する OVA 量を体重当たり直した場合と比較して 3 倍以上となる。また、乳児の多くは、加熱卵を摂取するが、OVA のアレルギー性は加熱により低下することが知られている。アレルギーモデルマウス作製時の OVA は非加熱であり、アレルギー量は著しく多い。しかしながら、多くの報告でこのモデルが用いられているのは、少量の OVA では、特異的 IgE の上昇が起こらないためである。この矛盾には、OVA 特異的 IgE の上昇に他の因子が関与している可能性が考えられる。前述の L-PGDS は PGH₂ から PGD₂ を合成する酵素であり、PGD₂ はアレルギー炎症と深く関わっていること、L-PGDS のトランスジェニックマウスに喘息を誘発させると、その症状は野生型マウスに比べ悪化することを報告されている。このため、我々は OVA 特異的 IgE の上昇の因子の一つとして L-PGDS を考え、先行研究により微量の OVA を単独で経口投与した場合は、特異的 IgE の上昇は起こらず、L-PGDS と併用投与すると OVA 特異的 IgE 上昇が起こることを見出した。本研究においては、このメカニズムを明らかにし、鶏卵白中 L-PGDS の定量を行って卵白中の L-PGDS によっても OVA 特異的 IgE 上昇が起こる可能性について検討する。

■ 方法

1. 鶏卵白中 L-PGDS の定量

産卵直後に入手可能な岡山県農林水産総合センター畜産研究所から提供された白色レグホン由来の鶏卵を用いた。鶏卵を卵白と卵黄に分け、卵黄重量を秤で計量した。卵白に 3 倍量 (w/w) の pH6.8 (PBS) と 1mM DTT を添加後、4°C で 20 分間混和した。その後、卵白溶解液は 4°C, 8000rpm, 20 分間遠心分離を行い、4°C, 10,000×g, 20 分間遠心分離を行った。得られた上清を粗抽出液とし、我々が作製したトリ L-PGDS に対する抗体を用いて、卵白中 L-PGDS をサンドイッチ ELISA 法により測定し、内部標準により補正を行った。

2. 組み換え型トリ L-PGDS の変異体の発現ベクターの構築

マウス L-PGDS の酵素活性には、60 番目のシステイン残基が重要であることが明らかとなっている²⁾。そこで、我々が以前に作成した組み換え型トリ L-PGDS の発現プラスミドベクター¹⁾をテンプレートとして、60 番目のシステインをアラニンに置換した変異体を QuickChange Lighting Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technology, CA, USA) を用いて、キットのプロトコールに従って、作成した。なお、forward プライマーとして 5'-GAAGCACCTGCTGAAGATGGCTACCA-CAGACATTGCTGTC-3', Reverse プライマーとして 5'-GACAGCAATG-TCTGTGGTAGCCATCTTCAGCAGGTGCCTC-3' を用いた。作製した組み換え型トリ C60A L-PGDS の配列は、Applied Biosystems 3130 genetic Analyzer を用いて確認した。

3. たんぱく質の定量

たんぱく質の定量は標準たんぱく質として BSA を使い、Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて、プロトコールに従って測定した。

4. 組み換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS の発現・精製

塩基配列を確認した組み換え型トリ C60A L-PGDS 発現ベクターを *E. coli* BL21 へ形質転換し、GST

融合タンパク質として大量発現させ、抽出した。これをアフィニティーカラムによって精製し、融合タンパク質を PreScission Protease (GE Healthcare, により切断して組換え型トリ C60A L-PGDS を得た。既に発現系を構築していた組換え型トリ L-PGDS についても同様に、発現・精製を行った。

5. 組換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS の消化酵素による消化

組換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS にタンパク質量として 1/100 量のペプシン (Sigma, MO, USA) を添加し、終濃度 35mM NaCl-HCl pH2.0 となる緩衝液中で、37 度で 30 分間反応させた。その後、1M Tris-HCl pH8.0 を 1/100 量添加し、その半量にはタンパク質量として 1/100 量のトリプシン (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) を添加して、37 度で 2 時間反応させた。

6. 組換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS の酵素活性の測定

組換え型トリ L-PGDS、組換え型トリ C60A L-PGDS およびそれぞれのペプシンまたはペプシン+トリプシン消化液を用いて、prostaglandin H₂ (PGH₂) を基質として L-PGDS の酵素反応を Urade, et al. の方法³⁾により行った。反応生成物である prostaglandin D₂ (PGD₂) 量を Prostaglandin D₂ MOX EIA kit (Cayman Chemical, MI, USA) を用いて測定した。

■ 結果

1. 鶏卵中 L-PGDS の定量

産卵日を Day0 とし、4°C で保存した Day0、Day1、Day3、Day5、Day14 の鶏卵白中 L-PGDS 量は Day0 で最も高く、鶏卵 1 個当たりの卵白中 L-PGDS 量の平均値は 584.1±104.2μg であった。その後一旦、Day1 に有意に減少傾向、そして Day3、Day5 では増加傾向を示した。Day14 では Day1 程度にまで減少し、Day0、Day5 に比べて有意に低かった。

2. 組換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS の発現・精製

組換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS を方法で示したように、発現・精製し、13% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供し、その精製度を確認した (図 1)。

3. 組換え型トリ L-PGDS および組換え型トリ C60A L-PGDS の酵素活性の比較

野生型 L-PGDS と C60A L-PGDS の酵素活性の違いおよびペプシン、トリプシンの消化酵素による消化の影響を検討した。先行研究で、我々は野生型の L-PGDS はペプシンに耐性であることを明らかにしているが、本研究において、C60A L-PGDS は野生型の活性の約 1/3 であり、ペプシン消化によって 56% にまで低下し、トリプシンによって、元の活性の 25% にまで低下することを明らかにした。

■ 考察

L-PGDS は脂肪酸結合タンパクである lipocalin family に属し、レチノール結合タンパク (RBP) として知られている^{4,5)}。L-PGDS はレチノイン酸やレチナールと結合して細胞膜表面へ運搬し、RBP レセプターと結合し、レチノイン酸やレチナールの細胞内取り込みに寄与している。最近、Kawaguchi, et al. は、RBP 受容体に結合した RBP レチノイン酸複合体はエンドサイトーシスに依存することなく、レチノイン酸のみが細胞内に取り込まれることを報告している⁶⁾。したがって、4°C で保存した際の卵白中 L-PGDS の増減は、L-PGDS が卵黄膜に結合量に関連するのではないかと考えられる。

マウス L-PGDS でその酵素活性に重要であるとされている 60 番目のシステインをアラニンに置換するとその活性が野生型の約 1/3 に低下したことから、トリ L-PGDS においても 60 番目のシステイン残基が活性に重要であることが示唆された。また、野生型はペプシンに耐性であるが、C60A L-PGDS は未処理の C60A L-PGDS に比べ、その活性が 56% まで低下した。トリプシンによって処理すると、その活性はさらに 25% まで低下することから、トリ L-PGDS の C60A の置換は、L-PGDS の立体構造を変化させることが示唆された。本組換え型トリ L-PGDS、組換え型トリ C60A L-PGDS を用いたアレルギーモデルマウスを作製したため、今後、両組換え型の影響の違いを検討し、L-PGDS による特異的 OVA-IgE の上昇は酵素活性に関連するものであるかを明らかにする。

■ 要約

白色レグホン由来の卵白中 L-PGDS 量は産卵直後が最も高く、その平均は 584.1±104.2μg であつ

た。トリ L-PGDS の酵素活性もマウスと同様に 60 番目のシステイン残基が重要であり、アラニンに置換すると野生型の 1/3 まで活性が低下した。また、トリ L-PGDS は消化酵素ペプシンに耐性であり、トリプシン処理によって、野生型の酵素活性の 25% まで低下することが明らかとなった。

■ 文 献

- 1) Suzuki M, Fujii H, Fujigaki H, Shinoda S, Takahashi K, Saito K, Wada H, Kimoto M, Kondo N, Seishima M, (2010), Lipocalin-type prostaglandin D synthase and cystatin react with IgE antibody obtained from children with egg allergy, *Allergol Int*, 59, 175-183.
- 2) Fujimori K, Inui T, Uodome N, Kadoyama K, Aritake K, Urade Y, (2006), Zebrafish and chicken lipocalin-type prostaglandin D synthase homologues: Conservation of mammalian gene structure and binding ability for lipophilic molecules, and difference in expression profile and enzyme activity, *Gene*, 375, 14-25.
- 3) Urade Y, Nagata A, Suzuki Y, Fujii Y, Hayaishi O, (1989), Primary structure of rat brain prostaglandin D synthetase deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem*, 264, 1041-1045.
- 4) Urade Y, Hayashi O, (2000), Biochemical structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 259-271.
- 5) Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A, Hayashi O, (1997), Lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem*, 272(25), 15789-15798.
- 6) Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, White legge J, Ping P, Witta P, Bok D, Sun H, (2007), A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular up take of vitamin A. *Science*, 315(5813), 820-825

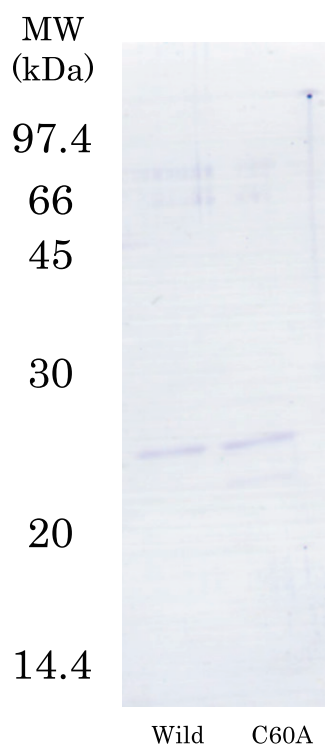


図 1