

申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	木本 眞順美 印
調査研究課題	乳幼児期アレルギーの新規な発症要因の検索と予防法の構築					
交付決定額	580,000 円					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	木本眞順美	保健福祉学部・教授	代謝生化学 分子栄養学	研究全般、総括 L-PGDSの同定・定量	
	分担者	山本登志子	保健福祉学部・准教授	細胞生物学 脂質生化学	乳中に分泌されるプロスタグランジン類の解析	
調査研究実績の概要	<p><b>【研究の目的】</b>                  プロスタグランジン<sub>D2</sub> (PGD<sub>2</sub>)は、一般的なアレルギー炎症であるI型アレルギーにおけるコンダクター細胞として知られているマスト細胞が分泌する主要なプロスタノイドであり、喘息発作時やアトピー性皮膚炎での炎症部位に産生がみられることから、アレルギーとの密接な関係が示唆されてきた。一方、鈴木らの鶏卵アレルギーに関する研究において、組換え型鶏卵L-PGDS (rL-PGDS)をOVA感作マウスに経口投与するとOVA特異的IgEの産生量を上昇させ、小腸細胞内への好酸球の浸潤を促進させることが認められている。しかしながら、その機序については全く不明である。鶏卵とともに乳幼児期のアレルギー食品としては牛乳が挙げられる。L-PGDS (リポカリン型プロスタグランジン<sub>D2</sub>合成酵素)は動物の脳に発現し、分泌型酵素タンパク質であり、脳脊髄液、血液、尿などに分泌される。このことから、動物の乳にも存在し、牛乳アレルギーの発症や進展に何らかの形で関与している可能性も考えられる。本研究においては、まず牛乳におけるL-PGDSの存在を立証し、その酵素活性についても検討した。</p> <p><b>【方法】</b>                  分析用試料として市販牛乳5検体 (M1~M5) および乳房炎に罹患した牛の乳サンプル12検</p>					

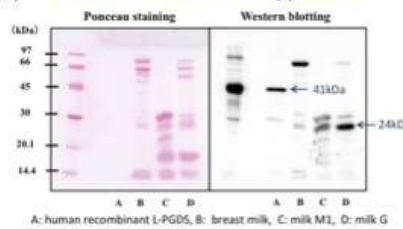
調査研究実績  
の概要

体, A (体細胞数が低) ~L (体細胞数が高) を用いた. 乳房炎牛の乳は岡山県農林水産総合センター畜産研究所より供与された. 各種乳サンプルからWhey protein画分を調製し, 塩析・透析後のサンプルをSDS-PAGEおよび二次元電気泳動により分離した. L-PGDSの存在ならびに特定は, HRP標識した抗L-PGDSを用いたウエスタンブロットにより行った. L-PGDSと推定されたスポットをゲルから切り出し, LC-MS/MS分析にて解析した. また, 乳サンプル中のPGD<sub>2</sub>をInertSep C18により固相抽出し, ODS18カラムを用いた逆相HPLCにより分離・定量した.

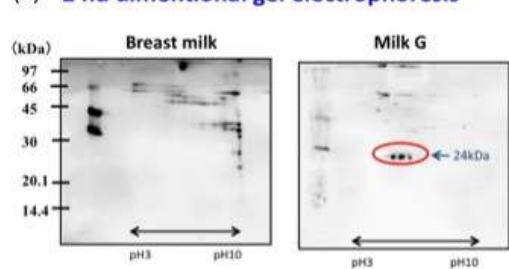
【結果および考察】

SDS-PAGE後のウエスタンブロット解析の結果, 乳サンプルGにおいて, ウシL-PGDSの分子質量 (MW=21, 229) に近似した位置に強い陽性バンドが観察された. 同時に分析したM1は弱い反応性を示し, ボランティアによって供与された人乳サンプルでは, わずかに反応する不鮮明なバンドが検出された(1). さらに, これらの二次元電気泳動後のウエスタンブロット解析により, M1およびGサンプルについては, 24 kDaの位置に複数の陽性スポット (pI 6~7の範囲内) が検出された(2). このようにして得られたGサンプルのスポットをゲルから切り出し, LC-MS/MS分析した. そのアミノ酸配列の結果からウシL-PGDSと同定された. 本研究で準備したすべてのサンプルについて, L-PGDSの存在量をウエスタンブロット図から半定量化し, 市販牛乳と乳房炎牛の乳を相対比較した結果, 乳房炎牛の乳の方が明らかに高値を示した(3, 4). しかし, 体細胞数とL-PGDSタンパク質量との相関は低かった. さらに, A~Lのサンプルについて, 活性測定を行い, その存在量に見合ったL-PGDS活性を有するという興味深い結果を得た(4). また, L-PGDSの触媒活性によって生成されるPGD<sub>2</sub>は乳房炎牛の乳において高濃度に存在する傾向を示した(5). 来年度は, 牛乳より単離・精製したL-PGDSを用いて, 食物アレルギーとの関連性について検討する.

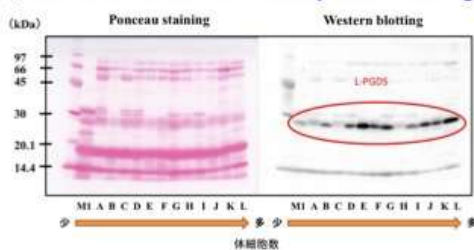
(1) Detection of L-PGDS in Whey proteins



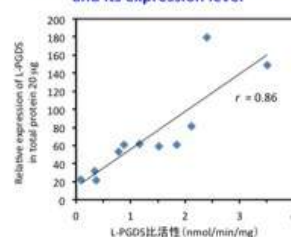
(2) 2 nd dimentional gel electrophoresis



(3) Semi-determination of L-PGDS by western blotting



(4) Positive correlation of L-PGDS activity and its expression level



(5) Concentration of PGD<sub>2</sub> in milk

Milk	PGD <sub>2</sub> (nmol/dl)
M1	0.104
E	0.243
F	0.193
G	0.176
J	0.195
K	0.129

成果資料目録

1. 室田佳恵子、木本眞順美 (2015) : 「食物アレルギーの現状と低減化食品素材の開発」第3章アレルギーの検出・定量およびアレルギー性評価. シーエムシー出版