



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                      |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Characterization of gene and three-dimensional structure of GRP, allergen from Cupressaceae plant [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 飯塚, 友菜                                                                                                                                                               |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                |
| Degree Name         | 博士(ソフトマター科学)                                                                                                                                                         |
| Dissertation Number | 甲第16109号                                                                                                                                                             |
| Issue Date          | 2024-09-25                                                                                                                                                           |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/93688">https://hdl.handle.net/2115/93688</a>                                                                                    |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                                              |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                      |
| File Information    | Tomona_Iizuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                                                                  |



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（ソフトマター科学） 氏名 飯塚友菜

## 学位論文題名

Characterization of gene and three-dimensional structure of GRP, allergen from Cupressaceae plant

(ヒノキ科植物由来アレルゲン GRP の遺伝子及び立体構造解析)

スギやヒノキなどのヒノキ科の樹木は南極をのぞくすべての大陸を含み世界で広く分布している。これらヒノキ科植物の花粉には高いアレルギー性があることが知られ、世界の様々な地域で重要なアレルギーの原因となっている。日本ではスギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉症、ヨーロッパではセイヨウイトスギ (*Cupressus sempervirens*) 花粉症の患者数が多く、日常生活に支障をきたす重篤なケースも少なくないことから、重要な社会問題の一つとなっている。

花粉に含まれるタンパク質のうちアレルゲンになるものは限られており、ヒノキ科植物の花粉ではペクチン酸リアーゼやポリガラクトツロナーゼといった比較的分子量の大きい酵素のほか、ソーマチン様タンパク質などが知られている。これらに加えて近年アレルゲンファミリータンパク質として GRP (ジベレリン調節タンパク質) と呼ばれる約 7 kDa の低分子量のタンパク質が注目されている。GRP は果物などに含まれる食物アレルゲンであることが知られていたが、ヒノキ科植物の花粉にも GRP ファミリーが含まれ、アレルゲンとなることが明らかになっている。さらに、花粉と果実等に含まれるアレルゲンの共通エピトープが原因となって引き起こされる PFAS (pollen-fruits allergy syndrome, 花粉-食物アレルギー症候群) に関与していることも報告されている。一般に PFAS は、比較的分子量が大きいアレルゲンにおいてその表面に保存された複数のエピトープに IgE 抗体が結合することでマスト細胞上に架橋構造を形成し、その刺激によりアレルギー反応が引き起こされると考えられている。このため、アレルゲンとしては分子量の小さい GRP によって架橋構造が形成され PFAS を発症する分子機構は興味深い。

そこで本研究では、スギ及びセイヨウイトスギ由来の GRP アレルゲンに注目し、小さいペプチドでも高いアレルギー性を持つそのアレルギー誘発機構について、遺伝子解析、免疫学的解析、立体構造解析という多角的な視点からの解明に取り組んだ。

スギ由来の遺伝子データベースを対象として、相同性検索によりアレルゲン GRP 遺伝子として Cry j 7 を同定し、酵母 *P. pastoris* を宿主としたリコンビナントタンパク質の発現系の構築を行い、これを用いて患者血清を用いたイムノアッセイを行った。果実に対してはアレルギー症状がなくスギ花粉のみにアレルギー症状を示す患者では Cry j 7 に対する感作は全く見られなかったのに対し、重篤な果実アレルギー反応を起こした患者の多くが Cry j 7 に感作していることが明らかになった。また、Cry j 7 に感作していた患者のみでモモ果実由来の GRP アレルゲンである Pru p 7 への感作が見られたことから、日本でのスギ花粉に含まれる Cry j 7 への感作も PFAS の原因となっている可能性が高いことが示唆された。

また、セイヨウイトスギの GRP の遺伝子配列や発現量を調べるために、花粉および雄花の RNA-seq を行った。得られた 80,000 以上の転写産物に対し解析を行った結果、アレルゲン GRP として Cup s 7 の遺伝子配列を同定するとともに、6 つの新規 GRP パラログ配列が明らかになった。また発現量解析を行うと、Cup s 7 は雄花のみから発現しており、7 種の GRP パラログの中で最も発現

量が多いことが明らかになった。

特定された配列をもとに得たリコンビナント Cup s 7 を用いたセイヨウイトスギ花粉症患者血清のイムノアッセイにより、リコンビナント Cup s 7 が天然と同じ立体構造を形成し、同一のエピトープを有していることを明らかにした。さらに安定同位体標識を施した Cup s 7 を作製し NMR 解析を行った。その結果ジスルフィド架橋により安定化された立体構造の中に部分的に柔軟性を持つループがあることが明らかとなり、高い配列相同性を持ち非常に類似した立体構造を有すると考えられていた花粉と果物の GRP 間で、柔軟性に顕著な違いがあるループの存在が示された。この柔軟性のある領域は、立体構造から予測した構造的エピトープとも一致しており、交差反応性や PFAS の感作機構と関連していると推定された。

さらに、GRP の遺伝子同定に用いた花粉および雄花のシーケンシング結果にさらなる解析を行い、新規アレルゲン候補配列を 16 種特定した。これらは他の植物花粉の既知アレルゲンと非常に相同性の高い配列であり、セイヨウイトスギにおいても新規アレルゲンである可能性が高いと言える。それらについても発現量解析を行い、既知アレルゲンと同等かそれ以上の発現量を持つ新規候補アレルゲンがあることが明らかになった。