モモ果皮からのモモアレルゲン Pru p3 抽出

斎藤美貴[§], 恩田 匠, 小嶋匡人, 長沼孝多, 辻 政雄, 深澤親房

山梨県工業技術センター

Extraction of Peach Allergen Pru p3 from Peach Skin

Miki Saito[§], Takumi Onda, Masato Kojima, Kota Naganuma,
Masao Tsuji and Chikafusa Fukazawa

Yamanashi Industrial Technology Center, 2094, Ohtsu-machi, Kofu, Yamanashi 400-0055

To extract the major allergen (Pru p3) from peach skin, a small-scale method was developed. This method involves shaking a small amount of peach skin on a high speed shaker instead of homogenizing it. Protein was extracted in sufficient quantity by shaking 5g of skin from one peach in a buffer solution (pH 5) containing 20 mmol/L ascorbic acid sodium salt. Total RNA was extracted from mature peach skin by the SDS-phenol method to obtain high concentration mRNA. Following purification of total RNA using a commercial kit, cDNA was amplified by RT-PCR using mRNA and oligo dT primers. Pru p3 expression in peach was confirmed by nested PCR using cDNA templates.

(Received Sep. 8, 2009 ; Accepted Jan. 4, 2010)

Keywords : peach, allergen, Pru p3, mRNA

キーワード : モモ, アレルゲン, Pru p3, mRNA

モモアレルギーは口腔アレルギー症候群 (Oral allergy syndrome (OAS)) のひとつで, 日本では, モモはアレルギー表示の「特定原材料に準ずるもの (18 品目)」として, 食品の原材料に使用した場合は, 微量 (数 μ g/g 以上) であっても, 表示が推奨されている¹⁾.

モモの主要アレルゲン Pru p3 は Pastorello²⁾³⁾ らによって, 主に果皮に存在する 9 kDa の水溶性の脂質輸送タンパク質 (lipid transfer protein (LTP)) であることが報告されている. また, Brenna⁴⁾ らはモモの果皮をアルカリ剥皮すると果肉のアレルゲン性が低減することを確認している. Brenna⁴⁾ らが行ったアルカリ剥皮は, 果実を 10% の NaOH 溶液に 60°C, 90 秒間浸漬することで行われるので, 高アルカリ性でのタンパク質変性により, アレルゲン性が低下される可能性も考えられた. そこで, 著者らは, 比較的温和な条件として, モモ果肉の pH に近い緩衝液中で, 包丁で剥皮したモモ果肉を浸漬した場合にアレルゲンが低減化するかを確かめたところ, pH 5 の緩衝液中で 20 分間果肉を浸漬すると, アレルゲンが低減することを確認した⁵⁾. 以上のことから, 一般的にモモ果皮は食されることはないが, 果皮中のアレルゲンが, 果肉表面に残存し, 果肉を食べた時のアレルギーに関与していることが示唆さ

れ, 果皮中に存在する水溶性タンパク質の解析が重要であると考えられた.

ところで, Pastorello³⁾ らが報告したモモ果皮からアレルゲンを抽出する方法は, Björkstén⁶⁾ らがリンゴ果肉からアレルゲンを抽出するために開発された方法に基づいており, モモ果皮からのアレルゲン抽出に適しているか確認されたものではなく, また抽出に際しては 多くの試料 (300 g) を必要とした. モモから果皮を包丁で剥いて採取する場合, 果皮のみを採取するのは難しく, 果肉が若干含まれることになる. モモ果肉は水溶性食物繊維を 0.6% 含有し⁷⁾, 成熟すると水溶性ペクチンの割合が 80% 近くに増加するため⁸⁾, タンパク質抽出の夾雑物となると考えられた. そこで, 本研究では, 果肉由来の夾雑物の混入を防ぎ, 少量のモモ果皮から振盪によって水溶性アレルゲンを抽出する方法を開発したので報告する.

つぎに, 遺伝子発現の面からアレルゲンを確認する方法も検討した. モモからの全 RNA 抽出は Zuidmeer⁹⁾ らや Diaz-Perales¹⁰⁾ らが行っているが, mRNA の精製までは行っていない. 著者らは mRNA を取得するため, 水溶性多糖類を多く含む材料から全 RNA の抽出をする際に多く用いられてきた SDS-フェノール法^{11)~13)} で抽出を試み, RT-PCR 法を用いたモモ果皮におけるアレルゲン Pru p3 の発現を確認したので併せて報告する.

〒400-0055 山梨県甲府市大津町 2094

[§] 連絡先 (Corresponding author), msaito@yitc.go.jp

実 験 方 法

1. モモ果皮からのアレルゲン検出

(1) 供試試料

山梨県で栽培された適熟のモモ（浅間白桃）を使用した。モモは使用するまで、 -30°C で保存した。

(2) タンパク質の抽出方法

凍結した状態のモモ果皮を包丁で剥き、果皮 5g を 50 ml 容量のプラスチック遠沈管に採取した。20 mmol/L のアスコルビン酸ナトリウムを含有する 10 ml のクエン酸-リン酸広域緩衝液（10 mmol/L クエン酸と 20 mmol/L リン酸二水素ナトリウムで pH 4, 5, 6 および 7 に調製）を抽出溶媒として加え、高速振盪機（CUTE MIXER CM-1000, 東京理化器械株式会社製）に装着し、 4°C 下で、2500 rpm, 10 分, 20 分または 30 分間振盪した。その後、ガーゼ濾過して果皮を除き、抽出液を $12000\times g$ で 20 分間、 4°C で遠心分離を行った。得られた上澄に 60% 飽和となるように硫酸ナトリウムを加えて 4°C で一晚塩析後、遠心分離（ $30000\times g$, 4°C , 30 分間）した。上澄を除き、沈殿を抽出溶媒 500 μl に溶解し、限外濾過膜が装着された遠心チューブ（Microcon Ultracel YM-3, MILLIPORE 社製）に入れた。抽出時と同じ pH の抽出溶媒を加えながら、溶媒が 2 回入れ替わるまで $14000\times g$ で遠心して、脱塩を実施し、抽出液が約 150 μl になるまで濃縮した。

また、Björkstén⁶⁾ らは、ポリフェノールを除去するために Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) を 2% で添加し、さらにタンパク質とポリフェノールの吸着を阻害する目的で、2 mmol/L のエチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸二ナトリウム塩二水和物（Ethylene-diamine-N, N, N', N'-tetra acetic acid, disodium salt, Dihydrate (EDTA)）と 10 mmol/L のジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム（Sodium diethyldithiocarbamate (DIECA)）を併用している。これらの効果を確かめるため、抽出溶媒にアスコルビン酸ナトリウムは加えずに、PVPP は 2%, EDTA は 2 mmol/L, DIECA は 10 mmol/L の濃度で添加した試験区も設定した。

(3) タンパク質の定量

150 μl に定容したタンパク質抽出液の一部を採取し、蒸留水で 12 倍に希釈した試料を BCA 法¹⁴⁾ によって測定した。なお、牛血清アルブミンを標準試薬として使用した。

(4) タンパク質の電気泳動

タンパク質抽出液と同量のサンプルバッファー（50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% 2-メルカプトエタノール, 20% グリセロールおよび 0.01% Coomassie brilliant blue (CBB)）を加え、熱湯中で 3 分間反応させた。電気泳動はアトー株式会社製の既成ゲル（SPU-15S）と付属バッファーを使用し、定電流 20 mA で 2 時間通電した。検出は CBB 染色で行なった。

(5) N 末端アミノ酸配列解析

電気泳動ゲルを電氣的に Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。CBB 染色後、PVDF 膜に転写されたタンパク質の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー（Protein sequencer 491, Applied Biosystems 社製）で解析した。

2. RT-PCR 法によるモモアレルゲンの検出

(1) 供試試料

山梨県で栽培された適熟のモモ（浅間白桃）を採取後直ちに包丁で剥皮し、果皮を液体窒素で凍結させ、 -80°C で保存した。

(2) SDS-フェノール法によるモモ果皮からの全 RNA 抽出

全 RNA の抽出は SDS-フェノール法¹¹⁾¹²⁾ に基づいて行った。すなわち、液体窒素で冷却した乳鉢にモモの果皮を 20 g 入れて、液体窒素で冷却しながら、乳棒で粉末状になるまで磨砕した。試料の 4 倍量の RNA 抽出用緩衝液（1% SDS 含有 50 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)）が入ったホモジナイザー（AM-3, 株式会社日本精機製作所製）用の受器に試料を入れ、10000 rpm で 4 分間攪拌した。緩衝液と同量の 85% フェノールを加えて更に 10000 rpm で 5 分間攪拌した。

試料溶液を 500 ml 容量の遠沈管に移し、室温でスターラーを用いて 30 分間攪拌したのち、室温で $6700\times g$, 10 分間の遠心分離を行った。境界面の変性タンパク質を採らないように上層の水層部分をパスツールピペットで採取した。この水層に同量の 85% フェノールを加えて良く振盪し、室温で $6700\times g$, 10 分間の遠心分離を行った。この操作を 3 回繰り返した。残りのフェノール層に 1/10 量の RNA 抽出用緩衝液を加えて振盪後、遠心分離して、水層部分を回収した。

この水層部分に最終濃度 0.1 mol/L となるように塩化リチウム溶液を加え、さらに 2.5 倍量の冷エタノールを加えて -20°C で 1 時間静置し、粗全 RNA を沈殿として得た。 $12000\times g$ で 5 分間、 4°C で遠心分離を行い、上清を捨て、粗全 RNA を 80% エタノールでの洗浄を 3 回繰り返した後、粗全 RNA を減圧乾固させた。

つぎに粗全 RNA を 0.1% ジエチルピロカーボネート水で再溶解し、試料を 50 ml 容量の遠沈管に移して、 $17000\times g$, 10 分間、 4°C の遠心で不要物を除去した。得られた上清に最終濃度 2 mol/L となるように塩化リチウム溶液を添加し、 4°C で一晚放置し、遠心分離を $17000\times g$, 20 分間、 4°C で行い、5 ml の 0.1% ジエチルピロカーボネート水で溶解して、全 RNA 水溶液を得た。

(3) mRNA の抽出および精製

全 RNA 水溶液 500 μl から PolyA Tract mRNA Isolation System（プロメガ社製）を使用し、プロメガ社のマニュアルに従い mRNA の抽出および精製を行った。mRNA の

純度は試料の 260 nm と 280 nm の吸光度の比 (260/280) で確かめ、濃度は [260 nm の吸光度 $\times 45 = \mu\text{g/ml}$] で計算した。

(4) RT-PCR による cDNA の合成

mRNA を鋳型にし、オリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応を行う Ready-To-Go T-Primed First-Strand kit (GE Healthcare 社製) を使用し、GE Healthcare 社のマニュアルに従い cDNA を合成した。

(5) cDNA を鋳型にした RT-PCR

モモのアレルゲン Pru p3 の cDNA の塩基配列 (Accession No : AJ277163) を Fig. 1 に示した。まず、外側のプライマー ex とプライマー 2 を用いて PCR 反応を行った。DNA ポリメラーゼは TaKaRa 社製の TaKaRa Taq を使用し、反応液の組成は鋳型 cDNA 6 μl 、プライマー ex (5'-ACTAAGCTTGCTTTGGTGGTGGCCTTGTGC-3' (10 $\mu\text{mol/L}$)) 5 μl 、プライマー 2 (5'-TCACTTCACGGTGGC-GCAGTTGGT-3' (10 $\mu\text{mol/L}$)) 5 μl 、10 $\times$ PCR バッファー (MgCl₂ なし) 10 μl 、dNTP mix 8 μl 、Taq DNA ポリメラーゼ 0.5 μl および滅菌水 66 μl とし、94°C で 1 分 (DNA 変性)、59°C で 1 分 (アニーリング) および 74°C で 1 分 (伸長反応) の条件で、30 サイクル増幅させた。PCR 反応には Applied Biosystems 社製の装置 (Gene Amp PCR

System 9700) を使用した。

反応溶液を 1000 倍希釈して、SUPREC™-02 (TaKaRa 社製) に入れ、1450 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、プライマーを除去した。この溶液 6 μl を鋳型として、プライマー 1 (5'-ATAACATGTGGCCAAGTG-3' (10 $\mu\text{mol/L}$)) 5 μl 、プライマー 2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 5 μl 、10 $\times$ PCR バッファー (MgCl₂ なし) 10 μl 、dNTP mix 8 μl 、Taq DNA ポリメラーゼ 0.5 μl および滅菌水 66 μl とし、94°C で 1 分 (DNA 変性)、55°C で 1 分 (アニーリング) および 74°C で 1 分 (伸長反応) の条件で、30 サイクル増幅させ、2 段階目の PCR 反応を行った。

(6) DNA のアガロースゲル電気泳動

PCR 終了後、目的 DNA の増幅を確かめるため、アガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルは 1.5% で作成し、泳動は 100 V で約 35 分間通電して実施した。電気泳動後ゲルはエチジウムブロマイド染色後、紫外線を照射して検出した。

(7) PCR 産物のシーケンス

2 段階目の PCR 反応溶液 100 μl に 10 μl の 3 mol/L 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と冷エタノール 200 μl を加えて、-80°C で 20 分間冷却した。23000 $\times g$ 、10 分間、4°C で遠心分離を行った。沈殿を 70% エタノールで洗浄し、再び同条件で遠心分離後、70% エタノールを除去し、沈殿を 10 μl の滅菌水に溶解した。これをアガロースゲル (1.5%) で電気泳動後、目的 DNA のバンド部分のゲルをメスで切り出し、DNA 回収カラム Quantum Prep Freeze N Squeeze Spin Column (Bio-Rad 社製) に入れた。-20°C で 5 分間静置後、13000 $\times g$ 、3 分間、室温で遠心分離を行い、濾液を回収した。得られた PCR 産物とプライマー 1 もしくは 2 を使用して、塩基配列の解析を DNA Analysis System (BECKMAN COULTER 社製) で行った。

実 験 結 果

1. モモ果皮からのアレルゲン検出

(1) 高速振盪機を使用したタンパク質振盪抽出時の溶媒 pH の影響

pH を 4, 5, 6 および 7 に調製したクエン酸-リン酸広域緩衝液にアスコルビン酸ナトリウムを 20 mmol/L となるように加え、高速振盪機を用いてモモ果皮からタンパク質を振盪抽出し、電気泳動した結果を Fig. 2 に示した。分子量 9 kDa のモモ主要アレルゲン Pru p3 に相当するバンドがいずれの pH においても主要バンドとして認められた。そのうち、特に強いバンドとして認められたのが、pH 5 および 6 であった。電気泳動ゲルを PVDF 膜に転写し、CBB 染色したところ、pH 5 および 6 で抽出した場合のみ、分子量 9 kDa に相当するバンドが明確に転写され、このバンドの N 末端アミノ酸の解析したところ、システインを除く 23 残基が解析でき、Pru p3 であることが確認された (データ

Fig. 1 cDNA sequence of Pru p3 and nested PCR Primer

The completed nucleotide sequence for the Pru p3 is shown. The primer positions with the corresponding names are shown by the arrows above (sense) or below (anti-sense) the nucleotide sequence.

Fig. 2 Effect of pH of the buffer used for extraction on 9kDa protein recovery

The number of left lane represents the molecular weights. The number of top represents extraction pH of citrate-phosphate buffer.

Table 1 The concentrations of protein extracted from peach skin

	Blank	PVPP	EDTA + DIECA	Ascorbic acid sodium salt
Protein (mg/ml)	2.3±1.5	1.4±0.1	3.7±0.6	3.7±0.7

Proteins of peach skin were extracted with twice volume of citrate-phosphate buffer (pH 5) containing PVPP, EDTA + DIECA or Ascorbic acid sodium salt.

Values are means±S.D. (n=3)

Blank : Only Citrate-Phosphate buffer

PVPP : 2% PVPP was added to the buffer.

EDTA+DIECA : 2mmol/L EDTA and 10mmol/L DIECA were added to the buffer.

Ascorbic acid sodium salt : 20mmol/L Ascorbic acid sodium salt was added to the buffer

は省略)。

- (2) PVPP の添加および EDTA と DIECA の併用添加がタンパク質抽出効率に及ぼす影響

PVPP を使用した場合と EDTA と DIECA を併用添加した場合およびアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合のタンパク質抽出量を比較するため、pH 5 の緩衝液のみで抽出操作を行った場合を無添加 (Blank) とし、それぞれの抽出液中のタンパク質量を BCA 法で測定した結果を Table 1 に示した。無添加 (Blank) の場合、抽出されるタンパク質濃度が 2.3 ± 1.5 mg/ml であったのに対し、PVPP を使用した場合は 1.4 ± 0.1 mg/ml、EDTA と DIECA を併用した場合は 3.7 ± 0.6 mg/ml、アスコルビン酸ナトリウムを加えた場合は 3.7 ± 0.7 mg/ml であった。

PVPP, EDTA と DIECA の併用もしくはアスコルビン酸ナトリウムをそれぞれ pH 5 の緩衝液に添加した場合のタンパク質抽出の電気泳動の結果を Fig. 3 に示した。pH 5

Fig. 3 Comparison of PVPP, EDTA+DIECA and Ascorbic acid sodium salt for extraction on 9kDa protein recovery

The initial shows the following. B, Blank : P, PVPP : E+D, EDTA+DIECA : A, Ascorbic acid sodium salt. The concentration of PVPP was 2%, EDTA was 2mmol/L, DIECA was 10mmol/L and Ascorbic acid sodium salt was 20mmol/L.

の緩衝液でのみ抽出した無添加 (Blank) と PVPP 添加では Pru p3 に相当する位置にバンドが認められなかった。一方、EDTA と DIECA を併用した場合はアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合と同様に Pru p3 のバンドが認められ、両者の電気泳動パターンに違いは認められなかった。

2. RT-PCR 法によるモモ果皮におけるアレルギー発現の確認

20 g の果皮から SDS-フェノール法で全 RNA を抽出後、全 RNA 溶液の 1/10 量の試料からキットを用いて、mRNA を抽出・精製したところ、 $3.5 \mu\text{g}$ の mRNA が得られた。この mRNA 試料の 260/280 nm の吸光度の比は 2.04 で、高純度の mRNA を得ることができた。これを鋳型として、オリゴ dT プライマーを使用した cDNA 合成を行った。さらに、この cDNA を鋳型としてプライマー ex とプライマー 2 を使用し PCR 反応を行った結果、目的とする 336 bp 付近のみにバンドが認められた (Fig. 4, レーン 1st)。

次に、増幅された DNA が Pru p3 であることを再確認するため、nested-PCR を実施した。プライマー ex と 2 を使用し、増幅した PCR 産物を鋳型にし、プライマー 2 と Pru p3 タンパク質の N 末端部分をコードするプライマー 1 を用いて nested-PCR を実施したところ、目的とする 276 bp 付近に DNA のバンドが認められ (Fig. 4, レーン 2nd), Pru p3 の遺伝子発現を確認することができた。

また、この 276 bp のバンドから DNA を回収・精製し、プライマー 1 および 2 を使用したダイレクトシーケンスで塩基配列を解析した結果、Fig. 1 に示したプライマー 1 と 2 には含まれた部分の 274 塩基が解析でき、Pru p3 の塩基配列と一致した (データは省略)。

Fig. 4 RT-PCR products from peach skin

Lane M: molecular maker Lane 1st: PCR products amplified by primer ex and primer 2. Lane 2nd: PCR products amplified by primer 1 and primer 2.

考 察

一般的にタンパク質を抽出する場合は組織をホモジナイザー等で均一化してから抽出するが、夾雑物も抽出され、この除去が必要となる。Pastorello³⁾らが使用した果皮 300 g はモモ約 60 個分に相当するため、その調製と抽出操作には大きな労力を割く必要があったと思われる。

そこで著者らは、目的とするアレルゲンが LTP タンパク質であることに着目し、小規模での抽出を試みた。LTP は低分子量のタンパク質で、植物組織の外層（表層）細胞に分布しており¹⁵⁾、また細胞内の脂質輸送に関与していることから、ホモジナイズしなくても、抽出が可能ではないかと推察した。そこで、ホモジナイズすることなく、短時間にタンパク質を効率よく抽出するために、高速で振盪することを考案し、高速振盪機を使用した方法を開発した。モモ果皮からタンパク質を抽出する場合、一般的なホモジナイザーを使用した均一化法では、組織の均一化が十分に行なわれず、遠心分離時に低分子のタンパク質がデブリと一緒に沈殿しているものと推察される。振盪抽出においても 30 分間振盪を行うと、果皮が軟化し、果皮を剥いたときに果皮に密着していた果肉部分がはがれ、10 分および 20 分間振盪した場合に比べて、その後の遠心分離で沈殿画分の増加が認められた。振盪時間が 10 分間と 20 分間では、電気泳動のパターンに差は認められなかったが、30 分間振盪した場合は、低分子のタンパク質のバンドが明確に確認できなくなったため、振盪時間は 10 分間が適当と判断した（データは省略）。

つぎに、アレルゲンの抽出時の pH を検討するために、クエン酸-リン酸広域緩衝液を使用した。この緩衝液はクエン酸とリン酸二水素ナトリウムを適当に混合することで、pH 2.2 から 8.0 まで調製できる。この緩衝液の pH をモモの pH 付近（pH 4.5）からタンパク質が比較的安定に存在する中性の pH に調製し、20 mmol/L のアスコルビン

Peach peel

- 10ml of Citrate-Phosphate buffer (pH 5.0) containing 20mM Sodium ascorbate
- Shake with tube shaker (2 500rpm, 10min, 4°C)
- Centrifuge (12 000 × g, 20min, 4°C)

Supernatant

- Ammonium sulfate precipitation at the final concentration of 60% (12hr, 4°C)
- Centrifuge (30 000 × g, 30min, 4°C)

Precipitate

- Dissolve in 500μl of Citrate-Phosphate buffer (pH 5.0)
- Remove salt and concentrate with 1 500μl of Citrate-Phosphate buffer using YM-3

Protein extract (150μl)

Fig. 5 New method for extraction allergen from peach skin

酸ナトリウムを加えた溶媒を使用して、モモ果皮からタンパク質を抽出し、電気泳動した結果を Fig. 2 に示した。その結果、pH は 5 または 6 で抽出した場合に Pru p3 のバンドが強く認められた。pH 5 と 6 を比較すると、いずれも N 末端アミノ酸解析を行う十分量が抽出されていたが、pH 5 の方が夾雑物の影響が少なく、限外濾過膜を使用した脱塩と濃縮では膜が目詰まりしにくく、短時間で試料調製ができ、抽出 pH としては 5 が最適であった。

ポリフェノール除去を目的として、Björkstén⁶⁾らは PVPP を使用しているが、抽出液は清澄化されるものの、無添加 (Blank) に比べ、抽出されるタンパク質量が低下した (Table 1)、電気泳動では Pru p3 のバンドが認められなかったため (Fig. 3)、PVPP の使用は不適当と判断した。また、タンパク質とポリフェノールの吸着を阻害する目的で添加されている EDTA と DIECA の併用添加は無添加に比べ、タンパク質抽出効率を顕著に上げることが確認できたが、本研究ではポリフェノールの酸化防止剤として、Nakamura¹⁶⁾らが、甲州ブドウからのタンパク質抽出時に使用していたアスコルビン酸ナトリウムを用いたところ、安価なアスコルビン酸ナトリウムのみで EDTA と DIECA を代替できることがわかった (Table 1, Fig. 3)。以上、本研究で確立したタンパク質抽出方法を Fig. 5 に示した。本方法を用いることにより、モモ約 1 個分の果皮 5 g からのアレルゲンの抽出が可能となった。

つぎに、全 RNA 抽出について、著者らは AGPC 法¹⁷⁾や

CTAB法¹⁸⁾を検討したが、RNAは抽出できなかった。そこで、モモに含まれる水溶性多糖類が抽出を妨害していると推定し、多糖類を多く含む材料から全RNAの抽出をする際に多く用いられてきたSDS-フェノール法^{11)~13)}を選択した。この方法で、全RNAを抽出後、プロメガ社のキットを用い、mRNAを精製した。Zuidmeer⁹⁾らは、5gのモモ果皮と果肉（割合について記述なし）から7.6μgの全RNAを得ており、mRNAの精製は行っていないが、mRNAは全RNAの2~5%を占めるので¹⁹⁾、mRNA量は0.15~0.38μgと推定される。本報で、著者らがモモ果皮から取得できたmRNA量をZuidmeer⁹⁾らと同様に5gの試料から抽出した場合に換算すると、mRNA量は8.75μgとなり、SDS-フェノール法による全RNA抽出法の有用性が確認できた。

遺伝子ライブラリーの作製では全RNAからmRNAを精製することは必須であり、RT-PCRでも原理的には全RNAを試料にして実施することが可能であるが、mRNAにすることによって、飛躍的に感度があがると期待される¹⁹⁾。本研究では、mRNAからcDNAを合成し、cDNAを鋳型にしたRT-PCRでPru p3の遺伝子発現を確認できた（Fig. 4）。

本報で行った全RNA抽出法およびmRNA精製法を用いることで、cDNAのPCRでの増幅が可能となり、タンパク質として発現量が少ないアレルゲンについて、遺伝子発現の面からの高感度検出に応用できるものと考え、将来的にはモモ果皮におけるアレルゲンタンパク質の発現量の比較やモモの品種、栽培条件等によるアレルゲンの差異を明らかにすることを目指したい。

要 約

(1) 少量のモモ果皮から主要アレルゲン Pru p3 を抽出する方法として、高速振盪機を使用した抽出方法を検討した。5gの果皮を20mmol/Lのアスコルビン酸ナトリウムを含有するpH 5のクエン酸-リン酸緩衝液10ml中で10分間振盪をおこなうと、夾雑物の影響が少ない状態でタンパク質が抽出され、N末端アミノ酸解析に十分なPru p3が得られた。

(2) モモ果皮からmRNAを取得することを目的に、全RNAの抽出をSDS-フェノール法で行った。その後キットを用いてmRNAを精製したところ、5gの試料から抽出した場合は8.75μgのmRNAが得られることがわかった。mRNAからcDNAを合成し、cDNAを鋳型にしたRT-PCRにより、Pru p3の遺伝子発現が確認した。

最後に、N末端アミノ酸配列の解析についてご協力いただきました元・山梨大学ワイン科学研究センター（現・東京工科大学）高柳 勉教授とDNA塩基配列解析にご協力いただきました山梨大学大学院長沼孝文准教授に深謝いた

します。

文 献

- 1) 加工食品製造・販売業のみなさまへ「アレルギー食品を含む加工食品の表示ハンドブック」平成21年3月改定（厚生労働省）pp. 4-5, p. 17.
- 2) Pastorello, E.A., Oratolani, C., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Borga, A., Bengtsson, A., Incorvaia, C., Berti, C. and Zanussi, C., Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: An in vivo and in vitro study. *J. allergy Clin. immunol.*, **94**, 699-707 (1994).
- 3) Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Oratolani, C., Ispano, M., Monza, M., Baroglio, C., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C. and Conti, A., The major allergen of peach (*Prunus Persica*) is a lipid transfer protein. *J. allergy. Clin. immunol.*, **103**, 520-526 (1999).
- 4) Brenna, O., Pompei, C., Ortilani, C., Pravettoni, V., Farioli, L. and Pastorello, E.A., Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 493-497 (2000).
- 5) 斎藤美貴, 小嶋匡人, 長沼孝多, 辻 政雄, 果実アレルゲンの検出方法と低減化加工手法の確立に関する研究（第2報）, 山梨県工業技術センター研究報告, **23**, 55-57 (2009).
- 6) Björkstén, F., Halmepurp, L., Hannuksela, M. and Lahti, A., Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*, **35**, 671-677 (1980).
- 7) 「五訂増補日本食品標準成分表」, 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会報告.
- 8) 真部孝明, 「ペクチン」—その科学と食品のテクスチャー（幸書房, 東京）, p. 60 (2001).
- 9) Zuidmeer, L., van Leeuwen, W.A., Buddle, I.K., Cornelissen, J., Bulder, I., Rafalska, I., Besoli, N.T., Akkerdaas, J.H., Asero, R., Rivas, M.F., Mamcebo, E.G. and van Ree, R., Lipid transfer protein from fruit: Cloning, Expression and Quantification. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **137**, 273-281 (2005).
- 10) Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Garacia-Selles, F.J., Barber, D. and Salcedo, G., cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clin. Exp. All.*, **32**, 87-92 (2002).
- 11) Brawerman, G., Mendecki, J. and Lee, S.Y., A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, **11**, 637-641 (1972).
- 12) Fukazawa, C., Momma, T., Hirano, H., Harada, K. and Uda, K., Glycinin A3B4 mRNA. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA complementary to a soybean storage protein. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6234-6239 (1985).
- 13) 渡辺 格・監修, 植物バイオテクノロジー実験マニュアル「クローニングとシーケンシング」杉浦昌弘編,（農村文化社, 東京）, p. 20 (1989).
- 14) Smith, P.K., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985).
- 15) 小川 正, 食品アレルギーを誘発する植物起源アレルゲン, 化学と生物, **40**, 643-652 (2002).
- 16) Nakamura, K., Amano, Y. and Kagami, M., Purification and same properties of a polyphenol oxidase from Koshu Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**, 122-127 (1983).
- 17) Chomczynski, P. and Sacchi, N., Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium thiocyanate-phenol-

-
- chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- 18) Murray, M.G. and Tompson, W.G., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321-4325 (1980).
- 19) 無敵のバイオテクニカルシリーズ 改定「遺伝子工学実験ノート下」田村隆明編, (羊土社, 東京), p. 146 (2001).
(平成 21 年 9 月 8 日受付, 平成 22 年 1 月 4 日受理)
-