

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 穀物アレルギー原因候補タンパク質の探索・評価研究

氏名 平野 可奈

論文内容の要旨

食物アレルギーは、抗原を経口的に摂取することにより誘発されるアレルギーである。その症状は粘膜や皮膚、呼吸器、消化管、神経など全身のあらゆる組織、器官において、またアナフィラキシーに見られるように全身性の症状として現れる。食物アレルギーを誘発する抗原のほとんどは、食物に含まれるタンパク質である。通常、食物を摂取した際には消化や経口免疫寛容といった生体の防御機構により、過剰な免疫応答は起こらないように制御されている。しかし、抗原となるタンパク質（アレルゲン）が未分解のまま体内に取り込まれ免疫系によって異物として認識・排除する機構がはたらくと、アレルギー反応を発症することとなる。アレルギーの原因となる食物としては、古くからよく知られる卵、牛乳に加えて、最近では植物性食物である穀物や果物などに対するアレルギーが増加している。卵や牛乳によるアレルギーの発症は、消化管機能の未発達な幼児に高い頻度で見られるが、成長に伴い寛解していく傾向がある。一方で穀物によるアレルギーは寛解しにくく、幼少期以降に発症が見られることから、感作・誘発において卵や牛乳とは異なる過程をとる可能性が考えられるが、このように異なる食物により多様な症状が誘発される機構の詳細は不明である。また穀物アレルギーでは、イネ科の雑草や牧草の花粉によるアレルギーとの関連も考えられる。国や地域によっても原因食物や発症の頻度が異なり、食生活および生活環境、さらに人種や民族などの遺伝的背景が複雑に関与していると考えられる。

本研究では、まず主要穀物であるイネを用いてアレルギー発症の抗原となる候補タンパク質について、既知のアレルゲンとの構造（アミノ酸配列）の相同性をもとに探索した。そこで得られたイネアレルゲン候補の組換えタンパク質を調製し、アレルギー患者血清抗体との反応性による潜在的アレルゲン性を評価した。また、既知アレルゲンとイネアレルゲン候補との免疫交差性については、立体構造上の類似性も含めて考察した。さらにマウスモデルを用いて、コムギの不溶性タンパク質であるグリアジン

における主要なアレルゲン候補の探索と即時型アレルギー誘発能を解析した。

米のアレルギーについては成人における難治性の皮膚炎が報告されており、アナフィラキシーなどの即時型症状の誘発も希にはあるが報告されている。本研究では、米の主要アレルゲンであるアミラーゼ／トリプシンインヒビター、26kDa グロブリン、およびグリオキサラーゼ I の発現を抑制した組換えイネの種子を用い、患者血清 IgE との反応性を指標とすることで、これら 3 種のアレルゲン候補の米アレルギーへの寄与度を解析した。その結果、アレルゲンの低減化により米タンパク質に対する患者血清 IgE の反応性は低下したが、その反応性にはいくつかのパターンがみられた。その感作抗原の種類と数に依存して血清サンプルがいくつかのグループに分類できることが明らかとなった。さらにいくつか検体については、3 種の主要アレルゲンを低減化した米に対しても、一部の患者血清サンプルでは IgE 反応性が残存した。このことより、米には主要アレルゲン以外に未知の潜在的アレルゲンが存在することが示唆された。

米に含まれる主要アレルゲン以外で、感作抗原となる未同定アレルゲン候補タンパク質を明らかにするために、プロテオームとアレルゲンのデータベースを活用したイネ種子の潜在的アレルゲンを探索した。イネ種子におけるタンパク質のアレルギー潜在性を、相同性に基づくアレルゲンデータベースからのスクリーニングと、組換えタンパク質を用いた IgE 反応性を解析することにより評価した。質量分析法に基づくプロテオミクスによって同定された 131 のイネの胚乳タンパク質の中から、BLAST 検索により 9 種のタンパク質が既知のアレルゲンと配列相同性を示した。それらは、トウモロコシの zein (Zea m 50K)、コムギの LMW-glutelin (Tri a 36)、kinase-like pollen allergen of Russian thistle (Sal k 1)、Hsp70-like hazel tree pollen allergen (Cor a 10)、コムギの chitinase-like xylanase inhibitor (Tri a XI)、オオムギの α -amylase (Hor v 16) そしてレモンの germin-like protein (Cit l 1) であり、それぞれ短い連続したアミノ酸配列が一致した。さらに配列が一致した領域の中には、3 次元構造において表面、あるいは突出した領域に集中して存在し、そこでは米タンパク質と既知アレルゲンとで類似の立体構造を持つことが示唆された。これらのイネのホモログの組換えタンパク質は、少なくともいくつかのアレルギー患者の血清検体と実際に反応を示すことを、IgE 免疫ブロット解析により明らかにした。反応性が見られたタンパク質については、抗原タンパク質のドメインやモチーフなどの部分的な構造類似性による免疫交差反応性や、タンパク質としての性質や機能などの類似性、共通性に基づいてアレルゲン性を発揮する可能性があると考えた。このように新しく同定された潜在的アレルゲンは、分子育種あるいは遺伝子操作によって作出された新種のイネの安全性の評価においても、追加すべき標的となると考えられた。

穀物アレルギーの原因タンパク質は、食物として種子の他に、吸入性抗原として花粉にも含まれる可能性がある。雑草・牧草などのイネ科植物による花粉症は特にヨーロッパにおいて広く知られており、いくつかのイネ科植物の花粉タンパク質はイネ科花粉症のアレルゲンとして同定され、特性が明らかにされている。対照的に、同じイ

ネ科に属するイネについては、イネ花粉による季節性鼻炎の症例報告があるのみで、その詳細な明らかにされていない。このような背景から、イネ花粉タンパク質の潜在のアレルゲン性を評価するために、雑草／牧草花粉の主要アレルゲンである β -expansin (EXP)、Ca²⁺-binding protein (CBP)/polcalcin、extensin (EXT)、profilin (PRF)、polygalacturonase (PGA)のイネホモログ遺伝子を探索し、その cDNA を用いて組換えタンパク質を調製した。これらに対する特異的抗体を調製し、免疫ブロットと免疫組織学的解析により、EXP、EXT、PGA と推定されるタンパク質が、葯組織と花粉中に発現していること、さらにそれらはチモシー花粉のタンパク質と免疫交差反応性を示すことを明らかにした。アレルギー患者の血清を用いた ELISA と免疫ブロット解析では、EXP と EXT に対して IgE の陽性反応が多くの特異性が見られ、PGA と PRF に対してはほとんど反応性が見られなかった。これらの結果から、EXP と EXT は他のイネ科花粉症と同様に、イネによる花粉症を誘発する可能性が考えられた。

穀物の中でもアナフィラキシー性の食物アレルギーを誘発する頻度が高いコムギについて、マウスを用いたコムギ食物アレルギーモデルを用いて、グリアジン経口摂取時のアナフィラキシー誘発における抗原成分を探索し、潜在のアレルゲン性を評価した。遺伝的要因も含めて解析するために、異なる H-2 ハプロタイプを持つ A/J、AKR/N、Balb/c、C3H/HeJ の 4 系統のマウスを用いて、グリアジン感作および経口摂取によるアナフィラキシー様症状の誘発を解析した。4 系統のマウスのなかで、A/J がグリアジンに対して最も高い IgE 応答性を示し、さらにグリアジンの胃内投与によって、重篤なアナフィラキシー様症状（直腸温の急激な低下と血管透過性の亢進）を示した。グリアジンに対する血清 IgE について、ELISA 結果では、A/J マウスと Balb/c マウスの 2 系統間で大きな違いは見られなかったが、アナフィラキシー様症状に明らかな差異が観察された。グリアジン胃内投与によって、A/J マウスでは 30 分後に最大 4 度の直腸温の低下が見られ、その後少なくとも 70 分にわたって 3 度程度の低下が続いた。一方 Balb/c マウスでは、経口投与後に最大で 2 度程度の低下が見られたが、30～40 分後には平常の温度まで回復した。また、このグリアジン胃内投与後の急激な直腸温の低下は、血小板活性化因子 (PAF) 受容体拮抗薬により顕著に抑制されたことから、アナフィラキシー誘発には粘膜マスト細胞に加え血流中の好塩基球も関与することが示唆された。次に、多様なグリアジン分子種の中のアレルゲン候補分子を探索するために、A/J マウスの血清 IgE とグリアジンの主要成分との反応性を ELISA と免疫ブロットにより解析した。IgE は、 β -グリアジンと γ -グリアジン、さらに ω -グリアジンとも反応したことから、マウスにおいて主要グリアジンはいずれもアレルギー感作能を持つことが示唆された。どのグリアジン成分が腸管から吸収され粘膜固有層さらに血中に移行してマスト細胞や好塩基球を活性化しているかを明らかにすることが今後の研究課題である。