

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 平野 可奈

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

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	松田	幹
委員	名古屋大学教授	牧	正敏
委員	名古屋大学教授	下村	吉治
委員	名古屋大学准教授	灘野	大太
委員	名古屋大学助教	大島	健司

論文審査の結果の要旨

食物アレルギーは、食品中に含まれるタンパク質抗原により誘発されるアレルギーである。その症状は消化管のみならず、皮膚、呼吸器など多様な組織、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も現れる。アレルギーの原因となる食物としては、卵、牛乳、甲殻類などの動物性食物に加えて、植物性食物である穀物や果物などがある。卵や牛乳によるアレルギーは、乳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成人になってからも発症する例もある。このような、食物抗原の種類に依存して多様なアレルギーが発症する機構の詳細は不明である。また、植物性食物では動物性食物に比べてタンパク質抗原が多種多様であり、アレルギーの原因となるタンパク質の同定も遅れている。

本学位論文では、主要穀物であるコメとコムギが原因となるアレルギーの発症機構の理解を目指して原因候補タンパク質抗原を探索し潜在のアレルゲン性を評価した一連の研究成果がまとめられている。その研究成果の要点を以下に記す。

1. イネ花粉タンパク質の潜在のアレルゲン性を評価し、それらのイネ科雑草・牧草花粉症および米食物アレルギーとの関連性を示唆した。

イネ科雑草・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配列相同性に基づいて探索し、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、イネ花粉に発現すること、EXT と PGA は胚乳（米）でも微量に検出されること、さらにはイネ科雑草花粉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により、イネの EXP と EXT に対する IgE 陽性率が高いことを示した。これらの結果から、米食物アレルギーでは、米飯の摂取とともに、イネ科雑草・牧草およびイネの花粉に対する暴露とも関係することを示唆した。

2. 主要アレルゲン発現抑制組換えイネを用いて米のアレルゲン性における主要アレルゲンの寄与を評価し、他の潜在のアレルゲンの存在を示唆した。

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て、患者血清 IgE との反応性を指標としてこれら 3 種のタンパク質の米アレルギーへの寄与度を調べた。多くの患者血清において、主要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 の反応性は顕著に低下し、また、各主要アレルゲンとの IgE 反応性にはいくつかの類型がみられた。さらに、いくつかの血清検体については、3 種の主要アレルゲンを低減化した米に対しても IgE 反応性が残存した。これらの結果から、

主要アレルゲン以外にも未同定の潜在的アレルゲンが存在することを示唆した。

3. 既知アレルゲンとの配列類似性と IgE との反応性を指標にしてイネ胚乳に発現するタンパク質の潜在的アレルゲン性を評価し、新規の潜在的アレルゲンを同定した。

質量分析プロテオミクスによって同定された 131 種のイネの胚乳タンパク質の中から、BLAST 検索により既知アレルゲンと類似の配列を持つ 9 種のタンパク質を選抜した。それらは、既知アレルゲンであるトウモロコシの 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) と相同性があり、Tri a XI および Hor v 16 ではイネタンパク質と配列が完全に一致した複数の短い領域 (9-14 残基) が 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することを示した。さらに、これらのイネホモログの組換えタンパク質は、少なくとも複数のアレルギー患者血清検体の IgE 抗体と実際に反応を示すことを明らかにし、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ことを示唆した。

4. コムギ種子タンパク質の経口摂取によるアナフィラキシー誘発モデルにおける抗原分子を探索し、潜在的アレルゲン性を評価した。

コムギ種子の主要貯蔵タンパク質であるグリアジンと異なる 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。IgE 応答性およびアナフィラキシー様症状誘発に高い系統依存性があること、また、グリアジン胃内投与後の急激な体温低下には、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を示唆した。さらに、産生された IgE 抗体は、多様なグリアジン分子種の中の 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潜在的アレルゲン性を持つことを示唆した。

以上のように、1-4 にまとめた研究結果は、主要穀物であるコメとコムギのタンパク質について、関連するデータベース、アレルギー患者血清や実験動物モデルなどを活用して潜在的アレルゲンを探索し評価したものであり、探索のアプローチと新たな潜在的アレルゲンの同定という点で独創性、新規性が認められる。本学位論文にまとめられた研究内容は、食品科学、アレルギー学、植物科学分野における新しい知見を提出し学術的に優れた成果であると評価し、博士 (農学) に値すると判定した。