

称号及び氏名	博士（農学）吉岡 宏幸
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日
論文名	「自殖性普通ソバにおけるアレルゲン性たんぱく質の分子遺伝学的研究」
論文審査委員	主査 教授 足立 泰二 副査 教授 原田 二郎 副査 教授 森田 尚文

論文要旨

普通ソバ種子には IgE 抗体を介した即時性の I 型アレルギーを引き起こすアレルゲンが存在する。その原因物質は、ソバアレルギー患者の血清中に含まれる IgE 抗体の結合活性によって同定する。そしてソバ種子に含まれる水溶性貯蔵たんぱく質がアレルゲンとして同定された。その内主要な 24 kDa、22 kDa、8 kDa のたんぱく質についてはコードする cDNA が単離され、18 kDa、16 kDa、14 kDa のたんぱく質の N-末端アミノ酸配列が決定されている。しかし、全てのソバアレルギー性たんぱく質の塩基配列やアミノ酸配列を網羅的に調査した報告はなく、また、分子特性やアレルギーへの詳細な関与はほとんど解明されていない。さらに、ソバは日本において卵、牛乳、小麦に次ぐ主要食物アレルギーであるにもかかわらず、その低減化がほとんど進められていないのが現状である。一方、種間雑種と戻し交雑によって近縁野生種の自家和合性遺伝子を普通ソバへ移入することに成功した。これによって開発された自殖性普通ソバは、普通ソバの遺伝的背景を持ちながら自家和合性であることから、遺伝子導入や遺伝解析に有効である。

本研究は、資源植物学的見地からアレルギー性たんぱく質の低減化を目的とし、自殖性普通ソバを供試植物として2つのアレルギー Fag e 1、Fag e 2 をコードする cDNA の単離とそのアレルギー性を同定した。また、遺伝子工学的手法を用いたアレルギー性たんぱく質の発現抑制を目的として Fag e 1 遺伝子のゲノム構造を明らかにした。さらに、Fag e 1 に存在する IgE エピトープ配列とクリティカルアミノ酸を分子遺伝学的手法によって明らかにしたものである。

第1章 主要アレルギー Fag e 1 をコードする cDNA の単離と同定

普通ソバにおけるアレルギー性たんぱく質は複数存在し、IgE 結合活性を示すたんぱく質は患者によって多様である。その内調査したすべての患者 IgE が結合活性を示す分子量 22kDa の水溶性たんぱく質は、種子中の蓄積量も高いことから主要アレルギー Fag e 1 とされた。近年、22kDa の分子量を持つグロブリンたんぱく質をコードする cDNA が Fag e 1 の候補遺伝子として単離されたが、その同定はなされていない。そこで、本章では自殖性普通ソバにおけるグロブリンたんぱく質をコードする cDNA を単離し、その cDNA をもとに大腸菌によって発現させた組換えたんぱく質とソバアレルギー患者の血清を用いてアレルギー性の同定を試みた。

また、自殖性普通ソバの登熟段階の種子より抽出した全 RNA をテンプレートとし、22kDa グロブリン特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。得られた増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した。また、大腸菌発現ベクターにサブクローニングし、発現・抽出・精製した組換えタンパク質は、患者血清による免疫ブロッティングに用いた。

クローニングした cDNA は、191 アミノ酸をコードし、分子量 21.7 kDa と推定され、普通ソバの Fag e 1 と 98.8% の相同性を示した。アミノ酸配列の相同性

検索 (BLASTp) では、ダイズアレルゲンのグリシニン、ピーナッツアレルゲンの Ara h 3 と高い相同性が認められ、モチーフドメインよりクピン・スーパー・ファミリーに属することを明らかにした。また、この cDNA より合成した組換えタンパク質に対して患者血清中の IgE 抗体が結合活性を示したことから、自殖性普通ソバにおける主要アレルゲン Fag e 1 をコードするものと同定した。

第 2 章 Fag e 1 遺伝子のゲノム内構造解析

13S グロブリンの β -サブユニットである Fag e 1 は、種子特異的たんぱく質であり、蓄積量も多く、ソバ属に普遍的に存在する。したがって、その遺伝子発現は、精密で強力なプロモーターによって制御されていることが推測された。しかし、Fag e 1 に関する遺伝子レベルでの研究は、cDNA の単離に留まっており、発現機構やゲノム構造の解明はなされていない。本章では、遺伝子工学的手法を用いたソバアレルゲン性たんぱく質の低減化のため、貯蔵タンパク質遺伝子の特異的発現を制御するプロモーター領域の詳細を解明し、特定の貯蔵たんぱく質の発現抑制システムを確立することを目的として Fag e 1 を構成するゲノム内構造の調査を行った。

自殖性普通ソバより抽出したゲノム DNA を 5 つの制限酵素 EcoR I、HindIII、Sac I、Xba I によって処理し、Fag e 1 cDNA をプローブとし、ゲノミックサザンブロット分析を行った。ハイブリダイズが見られた制限酵素処理ゲノム DNA 断片をクローニングし、コロニーハイブリダイゼーションによって選抜した陽性クローンの塩基配列を決定した。

ゲノミックサザンブロットの結果、Fag e 1 遺伝子内に制限酵素サイトを持つものと持たないもののハイブリダイズパターンより Fag e 1 遺伝子は 3 コピー存在すると推定した。そのうち、Fag e 1 cDNA プローブのハイブリダイズが認め

られた約 5 kb の Sac I 処理ゲノム DNA 断片をクローニングし、陽性クローンを選抜して塩基配列を決定した。その結果、このクローンは Fag e 1 コーディング領域とその上流約 1 kb を含むものであり、Fag e 1 コーディング領域は 2 つのエキソンによって 1 つのイントロンが挟まれた構造であった。また、5' 上流領域には種子特異的発現を調節するプロモーター領域に見られる ACGT エlement と CANNTG モチーフが存在していた。

第 3 章 Fag e 1 におけるエピトープ解析

アレルギー性たんぱく質の同定は、患者 IgE 抗体の結合活性によって行う。IgE 抗体はたんぱく質分子のある特定の領域を抗原決定基（エピトープ）として認識する。近年、このエピトープがアレルギー発症の機序や交叉反応性のメカニズム解明に重要だとされている。また、エピトープを構成するアミノ酸には IgE 抗体の結合を決定付けるクリティカルアミノ酸が存在し、このアミノ酸置換による変異ペプチドのアレルゲン性低減化が報告されている。したがって、本章では、ソバにおける主要アレルゲン Fag e 1 のエピトープ解析は、医療面や低減化においても重要であることから、自殖性普通ソバにおける主要アレルゲン Fag e 1 のエピトープ配列とクリティカルアミノ酸を決定しようとした。

自殖性普通ソバより単離した Fag e 1 cDNA より推定したアミノ酸配列をもとに 12 アミノ酸よりなるペプチドを 10 アミノ酸が重複するようにデザインした。このペプチドを SPOTs 法によってニトロセルロースメンブレン上に合成して作成したペプチドライブラリーと患者血清を用いて免疫ブロッキングを行った。また、エピトープを構成するアミノ酸を異なるアミノ酸に置換した変異ペプチドを同じ方法によってメンブレン上に合成し、同様に免疫ブロッキングを行った。その結果、患者 IgE 抗体が結合活性を示したペプチドに共通のアミノ酸

配列をエピトープとし、8つのエピトープ領域を同定した。さらに、これらのエピトープのうち、1つのアミノ酸を置換した変異ペプチドにおいて、著しいIgE抗体の結合活性の消失が見られた。よって置換したアミノ酸をIgE抗体結合におけるクリティカルアミノ酸とし、6つのアミノ酸をクリティカルアミノ酸として特定した。

第4章 機能性アレルゲン Fag e 2 をコードする cDNA の単離と同定

ソバにおける約 16 kDa の種子貯蔵たんぱく質は、トリプシンインヒビター活性やペプシン耐性が報告されており、植物アレルゲンが比較的分子量で機能性を持った種子貯蔵たんぱく質として同定されていることから、このタンパク質の潜在的なアレルゲン性が示唆された。そこで、本章では、約 16 kDa のたんぱく質をコードする cDNA を単離し、相同性検定による機能推定と既知植物アレルゲンとの配列比較、さらに組換えたんぱく質を用いたアレルゲン性の同定を試みた。

トリプシンインヒビターやペプシン耐性たんぱく質として報告されている 16 kDa のたんぱく質の N-末端アミノ酸よりプライマーをデザインし、自殖性普通ソバの登熟種子より抽出した全 RNA をテンプレートに 3' RACE を行った。得られた増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した。また、大腸菌発現ベクターに ORF 領域をサブクローニングし、発現・抽出・精製した組換えタンパク質を免疫ブロッティングに用いた。

クローニングした cDNA の ORF 領域は、122 アミノ酸、分子量 14.1 kDa と推定された。BLAST 検索では、相同性の高い順にピーナッツトリプシンインヒビターの Ara h 2、キャスタービーンのリッパの Ric c 1、Ric c 3 と相同性がみられた。また、これらのアミノ酸配列を比較したところ、共通に保存されたシステイン残基が

見られた。さらに、この cDNA より合成した組換えたんぱく質に対し、患者血清中の IgE 抗体が結合活性を示したことから機能性アレルゲン **Fag e 2** をコードするものと同定した。

以上のように、ソバアレルギーを引き起こすたんぱく質は熱や酸、消化酵素に対する耐性を構造上推定できるものや、プロテアーゼインヒビターやプロテアーゼ耐性などの機能性を持つものであった。このことから加熱などの調理や胃腸での消化を経ても比較的大きな分子もしくはペプチドの状態で吸収されることが予測される。よってこれらのような性質がアレルゲン性を獲得した要因であることも考えられる。また、アレルゲン性たんぱく質をコードする cDNA の単離やゲノム構造の解析によって遺伝子工学的な手法を用いたアレルゲン性たんぱく質の発現抑制が可能となった。**Fag e 1** 遺伝子はマルチコピーであることからジーンサイレンシングによる発現の抑制は容易ではないが、**Fag e 1** 特異的プロモーターの利用は有効と思われる。さらに、エピトープ配列の決定は、交叉反応性の予防やソバアレルギー発症のメカニズム解明に貢献するものである。そして、クリティカルアミノ酸を明らかにしたことによって、アレルゲン性の低減化をアミノ酸レベルで可能とした。このことは、低アレルゲンソバの作出に対する点突然変異応用の有効性を示し、また、クリティカルアミノ酸を操作したペプチドの開発によって、減感作治療薬など医療への応用も可能にするものである。

審査結果の要旨

本論文は、分子遺伝学的手法を用いたソバの主要アレルゲン性たんぱく質遺伝子のゲノム構造を同定するとともに、アレルゲン性たんぱく質の IgE エピトープ配列とクリティカルアミノ酸を明らかにし、発現制御に向けて検討を加えたものである。普通ソバにおけるアレルゲン性たんぱく質は複数存在し、IgE 結合活性を示すたんぱく質は患者によって多様であるが、調査したすべての患者 IgE が結合活性を示す分子量 22kDa の水溶性たんぱく質は、種子中の蓄積量も高く、主要アレルゲン **Fag e 1** とされていた。22kDa のグロブリンたんぱく質をコードする cDNA を自殖性普通ソバから単離し、大腸菌によって発現させた組換えたんぱく質と患者血清を用いて同定した。また、登熟種子より抽出した全 RNA をテンプレートとし、22kDa グロブリン特異的プライマーを用いた RT-PCR を行ない、得られた増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した。さらに、大腸菌発現ベクターにサブクローニングし、発現・抽出・精製した組換えタンパク質については、患者血清による免疫ブロッティングを実施した。クローニングした cDNA は、191 のアミノ酸をコードし、分子量 21.7 kDa と推定され、これまでの **Fag e 1** と 98.8% の相同性を示し、組換えタンパク質に対して患者血清中の IgE 抗体が結合活性を示した。アミノ酸配列の相同性検索 (BLASTp) では、ダイズ、ピーナッツ等との高い相同性が認められ、モチーフ・ドメインよりクピン・スーパー・ファミリーに属することも明らかにした。

13S グロブリンの β -サブユニットである **Fag e 1** は、種子特異的たんぱく質であり、蓄積量も多く、ソバ属に普遍的に存在する。従って、貯蔵タンパク質遺伝子の特異的発現を制御するプロモーター領域の詳細を解明し、特定の貯蔵たんぱく質の発現抑制システムを確立するために、**Fag e 1** を構成するゲノム内構造の調査を行った。その結果、**Fag e 1** 遺伝子は 3 コピー存在することが判明した。そのうちの約 5 kb のゲノム DNA 断片をクローニングし、陽性クローンを選抜して塩基配列を決定したところ、**Fag e 1** コーディング領域とその上流約 1 kb を含むものであり、**Fag e 1** コーディング領域は 1 つのイントロンを挟む構造であることが明らかになった。また、5' 上流領域には種子特異的発現を調節するプロモーター領域に見られる ACGT エlement と CANNTG モチーフの存在も明らかにした。

アレルゲン性たんぱく質 **Fag e 1** の患者 IgE 抗体との結合活性は、特定アミノ酸配列の領域を抗原決定基 (エピトープ) として認識する。また、エピトープ内の構成アミノ酸には IgE 抗体の結合を決定付けるクリティカルアミノ酸が存在し、このアミノ酸置換による変異ペプチドのアレルゲン性低減化を図ることができる。SPO Ts 法によってペプチドライブラリーと患者血清を用いた免疫ブロッティングを行い

、8つのエピトープ配列とその配列内の6つのアミノ酸をクリティカルアミノ酸として特定した。

約16 kDaのソバ種子貯蔵たんぱく質には、トリプシンインヒビター活性やペプシン耐性が報告されており、このタンパク質の潜在的なアレルギー性が示唆されたので、これをコードするcDNAを単離し、相同性検定による機能推定を試みた。その結果、このたんぱく質は熱や酸、消化酵素に対する耐性を構造上推定でき、プロテアーゼインヒビターやプロテアーゼ耐性等との機能的関連性を証明した。

審査委員会の所見

以上のように、これらの成果はソバの資源植物学的改善に関わる基礎的知見としてのみならず、低アレルギーソバの作出に対する点突然変異応用の有効性を示し、また、クリティカルアミノ酸を操作したペプチドの開発によって、減感作治療薬など医療への応用も可能にするなど、他分野への利用の可能性を拡げるものとしても高く評価できる。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。