

氏名	弓岡 仁美
授与した学位	博士
専攻分野の名称	栄養学
学位授与番号	博甲第93号
学位授与の日付	平成26年3月24日
学位論文の題目	Study on the precursor of Gly m Bd 28K, a soybean allergen (大豆アレルゲン Gly m Bd 28K の前駆体に関する研究)
学位審査委員会	主査 木本 眞順美 副査 山本 耕一郎 副査 山下 広美

学位論文内容の要旨

近年、食物アレルギーは喫緊に解決すべき社会的な問題となっている。大豆は、わが国においては主要なタンパク質の給源であるとともに、代表的なアレルギー食品の一つである。大豆にはアレルゲンが少なくとも16種類存在することが示され、そのうち、Gly m Bd 68K、Gly m Bd30K、Gly m Bd 28K (Gm28K) が主要アレルゲンであることが明らかにされている。前二者のアレルゲンについてはよく認識されている。一方、Gm28K はアスパラギン結合型糖鎖を有する糖タンパク質であり、その糖鎖がアレルゲン性に関与することが報告されている。また、当該アレルゲンは、部分的な cDNA の情報から、シグナルペプチド様配列、Gm28K、未知タンパク質 (Gm23K) の3つのペプチド成分からなる前駆体として翻訳された後切断を受け、Gm28K と Gm23K の成熟型タンパク質となることが示唆される。しかしながら、当該アレルゲン前駆体に関するアレルゲン性の全体像の解明を含め、当該アレルゲンの植物細胞を用いた発現系の構築は未だ行われていない。

本学位論文では、まず、当該前駆体に対する完全長の cDNA の核酸配列を解明した。この配列に基づき、前駆体配列がコードするペプチド成分について EGFP (enhanced green fluorescent protein) をマーカーとして、植物細胞株として一般的に利用されているタバコ培養細胞 BY2 株 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) で発現させ、細胞内輸送に及ぼす影響について検討した。次に、大豆種子において、当該前駆体から生じる Gm23K の存在については未解明であった為、抗 Gm23K モノクローナル抗体を作製して検索を行い、Gm23K が大豆種子中に存在することを明らかにした。さらに、登熟過程の大豆種子における前駆体の消長を mRNA 及びタンパク質レベルで示すとともに、大豆種子細胞内における Gm28K および Gm23K の局在、ならびに Gm23K のアレルゲン性についても検討を行った。本論文の内容は以下の通りである。

第1章においては、大豆アレルゲンの研究状況を概観し、Gm28Kの糖鎖がアレルゲン性を有し、共通抗原として働く可能性を述べた。当該前駆体の全体像は十分解明されていないが、Gm28Kは、シグナルペプチド様配列、Gm28K、Gm23Kの3つのペプチド成分を前駆体として、その前駆体よりプロセッシングを受けることにより生じる可能性について説明した。

第2章では、RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends)法を用いたRT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)により当該前駆体に対するcDNAの5'側の核酸配列を精査して完全長のcDNAの核酸配列を決定し、N末端側24アミノ酸残基からなる配列(A配列)、Gm28KおよびGm23Kから構成されることを明らかにした。さらにタバコ培養細胞株BY2において、EGFPをマーカーとした融合タンパク質として発現させて解析した結果、A配列は小胞体内腔に入るシグナルペプチドであることが示された。次いで、当該前駆体配列を発現させた場合、Gm28KとGm23Kとが結合した状態でのみ、EGFPは液胞にて観察され、この2つの配列が当該前駆体の液胞への輸送に関わり、液胞にて2つの成分に切断されることが示唆された。

第3章では、大豆種子におけるGm23Kの存在について、2次元電気泳動法とモノクローナル抗体を用いたイムノブロットを組み合わせて検討し、大豆種子にGm23Kが存在することを明らかにした。登熟過程の大豆種子における当該前駆体の消長についてノーザンブロット及びイムノブロット法により検討した。その結果、登熟早期から後期の長期間に渡りGm28KとGm23Kの前駆体に対するmRNA発現が確認され、同時に両タンパク質が確認されたが、前駆体に対するタンパク質は確認できなかった。さらに、両タンパク質は大豆種子のタンパク質貯蔵液胞のクリスタロイドに局在していた。続いて、Gm23Kの化学的性質とアレルゲン性について検討した。Gm23Kは、Gm28Kと類似したアスパラギン結合型糖鎖を有する糖タンパク質であることが明らかになった。さらに興味深いことに、当該糖鎖は大豆患者血清IgE抗体と特異的に反応することが示された。この事実は、糖タンパク質性の植物アレルゲンの糖鎖が、各々のアレルゲン特異的IgE抗体に対するエピトープとなるという従来の報告と合致し、糖鎖が共通抗原となるという仮説を支持するものである。

最終章においては、第2章および第3章にて得られた成果をまとめている。すなわち、当該前駆体をコードする完全長のcDNAの核酸配列の解明ならびにそのアミノ酸配列と前駆体タンパク質の細胞内輸送との関連性を明らかにした。さらに、当該前駆体における未知タンパク質Gm23Kが大豆種子に存在することを明らかにするとともに、Gm23KもまたGm28Kと同様の糖鎖を有し、その糖鎖が大豆アレルギー患者血清中のIgE抗体と結合することを示した。本研究で得られた成果は、当該糖鎖が共通抗原として働くという仮説を支持する根拠を示すものであり、Gm28KおよびGm23Kのタバコ培養細胞における生産に関する基礎的な知見を提供するものである。

主業績

No.1	
論文題目	Cloning of a cDNA encoding the Gly m Bd 28K precursor and its vacuole transport in tobacco BY2 suspension-cultured cells
著者名	Hitomi Yumioka-Ito, Ryo Misaki, Miyuki Yokoro, Makiko Suzuki, Hiromi Yamashita, Miki Hiemori-Kondo, Masumi Kimoto, Ko Kato, Kazuhito Fujiyama, Hideaki Tsuji
発表誌名	<i>Journal of Nutritional Science and Vitaminology</i> . (in press)

副業績

No.1	
論文題目	Identification of the 23-kDa peptide derived from the precursor of Gly m Bd 28K, a major soybean allergen, as a new allergen
著者名	Miki Hiemori, Hitomi Ito, Masumi Kimoto, Hiromi Yamashita, Keito Nishizawa, Nobuyuki Maruyama, Shigeru Utsumi, Hideaki Tsuji
発表誌名	<i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , Vol.1675, Issues 1-3, 174-183, 2004.

論文審査結果の要旨

大豆主要アレルゲン Gly m Bd 28K (Gm28K) は既に単離され、その性質は解明され、クローニングにより前駆体として生成されることが推定されていたが、前駆体そのものについての認識は不十分であった。本論文は、前駆体の構造的な特徴およびその機能ならびに大豆種子における代謝などを含めた正確な全体像をまとめたものであり、得られた成果は次のとおりである。

まず、5' -RACE キットを用いた RT-PCR により当該前駆体をコードする cDNA の 5' 側の核酸配列を精査して完全長の cDNA の核酸配列を決定し、N 末端側 24 アミノ酸残基からなる配列 (A 配列)、Gm28K および Gm23K から構成されることを明らかにした。さらに、タバコ培養細胞株 BY2 (*N. tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) において、マーカーとして EGFP を組み込んだ発現ベクターを用いて、A 配列が ER 内腔に入るシグナルペプチドとして働くことを明らかにした。次いで、当該前駆体 cDNA を発現させた場合、Gm28K と Gm23K とが結合した状態でのみ、EGFP は液胞にて観察され、この 2 つの配列が当該前駆体の液胞への転送に関わり、液胞にて 2 つの成分に切断されることを示した。

次いで、2 次元電気泳動法と Gm23K のモノクローナル抗体を用いたイムノブロットを組み合わせ、大豆種子に Gm23K が存在することを明らかにした。さらに、ノーザンブロット及びイムノブロットを用いて、大豆種子の登熟中の当該前駆体の消長について検討した結果、登熟早期に、Gm28K と Gm23K はそれぞれ出現したが、その前駆体タンパク質は観察されなかった。さらに、両タンパク質は液胞のクリスタロイドに局在していることが示された。

また、Gm23K は、Gm28K と類似した Asn 結合型糖鎖を有する糖タンパク質であり、しかも、興味深いことに、当該糖鎖は大豆患者血清 IgE 抗体と特異的に反応することが示された。この事実は、糖タンパク質性の植物アレルゲンの糖鎖がそれぞれのアレルゲンに特異的な IgE 抗体と結合するという従来報告と合致し、糖鎖が共通抗原として働くという仮説を支持するものである。

以上の結果より、本論文は学術上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (栄養学) の学位論文として価値あるものと認める。