

氏名	うすい まさかつ 臼井将勝
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第335号
学位授与年月日	平成16年 3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Reduction of Antigenicity and Allergenicity of Allergen Proteins by the Attachment of Polysaccharides (多糖修飾によるアレルゲン蛋白質の抗原性・アレルゲン性の低減化)
学位論文審査委員	(主査) 加藤昭夫 (副査) 松富直利 森嶋伊佐夫 松田英幸 内海俊彦

学位論文の内容の要旨

近年増加傾向にある花粉症・食餌性アレルギーにおいて、その原因物質であるアレルゲンタンパク質を用いての治療(免疫寛容誘導)がおこなわれるようになってきた。

しかし、患者によっては、低い濃度のアレルゲンであってもI型のアレルギー応答(アナフィラキシー)を示すことや、長期の通院・投薬などを必要とすることなど、安全性や継続性に多くの課題が残っている。

そこで本研究では、多糖修飾を用いて、スギ(Cry j I)、ダイズ(Gly m Bd 30K)のアレルゲンタンパク質の抗原性・アレルゲン性を低減化し、安全な新規の寛容原の作製を目的とした。

修飾多糖には天然物由来の高分子量のガラクトマンナンまたはキトサンを用い、天然に生じるメイラード反応によりタンパク質-多糖複合体を作製した。これらのタンパク質-多糖複合体とそれぞれの患者血清中のIgE・IgG抗体との結合性をELISAおよびimmuno blotにより解析した。その結果、両アレルゲンタンパク質ともIgE抗体との結合性が大幅に減少し、IgG抗体との結合性は顕著な変化はなかった。このことは、多糖により、アレルゲンタンパク質のIgE epitopeがマスクされ、抗体との結合が阻害されたためと考えられる。またIgG抗体との結合性は残存していることから、タンパク質分子の表面は完全にはマスクされておらず、寛容原としての有効性が期待できる。

また、マウスへの腹腔投与においては、未修飾の物に比べ、IgE抗体の産生量が低下しており、アレルゲン性の低下も示唆された。

さらに、分子レベルでの抗原構造低減化の機構を調査するために、遺伝子工学的に作製したニワトリリゾチームの糖鎖付加変異体を作製し、モノクローナル抗体との結合性を調査し、糖鎖付加部位および糖鎖の種類による抗原性低下率の違いについて解析した。

その結果、抗体結合表面領域近傍に選択的に多糖を付加した場合において、最も効率良く結合性が低下し、多糖が抗原-抗体反応の立体障害になることにより、抗原性が低下していることが明らかになった。

このように、スギ・ダイズアレルゲン蛋白質、鶏卵白リゾチームのいずれも、その抗原性が多糖修飾により効率良く低減化した。これらの結果は、多糖修飾が多くのタンパク質の抗原性低下に有効であることと、安全な寛容原を簡易に作るための新規な製法であることを示している。

論文審査の結果の要旨

花粉症、食餌性アレルギーは共通して抗原性の強いアレルゲンタンパク質により生じる。本研究ではスギアレルゲン Cryj1、大豆アレルゲン P34、卵白アレルゲン Lysozyme を多糖であるガラクトマンナンおよびキトサンを用いて、自然に生じるメイラード反応により、タンパク質-多糖複合体を作成することにより、アレルゲン構造がマスクされ、Antigenicity が著しく抑制できることを明らかにした。また、これらの複合体を腹腔投与することにより、免疫寛容が誘導され、IgE 産生が抑えられ、Allergenicity が低減化することを示した。

スギアレルゲン Cryj1 はスギ花粉の飛散時期に数トンのスギから花粉 5 kg を集め、タンパク質画分から分離精製した。得られたアレルゲン Cryj1 を多糖類として大豆種皮から調製したガラクトマンナンを用いて、メイラード型の Cryj1-ガラクトマンナン複合体を作成した。この複合体を用いて、スギ花粉症患者の IgE との抗原抗体反応を ELISA およびイムノブロットにより解析した。その結果、多糖修飾したアレルゲン Cryj1 は IgE との反応性を著しく低減化するが、IgG との反応性はあまり低減化しなかった。このことは、多糖によりアレルゲンタンパク質の IgE エピトープがマスクされるが、IgG エピトープはマスクされにくいという興味ある結果である。すなわち IgG エピトープが残存しているため、寛容源としての有効性が期待できる。これを裏付ける結果として、多糖修飾した Cryj1 をマウスへ腹腔内投与すると未修飾のものに比べ、IgE 抗体の産生量が低下することが示された。

大豆アレルゲン P34 の場合もガラクトマンナンで多糖修飾すると大豆アレルギー患者の抗血清との反応性は著しく低減化した。また、P34-多糖複合体をマウス腹腔内投与すると IgE の産生が抑制され、IgG の産生は抑制しなかった。このようにスギアレルゲン、大豆アレルゲンともに多糖化により、アレルゲン性が低減化し、腹腔内投与により、IgE の産生を抑制するという現象は多糖化アレルゲンが免疫寛容剤として有効であることを強く示唆する。

さらに、分子レベルでの糖修飾によるタンパク質の抗原構造低減化のメカニズムを明らかにするために、遺伝子工学的な手法で作成したグリコシル化リゾチームを用いて、モノクローナル抗体との反応性について調べた。その結果、抗体結合表面領域近傍に多糖を付加すると効果的に抗原性が低減化することが明らかになった。

このように、スギ、ダイズ、卵アレルゲンのいずれも共通して、多糖修飾によりそれらの抗原性が著しく低減化した。また、これらの多糖修飾アレルゲンの腹腔内投与により、IgE 産生が抑制されることから安全な経口寛容剤を作成するのに多糖修飾が有効な方法であることが示された。

以上、研究内容は新規性・独創性に富むものであり、その成果は花粉アレルギーや食餌性アレルギーの低減化の研究分野の発展に寄与するものであり、産業的な利用にもつながるものと判断された。よって、本研究論文は博士（農学）の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。