

博士論文審査の結果の要旨

氏名	AHMAD MOHAMED AMIN SALIM AL ATHAMNEH
学位名	博士（農学）
学位番号	乙 第 22 号
論文題目	Immunomodulatory activity of phosphorylated buckwheat major allergen and its enzymatic hydrolysate （リン酸化ソバ主要アレルゲンとその酵素消化物の免疫調節作用）
論文審査委員	主査 片山 茂 真壁 秀文 米倉 真一 福田 正樹 小川 雅廣 （香川大学）

（博士論文審査の結果の要旨）

本論文は、ソバ主要アレルゲンである Fag e 1 と Fag e 2 について、リン酸化および酵素消化による免疫調節作用を明らかにしたものである。本論文では、抗原特異型免疫調節材の開発を目指し、リン酸化 Fag e 1 とリン酸化 Fag e 2 の酵素消化物のアレルギー反応抑制作用を検討し、得られた成果をまとめている。

（１）本研究の背景と目的について

アレルギー疾患の根本的な治療を目指して「食べて治す」という経口免疫寛容を利用した治療法の研究が行われている。経口免疫寛容とは低量の抗原の経口摂取により抗原特異的な免疫応答の抑制（寛容）が誘導される機構であり、その応用として減感作療法が知られている。しかし、同法はアナフィラキシーショックなどの重篤な副作用を引き起こす危険性もあり、より安全性の高い手法が求められている。ソバは健康食品として注目を集めているが、一方で重篤なアレルギー症状を引き起こしやすいことが問題となっている。ソバ主要アレルゲンとして、グロブリンタンパク質に分類される 22 kDa の Fag e 1 とアルブミンタンパク質に分類される 16 kDa の Fag e 2 が報告されている。Fag e 1 はソバタンパク質中の含有量が高く、Fag e 2 は消化抵抗性を有し、強いアレルゲン性を示すことが知られている。本研究室では、Fag e 2 のソバアレルギー患者血清 IgE との抗体結合能はリン酸修飾により低下すること、さらには、リン酸修飾 Fag e 2 の経口摂取は Fag e 2 感作マウスのアレルギー症状を軽減させることを明らかにしている。リン酸修飾によりアレルゲン性が低減化されているため、経口免疫寛容を誘導するうえで、アレルゲンそのものを摂取させるよりも安全性が高い。そこで本研究では、ソバ主要アレルゲン Fag e 1 と Fag e 2 について、リン酸化および酵素分解がアレルギー反応抑制作用に及ぼす影響について感作マウスを用いて検討することを目的とした。

（２）ソバ主要アレルゲン Fag e 1 のリン酸化が免疫調節作用に及ぼす影響について

ソバは特定原材料の一つで重篤なアレルギー症状を起こすことが知られている。Fag e 1 はソバタンパク質中の含有量が高く、主要アレルゲンとして報告されている。そこで、Fag e 1 の *Pichia* 発現系による分泌生産の確立を試みると共に、ソバアレルギーに対する免疫調節剤の開発を目的として、ソバアレルギーモデルマウスを用いてリン酸化修飾

によるアレルギー改善効果を検討した。酵母発現ベクターである pPICZαA のマルチクローニングサイトに Fag e 1 の cDNA 配列を挿入後、得られたベクターでメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を形質転換した。形質転換酵母を培養後、菌体外に Fag e 1 を高効率で分泌させることに成功した。精製した Fag e 1 はドライヒーティング法でリン酸化した。Fag e 1 感作マウスにリン酸化 Fag e 1 を 6 週間摂取させたところ、血清中のヒスタミンと IgE 濃度が低下し、IgA 濃度が増加することが示された。さらに脾臓およびパイエル板細胞の培養上清において IL-4 濃度の低下も認められた。また、パイエル板の Tfh 細胞の割合はリン酸化 Fag e 1 摂取により増加した。以上の結果より、ソバ主要アレルゲン Fag e 1 のリン酸化は Tfh 細胞活性化を介した IgE 反応軽減効果をもたらすこと、さらにはソバアレルギー反応を軽減化させる免疫調節剤の開発において有用な方策であることが示唆された。

(3) リン酸化と酵素消化がソバ主要アレルゲン Fag e 2 の免疫調節作用に及ぼす影響について

Fag e 2 は 16 kDa の主要ソバアレルゲンであり、ペプシン消化に対して高い抵抗性を有することが報告されている。先行研究では、Fag e 2 をリン酸化すると IgE 結合能を低下させること、さらにはリン酸化 Fag e 2 (P-Fag e 2) の経口摂取は Fag e 2 感作マウスのアレルギー反応を軽減させることが報告されている。そこで本研究では、リン酸化が Fag e 2 のペプシン消化性に及ぼす影響を検討するとともに、ソバアレルギーモデルマウスを用いて P-Fag e 2 の酵素消化物のアレルギー改善効果を検証した。*Pichia* 発現系により得た Fag e 2 をドライヒーティング法でリン酸化した。Fag e 2 のペプシン消化性を検討した結果、ペプシン消化性はリン酸化により向上することが示された。この結果より、経口摂取した P-Fag e 2 は酵素消化物として作用することが示唆された。そこで、Fag e 2 感作マウスにリン酸化 Fag e 2 のペプシン消化物 (DP-Fag e 2) を 6 週間摂取させたところ、アレルギー症状スコアの低下が認められた。また、血清中の IgE および IgG1 濃度が低下し、IgA 濃度が増加することが示された。以上の結果より、ソバ主要アレルゲン Fag e 2 のリン酸化はペプシン消化性を向上し、その酵素分解物は IgE を介した免疫反応を軽減させることが示唆された。

以上のように、本研究ではリン酸化ソバ主要アレルゲン Fag e 1 と Fag e 2 の抗原特異型免疫調節作用に関する詳細な研究が展開されており、リン酸化を用いた免疫寛容誘導の可能性に関する新たな知見を提示した。申請者を筆頭著者とした論文が 2 編あり、学位審査基準のめやす (博士課程を「単位取得後退学」の後 1 年以内に博士論文を提出した場合の特別の取扱い：筆頭著者である論文を 2 編以上) を満たしている。以上のことから、本論文は博士 (農学) 論文に値するものであるとの結論に達した。

(公表主要論文名)

- Ahmad M. Al Athamneh, Supatta Chawalitpong, Yuta Suzuki, Daiki Yamaguchi, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama, Preparation of an allergen-specific immunomodulator by phosphorylation of a major buckwheat globulin allergen, Fag e 1, with diminished IgE

response *via* Tfh cell activation, Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 26, 91-98

- Ahmad M. Al Athamneh, Yuta Suzuki, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama, Hydrolysate of highly digestible phosphorylated buckwheat major allergen Fag e 2 attenuates allergic reactions in Fag e 2-sensitized mice, Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, Vol.27(2), 67-75, 2020(Aug)