

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Cabanos Cerrone Salamat
論文題目	Molecular and Structural Analysis of Peanut Allergens and Development of a Peanut Variety Lacking Major Allergens by Heavy-ion Beam Irradiation （落花生アレルゲンの分子構造解析と重イオンビーム照射によるアレルゲン欠失系統の開発）		
（論文内容の要旨）			
落花生は食物アレルギーの主要な原因食品の一つである。落花生及びその加工食品の摂取により引き起こされるアレルギー症状は重篤であることが多く、しばしば生命の危険を伴う。そのため、落花生アレルギー患者に対する正確なアレルゲン診断、治療方法の確立及びアレルゲン除去食品の開発が望まれている。この目的を達成するためには、アレルゲンである落花生タンパク質のエピトープ構造を解明し、落花生アレルギー患者血清の他の植物種タンパク質に対する免疫交差性を明確にすることが重要である。以上の観点から、落花生の主要アレルゲンである7Sグロブリンの立体構造を解明し、立体構造データに基づいてエピトープをマッピングした。また、免疫交差性が高いとされるアレルゲンであるプロフィリンについて、アレルギー患者血清を用いて落花生と他の植物種タンパク質との交差反応性について解析した。また、従来大量発現系の開発が困難であったアレルゲンタンパク質オレオシンの発現系及び精製法の確立に成功した。さらに、アレルゲン欠失落花生品種の作出を目指し、落花生種子に対して重イオンビーム照射による変異誘発を行い、主要アレルゲン2種を欠失した系統を得ることに成功した。 第一章ではAra h 1の結晶構造解析と立体構造上へのエピトープマッピングをおこなった。落花生の主要なアレルゲンの一つである7Sグロブリン(Ara h 1)の大腸菌発現系を確立し、高純度組換えタンパク質を調製した。高純度組換えタンパク質を用いてX線構造解析に供しうる良質な結晶を得た。Spring-8大型放射光施設において回折データを取得し、Ara h 1のコア領域の立体構造の決定に成功した。Ara h 1コア領域の立体構造データを用いて立体構造形成により形成されるエピトープをプログラムDiscoTopeにより推定し、その大部分がランダムコイル構造領域に位置していることを明らかにした。さらに、ダイズ、アズキ、リュクトウの7Sグロブリンのコア領域の立体構造データを用いて、7Sグロブリンをアレルゲンとする患者血清の植物種間交差性に寄与すると推定される6か所のエピトープ領域を特定した。 第二章では、Ara h 5の交差反応性を、アレルゲン性とホモロジーモデルから確認した。Ara h 5は、落花生のプロフィリンであり、アレルゲンの1つである。Ara h 5は、種子や花粉に含まれ、本タンパク質に対する抗血清は幅広い免疫交差性を示す。このようなアレルゲンに対するアレルギー患者は、落花生以外の植物性食品に対してもアレルギー反応を起こす可能性があるため、正確な免疫交差性診断が必要とされる。患者血清のプロフィリンに対する免疫交差性を正確に解析する検出系を作製するために、組換えAra h 5を大腸菌発現系を用いて調製し、Birch及びThimothy grassのプロフィリン(Bet v 2及びPhl p 2)とともにプロテインアレイにより患者血清との反応性を解析した。その結果、Ara h 5に反応する患者血清を検出し、さらにBet v 2及			

びPhl p 2への免疫交差性を初めて確認した。また、Ara h 5の立体構造モデルを構築し、異種植物プロフィリン間の免疫交差性に寄与する可能性がある、共通性の高い3か所のエピトープ領域をマッピングした。

第三章では、組換え落花生オレオシンの発現系を確立した。落花生の3種類のオレオシン分子種(Ara h 10、Ara h 11、Ara h 18k)はアレルゲンであると報告されている。オレオシンは油脂貯蔵オルガネラであるオイルボディーの構成タンパク質であり、分子中央部に疎水性領域をもつため、大腸菌発現系での可溶性組換えタンパク質の作製は困難であった。本研究では、真核細胞である昆虫細胞を用いて組換えAra h 10、Ara h 11、Ara h 18kを大量に発現させ、抽出及び精製操作における界面活性剤使用等の条件を最適化することにより、大量かつ高純度の組換えタンパク質の発現及び精製に初めて成功した。組換えAra h 10、Ara h 11、Ara h 18kは、いずれも水溶性で天然型タンパク質と同様の立体構造を有していることが示差走査熱量測定により確認され、立体構造及びエピトープ解析への道が拓けた。

第四章では、重イオンビーム照射により、主要アレルゲンを欠失した落花生系統を開発した。重イオンビーム照射により突然変異を誘発させる育種法は、良質な形質を損なわずに短期間で変異系統を作出できる新規な方法として注目されている。そこで、落花生種子の発芽能力を損なわず高頻度に変異を導入しうる重イオンビーム照射条件を検討・確立し、落花生種子に対して炭素イオン及び窒素イオンビーム照射を行った。ビーム照射後の種子から得られた約12,000粒のM2種子のタンパク質組成分析により、主要アレルゲンタンパク質2Sアルブミン(Ara h 2)あるいは11Sグロブリン(Ara h 3)を欠失する20系統を選抜することに成功した。本研究により、重イオンビーム照射による変異導入法を利用した落花生のアレルゲン欠失系統の作出と、後代の交雑によるアレルゲン性低減化落花生品種作出の可能性を示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

落花生は食物アレルギーの主要な原因物質の一つである。そのため、落花生に対してアレルギーをもつ患者に対する正確なアレルゲンの診断や治療方法の確立が望まれている。また、アレルゲンを欠失した落花生を開発することは、患者がアレルゲンを摂取するリスクの軽減に繋がる。本論文では、主要な落花生アレルゲンの立体構造を明らかにするとともに、植物種間での交差反応性について立体構造をもとにした考察を行っている。また、重イオンビーム照射を用いてアレルゲンを欠失した落花生の開発を試み、有望な系統を見出している。評価される主な点は以下の通りである。

1. 主要なアレルゲンである落花生7Sグロブリン(Ara h 1)のコア領域の立体構造を明らかにした。
2. Ara h 1のコア領域及びダイズ、アズキ、リョクトウの7Sグロブリンのコア領域の立体構造データを用いて、高次構造により形成されるエピトープを推定し、その中に7Sグロブリン間の交差性に寄与し得る6か所の領域が存在していることを示した。
3. アレルゲンとされている落花生プロフィリン(Ara h 5)の大腸菌発現系を構築し、組換え型タンパク質を調製することに成功し、組換え型Ara h 5を用いたプロテインアレイにより、Ara h 5と反応性を示す患者の血清を見出すとともに、Birch h及びThimothy grassのプロフィリンとAra h 5との間に免疫交差性があることを示した。
4. 落花生オレオシンの3種類の分子種(Ara h 10、Ara h 11、Ara h 18k)について昆虫細胞発現系の構築及び精製法の確立に成功した。
5. 重イオンビーム照射により主要なアレルゲンであるAra h 2あるいはAra h 3を欠失した20系統の作出に成功した。

以上のように本論文は、落花生アレルギーのアレルゲン診断、治療法の確立及びアレルゲン除去食品の開発のための基盤となる知見を得ることを目的として、主要アレルゲンの立体構造からエピトープを同定するとともに、重イオンビーム照射によるアレルゲン欠失系統の作出に成功したものであり、品質設計開発学、品質評価学及び育種学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降