

氏 名	Thanakorn Weangsrinaval
学位(専攻分野)	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1583 号
学位授与の日付	平成 18 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科食品生物学専攻
学位論文題目	STUDIES ON THE IDENTIFICATION AND GASTROINTESTINAL ABSORPTION OF PLANT ORIGINATED ALLERGENS (植物由来アレルゲンの同定と腸管吸収に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 河 田 照 雄 教授 北 畠 直 文 教授 伏 木 亨

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では植物由来アレルゲンを精製・同定し、アレルゲンの腸管吸収のメカニズムを解明するとともに、食品成分や食品添加物などの共存によりその腸管吸収への影響および吸収抑制成分を探索することを目的とした。以下に、論文内容の概要を述べる。

1. 複数の食物アレルギー患者の血清を用いて13種類の植物性食品素材中の IgE 結合性タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、45 kDa 付近のタンパク質が患者血清の IgE 抗体によって強く認識された。そこでトマト45 kDa の IgE 結合タンパク質に注目し、カラムクロマトグラフィーで精製を行った。2次元電気泳動で解析した結果、トマトアレルゲンは、分子サイズ45,000、等電点4.2の糖タンパク質であることが分かった。その N-末端アミノ酸は検出されなかったが、リシルエンドペプチダーゼ消化物由来のペプチドのアミノ酸配列から、既報のトマトのコルク化に関連する酸性ペルオキシダーゼ (suberization-associated anionic peroxidase I) と同定し、ペルオキシダーゼ活性の存在も確認した。さらに、トマト45 kDa アレルゲンは、植物性食品素材由来のアレルゲンとして報告されている感染特異的タンパク質 (Pathogenesis-related protein)-9 に属することを明らかにした。

2. ダイズは重要なタンパク質供給源であり、醤油、味噌、納豆、豆腐をはじめとする様々な伝統的加工食品の原料となっている。また、脱脂ダイズより分離されたタンパク質 (Soybean protein isolate) は栄養価、加工特性に優れ、様々な加工食品へ添加されるかたちで使用されている。ダイズアレルゲンの中で最もアレルゲン性が高いタンパク質 Gly m Bd 30K のマウスにおける腸管吸収を検討した。まず、24日齢と10週齢の ddY マウスに絶食後ゾンデにて豆乳 (Gly m Bd 30K 1 mg を含む) を強制胃内投与し、一定時間ごとに120分まで採血した。サンドイッチ ELISA 法によりマウスの血漿中の Gly m Bd 30K 濃度を測定したところ、投与後60分から120分までにおいて10週齢のマウスより24日齢のマウスで高い値が認められた。このことより、24日週齢のマウスでは小腸の形態が未完成であるために Gly m Bd 30K が体内に吸収されやすい可能性が示唆された。Gly m Bd 30K (0, 500または2000 mg/kg) を24日齢のマウスに投与すると、血漿中の Gly m Bd 30K 濃度は投与後30分でピークとなり、腸管吸収は投与濃度依存的に変化することが示された。血漿のイムノブロットティングの結果、インタクト Gly m Bd 30K および20 kDa 付近のフラグメントが検出された。次に共存物によって Gly m Bd 30K の腸管吸収率がどのように影響を受けるかについて検討した。Gly m Bd 30K (2000 mg/kg) と同時にコーンオイル (5%, 30% v/v) をエマルジョン状態で投与すると Gly m Bd 30K の腸管吸収が促進され、約30分後に血球中の Gly m Bd 30K 濃度が一定値になった。さらに、シュガーエステル系の乳化剤 (3% w/v) を加えると血漿中の Gly m Bd 30K 濃度と血漿中に認められるインタクトおよび20 kDa 以下のフラグメントが増加した。以上の結果から、脂肪および乳化剤によって Gly m Bd 30K の安定性が高まり、体内に吸収促進されることが示唆された。

3. 内服用クロモグリク酸ナトリウム (SCG) は食物アレルギーによるアトピー性皮膚炎の治療薬として使われている経口抗アレルギー薬である。SCG の作用機序としては、抗原抗体反応に伴って起きる肥満細胞からヒスタミンやロイコト

リエン類の遊離抑制が知られている。しかし、腸管からのアレルゲンの吸収に与える影響については不明である。そこで24日齢のマウスにおいて検討したところ、血漿中の Gly m Bd 30K 濃度は SCG (10-1000 mg/kg) の濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。Gly m Bd 30K の腸管吸収のメカニズムと吸収抑制について詳細な検討を行うために、ヒト小腸上皮様細胞 Caco-2 細胞の腸管吸収モデルにおいて実験を行った。Caco-2 細胞を 12-well-Transwell で14日間単層培養し小腸上皮様細胞に分化させた後、管腔側に Gly m Bd 30K を添加し一定時間後、基底膜側への吸収量と細胞内への取り込み量を ELISA 法およびイムノブロットング法により定量した。 intact Gly m Bd 30K は濃度および時間依存的に基底膜側へ吸収され、細胞内に取り込まれたことから、Gly m Bd 30K は細胞内のエンドサイトーシスにより取り込まれることが示唆された。SCG (0-50 mM)で処理した Caco-2 細胞は基底膜側、細胞内ともに Gly m Bd 30K が濃度依存的に減少した。さらに免疫染色法により検討したところ、Gly m Bd 30K は Caco-2 細胞の膜周囲に存在することが示され、SCG 処理によって Gly m Bd 30K の細胞内への取り込み量の減少が確認された。以上のことより細胞内のエンドサイトーシスに注目し、検討を行った。 Dansylcadaverine (clathrin 依存性エンドサイトーシス阻害剤)、nystatin (caveolae 依存性エンドサイトーシス阻害剤) および methyl- β -cyclodextrin (clathrin と caveolae 依存性エンドサイトーシス阻害剤) によって Gly m Bd 30K の細胞内への取り込みと基底膜側への吸収が抑制された。このことから、Gly m Bd 30K は小腸上皮細胞において clathrin 依存性および caveolae 依存性エンドサイトーシスにより取り込まれ、体内に吸収されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

食物アレルギーは深刻な社会問題となっている。食物アレルギー患者の中には豆類、穀類、野菜、果実など様々な植物由来アレルゲンに対して反応することが報告されている。食物アレルギー患者が様々な食品を安全に摂取出来るためには食物アレルゲンの同定とその性質を解析することが必要である。食物アレルギーの発症には主に腸管での未消化アレルゲンタンパク質の吸収過程が必須であるので、この過程を抑制することにより、食物アレルギーの発症を抑制することが可能と考えられる。本論文は、植物由来アレルゲンを精製・同定し、アレルゲンの腸管吸収のメカニズムを解明するとともに、食品成分や食品添加物などの共存によりその腸管吸収への影響および吸収抑制成分の探索について検討を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 食物アレルギー患者血清を用いて食品素材中のアレルゲンをスクリーニングした。患者血清中の IgE 抗体が認識するトマトアレルゲンは、分子サイズ45,000、等電点4.2の糖タンパク質であった。本アレルゲンは既報のトマトのコルク化に関連する酸性ペルオキシダーゼ I と同定され、ペルオキシダーゼ活性が確認された。

2. マウスに経口投与したダイズアレルゲン Gly m Bd 30K の腸管吸収は若い週齢の方が高いことが分かった。若い週齢マウスにおいて Gly m Bd 30K は濃度依存的に吸収され、 intact およびフラグメントとして血中に存在していることが示された。さらに、脂肪および乳化剤によって Gly m Bd 30K の安定性が高まり、体内への吸収が促進されることが示唆された。

3. マウス消化管およびヒト小腸上皮様 Caco-2 細胞において Gly m Bd 30K の吸収は、クロモグリク酸ナトリウムにより濃度依存的に抑制されることが分かった。Gly m Bd 30K は腸管上皮細胞から clathrin および caveolae 依存性エンドサイトーシスで体内に吸収されることが示唆された。

以上のように本研究は、植物由来アレルゲンの同定と腸管吸収に関する多くの重要な知見を得たものであり、食品科学、栄養科学、および食品安全学に寄与するところが大きい。

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18年7月13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。