

氏名（本籍）	森 田 秀 行（岐阜県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲第 872 号
学位授与日付	平成 23 年 12 月 21 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	1)Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34 2)Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy
審査委員	（主査）教授 鈴木 康 之 （副査）教授 中 島 茂 教授 恵 良 聖 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

大豆は食品として幅広く利用されており、大豆アレルギーは重要な食物アレルギーのひとつである。大豆には 20 を超える allergen タンパク質が存在するが、その中でも P34 はアトピー性皮膚炎を持つ大豆感受性患者の 65%以上が反応を示し、大豆の主要な allergen として知られている。Recombinant allergen の精製およびその特性を捉えることは、診断方法の進歩や免疫療法への応用などに極めて重要な役割を果たす。今回、申請者らは、大腸菌による発現システムを用いて recombinant P34 (rP34) を発現精製し、その特性を明らかにした。さらに、健常者と大豆アレルギー患者の末梢血単核球 (PBMCs) を用いて rP34 に対する増殖反応を検討するとともに、rP34 ImmunoCAP System を作成し P34 特異的 IgE の解析を行った。

#### 【対象と方法】

- 1) rP34 の発現精製：大豆から mRNA を抽出したのち、cDNA の合成を行った。primer を設計して PCR にて増幅後、大腸菌 (JM109) へ形質転換した。発現ベクターである pET24b にインサートし、大腸菌 (BL21) による大量培養を行った。タンパク質を可溶化するため 8M Urea で変性溶解後、gradient dialysis 法にてタンパク質の refolding を行った。さらに高純度のタンパク質を得るため、Ni Sepharose column およびゲル濾過による精製を行った。
- 2) 精製タンパク質の解析：精製したタンパク質を SDS/PAGE で泳動した。さらに抗 P34 抗体を用いてイムノブロット解析を行った。また Edman 分解法を用いて N 末アミノ酸配列解析を行った。
- 3) Circular dichroism による解析：native P34 および 0%, 1%, 4% SDS 溶液に溶解した rP34 に対して、circular dichroism による二次構造解析を行った。
- 4) Dynamic light scattering による解析：0%, 1%, 4% SDS 溶液に溶解した rP34 に対して、dynamic light scattering による分子量解析を行った。
- 5) Endotoxin の除去：4% SDS 溶液に溶解してモノマー化した rP34 溶液を Detoxi-Gel に通して endotoxin の除去を行った。
- 6) LPS pull-down assay による結合解析：rP34 とビオチン化された LPS を用いて、LPS pull-down assay による rP34 と LPS の結合実験を行った。
- 7) リンパ球幼若化反応による T 細胞反応性の解析：endotoxin を除去した rP34 (endotoxin-free rP34) を抗原として、健常者 10 名および大豆アレルギー患者 8 名（寛解群 2 名、非寛解群 6 名）の PBMCs を用いてリンパ球幼若化反応を行った。
- 8) rP34 特異的 IgE の解析：rP34 ImmunoCAP System を作成し、健常者 13 名および大豆アレルギー患者 18 名（寛解群 9 名、非寛解群 9 名）の血清を用いて rP34 特異的 IgE の測定を行った。

## 【結果】

- 1) rP34 の発現精製：精製後に行った SDS/PAGE では 1 本のバンドが検出された。イムノブロットでは、このバンドは抗 P34 抗体と反応した。Edman 分解法を用いた N 末シーケンスでは 9 塩基のアミノ酸が P34 の配列と一致した。本精製法により高純度の rP34 を LB 培地 1 リットル当たり 11.6 mg の収量で得た。
- 2) rP34 の構造解析：Circular dichroism および Dynamic light scattering による解析から、98°C、10 分間の条件下で 4% SDS 溶液に溶解した rP34 はモノマー化され、かつ native P34 とほぼ同等の二次構造を保つことが示された。
- 3) Endotoxin 結合解析：LPS pull-down assay にて rP34 と endotoxin は親和性を示した。ポリマーを形成した rP34 を Detoxi-Gel に通すと rP34 自体が column に吸着されるが、モノマー化した rP34 では、endotoxin は 0.01 EU/ml まで除去された。
- 4) リンパ球幼若化反応による T 細胞反応性の解析：endotoxin が混入した rP34 に対して、健常者の PBMCs は非特異的な増殖反応を示した。一方、endotoxin-free rP34 に対して、健常者および寛解群 2 名の PBMCs は増殖反応を示さなかったが、大豆アレルギー患者 5 名の PBMCs は有意に増殖反応を示した。
- 5) rP34 特異的 IgE の解析：rP34 特異的 IgE と大豆特異的 IgE の間には正の相関関係が認められた。rP34 特異的 IgE は、健常者の血清では全員が陰性であった。一方、大豆アレルギー患者では寛解群 9 名中 3 名、非寛解群 9 名中 6 名が陽性であった。Class2 以上の患者は 5 名中 4 名が非寛解であった。中間値は寛解群 0.50 kUA/l, 非寛解群 1.63 kUA/l であった。

## 【考察】

近年 recombinant タンパク質は診断や治療のツールとして用いられつつある。Endotoxin はリンパ球を非特異的に増殖させるため、T 細胞反応性を正確に評価するためには endotoxin 除去が必要不可欠である。P34 は endotoxin との結合力が強いタンパク質であったが、高濃度の SDS を用いてモノマー化した後に endotoxin 除去カラムを通すことにより、endotoxin を除去することが可能となった。Endotoxin-free rP34 は大豆アレルギー患者の T 細胞反応性を評価するのに有用であった。また、rP34 特異的 IgE の解析では、大豆アレルギー非寛解群のほうが健常者や大豆アレルギー寛解群よりも特異的 IgE 値が高く、大豆アレルギー患者の B 細胞反応性の評価に有用であった。以上より、我々が精製した rP34 はその立体構造や免疫反応性を保っており、大豆アレルギーの診断や治療のツールとして有用であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 森田秀行は、大豆の主要アレルゲンである P34 の recombinant タンパク質に関し、独自の精製方法を確立するとともに、リンパ球幼若化反応や特異的 IgE の反応により大豆アレルギー患者の細胞反応性の評価が可能であることを示した。

この研究成果は小児病態学、特に小児免疫・アレルギー学の研究の進歩と発展に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

- 1) H. Morita, H. Kaneko, H. Ohnishi, Z. Kato and N. Kondo : Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy* 66, 985-986 (2011)
- 2) H. Morita, H. Kaneko, H. Ohnishi, Z. Kato, K. Kubota, T. Yamamoto, E. Matsui, T. Teramoto, T. Fukao, K. Kasahara and N. Kondo : Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. *International Journal of Molecular Medicine* 29, 153-158 (2012)