

氏名(本籍・生年月日) 田澤 茂

(長野県・昭和53年8月5日)

学位の種類 博士(農学)

学位記番号 甲 第64号

学位授与の日付 平成28年9月30日

学位授与の要件 信州大学学位規程 第5条第1項該当

学位論文題目

多糖修飾によるソバタンパク質の機能性の改善に関する研究

論文審査委員 主査 教授 中村 宗一郎 教授 藤井 博
教授 池田 正人 教授 濱野 光市
教授 小川 雅廣(香川大学)

論文内容の要旨

ソバはPolygonaceae科に属する双子葉植物であり、痩せた土壌においても生育出来るため世界で広く見られる。こういった特徴が食材としてのソバの重要性を高めおり、有用なタンパク質も多く含んでいる。動物実験により1,2-dimethylhydrazine (DMH)誘導結腸癌の予防効果を示すタンパク質成分や、抗がん作用のある新規タンパク質も同定されている。栄養面でもソバは優れたアミノ酸バランスを示し、特にメチオニン、リジンの含有量が高いことから健康食品として注目を集めている。上述のようにソバは抗がん作用や健康を増進、改善させるタンパク質を豊富に含むが同時に致命的なアレルギー反応を引き起こすタンパク質も含んでいる。これまでの研究から幾つかのタンパク質がソバアレルギー患者の抗体と強力に結合することが明らかとなっている。またあるタンパク質分画が同様の作用を持つことが明らかとなっている。これらの課題を解決する為にアレルゲンタンパク質をメイラード反応により糖鎖修飾することが応用されており、主要アレルゲンタンパク質を糖鎖修飾することで顕著なアレルゲン性の低下が認められている。この反応は栄養的に重要な有効性リジンを保存しながら起こる為、アレルゲン性の低減と栄養面での有効性を両立させることが可能である。これまでの研究ではある一つのアレルゲンタンパク質の糖鎖修飾を行っていたがソバには複数種のアレルゲンタンパク質が存在している。またデキストランは*Leuconostoc mesenteroides*により産生され代替血漿として使用され、多くの国で食品添加物として承認されておりその安全性が保証されている。先行研究でソバに含まれる全てのアレルゲンタンパク質の糖鎖修飾をデキストランで行った例は報告されていないため、本研究において複数の分子量のデキストラン(6、17.5、40、70及び200 kDa)を用いてソバ全タンパク

質と各分子量デキストラン複合体を作製し、それらのアレルゲン性の低下及び分子表面機能の改善について比較及び各解析を行った。その結果40 kDaデキストランとソバ全タンパク質との複合体において顕著な乳化性及び溶解性の改善が認められ、また抗原性の低下が併せて認められた。

ソバアレルギーはIgE抗体を介した即時型アレルギー反応を引き起こす。本アレルギーの分子及び細胞レベルでのメカニズムは1) 抗原提示細胞による抗原タンパク質の貪食・分解及びnaive T細胞への抗原提示。2) サイトカインによるnaive T細胞から2型ヘルパーT細胞 (Th2) への分化。3) Th2から産生されたインターロイキン-4 (IL-4) による抗体産生細胞 (B細胞) の活性化。4) B細胞から形質細胞への成熟とIgE抗体の産生。5) IgE抗体によるソバアレルギータンパク質抗原の認識。6) IgE抗体を介した過剰アレルギー反応発現となる。これらの内、アレルギー誘導初期段階である1) 抗原提示細胞によるnaive T細胞への抗原提示における変化及び3) IgE抗体産生に関わるTh2及びB細胞、形質細胞を活性化させるIL-4並びにTh1からのサイトカイン産生を抑制するIL-10分泌への影響をマウス脾臓細胞を用いて検証した。またTh2分化と拮抗するTh1細胞分化を誘導するIFN- γ についても併せて解析をおこなった。

マウス脾臓を培養し培地にソバ全タンパク質 (WBP) 及びソバ全タンパク質-デキストラン (40 kDa) 複合体 (WBP-DX40) を添加し4日間培養後、フローサイトメーターにより樹状細胞を分取し抗原提示能の目安となる主要組織適合抗原複合体2 (MHC class II) 分子及び補助刺激分子 (CD86) の両分子を発現している細胞数を定量した。その結果、WBP-DX40添加群では両分子を発現している細胞が減少していた。WBP添加群では対照群と同程度であった。次にIL-4、IL-10及びIFN- γ 産生レベルをEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)法により定量したところ、WBP添加群は対照群と比較しIL-4及びIL-10分泌量の増加が認められた。WBP-DX40添加群に顕著な変化は認められなかった。またIFN- γ 分泌量については何れの添加群も変化は認められなかった。

以上の結果からWBP添加群ではTh2への分化並びにIL-4及びIL-10分泌の亢進が起こっていることが示され、WBP-DX40添加群ではこれらの反応は抑制されていたことから糖鎖修飾法が低アレルゲン化ソバの作製において有用な手法であることが示唆された。