

氏 名	ASADUZZAMAN MD		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	学 術		
学位授与番号	博甲第	6 2 7 2	号
学位授与の日付	2 0 2 0 年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	Purification and molecular characterization of a new isoform of Ara h1, a major peanut allergen (主要ピーナツアレルギー Ara h1 の新規アイソフォームの精製と分子キャラクタリゼーション)		
論文審査委員	教授 田村 隆	教授 村田 芳行	准教授 前田 恵
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>Peanut allergies are one of the most common food allergies, and many allergenic proteins referred to as Ara h1-Ara h17 have been identified from peanut seeds. The most predominant allergens are Ara h1 and Ara h2 to which the sera of 70–90% of the patients with peanut allergy respond. Ara h1, which belongs to the vicilin family of legume seed storage proteins (7S globulin), consists of three identical N-glycosylated subunits (63 kDa) and accounts for 12–16% of the total peanut proteins. The molecular characterization of Ara h1 has nearly been completed, and two isoforms (P17 and P41B) have been identified and characterized. From a view point of the allergenicity of Ara h1, it has been believed that the N-terminal domain and hydrophobic region on the trimer of Ara h1 are involved in its allergenicity; therefore, if a variant molecule of Ara h1 lacking the N-terminal domain of the mature molecule (63–66 kDa) is available, it must provide important molecular information regarding allergenicity. However, a truncated Ara h1 molecule lacking the N-terminal domain, which contains the putative pathological epitope, has not been prepared or purified thus far. Under the background, during the purification of Ara h1 using conventional procedures, I found and purified a new variant molecule of Ara h1 lacking the N-terminal domain (~7 kDa) of the mature Ara h1 molecule (63 kDa Ara h1). In this thesis, therefore, I describe the purification and molecular characterization, and allergenicity of the new variant Ara h1 (54 kDa Ara h1).</p> <p>In Chapter 2, I purified and characterized a new variant molecule of Ara h1 with a molecular mass of 54 kDa by a combination of ion-exchange chromatography, gel-filtration, and hydrophobic interaction chromatography. The 54 kDa Ara h1 was purified in the run-through fraction of the hydrophobic chromatography indicating the hydrophilic nature, while the 63 kDa Ara h1 bound to the hydrophobic resins. The N-terminal amino acid sequence of the 54 kDa Ara h1 was EGREGEQ-, indicating that the N-terminal domain of 63 kDa Ara h1 had been removed. When I analyzed the oligomeric structure of both Ara h1 molecules (54 kDa and 63 kDa) in the native state by a gel-filtration, I found that 63 kDa Ara h1 occurs as higher order oligomeric conformations ( undecameric, dodecameric, or nonameric conformations) in addition to homotrimers, while 54 kDa Ara h1 occurs exclusively as a homotrimer, indicating that the N-terminal domain of the 63 kDa molecule may be involved in higher order oligomerization.</p> <p>In Chapter 3, to determine the immunological significance of the N-terminal domain in the 63 kDa Ara h1 subunit, I compared the allergenicities of the 54 kDa and 63 kDa Ara h1 subunits by immunoblotting analysis using antisera from nine patients with peanut allergy after SDS-PAGE. The analysis showed that the IgEs in sera of all nine patients strongly reacted to both subunits of Ara h1, indicating that the deletion of the 63 kDa molecule N-terminal domain exerts an insignificant effect on allergenicity. These results indicate that the relevant epitopes for IgEs against the Ara h1 molecules occur on several portions of both subunits in addition to the N-terminal domain of the 63 kDa subunit.</p> <p>In Chapter 4, although it has already been reported that the both <math>\beta</math>-xylosylated immunogenic type and typical high-mannose type <i>N</i>-glycans are linked to the 63 kDa Ara h1 molecule at Asn (516 for P17, 521 for P41B), we analyzed the structures of <i>N</i>-glycans of the 54 kDa subunit to determine whether the deletion of the <i>N</i>-terminal domain affects <i>N</i>-glycan processing. The structural analyses demonstrated that both Ara h1 molecules carry the <math>\beta</math>-xylosylated immunogenic type (Man4Xyl1GlcANc2, Man3Xyl1GlcNAc2) and typical high-mannose type <i>N</i>-glycans (Man6GlcNAc2, Man5GlcNAc2, and Man4GlcNAc2) at almost equal proportion, indicating that the cleavage of the N-terminal domain had an insignificant effect on <i>N</i>-glycan processing in the Golgi apparatus.</p>			

## 論文審査結果の要旨

Ara h1 (63 kDa) は、過去 20 数年間に、アレルゲン同定、遺伝子解析、クローニング、タンパク質構造解析、エピトープ解析、糖鎖構造解析が既に行われてきている。特に、N-末端ドメインが Ara h1 の 4 次構造形成に重要な寄与をなしていること、この N-末端ドメインに存在するエピトープがアレルギー発症に重要であるとの推論がなされているが、N-末端ドメインを欠損した分子種による N-末端ドメインの機能解析は行われていなかった。

2 章では、Ara h1 の精製を行う過程で、N-末端ドメイン (65 アミノ酸残基) を欠損した variant Ara h1 (54 kDa) を見だし、疎水クロマトグラフィーを利用することで精製に成功している。次いで、N-末端ドメインが Ara h1 分子の多量体構造形成に及ぼす影響をゲル濾過で解析し、63 kDa Ara h1 が 10 量体を主とする多量体構造を形成するのに対して、54 kDa Ara h1 は 3 量体のみを形成することが明らかになり、N-末端ドメインが多量体構造形成と分子の疎水性に大きく関与することを明らかにした。

3 章では、ピーナツアレルギー患者 (9 名) の血清を用いて、63 kDa Ara h1 と 54 kDa Ara h1 のアレルゲン性の比較解析を行っている。その結果、いずれのアレルギー患者血清中の IgE も 63 kDa Ara h1 および 54 kDa Ara h1 に対して強い結合性を示した。この結果は、N-末端ドメイン以外にも、Ara h1 上にはいくつかの IgE エピトープが分布していることを示すものであった。その一方で、数人の健常人血清中にも Ara h1 に対する IgE が存在することが分かったが、興味深いことに、それらの IgE はいずれも 54 kDa Ara h1 に交差するものであり、63 kDa Ara h1 に交差する IgE は殆ど見られなかった。このことは、アレルギー発症には N-末端ドメインを認識する IgE が重要な役割を担う可能性を示すものであった。

4 章では、54 kDa および 63 kDa Ara h1 に結合する N-グリカン構造解析を行っている。63 kDa Ara h1 に結合する糖鎖構造は既に報告されているが、N-末端ドメインの糖鎖プロセッシングへの影響を調べる目的で 2 種 Ara h1 に結合する N-グリカン構造の構造比較を行っている。その結果、63 kDa Ara h1 と 54 kDa Ara h1 に結合する N-グリカンの構造特性はほぼ同一であることが分かり、N-末端ドメインは糖鎖プロセッシングには影響を与えないことが明らかとなった。

以上、著名なピーナツアレルゲンである Ara h1 について、N-末端ドメインの高次構造形成に関わる機能とアレルゲン性に関わる免疫化学的機能、N-グリカンプロセッシングへの関与への有無を明らかにした本論文は、博士論文として相応しい学問的意義及び価値を有するものと判定した。