

〔綜 説〕

アレルギーの構造とアレルギー反応

アサヒビール(株)基盤研究所

奥村 康

Key words: allergen — epitope — tertiary structure

はじめに

述べることにしたい。

アレルギーは、ハウスダストに代表される通年性、スギ花粉の様な季節性、および卵白アルブミンの様な食物性に大別される¹⁾。アレルギーは、これまで多くの物質の集合体として扱われ本質が何か不明であった。1980年代になって多くの研究者の努力によりいくつものアレルギーが単離され物質として同定された。今日では、ほとんどのアレルギー遺伝子が単離されその塩基配列並びにアミノ酸一次配列が明らかにされている^{2)~8)}。判明した各アレルギーのアミノ酸配列を比較し共通な部分構造があるのではないかと期待されたが共通配列は見いだされなかった。アレルギーとして作用する部位、すなわち IgE 抗体が認識し結合する部位は、連続したアミノ酸配列ではなく立体構造の一部と考えられる。アレルギーを真に理解するためにはその立体構造の解明が必要となっている。

本稿では、ダニ主要アレルギー Derf2 を例として IgE 抗体の結合部位が Derf2 の立体構造上のどこに位置するか解析した結果を概説すると共に得られた知見から何が治療現場へフィードバックできるかについて

1. 遺伝子の単離と組換え体の作製

タンパク質の立体構造を解析するには X 線結晶解析か高分解能 NMR を用いなければならない。いずれの方法を用いるにしても大量の純度の高いタンパク質が必要である。アレルギーの場合、その含有量の少なさおよび共存する不純物の多さ故に天然から大量にかつ純度の高い標品を調製することは難しい。この問題を解決するには大量にタンパク質を調製できる遺伝子組換え技術が適している。本法は優れた方法であるが、満たさなければならない条件がある。それは、アミノ酸一次配列はもちろん分子内ジスルフィド結合位置、立体構造さらにはアレルギー活性が天然由来のアレルギーと全く同一のタンパク質として調製しなければならない。

Derf2 の場合、筆者らのグループによって大腸菌を用いる製造法が既に確立している⁹⁾。Derf2 は、分子内に 3 カ所のジスルフィド結合を持っているが (図 1)¹⁰⁾、組換え Derf2 でもその位置は保持されている。また、ダニアレルギー患者 IgE 抗体に対する結合性

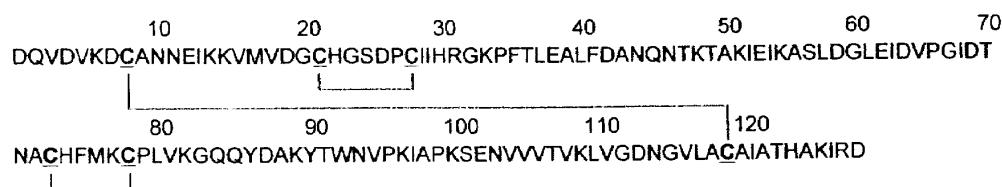


図 1. ダニアレルギー Derf2 の分子内ジスルフィド結合位置。

線で結んだシステイン残基間でジスルフィド結合している。アミノ酸は全て 1 文字表示した。

RELATIONSHIP OF ALLERGEN STRUCTURE
AND ALLERGIC REACTION

Yasushi Okumura

Bioscience Research & Development Laboratory
Asahi Breweries, Ltd.

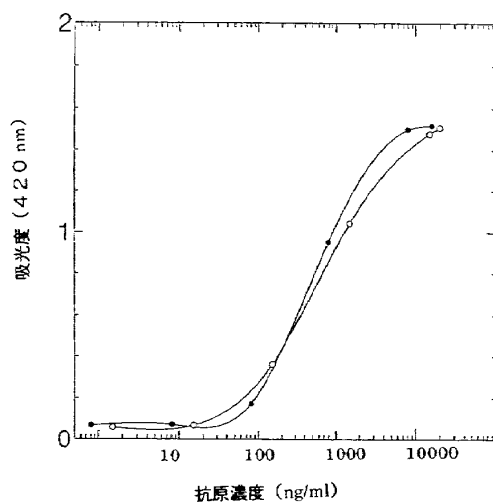


図2. ダニ虫体由来 Derf2 と組換え Derf2 との IgE 抗体結合活性の比較.

○: ダニ虫体由来 Derf2, ●: 組換え Derf2.

は、図2に示すようにダニ虫体から精製した Derf2 と同じであった。これらのことから、大腸菌を用いて作製した Derf2 はダニ虫体から精製した Derf2 と立体構造も含めて同等であることが明らかである。

次に、筆者らは Derf2 遺伝子に部位特異的変異を導入して種々の改変体を作製しどのアミノ酸残基が IgE 抗体結合部位かを検索した。その結果、IgE 抗体の結合する部位は分子内でジスルフィド結合している領域と考えられた。結果を図3に示す¹¹⁾。次にこの IgE 結合領域がダニアレルゲン Derf2 の立体構造の上でどの様に分布しているかを検討することとした。

2. Derf2 の立体構造解析と IgE 抗体結合部位

立体構造解析の手法は、X 線結晶解析または高分解能 NMR に限られる。筆者らは、東京都立臨床医学総合研究所生理活性部門(稲垣冬彦先生)と共同で NMR

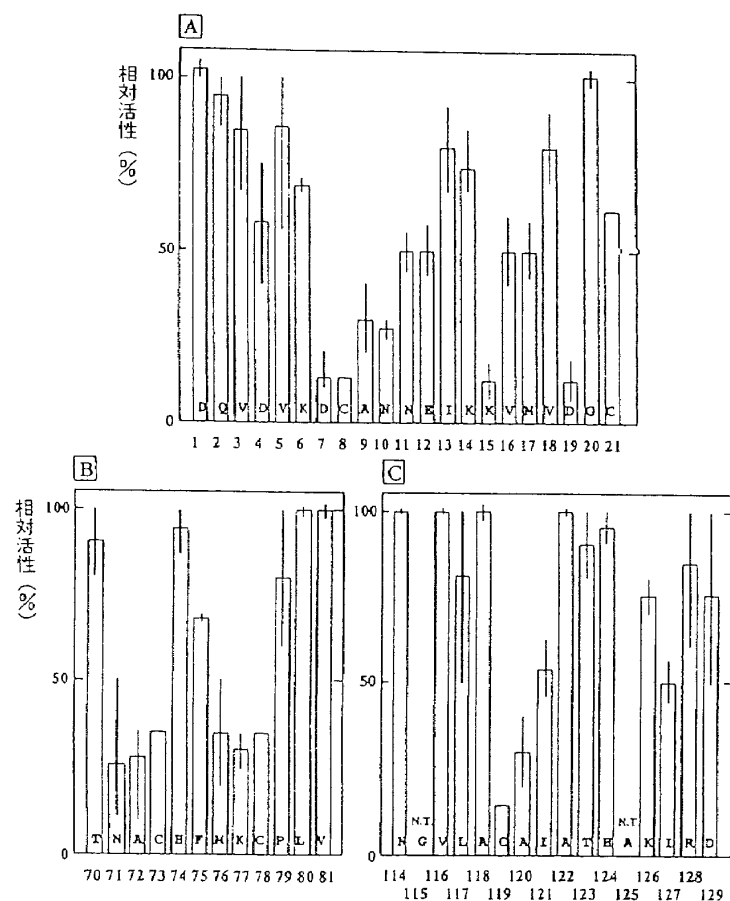


図3. Derf のアミノ酸置換体のヒト IgE に対する結合活性.

活性は、野性型に対する相対値で示した。アミノ酸置換の位置: [A]は N 末端1~21番目を、[B]は70~81番目を示す。[C]は、114~129番目の相対活性を示す。アラニン残基に変更したが、元がアラニンである位置の置換はロイシンを用い、システインはセリンに置換した。N.T.は試験していないことを示す。元のアミノ酸はカラム内に示した。(文献11より引用)

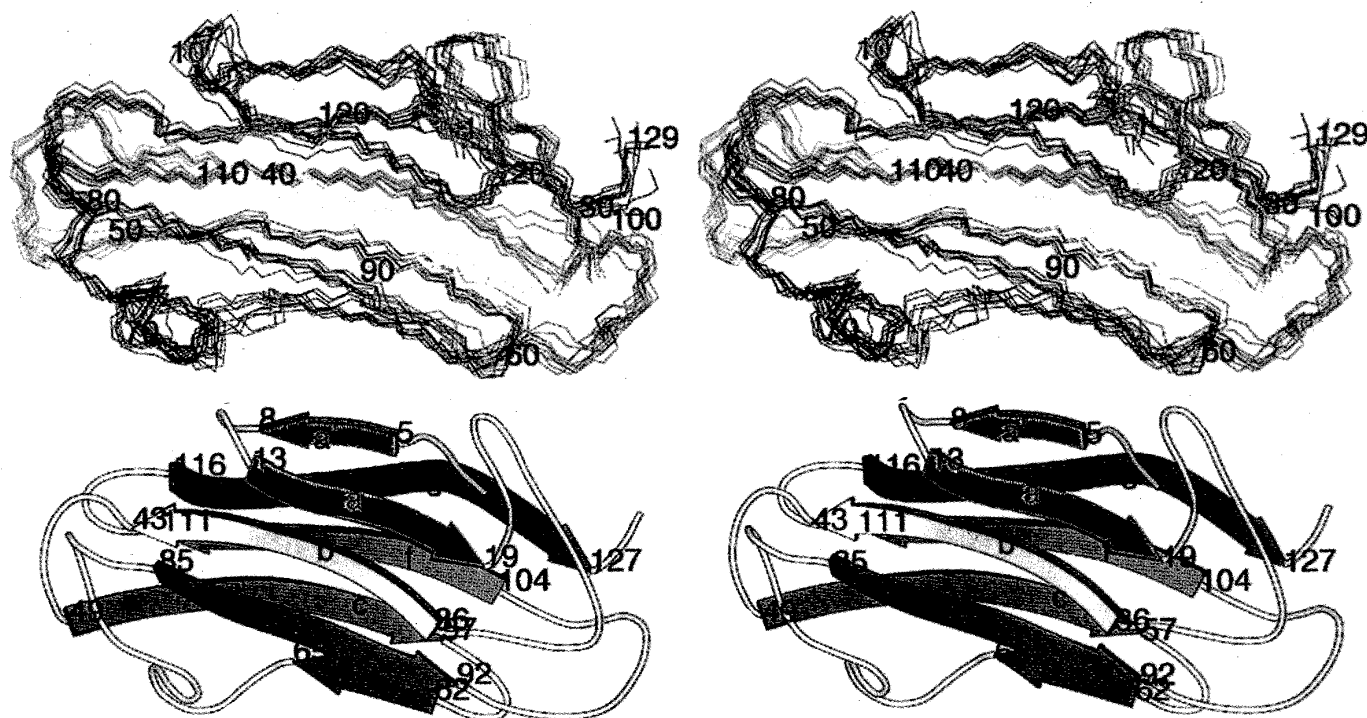


図4. Derf2の立体構造。(文献12より引用)

による解析を試みた。

まず、完全合成培地に ^{13}C -グルコースおよび ^{15}N -塩化アンモニウムを炭素源、窒素源として加え Derf2を発現する大腸菌を培養し Derf2を ^{13}C および ^{15}N で二重標識した。種々のクロマトグラフィーにより高純度の二重標識 Derf2を調製し600MHzのNMRで解析した。結果得られた立体構造を図4に示す¹²⁾。先に述べたIgE抗体結合部位を明らかになったDerf2立体構造上にマッピングした結果を図5に示す。この結果から、Derf2のIgE抗体結合部位は少なくとも2カ所ありそれぞれが互いに干渉しない位置関係にあることが明らかとなった。

3. 今後の展開について

これまで示してきたように、多くのアレルゲン遺伝子が単離されエピトープ解析が進んでいる。得られた結果を治療現場へフィードバックすることが今後の課題であろう。可能性の一つとして合成ペプチド、組換えアレルゲン等を用いた抗原特異的免疫療法があげられる。本法は、完治する可能性のある治療法として近年再評価されている。

筆者らは、ダニアレルゲン Derf2のエピトープ解析の過程でシステインをセリンに置換した置換体を得た。本置換体はIgEとの結合性が大きく低下している

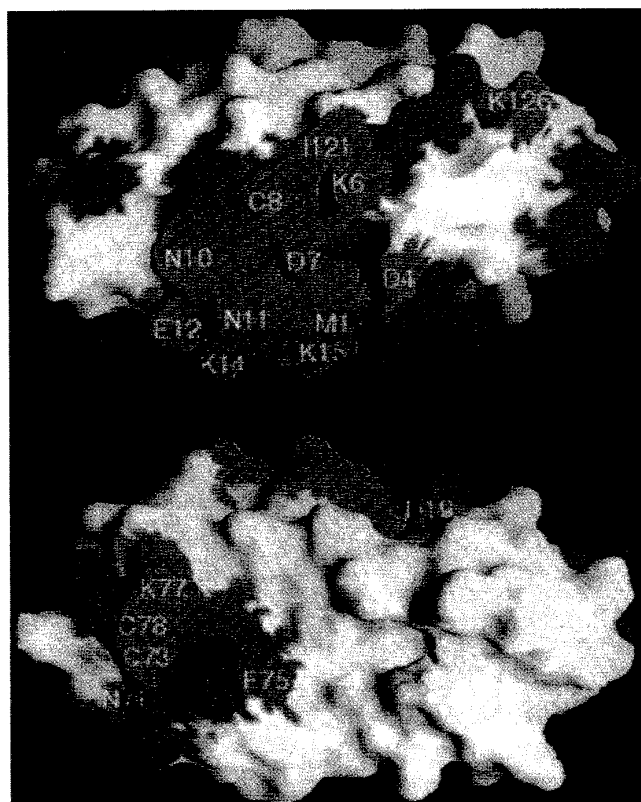


図5. IgE エピトープの Derf2 上へのマッピング。
赤で示した部位は、アミノ酸置換によって IgE 結合能が低下した部位。青で示した部位は、アミノ酸置換で結合活性に影響しなかった部位。それぞれ表と裏から見た位置である。(文献12より引用)

一方、T細胞には認識されるという免疫療法剤の候補として好ましい性質を持っていることが明らかとなり、ダニアレルギー動物モデルを作成して置換体の免疫療法剤としての可能性を検討した。その結果、筆者らが得た置換体は有効であることが示された¹³⁾。マウス、モルモット、最近では霊長類を用いた試験においても良い成績を収めており将来のダニアレルギー免疫療法剤として十分に期待できるものである。

4. 終わりに

本稿では、筆者らが行ってきたダニアレルゲン Derf2を中心にアレルゲンの構造とアレルゲン性について概観した。遺伝子がクローニングされ遺伝子組換え技術によって天然由来のアレルゲンと同等の純粋なダニアレルゲンが大量に得られるようになったことによって、これまで不可能と思われた多くの試験が実施できることになった。特に、立体構造が明らかになったことは大きな意味を持つ。今後は、明らかになった情報を医療現場へ早く適切にフィードバックすることが大きな課題である。本分野の研究が大きく進展しダニアレルギーをはじめとする種々のアレルギー疾患が完治することを期待したい。

文 献

- 1) 奥村 康, 奥平博一, 伊藤幸治: 主要アレルゲンのエピトープ。『最新内科学大系プログレス4, 免疫・アレルギー疾患』, pp. 217-223, 1997.
- 2) Chua, K.Y., Stewart, G.A. and Thomas, W.R.: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen *Der p* I. Homology with cysteine protease. *J. Exp. Med.* 167, 175-182, 1988.
- 3) Dilworth, R.J., Chua, K.Y. and Thomas, W.R.: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der f* I. *Clin. Exp. Allergy* 21, 25-32, 1991.
- 4) Yuuki, T., Okumura, Y., Ando, T., et al.: Cloning and sequencing of cDNA corresponding

- to mite major allergen *Der f* II. *Jpn. J. Allergology* 39, 557-561, 1990.
- 5) Chua, K.Y., Doyle, C.R., Simpson, R.J., et al.: Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p* II by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91, 118-123, 1990.
- 6) Nishiyama, C., Yasuhara, T., Yuuki, T., et al.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA encoding house dust mite allergen *Der f* 3, serine protease from *Dermatophagoides farinae*. *FEBS Lett.* 377, 62-66, 1995.
- 7) Morgenstern, J.P., Griffith, I.J., Brauer, A.W., et al.: Amino acid sequence of *Fel d* I, the major allergen of the domestic cat: Protein sequence analysis and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9690-9694, 1991.
- 8) Breitender, H., Pettenburger, K., Bito, A., et al.: The gene coding of the major birch pollen allergen *Bet v* I, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8, 1935-1938, 1989.
- 9) Iwamoto, N., Nishiyama, C., Yasuhara, T., et al.: Direct expression of *Der f* 2, major house dust mite allergen, in *Escherichia coli*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109, 356-361, 1996.
- 10) Nishiyama, C., Yuuki, T., Takai, T., et al.: Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, *Der f* II. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101, 159-166, 1993.
- 11) Nishiyama, C., Fukada, M. and Usui, Y., et al.: Analysis of the IgE epitope of *Der f* 2, a major mite allergen, by *in vitro* mutagenesis. *Mol. Immunol.* 32, 1021-1029, 1995.
- 12) Ichikawa, S., Hatanaka, H. and Yuuki, T., et al.: Solution structure of *Der f* 2, the major mite allergen for atopic diseases. *J. Biol. Chem.* 273, 356-360, 1998.
- 13) Yasue, M., Yokota, T. and Fukada, M., et al.: Hyposensitization to allergic reaction in r*Der f* 2-sensitized mice by the intranasal administration of a mutant of r*Der f* 2, C8/119S. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)