

〔綜 説〕

ダニ抗原の分子生物学的解析

東京大学医学部物療内科

奥平博一

Key words : allergenicity — epitope — gene recombination

1. ヒョウヒダニ

1964年オランダの Voorhorst らは室内塵 (house dust)の中に数多くのダニを発見し、これがアレルギーとして重要なのではないかと提唱した¹⁾。引き続いて1967年に彼らはダニ発生の季節消長と喘息発症の頻度がよく合致することを見いだした²⁾。1968年日本でも宮本がコナヒョウヒダニを用い、気管支喘息について研究を行い、室内塵抽出抗原とダニ抗原の皮内反応成績に高い相関があることを報告した³⁾。これらに引き続いて同様の成績が、イギリス、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、ポーランド、北欧、タイなどから続出した。これらのダニはヒョウヒダニ属 *Dermatophagoides* のダニである。肉眼では見えるか見えないか程度(0.3~0.4mm)の小さいダニで、公団住宅に大量発生して入居者を悩ませたりするケナガコナダニやイエダニなどとはまた別のものである。

ヒョウヒダニは寝具、カーペット、ソファなどの家具に生息し、ヒトのフケを常食とし、ヒトの生活に依存している。わが国では生活様式、気候などが、ダニの繁殖に適しており、アメリカ、ヨーロッパより家中のダニ数は、かなり多いと考えられている。

ヒョウヒダニの名は室内塵中に存在する人の皮膚・表皮を主要な食物とするとの考えから命名されたものである。ヒョウヒダニはアレルギーにはなるが、口の構造上、人を咬むことはない。

ダニのアレルギーとしての役割については気管支喘息のみならず、鼻アレルギーについても報告されている。日本では佐々木らが、コナヒョウヒダニと室内塵の抗原を用いて鼻アレルギー患者の反応性を調べ、室内塵に対して皮内反応陽性の者はすべてダニに対して陽性であったと報告している。またアトピー性皮膚炎の患者の生活環境中のダニの、病因としての重要性についての報告も出されている。1970年 Alani の報告によると、アトピー性皮膚炎患者の寝具など生活環境に

殺虫剤を用いてダニを駆除すると、一部に皮膚症状の改善をみるという⁴⁾。

2. アレルギー分析

1970年佐々木らは、それまでのダニ類の実験室内培養の経験に基づいてコナヒョウヒダニの培養を試み、動物飼料粉末に15%の水分を含ませたものが一番成績良く培養できることを報告した⁵⁾。この培養液に飽和量の食塩を加えると生ダニが浮き上がり、純粹に取り出すことが可能である。以後ダニアレルギーの精製が試みられたが、非常に困難であり「ダニアレルギーの精製は不可能だ」と考える研究も増加してきた。しかし、1980年、アメリカの Platts-Mills らのグループにより group I アレルギー (*Der p I*) が⁶⁾、そして1985年には group II アレルギー (*Der f II*) が⁷⁾著者らのグループにより発見された。group II アレルギーは主としてダニ虫体から抽出されるが、group I アレルギーはダニの糞中に多く存在する。最近、著者らは *Der f I* アレルギーが一種の蛋白質分解酵素であることを確定し(後述)、おそらくダニ腸管の消化酵素の一種であろうと推定している。

1983年筆者らは、radioimmuno-electrophoresis (RIEP)を用い、アトピー性疾患患者の IgE 抗体と反応するダニアレルギーが、多様であることをみいだした⁸⁾。1985年には、ダニアレルギーが少なくとも4種類以上存在することを確認し、Me1, Me2, Me3, Me4と命名した⁷⁾。その中での major allergen は Me1であり、second major allergen は Me2であった。Me1, Me2, 1986年の WHO の勧告によりそれぞれ *Der f II*, *Der f I* と呼ばれている⁹⁾。

3. 組み換え DNA 技術

1970年代初頭までは、DNA は生化学者にとって細胞内の化合物中で最も分析しにくい物質であった。非常に長い間、化学的には単純な物質のヌクレオチド配列は、間接的な方法でしか知りえなかった。しかし、今日では状況は一変した。DNA は最も分析の難しい巨大分子から、最も容易なものになったのである。今や DNA の特定の領域を切り出すこと、大量に調整すること、ヌクレオチド配列を 1 日に数百ヌクレオチドという速さで決めることができるようになっている。

組み換え DNA 技術 (recombinant DNA technology) は、真核生物の遺伝子発現を抑制する複雑な機構を理解する方法として有用なだけでなく、タンパク質のアミノ酸配列を決める効率的な方法を提供することにもなった。更に、現在では多大な労力と費用のかかるホルモンやワクチンの生産を、容易にしかも安価にする可能性もうかがわせている。

1) group I (*Der f I*) アレルゲン

最近、急速に進歩した分子生物学の成果がダニアレルゲンの研究にも導入されつつある。1988年オーストラリアの Chua らは *Der p I* の DNA 塩基配列を決定し、recombinant *Der p I* を作製した¹⁰⁾。しかし、この r*Der p I* はヒトの抗ダニ IgE 抗体との反応性を欠如していた。その原因として r*Der p I* が糖鎖を欠如していること、水への溶解性が悪いことなどが考えられているが、詳細は不明である。

Chua らは同時に *Der p I* の cDNA 塩基配列は種々の cystein protease と約 20% の homology があることを指摘した。これに基づき筆者らはコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) の抽出液中のタンパク質分解酵素の精製と characterization を行った。その結果、ダニ抽出液中の cystein protease 活性は *Der f I* の存在する画分と一致することが判明した。更に、ダニ抽出液中の cystein protease 活性は *Der f I* とは HPLC の retention time が完全に一致することが認められた。また、cystein protease のアミノ酸構成は *Der f I* のアミノ酸構成に非常に類似していることが確認され、また cystein protease と *Der f I* の N 末端のアミノ酸配列は完全に一致するという結果を得た。double immunodiffusion assay で検討したところ、この cystein protease は抗 *Der f I* 過免疫抗血清 (ラビット) と 1 本の沈降線を生じ、その沈降線は *Der f I* と抗 *Der f I* の反応で生じた沈降線と完全に fuse し

た。以上により、*Dep f I* とダニ抽出液中の cystein protease は同一の分子であることが証明された¹¹⁾。初期には、*Der f I* の検出に enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) を用いており、2 日ほどの時間が必要であった。しかし、*Der f I* が cystein protease であることが確定した後は、*Der f I* の検出に cystein protease 活性が指標とされるようになり、15~30 分の簡単な操作で、assay が完了するようになった。これにより、*Der f I* の精製法が格段に進歩し、現在ではわずか 2 step で大量の精製 *Der f I* が得られるようになった。

Der f I アレルゲンは、ダニ虫体から精製した標品中に糖が検出されており、事実その配列中には N-グリコシル化される配列 (Asn-X-Ser/Thr) が存在している。どのような糖鎖が結合しているかは今のところ明らかになっていない。成熟型 *Der f I* は 222 アミノ酸残基から構成されている (*Der p I* では 223 残基)。本アレルゲンは虫体中でプレプロ配列を持った形で発現されプレ配列、プロ配列がはずれて成熟型になるものと推定されている。*Der f I* 遺伝子が分離されたことから、遺伝子組み換え技術によって大量調整が試みられている。筆者らの研究室で大腸菌を用いた生産を試みている。これまでのところダニアレルギー患者血清 IgE と結合活性を持つ標品は得られていないが、患者末梢血から分離した T 細胞とは応答性を示す。一方、真核生物を用いた発現系から得られた *Der f I* は IgE との結合活性を持っており、糖鎖が IgE 結合活性に必須であるのかあるいは蛋白のフォールディングが大きく関与しているのか興味を持たれるところである。

2) group II (*Der f II*) アレルゲン

1990年、筆者らは DNA 組み換え技術を用いて、*Der f II* の cDNA の全塩基配列を決定し、recombinant *Der f II* を作製することに成功した¹¹⁾。以下、その方法の概略を示す。

まず、コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) の虫体から、全 RNA を抽出後、poly(A)⁺RNA を精製し、常法に従って cDNA ライブラリーを構築した (Fig. 1)。抗 *Der f II* 抗体 (ラビット) によるコロニーイムノアッセイでスクリーニングの結果、3 個の陽性クローンが得られたので、それぞれの cDNA の塩基列を決定した (Fig. 2, 3)。その結果、*Der f II* は 129 アミノ酸から成るタンパク質で、その分子量は約 14000 であることが判明した (Fig. 4)。

クローニングした *Der f II* 遺伝子は大腸菌中で β -

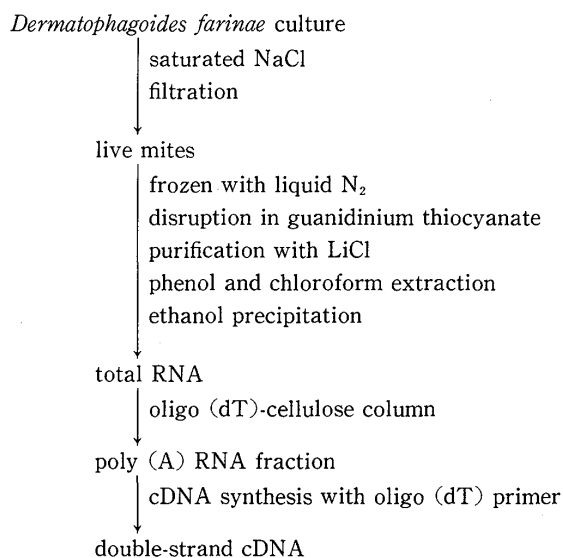


Fig. 1. Construction of cDNA library.

ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として大量に発現している。この融合タンパク質を抽出、精製し、アレルギー活性について検討した。この *rDer f II* は、Western blotting でアトピー患者血清中の抗ダニ IgE 抗体と反応し、ダニアレルギー患者で皮膚反応を惹起する

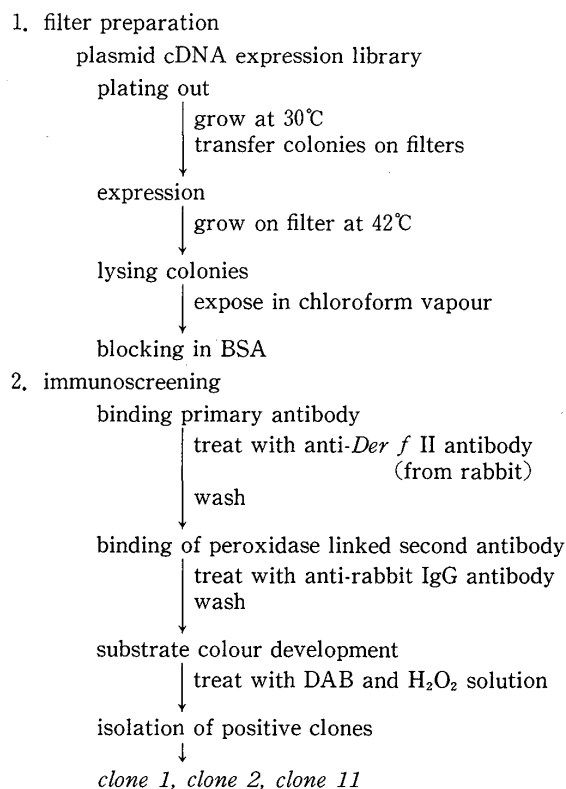
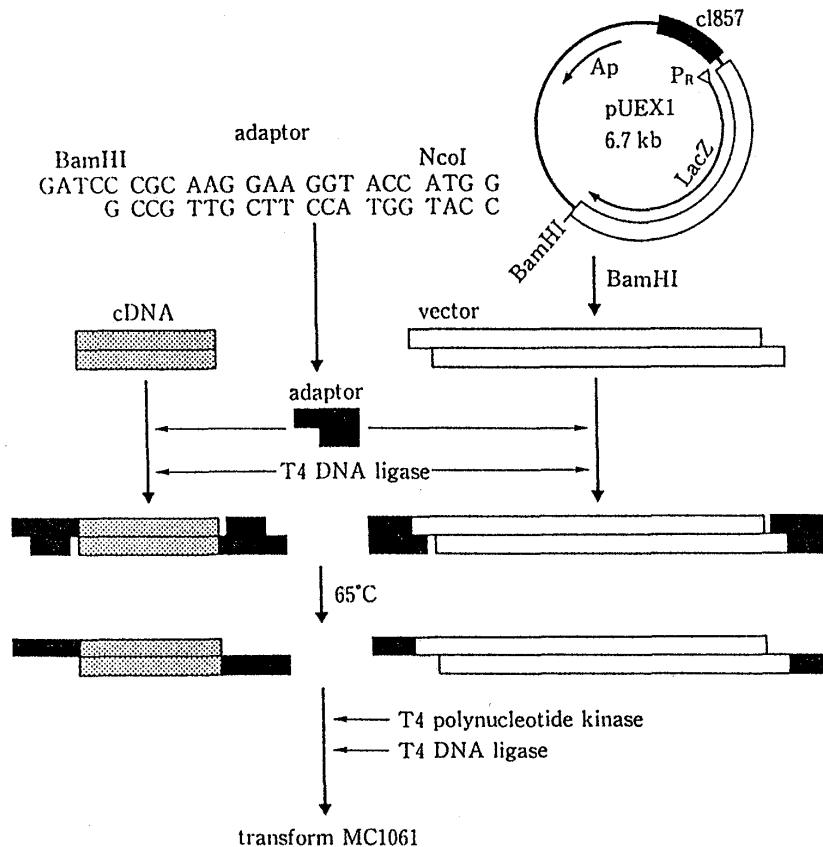
Fig. 2. Colony immunoassay using anti-*Der f II* antibody (rabbit).

Fig. 3. cDNA sequence determination of 3 positive clones.

adaptor			
1	GGT ACC ATG GTT TCA TTG TTG GTA GCA GCC	30	
1	Gly Thr Met Val Ser Leu Leu Val Ala Ala	10	
31	GTT GTT GCC GAT CAA GTC GAT GTT AAA GAT	60	
11	Val Val Ala Asp Gln Val Asp Val Lys Asp	20	
61	TGT GCC AAC AAT GAA ATC AAA AAA GTA ATG	90	
21	(Cys) Ala Asn Asn Glu Ile Lys Lys Val Met	30	
91	GTC GAT GGT TGC CAT GGT TCT GAT CCA TGC	120	
31	Val Asp Gly (Cys) His Gly Ser Asp Pro (Cys)	40	
121	ATC ATC CAT CGT GGT AAA CCA TTC ACT TTG	150	
41	Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Thr Leu	50	
151	GAA GCC TTA TTC GAT GCC AAC CAA AAC ACT	180	
51	Glu Ala Leu Phe Asp Ala Asn Gln Asn Thr	60	
181	AAA ACC GCT AAA ATT GAA ATC AAA GCC AGC	210	
61	Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser	70	
211	CTC GAT GGT CTT GAA ATT GAT GTT CCC GGT	240	
71	Leu Asp Gly Leu Glu Ile Asp Val Pro Gly	80	
241	ATC GAT ACC AAT GCT TGC CAT TTT GTC AAA	270	
81	Ile Asp Thr Asn Ala Cys His Phe Val Lys	90	
271	TGT CCA TTG GTT AAA GGT CAA CAA TAT GAT	300	
91	Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp	100	
301	ATC AAA TAT ACA TGG AAT GTG CCG AAA ATT	330	
101	Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys Ile	110	
331	GCA CCA AAA TCT GAA AAC GTT GTC GTT ACA	360	
111	Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr	120	

361	GTC AAA CTT ATC GGT GAT AAT GGT GTT TTG	390
121	Val Lys Leu Ile Gly Asp Asn Gly Val Leu	130
391	GCT TGC GCT ATT GCT ACC CAT GGT AAA ATC	420
131	Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Gly Lys Ile	140
421	CGT GAT TAA AAA AAA ATA AAT AAG AAA ATT	450
141	Arg Asp ***	
451	TTC ACC AAC ATC GAA CAA AAT TCA ATA ACC	480
481	AAA ATT TGA ATC CAA AAA AAA AAA AAA	510
511	ACC ATG G	

Fig. 4. Aminoacid sequence of *Der f* II.

ことが可能であった。また、この *rDer f* II は、ダニアレルギー患者の好塩基球を刺激して、ヒスタミンを遊離する活性も有していた。

1990年、筆者らは *Der f* II に対する6種のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。この抗体を用いて、*Der f* II 定量のためのサンドイッチELISA を確立した。

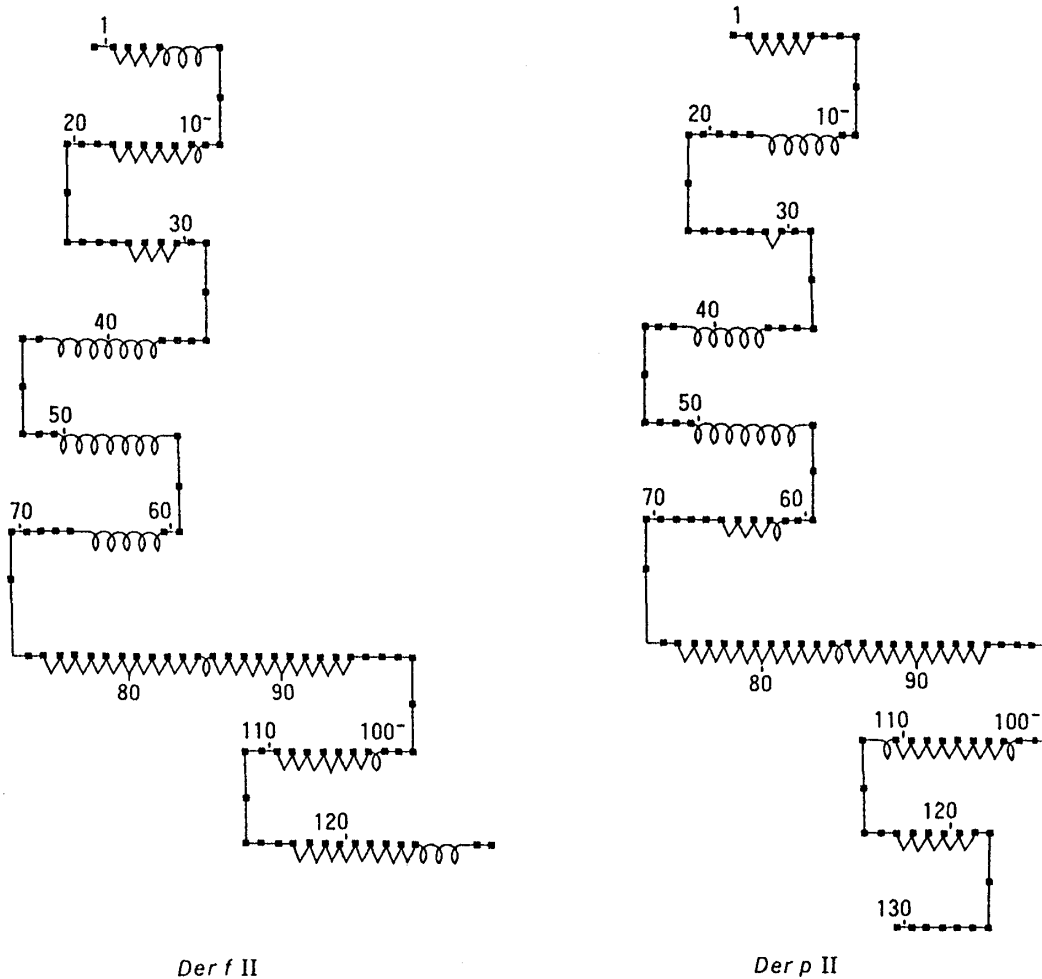


Fig. 5. Comparison of secondary structures of *Der f* II and *Der p* II. The method of CHOU and FASMAN was used for structure assumption. λλλ and ooo indicate α -helix and β -sheet structures respectively.

Der f II は、*Der f I* グループと同様に、Dp, Df に対応するアレルゲンの間には強い交差反応性があり、構造上の類似が推定されていた。アミノ酸配列を比較すると両者に129アミノ酸残基から構成されていて相互に高い相同性を持っていることが明らかとなった。本アレルゲン蛋白はこれまで報告されているいかなる蛋白ともアミノ酸配列の相同性が認められずダニにおける機能も解明されていない。本アレルゲン遺伝子はN末端側にシグナル配列と考えられる配列を持っており産生細胞から分泌されている可能性があるがその存在部位の特定はまだ明らかとなっていない。

Der f II 遺伝子は、Df 虫体から3種類得られている。本遺伝子がなぜ多型を示すかはっきりしていないが、虫体から精製した *Der f II* にも複数存在している。筆者らの研究によれば、図3に示すように染色体上の本遺伝子は真核生物に特徴的なエクソン/イントロン構造を取っており約90塩基のイントロンが1カ所存在している。また、本遺伝子は多型を示しているが、染色体上の1カ所に位置していることから、ダニの個体に複数の遺伝子が存在するのではないと考えている。おそらく、長期間の継体培養の間に遺伝子に異変が生じ遺伝子の組み換えによって複数存在するようになったものと推定している。

アレルゲン活性と *Der f II* のコンフォメーションが密接な関係にあることは、すでに明らかになった。そこで我々は、*Der f II* の立体構造解析に着手した。まず、分子内に存在するシステイン残基がジスルフィド結合しているかどうか、また形成しているとすればどの残基間で結合しているかを解析した。Df 虫体から精製した *Der f II* をエンドペプチダーゼで消化しその断片をプロテインシーケンサーでそのアミノ酸配列を調べ位置を決定した。*Der f II* の分子内には、3カ所にジスルフィド結合が存在しておりこの分子内架橋が本アレルゲンの安定性及びアレルゲン活性に大きく寄与している。実際、ジチオスレイトール等の還元剤でジスルフィド結合を切断すると、酵素分解に対する抵抗性が低下しダニアレルギー患者IgE抗体との結合活性も消失する。同様にして、大腸菌を用いて作製した組み換え *Der f II* についても調べたところ、まったく同じ位置でジスルフィド結合していることが明らかとなっている。*Der f II* 分子においては、N末端とC末端がジスルフィド結合によって互いに近い位置に存在しておりその両者によって構成されている高次構造をIgE抗体が認識しているものと推定している。こ

れは、欠失実験のN及びC末端側の欠失で結合能を失うこととよい一致を示している。

Fig. 5に示すように、アミノ酸配列から *Der f II* 分子の二次構造がコンピュータ解析によって明らかとなっているが構造解明には更に多くの研究が必要である。立体構造を明らかにすることは、IgE抗体との結合領域の解明、アレルギーの発症機構、更には治療に有効な薬剤開発に必要なことである。筆者らは、大量に調整できる組み換え *Der f II* の構造が虫体由来のものと同じであることを利用し立体構造解明に取り組んでいる。近い将来、その全貌を明らかにできるであろう。

文 献

- 1) Voorhorst, R., Spieksman, M.I.A. and Spieksma, F.T.M.: Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house dust allergen? *Allerg. Asthma* 10, 329-334, 1964.
- 2) Voorhorst, R., Spieksma, F.T.M., Varekamp, H., Leupen, M.J. and Lyklema, A.W.: The house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with the house-dust allergen. *J. Allergy* 39, 325-339, 1967.
- 3) Miyamoto, T., Johansson, S.G.O., Ito, K. and Horiuchi, Y.: Atopic allergy in Japanese subjects: Studies primarily with radioallergosorbent test. *J. Allergy Clin. Immunol.* 53, 9-19, 1974.
- 4) Alani, M. and Hjorth, N.: Sensitivity to house-dust mites in atopic dermatitis. *Acta Allergologica* 25, 41-47, 1970.
- 5) Sasa, M., Miyamoto, J., Shinohara, S., Suzuki, H. and Katsuhata, A.: Studies on mass culture and isolation of *Dermatophagoides farinae* and some other mites associated with house dust and stored food. *Jpn. J. Exp. Med.* 40, 367-382, 1970.
- 6) Chapman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Purification and characterization of the major allergen from the house dust mite. *Dermatophagoides pteronyssinus*—Antigen P1. *J. Immunol.* 125, 587-592, 1980.
- 7) Haida, M., Okudaira, H., Ogita, T., Ito, K., Miyamoto, T., et al.: Allergen of the house dust mite *Dermatophagoides farinde*—Immunochemical studies of four allergenic fractions. *J.*

- Allergy Clin. Immunol.* 75, 686-692, 1985.
- 8) Okudaira, H., Hongo, O., Ogita, T., Haida, M. and Yamauchi, N.: Serum IgE and IgE antibody levels in patients with bronchial asthma, atopic dermatitis, eosinophilic granulomas of the soft tissue (Kimura's disease) and other diseases. *Ann. Allergy* 50, 51, 1983.
- 9) David, G., et al.: Allergen nomenclature. *Bull. WHO* 64, 767-774, 1986.
- 10) Chua, K.Y., Stewart, G.A., Thomas, W.R., Simpson, R.J. and Dilworth, R.J.: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der pI*. Homology with cysteine proteases. *J. Exp. Med.* 167, 175-182, 1988.
- 11) Yuuki, T., Okumura, Y., Ando, T. and Yamakawa, H.: Cloning and sequencing of cDNAs corresponding to mite major allergen *Der f II*. *Jpn. J. Allergol.* 39, 557-561, 1990.
-