

ダニアレルゲン蛋白質のアレルゲン性
に関する研究

西山千春

①

ダニアレルゲン蛋白質のアレルゲン性に関する研究

西山 千春

目次

	頁
序章 本研究の背景及び論文の構成	1
第一節 アレルギー性疾患とアレルゲン蛋白質	1
第二節 ダニアレルゲン蛋白質	3
第三節 アレルゲン蛋白質-IgE-高親和性 IgE 受容体の 蛋白質相互作用に着目したアレルギー反応の制御	5
第四節 本論文の内容と構成	6
第一章 Der f 2 のジスルフィド結合位置	10
第一節 緒言	10
第二節 方法	11
第三節 結果	14
第四節 考察	24
第二章 Der f 2 の多型	27
第一節 緒言	27
第二節 方法	28
第三節 結果	32
第四節 考察	44
第三章 部位特異的変異を用いた Der f 2 のヒト IgE エピトープ検索	49
第一節 緒言	49

第二節 方法	50
第三節 結果	59
第四節 考察	66
第四章 マウスモノクローナル抗体を用いた Der f 2 の ヒト IgE エピトープ検索	74
第一節 緒言	74
第二節 方法	75
第三節 結果	77
第四節 考察	85
第五章 Der f 3 の cDNA クローニング及び活性発現	89
第一節 緒言	89
第二節 方法	90
第三節 結果	95
第四節 考察	101
総括	106
引用文献	112
謝辞	120

略語表

- BSA ; bovine serum albumin
Der f 1 ; *Dermatophagoides farinae* group 1 allergen
Der p 1 ; *Dermatophagoides pteronyssinus* group 1 allergen
Der f 2 ; *Dermatophagoides farinae* group 2 allergen
Der p 2 ; *Dermatophagoides pteronyssinus* group 2 allergen
Der f 3 ; *Dermatophagoides farinae* group 3 allergen
Der p 3 ; *Dermatophagoides pteronyssinus* group 3 allergen
FcεRI ; Fc ε receptor I (高親和性 IgE 受容体)
FcεRII ; Fc ε receptor II (低親和性 IgE 受容体)
GM-CSF ; granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GST ; glutathione-S-transferase
IgE ; immunoglobulin E
IgG ; immunoglobulin G
IL ; interleukin
IPTG ; isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
ITAM ; immunoreceptor tyrosine-based activation motif
mAb ; monoclonal antibody
pro ; pro sequence, protease precursor
PTH ; phenylthiohydantoinyl
RAST-EIA ; Radioallergosorbent test-enzyme immunoassay
SDS-PAGE ; Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
S-S 結合 ; disulfide (ジスルフィド) 結合
TNF-α ; tumor necrosis factor-α

序章 本論文の背景及び論文の構成

第一節 アレルギー性疾患とアレルゲン蛋白質

近年、アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、春季カタルといった様々なアレルギー性疾患の発症率が増加している。これらアレルギー性疾患を引き起こす原因物質、アレルゲンとして、環境中に存在する蛋白質、例えばスギやヒノキ、ブタクサ等の花粉由来の蛋白質、ハウスダスト中に存在しているダニ由来の蛋白質、卵、牛乳、米など食品中に含まれる蛋白質などが次々と同定されている。

アレルゲン蛋白質と結合してアレルギー反応を引き起こしている免疫グロブリンはヒトの場合 IgE であり、抗原特異的 IgE を介した情報は、その受容体を通して細胞内に伝達される。IgE の受容体は、IgE の Fc 部位と結合する、細胞表面に発現している分子で、高親和性 (FcεRI) と低親和性 (FcεRII) の 2 種類が知られている。抗原特異的 IgE を介したアレルギー反応の発症に主に寄与すると考えられている FcεRI は、マスト細胞、好塩基球に特異的に発現しており、 α 、 β 、と 2 分子の γ サブユニットよりなる四量体の受容体である¹⁾。

マウスでは IgE ノックアウトマウスにおいてもアナフィラキシー反応が観察されるという報告があり、一部の IgG が IgE と同様に抗原特異的なアレルギー反応に関与していると推定されているが²⁾、一方で、FcεRI の α サブユニットノックアウトマウスではア

ナフィラキシーショックが起こらないという報告があり³⁾、IgE と FcεRI を介した情報伝達機構がアレルギー反応を引き起こしている主要な経路とする見方が有力である。

IgE と直接結合する FcεRI 部位は、免疫グロブリンスーパーファミリー様の構造をもつ α 鎖の細胞外領域であり、細胞内への情報伝達は β 鎖、γ 鎖が細胞内領域に持っている Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) によって行われている。ITAM 中に存在しているチロシン残基が Lyn、Syk ラチロシンリン酸化酵素の活性化を起こすことからマスト細胞や好塩基球の活性化が始まると考えられている⁴⁾。FcεRI からの刺激で活性化されたマスト細胞内では、カルシウム濃度の上昇に続いて細胞内に蓄えられていた化学伝達物質、ヒスタミン、ロイコトリエン、プロスタグランジン D₂ 等の放出が起こる。これは即時型反応と呼ばれ、抗原刺激後速やかに現れる反応である。一方、抗原刺激から数時間経過した時点で再び即時型様の反応が現れる。これは、遅発反応と呼ばれている。遅発反応の機構は、受容体から蛋白質リン酸化酵素を介した経路で活性化された転写調節因子群が、IL-4、IL-5、GM-CSF、TNF-α 等のサイトカインの発現を促進し、その結果マスト細胞から放出されたこれらのサイトカインが炎症反応に関わる細胞、好酸球を呼び寄せ、浸潤させていることによると考えられている⁴⁾。

FcεRI のリガンドからの刺激は、FcεRI に結合した IgE が抗原によって架橋され、受容体が凝集することによって引き起こされる。従って、IgE に認識され、アレルゲンとなる蛋白質は、その分子内に IgE 結合領域を 2 箇所以上もつ多価抗原である^{1, 4)}。

第二節 ダニアレルゲン蛋白質

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の原因の一つにハウスダスト中に存在するダニがあげられる。室内にいるダニの中でもヒョウヒダニ属 (*Dermatophagoides*) の、コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*)、ヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) が主にアレルギーの原因となるダニである⁵⁻⁷⁾。アレルギー性疾患の患者に対し、その原因物質の特定を行う際に汎用されるテスト、Radioallergosorbent test-enzyme immunoassay (RAST-EIA) では、各アレルゲン蛋白質に反応する患者血清中 IgE 量の測定を行うが、RAST-EIA 法でダニ抗原として用いているのは *D. farinae* と *D. pteronyssinus* の虫体抽出物である。*D. farinae*、*D. pteronyssinus* 虫体抽出物中にはアレルギー患者血清中の IgE と反応する蛋白質が多く存在しており、ここ 10 年ほどの間に、ヒト IgE 結合を指標として *D. farinae* や *D. pteronyssinus* 虫体からアレルゲン蛋白質が次々と同定されてきた⁷⁻¹⁰⁾。このようにダニ虫体から発見されたアレルゲン蛋白質は、発見された順番に番号がつけられており、例えば、*D. farinae* 由来の最初に発見されたアレルゲン蛋白質は Der f 1 と呼ばれている。*D. farinae* 由来のアレルゲン蛋白質と、*D. pteronyssinus* 由来の蛋白質の間ではアミノ酸配列の相同性が高く、特性が類似しているものが多く存在し、同じグループに分類される。例えば、グループ 1 に属する Der f 1 と Der p 1 は約 82% のアミノ酸配列の相同性を^{9, 10)}、グループ 2 に属する Der f 2 と Der p 2 は約 88% の相同性を示して

いる^{1,2,12)}。現在まで、*Dermatophagoides* から IgE 結合性を示す蛋白質としてグループ 7 までが同定されている⁸⁻¹⁶⁾。同定された蛋白質のヒト IgE 結合活性を調べると、アレルギー性疾患患者のほとんどに反応するものと一部の患者と反応するものに分類される。前者を主要アレルゲンと呼び、初期に発見されたグループ 1 アレルゲン、グループ 2 アレルゲンは約 9 割のダニアレルゲン感受性アレルギー患者が反応する IgE を持つことから主要アレルゲンと考えられている¹⁷⁻²¹⁾。

これらのアレルゲン蛋白質の一部については cDNA がクローニングされ、予想されるアミノ酸配列も決定されている⁷⁻¹⁶⁾。決定されたアミノ酸配列からグループ 1 アレルゲンは、ババインなどと 30% 程度の相同性を示し、活性中心となるアミノ酸残基が保存されていたことからシステインプロテアーゼと考えられており^{11,12)}、実際、精製 Der f 1 蛋白質にはシステインプロテアーゼ活性が検出されている。グループ 3 アレルゲン蛋白質もトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を持つ蛋白質である²²⁻²⁶⁾。グループ 1、グループ 3 に属するダニアレルゲン蛋白質は、プロテアーゼ活性を有していること、ダニの糞中から多く検出されることなどからダニの消化酵素ではないかと推定されている。グループ 2 に属する Der f 2 と Der p 2 は互いの相同性は 88% と高いが^{13,14)}、それ以外に一次配列上類似していると思われる蛋白質は確認されておらず、その機能も未だ不明である。

天然に存在している様々な蛋白質の中で、特定の蛋白質がアレルゲン性を保持する機構は明らかになっていない。システインプロテアーゼやセリンプロテアーゼなど生体内に存在している蛋白

質と同じ様な立体構造を持っていると予想されるダニ虫体由来の蛋白質がアレルギー性を示していることは興味深い。

第三節 アレルゲン蛋白質-IgE-高親和性 IgE 受容体の蛋白質相互作用に着目したアレルギー反応の制御

これまで述べてきたように、マスト細胞活性化によって誘導される即時型、遅発型アレルギー反応の引き金となるのは、マスト細胞上に発現している FcεRI に結合した IgE がアレルゲン蛋白質によって架橋されることである。従って、この一連の蛋白質の結合を阻害することによって、抗原特異的 IgE を介したアレルギー反応を抑制することが期待される。

IgE と FcεRI の結合を阻害する試みは、IgE の Fe 部位に注目してその配列を基に作製した合成ペプチドや、同部位に対する抗体を用いて FcεRI や IgE の結合部位を覆ってしまうアプローチと^{26, 27)}、FcεRI α鎖のアミノ酸配列を利用して、FcεRI α鎖の細胞外ドメインより成る可溶性 FcεRI α鎖や^{28, 29)}、FcεRI α鎖に対する抗体を作製する方法などが報告されており、IgE の Fe 部位に対する抗体のヒト型化したものでは、実際にアレルギー性疾患患者への投与で効果を上げている。

一方、IgE に認識されるアレルゲン蛋白質は多価抗原であるが、IgE と結合しながら FcεRI の架橋を引き起こさないように IgE エピトープを 1 カ所のみ持つ一価のアレルゲン蛋白質改変体を作製したり、エピトープに特異的に結合する抗体を作製して、IgE の抗

原結合領域をふさごうとする試みも行われている^{30, 31)}。

ダニアレルゲン蛋白質でも、主要アレルゲン Der f 1, Der p 1, Der f 2, Der p 2 について 1980 年代後半から 1990 年はじめにかけて、決定されたアミノ酸配列を基に作製したペプチド断片を用いて、IgE や IgG のエпитープ検索が試みられた³²⁻³⁷⁾。しかし、IgE エピトープの再構築は勿論、IgE の結合部位の特定も明らかな結果が得られていない。これは、これらダニアレルゲン蛋白質に対する抗体が結合している抗原上の領域が、短いペプチド断片では再現できない配列や構造を持っているためと考えられる。

第四節 本論文の内容と構成

本研究では以上のことから、ダニ主要アレルゲン Der f 2 の IgE 結合活性発現に重要な立体構造に関する情報を収集し、遺伝子組み換え技術を用い蛋白質の高次構造変化を抑えた方法で Der f 2 の IgE エピトープを特定することを試みた。更に、グループ 3 ダニアレルゲン蛋白質 Der f 3 についても cDNA クローニングと活性発現を遺伝子組み換え技術を用いて行った。以下に本研究の内容を要約して述べる。

本研究は、結城らによる Der f 2 の cDNA クローニングに端を発している。結城らは *D. farinae* 虫体より抽出した mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、抗 Der f 2 抗体をプローブとして用い、Der f 2 の cDNA を 3 クローン得た¹²⁾。その後、組み換え遺伝子操作技術を用いて Der f 2 を大腸菌体内に大量発現する系を確

立し、解析を行うのに十分量の Der f 2 蛋白質を調製できるようになった^{3⁸)}。一方、機能、構造ともに不明であった Der f 2 を還元修飾することにより IgE 結合能が著しく低下するという結果が報告され、Der f 2 の持つ 6 つの Cys 残基の幾つかがジスルフィド結合 (S-S 結合) を形成して、エピトープを含む立体構造安定化に寄与していることが示唆された^{3⁹)}。そこで、まず Der f 2 をプロテアーゼ分解した後ペプチドマップを行うことにより S-S 結合位置の決定を行った。その結果、6 つの Cys 残基が Cys21-Cys27、Cys73-Cys78、Cys8-Cys119 という組み合わせで 3 つの S-S 結合を形成していることが判明した^{4⁰)}。また、Der f 2 の cDNA としてクローニングされた 3 クローンの多型にアレルゲン性や蛋白質の構造安定性の相違がある可能性を期待して比較検討を行った。最大 4 カ所の異なるアミノ酸配列をもつ 3 クローン間で IgE 結合活性に差異は認められなかったものの、モノクローナル抗体との反応性、蛋白質安定性に有為な差が認められた^{4¹)}。続いて、Der f 2 の N 末端側、C 末端側アミノ酸を欠失した変異体を作製し、それらの IgE 結合活性を調べたところ、Cys8 や Cys119 を含むアミノ酸残基を欠失した場合に Der f 2 の構造安定性、IgE 結合活性発現共に著しく低下することが判明した。このことから S-S 結合の破壊を伴う変異体を用いては IgE 結合領域の特定は困難であると考えられた。そこで高次構造変化を抑えてエピトープの検索を進めるためにアミノ酸残基を 1 つずつ異なるアミノ酸に置換した変異体を作製し、IgE 結合能を調べた。その結果、Cys8-Cys119 及び Cys73-Cys78 近傍、更に C 末端部位側に存在するアミノ酸残基の置換が IgE 結合活性を低下させる傾向が見られた^{4²)}。更に、Der f 2 の結合に対して IgE と拮抗するマウスモ

モノクローナル抗体のエピトープを検索した。モノクローナル抗体では、ポリクローナル抗体である IgE と比べて、抗原蛋白質の 1 アミノ酸残基の置換は明らかな抗原抗体親和性の低下をもたらした。その結果明らかになった IgE 拮抗性モノクローナル抗体のエピトープは、Cys73 周辺、Cys8-Cys119 に構造保持された領域、そして C 末端部位であった⁴³⁾。

一方、遺伝子のクローニングがまだ行われていなかったグループ 3 ダニアレルゲン Der f 3 についても Der f 2 と同様の解析を行うため、cDNA クローニングと蛋白質の活性発現を行った⁴⁴⁾。*D. farinae* の cDNA ライブラリーから、報告されている Der f 3 の N 末側アミノ酸配列を利用した Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で作製したプローブを用いてスクリーニングを行った。得られた Der f 3 の cDNA を Glutathione-S-transferase (GST) の遺伝子下流に連結した発現プラスミドを作製し、融合蛋白質として大腸菌体内に発現させた。封入体として菌体内に蓄積されていた GST-Der f 3 は、変性、再生操作によって可溶化し、ヒト IgE との結合活性も認められた。しかし、Der f 3 の機能であるセリンプロテアーゼ活性は検出されず、Der f 3 が前駆体蛋白質 (proDer f 3) から成熟型へ移行していないことが判明した。そこで、Der f 3 の pro 領域の C 末端アミノ酸残基 Thr を、Der f 3 を含めたトリプシン様セリンプロテアーゼが高い基質特異性を示す Arg に置換した変異体を作製したところ、Der f 3 は pro 配列が自己消化的に速やかに除去され、プロテアーゼ活性も発現することが確認された。また、PCR 法による cDNA クローニングの結果、Der f 3 に少なくとも 3 種類の多型が存在することが確認された。

以上が本論文の内容であるが、本論文は、序論、本章、総括で構成され、本章の構成は以下の通りである。

第一章では Der f 2 の S-S 結合位置の決定について述べる。

第二章では Der f 2 の多型が抗体との反応性や蛋白質の安定性に及ぼす影響について述べる。

第三章では部位特異的変異を用いて作製した Der f 2 欠失体やアミノ酸置換体の IgE 結合能を調べて特定した、ヒト IgE エピトープ部位について述べる。

第四章では Der f 2 との結合に際して IgE と拮抗するモノクローナル抗体の特定と、そのエピトープ部位の決定について述べる。

第五章では Der f 3 の cDNA クローニングと大腸菌を用いた Der f 3 活性発現、更にセリンプロテアーゼ活性を有する Der f 3 置換体の作製について述べる。

第一章 Der f2 のジスルフィド (S-S) 結合位置

第一節 緒言

気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患の原因の一つに家塵中に存在するダニへの高感受性が考えられる。近年、ヒョウヒダニ、特にコナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ由来の蛋白質中にアレルギー性疾患患者血清中 IgE と反応する蛋白質の存在が指摘され、一部についてはその遺伝子クローニングも行われ、塩基配列およびアミノ酸配列が明らかになっている。Der f2 はコナヒョウヒダニ由来の分子量約 14k の糖鎖を持たない蛋白質であり、約 9 割のダニ感受性アレルギー性疾患患者が Der f2 と反応する IgE を持つことから主要なダニアレルギー蛋白質と考えられている。Der f2 は、既に cDNA がクローニングされており^{1,2)}、そこから予想されるアミノ酸配列は、同じグループ 2 のダニアレルギーに分類されるヤケヒョウヒダニ由来の蛋白質 Der p 2 と 88% の高い相同性を持つ^{1,11)}。しかし、Der p 2 以外に Der f2 と類似した一次配列をもつ蛋白質は知られておらず、その立体構造も不明である。Der f2 の立体構造、特に IgE エピトープ、T 細胞エピトープといったアレルギー性を有する領域についての解析を行うことは、アレルギー蛋白質がアレルギー性を取得する機構やアレルギー性反応を引き起こす機構を解明し、アレルギー性疾患の治療に応用する為に必要であると思われる。

Der f2 は 129 アミノ酸よりなる蛋白質で、6 つの Cys 残

基を有している^{1,2)}。Lombardero らの報告から、アレルギー性疾患の患者血清中に存在している抗 Der f 2-IgE 抗体が Der f 2 を認識する際に、Der f 2 の S-S 結合の保持が必須であることが示唆されている^{3,4)}。すなわち、S-S 結合の再形成を阻害するために Der f 2 を還元後 Cys 残基を修飾した場合、抗 Der f 2 ヒト IgE による Der f 2 の結合活性が著しく低下するというものである^{3,4)}。このことから、Der f 2 中に存在する S-S 結合が本蛋白質の立体構造安定化に寄与している可能性が推定されるが、その存在も架橋位置も不明であった。そこで、Der f 2 の IgE エピトープ位置を含めた高次構造に関する情報を得るために、まず、Der f 2 の S-S 結合位置の決定を試みた。

第二節 方法

1) Der f 2 の精製

5g の *D. farinae* 虫体凍結乾燥物（鳥居薬品より供与）を 200ml の 0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）に溶解後、60%飽和硫酸を添加した。10,000 x g、30 分間遠心操作を行った後、得られた上清画分を 0.05 M トリス塩酸緩衝液（pH8.0）にて透析し、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel（ファルマシア）カラム（3.5 x 9.8 cm）に供し、0 から 0.3 M の NaCl を含む同緩衝液で溶出操作を行った。得られた各溶出画分中に含まれる Der f 2 量は Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を用いて検出した^{4,4)}。続いて Der f 2 を含む DEAE-Sephacel 溶出画分を 0.02 M 酢酸緩衝液

(pH5.5)を用いて透析を行い、同緩衝液で平衡化した S-Sepharose (ファルマシア) カラム (1.3 x 3.3 cm) に供した。0 M から 0.2 M の NaCl を含む同緩衝液を用いて溶出操作を行ったところ、0.08 M の NaCl で溶出される画分に Der f 2 が含まれていた。回収した Der f 2 画分を 0.15 M の NaCl を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH6.0) に透析後、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 (ファルマシア) カラム (2.7 x 34.0 cm) に供した。このゲル濾過操作の結果、Der f 2 は主要画分として溶出された。Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および ELISA を用いて確認した結果、得られた Der f 2 の精製度は 95% 以上であった。以上の操作から最終的に、4.0 mg の Der f 2 を得た。

2) 基質特異性の高いプロテアーゼを用いた Der f 2 の切断化

200 μ g の精製 Der f 2 を 2 ml の 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中に溶解後、 1×10^2 AU のリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬工業) を加え、37 度にて 36 時間から 40 時間インキュベートを行った。Der f 2 を 8 M 尿素で変性した場合は反応時間は 8 時間から 10 時間行った。1/2 容量の酢酸 (終濃度 33%) 添加、もしくはエバポレーターで乾燥させることにより酵素消化反応の停止を行った。ブロリン特異的エンドペプチダーゼ (生化学工業) を用いる場合には 0.05 M リン酸ナトリウム (pH7.0) 中で 37 度にて 3 時間酵素反応を行った。

3) ペプチド断片の分離

前述のようにして調製したペプチド断片混合物はエバポレーターにて乾燥後 0.1 から 1.0 ml の 0.01 %トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解し、溶媒 A (0.1%TFA/蒸留水) で平衡化した C8-HPLC カラム (RP-300、100 x 2.1 mm、アブライドバイオシステムズ) に供した。溶媒 B (0.1 % TFA/70 % アセトニトリル) による濃度勾配によって溶出操作を行ったが、その条件は、溶媒 B の濃度が 0 分で 0 %から、45 分で 65 %に、更に 55 分に 100 %になるように二段階の直線的な濃度勾配とし、更に 5 分間溶媒 B 100 % 条件下で保持した。この濃度勾配プログラムは 140A solvent delivery system (アブライド・バイオシステムズ) を用いて制御した。215 nm の吸光度で溶出液の検出を行い、各ペプチド断片はシリコンコートしたガラスチューブに回収した。

4) ペプチドの同定

上記の方法で回収した各断片は、溶媒を減圧除去した後 30-50 μ l の 0.1 % TFA に溶解し、473A protein-sequencing system (アブライド・バイオシステムズ) に供してアミノ酸配列の決定を行った。phenylthiohydantoinyl (PTH) アミノ酸は、PTH-C18 カラム (2.1 x 220 mm) を用いて同定した。

5) S-S 結合によって架橋しているペプチド断片の S-S 結合切断

分離したペプチド断片は、乾燥後窒素ガスで前処理し酸素

除去した溶液 (7 M 塩酸グアニジン、0.01 M EDTA を含む 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5)) に溶解した。これらの溶液には 0.1 mM ジチオスレイトールを加え、還元条件下で 37 度 1 時間保持した。

第三節 結果

1) リシルエンドペプチダーゼ消化により生成した Der f 2 ペプチド断片の同定

図 1-1 に示すようにリシルエンドペプチダーゼ消化を行った Der f 2 のクロマトグラムは 10 本の主だったピークより成っている。ナンバー 10 とラベルしたピークは未消化 Der f 2 であることが、未処理 Der f 2 の溶出時間と比較した結果確認された。ナンバー 9 のピークは部分消化された Der f 2 であることが判明し、通常の 4 倍から 20 倍に相当する 40 時間という長い反応時間にも関わらず Der f 2 は 50%以上が未消化のまま存在している結果となった。

HPLC の各ピーク画分から回収した全てのペプチド断片のアミノ酸配列をプロテイン・シークエンサーを用いて決定した。結果は表 1-1 に示すとおりである。これらのピーク画分の中で、ナンバー 6 とナンバー 7 は各々異なる 2 本のペプチド断片を含んでいることが判明した。すなわち、ナンバー 7 の配列を決定した結果、Cys78 から Lys82 までと、Ala56 から Lys77 までの 2 通りのアミノ酸配列が存在していることが確認された。ナンバー 6 もまた Asp7 から Lys14 までと、Leu110 から Lys126 までの 2 本のペプチド断

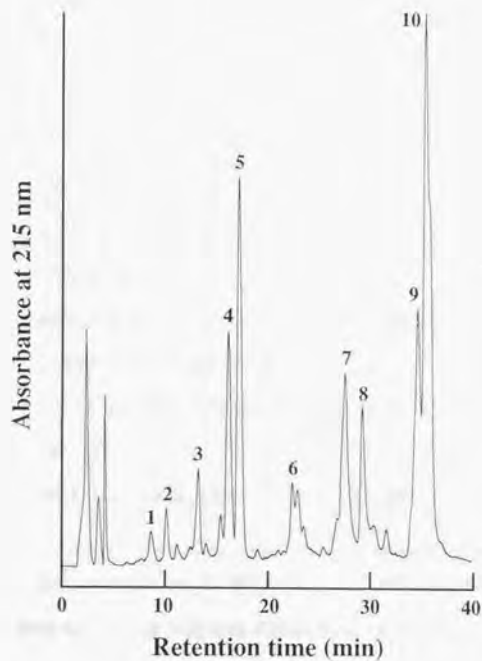


図 1-1 リシルエンドペプチダーゼ消化 Derf 2 の HPLC 溶出パターン。

ピーク 1 から 8 より回収した各ペプチド断片のアミノ酸配列は表 1-1 に示す。

表 1-1 Der f 2 由来ペプチド断片のアミノ酸配列

Fragment	Amino acid sequence	Residue number	Cystein residue, n
1	IEIK	52-55	0
2	GQQYDAK	83-89	0
3	SENVVTVK	101-109	0
4	VMVDGCHGSDPCIHRGK	16-33	2
5	YTWNVPK	90-96	0
6	DCANNEIK	7-14	1
	LVGDNGVLACAIATHAK	110-126	1
7	ASLDGLEIDVPGIDTNACHFMK	56-77	1
	CPLVK	78-82	1
8	PFTLEALFDANQNTK	34-48	0

ペプチド断片のナンバーは、図 1-1 に記した数字と同一である。

アミノ酸残基は分子数が最も多く検出されたものを示した。

片を含んでいた。ナンバー6, 7とも含まれている2本のペプチド断片の分子数はほぼ等量であった。これらの4本のペプチド、Cys78-Lys82, Ala56-Lys77, Asp7-Lys14, Leu110-Lys126はいずれも1つずつCys残基を含んでいる。すなわち、Cys78, Cys73, Cys8, そしてCys119である。これらのことからCys78とCys73, Cys8とCys119の間に各々S-S結合が存在している可能性が示唆される。

2) Cys残基を含む2本のペプチド断片の分離切断

ピーク6の画分と7の画分は各々還元処理後即座にC8-HPLCカラムに供し前述と同一の条件で溶出操作を行った。ピーク7画分の還元処理の結果、図1-2に示すように主に3本のピークが得られた。AとマークされたピークにはCys78からLys82までのペプチドが存在し、一方、ピークCにはAla56からLys77までのペプチドが存在していた。ピークBは、その溶出時間が還元操作前のピーク7の溶出時間と同じであることから、Cys73-Cys78間のS-S結合で連結したままのCys78-Lys82とAla56-Lys77の2本のペプチドであると思われる。ピーク6については、図1-3に示すように、還元操作によってピークDとその直後に溶出されるピークEの2本が得られた。ピークDはピーク6と同一、すなわちCys8-Cys119で連結した2本のペプチドであることが確認された。ピークEはLeu110からLys126までのペプチドのみより成ることがアミノ酸配列の決定の結果判明した。

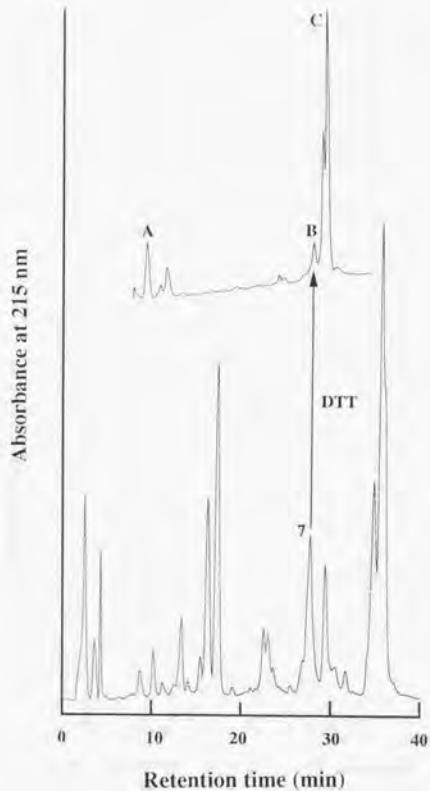


図 1-2 ピーク 7 画分由来ペプチドの還元処理後 HPLC 溶出パターン。

ピーク A ; Cys78 から Lys82 までの 5 アミノ酸残基よりなるペプチド

ピーク B ; Cys78 から Lys82 までと、Ala56 から Lys77 までの 2 本のペプチドを含む

ピーク C ; Ala56 から Lys77 までの 22 アミノ酸残基よりなるペプチド

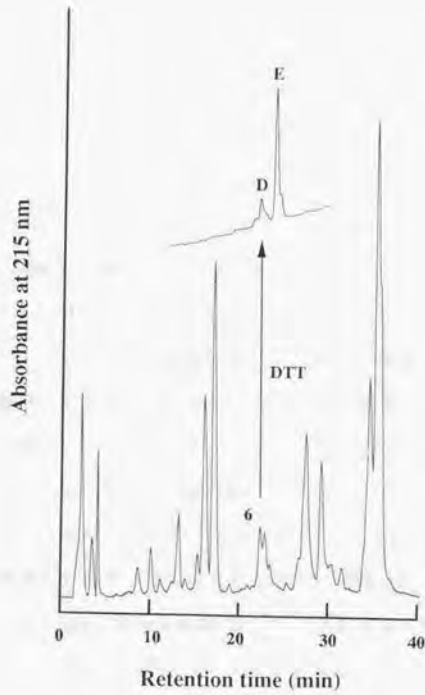


図 1-3 ピーク 6 画分由来ペプチドの還元処理後 HPLC 溶出パターン。
 ピーク D ; Asp7 から Lys14 までと Leu110 から Lys126 までの 2 本のペプチドを含む
 ピーク E ; Leu110 から Lys126 までの 17 アミノ酸残基よりなるペプチド

3) Cys21 と Cys27 間の S-S 結合の決定

上述の通り、ペプチダーゼ処理した Der f 2 の還元、非還元下における HPLC のクロマトグラムの比較から Der f 2 蛋白質中に存在する 2 つの S-S 結合の存在が明らかとなった。しかし、リシルエンドペプチダーゼによる切断では 6 つの Cys 残基のうち 2 つ、Cys21 と Cys27 については、一次配列上その間に Lys 残基が存在しないため切断、分離することができない。これら 2 つの Cys 残基は酵素消化後 Val16 から Lys33 までの 1 本のペプチド断片中に存在している。この 2 つの Cys 残基間に S-S 結合が形成されているかどうかを確認するため、この Val16 から Lys33 までのペプチドをプロリン特異的エンドペプチダーゼ消化し、消化産物のアミノ酸配列の決定を行った。プロリン特異的エンドペプチダーゼ処理でこのペプチドは Val16 から Pro26 までと Cys27 から Lys33 までのそれぞれ Cys 残基を 1 つずつ有する 2 本の断片に切断されると期待される。図 1-4 は Val16 から Lys33 までのペプチドより成るピーク 4 をペプチダーゼ処理した後のクロマトグラムを示している。2 本の高いピークとペプチダーゼ処理前に見られた位置と同じ溶出時間に 1 本低いピークが存在している。ピーク F とマークした鋭いピーク画分には Val16 から Pro26 までと Cys27 から Lys33 までの 2 本のペプチドが含まれていた。ピーク G と H 中には N 末側からの非特異的な分解を受けたペプチドが存在していた。すなわち、ピーク G は、Val18 から Lys33 までのペプチドを、ピーク H は、Val16 あるいは Met17 から Lys33 までのペプチド断片の混合物であった。ピーク G、H ともペプチダーゼによる Pro26 と Cys27 間の特異的

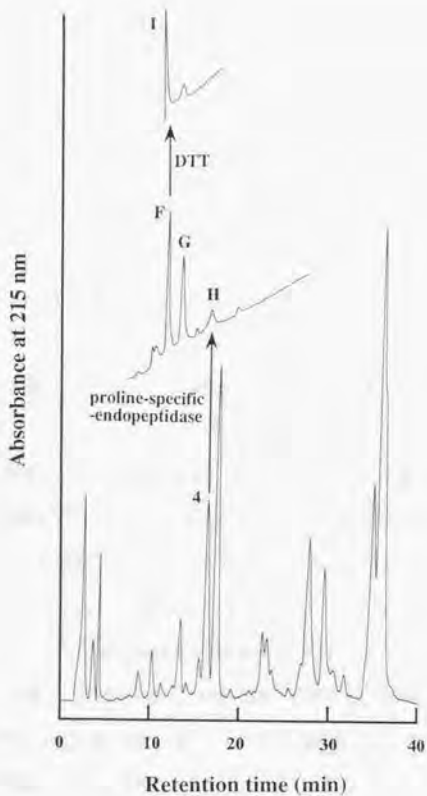


図 1-4 Cys21、Cys27 間の S-S 結合の決定。
 ピーク F ; Val18 から Pro26 までと Cys27 から Lys33
 までの 2 本のペプチドを含む
 ピーク G ; Val18 から Lys33 までのペプチド
 ピーク H ; Val16 から Lys33 までと Met17 から Lys33
 までのペプチド
 ピーク I ; Cys27 から Lys33 までのペプチド

な切断は受けていなかった。ピーク F の画分は還元処理後 HPLC で分離を行うと、図 1-4 に示すようにピーク F とほとんど同じ溶出時間に現れるピーク I が得られ、これは Cys27 から Lys33 までのペプチド 1 本のみより成ることが判明した。

4) PTH-Cystine の検出

本実験で用いたアミノ酸配列決定法では Cys 残基は検出することができない。しかし、2 つの Cys 残基が S-S 結合により Cystine を形成していた場合には、PTH-Tyr と同じ溶出時間に di-PTH として検出することができる^{4,5)}。ピーク F は Cys21 と Cys27 間の S-S 結合で連結されていると予想される Val18 から Pro26 までと、Cys27 から Lys33 までの 2 本のペプチドを含んでいる。従ってこの画分のアミノ酸配列決定の過程において、4 回目のシークエンスサイクル時に PTH-Tyr と同じ溶出時間にピークが検出されることが予想される。図 1-5 に示すとおり 4 回目のシークエンスサイクルで di-PTH-cystine のピークが検出されている。また、図 1-4 に示すように、ピーク F は 2 本のペプチドを含んでいるにも関わらず、図 1-5 において 1 回目のシークエンスサイクルでは PTH-Val のピーク 1 本しか検出されない。このことは、Cys27 が Cys21 と S-S 結合で連結していることを示している。ピーク 6 や 7 中のペプチドの場合も、各々 10 回目と 18 回目のシークエンスサイクル時に図 1-5 で現れたのと同じ溶出時間に小さなピークが検出されている。これらは各々 Cys8-Cys119、Cys73-Cys78 であると推定される。

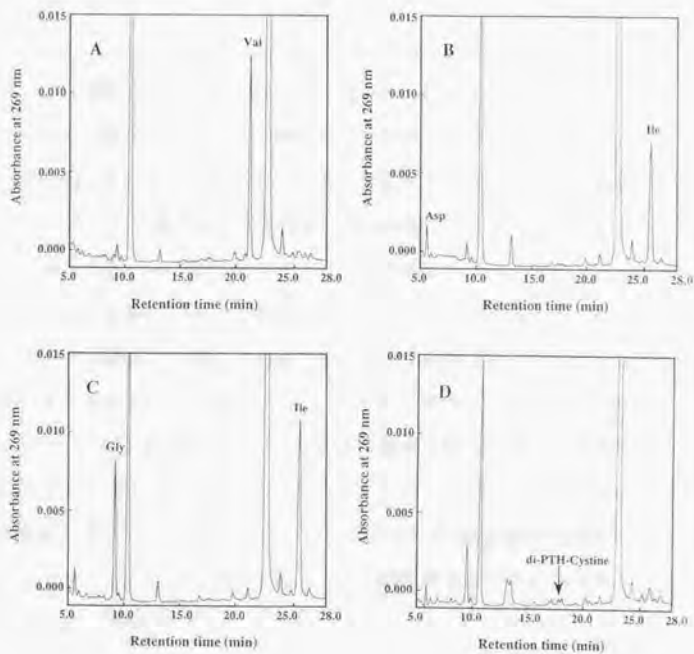


図 1-5 ピーク G (図 1-4) 由来ペプチドのエドマン分解による di-PTH cystine の検出。

A ; 1 サイクル目に検出される PTH-Val18

B ; 2 サイクル目に検出される PTH-Asp19, PTH-Ile28

C ; 3 サイクル目に検出される PTH-Gly20, PTH-Ile29

D ; 4 サイクル目に検出される di-PTH-Cys21-Cys27

5) 精製 Der f 2 の全アミノ酸配列の決定

リシルエンドペプチダーゼとエンドプロテイナーゼ Asp-N 処理で得られたペプチド断片の同定の結果、精製 Der f 2 の 129 全アミノ酸配列が明らかとなった。結果は、図 1-6 に示すとおりである。今回決定されたアミノ酸配列は、報告されている Der f 2 の cDNA 塩基配列より予想されるアミノ酸配列と一致していた。精製 Der f 2 には、一部のアミノ酸残基に多型が見られており、図 1-6 には、検出された分子数が最も多いアミノ酸残基を示している。アミノ酸残基の多型については次章で示す。Der f 2 をリシルエンドペプチダーゼで処理した場合、8 本の主なピークが得られ、そのアミノ酸配列を決定すると、Der f 2 の、N 末側 6 残基、Lys15、Thr49-Lys51、Ile97-Lys100、そして C 末側 3 残基を除く一次配列が明らかとなる。(図 1-1、表 1-1) リシルエンドペプチダーゼ処理断片で未確認の領域については、エンドプロテイナーゼ Asp-N 処理産物、もしくはインタクトな Der f 2 のアミノ酸配列をシークエンスすることによって決定した。

第四節 考察

Lombardero らは、2-メルカプトエタノール処理したグループ 2 のアレルゲンの立体構造安定性が低下し、IgE や IgG 抗体による認識も著しく低下していることを報告している³⁹⁾。このことから、Der f 2 や Der p 2 蛋白質中には、本蛋白質がアレルゲン性を発揮するために必要な立体構造を安定に維持するために S-S 結合

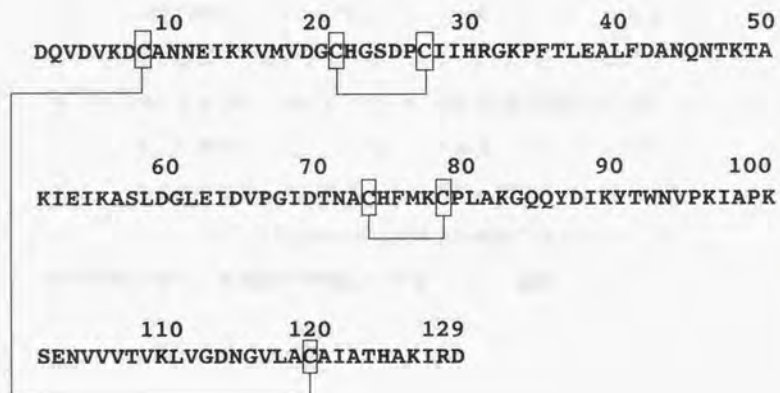


図 1-6 Der f2 蛋白質のジスルフィド結合位置。

が重要な役割を果たしていると推定される。グループ2アレルゲンがいかにして、IgEやIgG、あるいはMHCによって認識されるかを明らかにする第一段階としてDer f 2の立体構造形成に寄与しているS-S結合位置の決定を行った。二種類のペプチダーゼ(リシルエンドペプチダーゼ、プロリン特異的エンドペプチダーゼ)を用いて得られたDer f 2ペプチド断片を同定した結果、Der f 2中には3組のS-S結合、Cys8-Cys119、Cys21-Cys27、Cys73-Cys78が存在することが明らかとなった。Cys8とCys119は各々Der f 2のN末側、C末側に存在しており、Cys8-Cys119間のS-S結合は本蛋白質の両末端を近傍に位置させる役割を担っていることが予想される。第三章で述べるように、Der f 2はN末側やC末側をCys8やCys119を含む領域にわたって欠失させた場合、アレルギー性患者血清中に含まれる抗ダニアレルゲンIgE抗体との結合力が著しく低下する。このことからCys8-Cys119間のS-S結合はDer f 2のIgE結合領域を含む立体構造の安定化に寄与していると考えられる。

Der f 2 はコナヒョウヒダニ由来の主要アレルゲン蛋白質の一つであり、抗ハウスダストマイト IgE 抗体を持つアトピー性皮膚炎や喘息、アレルギー性鼻炎のダニ感受性アレルギー患者の約 9 割が Der f 2 に反応する IgE を持っている。Der f 2 は、その cDNA が既にクローニングされ、6 つの Cys 残基を含む 129 アミノ酸残基より成ることが明らかになっている^{1,2)}。Der f 2 中には 3 つの S-S 結合が存在し、 β -シートを多く含む二次構造であることが、ペプチドマップ、及び CD スペクトルを用いた実験から明らかにされているが^{3,4)}、それ以上の高次構造に関する情報は無い。我々がクローニングした Der f 2 の cDNA は 3 種類で、クローン 1、2、11 と命名しているが、クローン 2 はクローン 1 とアミノ酸残基で 1 カ所、クローン 11 はクローン 1 と 4 カ所のアミノ酸残基について置換がおこっていた^{1,2)}。そこでこれら 3 種類のクローンについてアレルゲン性を含めた蛋白質特性を比較することによって、Der f 2 の高次構造に関する情報や Der f 2 蛋白質をアレルゲンとするアレルギー反応の発症機構に関する情報を得ることを期待して、各々の抗 Der f 2 マウス IgG 抗体やヒト IgE 抗体との反応性を検討した。本章では、まず、天然型 Der f 2 の精製を行い、そこに存在する Der f 2 多型を蛋白質として確認し、更に組み換え遺伝子操作技術を用いて作製し得られた各クローン型の精製標品について抗体との反応性、蛋白質の構造安

定性を調べた。

第二節 方法

1) ダニ虫体からの Der f 2 の精製

鳥居薬品株式会社より供与された凍結乾燥ダニ虫体抽出物 5 g より、DEAE-Sephacel、S-Sepharose、Sephadex G-75 を用いた第一章と同様の手法で 4 mg の Der f 2 精製蛋白質を得た⁴⁰⁾。

2) 組み換え大腸菌による Der f 2 蛋白質の発現及び精製

T7 プロモーター制御下に目的蛋白質を発現するプラスミドベクター pGEMEX1 (プロメガ) を用いた Der f 2 の発現ベクターを構築した³⁸⁾。すなわち pGEMEX1 のプロモーター直下に存在するマルチクローニングサイト内の *Nde*I、*Hind*III 認識配列を利用して、遺伝子クローニングしていたプラスミド pUC18¹²⁾ から 3 種類の Der f 2、クローン 1、2、11 の cDNA を切り出し、挿入した。これらの発現プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を 50 µg/ml のアンピシリンを含む 5 ml の L broth (1 リッター当たり、バクトトリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g) 中で一晩 30 度で振とう培養を行い前培養液とした。続いて、500 ml の坂口フラスコに同じ培養液 (アンピシリンを含む L broth) 170 ml を用意し、前培養液を 1% 接種し更に 2 時間半培養を行った。そこで Isopropyl-β-D-

thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように添加し、17 プロモーターの誘導を行った。更に 4 時間培養を行った後、培養液を 5000 x g、10 分間遠心操作することにより大腸菌体の回収を行った。回収した大腸菌体を 10 x TE 緩衝液 (100 mM トリス塩酸、10 mM EDTA、pH7.5) 6 ml に懸濁後超音波破碎を行った。Der f 2 蛋白質は大腸菌体内に封入体として不溶化状態として蓄積されていたため、超音波破碎後、7000 x g、15 分間の遠心で沈殿として回収された。次に、6 M 尿素を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 50 ml を沈殿画分に加え、可溶化後、尿素を含まない同緩衝液中で 12 時間透析を行って尿素を除去し緩やかな再生操作を行った。再生した Der f 2 を含むこの平衡化後の溶液を同じ 20 mM トリス緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl (3.5 x 9.8 cm、トーソー) に供し、50 mM NaCl を含む同緩衝液で溶出した。その結果得られた Der f 2 蛋白質は、SDS-PAGE で 1 本のバンドとして検出される高い精製度であることが確認された。

3) Der f 2 のペプチドマップ

精製した野生型及び各組み換え体の Der f 2 を第一章で行ったのと同様にリシルエンドペプチダーゼ消化後、C8 カラムを用いた HPLC を行うことによりペプチドマップのカラムクロマトを得た。分離されたペプチド断片は各々回収し、第一章と同様プロテインシークエンシングシステム 473A を用いてアミノ酸配列の決定を行った。

4) ヒト IgE 抗体の Der f 2 結合活性

Der f 2 のヒト IgE 結合活性は Radioallergosorbent test-enzyme immunoassay (RAST-EIA) 法を用いて測定した。用いたヒト IgE 抗体はアレルギー性皮膚炎及び喘息のアレルギー患者血清 (ハウスダストマイト感受性) 由来である。直径 6.0 mm の円に打ち抜いた濾紙 (ワットマン) を BrCN で活性化したペーパーディスクを作製し、テストチューブ (塩野義製薬) 中で 1 ng/ml から 0.1 mg/ml までの異なる濃度に調製した Der f 2 溶液 (0.1 M ホウ酸緩衝液, pH8.0) 50 μ l に浸し、室温で一晩静置してディスクへの抗原吸着反応を行った。抗原吸着したペーパーディスクは、0.5 ml の 0.1 M NaHCO₃ で一度洗浄後、0.1 M モノエタノールアミン (pH9.0) 0.25 ml 中で時間室温放置してブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、0.5 ml の 0.1 M NaHCO₃ で 1 回、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.0) で 3 回洗浄を行った。続くヒト IgE 抗体の Der f 2 への結合、抗ヒト IgE 二次抗体 (*o*-nitrophenyl- β -D-galactosidase 標識ウサギ IgG) の添加、基質の発色は RAST-EIA キット (カビ・ファルマシア) を用いて行った。本法では Der f 2 抗原蛋白質に結合する IgE 抗体量は 420 nm の吸光度で測定する β -D-galactopyranoside の発色として検出される。

5) 抗 Der f 2 マウスモノクローナル抗体 (mAb) の Der f 2 結合活性

我々が作製した 3 種類の抗 Der f 2 マウス mAb について^{4,4)} Der f 2 との結合活性を以下に示す ELISA 法で測定した。Der f 2 蛋白質を 100 μ l の PBS 溶液 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄,

8.1 mM Na₂HPO₄, pH7.4) に様々な濃度で溶解し、ELISA プレート、イムロン 2 (ダイナテック) の各ウェル中に加え、室温で 2 時間以上放置して固相への吸着をおこなった。Der f 2 溶液を除去して各ウェルを PBS で 3 回洗浄した後、1% (w/v) のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS を添加して 1 時間室温放置することによりブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去後、0.05% (w/v) のトウイーン 20 を含む PBS (PBS-Tween) で 3 回洗浄後、100 μ l のマウスモノクローナル抗体をウェルに加えた。加えた抗体濃度は、抗体の力価によって異なっており、15E11 抗体が 10 μ g/ml、13A4 が 5 μ g/ml、18G8 が 2.5 μ g/ml である。マウスモノクローナル抗体と Der f 2 の抗原抗体反応は室温で 2 時間行った。モノクローナル抗体溶液を除去した後、ウェルを PBS-Tween で同様に洗浄し、二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG ヤギ IgG 抗体 (ベクターラボラトリー) を PBS (0.02% NaN₃, 1 mg/ml BSA を含む) に 10 μ g/ml の濃度となるように調製した溶液を 100 μ l ずつ加えて 2 時間反応を行った。二次抗体除去後、PBS-Tween で洗浄したウェルに 100 μ l のアルカリフォスファターゼ標識アビジン (ベクターラボラトリー) 溶液 (100 ユニット/90 ml PBS-BSA となるように調製) を加え、室温で 30 分反応させた後、酵素標識アビジン溶液を除去した。最後に、ウェルを PBS-Tween で洗浄した後 *p*-nitrophenylphosphate disodium を 0.5 mg/ml となるようにジエタノールアミン塩酸溶液 (pH9.8) に溶解した溶液 100 μ l ずつを基質として加え室温で酵素反応を行った。10 分後 5 N NaOH を 100 μ l ずつ添加して反応を停止し、405 nm の吸光度を測定した。

6) Der f 2 の構造安定性

Der f 2 蛋白質の熱安定性は、Der f 2 を 200 $\mu\text{g/ml}$ となるように 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) に溶解し、70 度で 30 分間加熱した後の IgE 結合活性を RAST-EIA 法で調べることにより測定した。凍結融解に対する安定性は 40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した Der f 2 の PBS 溶液 500 μl を、-20 度で 1 時間凍結後 37 度で融解、この操作を 3 回おこなって、IgE 結合活性を測定した。酸性条件下における安定性は 0.3 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) で平衡化した Der f 2 溶液を 4 度で一晩酸性条件下に置き、その後の IgE 結合活性を測定した。

7) トリプシン酵素消化に対する耐性

プロテアーゼ感受性を調べるため、各 Der f 2 組み換え体を 0.2 mg/ml となるように 50 mM NaCl を含む 14 mM トリス塩酸緩衝液、pH8.5 に溶解後、0.1 μg のトリプシンを加え、37 度で反応を行った。3 時間、6 時間、9 時間後に 10 μl ずつ反応液を採取し凍結保存することにより反応を停止した。これらのサンプルを SDS-PAGE に供して未消化蛋白質として残存する Der f 2 蛋白質量を比較した。

第三節

結果

1) コナヒョウニダニ虫体より精製した天然型 Der f 2 の多型

図 2-1 に示すように、コナヒョウヒダニより Der f 2 の cDNA としてクローニングした 3 種類の cDNA クローンは 1 箇所から 4 箇所のアミノ酸置換を有している。このような多型が実際に発現している Der f 2 蛋白質に存在することを確認するため、ダニ虫体より Der f 2 を精製した。図 2-2 に示すとおり、虫体由来 Der f 2 蛋白質のリシルエンドペプチダーゼ消化蛋白質のペプチドマップを行った。ペプチド断片のアミノ酸配列を調べた結果、ピーク 8 の中に含まれるペプチドと、ピーク 6、7 間に配列の多様性が存在していた。ピーク 8 は Ala56 から Lys82 までのペプチド断片を含んでいるが、76 残基目のアミノ酸として、Met と Val が、約 4 対 3 の比率で存在していることが判明した。図 2-2 に示すとおり、ピーク 6 と 7 はいずれも Cys8-Cys119 間の S-S 結合で架橋された 2 本のペプチド断片、Asp7 から Lys14 までと Leu110 から Lys126 まで、を含んでいた。ピーク 6 の画分に含まれていたのは 111 番目のアミノ酸残基と 125 番目のアミノ酸残基が各々 Val と Ala であるペプチドであった。一方、ピーク 7 画分として回収されたペプチドでは 111 番目と 125 番目は Ile と Gly であった。111 番目のアミノ酸残基の分子数比は Ile 対 Val がおよそ 7 対 9 の割合であった。125 番目については、Gly と Ala の存在比がほぼ 1 対 1 の割合であった。ピーク 2 は Gly83 から Lys89 までのペプチドを含んでいたが、その配列を確認したところ 88 番目のアミノ酸残基として検出されたのは Ile のみであった。しかし、V8 プロテアーゼ消化ペプチドのペプチドマップを行った結果、88 番目のアミノ酸残基が Ala のペプチドも存在していることが明らかとなった (data not shown)。これらの結果から、少なくとも 2 種類の多型が *D. farinae* 虫体中に存在することが Der f 2 蛋白質においても確

	10	20	30	40	50
Clone 1	DQVDVKDCANNEIKKVMVDGCHGSDPCIHRGKPFLEALFDANQNTKTA				
Clone 2	-----				
Clone 11	-----				

	60	70	80	90	100
	KIEIKASLDGLEIDVPGIDTNACHFVKCPLVKGQQYDIKYTWNVPKIAPK				

			M	-----	

			M	A	-----

	110	120	129
	SENVVVTVKLIGDNGVLACAIATHGKIRD		

			A
	V	-----	

図2-1 Derf2の3クローン型cDNA塩基配列より予想されるアミノ酸配列^{1,2)}。

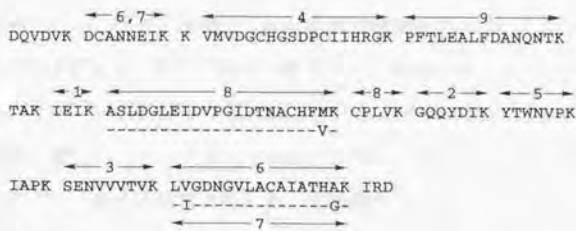
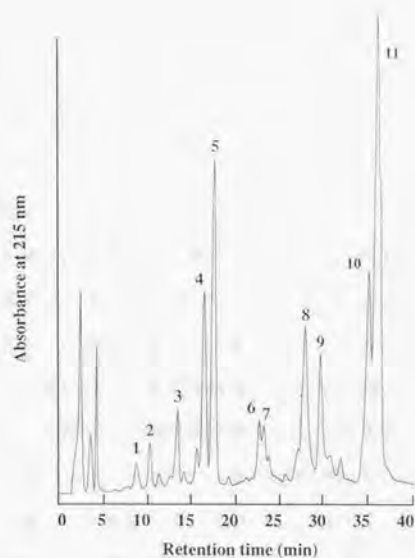


図 2-2 天然型 Der f 2 のリシルエンドペプチダーゼ消化産物の
 ペプチドマップ。
 アミノ酸配列上に記した数字はクロマトグラム上の数字
 と一致している。

認された。

2) Der f 2 組み換え蛋白質の S-S 結合位置決定

3 種類の Der f 2 クローンを T7 プロモーター制御下の発現系で大腸菌体内で産生させ、前節で記したとおり精製標品を得た。Der f 2 は、還元アルキル化によって IgE 結合活性が著しく低下する事が報告されていることから³⁹⁾、組み換え蛋白質においてもその特性を調べるに当たって、まず天然型と同じ S-S 結合の形成を確認することが必要であった。既に第二章で示したように天然型 Der f 2 は Cys8-Cys119、Cys21-Cys27、Cys73-Cys78 という 3 組の S-S 結合を形成していることを確認しているが⁴⁰⁾、組み換え大腸菌を用いて作製した Der f 2 蛋白質 3 種類についてもペプチドマップ、アミノ酸配列決定と同様の方法で、S-S 結合の確認を行った。その結果は、図 2-3 に示すとおりである。各クローン型 Der f 2 のリシルエンドペプチダーゼ消化産物の HPLC クロマトグラムは基本的に天然型の場合と同じパターンを示している。これらの各ピークより回収されたペプチド断片の同定を行った。天然型をリシルエンドペプチダーゼ消化した場合には、24 分に Cys8-Cys119 の S-S 結合で架橋された 2 本のペプチド断片が、27 分には Cys73-Cys78 間の架橋で連結された 2 本のペプチドが溶出されていた。組み換え蛋白質についても天然型とほぼ同じ時間に溶出されたこれらのペプチド画分についてアミノ酸配列の決定を行い、2 つの S-S 結合、Cys8-Cys119、Cys73-Cys78 が形成されていることを確認した。Cys21-Cys27 につい

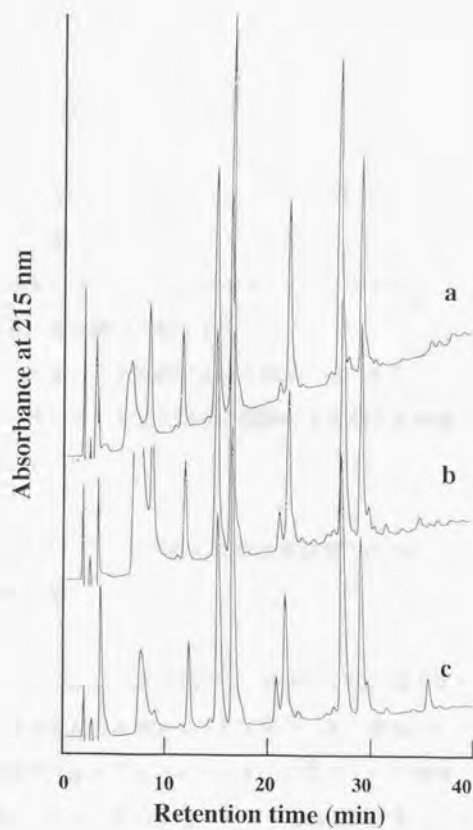


図 2-3 Derf2 組換え体 3 クローン型のリシルエンドペプチダーゼ消化産物の HPLC クロマトグラム。

a ; クローン 1、b ; クローン 2、c ; クローン 11

ては、リシルエンドペプチダーゼ消化の場合、Val16 から Lys33 の1本のペプチドの中に存在している。そこでCys21-Cys27間のS-S結合が形成されていることは、これらのアミノ酸残基を含むペプチド断片の溶出時間によって判断した。すなわち、これらのS-S結合が形成されているとVal16からLys33のペプチドは17分に溶出されるが、還元化によってCys残基がS-S架橋せずにSH基がフリーの状態にある場合にはこのペプチドは16.5分に溶出される。組み換え蛋白質由来のCys21、Cys27を含むペプチド断片は、いずれもS-S架橋状態の溶出時間に溶出されている。これらのことから、大腸菌を用いて作製し、変性剤による可溶化、再生操作を行ったDerf2蛋白質はいずれも天然型と同じ3種類のS-S結合を形成していることが確認された。

3) 野生型および組み換えDerf2蛋白質の抗Derf2ヒトIgE抗体との結合活性

抗Derf2IgE抗体を持つアトピー性皮膚炎及び喘息のアレルギー性疾患患者血清をもちいてヒトIgEと各Derf2蛋白質の結合活性を調べた結果を図2-4に示す。少なくとも2種類の多型を持つ天然型Derf2と、各Derf2クローンのIgE結合様式はほとんど一致していた。更に異なる13名のアレルギー患者血清を用いて同様の測定を行ったが、蛋白質間のIgE結合性の差異は認められなかった。

4) 抗Derf2マウスmAbと3クローン型Derf2の結合活性

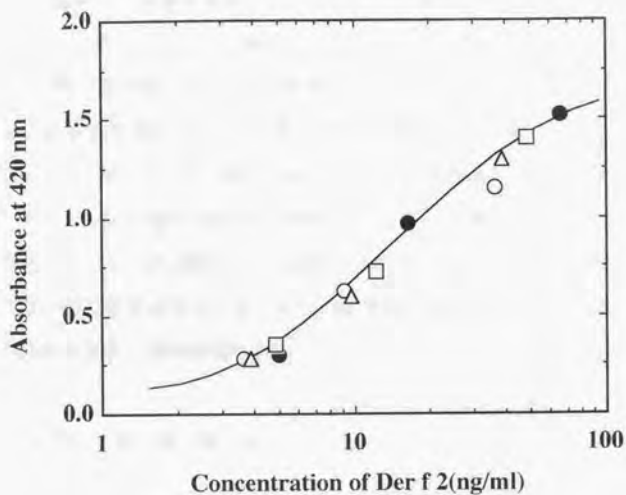


図 2-4 天然型 Der f 2 及び Der f 2 組換え体 3 クローン型の抗 Der f 2 ヒト IgE 結合活性。

天然型 Der f 2 (●)、クローン 1 (○)、
クローン 2 (△)、クローン 11 (□)

Der f 2 の多型が抗 Der f 2 マウス mAb, 15E11, 13A4, 18G8⁴⁴⁾との結合に影響を及ぼす可能性について調べた。図 2-5 に示したのは、ELISA プレートに添加した Der f 2 蛋白質濃度に対する、405 nm の吸光度の値である。この吸光度は、Der f 2 に結合している mAb 蛋白質量と比例するパーオキシダーゼ酵素活性を表している。mAb15E11 はクローン 1 型の Der f 2 に対して最も高い特異性を示し、次にクローン 2 型への結合力が高く、クローン 11 型への特異性は最も低くなっている。他の 2 つの mAb, 13A4 と、18G8 については 15E11 の様な顕著な差は見られないが、13A4 ではわずかにクローン 2 型への特異性が高い傾向が見られる。

5) Der f 2 蛋白質の安定性

加熱、凍結、酸性条件下においた Der f 2 蛋白質のヒト IgE 結合活性を測定した。図 2-6 に示すとおり、これらの処理を行った後も Der f 2 はヒト IgE との結合活性を有していた。これら 3 種類のクローン型のうち、クローン 2 型が安定性が最も高いことが判明した。次に、トリプシン消化に対する耐性も、3 クローンについて検討した結果を図 2-7 に示す。9 時間トリプシン消化後、クローン 11 型は約半分の蛋白質が分解されているのに対し、クローン 2 型はほとんどの蛋白質が残存している。デンストメーターを用いて図 2-7 に示した蛋白質量を測定した結果、9 時間トリプシン処理後のクローン 1, 2, 11 の残存 Der f 2 蛋白質量は、それぞれ、71、

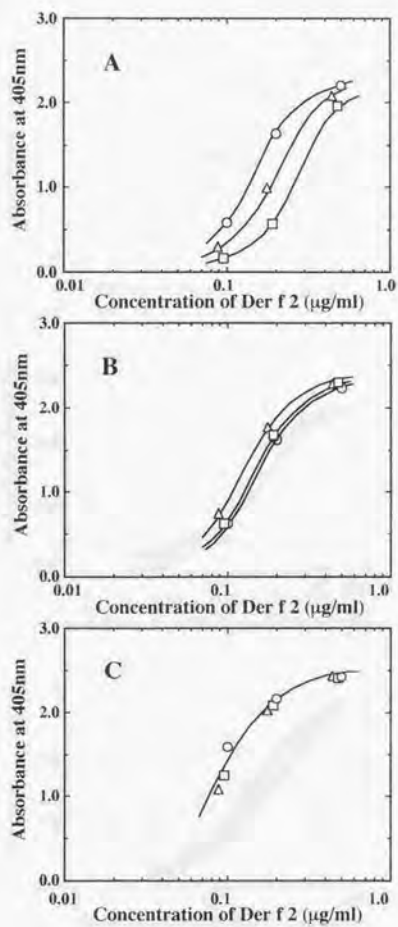


図 2-5 抗 Der f2 マウス mAb の Der f2 組換え体 3 クローン型に対する結合活性。

A; 15E11, B; 13A4, C; 18G8.

クローン 1 (○)、クローン 2 (△)、クローン 11 (□)

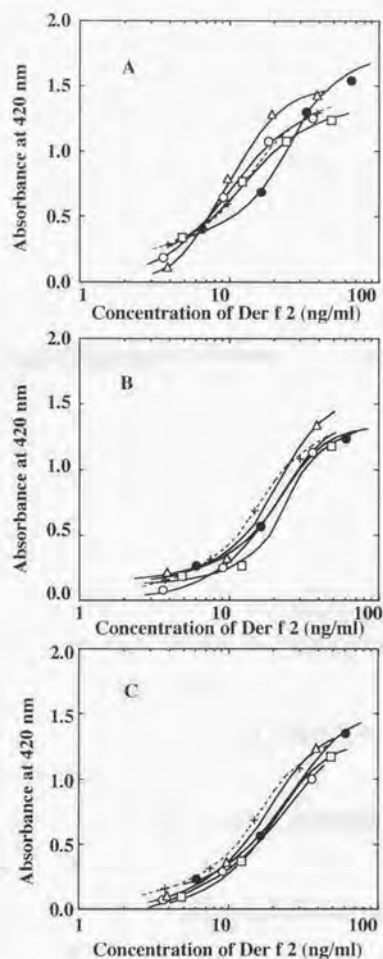


図 2-6 加熱、凍結融解、酸処理後の野生型 Der f 2 及び Der f 2 組換え体 3 クローン型に対するヒト IgE 結合活性。

A ; 加熱処理、B ; 凍結融解、C ; 酸処理

処理前の野生型 Der f 2 (+)、処理後野生型 (●)、

クローン 1 (○)、クローン 2 (△)、クローン 11 (□)



図 2-7 3 クローン型 Der f 2 のトリプシン消化に対する耐性。

レーン M ; 分子量マーカ、

レーン 1、2、3 ; トリプシン消化前のクローン

1、2、11 型、

レーン 4、5、6 ; トリプシン処理 3 時間後のクローン

1、2、11 型、

レーン 7、8、9 ; トリプシン処理 6 時間後のクローン

1、2、11 型、

レーン 10、11、12 ; トリプシン処理 9 時間後のクローン

1、2、11 型、

デンストメーターを用いて測定した蛋白質量の相対値は、

レーン 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 が各々

100、100、100、99、102、55、82、91、36、71、82、31%

82、31%であった。

第四節

考察

Der f 2 はヒト IgE 抗体と結合する主要アレルゲン蛋白質の一つとしてハウスダストマイトより精製された蛋白質である⁵⁻⁷⁾。ダニ虫体より精製した Der f 2 を SDS-PAGE に供すると第一章でも述べたように Der f 2 は 1 本のバンドとして検出される。しかし、等電点電気泳動に供すると、検出されるバンドは 2 本となり、また、HPLC においても、2 本の近接したピークとして溶出される (data not shown)。これらのことから、ダニ虫体由来の Der f 2 には少なくとも 2 種類存在する可能性が示される。一方、我々がクローニングした Der f 2 の cDNA には、129 アミノ酸のうち最大 4 カ所でアミノ酸の置換が見られる 3 種類のクローン型が存在していた (図 2-1)。この多型を確認するために、虫体より精製した Der f 2 の、リシルエンドペプチダーゼ及び V8 プロテアーゼ消化産物を HPLC に供し、回収したペプチド断片すべてについてアミノ酸配列の決定を行った。その結果、76 番目、88 番目、111 番目、そして 125 番目の 4 箇所のアミノ酸残基にアミノ酸のパラエティーが存在する少なくとも 2 種類の多型が認められた。Der f 2 の cDNA 塩基配列より予想されるアミノ酸配列によると、クローン 1 型は、76 番目、88 番目、111 番目、125 番目のアミノ酸残基が各々 Val, Ile, Ile, Gly となっており、クローン 2 型では 1 型と 1 箇所、76 番目のアミノ酸残基が Met となっている点が異なっている。クローン 11 型ではこれら 4 カ所のアミノ

酸残基は、Met, Ala, Val, Alaとなっている。今回 Der f 2 蛋白質のなかに発見された多型は 3 種類の cDNA クローン型の配列と矛盾しないものであった。

Der f 2 には多型が存在しているが、これらのバリエーションが例えば Der f 2 の IgE 反応性、ひいてはアレルギー反応を引き起こすアレルゲン性の程度、または蛋白質の安定性といった特性に影響を及ぼしている可能性も考えられる。一方、我々は Der f 2 の cDNA を 3 クローン取得していたことから、組み換え遺伝子操作技術を用いて Der f 2 を大腸菌体内に発現させ、3 種類の異なるクローン型 Der f 2 の特性を比較することを試みた。組み換え大腸菌を用いて作製した Der f 2 は 3 クローン型とも Der f 2 の立体構造やアレルゲン性の保持に重要である S-S 結合を、天然型と同じ組み合わせで 3 つとも形成していた。また、蛋白質の二次構造の指標となる CD スペクトルについても 3 クローン型とも天然型と同じパターンを示していた (data not shown)。これらのことから、組み換え大腸菌を用いて作製した Der f 2 は、天然型 Der f 2 と同じ立体構造をとっていると判断し、Der f 2 の一次配列の多様性がアレルゲンとしての活性に影響を及ぼしている可能性を調べるため、ヒト IgE 抗体によるこれらの Der f 2 蛋白質の結合力を RAST-EIA 法を用いて測定した。その結果、図 2-4 に示すとおり、各 Der f 2 蛋白質のヒト IgE 結合活性に差は認められなかった。更に、ブリックテスト法で、これら 3 クローン型の Der f 2 組み換え蛋白質と天然型 Der f 2 のアレルゲン性を比較したが、やはり同程度の反応性を示した (data not shown)。これらのことから、ヒト IgE 抗体は、Der f 2 蛋白質のアミノ酸配列に多様性の現れている領域を直接認識していない、或いは、バリエーションの現れ

ている領域を直接に、またはその近傍を認識しているが今回調べたアミノ酸置換が Der f 2 のヒト IgE 抗体による結合に影響を及ぼす変異ではない、といった可能性が考えられる。この仮説を検証するために、次章で述べるように Der f 2 に部位特異的変異法を用いてアミノ酸置換を導入し、IgE エピトープ部位の検索をおこなった。

図 2-5 の結合曲線が示すように、mAb15E11 は Der f 2 のアミノ酸の多型が存在している領域を認識していると予想される。既に我々は、Der f 2 蛋白質の検出・定量を行うため、15E11 を固相吸着させ、13A4 を二次抗体として用いた Sandwich ELISA 系を確立している¹⁴⁾。この ELISA でクローン 1、2、11 各 Der f 2 蛋白質の定量を行うと、クローン 2、11 は、クローン 1 と比べて抗体との反応性が各々約 1/2、1/5 に低下していることが判明した (data not shown)。13A4 については、各クローン型との結合活性に大きな差が見られなかったことから、この Sandwich ELISA の結果は、15E11 抗体の結合力の差によるものと考えられる。クローン 1 型と 2 型では、76 番目のアミノ酸残基がそれぞれ Val、Met となっている以外は、同じアミノ酸配列である。従って、クローン 1 型が 15E11 に最も強く結合されるのは、76 番目のアミノ酸残基 Val がこの mAb のエピトープ形成に重要であることを示唆している。更に、15E11 は Der f 2 を特異的に認識し、Der f 2 と 88% の高い相同性を示す Der p 2 とは結合しない蛋白質であるが、Der p 2 では 76 番目のアミノ酸残基は、クローン 2 型や 11 型と同じ Met である¹¹⁾。これらのことから 15E11 は、Der f 2 蛋白質の 76 番目のアミノ酸残基周辺を認識していると推定される。Der f 2 欠失体と抗 Der f 2 マウス mAb の結合活性をウェスタンブロッティング法を用いて解析した結果からも、15E11 は 67 番

目から 90 番目のアミノ酸残基をエピトープとしていることが示唆されている⁴⁶⁾。一方、図 2-5 に示した 15E11 の結合活性を見ると、クローン 2 型と 11 型についてもわずかだが明らかに結合力に差が見られる。クローン 2 型と 11 型では 67 番目から 90 番目のアミノ酸残基の中では 88 番目のアミノ酸残基に置換が見られることから(クローン 2 型では Ala で、クローン 11 型では Ile となっている)、15E11 が Der f 2 蛋白質の 76 番目と 88 番目のアミノ酸残基を含む領域をエピトープとしている可能性が考えられる。これら抗 Der f 2 マウス mAb のエピトープ領域についても第五章で部位特異的変異法を用いた解析を試みた。

虫体由来天然型 Der f 2 を HPLC に供すると 36.5 分と 37 分の近接した 2 本のピークとして溶出された (data not shown)。天然型 Der f 2 をリシルエンドペプチダーゼ消化後再び HPLC に供すると、36.5 分に溶出されていた画分の分解が 37 分に溶出されていた Der f 2 の分解より速やかにおこっている傾向が見られた。このことは、安定性の高い Der f 2 蛋白質、クローン 1 型と 2 型が同じ条件下で 36.5 分に溶出され、安定性の最も低いクローン 11 型が 37 分に溶出されることに矛盾しない。従って、天然型 Der f 2 としてダニ虫体より精製された Der f 2 蛋白質の中にもクローン 1 型か 2 型、或いはその混合物の安定型 Der f 2 と、プロテアーゼに高感受性のクローン 11 型が存在している可能性が支持される。以上の結果から、129 アミノ酸中のわずか 4 アミノ酸の置換によって蛋白質の安定性が変化することも明らかとなった。

その後、我々のグループでは *D. farinæ* の染色体 DNA を鋳型とした PCR 法により、Der f 2 のゲノミック DNA の解析を行って

いる⁴⁷⁾。その結果、PCR で得られた Der f 2 のゲノミック DNA は、4 クローン型存在していた。そのうち 3 クローン型は cDNA で得られていたクローン 1、2、11 型と同じアミノ酸配列を持っていた。更に、新たに得られたゲノミッククローンは、76 番目のアミノ酸残基が Val、88 番目が Ala、111 番目が Val、125 番目が Ala という、クローン 1 型とクローン 11 型のキメラ様の配列をもつものであり、多型の見られるアミノ酸配列部位は cDNA の場合と同じ残基であった。また、サザンプロテイング解析の結果、Der f 2 遺伝子は *D. farinae* 染色体中一カ所に存在していることが判明した。すなわち、*D. farinae* が一個体中に Der f 2 の多型を持っているのではなく、各個体間でアミノ酸配列の異なる Der f 2 多型を持っていると推定される。

第三章 部位特異的変異を用いた Der f 2 のヒト IgE エピトープ検索

第一節 緒言

アレルギー反応は、マスト細胞や好塩基球上に発現している高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) が IgE 抗体を結合し、さらにその IgE 抗体が多価抗原によって架橋されることによって細胞の活性化が起こり、細胞からのヒスタミン等の化学伝達物質の放出が引き起こされることによって発症する¹⁾。したがって、IgE 抗体によって認識される抗原のエピトープは、アレルギー反応を制御するかぎとなる領域である。

D. farinae 由来のアレルゲン蛋白質 Der f 2 は、*D. pteronyssinus* 由来の Der p 2 と 88% という高い相同性をもつ蛋白質で、共にダニ感受性アレルギー患者血清中 IgE と高頻度で反応する主要アレルゲン蛋白質の一つグループ 2 アレルゲンに分類されている¹¹⁻¹²⁾。グループ 2 アレルゲンのうち、Der p 2 については患者血清由来のヒト IgE 抗体が認識するエピトープ領域について検索を行った報告がある。一つは、Der p 2 のアミノ酸一次配列を基に作製した合成ペプチドを用いて IgE 結合領域を検索した報告であり、Der p 2 の一次配列上中間部分が IgE 結合活性を持つ領域として同定されているが、その IgE 結合活性はインタクトな Der p 2 に比べてきわめて低いものであった³²⁾。また、Der p 2 の cDNA を用いて IgE エピトープを検索した例もある。そこでは、様々に欠失した Der p 2 の cDNA

をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子下に挿入した発現プラスミドベクターを用いて大腸菌体内に融合蛋白質として発現させた後、IgE 結合領域を検索しているが、明らかに IgE との結合活性を持つ蛋白質は得られていない³³⁾。このようにペプチド断片を用いて IgE 結合領域を特定する試みで明らかな結果が得られない原因の一つに IgE 抗体が Der f 2 の一次配列上離れた、高次構造上近傍に存在している部位を認識している可能性が考えられる。第一章で示したとおり、天然型 Der f 2 には、Cys8-Cys119、Cys21-Cys27、Cys73-Cys78 という組み合わせで3つの S-S 結合が存在しているが、第二章で示したとおり、組み換え大腸菌を用いて作製した Der f 2 蛋白質は少なくとも天然型と同じ3つの S-S を形成し、IgE 結合活性も同等であることが確認されている。部位特異的変異法は、蛋白質に大きな構造変化を引き起こさずに特定のアミノ酸を異なるアミノ酸に置換しうることから、蛋白質の構造-機能相関を調べるのに適した方法であると考えられる。Der f 2 蛋白質にアミノ酸変異を導入することによって、ペプチド断片で再構成しにくい Der p 2 の IgE 認識部位のような高次構造を含めたエピトープについての情報が得られると期待される。本章では、Der f 2 の N 末端側及び C 末端側アミノ酸の欠失体に加えて、部位特異的変異法を用いてアミノ酸置換を導入した変異体についてヒト IgE 結合活性を調べることにより、IgE エピトープ部位の構成に必要な領域の特定を行った。

第二節 方法

1) Der f2 欠失体発現プラスミドベクターの構築

Der f2 欠失体を作製するのに用いたオリゴヌクレオチド (表3-1) は、アプライド・バイオシステムズ 381A DNA シンセサイザーを用いて合成した。Der f2 欠失体の作製は PCR 法を用いて行った。PCR の鋳型として用いた野生型 Der f2 発現プラスミド pFLT11^{3,8)} は図3-1に示すとおり、T7 プロモーター制御下で野生型 Der f2 を発現するように pGEMEX1 (プロメガ) に Der f2 の cDNA を導入したプラスミドである。PCR はサーマルサイクラー RC-700 を用いて、94 度 1 分、37 度 2 分、72 度 3 分の温度変化を 25 回繰り返す条件で行った。オリゴヌクレオチド R1 は pFLT11 の *Hind*III 部位の下流域に相補的な配列となるように設計し、N 末端側の欠失体作製に用いた。N 末端側アミノ酸を各々 3 アミノ酸、5 アミノ酸、10 アミノ酸、15 アミノ酸、20 アミノ酸欠失した欠失体 N3、N5、N10、N15、及び N20 を作製する際もう一方のプライマーとして用いた合成オリゴヌクレオチドは各々 F-N3、N5、N10、N15、及び N20 である (表3-1)。得られた PCR 産物は制限酵素 *Nde*I 及び *Hind*III で切断後、*Nde*I、*Hind*III 切断した pGEMEX1Δ*Nde*I (pGEMEX1 を *Nde*I で部分消化切断後、T4DNA ポリメラーゼで平滑末端化反応を行うことによって、2 つある *Nde*I 認識部位のうち、T7 プロモーター直下の部位のみ残存させたプラスミドベクター) に挿入した。このようにして N 末端側アミノ酸欠失体発現プラスミド pFLT_N3、5、10、15、20 を得た。C 末端側アミノ酸欠失体の作製には、pFLT11 上 Der f2 の開始コドンの上流約 130 bp の位置と同じ配列の合成オリゴヌクレオチド F1 と R-C5、C6、あるいは C7 を組み合わせて PCR に

表 3-1 欠失体作製に用いた合成オリゴヌクレオチド。

Oligonucleotide	Sequence
<i>Nde</i> I	
F-N3	5'-CCCATATGGATGTTAAAGATTGTGCCAAC-3'
F-N5	5'-GGCATATGAAAGATTGTGCCAACAAATGAA-3'
F-N10	5'-CCCATATGAATGAAATCAAAAAAGTAATG-3'
F-N15	5'-GCCATATGGTAATGGTCGATGGTTGCCAC-3'
F-N20	5'-CGCATATGTGCCACGGTTCTGATCCATGC-3'
<i>Hind</i> III	
R-C5	5'-CGCAAGCTTAGTGGGTAGCAATAGCGCAAGCCAA-3'
R-C6	5'-GCGAAGCTTAGGTAGCAATAGCGCAAGCCAA-3'
R-C7	5'-GCGAAGCTTAAGCAATAGCGCAAGCCAAAAC-3'
R1	5'-ATCAAGCTGGGATTTAGGTG-3'
F1	5'-CCGATTCATTAATGCAGCCC-3'

開始コドン、終止コドンへの変異は、それぞれ F-N3 から F-N20、R-C5 から C7 配列中太字で記した。制限酵素の認識配列はアンダーラインで示した。

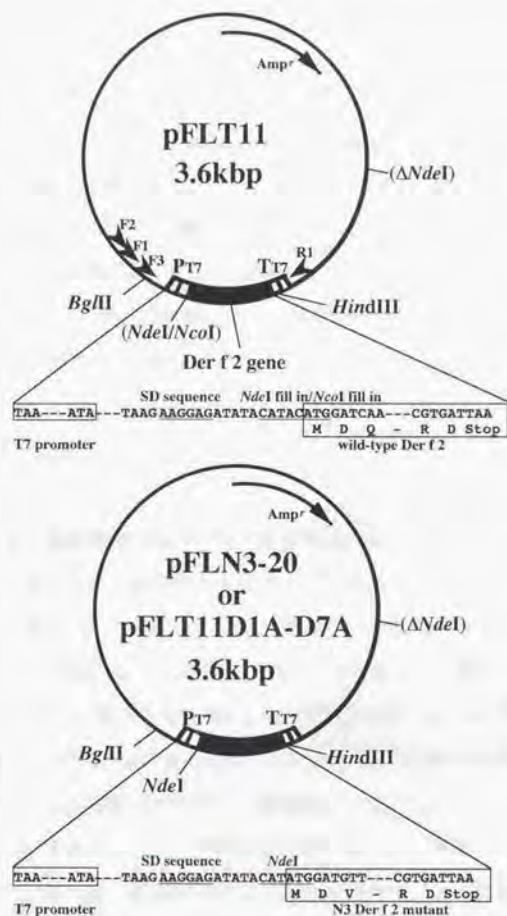


図 3-1 Derf 2 (クローン 11) の cDNA をコードする発現プラスミド pFLT11 と N 末端側欠失体 (N3-20) 及び N 末端アミノ酸置換体 (D1A-D7A) の模式図。
P_{T7}, T_{T7} はそれぞれ、T7 プロモーター、T7 ターミネーターを示す。プライマー F1、F2、F3、R1 のアニーリング位置は各々矢印で示した。

用いた。C末端側欠失体用のPCR産物を制限酵素 *Bgl*III と *Hind*III で切断後、同酵素処理した pFLT11 に連結して発現プラスミド pFLTC5、C6、およびC7を作製した。他の2つの欠失体N24 (N末端側4アミノ酸欠失体) とC9 (C末端側9アミノ酸欠失体) はエクソヌクレアーゼIIIを用いて作製した^{4,6)}。以上のように作製した欠失体の模式図は図3-2に示す。

2) 部位特異的変異

アミノ酸置換体作製のための部位特異的変異に用いた合成オリゴヌクレオチドの一覧を表3-2に示す。N末端側1番目から7番目のアミノ酸のAlaへの変異と、C末端側アミノ酸123番目から129番目のアミノ酸のAlaへの変異は、前述の欠失体作製の場合と同様のPCR法を用いて導入した。更に、N末端側9番目から20番目のアミノ酸と、中間部分の70番目から81番目、C末端側に位置する114番目から122番目までのアミノ酸残基 (Cys73、Cys78、Cys119を除く) のAlaあるいはLeuへの変異には以下に示す二段階のPCRを用いた^{4,8)}。例えば、10番目のアミノ酸残基AsnをAlaに置換した変異体を作製する場合、プライマーF3とR1、プライマーF2とR-N10Aという2通りの組み合わせで、pFLT11を鋳型にしたPCRを行い、2種類のPCR産物を得た。プライマーF3とR1を用いて増幅されたDNA断片はpFLT11に本来存在していた*Bgl*III部位に変異が導入されており、*Bgl*IIIでの切断が行われなくなっている。

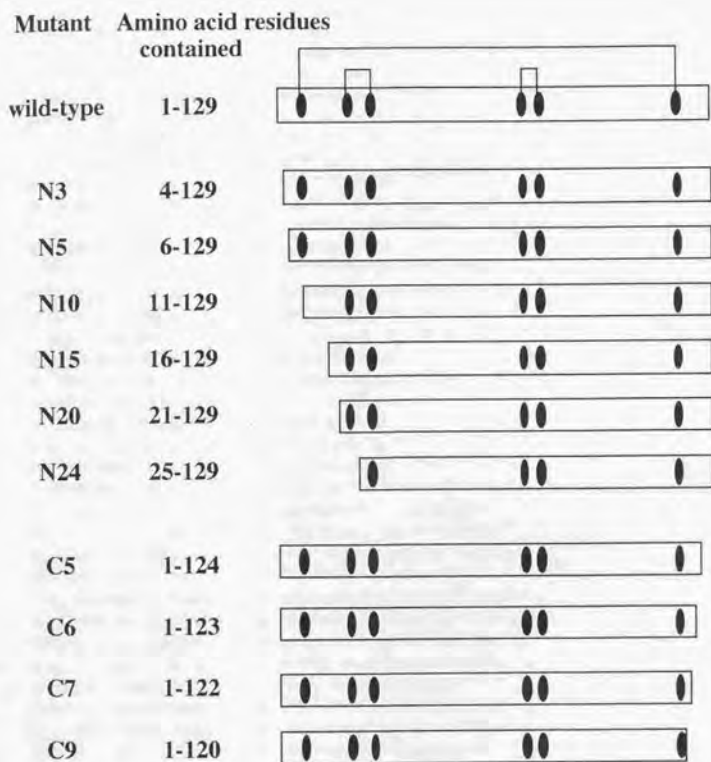


図 3-2 作製した Der f 2 の N 末側及び C 末側欠失体の模式図。
 黒い楕円は Cys 残基を示す。Der f 2 の 3 つの S-S 結合は、
 直線で連結して示した。

表 3-2 変異体作製に用いた合成オリゴヌクレオチド。

Oligonucleotide (Mutation)	Sequence ^{a)}
<i>Nde</i> I	
F-D1A (Asp1Ala)	5'-GGCATATGGCTCAAGTCGATGTTAAAGAT-3'
F-Q2A (Gln2Ala)	5'-CCCATATGGATG CAGTCGATGTTAAAGAT-3'
F-V3A (Val3Ala)	5'-GCCATATGGATCAAGCCGATGTTAAAGAT-3'
F-D4A (Asp4Ala)	5'-CGCATATGGATCAAGCCGCTGTTAAAGAT-3'
F-V5A (Val5Ala)	5'-GGCATATGGATCAAGTCGATGCTAAAGATTG-3'
F-K6A (Lys6Ala)	5'-CCCATATGGATCAAGTCGATGCTG CAGATTGTG-3'
F-D7A (Asp7Ala)	5'-GCCATATGGATCAAGTCGATGCTAAAGCTTGTGC-3'
R-A9L (Ala9Leu)	5'-CATTTGTTGA GACAATCTTT-3'
R-N10A (Asn10Ala)	5'-GATTTTCATTGG CGGCACAATC-3'
R-N11A (Asn11Ala)	5'-TTTGATTTCAG CGTTGGCACA-3'
R-E12A (Glu12Ala)	5'-TTTTTTGATTGCATTGTTGG-3'
R-I13A (Ile13Ala)	5'-TACTTTTTTGG CTTCATTGTT-3'
R-K14A (Lys14Ala)	5'-CATTACTTTTG CGATTTCATT-3'
R-K15A (Lys15Ala)	5'-GACCATTACTG CTTTGATTTC-3'
R-V16A (Val16Ala)	5'-ATCGACCATTG CTTTTTGA-3'
R-M17A (Met17Ala)	5'-ACCATCGACCG CTACTTTTTTG-3'
R-V18A (Val18Ala)	5'-GCAACCATCGGCCATTACTTT-3'
R-D19A (Asp19Ala)	5'-GTGGCAACCAGCGACCATTAC-3'
R-G20A (Gly20Ala)	5'-ACCGTGGCAAGCATCGACCAT-3'
R-T70A (Thr70Ala)	5'-CAAGCATGGCATCGATAC-3'
R-N71A (Asn71Ala)	5'-TGGAAGCAG CGGTATCGA-3'
R-A72L (Ala72Leu)	5'-AAATGGCAA GATTGGTATCG-3'
R-H74A (His74Ala)	5'-TTCATAAAG CGCAAGCAT-3'
R-F75A (Phe75Ala)	5'-CATTTCCATAG CATGGCAAG-3'
R-M76A (Met76Ala)	5'-GGACATTCG CAAAATGGC-3'
R-K77A (Lys77Ala)	5'-AATGGCATG CCATAAAT-3'
R-P79A (Pro79Ala)	5'-TTAACCAATGCACATTTCA-3'
R-L80A (Leu80Ala)	5'-CCTTTAACCG CTGGACATT-3'
R-V81A (Val81Ala)	5'-TGACCTTTAG CCAATGGAC-3'
R-N114A (Asn114Ala)	5'-CAAAACACCG CATCACCCAA-3'
R-G115A (Gly115Ala)	5'-AGCCAAAACAGCATTATCACC-3'
R-V116A (Val116Ala)	5'-GCAAGCCAAAGCACCATTATC-3'
R-L117A (Leu117Ala)	5'-AGCCCAAGCCG CAACACCATTA-3'
R-A118L (Ala117Leu)	5'-TAGCCGAAA GCAAAACACC-3'
R-A120L (Ala120Leu)	5'-GGTAGCAATAA GGCAAGCCAA-3'
R-I121A (Ile121Ala)	5'-GTGGGTAGCAG CAGCCGAAGC-3'
R-A122L (Ala122Leu)	5'-GCGTGGGTAA GAATAGCGC-3'
<i>Hind</i> III	
R-T123A (Thr123Ala)	5'-CGCAAGCTTAATCACGGATTTAGCGTGGGCAGCAA-3'
R-H124A (His124Ala)	5'-GCGAAGCTTAATCACGGATTTAGCGG CGGTAGC-3'
R-K126A (Lys126Ala)	5'-GCGAAGCTTAATCACGGATTG CAGCGTGGG-3'
R-I127A (Ile127Ala)	5'-GCGAAGCTTAATCACGGG CTTTAG-3'
R-R128A (Arg128Ala)	5'-GCGAAGCTTAATCAG CGATTTT-3'
R-D129A (Asp129Ala)	5'-GCGAAGCTTAAGCACGGAT-3'
R1	5'-ATCAAGCTGGGATTTAGGTG-3'
F1	5'-CCGATTCATTAATGCAGCCC-3'
F2	5'-CCCCGCGGTTGGCCGATTC-3'
F3	5'-GCCCGGGAGTTCTCGATCCC-3'
Δ B β III	

^{a)}アミノ酸置換のため導入した塩基配列の変異は太字で、制限酵素の認識配列はアンダーラインで示した。

もう一方のプライマー-F2 と R-N10A を用いて得られた DNA 断片は Der f 2 の 10 番目のアミノ酸残基 Asn が Ala に置きかわるように変異が導入されている。これら 2 種類の PCR 産物を混合後、94 度、10 分間の加熱で DNA の変性を行い、30 分間で 37 度まで緩やかに冷却することにより DNA のアニーリングを行った。更に 15 分間 37 度で保持した後、Taq DNA ポリメラーゼを添加し、60 度で 3 分間インキュベートして伸長反応して相補的な DNA を形成した。このようにして得られた二本鎖 DNA を鋳型とし、プライマー-R1 と F1 を用い、PCR (94 度 0.5 分、55 度 2 分、72 度 1 分、の温度変化の 10 回繰り返し)を行った。この PCR 産物を *Bgl*III と *Hind*III で切断後、pGEMEX1 に導入した。以上の二段階 PCR 反応の結果得られる DNA 断片では、Asn10 の Ala への変異が導入されている場合 *Bgl*III 認識配列が残っている一方、野生型の場合 *Bgl*III 部位に変異が導入されているため、制限酵素処理によって Der f 2 変異体が選択的にクローニングされる。

すべての Der f 2 変異体の塩基配列は、サンガーらの方法に従ってアプライド・バイオシステムズ DNA シークエンサー-370A を用いて確認を行った⁴⁹⁾。

3) 組み換え Der f 2 蛋白質の発現及び精製

野生型 Der f 2 及びすべての変異体は、第二章で行ったように大腸菌 BL21(DE3)を用いて発現させたが、いずれも菌体内に封入体として蓄積された。これらの不溶化蛋白質は、6 から 8 M の尿素を加えて可溶化し、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH9.0) 中で透析操作を行った。再生後、野生型 Der f 2、変異体とも第二章で行ったよ

うに DEAE-Toyopearl (トーソー) を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製を行った。

4) IgE 結合活性

以下の IgE 結合活性測定に用いたヒト IgE 抗体は、抗 Der f 2-IgE 抗体をもつアトピー性皮膚炎及び喘息のアレルギー患者血清由来である。Der f 2 変異体とヒト IgE 抗体の結合活性測定は、第二章で用いた RAST-EIA 法にて行った。

5) 阻害活性測定

Der f 2 のヒト IgE 結合活性について、上述の RAST-EIA 法の変法である阻害活性測定法を用いての測定も行った。異なる濃度に調製した Der f 2 変異体溶液と終濃度 25% となるように希釈した患者血清の混合溶液 50 μ l を各々室温で 2 時間反応させた後、50 ng/ml の野生型 Der f 2 溶液 50 μ l を用いて Der f 2 抗原を固定化・洗浄したペーパーディスクに添加し、37 度にて 3 時間インキュベーションを行った。この過程で液層中の変異体に結合した IgE 抗体は、固相に固定化した野生型 Der f 2 に結合することなく除かれる。続く抗ヒト IgE 抗体添加以降の操作は通常の RAST-EIA と同様に行う。この結果、最終的に検出される IgE 量は、Der f 2 変異体に結合しなかった抗体と考えられる。すなわち、固相に吸着しなかった IgE 抗体の、最初に添加した IgE に対する量比を阻害活性 (%) として表した。

第三節 結果

1) Der f 2 変異体の精製

Der f 2 欠失体及び変異体はT7 プロモーター制御下の誘導発現系を用いて大腸菌 BL21(DE3)株内に封入体として産生された。これらの Der f 2 変異体は6から8 M 尿素で可溶化後、続く透析操作で再生し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った。3組の S-S 結合、Cys8-Cys119、Cys21-Cys27、Cys73-Cys78⁴⁰⁾ は Der f 2 蛋白質の構造安定化のみならず、アレルゲン性の発現にも重要である³⁹⁾。リシルエンドペプチダーゼ消化 Der f 2 のペプチドマップの結果、全てのアミノ酸置換体と、欠失体のうち N3、N5、C5、C6、及び C7 については3つの正しい S-S 結合を形成していることが確認されている。それ以外の Der f 2 欠失体のなかで N10、N15、N20、N24 は、1つ、或いは2つの天然型 Der f 2 と同じ S-S 結合を保持していた。欠失体 C9 については、そのほとんどは正しい架橋を形成していたが、一部、Cys8-Cys73 という天然型 Der f 2 には存在しない S-S 結合を形成している蛋白質が含まれていた (data not shown)。

2) Der f 2 欠失体の IgE 結合活性

N 末端側アミノ酸欠失体の IgE 結合活性を RAST-EIA を用

いて測定した結果を、図 3-3 に示す。この測定系では、抗原に結合した IgE 抗体の量は、 β -ガラクトシダーゼ活性として検出される。

N 末端側アミノ酸残基を欠失している Der f 2 変異体、N3 の IgE 結合様式は、野生型 Der f 2 とほとんど一致していた。N 末端側アミノ酸 5 残基を欠失している N5 の場合、N3 や野生型と比べてわずかな、しかし明らかな活性の低下が見られた。一方、N 末端側の欠失するアミノ酸残基数が、10、15、20、24 残基の欠失体の場合、IgE 結合活性は著しく低下していることが判明した。N 末端側アミノ酸欠失体 N10、N15、N20 の IgE 結合活性は、野生型の約 1/100、N24 の場合には、約 1/1000 にまで低下していた。

次に、C 末端側アミノ酸欠失体の IgE 結合活性を測定した。結果は図 3-4 に示す通り、欠失するアミノ酸残基数が増加するにつれて活性が低下していた例えば 0.01 mg/ml の C9 欠失体をペーパーディスクに結合した場合でも検出される β -ガラクトシダーゼ活性はわずかであった。

3) Der f 2 欠失体の阻害活性

野生型 Der f 2 と IgE の結合に対する Der f 2 欠失体の阻害活性を測定した結果を図 3-5 a、b に示す。N 末端欠失体、N5、N10、N15、N20、N24 と C 末端欠失体 C9 では、野生型と比べて阻害活性の低下が見られた。N 末端側アミノ酸 5 残基を欠失している N5 においても、50% の結合阻害活性を示すのに野生型の約 2 倍の 50 ng/ml の蛋白質濃度を必要としていた。その他の N 末端側アミノ酸

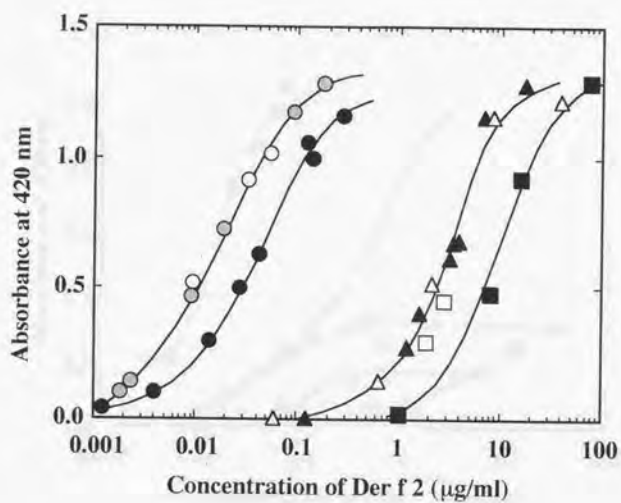


図 3-3 RAST-EIA 法を用いて測定した Der f 2 の N 末側アミノ酸欠失体のヒト IgE 結合活性。

野生型 Der f 2 (●)、N3 (○)、N5 (●)、N10 (△)、N15 (▲)、N20 (□)、N24 (■)

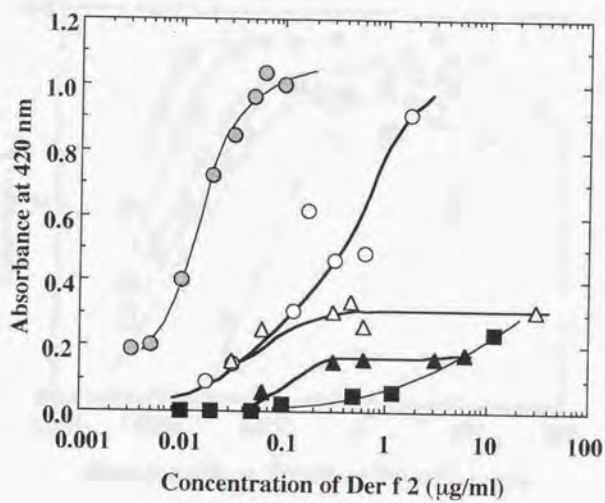


図 3-4 RAST-EIA 法を用いて測定した Der f 2 の C 末側アミノ酸欠失体のヒト IgE 結合活性。
 野生型 Der f 2 (●)、C5 (○)、C6 (△)、C7 (▲)、C9 (■)

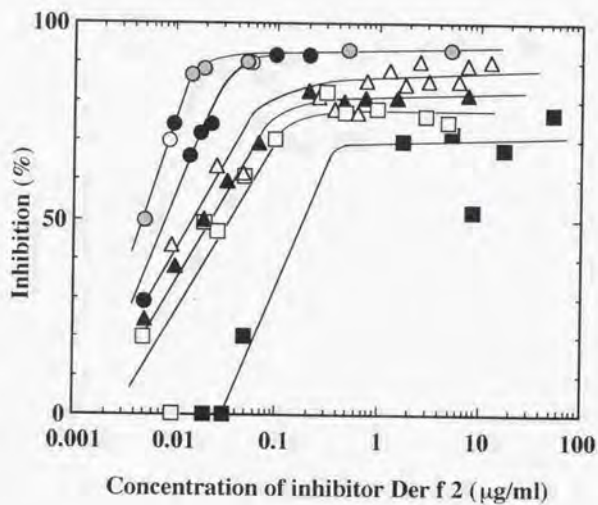


図 3-5a Der f 2 の N 末側アミノ酸欠失体のヒト IgE 結合阻害活性。

野生型 Der f 2 (○)、N3 (○)、N5 (●)、N10 (△)、
N15 (▲)、N20 (□)、N24 (■)

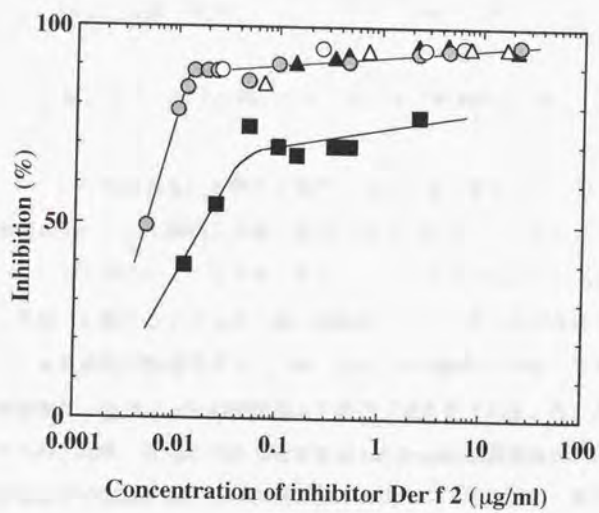


図 3-5b Der f 2 の C 末側アミノ酸欠失体のヒト IgE 結合阻害活性。
 野生型 Der f 2 (●)、C5 (○)、C6 (△)、C7 (▲)、
 C9 (■)

欠失体は、50%阻害活性を示すのに、更に高濃度の抗原蛋白質を必要としており、その濃度は欠失アミノ酸残基数が増えるに従って高くなることが確認された。C末端側アミノ酸欠失体ではC9で著しい阻害活性の低下が見られた。阻害活性測定は、固相に吸着させる野生型 Der f 2 量を固定して行ったがその結果は、前述の RAST-EIA 直接法の場合と同様の傾向を示していることが確認された。

4) IgE 結合活性における Der f 2 のアミノ酸残基置換の効果

欠失体を用いた解析の結果、Der f 2 蛋白質の N、C 両末端部位が IgE による認識に必要な領域である可能性が示された。しかし、ここで用いたような欠失を導入する方法では、Der f 2 の IgE 結合活性に影響するような蛋白質立体構造の大きな変化を引き起こしている可能性が否定できない。特に Der f 2 の場合 N 末端と C 末端両領域は、Cys8 と Cys119 間の S-S 結合で安定化されていると推定される。実際、欠失体 N24 の場合には Cys8-Cys119 間の S-S 結合のみならず Cys21-Cys27 の S-S 結合まで欠失しており、大きな構造変化が予想される。このような構造変化を小さく抑えて、N 末端 C 末端領域に存在すると推定される IgE エピトープを形成しているアミノ酸残基の特定を行うためにこれらの部位のアミノ酸残基を各々 Ala に（本来 Ala であった場合には、Leu）に置換した変異体を作製した。合成ペプチドを用いたエピトープ検索の実験から IgE エピトープの一つであると報告されている Der p 2 の中間部分 T70 から V81 までの部位についても^{3,21}、Der f 2 との相同性が高いことから N、C 末端領域に加えて部位特異的変異によるアミノ酸置換を導入し IgE

結合領域の検索に用いた。

全ての置換体の IgE 結合活性は RAST-EIA 直接法を用いて測定した。欠失体の場合と同様に描いた dose-response curve から、420 nm における吸光度が最大値の半分を示す蛋白質濃度を各変異体について調べ、その蛋白質濃度を各々野生型に対する比で示したのが、図 3-6 a, b, c である。多くの置換体で IgE 結合活性の低下が見られたが、N 末端側アミノ酸残基の置換で著しく活性が低下する傾向を示した。特に、一次配列上 Cys8 近傍に存在するアミノ酸残基の変異 (Asp7Ala, Ala9Leu, Asn10Ala) と、Lys15Ala, Asp19Ala の変異導入で IgE 結合活性が大きく低下していた。N 末端側アミノ酸残基の置換に比べて、C 末端側及び中間部分の変異体では IgE 結合活性の低下は比較的緩やかであった。しかし、S-S 結合を形成している 2 つの Cys (Cys73, Cys78) 近傍と Cys119 近傍に存在するアミノ酸残基、更に C 末端側の末端となる 4 アミノ酸残基を置換した場合には IgE 結合活性が低下する傾向が見られた。

第四節 考察

合成ペプチドを用いたエプトープ検索は、抗原蛋白質の一次配列が認識されている場合には有効な手法である。Der f 2 と同じグループ 2 アレルゲン蛋白質に属する Der p 2 についても、合成ペプチドを用いたスクリーニングによりいくつかのペプチド断片が T 細胞エプトープとして同定されている⁵⁰⁻⁵²⁾。同様に Der f 2 由来のペプチド断片を指標として、Der p 2 の B 細胞エプトープを調べた報告もある^{32, 33)}。しかし、B 細胞エプトープ検索に用いた場合、

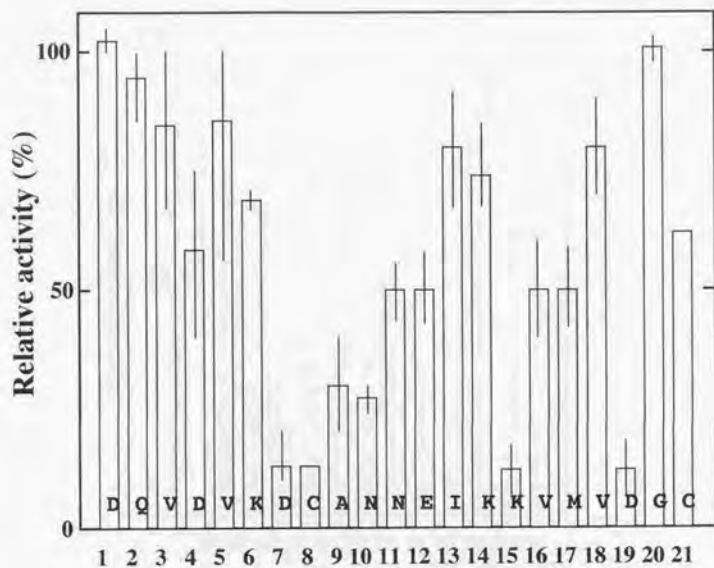


図 3-6a Der f 2 変異体の IgE 結合活性。

アミノ酸置換導入残基番号 ; 1-21

置換前のアミノ酸残基はグラフ中に一文字表記で示した。

Cys 置換体は S-S 結合を形成している Cys を対で Ser に置換した変異体を用いた。

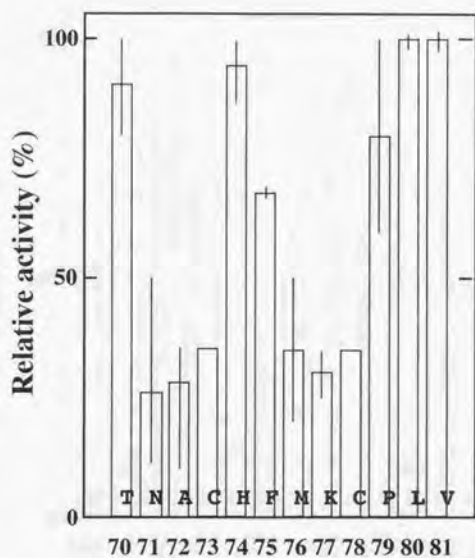


図 3-6b Der f 2 変異体の IgE 結合活性。

アミノ酸置換導入残基番号 ; 70-81

置換前のアミノ酸残基はグラフ中に一文字表記で示した。

Cys 置換体は S-S 結合を形成している Cys を対で Ser に置換した変異体を用いた。

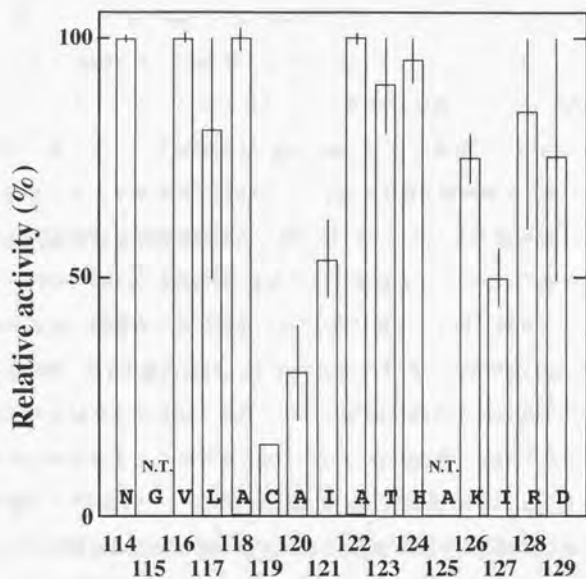


図 3-6c Der f 2 変異体の IgE 結合活性。

アミノ酸置換導入残基番号 ; 114-129

置換前のアミノ酸残基はグラフ中に一文字表記で示した。

Cys 置換体は S-S 結合を形成している Cys を対で Ser に置換した変異体を用いた。

N. T. ; not tested

Der p 2 由来のペプチドのほとんどはインタクトな Der p 2 に比べてきわめて弱い IgE 結合活性を示していた^{32, 33}。例えば、195 名の患者血清の内 3 名の患者血清と反応し、IgE 結合部位と同定された 65 残基目から 78 残基目までの領域は、インタクトな Der p 2 の 25 から 30% 程度の弱い IgE 結合活性を示している³²。これらのことから、グループ 2 アレルゲンでは一次配列上連続した一部の領域では再構築できない立体構造が IgE 抗体によって認識していると示唆される。そこで本研究ではホールの Der f 2 蛋白質を使ってヒト IgE 抗体認識部位の検索を試みた。第二章で示したように組み換え大腸菌を用いて Der f 2 蛋白質を生産する系を確立している。この系で大腸菌体内に蓄積された不溶化 Der f 2 蛋白質を、変性、再生して得られる精製 Der f 2 蛋白質は、*D. farinosa* より抽出した天然型 Der f 2 と同じ S-S 結合を形成しており、ヒト IgE 結合活性や蛋白質の二次構造を反映する CD スペクトルのパターンも天然型と同等であることを確認している⁴¹。この組み換え遺伝子操作技術を用いてまずはじめに作製したのは、N24 と C9 の 2 種類の Der f 2 欠失体である。この 2 つの欠失体は、ウェスタンブローディング法を用いた解析から、調べた 10 名のアレルギー患者血清全てについて IgE 抗体との結合反応がほとんど失われていた⁴⁶。このことは、Der f 2 の IgE 認識部位の構造形成に N 末端側 24 アミノ酸、C 末端側 9 アミノ酸が重要な役割を担っていることを示唆している。そこでそのエピトープ形成に寄与しているアミノ酸残基を特定するために、Der f 2 の N 末端側、及び C 末端側アミノ酸残基を段階的に欠失した変異体を数種類作製し、それらの IgE 結合活性を測定した。RAST-EIA 直接法を用いて調べた結果、図 3-3 に示すとおり、N 末端側アミノ酸では 6 番目

から 10 番目のアミノ酸残基を欠失することにより大きく IgE 結合活性が低下することが判明した。このことは Cys8 と Cys119 との間の S-S 結合がエピトープ形成に重要であることを示唆している。一方、C 末端側アミノ酸残基の欠失によっても図 3-4 に示すように IgE 結合活性が低下している。このことから、S-S 結合によって N 末端側近傍に保持されている C 末端側領域が IgE 抗体のエピトープ部位の形成に必要であると考えられる。しかし、C 末端領域欠失体の場合、IgE 結合曲線は、野生型 Der f 2 や N 末端部位欠失体とは異なる様相を示している。おそらく、C 末端側アミノ酸残基の欠失によって、Der f 2 蛋白質の構造安定性が低下し、高濃度下で測定に用いた際の構造変化や凝集を引き起こしているのではないかと推定している。実際、欠失体 C9 では Cys8 と Cys73 という組み合わせで野生型には存在しない S-S 結合を形成している蛋白質も一部含まれていることを確認している。これらのことから、S-S 結合している Cys8 や Cys119 の近傍を欠失した場合、蛋白質の構造変化を引き起こし、その結果、エピトープを形成していると予想される N 末端と C 末端領域の詳細な検索が困難になる可能性が予想される。

このような蛋白質の立体構造の大きな変化を最小限に抑えて、IgE のエピトープ領域を形成しているアミノ酸残基の特定を進めるために、部位特異的変異法を用いて Der f 2 のアミノ酸残基を置換した変異体の作製を行った。Der f 2 変異体の IgE 結合活性を測定した結果、Asp7Ala、Ala9Leu、Asn10Ala、Asn71Ala、Ala72Leu、Met76Ala、Lys77Ala、Ala120Leu といった S-S 結合を形成している Cys 残基、Cys8-Cys119、Cys73-Cys78 の近傍に位置するアミノ酸残基の置換により IgE 結合活性が大きく低下していることが判明した。このこと

から S-S 結合が、あるいはその近傍も含む領域が Der f 2 蛋白質の表面に存在して本蛋白質の IgE 認識部位となっていると示唆される。グループ 2 アレルゲンを還元アルキル化することによってヒト IgE 抗体との結合力が著しく低下していることによっても³⁹⁾ Der f 2 において S-S 結合が IgE エピトープ構造を形作るために重要であると考えられる。更に、Der f 2 の S-S 結合を一つずつ破壊するように対となっている Cys 残基を Ser に置換した変異体では Cys21/27Ser の活性低下が比較的小さく、Cys8/119Ser、Cys73/78Ser の IgE との結合力が著しく低下していることから (図 3-6 a, b, c、投稿準備中) この 2 つの S-S 結合に形成される領域がエピトープとして IgE に認識されている可能性が支持される。加えて、今回変異を導入したアミノ酸残基の中では、Lys15 や Asp19 といった電荷をもつアミノ酸残基を置換することによって IgE 結合力が低下することが判明した。図 3-6 において同程度に IgE 結合活性に影響を及ぼしている負の電荷をもつアミノ酸残基 Asp7、Asp19 を同じ負の電荷をもつアミノ酸残基である Glu と、電荷を持たないアミノ酸残基 Asn に置換した変異体を各々作製した場合、その IgE 結合活性の変化は異なる傾向を示した。即ち、Asp7 はいずれのアミノ酸残基に置換した場合でも IgE との結合力は野生型の 10 から 20% 程度に低下しているのに対し、Asp19 では、同じ酸性アミノ酸である Glu に置換した場合 IgE 結合活性が野生型と同程度であった。このことから、Asp19 はそのアミノ酸残基のもつ電荷が IgE との結合あるいは結合部位の形成に寄与しているのに対し、Asp7 では側鎖構造そのものが厳密に IgE エピトープ構造の形成に影響を及ぼしていると推定される。今回欠失体及びアミノ酸置換体を用いた IgE エピトープ検索の結果、Cys8-Cys119

近傍のアミノ酸残基、Cys73-Cys78 によって形成されるループ部分に存在するアミノ酸残基、更にC末側の末端に位置するアミノ酸残基がエピトープを形成している領域であると示唆された。上記の結果はポリクローナルな抗体であるヒト IgE 抗体が、抗原蛋白質の特定の部位を認識し、しかも IgE を介してその受容体の架橋を行う多価抗原として機能する抗原蛋白質の IgE エピトープ領域が少なくとも2カ所以上存在する可能性を示している。現在 Der f 2 の立体構造解析を進行中であるが、今回変異を導入したアミノ酸残基の位置や側鎖の方向を含めた Der f 2 の詳細な立体構造が明らかにされることによって、IgE エピトープ部位の構造が更に解明されていくものと期待される。

第四章 マウスモノクローナル抗体を用いた Der f 2 の ヒト IgE エピトープ検索

第一節 緒言

Der f 2 のヒト IgE エピトープ部位を明らかにすることは、アレルギー性疾患の発症機構を明らかにし、アレルギー反応を抑制する治療法の開発にも有効な情報をもたらすと考えられる。前章で述べたようにグループ 2 アレルゲンの IgE エピトープを決定する試みは、抗原蛋白質の一部のペプチドを用いた報告があるが^{32, 33)}、インタクトな蛋白質と比べてその IgE 結合力はきわめて弱く、IgE が立体構造を含めて抗原蛋白質を認識していると考えられる Der f 2、Der p 2 の場合、ペプチド断片を用いた方法は必ずしも適している方法ではないと思われる。そこで、第三章で述べたように部位特異的変異法を用いた Der f 2 変異体の作製を行い、IgE 結合活性に影響を及ぼすアミノ酸残基の特定を行った。その結果、ヒト IgE エピトープ形成に寄与していると思われる領域として、Cys73-Cys78 の S-S 結合近傍に存在するアミノ酸残基、Cys8、Cys119 のやはり S-S 結合を形成している 2 つの Cys 残基近傍のアミノ酸残基、そして C 末端の末端のアミノ酸残基が挙げられた。しかし、多価抗原のアレルゲン蛋白質を認識している IgE 抗体はポリクローナルであり、1 アミノ酸残基を Ala や Leu に置換した変異体では IgE 結合活性が完全には失われない。そこで、本章では 1 アミノ酸残基の置換によりエピトープ位置がより鮮明に決定されるモノクローナル抗体を用い、ヒ

ト IgE エピトープ領域の検索を行った。

第二節 方法

1) 抗 Der f 2 マウス mAb とヒト IgE 抗体

用いた 5 クローン の抗 Der f 2 マウスモノクローナル抗体は、いずれも IgG1 サブクラスに属する。mAb、15E11、13A4、18G8 は Balb/c を、1B2 と 7C10 は A/J マウスを用いて作製した^{4,5)}。

血清 A、B、C、D はいずれもハウスダストマイト感受性のアレルギー性疾患患者血清ストックより用いた。A、B、C は各々 1 名の患者血清であり、D は少なくとも 10 名のアレルギー患者の血清を含むプール血清である。

2) 野生型及びアミノ酸置換 Der f 2 変異体の作製

野生型及びアミノ酸置換 Der f 2 変異体の作製は、前章と同様の方法で行った。

3) mAb による Der f 2 とヒト IgE の結合阻害 (RAST-EIA 阻害法)

各 mAb による Der f 2 とヒト IgE の結合阻害活性を以下に示す方法で測定した。RAST-EIA 用に作製した BrCN 活性化濾紙をテストチューブ内に用意し、50 µg/ml の野生型 Der f 2 溶液 (0.1 M ホ

ウ酸緩衝液、pH8.0) 50 μ l を添加後、室温で一晩放置して、濾紙への Der f 2 の吸着を行った。第二、第三章で記した方法で抗原吸着濾紙の洗浄及びブロッキングを行った後、RAST-EIA キットに含まれている洗浄液で四分の一に希釈した 50 μ l の患者血清を添加した。このとき、終濃度 0 から 100 μ g/ml となるように調製した各 mAb を IgE-Der f 2 結合阻害剤として同時に添加した。37 度で 3 時間放置して抗原抗体反応を行い、再び濾紙を洗浄後、酵素標識した抗ヒト IgE ラビット IgG を二次抗体として加えた。以下、第二、第三章に記した方法と同様に行った。この結果 Der f 2 に結合して検出される IgE 抗体は、抗 Der f 2 マウス mAb によって結合を阻害されなかった分子である。従って、得られた吸光度からマウス mAb に結合した Der f 2 量を求め、はじめに添加した Der f 2 量で割った値を、阻害活性として表した。

4) ヒト IgE による抗 Der f 2 マウス mAb と Der f 2 の結合阻害活性

ELISA 法を用いて、ヒト IgE による抗 Der f 2 マウス mAb と Der f 2 の結合阻害効果を調べた。500 ng/ml となるように PBS 緩衝液を用いて調製した野生型 Der f 2 を 100 μ l ずつイムロン 2 ELISA プレートに添加し 2 時間室温で固相への吸着を行った。PBS で 3 回ウェルを洗浄した後、1% Tween-PBS 溶液でブロッキングを行った。室温で 1 時間ブロッキングを行った後、0.05% Tween-PBS で 3 回洗浄したウェルに 100 μ l の抗体溶液を添加した。この溶液中には、一定濃度の mAb (15E11 は 10 μ g/ml, 13A4, 1B2, 7C10 は 5 μ g/ml, 18G8 は 2.5 μ g/ml) と、希釈倍率の異なるヒト血清 (抗 Der f 2 ヒト IgG 抗

体を除くため 2mg/ml の IgG SORB (エンザイムセンター) で前処理を行った。) を含んでいる。この抗体溶液を 37 度で 3 時間抗原 Der f 2 と反応させた。二次抗体として、ビオチン化抗マウス IgG ヤギ IgG 抗体を用い、アルカリフォスファターゼ標識アビジンを介し、*p*-ニトロフェニルホスフェート 2 ナトリウムを基質とした酵素反応で野生型 Der f 2 に結合したマウス mAb 量を測定した。詳細は第三章の示した方法と同じである。阻害活性は、IgE 共存下に測定された吸光度の、IgE 非存在下で測定された吸光度に対する比で表した。

5) Der f 2 アミノ酸置換変異体を用いた mAb のエピトープ検索

mAb に対する Der f 2 のエピトープ部位を形成しているアミノ酸残基を以下に示す方法で検索した。1 ng/ml から 2 μg/ml までの異なる濃度となるように PBS 緩衝液を用いて調製した野生型 Der f 2、及び変異体を 100 μl ずつイムロン 2 ELISA プレートに添加し 2 時間室温で固相への吸着を行った。続いて、ウェルの洗浄、ブロッキングを前項で示したのと同様の操作で行い、各 mAb 溶液を添加した。酵素溶液の濃度も前項の阻害活性測定時に用いた条件と同じである。ビオチン化した二次抗体、酵素標識アビジン、基質を前項と同様に用い、固相に吸着している Der f 2 に結合した mAb を検出した。

第三節 結果

1) Der f 2 とヒト IgE 抗体の結合を阻害する mAb

部位特異的変異法を用いてアミノ酸残基の置換を導入した Der f 2 蛋白質と IgE の結合を調べた結果、Der f 2 蛋白質の場合 IgE 抗体は抗原蛋白質の立体構造を含めて認識していることが示唆された。そこで、Der f 2 の IgE エピトープを検索する別なアプローチとして、抗 Der f 2 マウス mAb を用いた方法を試みた。すなわち、Der f 2 と IgE の結合を阻害する mAb を選び出し、IgE とエピトープ領域が拮抗すると思われる mAb のエピトープを Der f 2 変異体を用いて検索を行った。

5 種類の抗 Der f 2 マウス mAb、15E11、13A4、18G8、1B2、7C10 について Der f 2 に対するヒト IgE の結合阻害活性を調べた。図 4-1 に示すとおり、15E11 と 13A4 は抗 Der f 2 ヒト IgE の Der f 2 への結合を 30 から 60% 阻害していた。一方、残る 3 つの mAb、18G8、1B2、7C10 は IgE の Der f 2 への結合に影響を及ぼさなかった。これらのことから、15E11 と 13A4 は IgE の認識部位近傍をエピトープとしている可能性が示された。更に、この結果から、アレルギー性疾患患者血清由来ヒト IgE 抗体はポリクローナルでありながら、18G8、1B2、7C10 の 3 種類の mAb の結合部位はエピトープとしておらず、15E11、13A4 が結合する Der f 2 上の限られた部位をエピトープとして認識していることが示唆された。15E11 と 13A4 による IgE 阻害活性は、図 4-1 に示すとおり、用いたすべての血清について同様の傾向を示した。

2) ヒト IgE による抗 Der f 2 マウス mAb と Der f 2 の結合阻害

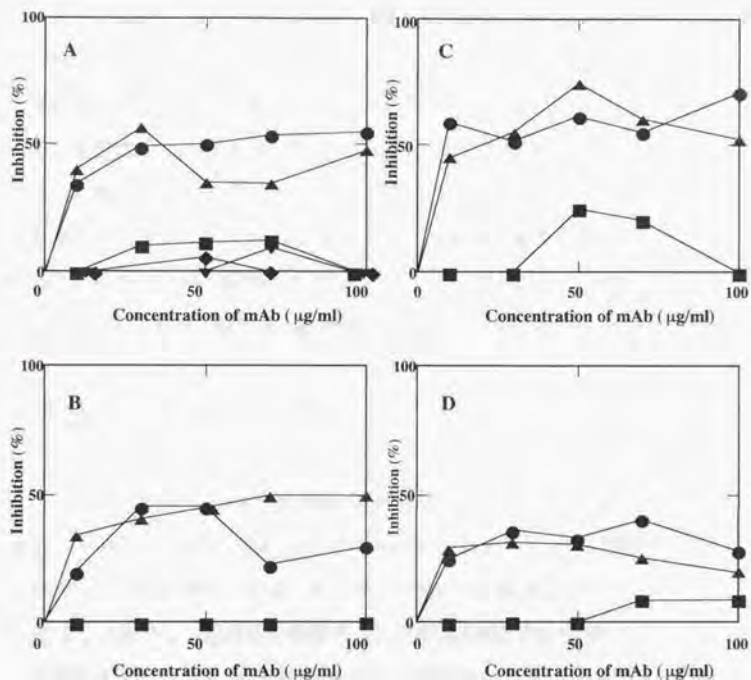


図4-1 抗Derf2マウスmAbによるDerf2とヒトIgE結合に対する阻害活性。

15E11 (●)、13A4 (▲)、18G8 (■)、1B2 (▼)、
7C10 (◆)

A、B、Cはそれぞれ一名のアレルギー性疾患患者血清、

Dはプール血清

前項で示したとおり、用いた5種類の抗Der f 2マウス mAbのうち、2種類のみがIgEのDer f 2への結合を阻害した。このことを確認するため、次に、各mAbとDer f 2の結合に対するヒトIgE抗体の阻害活性をELISA法を用いて調べた。結果は図4-2に示す。ヒトIgE濃度が上昇するに伴って、15E11と13A4のDer f 2への結合阻害率が上昇した。一方、18G8、1B2、7C10の3種類のmAbのDer f 2への結合は全く阻害を受けなかった。このことから、15E11と13A4のエピトープはヒトIgE抗体と拮抗していると考えられる。

3) 抗Der f 2マウス mAbのエピトープ

15E11、13A4、2つのmAbがDer f 2への結合でヒトIgEと拮抗していたことから、これら2つのmAbがIgEのエピトープ部位に結合していると考えられる。そこで、15E11、13A4のエピトープとなっているアミノ酸残基を特定することを試みた。Der f 2のアミノ酸残基を1つずつ本来とは異なるアミノ酸残基、AlaかLeuに置換した変異体について、これらmAbとの結合活性をELISA法で測定を行ったのである。各置換体に対する15E11、13A4、18G8の結合力を野生型Der f 2に対する結合力に対する相対値で表した結果が、図4-3 a、b、cである。15E11のDer f 2への結合は、D4、D7、C8、D19、D69、N71、C73、H74、F75、M76、K77、C78、L117、C119、I121、I127といったアミノ酸に変異を導入することにより低下した。特に、Cys73、Cys78近傍に存在するアミノ酸残基、69番目、71番目、74番目のアミノ酸残基の置換が15E11の結合に大きく影響していた。

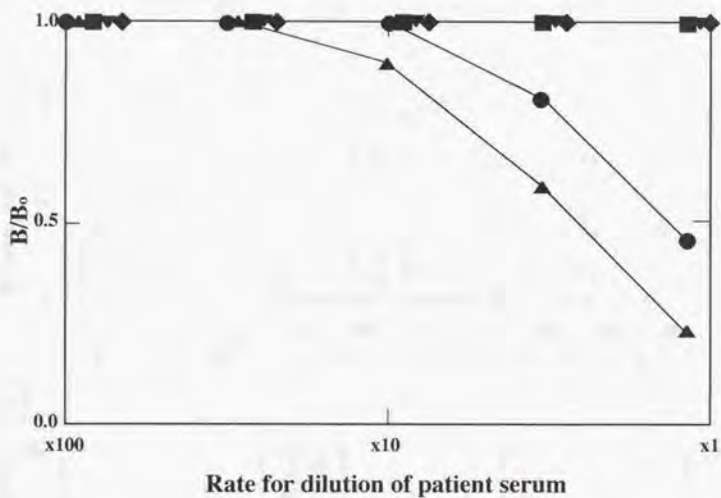


図 4-2 IgE による Der f 2 と抗 Der f 2 マウス mAb 結合に対する
阻害活性。

阻害活性は、mAb 非存在下における吸光度 (B_0) に対する
mAb 存在下の吸光度 (B) 比で表した。

ヒト IgE 抗体は患者血清を希釈して用いた。

15E11 (●)、13A4 (▲)、18G8 (■)、1B2 (▼)、
7C10 (◆)

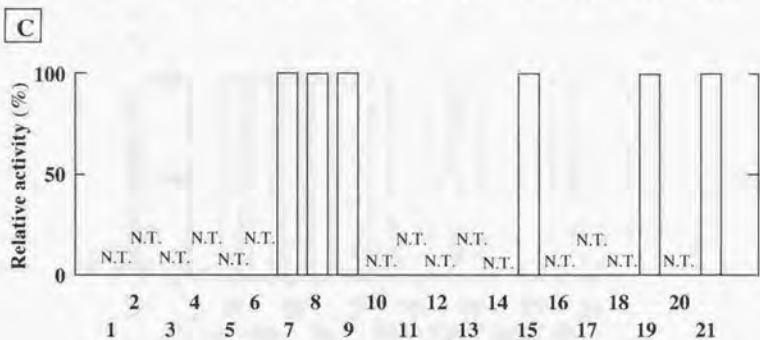
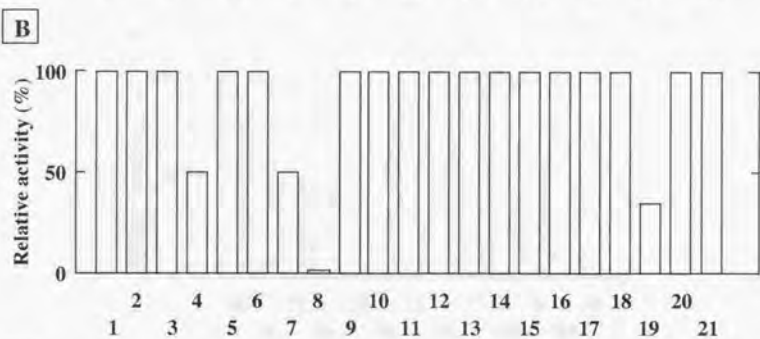
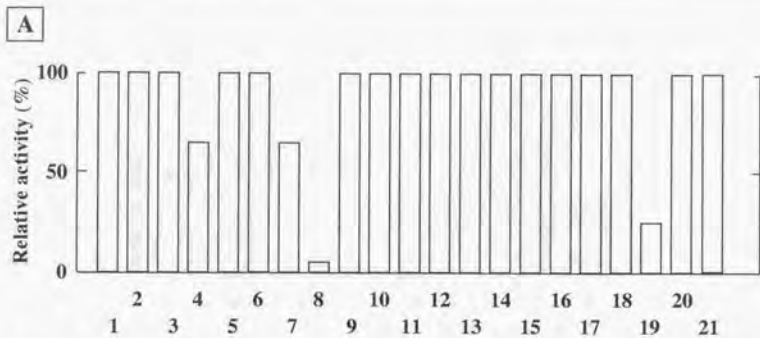


図 4-3 a Derf 2 のアミノ酸変異が mAb 結合に及ぼす影響。

(1-21 アミノ酸残基)

A; 15E11, B; 13A4, C; 18G8

N. T.; Not Tested

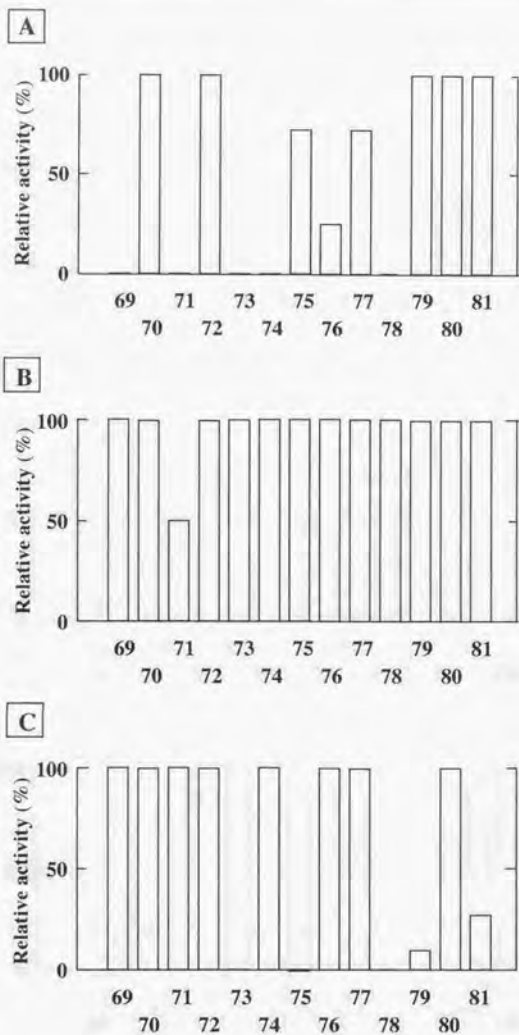


図 4-3 b Der f 2 のアミノ酸変異が mAb 結合に及ぼす影響。

(69-81 アミノ酸残基)

A; 15E11, B; 13A4, C; 18G8

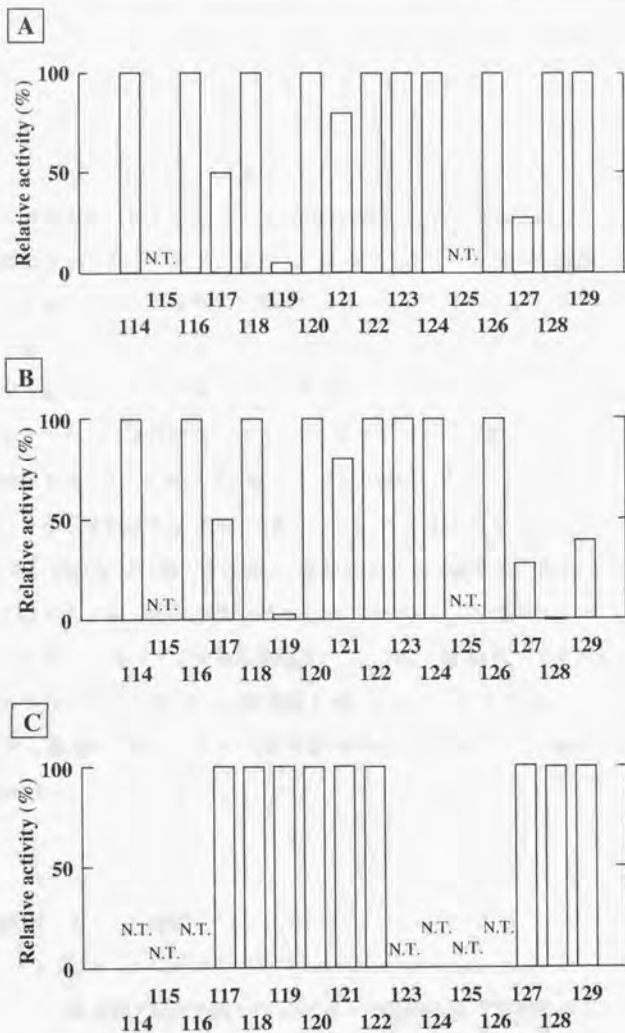


図 4-3 c Derf 2 のアミノ酸変異が mAb 結合に及ぼす影響。

(114-129 アミノ酸残基)

A; 15E11, B; 13A4, C; 18G8

N. T.; Not Tested

このことから 15E11 は Der f 2 の 69 番目のアミノ酸から 78 番目のアミノ酸までの領域を認識していると推定される。13A4 については、各変異体との結合パターンは 15E11 の場合と似ているが、69 番目から 78 番目のアミノ酸残基の置換が結合活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。Arg128 の置換が最も 13A4 の結合活性の低下を引き起こし、その近傍のアミノ酸残基である Asp127、Asp129 の置換も明らかに活性を低下させていた。これらのことから C 末端側領域が 13A4 のエピトープとなっている可能性が考えられる。一方、IgE との拮抗を示さなかった 18G8 では、S-S 結合を形成している Cys73、Cys78 の近傍、75 番目と 79 番目のアミノ酸残基の置換によってほとんど結合活性が失われていたことから、この領域が 18G8 のエピトープとなっていると推定された。1B2、7C10 についても同様の検索を行ったが、アミノ酸置換を導入した領域内では 1B2、7C10 結合に影響を及ぼすアミノ酸残基は存在しなかった (data not shown)。

第四節 考察

ペプチド断片を用いてエピトープ検索を行う報告は多く、Der p 1 や Der p 2 を含む多くのアレルゲン蛋白質の B 細胞エピトープ検索にペプチド断片が用いられてきた³⁰⁻³⁷⁾。そのうちいくつかのケースでは、エピトープ領域のペプチドやその領域に結合する mAb がアレルゲン蛋白質とアレルゲン蛋白質特異的ヒト IgE 抗体の結合を阻害し、好塩基球からのヒスタミンの遊離や抗原特異的な抗

体の産生といった、*in vivo*でのアレルギー反応を軽減させることに成功している^{30, 31)}。しかし、このようにペプチド断片を用いた方法では、エピトープが一次配列上いくつかの離れた領域で構成されている場合、このような断片を指標とした検索方法では特定が困難となる。例えば、アレルゲン蛋白質 Der f 2 や Der p 2 の IgE 結合活性は、還元修飾による S-S 結合の破壊によって著しく低下し³⁹⁾、また、合成ペプチドを用いたエピトープ検索では IgE 結合活性を示すとして特定されたペプチドでも、結合活性はホールの Der f 2 と比べてわずかであった^{32, 33)}。そこで Der f 2 の高次構造変化を最小限に抑えて IgE エピトープ検索を行うために Der f 2 にアミノ酸残基の置換を導入した変異体を作製し、IgE 結合力の変化を調べた。前章ではこれら変異体と IgE との結合力を直接測定したが、本章では、IgE とエピトープ部位が拮抗する mAb を選び出し、それらのエピトープ部位を特定して IgE エピトープ部位と推定される領域との比較を行った。

用いた 5 種類の mAb のうち、Der f 2 への IgE の結合を阻害したのは、15E11 と 13A4 の 2 種類であった。残る 3 種類の mAb が阻害活性を示さなかった理由の一つとして、Der f 2 への結合力が影響している可能性も考えられるが、用いた mAb の中で 18G8 が最も Der f 2 への結合力が強く、1B2, 7C10 も 15E11, 13A4 より強い結合力で Der f 2 に結合していることを確認しており (data not shown)、今回の結果は、結合力の差によるものではないと考えられる。このように、15E11 と 13A4 のみが IgE と拮抗したことは、ポリクローナルな IgE 抗体が、Der f 2 の限定された領域を認識していることを示している。また、用いたすべての患者血清由来 IgE について 15E11、

13A4のみが同じように阻害活性を示したことは、Der f 2の特定の領域をいずれのアレルギ―患者血清中に存在するIgEも同様に認識している可能性を示すものである。

ヒトIgEエпитープ領域を特定するため、Der f 2結合に際して拮抗していたmAb、15E11と13A4についてエпитープ領域の検索を行った。15E11は、D69G、N71A、H74A、2アミノ酸置換体のC73/78Sとはほとんど結合しなかった。一方、13A4については、C末側の3アミノ酸残基がエピトープとなっている可能性が示された。第二章で示したように、15E11が76番目のアミノ酸にのみ置換が見られる2つのクローン型1と2の間で、(各々76番目のアミノ酸残基は、ValとMetである)結合力が異なっていることは、このアミノ酸残基を含む領域が15E11のエピトープであるという今回の結果と矛盾しない。また、第三章でIgEエピトープ部位と推定した領域、Cys8-Cys119、Cys73-Cys78、の2つのS-S結合近傍と、C末端側領域が15E11、13A4の認識部位と一致している。最近、Der f 2と88%という高い相同性を示すDer p 2のCys残基のアミノ酸残基の置換を導入した結果が報告されたが、そこではCys73-Cys78のS-S結合が本蛋白質のIgE結合活性に必須であるという⁵³⁾。更に、Cys8-Cys119間のS-S結合の破壊はIgE結合に影響を及ぼさないと言う結果も得られており、我々の結果とは異なっている。これは、Der f 2とDer p 2のアミノ酸配列の違いや、用いた組み換え蛋白質の調製法の違いが影響しているのかもしれない。18G8は少なくともDer f 2のPhe75、Pro79を結合部位としていることが判明したが、これは15E11の一次配列上近接している領域である。18G8は15E11とDer f 2の結合に拮抗性を示すことと⁴⁴⁾、今回の結果は一致する。

しかし、15E11 が IgE の Der f 2 結合を阻害するのに、18G8 が IgE に全く影響を及ぼさないのは興味深い。

15E11、13A4 のエピトープ部位として Der f 2 結合活性に大きく影響していたアミノ酸残基は異なっていたが、4 番目、7 番目、19 番目、117 番目、127 番目のアミノ酸残基の置換で同様に Der f 2 への結合が少し低下している傾向が一致している。このことから、これらのアミノ酸残基が Der f 2 の抗原性を示す領域の構造形成に寄与している可能性が考えられる。興味深いことに、4 番目、7 番目、19 番目のアミノ酸残基はいずれも Asp である。これらのアミノ酸残基のもつ負の電荷が抗原性を発揮するのに必須であるのかもしれない。例えば、19 番目の Asp を Asn に置換すると抗 Der f 2 ヒト IgE 抗体の結合力は著しく低下するが、同じ負電荷をもつ Glu に置換しても IgE の結合は影響を受けない (data not shown)。

現在 Der f 2 の立体構造決定が進められているが、Der f 2 の詳細な立体構造が決定されることによって、これら抗体の結合様式が解明されるものと期待される。

Dermatophagoides 属は、アトピー性皮膚炎、気管支喘息等のアレルギー性疾患を引き起こす様々なアレルゲン蛋白質を産生するハウスダストマイトとして知られている。2種類の *Dermatophagoides* 属、*D. farinae*、*D. pteronyssinus* から、ヒト IgE 抗体と結合し、アレルギー反応を引き起こすアレルゲン蛋白質が数種類分離、同定されている。Der f 3 は *D. farinae* から単離されたアレルゲン蛋白質の一つで、グループ 3 アレルゲンに属する^{1, 6)}。Der f 3 のダニ生体中での役割は明らかになっていないが、トリプシン様のセリンプロテアーゼ活性を有することが知られている^{2, 2-2, 5)}。このプロテアーゼ活性については、ヒト血漿中におけるアレルギー反応に関係するカリクレイン-キニン系を活性化するという報告もある^{5, 4, 5, 6)}。この数年間 Der f 3 についてアレルゲン性についてのいくつかの研究がなされているが、Der f 3 に反応するアレルギー患者血清の割合が、16%とするものから 100%とするものまで、IgE に対する反応性について報告されている結果はさまざまである^{2, 2-2, 4)}。このようにまちまちの結果が得られている原因の一つに、用いられている Der f 3 の精製度が異なる可能性が考えられる。グループ 3 アレルゲンの IgE 結合性について正確なデータを得るために、Der f 3 を高い純度で得る生産系の確立が必要である。また、アレルゲン蛋白質の高産生系の確立は IgE を介したアレルギー性疾患の治療や、アレルギー性反応の機

構解明にも有用であると考えられる。

以上のことから、Der f 3 の cDNA クローニングとその蛋白質の生産を組み換え遺伝子操作技術を用いて行った。

第二節 方法

1) *D. farinae* の cDNA ライブラリーの作製

培養した *D. farinae* 虫体より mRNA を抽出、cDNA を作製後^{1,2)}、得られた cDNA を complete rapid cloning system (アマシャム) を用いて λ gt11 ファージ DNA にクローニングした。続くファージ DNA のインビトロパッケージング及び大腸菌 Y1090 の形質転換は Giga pack II packaging extract (ストラタジーン) を用いて行った。

2) cDNA ライブラリーからの Der f 3 cDNA の単離

以下に示す 2 本の合成 DNA をプライマーとして用い、前述の cDNA ライブラリーを鋳型にした PCR を行った。即ち、報告されている天然型 Der f 3 の N 末端側アミノ酸配列をもとに^{2,3)}、5'末端に制限酵素 *Bam*HI の認識配列を含むように作製した合成オリゴヌクレオチド (5'-GGGGATCCATTGTTGGTGGTAAAGCA-3') と、 λ gt11 の配列をもとに作製した合成オリゴヌクレオチド (5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3') をプライマーとし、94 度 1 分、55 度 2 分、72 度 3 分のサイクルを 25 回繰り返す条件で、サー

マルサイクラーRC-700 (アステック) を用いて PCR を行った。その結果約 1000bp の DNA 断片が特異的に増幅した。この断片を制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI で消化切断後、同酵素で処理したプラスミドベクター-pBluescriptII に連結し、大腸菌 DH5 α の形質転換に用いた。得られた大腸菌の形質転換体から目的のプラスミドを QIAGEN plasmid midi kit (キアジェン) を用いて精製し、*Bam*HI と *Eco*RI で切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1000bp の断片をゲルから抽出精製した。このようにして得られた DNA 断片を ECL direct nucleic acid labeling system (アマシャム) を用いて標識しブラークハイブリダイゼーション法のプローブとした。cDNA ライブラリーはブラークが、90 mm ベトリディッシュ当たり 10,000 pfu となるようにまき、Hybond-N+ membrane filter (アマシャム) にトランスファーした。ハイブリダーゼーションは、ECL detection system (アマシャム) を用いて行った。約 50,000 個のブラークから 1 つの陽性クローンを得、二次スクリーニングに供して単離した。この陽性クローンのファージ DNA は、QIAGEN Lamda midi kit (キアジェン) を用いて精製した。

3) Der f 3 cDNA の塩基配列決定

前述の陽性ファージクローン DNA を制限酵素 *Eco*RI と *Cl*ai に切断することにより Der f 3 の cDNA を切り出し、プラスミドベクター-pBluescriptII にサブクローニングした。この Der f 3 cDNA の塩基配列はアプライドバイオシステムズ 370A シークエンサー (パーキンエルマー) を用いて決定した^{4 B)}。

4) 発現プラスミドベクターの構築

PCR を用いて、Der f 3 のプロ配列の上流に *Bam*HI 認識部位を、停止コドンの直下流に *Hind*III 部位を導入した。即ち、Der f 3 の cDNA を鋳型とし、以下に示す 2 本の合成オリゴヌクレオチド、プライマー-A (5'-AGTGGATCCACACCGATTCTTCCATCA-3') とプライマー-B (5'-CGAAGCTTACTGTGAACGTTTTGATTCAAT-3') を用いて、前述と同じ反応条件下で PCR を行った。この PCR 産物を制限酵素 *Bam*HI と *Hind*III で処理した後、同制限酵素で切断した発現プラスミド pGEX-4T-2 (ファルマシア・バイオテック) に連結した。このようにして作製したプラスミド pGEX/proDer f 3 によって、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と Der f 3 のプロ体がジペプチド (Gly-Ser) で連結した融合蛋白質として生産される。もう一つの発現プラスミド、pGEX/T(-1)R-proDer f 3 は pGEX/proDer f 3 は、プロ配列の C 末端アミノ酸 Thr のコドン ACT を Arg のコドン CGT となるように変異させた以外は、pGEX/proDer f 3 と同じコンストラクションのプラスミドベクターである。部位特異的変異は PCR 法で行った。PCR のプライマーとして、一方は変異導入のための合成オリゴヌクレオチド 5'-

GCGGATCCACACCGATTCTTCCATCATCACCAAATGCACGT-3'を、もう一方は pGEX/proDer f 3 を作製するのに用いたプライマー-B を、鋳型として、pGEX/proDer f 3 を用いた。このようにして得られた PCR 産物を *Bam*HI と *Hind*III で処理し、pGEX-4T-2 へ導入して、pGEX/T(-1)R-proDer f 3 を得た。

5) 組み換え融合蛋白質の生産及び精製

pGEX/proDer f 3 で形質転換した大腸菌 BL21 を 50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む L-broth で一晩培養した培養液を、同一の培養液に 1% 接種した後 30 度で 2 時間培養を行った。続いて、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを終濃度 100 μM となるように添加し、*lac* プロモーターを誘導して、更に 4 時間培養を行った。次に培養液を 5000 x g で 10 分間遠心して大腸菌体を回収し、10 mM EDTA を含む 100 mM トリス塩酸 (pH9.0) 溶液に懸濁後、超音波により菌体の破碎を行った。GST-pro Der f 3 融合蛋白質は封入体として大腸菌体内に生産されているため、続く 7000 x g、15 分間の遠心操作で沈殿物として回収された。この不溶化蛋白質は、8 M 尿素を含む 20 mM トリス塩酸 (pH9.0) 溶液中で可溶化後、20 mM トリス塩酸 (pH9.0) 溶液で 4 時間透析する事によって再生を行った。この GST-pro Der f 3 溶液を PBS 緩衝液下で 2 時間透析を行った後、PBS 緩衝液で平衡化したグルタチオン-セファロース 4B カラムに供し、10 mM 還元グルタチオンを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を用いて融合蛋白質画分を溶出した。得られた GST-pro Der f 3 精製蛋白質に蛋白質 1 mg 当たり 1 U のトロンピンを添加後、室温で 2 時間以上放置することによって消化反応を行い、最終的に N 末端側に 2 アミノ酸 (Gly-Ser) を付加した pro Der f 3 と GST に分離した。この結果得られた GST と pro Der f 3 蛋白質混合物を再びグルタチオン-セファロース 4B カラムに供することによって、精製 pro Der f 3 をその通過画分に得た。

6) 蛋白質の電気泳動とウェスタンブロットニング

蛋白質標品を還元条件下で SDS-PAGE に供した後、ニトロセルロース膜 (バイオ・ラッド) にトランスファーしウェスタンブロットニング解析に用いた。0.05 % (w/v) トウイーン 20 (Tween) を含む PBS 緩衝液中で室温で 1 時間処理することによってブロッキングを行った膜を、0.05 % Tween-PBS で四分の一に希釈したアレルギー患者血清中で 4 度で一晩インキュベートした。0.05 % Tween-PBS で洗浄操作を三回行った膜に、0.05 % Tween-PBS で 1/1000 に希釈したホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識抗ヒト IgE ヤギ抗体 (カッセル) を二次抗体として添加した。膜を二次抗体存在下に室温で 5 時間以上置くことによって抗原抗体反応を行った後、PBS で洗浄した。30 mg の 1-クロロ-4-ナフトールを溶解した 10 ml のメタノールと 50 ml の PBS 緩衝液の混合液 (0.03 % 過酸化水素水を含む) を基質として膜上に添加した。

7) プロテアーゼ活性の測定

Der f 3 野生型及び変異体の酵素活性は合成基質を用いて測定を行った。合成基質、Boc-Q-G-R-MCA、Boc-F-S-R-MCA、Boc-V-L-K-MCA、Suc-L-L-V-Y-MCA を終濃度 40 μ M となるように 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 1 ml に加え、適量の野生型及び変異体の Der f 3 を添加後、37 度で酵素反応を行った。合成基質から遊離する 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) 量は、蛍光光時計 (日立 S-2000 フルオレッセンス スペクトロフォトメーター) を用い、励起波長

380 nm, 消光波長 460 nm 条件下の吸光度を測定することにより決定した。

8) PCR を用いた Der f 3 の cDNA クローニング

Der f 3 の多型を検索するために再度 *D. farinae* の cDNA ライブラリーを鋳型にした PCR を行った。プライマーは野生型 Der f 3 の発現プラスミドベクター構築時に用いた前述の A と B を使用した。前述と同一反応条件で得られた PCR 産物を pBluescript II にサブクローニング後、各 Der f 3 cDNA クローンの塩基配列を決定した。

第三節 結果

1) Der f 3 の cDNA クローニングと塩基配列決定

既に報告されている Der f 3 蛋白質の N 末端側アミノ酸配列の一部をもとに、オリゴヌクレオチドの合成を行った。 λ gt11 の配列を持つように設計した合成オリゴヌクレオチドをもう一方のプライマーとして用いた PCR の結果、約 1000 bp の大きさを持つ DNA 断片のみが特異的に増幅された。この DNA 断片の塩基配列を決定したところ報告されている Der f 3 の N 末端側アミノ酸配列と一致する配列が含まれていた。そこで Der f 3 の cDNA クローンを得るためのプローブにこの DNA 断片を用いた。ブランクハイブリダイゼーションを行った結果、*D. farinae* ライブラリー約 50,000 クローンから最

最終的に1個の陽性クローンを得ることができた。この陽性クローンのDNA塩基配列とそこから予想されるアミノ酸配列を図5-1に示す。得られたcDNAは全長1043 bpよりなり、780 bpのオープンリーディングフレーム(46塩基目のATG開始コドンから始まり、823塩基目のTGA停止コドンで終了している)を含んでいた。停止コドンの下流170 bpの位置には、Der f 3のmRNAの3'末端にポリAシグナルを付加するための配列と思われる、AATAAAが存在していた⁵⁶⁾。

2) Der f 3 組み換え蛋白質のヒト IgE 結合活性

pro Der f 3の組み換え体に対するアレルギー患者血清由来のヒトIgEの結合活性をウェスタンブロッティング法を用いて調べた。その結果は図5-2に示すとおりである。pro Der f 3をGSTとの融合蛋白質として発現させた場合、用いたすべての患者血清中のIgEによって認識されることが確認された。更に、GST-pro Der f 3融合蛋白質をトロンピン処理してGSTとpro Der f 3を切断した後に同様の実験を行った場合にも、GSTがわずかにヒトIgEと反応しているのに対し、pro Der f 3が明らかにヒトIgE抗体と結合することが判明した。

3) Der f 3 組み換え体のプロテアーゼ活性

前述の通りDer f 3はトリプシン様セリンプロテアーゼ活性

```

ATTTCCAAATTAACAATAAATCGTATATTTGAAATCG 38
-20
AACCAAG ATG ATG ATT TTA ACC ATT GTC GTG TTA TTG GCT GCA AAC ATT 87
Met Met Ile Leu Thr Ile Val Val Leu Leu Ala Ala Asn Ile
-10 -1 1
TTG GCC ACA CCG ATT CTT CCA TCA TCA CCA AAT GCA ACT ATT GGT GGT 135
Leu Ala Thr Pro Ile Leu Pro Ser Ser Pro Asn Ala Thr Ile Val Gly
10 -1 1
GGT GTG AAA GCA CAA GCC GGT GAT TGT CCA TAT CAA ATT TCA TTG CAA 183
Gly Val Lys Ala Gln Ala Gly Asp Cys Pro Tyr Gln Ile Ser Leu Gln
20 30
TCA AGC AGC CAT TTT TGT GGT GGT AGT ATC CTG GAT GAA TAT TGG ATC 231
Ser Ser Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asp Glu Tyr Trp Ile
40 50
TTG ACC GCT GCA CAT TGT GTC AAT GGA CAA TCA GCA AAA AAA CTT TCA 279
Leu Thr Ala Ala His Cys Val Asn Gly Gln Ser Ala Lys Lys Leu Ser
60
ATT CGT TAC AAT ACT CTT AAA CAT GCA TTT GGT GGT GAA AGC ATT CAA 327
Ile Arg Tyr Asn Thr Leu Lys His Ala Ser Gly Gly Glu Lys Ile Gln
70 80
GTG GCG GAA ATT TAT CAA CAT GAA AAT TAT GAT AGC ATG ACT ATC GAT 375
Val Ala Glu Ile Tyr Gln His Glu Asn Tyr Asp Ser Met Thr Ile Asp
90
AAT GAT GGT GCA TTG ATA ABA CTC AAA ACA CCA ATG ACA TTG GAT CAA 423
Asn Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Thr Pro Met Thr Leu Asp Gln
100 110
ACA AAT GCT AAA CCC GTA CCA TTA CCA GCA CAA GGA TCA GAT GTA AAA 471
Thr Asn Ala Lys Pro Val Pro Leu Pro Ala Gln Gly Ser Asp Val Lys
120 130
GTT GGT GAT AAA ATT CGT GTT TCT GGT TGG GGT TAT CTT CAG GAA GGA 519
Val Gly Asp Lys Ile Arg Val Ser Gly Trp Gly Tyr Ler Gln Glu Gly
140
AGT TAT TCA TTA CCA TCG GAA TTA CAA CGT GTT GAT ATT GAT GGT GEA 567
Ser Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Leu Gln Arg Val Asp Ile Asp Val Val
150 160
TCA CGT GAA CAA TGT GAC CAA TTA TAT TCA AAA GCA GGC GCC GAT GTT 615
Ser Arg Glu Gln Cys Asp Gln Leu Tyr Ser Lys Ala Gly Ala Asp Val
170
AGT GAA AAT ATG ATT TGC GGC GGT GAT GTC GCT AAT GGT GGT GGT GAT 663
Ser Glu Asn Met Ile Cys Gly Gly Asp Val Ala Asn Gly Gly Val Asp
180 190
TCA TGT CAA GGT GAT TCT GGC GGA CCA GTT GTT GAT GTT GCC ACT AAA 711
Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Asp Val Ala Thr Lys
200 210
CAA ATT GTT GGT ATT GTT TCA TGG GGT TAT GGT TGT GCA CGT AAA GGT 759
Gln Ile Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Ala Arg Lys Gly
220
TAT CCA GGT GTC TAT ACA CGT GGT GGT AAT TTT GTC GAT TGG ATT GAA 807
Tyr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Gly Asn Phe Val Asp Trp Ile Glu
230
TCA AAA CGT TCA CAG TGA ATGATAAAATGGCAACAACGGTCACAATGGCAGATAAT 864
Ser Lys Arg Ser Gln Trm
ACACCCCTACGGTCGAATCATATGTTTTTATAATTTTCTTTTTCTCTATCTTTTATTTT 927
TTATCGAAAGTAAAAAACAGCAAAATCAATATTGACTTAAGAGAATTGATTTTGTTCGAA 990
AAATAAAATGAAATGGACACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1043

```

図 5-1 Derf 3 の cDNA 塩基配列及びそこから予想されるアミノ酸配列。

DDBJ, EMBL, GenBank の accession number は D63858。

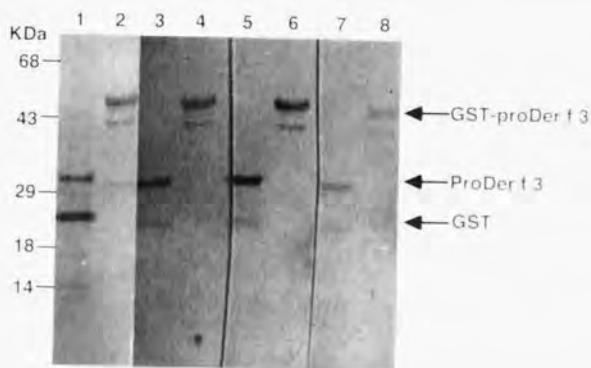


図 5-2 ウェスタンブロッティング法を用いて調べた proDer f 3 組み換え体のヒト IgE 結合活性。

レーン 1、3、5、7；トロンピン処理後の GST-proDer f 3

レーン 2、4、6、8；GST-proDer f 3

レーン 1、2；クマシーブリリアントブルー染色

レーン 3-8；アレルギー患者血清由来 IgE との反応性

レーン 3、4；患者血清 A

レーン 5、6；患者血清 B

レーン 7、8；ブール血清

を持つことが知られている^{19) 22-25, 54, 55)}。従って、組み換え体のプロテアーゼ活性や基質特異性を調べることは、不活性型のインクルージョンボディとして産生された Der f 3 の正しいリフォールディングの指標になると考えられる。変性、再生した GST-pro Der f 3 融合蛋白質や融合蛋白質からトロンピン処理して得られた pro Der f 3 は、ウェスタンブロットィングで調べたとおりヒト IgE との結合活性は示したが、プロテアーゼ活性は検出されなかった。一般にプロ配列はプロテアーゼ蛋白質の正しい構造形成に寄与すると同時に、プロテアーゼが不活性状態を維持するための特異的なインヒビターとしても機能することが知られている。野生型の pro Der f 3 はプロ配列の除去が行われなためにプロテアーゼ活性が発現していないと考え、Der f 3 がプロ配列を自己消化的に切断しやすいように、プロ配列の C 末端アミノ酸をトリプシンや Der f 3 が基質特異性を示す正に電荷したアミノ酸に置換した変異体を作製することを試みた。その結果、プロ配列の C 末端アミノ酸の Thr を Arg に置換した変異体 T(-1)R は、表 5-1 に示すとおり、報告されている天然型 Der f 3 と同じ基質特異性のプロテアーゼ活性を持つことが確認された。

4) Der f 3 の多型

前述の通り Der f 3 の cDNA として得られたクローンは一つであった。その塩基配列より推定される N 末端側アミノ酸配列を、報告されている天然型 Der f 3 のアミノ酸配列と比較すると、Ando らの報告している配列²³⁾ 及び Kohmoto らの報告している配列^{5,5)}

表 5-1. Der f 3 組み換え体と天然型のプロテアーゼ活性比較。

Synthetic substrates	Relative protease activity (%)			
	Recombinant Der f 3 ^{a)}		Native Der f 3	
	T(-1)R	A ^{a)}	B ^{a)}	C ^{b)}
Boc-Q-G-R-MCA	100	105	N. D.	100
Boc-F-S-R-MCA	100	100	100	N. D.
Boc-V-L-K-MCA	50	50	58	43
Suc-L-L-V-Y-MCA	2	30	0	0
Suc-A-A-P-F-MCA	0	0	0	N. D.

天然型 Der f 3 のプロテアーゼ活性 A、B、C は報告されている値を転用^{2,3, 24, 54)}。

プロテアーゼ活性は、

a); Der f 3 変異体 T(-1)R と天然型 A、B は合成ペプチド Boc-F-S-R-MCA に対する活性を 100% とし、

b); 天然型 C は合成ペプチド Boc-Q-G-R-MCA に対する値を 100% として表示した。

N. D.; not determined.

とは一致していたが、図 5-1 に示すとおり Heymann らの報告している配列とは一部異なっていることが判明した¹⁹⁾。このことから Der f 3 についても他のグループ 1^{5,7)} やグループ 2^{12,47)} のダニアレルゲンの場合と同様に多型が存在する可能性が考えられた。そこで Der f 3 の多型の可能性を確認するために PCR を用いて Der f 3 の異なる型の cDNA クローンの取得を試みた。その結果、Heymann らの報告している N 末端アミノ酸配列と一致する配列をもつ Der f 3 クローンは得られなかったが、3 種類の異なる Der f 3 クローンの存在が確認された。これらの塩基配列より予想されるアミノ酸配列を図 5-3 に示す。7 つの PCR クローンについて塩基配列を決定した結果、図 5-3 でタイプ 1 と読んでいるクローン型が 1 つ、タイプ 2 と一致する配列のものが 5 つ、そしてタイプ 3 が 1 つという内訳であった。

第四節 考察

Der f 3 の既に報告されている N 末端側 20 アミノ酸の配列は、オープンリーディングフレームの中の 28 番目から 47 番目の予想されるアミノ酸配列と一致していたことから、Der f 3 は N 末端側に 27 アミノ酸を付加した前駆体として産生されることが示唆された。Der f 3 はトリプシン様のセリンプロテアーゼ活性を持つことが報告されているが、膵臓より分泌されるトリプシンは 20 個以上のアミノ酸より成る付加配列を N 末端側に持つ前駆体として産生される^{58, 59)}。トリプシンの場合、N 末端側付加配列のうち N 末端側の 15 アミノ酸は分泌のためのシグナル配列として、C 末端側 6 から 9

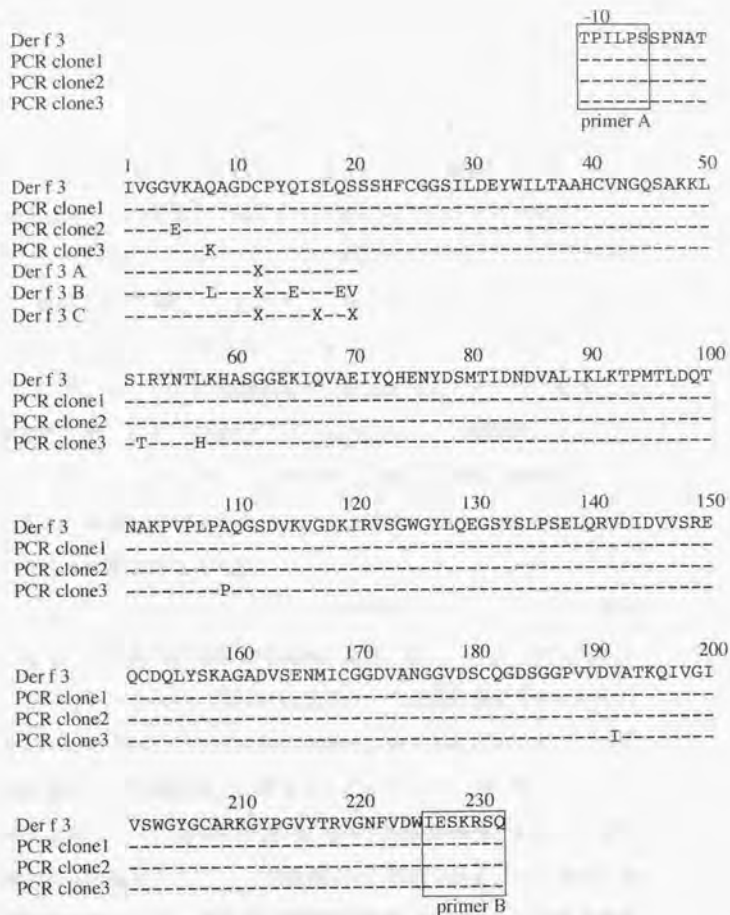


図 5-3 Der f 3 のアミノ酸配列の多型。

塩基配列を決定した Der f 3 の cDNA クローンのうちアミノ酸配列に変異のあったものを示している。Der f 3A^{5,6)}、B^{1,9)}、C^{2,3)} は報告されている Der f 3 の N 末端アミノ酸配列。プライマー A、B の配列は第二節、方法に記した。

アミノ酸はプロ配列として機能していることが知られている。Der f 3においては、N末端側1から16番目のアミノ酸より成る領域が典型的なシグナル配列の特徴である高度に疎水的なアミノ酸で構成されている。従って、Der f 3のN末端側配列は分泌のためのプレ配列（1番目から16番目）と、おそらく蛋白質のリフォールディングのためのプロ配列（17番目から27番目）の2つの機能領域に分けられると考えられる。N末端側領域の機能を解明するためには更なる検討が必要である。今回決定したDer f 3のアミノ酸配列についてトリプシンファミリーのアミノ酸配列と比較した結果、酵素活性を持つために必要な活性中心となるアミノ酸は、His40、Asp85、Ser185の3アミノ酸と推定された。

トリプシンやカリクレインはArgやLysといった正の電荷を持つアミノ酸のC末側を特異的に切断するプロテアーゼ活性を持っているが、そのプロ配列のC末端のアミノ酸はArgやLysになっており、分子内、あるいは分子間の自己消化的な切断によりプロ配列を除去して活性化すると考えられている⁶⁰⁾。一方、野生型Der f 3はArgやLysのC末側を特異的に切断する酵素活性を示すことが報告されているが^{23, 24)}、プロ領域のC末端となるアミノ酸はThrである。プロテアーゼのプロ配列はその蛋白質の正しい立体構造形成に寄与している。更に、プロ配列はプロテアーゼが好ましくない条件下で活性化して細胞に損傷を与えることを防ぐために、プロテアーゼが不活性状態を維持するための特異的なインヒビターとして機能するとも考えられている。従って、野生型のpro Der f 3を組み換え蛋白質として大腸菌体内に発現させ変性再生を行った場合、プロ配列の除去が行われずプロテアーゼ活性が検出されなかったのは、

Der f 3 が成熟型蛋白質となる際に切断される部位の配列が、Thr(-1)-Ile1 というように Der f 3 にとって基質特異性の低い配列であったためと考えられる。そこでこの Thr を Arg に置換した変異体を作製した。Der f 3 変異体 T(-1)R は、GST との融合蛋白質として大腸菌体内に発現させた場合、野生型と同様に封入体中に蓄積された。封入体を変性剤を用いて可溶化後、トリス塩酸緩衝液に透析して再生させる過程において N 末側プロ配列を自己消化的に除去していることが判明した。これは野生型では見られなかった現象である。また、*p*-アミノベンズアミジンやロイペプチンといったセリンプロテアーゼインヒビターとして知られる物質を添加することによりこの自己消化的プロ配列の除去は阻害された。再生した GST-pro Der f 3 T(-1)R 画分を DEAE-Toyopearl カラムに供し、主要ピークを回収したところ、2 種類の蛋白質より成ることが SDS-PAGE の結果確認された。一方は、GST 蛋白質であり、もう一方はヒト IgE 抗体と反応する蛋白質であった。後者については SDS-PAGE で分離した蛋白質について N 末端アミノ酸配列を決定したところ成熟型 Der f 3 と一致しており、Der f 3 プロ配列の C 末端アミノ酸の置換が Der f 3 の正しいプロセッシングを引き起こしていることが判明した。このように成熟型 Der f 3 を含む GST-pro Der f 3 T(-1)R 標品の酵素活性は、表 5-1 に示すとおり天然型 Der f 3 と同様の基質特異性を示していた。Der f 3 は、蛋白質の再生段階において自己消化的切断と思われる分解を容易に受けってしまうため、定量的な酵素活性の測定に耐える純度の高い精製物が得られていない。SDS-PAGE のバンドのパターンから推定される Der f 3 の単位質量当たりの酵素活性は報告されている天然型 Der f 3 のそれとほぼ同程度であると思われる。(data not shown)

今回の実験では野生型 pro Der f 3 には前駆体から活性型に変換させる活性が確認されなかったことから、ダニ虫体中においても Der f 3 前駆体を活性型に変換するための異なるプロテアーゼが存在している可能性が推測される。

Der f 3 の多型は、図 5-3 に示すとおり今回少なくとも 3 種類が存在が確認された。PCR クローンタイプ 1 は、はじめに cDNA ライブラリーより取得した Der f 3 cDNA と同じ配列である。タイプ 2 は、タイプ 1 と N 末端側から 5 番目のアミノ酸のみ Val から Glu に置き換わっている。タイプ 3 はタイプ 1 と 5 箇所のアミノ酸配列が異なっているが、これははじめに cDNA ライブラリーのスクリーニング時にプローブとして用いた Der f 3 の cDNA 断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致していた。Der f 3 と同様に多型を示す Der f 2 は、遺伝子が一つであると推定されていたが^{4,7)}、最近 Der p 1 や Der p 3 についても遺伝子が一つであることが報告されており^{6,1)}、Der f 3 の多型もダニ個体間の差であると予想される。

今回得られた Der f 3 の多型はいずれもプロ配列の C 末端アミノ酸残基が Thr であった。また、Der f 3 とアミノ酸配列上高い相同性を示す *D. pteronyssinus* 由来アレルゲン蛋白質 Der p 3 においてもプロ配列の C 末端は Thr であった^{6,2)}。トリプシン様セリンプロテアーゼの一つ、トリプターゼも、プロ配列をもつ前駆蛋白質として産生される。トリプターゼのプロ-成熟蛋白質間のアミノ酸配列は Gly-Ile であるが、異なるプロテアーゼによってプロ配列を切断除去されることにより活性化される^{6,3)}。Der f 3 についても、このような異なるプロテアーゼによるプロ配列の除去、活性化が引き起こされている可能性が考えられる。

総括

本論文は、抗原特異的な IgE を介するアレルギー反応の制御を最終的な目的として、アレルギー性疾患の原因となるアレルゲン蛋白質の一つ、ダニアレルゲン蛋白質の IgE エピトープ及び蛋白質の構造安定性等の特性について解析を行った研究である。

アレルギー性疾患は、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、花粉症、春季カタルというように、皮膚、気管支、鼻、眼といった体の様々な部位で発症する疾患である。これらアレルギー性疾患は近年その発症が増加しているが、発症機構は完全に解明されておらず、発症を根絶する治療法は確立されていない。

抗原特異的なアレルギー反応に携わるイムノグロブリンである IgE は、アレルギー性疾患患者血清中に高濃度に存在する傾向を示す。B 細胞から産生された IgE はマスト細胞、好塩基球の細胞膜表面に発現している FcεRI に結合する。このように受容体に結合した IgE に多価抗原が結合し受容体の凝集を引き起こすと、それが引き金となって細胞の活性化、脱顆粒が生じる。

主要ダニアレルゲン Der f 2 は、ダニアレルゲン感受性アレルギー疾患患者の 9 割が反応する *D. farinae* 由来のタンパク質であり、同じグループ 2 アレルゲン、Der p 2 以外にはアミノ酸配列に相同性を示す蛋白質が確認されておらず、Der f 2 のダニ虫体中での機能や立体構造については不明である。グループ 2 アレルゲンタンパク質を還元アルキル化することにより、ヒト IgE やマウス IgG との反応性が著しく低下するという報告があり、このことから、Der f 2 中に

存在する6つのCys残基がS-S結合を形成して、Der f 2のIgE結合及び蛋白質の構造安定性に寄与していると推定された。そこで *D. farinae* 虫体より精製したDer f 2タンパク質のS-S結合位置の決定を行った。その結果、6つのCys残基は、Cys8-Cys119、Cys21-Cys27、Cys73-Cys78という組み合わせで3つのS-S結合を形成していることが明らかとなった。

また、S-S結合位置決定の際に行ったペプチドマップの結果、少なくとも2種類の多型の存在がDer f 2タンパク質中に確認された。既に、結城らはDer f 2のcDNAとして129アミノ酸残基のうち、最大4カ所で置換の存在する3種類のDer f 2クローンを得ていた。そこで、これらの多型がDer f 2の抗原性やタンパク質の構造安定性に影響を及ぼす可能性を調べた。組換え遺伝子操作技術により大腸菌を用いて作製したDer f 2は、天然型Der f 2と同じS-S結合を形成しており、CDスペクトルの測定結果から β -シートを多く含む天然型と同様の二次構造を形成していることを確認した。これら組換え体は3クローンとも、抗Der f 2ヒトIgEとの結合活性は天然型と同程度であったが、プロテアーゼ耐性等のタンパク質安定性がクローン間で異なっていた。

次にDer f 2のヒトIgE結合部位の検索を行った。まずDer f 2タンパク質のN末端側およびC末端側アミノ酸残基を欠失した変異体を作製し、ヒトIgE結合活性の変化を調べたところ両末端ともIgE結合のみならずタンパク質の構造安定化に寄与していることが示唆された。特に、S-S結合をしているCys8、Cys119を含む領域の欠失はIgE結合活性を大きく低下させた。Der f 2と88%の相同性を示すDer p 2について、合成ペプチドやcDNA由来のDNA断片を

用いて作製した組換えペプチド断片による IgE エピトープ検索の報告がある。組換えペプチド断片を用いた方法では IgE と結合性を示すペプチドは得られていない。合成ペプチドを用いた報告では Cys73-Cys78 を含む領域が IgE 結合活性をもつペプチドとして同定されているが、用いた 195 名の患者血清の中でこのペプチドと反応する IgE を含んでいたのは 3 名のみであった。これらのことから、Der f 2 や Der p 2 に対するヒト IgE 抗体は一次配列上連続したペプチド断片では再構成が困難な領域をエピトープとしている可能性が考えられる。このことと欠失体を用いた結果から、エピトープを形成するアミノ酸残基をより正確に特定するには S-S 結合を保持したまま検索を行うことが必要であると考え、Der f 2 のアミノ酸残基を 1 つずつ異なるアミノ酸に置換した変異体を作製し、各 IgE 結合活性を測定した。その結果、Cys8 近傍、K15、D19 等の電荷をもつアミノ酸、Cys119 近傍のアミノ酸への置換導入が IgE 結合活性の著しい低下を引き起こし、更に、Cys73-Cys78 周辺と C 末端側に存在するアミノ酸残基も IgE 結合に寄与していることが示された。

抗 Der f 2 マウスモノクローナル抗体についてもエピトープの検索を行った。モノクローナル抗体ではポリクローナル抗体の抗 Der f 2 ヒト IgE 抗体と比べてエピトープ部位を構成するアミノ酸残基への変異導入の影響が明確に現れる。Der f 2 結合に関してヒト IgE と拮抗した 2 種類のマウスモノクローナル抗体 15E11 と 13A4 のエピトープは、各々 Cys73 を中心とした領域、C 末端側であることが確認され、先の Der f 2 変異体に対するヒト IgE 結合活性の測定結果からエピトープと推定された位置と一致する。また、用いたアレルギー性疾患患者血清中 IgE の Der f 2 への結合は、いずれもモノクロ

一ナル抗体 15E11, 13A4 でのみ阻害され, 18G8, 1B2, 7C10 では阻害されなかったことから Der f 2 の IgE エピトープは患者間で共通の部位であり, 2 カ所以上存在している可能性が示された。

Der f 2 はダニ生体中での生理機能も立体構造も不明な蛋白質である。本文中でも述べているように, Der f 2 の立体構造に関する情報は, アミノ酸残基へ置換を導入したり, 変異体から得られた情報を解析するのに有益である。今回は Der f 2 の立体構造の情報がないことから, S-S 結合位置や欠失体の解析結果を基に, エピトープを形成するアミノ酸残基の特定を試み, その結果全 129 残基のうち 40 残基を越えるアミノ酸への置換導入を行うこととなった。最近, 都臨床研との共同研究により NMR を用いた解析で, Der f 2 の主鎖構造についての立体構造が決定された。Der f 2 は, CD スペクトルから予想されていたとおり β -シートの多い構造を示しており, ペプチドマップを用いて決定した 3 つの S-S 結合の存在も確認された。また, 側鎖構造を含む詳細な構造決定には至っていないが, Der f 2 の立体構造に関する情報を基にアレルゲン性を示す領域の解析が進むことが期待される。また, 花粉由来のアレルゲン蛋白質 Amb a 5, Amb t 5, Phl p 2, プロフィリン等の立体構造も次々と明らかになっているが, これらアレルゲン蛋白質の立体構造を比較することによって, アレルゲン性発現の機構が明らかにされることも期待される。

Der f 3 についても, IgE アレルゲン性解析を行う第一段階として, cDNA クローニング及び活性発現を試みた。Der f 3 はアレルゲン性に関しては, Der f 2 のように多くのアレルギー性疾患患者に対して陽性反応を示すかどうか不明である。今回構築した活性発現系を用いて精製度の高い Der f 3 蛋白質を作製し, 抗原性について

詳細に解析を行うことが望まれる。一方、Der f 3 はセリンプロテアーゼとして興味深い蛋白質である。一般にトリプシン様のセリンプロテアーゼでは前駆体蛋白質から成熟型へ構造変化をする際に除去されるプロ配列の切断部位が、基質特異性の高い Arg-X、Lys-X といった配列であるのに対し、同様の基質特異性を示すトリプシン様セリンプロテアーゼの Der f 3 は、切断部位の配列が Thr-Ile となっている。今回、プロ配列の C 末端アミノ酸を Thr から Arg に置換した変異体を GST 融合蛋白質として大腸菌を用いて発現させることにより、速やかに自己消化的にプロ配列を除去し活性型 Der f 3 に変換させることに成功した。ダニ虫体中における前駆体から成熟型への変換には異なるプロテアーゼが関与している可能性もあり、生体内での活性化機構、構造変化について、より詳細な研究が行われることが必要である。

ダニアレルゲンは、IgE 結合活性を指標に同定されてきた蛋白質である。実際、これらダニアレルゲンと反応する IgE を持つアレルギー性疾患患者は多く、その場合、ダニアレルゲンとの接触を減らすことで症状の改善が認められることもある。また、序章でも述べたように、IgE と IgE 受容体の結合阻害によってアレルギー反応を抑制するといった、IgE を介したアレルギー反応の制御に着目した様々な研究が報告されている。抗原-IgE-IgE 受容体の結合は、多くのエフェクター分子、細胞が関わっているアレルギー反応の中で比較的制御が容易であると思われる。しかし、アレルギー反応には、膜結合型 IgE を発現し、IgE 抗体を産生する B 細胞や、アレルギー症状を促進するサイトカイン IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等を産生する Th2 型の T 細胞、MHC クラス II を介してダニ抗原由来ペプチ

ドを提示し、T 細胞を活性化している抗原提示細胞など、様々な機能細胞、分子が関わっている。従って、本研究では IgE を介した機構に言及してダニアレルゲンのアレルゲン性解析を進めたが、アレルギー反応に関わるこれら細胞、分子について幅広く注意を払っていくことが望まれる。

引用文献

1. Metzger H., Alcaraz G., Hohman R., Kinet J. P., Pribluda V., and Quatro R. (1986) The receptor with high affinity for Immunoglobulin E. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 419-470
2. Oettgen H. C., Martin T. R., Wynshaw-Boris A., Deng C., Drazen J. M., and Leder P. (1994) Active anaphylaxis in IgE deficient mice. *Nature* **370**, 367-370
3. Dombrowicz D., Flamand V., Brigman K. K., Koller B. H., and Kinet J. P. (1993) Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* **75**, 969-976
4. Beaven M. A., and Baumgartner R. A. (1996) Downstream signals initiated in mast cells by FcεRI and other receptors. *Current Opinion in Immunol.* **8**, 766-772
5. Platts-Mills T. A. E., and Chapman M. D. (1987) Dust mite: immunology, allergic disease and environmental control. *J. Allergy Clin. Immunol.* **80**, 755-775
6. Platts-Mills T. A. E., and De Weck A. L. (1989) Dust mite allergens and asthma - a world-wide problem. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 416-427
7. Platts-Mills T. A. E. (1992) Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1046-1060
8. Thomas W. R., Stewart G. A., Simpson R. J., Chua K. Y., Plozza T. M., Dilworth R. J., Nisbet A., and Turner K. J. (1988) Cloning and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen *Der p 1* in *Escherichia coli*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **85**, 127-129
9. Dilworth R. J., Chua K. Y., and Thomas W. R. (1991) Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen *Der f 1*. *Clin. Exp. Allergy* **21**, 25-32

10. Chua K. Y., Stewart G. A., Thomas W. R., Simpson R. J., Dilworth R. J., Plozza T. M., and Turner K. J. (1988) Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der p*1. *J. Exp. Med.* **167**, 175-182
11. Chua K. Y., Doyle C. R., Simpson R. J., Turner K. J., Stewart G. A., and Thomas W. R. (1990) Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p* II by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**, 118-123
12. Yuuki T., Okumura Y., Ando T., Yamakawa H., Suko M., Haida M., Okudaira H. (1991) Cloning and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen *Der f* II in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1233-1238
13. Smith W. A., Chua K. Y., Kuo M. C., Rogers B. L., and Thomas W. R. (1994) Cloning and sequencing of the *Dermatophagoides pteronyssinus* group III allergen, *Der p* III. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 220-228
14. Nishiyama C., Yasuhara T., Yuuki T., and Okudaira H. (1995) 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
15. Lin K. Y., Hsieh K. H., Thomas W. R., Chiang B. L., and Chua K. Y. (1994) Characterization of *Der p* V allergen, cDNA analysis, and IgE-mediated reactivity to the recombinant protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**, 989-996
16. Shen H. D., Chua K. Y., Lin W. L., Hsieh K. H., and Thomas W. R. (1995) Molecular cloning and immunological characterization of the house dust mite allergen *Der f* 7. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 1000-1006
17. Yasueda H., Mita H., Yui Y., and Shida T. (1986) Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **81**, 214-223

18. Holck A., Dale S., and Sletten K. (1986) Purification and characterization of a major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* **41**, 408-417
19. Heyman P. W., Chapman M. D., Aalberse R. C., Fox J. W., and Platts-Mills T. A. E. (1989) Antigenic structural analysis of group II allergens (*Der f* II and *Der p* II) from house dust mite (*Dermatophagoides* spp.). *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 1055-1067
20. Van der Zee J. S., Van Sweieten P., Jansen H. M., and Aalberse R. C. (1988) Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 884-896
21. Baldo B. A., and Donovan G. R. (1990) House dust mite (*Dermatophagoides* spp.) allergens: research directions and priorities in the 1990s. In *Molecular Approaches to the Study of Allergens* (Edited by Baldo B. A.), p.138. Karger, Basel
22. Stewart G. A., Ward L. D., Simpson R. J., and Thompson P. J. (1992) The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. *Immunology* **75**, 29-35
23. Ando T., Homma R., Ino Y., Miyahara A., Yanagihara T., Kimura H., Ikeda S., Yamakawa H., Iwaki M., Okumura Y., Suko M., Haida M., and Okudaira H. (1993) Trypsin-like protease of mites: Purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides farinae*. Relationship between trypsin-like protease and *Der f* III. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 777-784
24. Yasueda H., Mita H., Akiyama K., Shida T., Ando T., Sugiyama S., and Yamakawa H. (1993) Allergens from *Dermatophagoides* mites with chymotryptic activity. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 384-390
25. Stewart G. A., Kollinger M. R., King C. M., and Thompson P. J. (1994) A comparative study of three serine proteases from *Dermatophagoides teronyssinus* and *D. farinae*. *Allergy* **49**, 553-560

26. Haak-Frendscho M., Ridgway J., Shields R., Robbins K., Gorman C., and Jardieu P. (1993) Human IgE receptor α -chain IgG chimera blocks passive cutaneous anaphylaxis reaction in vivo. *J. Immunol.* **151**, 351-358
27. Saban R., Haak-Frendscho M., Zine M. (1994) Human Fc ϵ RI-IgG and humanized anti-IgE monoclonal antibody MaE11 block passive sensitization of human and rhesus monkey lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**, 836-843
28. Ra C., Kuromitsu S., Hirose T., Yasuda S., Furuchi K., and Okumura K. (1993) Soluble human high affinity receptor for IgE abrogates the IgE-mediated allergic reaction. *Int. Immunol.* **5**, 47-54
29. Naito K., Himura M., Okumura K., and Ra C. (1996) Recombinant soluble form of the human high affinity receptor for IgE inhibits anaphylactic shock in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 773-780
30. Ball T., Vrtala S., Sperr W. R., Valent P., Susani M., Kraft D., and Valent R. (1994) Isolation of an immunodominant IgE hapten from an epitope expression cDNA library. *J. Biol. Chem.* **269**, 28323-28328
31. Van Ree R., and Aalberse R. C. (1995) Rabbit IgG directed to a synthetic C-terminal peptide of the major grass pollen allergen *Lol p I* inhibits human basophil histamine release induced by natural *Lol p I*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **106**, 250-257
32. Van't Hof W., Driedijk P. C., Van den Berg M., Beck-Sickinger A. G., Jung G., and Aalberse R. C. (1991) Epitope mapping of the *Dermatophagoides pteronyssinus* house dust mite major allergen *Der p II* using overlapping synthetic peptides. *Mol. Immunol.* **28**, 1225-1232
33. Chua K. Y., Greene W. K., Kehal P., and Thomas W. R. (1991) IgE binding studies with large peptides expressed from *Der p II* cDNA constructs. *Clin. Exp. Allergy* **21**, 161-166
34. Lind P., Hansen O. C., and Horn N. (1988) The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, *Der p I*, of

Dermatophagoides pteromyssinus. J. Immunol. **140**, 4256-4262

35. Greene W. K., Chua K. Y., Stewart G. A., and Thomas W. R. (1990) Antigenic analysis of group I house dust mite allergens using random fragments of *Der p* I expressed by recombinant libraries. Int. Arch. Allergy Immunol. **92**, 30-38
36. Greene W. K., Cyster J. G., Chua K. Y., and O'Brien R. M. (1991) IgE and IgG binding of peptides expressed from fragments of cDNA encoding the major house dust mite allergen *Der p* I. J. Immunol. **147**, 3768-3773
37. Chapman M. D., Heymann P. W., and Platts-Mills T. A. E. (1987) Epitope mapping of two major inhalant allergens, *Der p* I and *Der f* I, from mites of genus *Dermatophagoides*. J. Immunol. **139**, 1479-1484
38. Iwamoto N., Nishiyama C., Yasuhara T., Saito A., Yuuki T., Okuruta Y., and Okudaira H. (1996) Direct expression of *Der f* 2, a major house dust mite allergen, in *Escherichia coli*. Int. Arch. Allergy Immunol. **109**, 356-361
39. Lombardero M., Heymann P. W., Platts-Mills T. A. E., Fox J. W., and Chapman M. D. (1990) Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effects of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. J. Immunol. **144**, 1353-1360
40. Nishiyama C., Yuuki T., Takai T., Okumura Y., and Okudaira H. (1993) Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, *Der f* II. Int. Arch. Allergy Immunol. **101**, 159-166
41. Nishiyama C., Yuuki T., Usui Y., Iwamoto N., Okumura Y., and Okudaira H. (1994) Effects of amino acid variations in recombinant *Der f* II on its human IgE and mouse IgG recognition. Int. Arch. Allergy Immunol. **105**, 62-69
42. Nishiyama C., Fukada M., Usui Y., Iwamoto N., Yuuki T., Okumura Y., and Okudaira H. (1995) Analysis of the IgE-epitope of *Der f* 2, a major mite

- allergen, by *in vitro* mutagenesis. *Mol. Immunol.* **32**, 1021-1029
43. Nishiyama C., Fukada M., and Okumura Y. (submitted)
 44. Akagawa M., Mori T., Ando T., and Okudaira H. (1992) Specific measurement of a major mite allergen, *Der f* II, by an enzyme-linked immunosorbent assay system using monoclonal anti-*Der f* II antibodies. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1725-1727
 45. Marti T., Rosselet S. J., Titani K., and Walsh K. A. (1987) Identification of disulfide-bridge substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* **26**, 8099-8109
 46. Takai T., Yuuki T., Okumura Y., and Okudaira H. (in press) *Mol. Immunol.*
 47. Yuuki T., Okumura Y., and Okudaira H. (1997) Genomic organization and polymorphisms of the major house dust mite allergen *Der f* 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**, 44-48
 48. Ito W., Ishiguro H., and Kurosawa Y. (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* **102**, 67-70
 49. Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 29-35
 50. O'Hehir R. E., Verhoef A., Panagiotopoulou E., Keswani S., Hayball J. D., Thomas W. R., and Lamb J. R. (1993) Analysis of human T cell responses to the group II allergen of *Dermatophagoides* species: localization of major antigenic sites. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 105-113
 51. Van Neerven R. J. J., Van't Hof W., Ringrose J. H., Jansen H. M., Aalberse R. C., Wierenga E. A., and Kapsenberg M. L. (1993) T cell epitopes of house dust mite major allergen *Der p* II. *J. Immunol.* **151**, 2326-2335
 52. Hoyne G. F., Gallow M. G., Kuo M.-G., and Thomas W. R. (1993)

Characterization of T-cell responses to the house dust mite allergen *Der p II* in mice. Evidence for major and cryptic epitopes. *Immunology* **78**, 65-73

53. Smith A. M., and Chapman M. D. (1996) Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: Contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen *Der p 2*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **33**, 399-405
54. Takahashi K., Aoki T., Kohmoto S., Nishimura H., Kodera Y., Matsushima A., and Inada Y. (1990) Activation of Kallikrein-Kinin system in human plasma with purified serine protease from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **91**, 80-85
55. Kohmoto S., Kodera Y., Takahashi K., Nishimura H., Matsushima A., and Inada Y. (1991) Activation of the Kallikrein-Kinin system in human plasma by serine protease from mites. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **10**, 15-20
56. Proudfoot N. J., and Brownlee G. G. (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**, 211-214
57. Chua K. Y., Kehal P. K., and Thomas W. R. (1993) Sequence polymorphisms of cDNA clones encoding the mite allergen *Der p I*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **101**, 364-368
58. MacDonald R. J., Stary S. J., and Swift G. H. (1982) Two similar but nonallelic rat pancreatic trypsinogen. *J. Biol. Chem.* **257**, 9724-9732
59. Huerou I. Le, Wicker C., Guilloteau P., Toullec R., and Puigserver A. (1990) Isolation and nucleotide sequence of cDNA clone for bovine pancreatic anionic trypsinogen. *Eur. J. Biochem.* **193**, 767-773
60. Huber R. and Bode W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* **11**, 114-122
61. Thomas W. R., Smith W., Hales B. J., and Carter M. D. (1997) Functional effects of polymorphisms of house dust mite allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**, 96-98

62. Smith W. A., Chua K. Y., Kuo M. C., Rogers B. L., and Thomas W. R. (1994) Cloning and sequencing of the Dermatophagoides pteronissynus group III allergen, *Der p* III. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 220-228
63. Vanderslice P., Ballinger S. M., Tam E. K., Goldstein S. M., Craik C. S., and Caughey G. H. (1990) Human mast cell tryptase: Multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3811-3815

謝辞

本論文を作成するに当たり、懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学科教授野口忠先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うに当たり、ご助言戴きましたアサヒビール株式会社基盤研究所所長奥村康博士に深く感謝いたします。本研究を行う機会をお与え戴きましたアサヒビール株式会社顧問、鳥居薬品株式会社北畠克顕博士（前アサヒビール基盤研究所所長）に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるに当たり、ご助言、ご指導を戴きましたアサヒビール基盤研究所基礎技術部部員の皆様方に感謝いたします。本研究の遂行に当たり、ご助言戴きました結城敏文博士、高井敏朗氏、安江奈美子氏、安原貴臣氏、ご尽力戴きました碓井由紀子氏、深田美奈子氏に深く感謝いたします。

本研究を進めるに当たり、数々のご助言、御示唆を戴きました東京大学生物生産工学研究センター西山真助教授に深く感謝いたします。

