

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570107

研究課題名（和文）

ヒッポ仮説とアレルゲン性の由来に関する構造生物学的研究

研究課題名（英文）

Structural biology on hyppo hypothesis and origin of allergenicity

研究代表者

畠中 秀樹 (HATANAKA HIDEKI)

九州大学・生体防御医学研究所・学術研究員

研究者番号：00260331

研究成果の概要：

ダニアレルゲン Der f 2 は、立体構造が類似している先天性免疫分子 MD-2 と同様に、リポ多糖を結合することが、核磁気共鳴法やゲルろ過、蛍光測定などによって示された。化学シフト摂動法などの結果から、Der f 2 は 2 枚の大きな β シートの間でリポ多糖の疎水部位（ヒッポ）を捉え、MD-2-リポ多糖複合体に似た構造を作ることが示唆された。これらの結果は、Der f 2 が MD-2 の代わりに先天性免疫系を活性化することでアレルゲン性を獲得したとする考えと合致する。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、脂質、生体分子、蛋白質、免疫学

1. 研究開始当初の背景

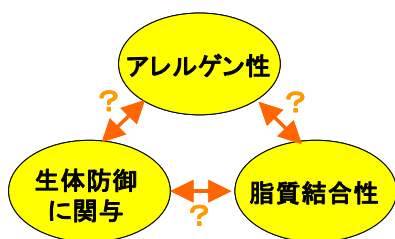
ヒッポ仮説とは、有名な危険モデル(免疫系は非自己に反応するというより、むしろ宿主の損傷に関連する事物に反応しているとする説)に続いてMatzinger博士らが2004年に提唱した仮説であり、その危険シグナルの進化的由来は露出したヒッポ (HYdroPhobic POrtion=疎水部) である、とする説である。このヒッポ仮説

は医学的に重要ないくつかの示唆を含んでいるが、論文中で最初に言及されたものがアレルギーの原因に関する示唆であった。

アレルギーを引き起こす蛋白質をアレルゲン蛋白質、または単にアレルゲンと呼ぶ。花粉やハウスダスト、食物などは、それぞれ多種多様な蛋白質が含んでいるが、なぜ一部の蛋白質だけが強いアレル

ゲン性を示すのかは、今も不明である。このため、例えば遺伝子組換え作物のアレルゲン性は長期予測が難しく、問題となっている。

研究開始以前から研究代表者らは、この「なぜアレルゲンがアレルゲンになるのか？」という古くからの問題について2点を検討していた。まずアレルゲンには生体防御、つまりそれぞれの生物が微生物などから体を守るしくみに関わる蛋白質が多い。次に、動植物のアレルゲンの大多数は、脂質結合性蛋白質またはその類縁蛋白質である(図)。



ヒッポ仮説はまさにこれと同じ点を指摘している。しかしヒッポ仮説も研究代表者らも、この3者関係の背後にある具体的な因果関係、特にヒト体内で各種のアレルゲンがどのような分子と相互作用をしているのかについてはほとんど迫れていなかった。またこれらの説で前提とされている緩いながらも十分な特異性は理学的に大きな関心もたれるが、これもどのように実現されているのか全くわかっていなかった。

研究代表者らは世界に先駆けて明らかにしたダニアレルゲンDer f 2の立体構造をきっかけに、Der f 2が細菌表面に結合することを見出していた。その後様々な知見が現れ、Der f 2は新しい分類群、ML蛋白質スーパーファミリーにまとめられた。この分類群は先天性免疫に関わる脂質結合蛋白質として提案されており、分類群を代表するのが、哺乳動物において細菌に特徴的なリポ多糖のリピドA部分を認識して免疫の発動を強力に左右するMD-2である。つまりDer f 2は、上図の3者関係を象徴する存在になりつつあった。

2. 研究の目的

本研究は、ダニアレルゲン Der f 2 と

先天性免疫に関わるリポドA認識分子MD-2蛋白質に関する総合的な知見を得ることで、生体分子におけるアレルゲン性・生体防御との関連性・脂質結合性の3者の因果関係を探り、アレルゲン性の構造生物化学的基盤を構築することを目的とした。具体的には、Der f 2 と脂質リガンド(未知)の複合体構造と、MD-2 とリポドAの複合体構造の2つを、詳細に比較することで、Der f 2 がどのような脂質群を結合するのか、また2つのML蛋白質が脂質群をどのように結合するのかを明らかにしたいと考えていた。

3. 研究の方法

核磁気共鳴法(NMR)については、九州大学の共通施設であるBruker社の600MHz・700MHz(クライオプローブ装備)NMR装置を利用し、 ^1H - ^{13}C HSQC や ^1H - ^{15}N HSQC などの2次元スペクトルやHNC0などの蛋白質用標準3次元スペクトルを測定し、精製タグ付きDer f 2に結合した ^{13}C 、 ^{15}N 標識リガンド、特にアミノ糖誘導体の化学構造を解析するとともに、化学シフト摂動法によりリガンド結合部位を解析した。

X線結晶解析については、やはり九州大学の共通施設であるRobbins社の結晶化微量スクリーニング装置Hydraを用いて結晶化を行った後、Bruker社CCD搭載型X線回折装置や、放射光施設であるSPring-8を利用して回折データを収集した。

ゲルろ過による解析ではGE Healthcare社のsuperdex75を用い、リポ多糖の有無によるDer f 2の流出位置の変化を調べた。蛍光測定では、Molecular DevicesのSpectra MAX GEMINI EMを用い、励起光波長290nm、発光波長324nmで、リポ多糖の濃度に伴う蛍光強度の減少を調べた。

4. 研究成果

ダニアレルゲンDer f 2の脂質リガンドの同定については、NMRを中心にした各種の方法によって進められた。まず、大腸菌破砕物中から脂質リガンドを同定する試みについては、炭素13と窒素15

で標識した破砕物を精製タグ付きDer f 2と混合した後にタグ精製された試料を用いて各種三重共鳴NMRを測定したところ、Der f 2に結合した大腸菌由来のシグナルの多くが(→4 GlcNAc β1→3 Fuc4NAc α1→4 ManNAcA β1→)という三糖の繰り返し構造に合致することがわかった。しかしこれは環状型の腸内細菌共通抗原にあたり、一般にNMR試料でよく見られる混入物として近年報告があったものであった。この成分は複合体の精製を進めることで除去され、再びNMRスペクトルを測定することで、大腸菌破砕物中のリガンドはリポ多糖と共通の特徴を持つ糖脂質であることがわかった。

そこで市販のリポ多糖がDer f 2と結合するかどうかを、種々の方法で共同研究により検討した。まずリポ多糖をDer f 2と混合するとゲルろ過クロマトグラフィーの流出パターンが変化することがわかった。またDer f 2の唯一のトリプトファン残基Trp-92の蛍光強度もリポ多糖の添加により変化することがわかった。この解析を進め、数十nMの解離定数を持つ十分強い結合であること、1対1の結合であることがわかった。

それに加え、海外からDer p 2はリポ多糖だけでなく先天性免疫レセプターToll-like receptor 4 (TLR4)と結合しMD-2の代わりにリポ多糖のシグナルを伝達しうることが報告され、Der f 2に関して本研究で提唱した仮説、つまりDer f 2が脂質を結合して先天性免疫に影響すること、それがアレルギー性の由来になりうることを実証された。

リポ多糖との結合がわかったので、Der f 2の脂質との相互作用様式を知る目的で、Der f 2とリポ多糖の混合物の結晶化を行ったところ、Der f 2単体試料では結晶化しない多数の溶液条件で結晶が得られた。1.5オングストロームを超える分解能を持つ結晶が得られており、分子置換法によって解析を試みたが、回折データの質がまだ不十分であるため、現在結晶化条件の最適化を進めた。しかし、結晶の質は改善できたが、実験的な位相情報は得られず、最終構造を得ることができなかった。

その代わりにNMRの化学シフト撮

動法を進め、リポ多糖の結合様式を詳細に調べた。その結果、Der f 2は2枚のβシートの間の疎水的なポケットを開き、リポ多糖のリポドAの脂肪酸部分を取り込んで結合することが明らかになった。つまりDer f 2はリポ多糖のヒッポを認識することがわかった。

MD-2のリポドA複合体については、大量発現と精製を進めていたが、海外のグループでTLR4・MD-2・リポ多糖の三者複合体の二量体の結晶構造が得られ、リポ多糖のリポドA部分の脂肪酸はMD-2の構造を変えることなく6本ともタンパク質内部の疎水的空間に納まっていた。上記の化学シフト撮動法などの結果から考えて、Der f 2・リポ多糖複合体はMD-2・リポ多糖複合体と同様のTLR4結合部位を形成できると考えられ、三者複合体の二量体をよく似た形に作ること(つまり構造的な分子擬態)でリポ多糖のシグナルを伝達しうると考えられる。

今後は他のアレルギーについても同様の仮説を裏付ける生化学的・構造生物学的知見の有無を検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2件)

- ① 市川さおり、高井敏朗、奥村康、小川秀興、沖野望、伊東信、神田大輔、畠中秀樹ダニ主要アレルギーDer f 2のリガンド探索と複合体の構造解析
第7回日本蛋白質科学会年会
平成19年5月25日・仙台市
- ② 市川さおり、高井敏朗、奥村康、小川秀興、沖野望、伊東信、神田大輔、畠中秀樹ダニ主要アレルギーDer f 2のリガンド探索と複合体の構造解析
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会年会合同年会
平成19年12月12日・横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠中 秀樹 (HATANAKA HIDEKI)
九州大学・生体防御医学研究所・学術研究

員

研究者番号：00260331

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：