

平成22年6月10日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成19年4月1日～平成22年3月31日

課題番号：19580356

研究課題名（和文） イヌアレルギーの性状分析を通じてのイヌアレルギーのリスク評価とその制御法開発

研究課題名（英文） Characterization of dog allergens and their application to develop a control method for dog allergy

研究代表者 鎌田 洋一

(KAMATA YOICHI)

研究者番号：20152837

研究成果の概要（和文）：

人と動物が共に生きる社会が広まっている。伴侶動物としての代表の位置にあるイヌが、アレルギーを誘導するものとして、危害を持つか、すなわちイヌアレルギーとしてリスク性を示すか否か検討するために、イヌアレルギーの構造と機能を詳細に解析した。また、同アレルギーのIgE抗体反応における交差性を検討した。推定アミノ酸配列から、バイオインフォマティクスの技術を用いてイヌアレルギーについてモデル構造を解析した。その結果、Can f 1およびCan f 2は、リポカリンファミリー蛋白質に属し、バレル構造とジスルフィド結合というアレルギー蛋白質がもつ共通の特徴を有していた。X線小角散乱法解析と円偏光二色性分光法から、同蛋白質は球状で、溶液中で単分子として分散する事、推定アミノ酸から計算される分子量と一致する溶液中の分子量を示した。また、 β -sheetが豊富な蛋白質であることが明らかになった。アルブミンの交差性について検討した結果、イヌアレルギー患者中にはイヌアルブミン(Can f 3)だけでなく多数の動物種のアルブミンにもIgE抗体を産生しており、アルブミンが広くアレルギーリスク物質である事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Human-animal bonds become stronger. Dogs as behalf of pets are tightly associated with human living life. Due to the intimate relationship, human may be sensitized with and exhibit allergic response to dog allergens. To prevent dog allergy and assess the risk of dog allergens, characterization of dog allergens was performed. From the analysis of amino-acid sequence of Can f 1 and Can f 2 (major dog allergens), both allergens revealed the barrel structure and one disulfide bond, which were the charters of popular antigenic proteins. X-ray small angle scattering analysis and circular dichroism photometric method indicated that both allergens were globular and β -sheet-abundant proteins, and showed mono-molecular distribution in water-solutions. Also, both allergens showed the values of molecular weight in solution, which was accordance with those estimated from the amino-acid sequence. Dog albumin (Can f 3) being as one of dog allergens was also examined its allergic cross reactions. The IgE antibody in the serum of dog allergy patients bound to albumin of dog and other animal species. This fact indicates that dog allergens must be recognized as widely distributed risk substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	0	1,000,000
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：獣医公衆衛生

1. 研究開始当初の背景

家庭内における動物の飼育の増加とともに、これらの動物が産生・分泌する蛋白質がアレルギーとなり引き起こされるアレルギーが問題となってきている。家庭で飼育されている動物のうち、最も飼育頭数が多い動物はイヌ (*Canis familiaris*) であり、現在、日本では20%近くの家庭でイヌが飼育されており、飼育頭数は、約1,310万頭にのぼる。さらに、イヌ飼育家庭を年齢別に分けると、最も多い約30%が高齢者を占めており、高齢化社会の進む先進国では、さらなる飼育頭数の増加が見込まれる。また、イヌの飼育意向を示す家庭が全体の約46%を占め、今後ますます飼育頭数は増加していくと考えられる。また、2002年の身体障害者補助犬法の施行や、セラピードッグの普及などに表れるように、動物介在教育、動物介在活動、あるいは動物介在療法が人間の健康増進、医療の一部における補完医療、高齢者や障害者のノーマライゼーション、および子供の心身の健康的な発達に大きな役割を担っているということが認知され始めている²⁾。このことから、ヒトとイヌとが直接的に接する機会が増加し、イヌアレルギーが問題となってきている。

これまでにイヌアレルギーとして、唾液腺で産出・分泌される *Canis familiaris* allergen 1 (Can f 1)、および Can f 2 が同定されており、イヌアレルギー患者の血清中の IgE 抗体に対して、Can f 1 は75%、Can f 2 は25%反応することが明らかとなっている。また、Can f 1、および Can f 2 が、マウスに対してアナフィラキシーを誘発することも明らかとなっている。

Can f 1、および Can f 2 は、それぞれ148、および161 アミノ酸残基からなる分子量約17,300、および18,800の蛋白質であり、アミノ酸配列の相同性から疎水性低分子輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーに属すると考えられている。

Can f 1およびCan f 2について、そのアミノ酸配列の研究により、システインプロテアーゼ阻害剤であるシスタチンが有するQXVXGモチーフの一部が存在していることが報告されている。また、ヒトにおいて唾液中に分泌されるシスタチンが、口腔内の炎症部位で細胞分解などにより遊離したシステインプロテアーゼを制御しているかもしれないという報告がある。

Can f 1およびCan f 2 の構造、機能、およびアレルギー発症メカニズムについてはほとんど明らかとなっていない。従って、それらを明らかにすることが、イヌアレルギーの制御やそのリスク評価を可能ならしめる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3点に要約される。

(1) イヌアレルゲンは、アレルゲンとしての同定がなされただけで、なぜアレルゲンになるのかという問題に解答する研究がなされていない。イヌアレルゲンタンパク質の構造を解析する。

(2) イヌアレルゲンが生体内でいかなる働きをするタンパク質であるのか検討する。具体的には、イヌアレルゲン分子中にタンパク質分解酵素阻害物質のアミノ酸配列と相同の部分があることから、パパインというタンパク質分解酵素の活性を阻害するか否か調べた。イヌアレルゲンの生体内での役割が分かれば、その制御のための切り口の発見に迫れるためである。

(3) アルブミンは動物に共通して存在する血清中の蛋白質であるが、イヌアレルギー患者中のIgE抗体が、多種類の動物のアルブミンと反応するかどうか、その結果、幅広くリスク物質として位置づけられるかどうか、検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) イヌアレルゲンの構造解析

① イヌアレルゲンのホモロジーモデル構造による立体構造予測

Can f 1およびCan f 2 のアミノ酸配列をBLAST (Basic Local Alignment Search Tool;<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用い、約20,000個の蛋白質構造データベースであるProtein Data Bank (PDB) 19)に登録されている最もアミノ酸配列相同性の高い蛋白質を得た。さらに、得られた最もアミノ酸配列相

同性の高かった蛋白質を鋳型として、

SWISS-MODEL workspace

(<http://swissmodel.expasy.org/>)を用いて、Can f 1およびCan f 2のホモロジーモデル構造を解析した。分子動力的シミュレーションプログラムであるGROMOS 22) (GROnigen MOlecular Simulation computer program package)によってエネルギーの極小化による構造の精密化を行った。

② 組換えCan f 1およびCan f 2の調製

Can f 1およびCan f 2遺伝子を発現ベクターpGEX-4T-2に導入したプラスミドで形質転換した*E.coli* BL21を用いて両アレルゲンの組換え体を調製した。

③ X線小角散乱法によるCan f 1およびCan f 2の構造解析

A. サンプル調整

精製したCan f 1およびCan f 2溶液を2.5 mg/ml、5.0 mg/ml、8.0 mg/ml、および12.0 mg/mlの濃度に調整し、サンプルとした。

また、分子量のリファレンスとしてovalbumin ($M_r = 45,000$)とlysozyme ($M_r = 14,307$)を用いた。

B. X線小角散乱測定

大型放射光施設SPring-8のビームラインBL40B2にて行った。照射X線波長を1.000 Å、カメラ長を1.000 mに調整し、25 °Cにおいて実験を行った。散乱光はR-AXIS IV++システム (RIGAKU) を用いて検出した。

C. データ解析

検出器に二次元的に記録された蛋白質試料、および緩衝液の散乱パターンを円環平均によって一次元データに変換し、蛋白質試料のデータから緩衝液のデータを差し引いた。小角領域の散乱曲線は単分散系に対するギニエの近似式によって分析した。

④ 円偏光二色性分光法によるCan f 1およびCan f 2の構造解析

A. 遠紫外領域 (far-UV) 円偏光二色性測定と二次構造含有量予測

測定は、J-820 spectropolarimeter (Jasco) を用い、測定波長200~260 nm において行った。Can f 1およびCan f 2 の二次構造含有量の予測は、DICROPROT 200035)プログラムを用いて計算した。

(2) イヌアレルギーのパパインの酵素活性への影響

パパイン (SIGMA) は、0.2 M リン酸カリウムバッファー (pH 6.0、4 mM EDTA および 0.2 mM システインを含む) に溶解した。0.2 M リン酸カリウムバッファー、pH 6.0 に EDTA を加えたものは室温で保存し、システイン加えたものは即日使用した。パパインの阻害剤として鶏卵白由来シスタチン (以下、シスタチン) を用いた。シスタチンのバッファーには PBS を使用した。パパインの基質にはベンゾイル-DL-アルギニン-ナフチルアミド (以下、BANA) を使用した。30 mg の BANA を 1 ml の DMSO に溶解して 4°C で保存し、使用のたびに蒸留水で 10 倍希釈した (最終濃度 3 mg/ml)。パパインの反応停止剤に 5 mM の 4-クロロマーキュリー安息香酸 (以下、CMB) を使用した。0.1785 g の CMB を 6 ml の 0.5 M NaOH に溶かして、0.5 M EDTA を 5 ml 加えて、蒸留水で 45 ml にし、1 M HCl で pH 6.0 にし、蒸留水で 50 ml にして作成し、室温で保存した。パパインが BANA を分解して生成した 2 ナフチルアミドと反応して発色する呈色剤に 0.15 mg/ml のファーストガーネット GBC を使用した。ファーストガーネット GBC は 4% Brij-35 に溶かして即日使った。

プレート 1 ウェルあたり、パパイン 60 μ l、シスタチンまたはイヌアレルギー 40 μ l をいれ、5 分間 37°C で反応させた。その後、BANA を 40 μ l 加え、15 分間 37°C で反応させた。そして、CMB とファーストガーネット GBC を

等量混合した溶液を 96 μ l 加えて、室温で 5 分間反応させ、プレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定し、パパインの酵素活性量とした。

(3) アルブミンアレルギーとの交差性

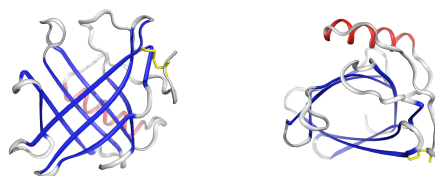
ハムスターアレルギー患者について、アレルギー解析をした結果、アルブミンに感作を受けている患者血清と、イヌのアルブミンとの反応性を解析した。抗ヒト IgE 抗体を用いて、アルブミンにおける動物種の違いとアレルギー反応性を検討した。

4. 研究成果

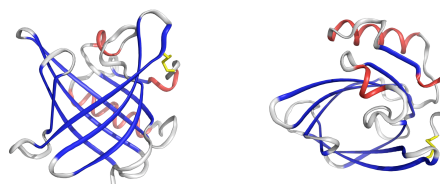
(1) イヌアレルギーのタンパク質構造解析

① イヌアレルギーのホモロジーモデル構造による立体構造予測

モデル構造より、Can f 1、および Can f 2 ともに、リポカリン蛋白質特有の構造的特徴である 8 本の β -strand からなる β -barrel 構造、1 本の長い α -helix、および分子内ジスルフィド結合を有し、疎水性低分子を結合するであろう cavity を有することが推測された。



Can f 1の立体構造モデル



Can f 2の立体構造モデル

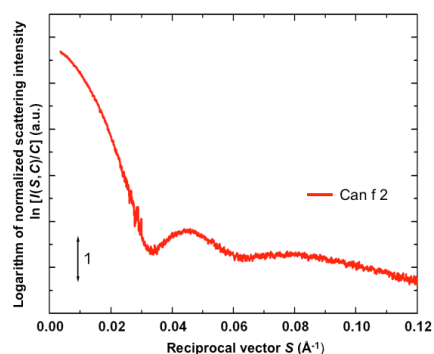
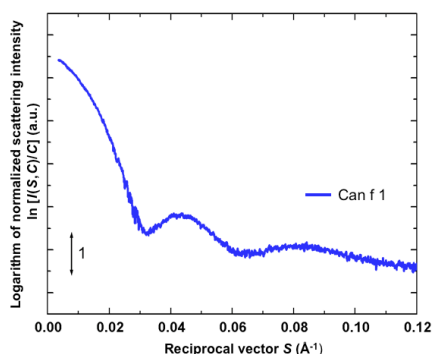
ホモロジーモデル構造からも Can f 1および Can f 2 はリポカリン蛋白質であることが示唆された。また、リポカリン蛋白質において、 β D-strandとC 末端部を結ぶ分子内ジス

ルフィド結合のみを有することが、アレルギーンとしての機能に関わっていることが考えられる。

②X線小角散乱法による Can f 1 および Can f 2 の構造解析

A. Can f 1、および Can f 2 の散乱曲線

Can f 1、およびCan f 2 の散乱曲線を示す。このような散乱曲線パターンは、Can f 1およびCan f 2 が球状タンパク質であることを示している。



Can f 1およびCan f 2 の $R_g(0)$ は、それぞれ $18.9 \pm 0.03 \text{ \AA}$ 、および $19.2 \pm 0.05 \text{ \AA}$ となった。また、リファレンスであるovalbuminおよびlysozymeと、Can f 1およびCan f 2 の $I(0, C)/C$ を比較して分子量を求めた。Can f 1およびCan f 2 の分子量は、それぞれ $1.5 \times 10^4 \text{ Da}$ 、および $2.1 \times 10^4 \text{ Da}$ とアミノ酸配列から予想される分子量 (Can f 1 : $1.7 \times 10^4 \text{ Da}$ 、Can f 2 : $1.9 \times 10^4 \text{ Da}$) とよく一致した。

③円偏光二色性分光法による Can f 1 および

Can f 2 の構造解析

CD スペクトルから得られた二次構造含有量と同様の値を示した。このことから、Can f 1、およびCan f 2 も他のリポカリンタンパク質と同様に β -sheet に富んだ構造であることが予測された。

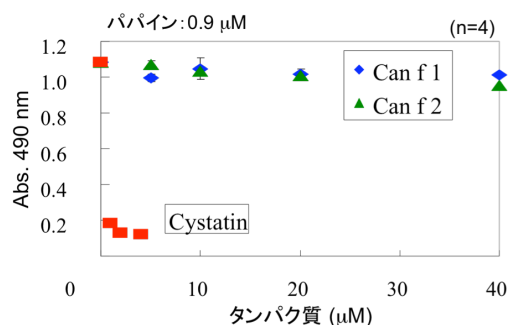
CD スペクトラムから計算した Can f 1 および Can f 2 の二次構造含有量

	α -helix	β -sheet	Coil
Can f 1	11.2	36.6	52.2
Can f 2	14.3	38.8	46.6

(2)イヌアレルギーンの生物学的意義の検討

イヌアレルギーンによるパパインの酵素活性への影響

パパインの濃度を変量にし、パパインのタンパク分解活性があると、吸光度が上昇することを確認した。パパイン 20 mg/ml の溶液に対して、各濃度のタンパク質の効果を調べた結果を以下に示した。陽性対象のシスタチンは 490 nm の吸光度を大きく低下させた。一方、Can f 1 および Can f 2 では濃度依存的な吸光度の低下が見られなかった。



結論として、イヌアレルギーンにタンパク質分解酵素阻害作用はないものと考えられた。

(3)アレルギーンとしてのアルブミンの交差性

イヌアレルギー患者には、Can f1 および Can f 2 に対して IgE 抗体を産生しているのみならず、イヌアルブミンに反応性を示す IgE 抗体を血清中に保有していた。さらに、同患者血清は各種動物のアルブミンに対しても IgE 抗体を産生していた。イヌアルブミンアレルギーであること、さらに多種の動物のアルブミンへの交差性があることは、一度イヌアレルギーあるいはペットアレルギーに罹患すれば、接触経験のない動物へのアレルギーも誘発される危険性が示唆され、イヌアレルギーあるいはペットアレルギーの潜在的リスクの大きさが推察された。

各種蛋白質に対するイヌアレルギー患者血清の反応性：IgE 抗体の結合

	患 者	
	No.13	No.17
Dog Can f 1	1.354	3.319
Dog Can f 2	1.830	3.500
Albumin		
Dog	0.969	3.500
Hamster	1.693	2.057
Mouse	0.299	0.451
Rat	0.286	0.429
Ginea pig	0.304	0.648
Rabbit	0.015	0.427
Pig	0.275	0.555
Cow	0.424	2.554

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 田畑瑞毅、宮本優也、辻 裕明、西村重徳、鎌田洋一、乾 隆、イヌアレルギー Can f 1 および Can f 2 の構造解析、第 82 回日本生化学会、2009、神戸
- ② 森田園子、伊澤 淳、額賀優江、新妻知行、鎌田洋一、ハムスターアレルギーの同定とその分子生物学的免疫学的性状、第 57 回日本アレルギー学会、2007、横浜
- ③ 鎌田洋一、シンポジウム「ペットアレルギー

ー：ヒトが動物と共生する際の健康障害-イヌアレルギーが将来の大問題となる前に-

- ④ 鎌田洋一、手塚史章、森田園子、伊澤 淳、額賀優江、新妻知行、第 144 回日本獣医学会、2007、江別

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：イヌアレルギーに対する予防又は治療作用を有するポリペプチド

発明者：鎌田洋一

権利者：鎌田洋一、大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2006-009118

出願年月日：2009 年 1 月 6 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 洋一 (KAMATA YOICHI)

研究者番号：20152837