

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780097  
 研究課題名 (和文) ピーナッツ主要アレルゲンの立体構造解析と重篤症状を引き起こす構造要因の解析  
 研究課題名 (英文) Three dimensional structural analysis of peanut major allergens

研究代表者  
 増田 太郎 (MASUDA TARO)  
 京都大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：40395653

## 研究成果の概要：

ピーナッツ主要アレルゲンである Ara h 1、および、Ara h 3 について、cDNA のクローニング、組換えタンパク質の発現と精製を行い、Ara h 1 については X 線結晶構造解析に供し得る単結晶の調製に成功した。Spring-8 放射光施設において取得した 2.8 Å までの X 線回折データより、Ara h 1 結晶の空間群を C2、 $a=165.899\text{Å}$ 、 $b=89.263\text{Å}$ 、 $c=160.036\text{Å}$ 、 $\alpha=90^\circ$ 、 $\beta=109.046^\circ$ 、 $\gamma=90^\circ$  と決定し、ダイズ 7S グロブリンβ-サブユニットの立体構造をサーチモデルとした分子置換法により初期位相を決定した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品生化学

## 1. 研究開始当初の背景

食品タンパク質が誘起するアレルギーの中で、ピーナッツアレルギーは特に重篤な症状を引き起こすことが知られている。ピーナッツアレルギーの主要なアレルゲンとして、Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3 という 3 種のタンパク質が同定されており、これら 3 種のアレルゲンは各々、種子貯蔵タンパク質である 7S グロブリン、2S アルブミン、11S グロブリンに分類される。Ara h 1 と Ara h 3 がアレルゲンとなり重篤なアレルギー症状を誘起

するにもかかわらず、同じタンパク質ファミリーに属し、極めて類似した構造を有する他のマメ科植物由来の 7S、11S グロブリンはアレルギー反応に寄与しないか、或いは軽度のアレルギー症状を誘起するのみである。このようなアレルギー反応の軽重は、アレルゲンのアミノ酸配列及び立体構造に起因していると考えられている。しかし、Ara h 1 と Ara h 3 のエピトープに関しては詳細な解析がなされ、エピトープ部位のアミノ酸配列数箇所が明らかにされているものの、立体構造と抗

原性の関係については全く未解明であり、両アレルギーの立体構造解析が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ピーナッツアレルギー Ara h 1 と Ara h 3 の立体構造を明らかとし、非アレルギー性及び低アレルギー性 7S グロブリン及び 11S グロブリンの立体構造と詳細に比較検討する。本申請研究において、重度のアレルギー性を規定するタンパク質の構造要因が明らかになると考えられる。ここで得られる知見は低アレルギー食品の開発或いは低アレルギー化を可能とする食品加工法の開発に寄与すると期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) Ara h 1, Ara h 3 cDNA のクローニング

Ara h 1, Ara h 3 はそれぞれ種子貯蔵タンパク質 7S グロブリン、11S グロブリンファミリーに属しており、いずれも複数遺伝子からなるファミリーを構成しているため、種子より単一の Ara h 1, Ara h 3 を調製することは困難であると考えられる。したがって、本研究では組換え型 Ara h 1, Ara h 3 を調製し、結晶化を試みた。すなわち、登熟期のピーナッツ種子より RNA を抽出し、Ara h 1 と Ara h 3 各々に特異的なプライマーを設計し、RT-PCR 法により cDNA の単離を行った。

### (2) 組換え型 Ara h 1, Ara h 3 発現系の構築

#### ① Ara h 1 発現系の調製

Ara h 1 の成熟領域をコードする cDNA を大腸菌発現プラスミド pET21d の NcoI サイト、BamHI サイト間にクローニングした。塩基配列の確認後、本発現プラスミドを発現用宿主 BL21(DE3) に導入し、LB 培地 37°C にて培養後 IPTG による発現誘導を行った。発現誘導後、菌体を超音波破碎し、発現タンパク質を SDS-PAGE により確認した。

また、Ara h 1 には、N-末端、C-末端領域に立体構造形成、多量体形成に関与が薄いと考えられるエクステンション領域が存在する。結晶化を容易にするため、これらの領域を欠失させた組換え型 Ara h 1 タンパク質 (以下 Ara h 1\_core) の発現系も併せて調製した。

#### ② Ara h 3 発現系の調製

Ara h 3 についても、Ara h 1 と同様、発現プラスミド pET21d による組換えタンパク質発現系を調製した。更に、Ara h 3 に関しては、発現条件の最適化を行うため、以下の発現プラスミドにおいて、発現条件

の検討を行った。pCold (コールドショック発現系)、pGEX (GST 融合タンパク質発現系)、pMAL (マルトース結合タンパク質との融合タンパク質発現系)。pCold, pGEX, pMAL による Ara h 3 発現プラスミドは大腸菌株、BL21, HMS174, DH5a, Origami, Rosetta などに導入し、目的タンパク質の発現と溶解性を確認した。

### (3) 組換え型 Ara h 1, Ara h 3 の精製

#### ① 組換え型 Ara h 1, Ara h 1\_core の精製

発現プラスミド pET\_Ara h 1 を導入した発現用宿主 BL21(DE3) を LB 培地にて、OD<sub>600</sub>=0.6 付近まで 37°C にて培養し、氷上にて 20 分間冷却後、IPTG を添加し、20°C にて 24 時間培養した。菌体を超音波破碎したのち、上清に 40% 飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し、遠心分離により沈澱を取り除いたのち、上清をブチルトヨールによる疎水性カラムクロマトグラフィーにより精製した。更に組換え型 Ara h 1 を含む画分を収集し、Q-セファロースカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。最後に Superdex-200pg カラムによるゲル濾過を行い、精製と多量体形成能の確認を行った。Ara h 1\_core の発現と精製も同様の手順にて行った。

#### ② 組換え型 Ara h 3 の精製

発現プラスミド pMAL\_Ara h 3 は発現用宿主大腸菌 Rosetta に導入し、37°C での前培養後、IPTG 誘導を行い、20°C で 24 時間培養後、発現タンパク質の溶解性を確認した。本発現系は、目的タンパク質をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させるため、タンパク質の精製にはアミロースレジン (NEB) を用いた。精製方法は添付のマニュアルに従った。

### (4) Ara h 1, Ara h 1\_core の結晶化

Ara h 1, Ara h 1\_core の精製試料を 15 mg/ml に濃縮し、市販のスクリーニングキット ('Crystal Screen' Hampton research 社製、'Wizard' B-Bridge 社製) を用いたスパースマトリックス法による結晶化条件のスクリーニングを行った。

### (5) X 線回折データ収集

Ara h 1\_core 結晶について、液体窒素低温条件下におけるクライオプロテクタントの検討は、M18XHF (MacScience) を Cu K $\alpha$  X 線発生源とし、マルチワイアーエアディテクター (Bruker) を検出器として行った。更に、Spring-8 放射光施設の BL-38B1 にて高分解能のデータ収集を行った。回折データのプロセスには解析ソフト

トウェア HKL2000 を用いた。Ara h 1\_core の初期位相は CCP4 インターフェイス中の分子置換プログラム MOLREP を用いた分子置換法により決定した。立体構造の精密化は REFMAC5 プログラム、グラフィック上での分子モデル構築には、Coot6.01 を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組換え型 Ara h 1, Ara h 3 の発現と精製

組換え型 Ara h 1, Ara h 1\_core は、大腸菌 BL21 (DE3) 株を発現用宿主とした pET システムにより調製した。Ara h 1, Ara h 1\_core とともに疎水性カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによりほぼ単一に精製し (図 1)、天然型 Ara h 1 と同様に 3 量体構造を形成していることが確認された。

組換え型 Ara h 3 について、pET システム発現系においては発現用宿主大腸菌株の種類によらず目的タンパク質の発現が認められなかった。他のプロモータを用いた発現系である、pCold, pGEX, pMAL での発現を試みたところ、各々 Rosetta 株を発現用宿主とした系において組換え型 Ara h 3 の発現が認められた。Ara h 3 の cDNA 内において、大腸菌におけるレアコドンである AGA (アルギニン) AGG (アルギニン) などが頻出することが、通常の発現用宿主での発現が困難であった原因であると考えられる。このうち、pCold, pGEX 発現系を用いた場合は Rosetta 株を宿主とした場合、発現が見られたものの、培養条件によらず、大腸菌体内で封入体を形成し不溶性となった。一方、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現を試みた場合のみ、目的タンパク質 Ara h 3 は可溶性画分での発現が可能であったため、以後の精製を試みた。本発現系 (pMAL 発現系) において、Ara h 3 はマルトース結合タンパク質との融合タンパク質調製されることから、マルトース結合タンパク質との親和性をもつ「アミロースレジン」により融合タンパク質をほぼ単一に精製した。

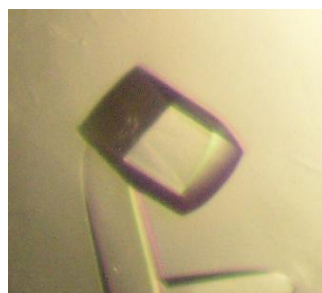


(図 1) 精製後の Ara h 1\_core の SDS-PAGE

##### (2) Ara h 1, Ara h 1\_core の結晶化

Ara h 1 全長に関しては、種々の結晶化条件スクリーニング法を試みたものの、X線結晶構造解析に供し得る単結晶を得ることができなかった。一方、N-末端と C-末端領域に存在するエクステンション領域を欠失させた変異体 Ara h 1\_core については、0.1 M クエン酸緩衝液 pH 5.6、0.1 M NaCl、15% PEG400 を母液とした条件において、良好な結晶が得られた (図 2)。また、0.1 M Tris-HCl pH 8.5、0.1 M クエン酸三ナトリウム、12-15% PEG1000 を母液として用いた条件においても単結晶の析出を得た。

(a)



(b)

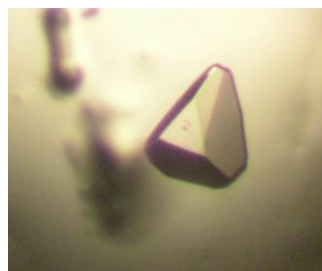


図 2 組換え型 Ara h 1\_core 結晶

##### (3) X線回折データの収集と空間群の決定 (Ara h 1\_core 結晶)

Spring-8 (BL38B1) における Ara h 1\_core 結晶のデータ収集は、PEG400 を沈殿剤とした図 3 (a) の結晶を用い、液体窒素低温下において、30%グリセロールを凍結保護剤として行った。2.8 Å までのデータを収集し、空間群 C2、格子定数  $a=165.899 \text{ \AA}$ ,  $b=89.263 \text{ \AA}$ ,  $c=160.036 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=109.046^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$  と決定した。データ収集に関する統計値を表 1 に示す。この結晶の非対称単位中には Ara h 1\_core の三量体が二つ (6 サブユニット) 含まれており、水分含量  $V_{\text{sol}}=37.9\%$ 、Matthews 係数  $V_M=1.98 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  であった。

##### (4) Ara h 1\_core の分子置換法による構造解析

Ara h 1 と同様 7S グロブリンファミリーに属するダイズβ-コングリシニンβサブユニットの立体構造をサーチモデルとした分子置換を行い、Ara h 1\_core 回折データの初期位相を決定した。立体構造モデルの精密化途上であり、現在の精密化統計値はR因子は0.244 (Rfree =0.364) となっている。

現在、詳細な立体構造解析を可能とするため、更なる高分解能データの取得を目指した結晶の再調製と、現時点でのデータセットによる構造の精密化を進めている。

Space group	C2
Lattice parameters (Å)	a=165.899 Å, b=89.263 Å, c=160.036 Å
Wave length (Å)	0.9
Resolution overall (ov) (Å)	50-2.8
Resolution highest shell (hs) (Å)	2.9-2.8
No. unique reflections	50400
Completeness (ov/hs) (%)	94.7/72.2
Data redundancy (ov/hs)	3.7/3.4
Rmerge (I) (ov/hs)	0.048/0.276
<I/s (I)>	10.5

(表1) Ara h 1\_core のデータ収集に関する統計値

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

Okamura, N., Masuda, T., 他 17 名 (2008) Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic marker and therapeutic target in human renal cell carcinoma. *Proteomics*, 8, 3194-3203 (2008) 査読有

Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., Ezure, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Shikata, M. and Utsumi, S., Construction of homo- and heteropolymers of plant ferritin subunits using an in vitro protein expression system. *Protein Expr. Purify.* **56**: 237-246 (2007) 査読有

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 太郎 (MASUDA TARO)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：40395653

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者