

X線小角散乱法を用いたイヌ主要アレルゲン Can f 1 および Can f 2 の構造解析

Structural analysis of the major dog allergen Can f 1 and Can f 2 by small-angle X-ray scattering

乾 隆^a, 宮本優也^{a,b}, 田畑瑞毅^a, 久米慧嗣^a, 福原彩乃^a, 鎌田洋一^c
Takashi Inui^a, Yuya Miyamoto^{a,b}, Mizuki Tabata^a, Satoshi Kume^a, Ayano Fukuhara^a, Yoichi Kamata^c

^a大阪府立大学, ^b独)日本学術振興会特別研究員 DC, ^c国立医薬品食品衛生研究所

^aOsaka Prefecture University, ^bJSPS Research Fellow, ^cNIHS

X線小角散乱法を用いて、イヌアレルゲン Can f 1, Can f 2, および分子内ジスルフィド結合が欠如された C52S-Can f 1 の構造解析を行い、分子の形状や大きさを調査した。その結果、Can f 1, C52S-Can f 1, および Can f 2 は溶液中において球状蛋白質であり、その慣性半径はそれぞれ、18.9 Å, 21.6 Å, および 19.2 Å となり、Can f 1 において分子内ジスルフィド結合が蛋白質の構造に大きく影響していることが判明した。

We measured small-angle X-ray scattering (SAXS) of major dog allergen *canis familiaris* allergen 1 (Can f 1), Can f 2, and C52S-Can f 1 without an intrinsic disulfide bond to clarify their structure. The profiles of Can f 1, Can f 2, and C52S-Can f 1 revealed that these protein had the globular shapes in solution. The radius of gyration was estimated to be 18.9 Å for Can f 1, 19.2 Å for Can f 2, and 21.6 Å for C52S-Can f 1. These results indicated that the intrinsic disulfide bond is important to maintain the native conformation of Can f 1.

キーワード：イヌアレルギー，イヌアレルゲン，リポカリンファミリー，X線小角散乱法

背景と研究目的：近年、イヌアレルギーは、室内飼育されるイヌの増加に伴いその患者数が増加し、社会問題の一つとなっている。イヌアレルゲンには、イヌ唾液腺で産出される *Canis familiaris* allergen 1 (Can f 1), および Can f 2 があり、アミノ酸配列の相同性から、生体内輸送タンパク質群であるリポカリンファミリーに属することが知られている¹⁾。リポカリンタンパク質は、140~200 アミノ酸残基からなり、8本のβ-ストランドからなるβ-バレル構造と1本のα-ヘリックス、および分子内にジスルフィド結合を持つのが特徴である。これまでに、我々は、Can f 1, および Can f 2 が、マウスに対してアレルギー症状の1つであるアナフィラキシーショックを引き起こすことを報告している²⁾。しかし、両タンパク質の構造や機能、およびアレルギー発症のメカニズムに関してはほとんど解明されていない。

我々は、構造機能関連の観点からイヌアレルゲン Can f 1, および Can f 2 のアレルギー活性を有する部位を特定し、イヌアレルギーに対する新規診断法や対策法の構築を目指している。本研究では、X線小角散乱法を用いて Can f 1, および Can f 2 の分子形状や大きさなどの溶液

状態における分子構造を解明することが目的である。さらに、リポカリンタンパク質に保存されているジスルフィド結合を持たない変異体 C52S-Can f 1 についても同様の実験を行い、ジスルフィド結合が立体構造に与える影響について考察する。

Can f 1, および Can f 2 の構造的特徴を解明することにより、イヌアレルゲンのアレルギー発症メカニズムに新たな知見を与えるだけでなく、新規の診断法や対処法の構築、さらにはタンパク質の構造と機能の相関の解明にも多大な貢献をもたらすと考えられる。

実験：実験は、BL40B2で行った。単色化されたX線を集光ミラーによって集光した後、スリットで整形し、1.0 Åの波長のX線を試料に入射した。散乱像はビームラインに設置されている自動読み取り型イメージングプレート (R-AXIS IV⁺⁺ system) を用いて読み取った。Can f 1, Can f 2, および C52S-Can f 1 は大腸菌を用いて発現させ、精製後に50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し濃縮した後、2.5 mg ml⁻¹, 5.0 mg ml⁻¹, 8.0 mg ml⁻¹, および12.0 mg ml⁻¹の各濃度に調整した。また、分子量決定のためのリファレンスとして、ovalbumin (Mr: 45,000, Sigma)と

lysozyme (Mr: 14,307, Seikagaku corporation)を用いた。

結果と考察： 図1に溶液中における Can f 1, Can f 2, および C52S-Can f 1 の散乱曲線を示す。

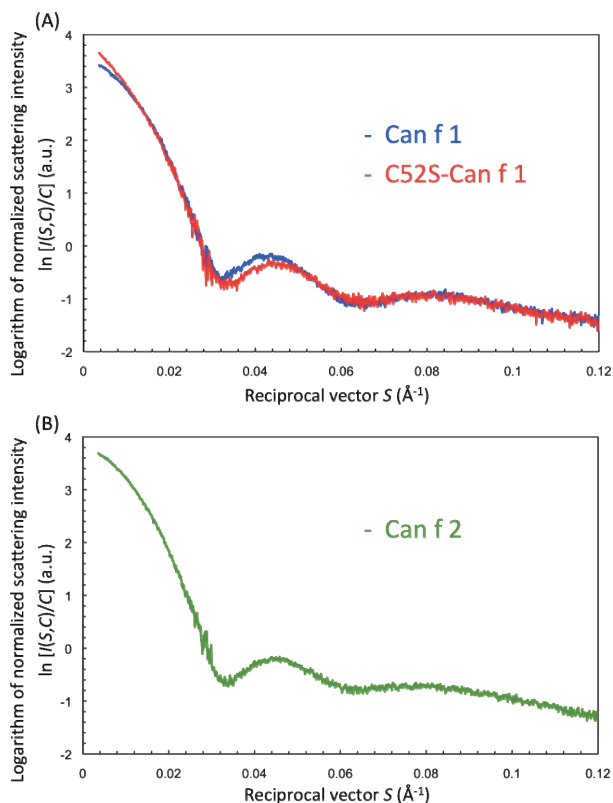


Fig. 1. (A) SAXS profiles of Can f 1 and C52S-Can f 1. SAXS profiles of Can f 1 and C52S-Can f 1 are shown in blue and red, respectively. (B) SAXS profile of Can f 2. SAXS profile of Can f 2 is shown in green. The logarithm of scattering intensity is shown as a function of reciprocal vector (S).

図1の散乱パターンより、Can f 1, C52S-Can f 1, および Can f 2 は球状蛋白質であることが判明した。また、Can f 1 と C52S-Can f 1 の散乱曲線を比較した結果、小角領域 ($S < 0.02 \text{ \AA}^{-1}$)、および第2ピーク ($0.03 < S < 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) に変化があることが確認された。さらに、得られた散乱曲線を用いてギニエ・プロット解析を行い、蛋白質濃度に対する $R_g(C)^2$ (R_g :慣性半径) を計算した結果、濃度ゼロで得られた Can f 1, および C52S-Can f 1 の慣性半径はそれぞれ、 $18.9 \pm 0.03 \text{ \AA}$, および $21.6 \pm 0.64 \text{ \AA}$ となった。以上の結果から、Can f 1 は、分子内ジスルフィド結合の欠如により分子構造を大きく変化させることが判明し、ジスルフィド結合が保存されている場合に比べて、慣性半径が約 2.7 \AA 大きくなることが判明した。

Can f 2 にも同様にギニエ・プロット解析を行

った結果、慣性半径は $19.2 \pm 0.05 \text{ \AA}$ となった。以上の結果を表1にまとめる。

Table 1. Structural parameters of Can f 1, C52S-Can f 1, and Can f 2

	R_g (Å)	M.r. (Da)
Can f 1	18.9 ± 0.03	1.5×10^4
Can f 2	19.2 ± 0.05	2.1×10^4
C52S-Can f 1	21.6 ± 0.64	1.9×10^4

今後の課題： 今回、我々は世界で初めてイヌアレゲンタンパク質の溶液状態における分子形状や大きさについての知見を得る事に成功した。これはイヌアレルギー発症メカニズムの解明に向けての大きい前進である。

近年、国外においてもイヌアレゲンについての研究が盛んに行われている。最近のトピックスとして、ヒト T 細胞の Can f 1 のエピトープ認識様式を解明した報告や³⁾、Can f 2 の結晶化成功に関する報告があり⁴⁾、本研究領域は、免疫学的、且つ構造生物学的に非常に注目されている。よって、今後も益々世界規模のイヌアレルギーに関する研究がなされることは明白である。

我々は、本 2009A 期の成果に基づき、2009B 期には疎水性低分子結合蛋白質である Can f 1, および Can f 2 と各種疎水性低分子(レチノイン酸や胆汁色素など)との複合体の SAXS 測定を行い、疎水性低分子を結合するリポカリンタンパク質としての機能と、アレルギー発症メカニズムの関係を解明する予定であったが、残念ながら本研究は採択されるには至らなかった。

我が国におけるイヌアレルギー研究の進歩のためにも、2010A 期において本研究が採択されることを切に望む。

参考文献

- 1) H. DE Groot *et al.* J. Allergy. Clin. Immunol. **87** (1991) 1056.
- 2) Y. Kamata *et al.* Int. Arch. Allergy. Immunol. **142** (2007) 291.
- 3) R. Juntunen *et al.* Mol. Immunol. (2009) in press.
- 4) C. Madhurantakam *et al.* Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. **65** (2009) 467.