

## 加水分解小麦アレルギー病態解明・治療開発にむけたタンパク構造解析に関する研究

担当責任者 加藤善一郎 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 教授

### 研究要旨

アレルギーエピトープとHLA立体構造解析による新たな治療法の確立を目指すことが本研究課題の目的であるが、特に、アレルギーである加水分解小麦タンパクの解析及び構造解析が重要な課題である。これらのペプチドによる免疫寛容誘導による治療は、症状が軽快しない難治例患者に対する有効な治療法となる可能性があり、今後の新規治療法の確立にむけて、B細胞エピトープの構造、T細胞エピトープの構造解析における応用可能性を検討した。その結果より、加水分解小麦タンパクにおけるアレルギー反応の成立・増強に関わるメカニズムとして、繰り返し配列周辺のT細胞エピトープを患者HLAが認識できる立体構造をもつこと、さらに、脱アミド化により、自然に存在する食物タンパク由来ペプチドとは異なる結合様式を介して、免疫反応を増強している可能性が示唆された。今後、エピトープの構造解析を進めることで、治療法確立に繋がる知見を得ることができると考えられ、構造解析が重要な役割を果たすことが期待される。

### 共同研究者

川本 典生 岐阜大学大学院医学系研究科  
小児病態学

### A. 研究目的

これまで、加水分解小麦タンパクによる被害の調査研究及びメカニズム解明などが進んできている。一方で、原因タンパクであるグルパール19SのIgE結合エピトープが報告されているがT細胞エピトープ解析についてはいまだなされていない。獲得免疫が成立する上で、T細胞エピトープは必須であり、分子メカニズムの解明が重要と考えられる。また、このようなT細胞エピトープとなるペプチドはT細胞性の免疫寛容(アナジー)を

誘導可能で、かつ、ペプチドであることからアナフィラキシー等の副反応は誘発しづらいと予想される。

これらのペプチドによる免疫寛容誘導による治療は、症状が軽快しない難治例患者に対する有効な治療法となる可能性があり、今後の新規治療法の確立にむけて、B細胞エピトープの構造、T細胞エピトープの構造解析における応用可能性を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

#### B細胞エピトープ解析

これまでに報告されているエピトープの結果を踏まえ、 グリアジン内に存在するエ

ピトープの共通性等、及び潜在的エピトープモチーフについて、配列解析から検討した。

#### HLA 構造解析技術の確立

これまでに報告された他の食物アレルギーに関する知見を踏まえ、T細胞エピトープ解析の結果から、HLA立体構造とエピトープペプチドとの複合体解析技術の検討を行った。

#### 脱アミド化ペプチドの構造解析

食物由来抗原が引き起こす疾病としてセリアック病があるが、セリアック病において、これまでに報告のある疾病に関連したHLAと脱アミド化されたエピトープペプチドとの複合体構造から、脱アミド化の与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

### **C. 研究結果**

#### B細胞エピトープ解析

先行文献により解析されたB細胞エピトープ(QPQQPFPQ)については、異なった患者血清にて様々な程度で認識されており、さらに、脱アミド化によりその結合が増強されることが判明している。今回の検討では、上記のコア配列以外にも異なった種類の配列が認識されていることを確認した。それらのエピトープでは、必ずしも患者における共通性は見いだされない場合もあるが、コア配列に準じて保存された配列を認識している可能性が示唆された。さらに、不完全モチーフにおける検討にて、特に、P5のアミノ酸配列の変化により、その認識が

変化することが認められた。また、B細胞エピトープについては、繰り返し配列の多いグリアジンタンパクの前半に多く存在しており、T細胞エピトープについても類似したモチーフを利用している可能性が示唆された。

#### HLA 構造解析技術の確立

Protein Data Bankに登録されたHLA立体構造データベースを利用してHLAタンパク単体の構造モデルを作成する技術に加え、認識ペプチドとの複合体モデル構造の解析に関する技術開発を行った。また、関連する立体構造決定技術の開発と実際のタンパク発現・結晶化等の技術開発を併行して行い、複合体解析の方法を確立することができた。結果として、HLAとペプチド2者複合体の解析にくわえ、T細胞レセプターの構造との3者複合体解析が重要と考えられた。

#### 脱アミド化ペプチドの構造解析

セリアック病に関連したHLAと脱アミド化されたエピトープペプチドとの複合体構造解析を行った結果、

B細胞エピトープだけでなく、T細胞エピトープの反応が著明に増強されるメカニズムとして、HLAと脱アミド化ペプチド間において、水素結合から、イオン結合への変化が生じることにより、結合が著明に増強し、結果として反応が増強すると考えられた。

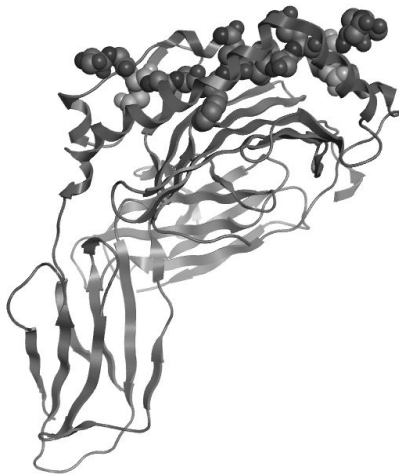


図 1：脱アミド化された グリアジンペプチドと HLA の複合体立体構造

#### D. 考察

以上の結果より、加水分解小麦タンパクにおけるアレルギー反応の成立・増強に関わるメカニズムとして、繰り返し配列周辺の T 細胞エピトープを患者 H L A が認識できる立体構造をもつこと、さらに、脱アミド化により、自然に存在する食物タンパク由来ペプチドとは異なる結合様式を介して、免疫反応を増強している可能性が示唆された。

#### E. 結論

今後、エピトープの構造解析を進めることで、治療法確立に繋がる知見を得ることができると考えられ、構造解析が重要な役割を果たすことが期待される。

#### F. 健康危険情報

記載事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun* 5:5340 2014.
2. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol* 58:1 66-76 2014.
3. Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70:Pt 10 1351-1356 2014.

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
記載事項なし
2. 実用新案登録  
記載事項なし
3. その他  
記載事項なし