

バイオインフォマティクスを高度利用した病原性タンパク質の検索・組換え体作出とその利用：カビアレルゲンタンパク質を例にして

大内勇樹

要約

真菌由来の病原性タンパク質であるアレルゲンを同定するには、IgE結合性試験、質量分析、コーディング領域 (Coding sequence : CDS) 全長の把握を行うため、非常に多くの労力と時間を要する。そこで、次世代シーケンス (Next generation sequencing : NGS) 解析を利用することで、真菌由来アレルゲンを迅速かつ網羅的に同定する新たな手法を確立した。アレルゲン検索の対象として、*Aspergillus restrictus*からmRNAを抽出し、NGS解析を行った。得られた塩基配列をInternational Union of Immunological Societiesに登録されている真菌アレルゲンに対して相同性検索を行ったところ、6つの*A. restrictus*由来候補アレルゲン (ARAC1~6) 遺伝子が特定された。大腸菌発現系により、これら6つのARACを作出し、アレルギー患者血清と反応させたところ、ARAC4およびARAC6においてIgE結合性を確認した。また、ARAC6のアナフィラキシー誘導性も確認された。本総説において提案された新規アレルゲン同定法は、バイオインフォマティクスを利用した病原性タンパク質の同定法として、広く有用であると考えられる。

キーワード：バイオインフォマティクス、次世代シーケンス解析、アレルゲン、病原性タンパク質、*Aspergillus restrictus*

1. 序論

真菌はダニ、花粉、ペットと並んでアレルギー疾患の主要な原因となっている。真菌に対するI型アレルギー反応が原因で起こる疾患には様々なものがあり、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) などが知られている [1]。真菌の孢子や菌糸の吸入および接触により真菌アレルギーは生じるが、人体に定着し、毒素や酵素、揮発性有機化合物の産生により気道を損傷する点で他のアレルギー源よりも患者の免疫系に多大な影響を与えていると考えられている [2]。

真菌アレルギーの診断は、患者の病歴や、真菌エキスをを用いた皮膚プリック試験、皮内試験などの*in vivo*試験、Radioallergosorbent Test (RAST)、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、ウエスタンブロッティングなどの*in vitro*試験に基づいている。*in vivo*試験および*in vitro*試験での評価の正確性や信頼性は、用いられる真菌エキスの質に大きく依存して

いる。しかし、同じ真菌種であっても、菌株間の違いや抽出時のバッチ間の違い、真菌の培養条件や抽出方法によって、真菌エキスのタンパク質組成は大きく変動するため、真菌エキスの質は診断を行ううえで不均一なものとなっている [3, 4]。

この真菌エキスにおける質の問題を克服するため、診断に利用されているのが組換えアレルゲンである。アレルゲンとはアレルギーの原因となる物質のことであり、通常、アレルギー源となる花粉や食品は2~3種類のアレルゲンによって構成されているのに対し、真菌エキスは10種類以上のアレルゲンによって構成されており、それぞれのアレルゲンがアレルギー患者に対して異なる反応性を示し、その病態を多様化している [5]。組換えアレルゲンとは分子生物学的手法により作出されたアレルゲンのことであり、タンパク質の調製に再現性がある点、純度の高いタンパク質の大量生産が行える点、感作および暴露における交差反応性の分析が可能であり、各アレルギー患者における病態

の性質を特定できる点において、真菌エキスよりも優れている。また、これらの利点により、組換えアレルゲンをを用いた特異的な免疫療法は、真菌エキスと比較して副作用を抑えることができ、アレルギーや真菌症の効果的な治療法になると考えられている [6]。

従来のアレルゲン同定法には、アレルギー患者血清を用いて、真菌エキスからIgEと特異的に結合するタンパク質を分離する方法がある [7]。この方法は、二次元電気泳動やウエスタンブロッティングにより、IgE結合性タンパク質を単離または同定した後、その部分アミノ酸配列を質量分析により特定し、縮重ポリメラーゼ連鎖反応（縮重PCR）やRapid Amplification of cDNA End (RACE) 法を用いてコーディング領域（CDS）全長をクローニングし同定する。最も一般的なアレルゲン同定法ではあるが、抗原抗体反応時のバックグラウンドが高くなり、IgE結合性タンパク質を特定できないことが多い。また、そのタンパク質の精製、アミノ酸配列の決定、CDSの選別には非常に多くの時間と労力が必要であり、一度に1つのアレルゲンしか同定できないため、より効率的な新しいアレルゲン同定法の開発が求められている。

2. 次世代シーケンス（NGS）解析を利用した新規真菌アレルゲンの同定

NGS解析とは次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析のことであり、従来のDNA塩基配列解読法であるサンガー法とは比較にならないほど低コスト、短時間で簡便に大量の塩基配列データを得ることができる。近年では、シーケンシングコストが低下したため、多

くの研究機関で次世代シーケンサーが導入され、多くの生物種でゲノム解析やトランスクリプトーム解析、メタゲノム解析などが行われている。そこで、次世代シーケンサーを利用し、培養真菌において転写されたmRNAを網羅的に調べるトランスクリプトーム解析を行うことで、真菌由来アレルゲンを迅速に同定する新たな手法を検討した。

アレルギー疾患の原因真菌として*Aspergillus*属真菌は最も知られている [1]。*Aspergillus*属真菌の関係したアレルギー疾患の大半が*Aspergillus fumigatus*によるものと考えられており、現在までに22種類のアレルゲンが同定されている。同属の真菌である*Aspergillus restrictus*は、*A. fumigatus*に匹敵するアレルギー誘発性を持ち交差抗原性を示すと近年報告されている [8] にもかかわらず、未だアレルゲンが同定されていないことから、*A. restrictus*を本手法検討の対象とした。

*A. restrictus*培養菌体からmRNAを抽出し、NGS解析を行うことで1556のCDSを示すコンティグ配列が得られた。Translated Basic Local Alignment Search Tool (blastx) により、これらの塩基配列をInternational Union of Immunological Societies (IUIS) に登録されている98種の真菌アレルゲンアミノ酸配列に対して相同性検索を行った（表1）。E-value<10⁻¹⁰⁰の高い相同性を示すアレルゲン遺伝子15種のうち、CDS全長が解読できた6種を*A. restrictus*由来候補アレルゲン（ARAC1~6）遺伝子とした（表2）。各ARAC遺伝子について、大腸菌発現系により組換えタンパク質を作製し、IgEウエスタンブロッティング

表1 既知真菌アレルゲンとの相同性が高かったコンティグ配列

| Query ID | Subject | Characteristics | Identity % | E-value |
|-------------|-----------|------------------------------------|------------|------------------------|
| contig00511 | Asp f 12 | Heat shock protein P90 | 90.2 | 0 |
| contig00513 | Pen c 19 | Heat shock protein P70 | 93.9 | 0 |
| contig00527 | Asp f 18 | Vacuolar serine protease | 77.7 | 0 |
| contig00681 | Asp f 23 | L3 ribosomal protein | 90.7 | 0 |
| contig00732 | Pen ch 35 | Transaldolase | 80.9 | 0 |
| contig00811 | Cla h 10 | Aldehyde dehydrogenase | 75.8 | 0 |
| contig00853 | Pen c 30 | Catalase | 80.6 | 0 |
| contig01077 | Asp f 22 | Enolase | 92.9 | 1.0x10 ⁻¹⁷⁷ |
| contig00533 | Rhi o 1 | Aspartyl endopeptidase | 53.0 | 8.0x10 ⁻¹⁵⁰ |
| contig01019 | Cla h 8 | Mannitol dehydrogenase | 76.7 | 8.0x10 ⁻¹³² |
| contig00628 | Asp f 4 | - | 57.7 | 2.0x10 ⁻¹²³ |
| contig00785 | Mala f 4 | Mitochondrial malate dehydrogenase | 55.7 | 2.0x10 ⁻¹¹⁰ |
| contig01401 | Asp f 6 | Mn superoxide dismutase | 68.3 | 2.0x10 ⁻¹⁰⁶ |
| contig00591 | Asp f 9 | - | 60.8 | 1.0x10 ⁻¹⁰² |
| contig01592 | Asp f 3 | Peroxisomal membrane protein | 81.0 | 6.0x10 ⁻¹⁰² |

によってABPM患者血清中のIgEとの結合性を評価した。その結果、ARAC4およびARAC6においてIgE結合性があることが判った（図1）。このうち、ARAC6に対するウサギポリクローナル抗体を作製し、*A. restrictus*から抽出した菌分泌成分、菌体外成分、菌

体成分に対するウエスタンブロッティングを行ったところ、菌体外成分および菌体成分においてARAC6の存在が確認された（図2）。このことより、ARAC6はIgE結合性のアレルゲンとして*A. restrictus*から実際に産生されていることが証明された。

表2 相同性検索により得られた*Aspergillus restrictus*由来候補アレルゲン（ARAC）

| 候補アレルゲン | 相同アレルゲン | | Identity % | E-value |
|---------|-----------|--------------------------------|------------|------------------------|
| | 名称 | 由来真菌種 | | |
| ARAC1 | Asp f 12 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 90.2 | 0.0 |
| ARAC2 | Asp f 18 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 77.7 | 0.0 |
| ARAC3 | Asp f 23 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 90.7 | 0.0 |
| ARAC4 | Pen c 19 | <i>Penicillium citrinum</i> | 93.9 | 0.0 |
| ARAC5 | Pen ch 35 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 80.9 | 0.0 |
| ARAC6 | Asp f 3 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 81.0 | 6.0x10 ⁻¹⁰² |

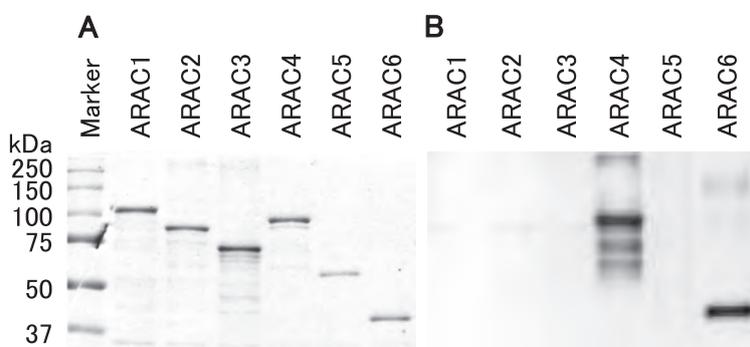


図1 ARACの作出およびIgE結合性の検出

A：精製済みARAC1～6のSDS-PAGE泳動像（CBB染色）。
 B：ウエスタンブロッティングを用いた精製済みARAC1～6とアレルギー性気管支肺真菌症（ABPM）患者血清中のIgEとの結合性評価。

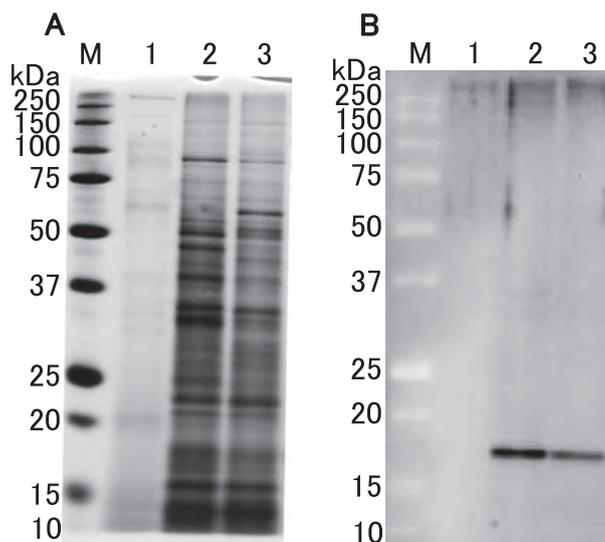


図2 *Aspergillus restrictus*におけるARAC6の発現状況

A：各真菌エキス分画のSDS-PAGE泳動像（銀染色）。
 B：抗ARAC6ウサギIgGを用いたウエスタンブロッティング。
 Lane 1：*A. restrictus* 菌分泌成分エキス。 Lane 2：*A. restrictus* 菌体外成分エキス。
 Lane 3：*A. restrictus* 菌体成分エキス

3. 作出された組換えアレルゲンの免疫学的性状解析

ARAC6はペルオキシゾーム膜タンパク質ファミリーに属しており、このファミリー内では、Asp f 3 (*A. fumigatus*), Pen c 3 (*Penicillium citrinum*), Cand a 3 (*Candida albicans*), Cand b 2 (*Candida boidinii*), Mala f 2 (*Malassezia furfur*), Mala f 3がアレルゲンとして既にIUISに登録されている [9-13]. また、RAST抑制試験および阻害ELISAによって、*A. restrictus*と*A. fumigatus*の真菌エキス中には共通アレルゲンが存在し、そのアレルゲンが主要アレルゲンになっていると考えられている [14, 15]. そこで、*A. fumigatus*の主要アレルゲンとして知られているAsp f 3のアミノ酸配列に対して、81.0%の相同性を示したARAC6が同様の免疫学的性状を有しているか確認する必要がある。

ARAC6と同様にAsp f 3を作製し、46人のABPM患者血清を用いてIgE ELISAを行い、ARAC6およびAsp f 3の患者血清中IgEに対する結合性の陽性率を評価した。ABPM患者血清中のIgEに対し、ARAC6は39.1% (18/46)、Asp f 3は65.2% (30/46) とどちらも高い陽性率を示した (図3)。この結果から、ARAC6がアレルギー患者においてアレルゲンとして認識され

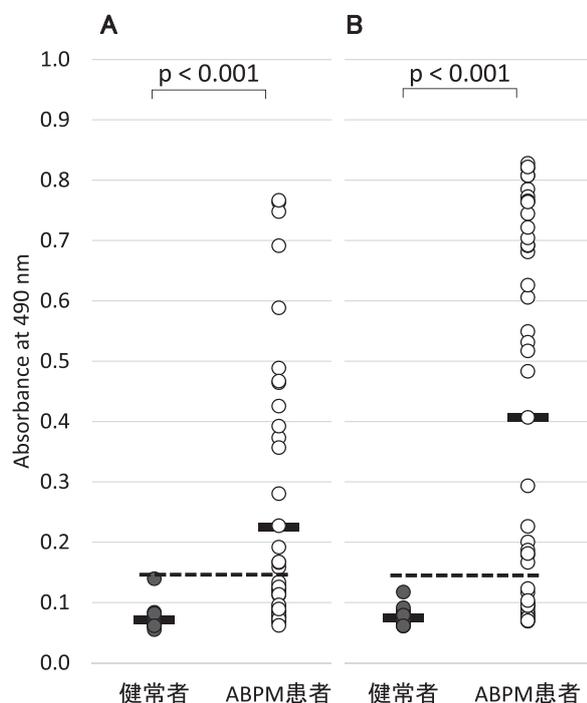


図3 健康者およびABPM患者のARAC6およびAsp f 3に対するIgE抗体価

健康者 (17名) およびABPM患者 (46名) の血清を用いて、IgE ELISAを行った。太線は各群の平均値、破線はカットオフ値を示す。カットオフ値には17名の健康者血清における平均吸光度の2倍値を使用した。統計にはT検定を用いた。

ている可能性が示唆された。加えて、マウスモデルを用いたアナフィラキシー試験を行うことで、ARAC6のアレルギー誘発性を評価した。アレルゲンを皮下投与により感作し、IgE抗体価を上昇させた後、同じアレルゲンを尾静脈内投与により曝露し、体温低下を指標としたアナフィラキシー症状を観察した。その結果、陽性対照として用いたオボアルブミンおよびAsp f 3と同様に、ARAC6はマウスにおいてアナフィラキシー症状を引き起こした (図4)。ARAC6が*A. restrictus*独自のアレルゲンとしてアレルギー疾患の原因となることが示唆された。

相同性検索より得られた候補アレルゲンであるARAC6と既知アレルゲンであるAsp f 3のアライメント解析に、エピトープ予測ツール (Linear Epitope Prediction Based on Propensity Scale and SVM (LEPS)) を導入することで図5のような結果が得られた。加えて、タンパク質の三次元構造予測ツール (SWISS MODEL) を利用することで、エピトープのアレルゲン表面上における立体構造を予測した (図6)。その結果、N末端側37-45残基目のペプチドがARAC6およびAsp f 3の共有エピトープであり、C末端側150-160残基目のペプチドはAsp f 3特異的な

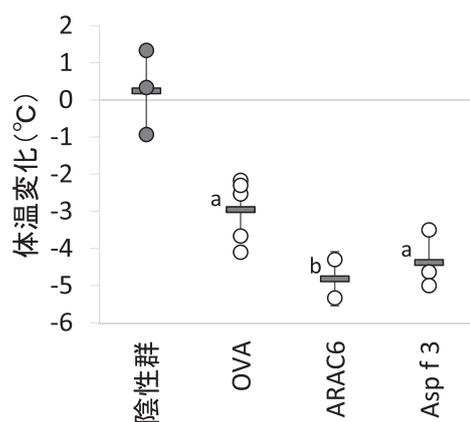


図4 ARAC6およびAsp f 3のアレルギー誘発性

各アレルゲン曝露15分後の体温変化をアナフィラキシー反応の指標とした。OVA: オボアルブミン感作後、オボアルブミン曝露。ARAC6: ARAC6感作後、ARAC6曝露。Asp f 3: Asp f 3感作後、Asp f 3曝露。棒線は各群の平均値を示す。陰性群と各群を比較した際の統計にはMann-Whitney検定を用いた (a: $p < 0.05$, b: $p < 0.1$)。

| | | |
|---------|--------------------------------------------------------------|-----|
| ARAC6 | MSGIKTGDSFSPDVVFSYIPWSEEKSDVTSCGIPINYNASKEWANKKVLFLSPLGAFTPV | 60 |
| Asp f 3 | ... L. A. ... D. GEI. A. ... D. ... A. ... | 60 |
| ARAC6 | CSANHVPEYLEKLPEIREKGVDDVAVLAYNDAFVMSAWGKANNVKNDJLFLSDPDAKFS | 120 |
| Asp f 3 | ... R. ... I. ... A. ... Y. ... Q. TG. ... R. ... | 120 |
| ARAC6 | KSIGWNLGE-RTARYAIVLDHGKVTYAAREPEMNHLEFSRADNVIKHL | 167 |
| Asp f 3 | ... ADE. G. K. ... L. I. ... I. ... L. AK. ... S. ET. L. ... | 168 |

図5 ARAC6およびAsp f 3のアミノ酸配列におけるアライメント解析

Linear Epitope Prediction Based on Propensity Scale and SVM (LEPS) により予測されたエピトープを灰色で示す。

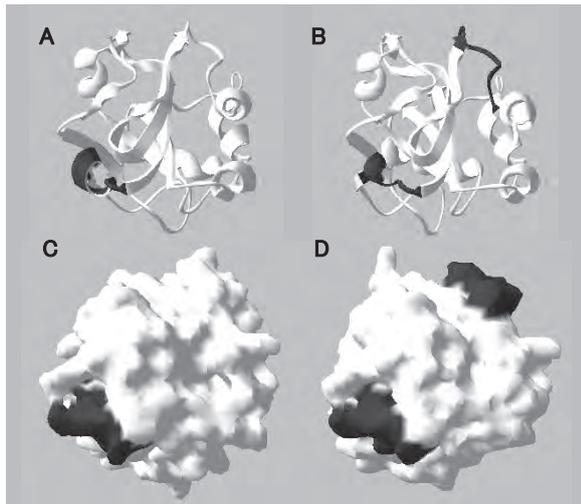


図6 SWISS MODELを用いたARAC6およびAsp f 3の三次構造予測

LEPSにより予測されたエピトープを灰色で示す。

- A : ARAC6における予測リボンモデル。
 B : Asp f 3における予測リボンモデル。
 C : ARAC6における予測表面表示モデル。
 D : Asp f 3における予測表面表示モデル。

エピトープであることが考えられた。このことは、ARAC6がアナフィラキシー試験においてAsp f 3に匹敵するアレルギー誘発性を有していたにもかかわらず、IgE ELISAにおいてAsp f 3よりも低い陽性率を示した現象を裏付けている。これらのエピトープ予測や三次元構造予測といったバイオインフォマティクスを利用した解析を、本総説で述べたNGS解析による網羅的アレルゲン同定法に組み込むことで、より信頼性の高いシステムが実現されると期待する。

4. バイオインフォマティクスを利用した病原性タンパク質検索の展望

本総説では、病原性タンパク質の検索と同定の新しい手法として、NGS解析を利用した真菌由来アレルゲンの網羅的同定法を提案した。近年では、特にウイルスや細菌などゲノムサイズが5 Mb未満と小さい病原

体についてはNGS解析が頻繁に行われ、病原遺伝子や薬剤耐性遺伝子の同定、ワクチンデザインを目的とした抗体結合部位の特定などのために解読されたゲノムDNAが利用されている [16]。しかし、*Aspergillus*属のような真菌のゲノムサイズは30 Mb前後と大きく、*A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*など、限られた菌種でしかゲノムは解読されていない [17, 18]。また、解読されたゲノムDNAにより一部の*Aspergillus*属真菌で代謝に関与する遺伝子やアレルゲン遺伝子の予測が行われ始めているものの、その遺伝子がコードするアレルゲン自体の評価は行われていなかった [19-21]。もちろん、解読されたゲノムDNAを用いて、本総説で述べた同定法を行うことはできるが、実際に転写されているmRNAを特定できる点、スプライシング後の塩基配列を得られる点において、mRNAをNGS解析した本同定法の方がより効率的かつ信頼できる手法になると考えられる。この手法は、真菌だけでなく植物や動物由来のアレルゲン、さらにはアレルゲン以外の病原性タンパク質の同定にも広く応用できるゴールドスタンダードになると予測される。

謝 辞

本稿を遂行するにあたり、多大なるご指導を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科 獣医公衆衛生学研究室 鎌田洋一教授ならびに山崎朗子博士に心から感謝いたします。

引用文献

- [1] B. Simon-Nobbe, U. Denk, V. Pöll : The spectrum of fungal allergy., *Int. Arch. Allergy Immunol*, 145, 58-86 (2008)
 [2] H.F. Kauffman, J.F.C. Tomee, M.A. van de Riet : Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production, *J. Allergy Clin. Immunol*, 105, 1185-1193 (2000)

- [3] L. Vailes, S. Sridhara, O. Cromwell : Quantitation of the major fungal allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in commercial allergenic products, *J. Allergy Clin. Immunol*, 107, 641-646 (2001)
- [4] S. Paris, C. Fitting, E. Ramirez : Comparison of different extraction methods of *Alternaria* allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 85, 941-948 (1990)
- [5] R. Cramer, S. Zeller, A.G. Glaser : Cross-reactivity among fungal allergens: A clinically relevant phenomenon?, *Mycoses*, 52, 99-106 (2009)
- [6] R. Valenta, B. Linhart, I. Swoboda : Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol*, 66, 775-783 (2011)
- [7] B. Singh, G.L. Sharma, M. Oellerich : Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia, *J. Proteome Res*, 9, 5530-5541 (2010)
- [8] T. Sakamoto, K. Ito, M. Yamada : Allergenicity of the osmophilic fungus *Aspergillus restrictus* evaluated by skin prick test and radioallergosorbent test, *Japanese Soc. Allergol*, 39, 1492-1498 (1990)
- [9] S. Hemmann, C. Ismail, K. Blaser : Skin-test reactivity and isotype-specific immune responses to recombinant Asp f 3, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*, *Clin. Exp. Allergy*, 28, 860-867 (1998)
- [10] H.D. Shen, C.W. Wang, H. Chou : Complementary DNA cloning and immunologic characterization of a new *Penicillium citrinum* allergen (Pen c 3), *J. Allergy Clin. Immunol*, 105, 827-33 (2000)
- [11] H. Chou, M.F. Tam, C.-Y. Chang : Characterization of a novel *Candida albicans* 29 kDa IgE-binding protein--purification, cDNA isolation and heterologous expression of Cand a 3, *Allergy*, 58, 1157-1164 (2003)
- [12] L.J. Garrard, J.M. Goodman : Two genes encode the major membrane-associated protein of methanol-induced peroxisomes from *Candida boidinii*, *J. Biol. Chem*, 264, 13929-13937 (1989)
- [13] H. Yasueda, T. Hashida-Okado, A. Saito : Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 248, 240-4 (1998)
- [14] T. Sakamoto, K. Ito, M. Yamada : Allergenic relationships between *Aspergillus restrictus* and *Aspergillus fumigatus* determined by radioallergosorbent test inhibition, *Japanese Soc. Allergol*, 40, 1320-1326 (1991)
- [15] T. Itabashi, T. Hosoe, N. Toyasaki : Allergen activity of xerophilic fungus, *Aspergillus restrictus*, *Japanese Soc. Allergol*, 56, 101-108 (2007)
- [16] F. Luciani, R.A. Bull, A.R. Lloyd : Next generation deep sequencing and vaccine design: today and tomorrow, *Trends Biotechnol*, 30, 443-452 (2012)
- [17] M. Machida, K. Asai, M. Sano : Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
- [18] J.E. Galagan, S.E. Calvo, C. Cuomo : Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*, *Nature*, 438, 1105-1115 (2005)
- [19] W.C. Nierman, A. Pain, M.J. Anderson : Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, *Nature*, 438, 1151-1156 (2005)
- [20] H.J. Pel, J.H. de Winde, D.B. Archer : Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Nat. Biotechnol*, 25, 221-231 (2007)
- [21] P. Bowyer, M. Fraczek, D.W. Denning : Comparative genomics of fungal allergens and epitopes shows widespread distribution of closely related allergen and epitope orthologues., *BMC Genomics*, 7, 251 (2006)