

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4881526号  
(P4881526)

(45) 発行日 平成24年2月22日(2012.2.22)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| (51) Int.Cl.  | F 1                            |
| C 07 K 14/415 | (2006.01) C 07 K 14/415        |
| C 12 N 15/09  | (2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A |
| A 61 K 39/00  | (2006.01) A 61 K 39/00 H       |
| A 61 K 49/00  | (2006.01) A 61 K 49/00 A       |
| A 61 P 37/08  | (2006.01) A 61 P 37/08         |

請求項の数 3 (全 23 頁) 最終頁に続く

|               |                               |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2001-533813 (P2001-533813)  |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年10月24日 (2000.10.24)      |
| (65) 公表番号     | 特表2003-513023 (P2003-513023A) |
| (43) 公表日      | 平成15年4月8日 (2003.4.8)          |
| (86) 國際出願番号   | PCT/SE2000/002062             |
| (87) 國際公開番号   | W02001/030816                 |
| (87) 國際公開日    | 平成13年5月3日 (2001.5.3)          |
| 審査請求日         | 平成19年10月10日 (2007.10.10)      |
| (31) 優先権主張番号  | 9903950-5                     |
| (32) 優先日      | 平成11年10月29日 (1999.10.29)      |
| (33) 優先権主張国   | スウェーデン (SE)                   |

前置審査

|           |  |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 502043547<br>ファデイア・アー・ペー<br>スウェーデン国、751 37・ウプサラ<br>、ボックス・6460              |
| (73) 特許権者 | 500140002<br>ルドルフ・ヴァレンタ<br>オーストリア、アーレンテ・テレジン<br>フェルト、ペートホーフェンシュトラーゼ<br>18番 |
| (74) 代理人  | 110001173<br>特許業務法人川口國際特許事務所   |
| (72) 発明者  | ヴァレンタ、ルドルフ<br>オーストリア国、アーレンテ・テレジン<br>フェルト、ペートホーフェンシュトラ<br>ーゼ・18             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 牧草花粉 Phl p 6 アレルゲンの非アナフィラキシー形態及びそれらの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Phl p 6 アレルゲンから誘導される低刺激性免疫原性分子の組合せであって、(i) N 末端でトランケートされることにより IgE 結合能を欠如している Phl p 6 分子、及び (ii) C 末端でトランケートされることにより IgE 結合能を欠如している Phl p 6 分子を含み、かかる 2 つの分子の配列が共同して Phl p 6 の完全な配列にわたる、免疫原性分子の組合せ。

## 【請求項 2】

前記 N 末端でトランケートされることにより IgE 結合能を欠如している Phl p 6 分子が Phl 6 a a 3 1 - 1 1 0 である、請求項 1 に記載の低刺激性免疫原性分子の組合せ。

10

## 【請求項 3】

I 型アレルギーに罹患している哺乳類個体の減感作において使用される薬剤の調製のため、又は I 型アレルギーの生体内診断において使用される試薬の調製のため、請求項 2 に記載の免疫原性分子の組合せの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、重要なチモシー(オオアワガエリ)牧草花粉アレルゲン Phl p 6 の非アナフィラキシー性、すなわち低刺激性形態ならびに減感作及び診断のためのかかる形態の使用に関する。本発明はまた、Phl p 6 アレルゲンに対する I 型アレルギーに罹患

20

している哺乳類個体、代表的にはヒト個体の減感作のための方法に関する。

【0002】

I型アレルギーは、工業国において人口の20%以上が罹患する遺伝的に決定された過敏性疾患である(1)。この免疫障害の結果、アレルギー患者は、花粉、ダニ、カビ及び動物の毛/ふけからのそれ自体は無害な、主として空気伝達されるタンパク質に対してIgE抗体を産生する。I型アレルギーの症状(アレルギー性鼻炎、結膜炎、アレルギー性喘息及びアナフィラキシーショック)は、アレルゲンが誘導する、エフェクター細胞(肥満細胞、好塩基球)結合IgE抗体とその後の炎症伝達物質遊離のクロスリンクによって生じる(2)。アレルギー個体の約40%が牧草花粉との接触後に症状を起こすことから、タンパク質及び免疫化学法による関連する牧草花粉アレルゲンの特定に関して研究が進められてきた(3)。大部分の牧草種で生じる交叉反応の一部分として主要なアレルゲンのグループが同定されたが(4)、それらの性質や生物学的機能に関しては全く不明であった。

【0003】

アレルゲンの特定に対して、最近の分子生物学手法を応用することにより、アレルゲンの一次構造が明らかになり、診断及び治療を目的とする組換えアレルゲンの産生が容易となつた(5)。植物細胞骨格の成分(たとえばプロフィリン)(6)ならびにカルシウム結合花粉タンパク質(7)が関連アレルゲンとして同定された。アレルギー患者が種々の無関係なアレルゲン源との接触時に即時型反応を示すという事実は、それ故、遍在するアレルゲンとそれらのIgE抗体との交叉反応性によって説明することができる。1群の牧草花粉アレルゲンが細胞壁弛緩タンパク質(エクスパンシン)のファミリーに属し(8)、牧草5群アレルゲンがRNAse活性を有すると考えられる(9)証拠によって、所与のタンパク質の生物学的機能はそのアレルゲン性に関連するとの説が再燃している。主要な牧草花粉アレルゲンは、小粒子に付着する(たとえばディーゼル排気に対する1群アレルゲン(10))か、若しくは小さな花粉小画分として空気伝達されうる(たとえばアミロラスト中の5群アレルゲン(11))という最近の所見は、一部のアレルゲンが患者の気道深部に達し、アレルギー性喘息を惹起するという作用機序の解明の可能性を提供するであろう。

【0004】

I型アレルギー疾患の治療は、現在、薬理学的治療と特異的免疫療法によって行われている。特異的免疫療法は今世紀の初頭に既に確立されており(Noon, Lancet 1(1911)1572-1573)、長期間にわたって漸増量のアレルゲンを全身投与することを含む。特異的免疫療法は有効な治療として認められているが、アナフィラキシー副作用の発生がこの治療の主要な問題点の1つとなっている。アナフィラキシー反応を低減するために、最近アレルゲン特異的免疫療法のためにT細胞エピトープの使用が提案された(Brinerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993)7608-7612及びNorman, Curr. Opin. Immunol. 5(1993)986-973)。アレルゲンは、連続抗原決定基であるIgEエピトープと重複しうる、極めて多様なT細胞エピトープを内包する(Ebnerら、J. Immunol. 150(1993)1047-1054; Joost-van-Neervenら、J. Immunol. 151(1993)2326-2335; 及びSchenkertら、J. Allergy Clin. Immunol. 96(1995)986-996)。エフェクター細胞(肥満細胞、好塩基球)結合IgEと伝達物質遊離の架橋を防ぐためには、T細胞エピトープとIgEエピトープを詳細に検討する必要がある。

【0005】

Vrtalaら、J. Clin. Invest. 99(7)1673-1681(1997)及びWO99/16467号は、大腸菌のアミノ酸1-74と75-160で表されるBet v 1 cDNAの2つの部分を発現することによりその三次元構造を崩壊することによって主要なカバアレルゲンBet v 1のアナフィラキシー活性を低下させるという新しい戦略を開示している。完全な組換えBet v 1と異なって、組換え断

10

20

30

40

50

片はほとんどアレルゲン性を示さなかった。両方の非アナフィラキシー性断片がヒト  $B_{et} v 1$  特異的 T 細胞クローニングの増殖を誘導し、それらがすべての優性 T 細胞エピトープを内包し、それ故安全で特異的な T 細胞免疫療法のために使用しうることを示唆した。この戦略の成功の秘訣は、 $B_{et} v 1$  アレルゲンが、他の多くのアレルゲンの場合のように連続 IgE エピトープではなく不連続（すなわち立体的）IgE エピトープを有するという事実によるものと考えられた。

【0006】

主要カバアレルゲン  $B_{et} v 1$  と異なって、主要チモシー牧草花粉アレルゲン  $Ph 1 p 6$  は連続（一連の）IgE エピトープを含むので、上記のようなアナフィラキシー活性低下の断片化戦略には適応しないであろう。

10

【0007】

しかしながら、驚くべきことに且つ意外にも、本発明に従えば、遺伝的（組換え）又は合成断片化によって  $Ph 1 p 6$  欠失変異体が構築でき、かかる断片は低いアナフィラキシー副作用で牧草花粉アレルギーの特異的免疫療法のために使用しうることが認められた。そのようなアナフィラキシー能力が大きく低下した断片を、以下に非アナフィラキシー性又は低刺激性と称する。

【0008】

本発明の最初の態様としては、 $Ph 1 p 6$  アレルゲンから誘導される低刺激性免疫原性分子を提供するが、該  $Ph 1 p 6$  分子は、N 末端及び / 又は C 末端を欠失しており、これにより該分子は IgE 結合能を少なくとも実質的に欠如している。

20

【0009】

N 末端又は C 末端の欠失はアレルゲンの末端トランケーションであると考えられる。かかる欠失はまた、それぞれアレルゲンの N 末端又は C 末端部分の内部でも存在しうる。

【0010】

アレルゲン分子の断片は、それ自体当業者には周知であり、組換え DNA 手法又はペプチド合成化学によって作製することができる。

【0011】

第二の態様としては、本発明は、(i) N 末端が欠失することにより IgE 結合能を少なくとも実質的に欠如している  $Ph 1 p 6$  分子、及び (ii) C 末端が欠失することにより IgE 結合能を少なくとも実質的に欠如している  $Ph 1 p 6$  分子を含み、かかる 2 つの分子が共同して  $Ph 1 p 6$  の完全な配列を含む、免疫原性分子の組合せを提供する。

30

【0012】

共同して  $Ph 1 p 6$  の完全なアミノ酸配列を含むため、2 つの  $Ph 1 p 6$  分子のそれぞれの配列は重複し又は隣接しうる。

【0013】

本発明のために有用である断片に必要な (i) 免疫原性であって、且つ (ii) 非 IgE 反応性である  $Ph 1 p 6$  アレルゲンの N 末端及び C 末端欠失部分の大きさは、当業者には容易に決定できるであろう。特定の N 末端又は C 末端欠失分子の IgE 結合能の存否は容易に決定でき、IgE 反応性の欠如は、その分子がアナフィラキシー副作用を誘発する危険性なしに又は低い危険性で適用できることを示唆する。該分子の免疫原性は、完全な  $Ph 1 p 6$  アレルゲンに対するポリクローナル抗血清によって認識される能力によって測定することができる。このようにして、完全なアレルゲンに対する防御免疫応答を惹起することができる可能性が非常に高い断片及び断片の組合せを選択しうる。

40

【0014】

本発明の第三の態様は、特異的減感作療法である。かかる療法はタンパク質アレルゲンについての公知技術として実施され、アレルゲンに対する I 型アレルギーに罹患している哺乳類、代表的にはヒト個体に、当該アレルゲンに対する IgG 免疫応答を惹起することができる免疫原を繰り返し投与することを含む。免疫原は酸化アルミニウムのような適当なアジュバントと混合することができる。投与は全身的に、たとえば注射、注入等々によつ

50

て実施しうるが、免疫系の腸管部分にさらすために経口経路も示唆されてきた。Norman PS、「アレルギー及びアナフィラキシー反応のための免疫療法の現状 (Current status of immunotherapy for allergies and anaphylactic reactions)」Adv. International Medicine 41 (1996) 681-713も参照のこと。

【0015】

ここでは、投与する免疫原は本発明の最初の態様による免疫原性分子、又はそのような分子の混合物、好ましくは本発明の第二の態様による、(i) N末端が欠失することにより IgE 結合能を少なくとも実質的に欠如している Phl p 6 分子、及び(ii) C末端が欠失することにより IgE 結合能を少なくとも実質的に欠如している Phl p 6 分子であって、かかる2つの分子が共同して Phl p 6 アレルゲンの完全なアミノ酸配列を含む、Phl p 6 アレルゲンから誘導される上記の低刺激性免疫原性分子の組合せでありうる。

【0016】

より明細には、免疫原は、患者において抗体応答を誘導するため、及び/又はT細胞応答を惹起するため、及び/又は寛容を誘導するように抗体及びT細胞応答を調節させるために使用しうる。

【0017】

本発明の第四の態様は、第一の態様による免疫原又は第二の態様による免疫原の組合せの、当該免疫原が由来する Phl p 6 アレルゲンに対する IgA、IgD、IgE、IgG 又は IgM クラスの特異性抗体を検出するための免疫測定法における抗原としての使用を提供する。適切なアッセイ変法は、免疫原、サンプル抗体及び対象とする Ig クラスに対する抗体間での三重複合系の形成を含む。サンプルは、Ig を含有するあらゆる生物学的液体、たとえば血液由来のサンプル（血清、血漿、全血）、CSF、等々でありうる。特に、低刺激性断片は、治療において当該断片に対する新たな免疫応答を誘導するときの診断モニタリング（たとえば IgG 測定、T細胞応答の測定）のために使用しうる。

【0018】

本発明を以下の非制限的実施例によって説明する。

【0019】

（実施例）

実験材料及び方法

生物学的材料、患者血清、抗血清、組換えアレルゲン。

【0020】

チモシー牧草 (Phleum pratense)、ホソムギ (Lolium perenne)、ライムギ (Secale cereale)、ケンタッキースズメノカタビラ (Kentucky blue grass) (Poa pratensis)、コムギ (Triticum sativum)、カラスムギ (cultivated oat) (Avena sativa) 及びヨシ (common reed) (Phragmites communis) からの花粉は Allergon AB (Valinge, Sweden) から入手した。チモシー牧草の種子を Austrosaat (Vienna, Austria) から購入し、4週間生育させて生葉と根を入手した。牧草花粉に対してアレルギー性の患者は(4)の記載のように特定した。ウサギ抗セロリプロフィリン抗血清 (RP1) が(12)に記載されている。フロイントアジュバントを用いて、精製組換え Phl p 6 に対するウサギ抗 rPhl p 6 抗血清を作製した (Charles River, Kisslegg, Germany)。組換えチモシー牧草花粉アレルゲン、rPhl p 1、rPhl p 2 及び rPhl p 5 を(13)に記載されているように精製した。組換えチモシー牧草花粉プロフィリンをポリ (L-プロリン) アフィニティークロマトグラフィー(6)によって精製した。

【0021】

Phl p 6 アイソフォーム / 断片をコードする cDNA の単離と特定。

10

20

30

40

50

## 【0022】

ファージ g t 1 1 ( 1 4 )において成熟チモシー牧草花粉から構築した発現 c D N A ライブライマーから、350のI g E反応性クローンを単離した。P h 1 p 6をコードするc D N Aと配列相同意を有する6個のc D N A ( c 1 2 1 、 c 1 4 2 、 c 1 4 6 、 c 1 7 1 、 c 2 2 3 、 c 2 3 3 )をプラスミドp U C 1 8にサブクローニングし、配列決定した( 1 6 、 1 7 )。M c V e c t o r プログラム( K o d a k , R o c h e s t e r , N Y )を用いて配列を分析した。S w i s s P r o t データベースのF a s t A プログラム( G C G パッケージ ) ( 1 8 )によりP h 1 p 6に相同なタンパク質配列について検索を行った。E M B L データベースからH o l l 5 及びH o r v 5 アレルゲンの配列を取り出した。C l u s t a l W ( 1 9 )で多配列アラインメントを作製し、手動で編集した。G D E 配列エディター( S . S m i t h , H a r v a r d U n i v e r s i t y , C a m b r i d g e , M A )及びC O L O R M A S K ( J . T h o m p s o n , E M B L , H e i d e l b e r g , G e r m a n y )を用いて、関連した特性を有する保存された残基に着色した( 1 9 )。E M B L P r e d i c t P r o t e i n s e r v e r ( 2 0 )でP H D プログラムによりタンパク質二次構造及び表面可触性の予測を行った。

## 【0023】

P h 1 p 6 I g E エピトープのマッピング、組換えP h 1 p 6の発現と精製。

## 【0024】

P h 1 p 6 アイソフォーム及び断片を発現するファージクローンのI g E 結合能をブラークリフトアッセイ( 2 1 )によって検討した。成熟P h 1 p 6 アレルゲンをコードするD N Aをクローン1 4 2 D N AからP C R 増幅し、p E T - 1 7 bのN d e I / E c o R I 部位にサブクローニングした。組換えP h 1 p 6を液体培養中でE . c o l i B L 2 1 ( D E 3 )において発現させた。細胞を2 5 m M イミダゾール、p H 7 . 4 、 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 に懸濁し、リゾチーム( 2 0  $\mu$  g / g 細胞 )の室温で3 0 分間の添加と凍結融解サイクルによって溶解した。D N Aを室温で2 0 分間D N A s e I ( 0 . 1 m g / g 細胞ペレット )で消化した。タンパク質抽出物を1 0 , 0 0 0  $\times$  gで2 0 分間遠心分離して( S o r v a l l R C 5 C ; S S 3 4 ローター )、不溶性物質を除去した。得られた沈殿物中に硫酸アンモニウム( 4 0 - 6 0 % w / v )を加えてr P h 1 p 6を濃縮した。沈殿物を1 0 m M T r i s p H 6 に溶解し、この緩衝液を透析し、遠心分離( 2 0 分間、1 0 , 0 0 0 g , S o r v a l l R C 5 C ; S S 3 4 ローター )後、ジエチルアミノエチルセルロース - S e p h a r o s e カラム( P h a r m a c i a )に注入した。非結合タンパク質を1 0 m M T r i s 、p H 6 、 4 % v / v イソプロパノールで溶出した。8 0 %以上の純度のP h 1 p 6を含む分画をN a O Hでp H 8の調整し、ジエチルアミノエチルセルロース - S e p h a r o s e カラムで第二のクロマトグラフィー段階に供した。p H 8の0 - 0 . 5 M N a C l 勾配での結合タンパク質の溶出により純r P h 1 p 6を含む分画を得て、それをH 2 O d d で透析した。

## 【0025】

精製組換えP h 1 p 6のM A L D I - T O F ( マトリックス援用レーザー脱着イオン化 - 飛行時間型 ) 及びC D ( 円偏光二色性 ) 分析。

## 【0026】

飛行時間型C o m p a c t M A L D I I I 装置( K r a t o s , M a n c h e s t e r , U K )を用いて線形モードでレーザー脱着質量スペクトルを得た( p i C H E M , G r a z , A u s t r i a )。J a s c o P T C - 3 4 8 W I ペルチ工型温度制御システムを取り付け、F i s o n s H A A K E G H 水浴に結合したJ a s c o J - 7 1 0 分光偏光計でC Dスペクトルを記録した。7  $\mu$  Mのタンパク質濃度で2 m m幅 - 長さの石英キュベット( H e l l m a , M u l l h e i m , B a d e n , G e r m a n y )で2 0 で遠紫外C Dスペクトルを記録した。2 2 0 n mで温度上昇の間( 5 0 / 時 )の構円性を記録することにより、P h 1 p 6の熱変性をモニターした。開始温度( 2 0 )

まで冷却したとき(50℃)のCDシグナルの回復を測定することにより、変性プロセスの可逆性を調べた。折りたたみタンパク質の分画をF=1-U[式中、U=(220-N)/(U-N)]として算出した。Nは天然状態でのタンパク質の構造性であり、Uは変性タンパク質の構造性である。rPh1p6については、Uは85で220に等しいと仮定し、Nは20で220に等しいと仮定した。

【0027】

組換えPh1p6のIgE結合能、天然Ph1p6及び他のチモシー牧草花粉アレルゲンとの交叉反応性。

【0028】

IgE抗rPh1p6反応性の発生率を、171名の牧草花粉アレルギー患者からの血清及び対照として非アトピー個人からの血清においてELISAによって測定した(13)。天然及びrPh1p6上の交叉反応性IgEエピトープの存在をIgE免疫プロット阻害実験によって検討した(4)。rPh1p6と組換えチモシー牧草花粉アレルゲン(rPh1p1、rPh1p2及びrPh1p5)との間の免疫学的関係(13)を(4)の記載のようにELISA競合によって検討した。

【0029】

ヒスタミン遊離実験。

【0030】

rPh1p6反応性IgE抗体を有する牧草花粉アレルギー個人のヘパリン化血液サンプルから、デキストラン沈降によって(22)顆粒球を単離した。細胞を漸増濃度の精製rPh1p5、rPh1p6、及び抗ヒトIgE抗体(E124.2.8D2, Immunotech, Marceille, France)と共にインキュベートした。上清中に遊離されたヒスタミンを放射免疫測定法(Immunotech, Marceille, France)によって測定した。

【0031】

皮膚試験。

【0032】

インフォームドコンセントを得たあと、(23)の記載のように各人の前腕に皮膚穿刺試験を実施した。種々の濃度(1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml)の精製rPh1p6、rPh1p5を含む20μlアリコート及びチモシー牧草花粉抽出物、ヒスタミン及び塩化カリウム(ALK, Horsholm, Denmark)で各人を穿刺した。

【0033】

他の牧草種におけるPh1p6関連アレルゲン存在の分析及びPh1p6の組織特異的発現。

【0034】

SDS-サンプル緩衝液中で組織を均質化することによって花粉、葉及び根からのタンパク質抽出物を得た(24)。抽出物を遠心分離して(10,000×g、20分間; Sorval RC5C, SS34ローター)不溶性物質を除去した。タンパク質抽出物を14%SDS-PAGEによって分離し(25)、ニトロセルロースにプロッティングした(26)。ニトロセルロース細片をウサギ抗セロリプロフィリン抗血清、RP1(12)、ウサギ抗rPh1p6抗血清及び後者のウサギ免疫前血清で試験した。結合ウサギ抗体を1:1000希釈した<sup>125</sup>I標識ロバ抗ウサギIgG抗血清(Amersham)で検出した。

【0035】

イムノゴールド電子顕微鏡検査によるPh1p6のin situ局在。

【0036】

チモシー牧草花粉粒を(27)の記載のように無水的に固定した。超薄切片を等濃度のウサギ抗rPh1p6 IgG(IgG:Gタンパク質精製免疫グロブリン分画)又は免疫前IgGのいずれかと共にインキュベートした。結合ウサギ抗体を、10nmのコロイド状

10

20

30

40

50

金粒子 (Plano, Wetzlar, Germany) に結合したヒツジ抗ウサギ Ig G 抗体で検出した (27)。

【0037】

低刺激性 Phl p 6 (Phleum pratense) 欠失変異体の構築。

【0038】

N末端及びC末端の Phl p 6 欠失変異体を作製し、aa1-57 及び aa31-110 と称した。Phl p 6 aa1-57 及び Phl p 6 aa31-110 をコードする cDNA を、次のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた Phl p 6 cDNA (クローン #142) の PCR 増幅によって得た：

【化1】

10

Phl p 6 aa1-57 について：

5': GGG AAT TCC ATA TGG GGA AGG CCA CGA CC 3'

5': CGG GGT ACC CTA GTG GTG GTG GTG GTG GGG CGC CTT TGA AAC 3'

Phl p 6 aa31-110 について：

5': GGG AAT TCC ATA TGG CAG ACA AGT ATA AG 3'

5': CCG GAA TTC CTA GTG GTG GTG GTG GTG CGC GCC GGG CTT GAC 3'

20

Eco RI 及び Kpn I 部位をイタリック体で示し、Nde I 部位及び C 末端に導入された Hinc 標識に下線を付している。

【0039】

PCR 産物を Nde I / Kpn I (aa1-57) 又は Nde I / Eco RI (aa31-110) で切断し、分取アガロースゲル電気泳動によって精製して、プラスミド pET-17b (Novagen) にサブクローニングし、E. coli BL 21 (DE3) (Novagen) に形質転換した。ウサギ抗 Phl p 6 抗血清を用いた免疫スクリーニングにより、正しい欠失変異体を発現するコロニーを同定した。陽性クローンからの DNA を Qiagen tips (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて単離し、配列決定した (MWG-Biotech, Hilden, Germany)。

30

【0040】

E. coli における Phl p 6 欠失変異体の発現及び IgE 結合能の試験

組換え Phl p 6 aa1-57 及び Phl p 6 aa31-110 を、液体培地中 0.8 の OD 600、37 度 5 時間、0.5 mM イソプロピル -D-チオガラクトピラノシドで誘導することにより、E. coli BL 21 (DE3) において発現させた。等量の rPhl p 6、rPhl p 6 aa1-57 及び rPhl p 6 aa31-110 を SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロースにプロッティングした。ニトロセルロース細片を、アレルギー個人、非アレルギー対照個人からの血清 IgE、ウサギ抗 Phl p 6 抗血清及びウサギ免疫前血清と共にインキュベートした。結合 IgE 抗体を <sup>125</sup>I 標識抗ヒト IgE 抗体で検出し、結合ウサギ抗体を <sup>125</sup>I 標識ロバ抗ウサギ抗体で検出した。

40

【0041】

結果

Phl p 6 のアイソフォーム / 断片をコードする cDNA の単離と特定。

【0042】

Phl p 6 アイソフォーム / 断片をコードする 6 個の cDNA クローン (c142、

50

c 2 2 3、c 1 7 1、c 1 2 1、c 2 3 3、c 1 4 6)を、牧草花粉アレルギー患者からの血清IgEでチモシー牧草花粉gt11ライブラーから単離した。上述したクローニの配列をGenBankデータベースに寄託した(アクセス番号:Y16955 Y16960)。Ph1 p 6(クローニ142)の推定アミノ酸配列は28aa疎水性リーダーペプチドを含んだ。グリシン残基から始まり、アラニン残基の高い含量(20.9%)を示す成熟Ph1 p 6(クローニ142)タンパク質について、分子量11.8kDa、pI 5.5と算定した。Ph1 p 6のコンピュータ援用二次構造分析は顕著ならせん含量を示唆し、溶媒可触性の算定によって、N末端アミノ酸の多くが溶媒にさらされているのに対し、C末端アミノ酸は埋め込まれていることが予測される。配列モチーフについての検索によって、1つの潜在的N連結グリコシル化部位(NAS:aa15-17)、1つのN末端ミリストイル化部位(GKAT:aa1-4)、2つのcAMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位(KATT:aa2-5; KYKT:aa33-36)及び2つのペルオキシソーム標的部位(GKA:aa1-3; SKA:aa54-56)の存在が明らかになった。推定Ph1 p 6アミノ酸配列は、最近提供されたPh1 p 6配列(15)と同一性を示し、また5群牧草花粉アレルゲンのN末端部分と類似性を示した。しかし、Ph1 p 6特異的IgEは5群アレルゲンとほとんど若しくは全く交叉反応性を示さない。5群牧草花粉アレルゲンとの比較はVrtala, S.ら、J. Immunol. 1999, 163(10):5489-5496(37)(その開示は参照してここに組み込まれる)に述べられている。その中の図1Aは、Ph1 p 6変異体及び5群アレルゲンの多配列整列、二次構造及び溶媒可触性の予測を示している。

#### 【0043】

Ph1 p 6のN末端はIgE結合に関連する。

#### 【0044】

ニトロセルロース結合-gal融合完全rPh1 p 6(c223、c142)、N末端トランケートrPh1 p 6(c171、c121、c233、c146)及び対照として-gal単独、9名の牧草花粉アレルギー個人及び1名の非アレルギー個人からの血清IgEに接触させた(図1)。結果は、2つの完全なPh1 p 6アイソフォーム及び4個のN末端アミノ酸のみ欠失するPh1 p 6断片は試験したすべての牧草花粉アレルギー患者からのIgEに強く結合し、部分的Ph1 p 6クローニのIgE結合能はタンパク質のN末端から欠如しているアミノ酸の数に依存して低下することを示した。N末端の30個のアミノ酸を欠失する部分クローニ(クローニ121)は既にそのIgE結合能を完全に喪失していた(図1)。

#### 【0045】

組換えPh1 p 6のE. coli発現と精製。精製rPh1 p 6のIgE結合能。

#### 【0046】

E. coli BL 21(DE3)においてrPh1 p 6を過剰発現させた。いくつかの精製段階の組合せによって純粋な可溶性rPh1 p 6(約5mgタンパク質/リットルE. coli培養)を生成し、SDS-PAGEにより低分子量チモシー牧草花粉アレルゲンの1つとして同定した(図2A)。精製組換えPh1 p 6のMALDI-TOF分析は、サンプルのMH<sup>+</sup>及びM2H2<sup>+</sup>種に対応する11790と5896の2つの質量/電荷ピークを生じ、推定Ph1 p 6分子量(11789Da)と一致した。

#### 【0047】

171名の牧草花粉アレルギー患者からの128の血清においてrPh1 p 6特異的IgE抗体が検出されたが、10名の非アレルギー個人からの血清からは検出されなかった。rPh1 p 6を有する牧草花粉アレルギー患者からの血清の前吸収は、ニトロセルロースにプロッティングしたチモシー牧草花粉抽出物における10-14kDa部分へのIgE結合を大きく低下させ、rPh1 p 6と天然Ph1 p 6がIgEエピト

ープを共有することを示唆した。ELISA競合実験は、低率(<20%)のPh1p5特異的IgEだけがrPh1p6と共に前吸収されうることを明らかにした。rPh1p1、rPh1p2及び組換えチモシー牧草プロフィリンへのIgE結合は、rPh1p6との血清のプレインキュベーション後も低下しなかった。これらの結果により、Ph1p6が他の牧草花粉アレルゲンとは異なる重要なアレルゲンとして同定された。

## 【0048】

安定なすべてのらせんコンフォメーションにおけるrPh1p6の折りたたみ精製rPh1p6の遠紫外CDスペクトル(図2B)は、このタンパク質がかなりの量のらせん二次構造を含むことを示す。スペクトルは、208nmと220nmの2つの広い最小量と191nmの最大量を特徴とする。二次構造予測(37)は、顕著ならせん二次構造含量を示し、CD測定とかなり一致する。rPh1p6の変性推移は一相性であり、61の融点と高度に協同する。85では、rPh1p6は200nmの典型的最小量を有するランダムコイル構造をとる。rPh1p6は、冷却曲線プロフィール(図2C)及び85から冷却後20で記録した遠紫外スペクトル(図2B)から明らかなように、高度の折りたたみ可逆性を示す。

## 【0049】

組換えPh1p6は牧草花粉アレルギー患者において用量依存的な好塩基球のヒスタミン遊離と即時型皮膚反応を誘導する。

## 【0050】

精製rPh1p6は、牧草花粉アレルギー患者の好塩基球から特異的で用量依存的なヒスタミンの遊離を誘導した(図3A)。活性が高い牧草花粉アレルゲンであるrPh1p5(14、ValentaとFlicker、未発表データ)は、rPh1p6に比べてより低濃度でも最大の遊離を誘導した。4名の牧草花粉アレルギー患者においてrPh1p6、rPh1p5及びチモシー牧草花粉抽出物は即時型皮膚反応を誘発したが、非アレルギー患者では反応を生じなかった(表1；図3B)。塩化ナトリウムに対する反応は認められなかったが、ヒスタミンは試験したすべての個人で膨疹反応を誘発した(表1；図3B)。

## 【0051】

6群アレルゲンは花粉特異的タンパク質である。

## 【0052】

牧草花粉アレルゲンの主要な群はほとんどの牧草種で起こるが(4)、6群アレルゲンはチモシー牧草(*Phleum pratense*)花粉において広汎に生じることが報告された(15)。ウサギ抗rPh1p6抗血清は、25-28kDaの間で様々な単子葉植物(*Phleum pratense*、*Lolium perenne*、*Secale cereale*、*Triticum sativum*、*Avena sativa*、*Phragmites communis*)からのニトロセルロースプロッティングした花粉抽出物中の5群アレルゲンと交叉反応した(図4A、レーン2)。11kDaでPh1p6又はPh1p6関連アレルゲンが*Phleum pratense*及び*Poa pratensis*からの花粉において広汎に検出された。Ph1p6cDNA配列から推定したアミノ酸配列内に推定Nグリコシル化部位が認められたが、天然と組換えのPh1p6について同等の分子量が観察されたことから、天然Ph1p6の多グリコシル化は排除される(図4A、2A)。ウサギ抗rPh1p6抗体は、ニトロセルロースプロッティングしたチモシー牧草花粉中11kDaでPh1p6と強く反応したが、葉あるいは根の抽出物とは反応しなかった(図4B、レーン2)。約14kDaで3つの組織すべてにおいてプロフィリンが検出された(図4B、レーン1)。

## 【0053】

チモシー牧草花粉におけるPh1p6の免疫電子顕微鏡的局在。

## 【0054】

10

20

30

40

50

包埋後イムノゴールド電子顕微鏡を用いて、ウサギ抗 r Ph1 p 6 抗体を成熟チモシー牧草花粉粒内のかなりの部分を満たす多数の多糖類 (P-) 粒子に結合した (図 4 C)。金粒子の最大の蓄積は P 粒子の断面図上の表面に認められ、Ph1 p 6 は P 粒子内ではなく P 粒子上に存在することを示唆した。花粉粒子の他の部分ではほとんど (細胞質ゾル、外膜) 若しくは全く (ミトコンドリア、内膜) 抗 r Ph1 p 6 免疫反応性を認めなかった。同様にアミロプラストではほとんど金粒子が検出されなかった。この局在パターンは、ウサギ抗 r Ph1 p 5 抗血清が P 粒子を標識することができなかったという我々の所見 (データは示していない) と合わせて考えると、P 粒子の免疫標識が交叉反応性 5 群アレルゲンの存在から生じた可能性を排除する。免疫前 Ig に関して実施した対照実験は、いくつかの非特異的に吸収された金粒子だけを生じた (図 4 D)。

10

## 【0055】

Ph1 p 6 欠失変異体 (aa1-57, aa31-110) は Ig E 結合能が大きく低下したことを示す。

## 【0056】

ニトロセルロースプロットした完全な r Ph1 p 6 (図 5 A)、r Ph1 p 6 変異体 aa1-57 (図 5 B) 及び r Ph1 p 6 変異体 aa31-110 (図 5 C) を、牧草花粉アレルギー患者からの 13 の血清、非アトピー個人からの血清及びウサギ抗 r Ph1 p 6 抗血清に接触させた。13 名の牧草花粉アレルギー患者全員が完全な組換え Ph1 p 6 に対して Ig E 反応性を示し (図 5 A)、変異体 aa1-57 は、血清 11 によって認識され、血清 13 によって認識は弱くかった (図 5 B)。Ph1 p 6 変異体 aa31-110 は血清 7 及び 11 とのみ弱く反応した (図 5 C)。非アトピー個人からの血清は完全な r Ph1 p 6 及び欠失変異体と反応することができなかった。ウサギ抗 r Ph1 p 6 抗血清は完全な r Ph1 p 6 及び 2 つの欠失変異体に対して同等の強度の反応性を示した (図 5 A-C; レーン 15) が、ウサギ免疫前血清は当該分子の分子量の範囲内で反応性を示さなかった (図 5 A-C; レーン 16)。

20

## 【0057】

r Ph1 p 6 に対するマウス抗 r Ph1 p 6 又は r Ph1 p 6 aa31-110 抗血清の Ig G 1 反応性

完全な r Ph1 p 6 及び r Ph1 p 6 aa31-110 に対して惹起したマウス Ig G 1 は r Ph1 p 6 と反応する (表 II)。

30

## 【0058】

r Ph1 p 6 誘導体はヒスタミンの遊離誘導能がかなり低下している。

## 【0059】

牧草花粉に対してアレルギー性の患者からの顆粒球を様々な濃度の精製 r Ph1 p 6 、r Ph1 p 6 aa1-57、r Ph1 p 6 aa31-110、r Ph1 p 6 aa1-33 又は抗 Ig E mAb (E124.2.8 D2, Immunotech, Marseille, France) と共にインキュベートした。上清中に遊離されたヒスタミンを RIA (Immunotech) によって測定した (図 6)。精製 r Ph1 p 6 は、牧草花粉に対してアレルギー性の患者の好塩基球から特異的で用量依存性のヒスタミン遊離を誘導したが、r Ph1 p 6 誘導体 aa1-57 及び aa31-110 は 1 μg / ml の濃度までヒスタミンの遊離を誘導しなかった。Ph1 p 6 aa1-33 は 1 μg / ml の濃度でヒスタミンの 50 % 遊離を誘導し、これは完全な r Ph1 p 6 に比べて約 1000 倍のヒスタミン遊離の低下に相当する。

40

## 【0060】

## (考察)

アレルギー患者の約 40 % が牧草花粉との接触後に即時型症状を示す (3)。我々は、Ph1 p 6 と称する、主要なチモシー牧草花粉アレルゲンのアイソフォーム及び断片をコードする cDNA を単離した。Ph1 p 6 は、牧草花粉アレルギー患者の 75 % の Ig E 抗体によって認識される 11.8 kDa のタンパク質アレルゲンである。従って r Ph1 p 6 の Ig E 認識の発生率は先に報告された天然 Ph1 p 6 についての発

50

生率と一致し、炭水化物は Phl p 6 の IgE 認識に関連する役割を果たしていないことを示唆する(28、29)。天然 Phl p 6 について得られたペプチド配列データと一致して、我々は、r Phl p 6 の推定繰アミノ酸配列が、25-35 kDa の主要牧草花粉アレルゲンのファミリーである5群牧草花粉アレルゲンのN末端部分と高度の配列相同性を示すことが認められた(29、14)。N末端の疎水性リーダーペプチドの存在により、Phl p 6 は、5群アレルゲン断片と異なる独立したアレルゲンである。cDNA クローンをコードする Phl p 6 を分析した他の著者(15)の提案と一致して、我々は、5群及び6群アレルゲンが、1群及び2/3群牧草花粉アレルゲンについて記述されている(30)と同様に、共通の祖先遺伝子から進化したのであろうと推測する。Phl p 6 が牧草花粉アレルゲンの独立した群に属するという仮説も、Phl p 6 が5群及び他の牧草花粉アレルゲンと交叉反応性 IgE エピトープをほとんど共有しないという我々の所見に裏付けられる。溶媒可触性の予測からは、Phl p 6 のN末端アミノ酸の多くが溶媒に接触しているのに対し、C末端アミノ酸残基の大部分は被覆されていることが示された。証明されてはいないが、この所見は IgE エピトープマッピング実験から得られたデータと一致しており、この実験は、タンパク質のN末端が IgE 認識に決定的に関与することを示している。しかしながら、N末端自体が優性 IgE エピトープである、若しくはN末端の欠失が立体的 Phl p 6 IgE エピトープに影響を及ぼすという可能性も存在する。

## 【0061】

E. coli における Phl p 6 の発現は、らせん二次構造をほとんど独占的に含む可溶性の折りたたみ組換えタンパク質を大量に生成した。Phl p 6 のらせん折りたたみは、ある種のタンパク質がアレルゲンとして働く傾向として共通の構造的特徴が存在しないことがさらに確認された。Phl p 6 はおそらくすべてらせんタンパク質である可能性が高いが、主要カバ花粉アレルゲンである Bet v 1(31)、及びカバプロフィリン、Bet v 2(32)は混合折りたたみを有する。CD 分光分析によって明らかにされたように、r Phl p 6 は、他の免疫学的に無関係な花粉アレルゲン(たとえば Bet v 1(33)、Bet v 2(6、32))と、変性後再び安定な構造に折りたたまれるという顕著な内在傾向を共有する。Phl p 6 と他の重要な植物アレルゲンが共有するもう1つの特徴は、花粉組織におけるその高い発現である。これまでに特定された植物アレルゲンの大部分が主として成熟花粉において発現されるという事実により、気道を通じた感作の軌跡と解釈することができる(34)。

## 【0062】

イムノゴールド電子顕微鏡検査によると、Phl p 6 は主として成熟花粉のP粒子上に局在した。P粒子は、休眠花粉粒の含量の30%までを占め、花粉の発芽の際に成長する花粉管壁内に物質を運ぶ、小さな多糖類含有体である(35、36)。P粒子は小さなサイズであり(<2.5ミクロン)、それ故 Phl p 6 を気管支粘膜と直接接触させる呼吸性アレルゲン担体として働くことができるので、P粒子上に Phl p 6 が生じることと決定的な関連性を有すると考えられる。従って、いくつかの牧草種(Phleum pratense、Poa pratensis)だけが低分子量範囲内(10-12 kDa)にウサギ抗 r Phl p 6 反応性部分を含むが、P粒子と結合した Phl p 6 の気道深部への侵入により、アレルゲン感作の発生率が高い(75%)ことの説明となるであろう。

## 【0063】

大腸菌(Escherichia coli)に発現させた精製組換え r Phl p 6 アレルゲンは、牧草花粉アレルギー患者の大半の IgE 抗体と反応し、好塩基球のヒスタミン遊離ならびに即時型皮膚反応を誘発した。それ故、このアレルゲンは牧草花粉アレルギーの生体外及び生体内(皮膚試験)診断のために使用しうる。Phl p 6 のN末端部分の欠失がアレルゲンの IgE 結合能を著しく低下させたという我々の所見により、アフィラキシー副作用の少ない牧草花粉アレルギーの特異的免疫療法のために使用しうる Phl p 6 欠失変異体を構築することが可能であろうという発想に至った。同様の戦

略が最近、主要カバ花粉アレルゲン Bet v 1 の立体的 IgE エピトープを崩壊するために適用された(23)が、Phl p 6 分子は連続 IgE エピトープであるので、Phl p 6 については予測できなかったであろう。我々は、Phl p 6 の N 末端及び C 末端がトランケートされた変種を作製したが、その中で変異体 aa1-57 と aa31-110 は IgE 結合能をほとんど完全に消失していた。我々は、組換え分子として又はペプチド化学によって作製したこれら 2 つの低刺激性 Phl p 6 を牧草花粉アレルギーに対するワクチン候補として使用することを提案する。

#### 【0064】

(表の簡単な説明)

(表 I )

r Phl p 6 に対する即時型皮膚反応。4名の牧草花粉アレルギー患者 (HP、SF、CS、LW) 及び2名の非アレルギー個人 (SV、SS) を、精製 r Phl p 6、r Phl p 5、天然チモシー牧草花粉抽出物、ヒスタミン及び等張塩化ナトリウムで皮膚試験した。結果は膨疹反応の平均直径 (mm) で表わしている。

10

#### 【0065】

(表 II )

r Phl p 6 に対するマウス抗 r Phl p 6 又は抗 r Phl p 6 aa31-110 抗血清の IgG1 反応性。

#### 【0066】

【表 1】

20

## 参考文献

1. Kay, A. B. 1997. *Allergy and Allergic Diseases*. Blackwell Science, Oxford, UK.
2. Segal, D. M., J. D. Taurog, and H. Metzger. 1977. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:457. 10
3. Freidhoff, L. R., E. Ehrlich-Kautzky, J. H. Grant, D. A. Meyers, and D. G. Marsh. 1986. A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, *Lol p* I and *Lol p* II (rye I and rye II). *J. Allergy Clin. Immunol.* 78:1190.
4. Niederberger, V., S. Laffer, R. Fröschl, D. Kraft, H. Rumpold, S. Kapiotis, R. Valenta, and S. Spitzauer. 1998. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101:258. 20
5. Valenta, R., and D. Kraft. 1995. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 7:751.
6. Valenta, R., M. Duchêne, K. Pettenburger, C. Sillaber, P. Valent, P. Bettelheim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft, and O. Scheiner. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253:557.
7. Seiberler, S., O. Scheiner, D. Kraft, D. Lonsdale, and R. Valenta. 1994. Characterization of a birch pollen allergen, Bet v 3, representing a novel class of  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins: specific expression in mature pollen and dependence of patients IgE binding on protein-bound  $\text{Ca}^{2+}$ . *EMBO J.* 13:3481. 30
8. Shcherban, T. Y., J. Shi, D. M. Durachko, M. J. Guiltinan, S. J. McQueen-Mason, M. Shieh, and D. J. Cosgrove. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9245. 40

9. Bufl, A., G. Schramm, M. B. Keown, M. Schlaak, and W. M. Becker. 1995. Major allergen Phl p 5b in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS Lett.* 363:6.

10. Knox, R. B., C. Suphioglu, P. Taylor, R. Desai, H. C. Watson, J. L. Peng, and L. A. Bursill. 1997. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin. Exp. Allergy* 27:246.

11. Suphioglu, C., M. B. Singh, P. Taylor, R. Bellomo, P. Holmes, R. Puy, and R. B. Knox. 1992. Mechanism of grass pollen-induced asthma. *Lancet* 339:569.

12. Vallier, P., C. Dechamp, R. Valenta, O. Vial, and P. Deviller. 1992. Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin. *Clin. Exp. Allergy* 22:774.

13. Vrtala, S., M. Susani, W. R. Sperr, P. Valent, S. Laffer, C. Dolecek, D. Kraft, and R. Valenta. 1996. Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (*Phleum pratense*) allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5). *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:781.

14. Vrtala, S., W. R. Sperr, I. Reimitzer, R. van Ree, S. Laffer, W.-D. Müller, P. Valent, K. Lechner, H. Rumpold, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta. 1993. cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen: characterization of the recombinant Phl p V allergen. *J. Immunol.* 151:4773.

30 15. Peterson, A., A. Bufl, G. Schramm, M. Schlaak, and W. M. Becker. 1995. Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). II. cDNA cloning of Phl p 6 and structural comparison to grass group V. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:55.

16. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

40 17. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463.

18. Devereux, J., P. Haeberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12:387.

19. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673.

20. Rost, B., and C. Sander. 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232:584.

21. Ball, T., S. Vrtala, W. R. Sperr, P. Valent, M. Susani, D. Kraft, and R. Valenta. 1994. Isolation of an immunodominant IgE-hapten from an epitope expression cDNA library; dissection of the allergic effector reaction. *J. Biol. Chem.* 269:28323.

22. Valent, P., J. Besemer, M. Muhm, O. Majdic, K. Lechner, and P. Bettelheim. 1989. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5542.

23. Vrtala, S., K. Hirtenlehner, L. Vangelista, A. Pastore, H.-G. Eichler, W. R. Sperr, P. Valent, C. Ebner, D. Kraft, and R. Valenta. 1997. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments; candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 99:1673.

24. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.

25. Fling, S. P., and D. S. Gregerson. 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155:83.

26. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350.

27. Grote, M., C. Dolecek, R. vanRee, and R. Valenta. 1994. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p 1 and Phl p 5 after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J. Histochem. Cytochem.* 42:427.

10

20

30

40

28. Lowenstein, H. 1978. Isolation and partial characterization of three allergens of timothy pollen. *Allergy* 33:30.

29. Matthiesen, F., L. Friberg, M. Olsen, and H. Lowenstein. 1993. Purification and characterization of the *Phleum pratense* (timothy) pollen allergen Phl p 6. In: Molecular Biology and Immunology of Allergens. D. Kraft and A. Sehon eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 189-191.

30. Dolecek, C., S. Vrtala, S. Laffer, P. Steinberger, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta. 1993. Molecular characterization of *Phl p* II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335:299. 10

31. Gajhede, M., P. Osmark, F. M. Poulsen, H. Ipsen, J. N. Larsen, R. J. van Neerven, C. Schou, H. Lowenstein, and M. D. Spangfort. 1996. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Struct. Biol.* 3:1040.

32. Fedorov, A. A., T. Ball, R. Valenta, and S. C. Almo. 1997. Crystal structure and IgE epitope mapping of birch pollen profilin: The molecular basis for allergen cross-reactivity. *Structure* 5:33. 20

33. Laffer, S., L. Vangelista, P. Steinberger, D. Kraft, A. Pastore, and R. Valenta. 1996. Molecular characterization of Bip 1, a monoclonal antibody that modulates IgE binding to birch pollen allergen, Bet v 1. *J. Immunol.* 157:4943.

34. Valenta, R., and D. Kraft. 1996. Type I allergic reactions to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:893.

35. Heslop-Harrison, J., and Y. Heslop-Harrison. 1982. The growth of the grass pollen tube: 1. Characteristics of the polysaccharide particles ("P-particles") associated with apical growth. *Protoplasma* 112:71. 30

36. Heslop-Harrison, J., Y. Heslop-Harrison, and J. S. Heslop-Harrison. 1997. Motility in ungerminated grass pollen: association of myosin with polysaccharide-containing wall-precursor bodies (P-particles). *Sex. Plant Reprod.* 10:65.

37. Vrtala, S., Fischer, S., Grote, M., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W., Valent, P., Reichelt, R., Kraft, D., Valenta, R. 1999. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J. Immunol.* 163:5489. 40

【0067】

【表2】

表 I rPhl p 6 に対する即時型皮膚反応

| 個人                | Phl p 6<br>(10 $\mu$ g/ml) | Phl p 6<br>(100 $\mu$ g/ml) | Phl p 5<br>(10 $\mu$ g/ml) | Phl p 5<br>(100 $\mu$ g/ml) | チモ-牧草 | セスキ | NaCl |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|-----|------|
| 牧草花粉に対してアレルギー性の患者 |                            |                             |                            |                             |       |     |      |
| HP                | 5                          | 16.5                        | 5.5                        | 13                          | 16    | 5.5 | 0    |
| SF                | 0                          | 13                          | 2                          | 11                          | 8     | 7   | 0    |
| CS                | 0                          | 12                          | 5                          | 8.5                         | 12    | 9   | 0    |
| LW                | 2.5                        | 10.5                        | 5                          | 13                          | 9     | 5.5 | 0    |
| 非アレルギー個人          |                            |                             |                            |                             |       |     |      |
| SV                | 0                          | 0                           | 0                          | 0                           | 0     | 6   | 0    |
| SS                | 0                          | 0                           | 0                          | 0                           | 0     | 7.5 | 0    |

【 0 0 6 8 】  
【 準 3 】

表 II rPhl p 6 に対するウス抗 rPhl p 6 又は抗 rPhl p 6 aa31-110 抗血清の IgG1 反応性。

| ウス抗 rPhl p 6             | 免疫前血清 | I. 免疫血清 | II. 免疫血清 |    |
|--------------------------|-------|---------|----------|----|
| 1                        | 0.060 |         | >2.5     |    |
| 2                        | 0.061 |         | >2.5     |    |
| 3                        | 0.065 |         | >2.5     |    |
| 4                        | 0.061 |         | >2.5     |    |
| 5                        | 0.062 |         | >2.5     |    |
| ウス抗 rPhl p 6<br>aa31-110 |       |         |          | 10 |
| 1                        | 0.063 | 1.218   | >2.5     |    |
| 2                        | 0.056 | >2.5    | >2.5     |    |
| 3                        | 0.057 | 0.347   | >2.5     |    |
| 4                        | 0.054 | >2.5    | >2.5     |    |
| 5                        | 0.056 | 0.406   | >2.5     |    |

【図面の簡単な説明】

【図 1】 rPhl p 6 アイソフォーム及び断片の IgE 反応性。2つの Phl p 6 アイソフォーム (c142, c223)、Phl p 6 断片 (c121, c146, c171, c233) を発現する組換え g t 11 ファージ、及び対照として g t 1 野生型ファージ (0) からのタンパク質を含むニトロセルロースフィルターを、9名の牧草花粉アレルギー患者 (1-9) 及び1名の非アレルギー個人 (10) からの血清 IgE で試験した。

【図 2 A】 、組換えチモシー牧草花粉アレルゲンの純度。精製組換えチモシー牧草花粉アレルゲン (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, チモシー牧草花粉プロフィリン) 及び天然チモシー牧草花粉抽出物 (チモシー) を含む、クマシーブリリアントブルー染色した SDS-PAGE. (M) 分子量マーカー。

【図 2 B】 円偏光二色性分析。平均残基権円性 ([ ]) として表わした rPhl p 6 の遠紫外遠偏光二色性スペクトル (y 軸) を x 軸に表示した波長範囲で 20 (実線)、85 (点線) 及び 85 から冷却後 20 (破線) で記録した。

【図 2 C】 円偏光二色性分析。220 nm でモニターした精製 rPhl p 6 の熱変性と冷却 (x 軸: で表示した温度; y 軸: 折りたたみタンパク質の見かけ分画)。

【図 3 A】 rPhl p 6 は好塩基球のヒスタミン遊離を誘導する。牧草花粉アレルギー患者からの顆粒球を種々の濃度 (x 軸) の精製組換え Phl p 6 (三角)、Phl p 5 (点) 又はモノクローナル抗 IgE 抗体 (四角) と共にインキュベートした。上清中に遊離されたヒスタミンのパーセンテージを y 軸に示す。結果は3回の測定の平均値 (+/- SD) である。

【図 3 B】 感作アレルギー患者での rPhl p 6 による即時型皮膚反応の誘発。2名の牧草花粉アレルギー患者 (a) LW、(b) HP 及び非アレルギー個人 (c) SV を、(d) に示すような漸増濃度の rPhl p 6 と rPhl p 5 ならびにヒスタミン (Hist) と NaCl で前腕に穿刺した。膨疹部分をボールペンで囲んでいる。

【図 4】 Phl p 6 の組織特異的発現。種々の単子葉植物からのニトロセルロースプロットした牧草花粉抽出物をウサギ免疫前 Ig (レーン 1) 又はウサギ抗 rPhl p 6 Ig (レーン 2) でプローブした。B、同等の量のニトロセルロースプロットしたチモシー牧草花粉、葉及び根からのタンパク質抽出物をウサギ抗プロフィリン Ig (レーン 1)、ウサギ抗 Phl p 6 Ig (レーン 2) 又はウサギ免疫前 Ig (レーン 3) と共にインキュベートした。

C, D, Phl p 6 の超微細構造局在。チモシー牧草花粉の超薄切片をウサギ抗 Phl p 6 Ig (C) 及びウサギ免疫前 Ig (D) で染色した。結合ウサギ抗体を金複

合ヤギ抗ウサギ IgG 抗血清（金粒子 = 黒い点）で検出した。矢印は P 粒子上の Ph1 p 6 欠失変異体を示す。略語：E：外膜；I：内膜；P：P 粒子。バーは 0.250 μm である。

【図 5 A】 Ph1 p 6 欠失変異体の低い IgE 結合能。等量の組換え Ph1 p 6 を、チモシー牧草花粉アレルギー患者からの血清（レーン 1 - 13）及び非アレルギー対照個人からの血清（レーン 14）との IgE 反応性について試験した。レーン 15 とレーン 16 はウサギ抗 r Ph1 p 6 抗血清及びウサギ免疫前血清との反応性を示す。結合 IgE 抗体を  $^{125}\text{I}$  標識抗ヒト IgE 抗体で検出し、結合ウサギ抗体を  $^{125}\text{I}$  標識ロバ抗ウサギ抗体で検出して、オートラジオグラフィーによって視覚化した。

【図 5 B】 Ph1 p 6 欠失変異体の低い IgE 結合能。等量の組換え Ph1 p 6 aa1-57 を、チモシー牧草花粉アレルギー患者からの血清（レーン 1 - 13）及び非アレルギー対照個人からの血清（レーン 14）との IgE 反応性について試験した。レーン 15 とレーン 16 はウサギ抗 r Ph1 p 6 抗血清及びウサギ免疫前血清との反応性を示す。結合 IgE 抗体を  $^{125}\text{I}$  標識抗ヒト IgE 抗体で検出し、結合ウサギ抗体を  $^{125}\text{I}$  標識ロバ抗ウサギ抗体で検出して、オートラジオグラフィーによって視覚化した。

【図 5 C】 Ph1 p 6 欠失変異体の低い IgE 結合能。等量の組換え Ph1 p 6 aa31-110 を、チモシー牧草花粉アレルギー患者からの血清（レーン 1 - 13）及び非アレルギー対照個人からの血清（レーン 14）との IgE 反応性について試験した。レーン 15 とレーン 16 はウサギ抗 r Ph1 p 6 抗血清及びウサギ免疫前血清との反応性を示す。結合 IgE 抗体を  $^{125}\text{I}$  標識抗ヒト IgE 抗体で検出し、結合ウサギ抗体を  $^{125}\text{I}$  標識ロバ抗ウサギ抗体で検出して、オートラジオグラフィーによって視覚化した。

【図 6】 牧草花粉に対するアレルギー患者からの顆粒球を様々な濃度（1、10-1、10-2、10-3、10-5、及び 10-7 μg/ml）の精製 r Ph1 p 6（点）、r Ph1 p 6 aa1-57（上向き三角）、r Ph1 p 6 aa31-110（下向き三角）、r Ph1 p 6 aa1-33（菱形）又は抗 IgE mAb（四角）と共にインキュベートした。上清中に遊離されたヒスタミンをRIAによって測定し、y 軸に示している。結果は 3 回の測定の平均値である。

【図1】

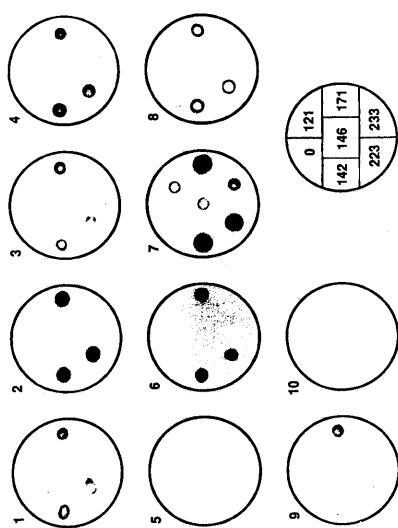


Figure 1

【図2A】

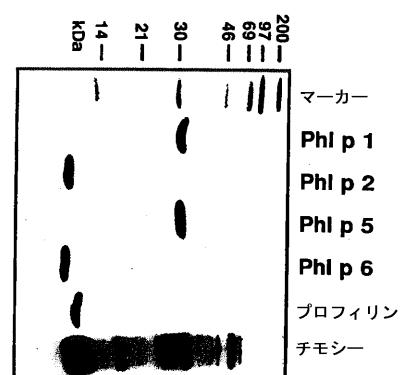


Figure 2A

【図2B】

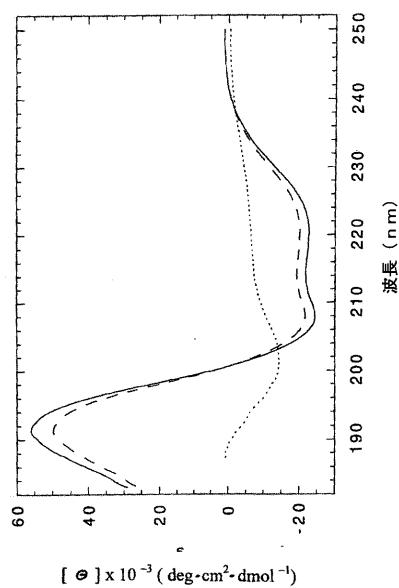


Figure 2B

【図2C】

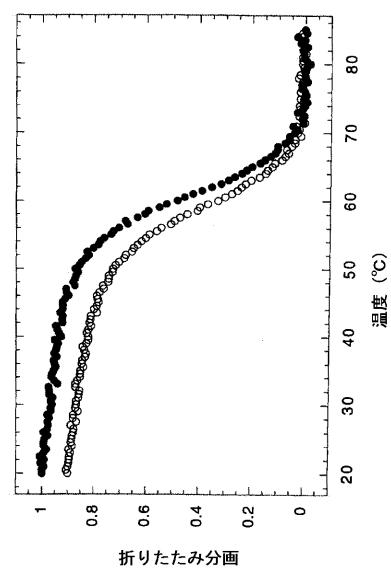


Figure 2C

【図3A】

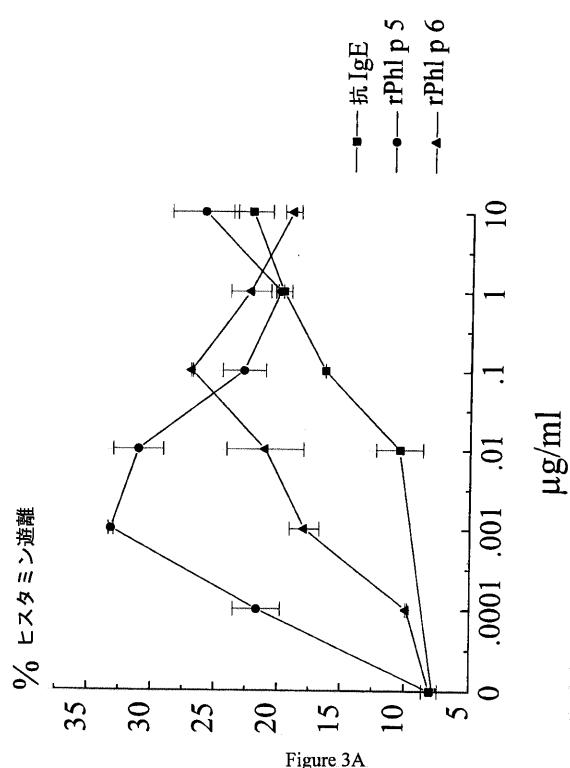


Figure 3A

【図3B】

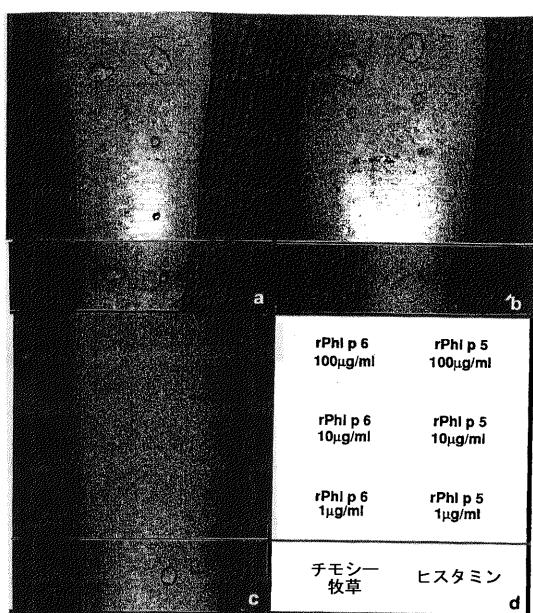


Figure 3B

【図4】

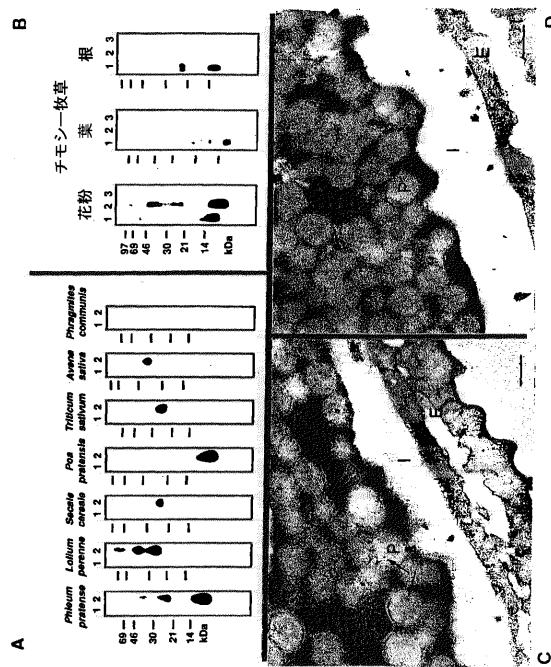


Figure 4

【図5A】

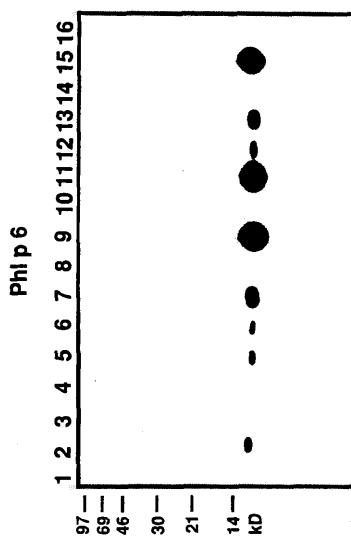
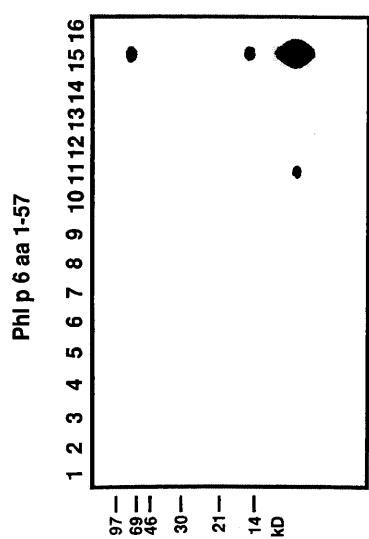


Figure 5A

【図5B】



【図5C】

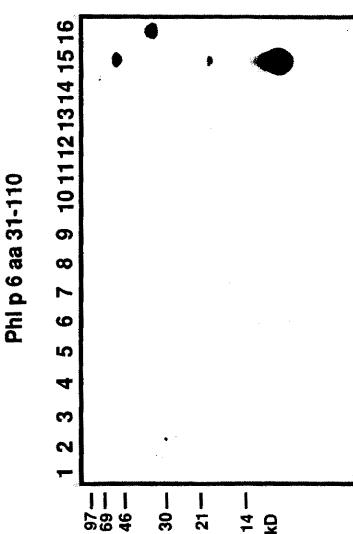


Figure 5C

Figure 5B

【図6】

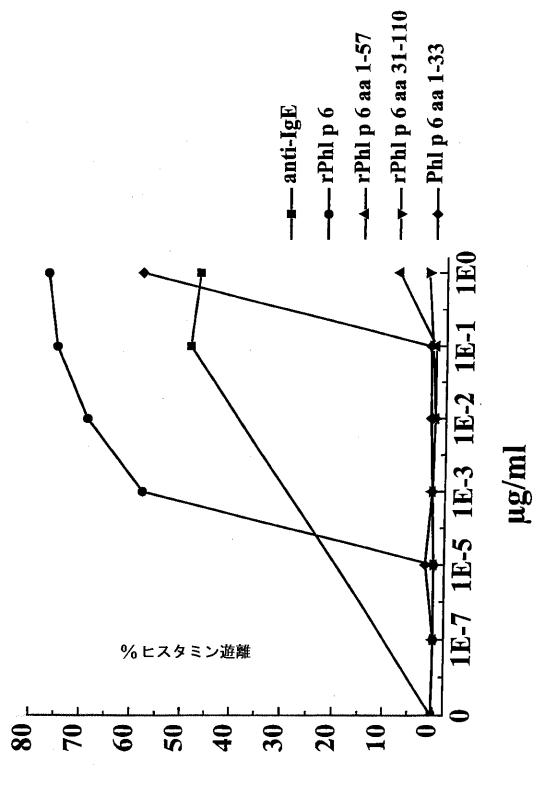


Figure 6

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 61 K 38/00 (2006.01) A 61 K 37/02

(72)発明者 フルタラ, ズーザーナ  
オーストリア国、ア- - 1 2 1 0 · ビエナ、シエンケンドルフガツセ · 1 6 / 1 / 4

(72)発明者 シュトゥムフォル, ザビーネ  
オーストリア国、ア- - 3 3 5 2 · ザンクト・ペーター、ザンクト・ヨハン · 1 7

(72)発明者 グレンリュンド, ハンス  
スウェーデン国、エス - 1 8 1 5 7 · リーデインギヨ、ビンケルベーゲン · 1 4

(72)発明者 グロテ, モニカ  
ドイツ国、デ- - 4 8 1 6 1 · ミュンスター、グロナウベーク · 3 3

(72)発明者 バンジエリスタ, ルカ  
イタリー国、イ - 3 5 1 2 2 · パドバ、ビア・カルロ・ドットーリ、5

(72)発明者 パストーレ, アナリサ  
イギリス国、ロンドン・エヌ・ダブリュ・7 · 1 · エイ・エイ、ナショナル・インスティテュート  
・ フォー・メディカル・リサーチ、モレキユラー・ストラクチャ・デイビジョン

(72)発明者 シュペル, ポルフガング・エル  
オーストリア国、ア- - 1 1 9 0 · ビエナ、イグレゼーガツセ · 9

(72)発明者 バーレント, ペーター  
オーストリア国、ア- - 1 1 7 0 · ビエナ、シユルガツセ · 7 / 1 8

(72)発明者 クラフト, デイートリツヒ  
オーストリア国、ア- - 1 1 7 0 · ビエナ、レーベンベーク · 1 / 1 8 / 1

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第98/043657 (WO, A1)  
J. Immunology, (1999), Vol. 162, p. 2406-2414  
Int. Arch. Allergy Immunol. (1995), Vol. 108, p. 55-59

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/415  
A61K 38/00  
A61K 39/00  
A61K 49/00  
A61P 37/08  
C12N 15/00  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq