

(学術資料)

ヒノキ花粉メジャーアレルゲン (Cha o 1) のN末端 アミノ酸シーケンス

井手 武¹⁾・山本 恵三¹⁾・田端 司郎¹⁾・芦田 恒雄²⁾¹⁾ 奈良県立医科大学 化学教室

〒634 橿原市四条町 840

²⁾ 芦田耳鼻咽喉科医院

〒577 東大阪市小阪 3-4-51

(1995年3月1日 受理)

N-Terminal Amino Acid Sequence of a Major Allergen, Cha o 1, of Japanese Cypress Pollen

Takeshi IDE¹⁾, Keizo YAMAMOTO¹⁾, Shiro TABATA¹⁾ and Tsuneo ASHIDA²⁾¹⁾ Department of Chemistry, Nara Medical University,
Shijo-cho 840, Kashihara 634, Japan²⁾ ASHIDA ENT Clinic, Kosaka 3-4-51, Higashiosaka 577, Japan

The sequence of 7 N-terminal amino acids of a major allergen, Cha o 1, from *Chamaecyparis obtusa* pollen was determined to be N-Asp-Asn- Pro-Ile-Asp-Ser-?-Trp. Although, Cha o 1 included two components having molecular mass of 45 and 50kDa. The sequences, 7 N-terminal amino acids of 45 and 50kDa, were identical. The sequence of Cha o 1 was identical to the reported sequence of the major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar. A quick and convenient method for partial purification of Cha o 1 was also described.

Key words : *Chamaecyparis obtusa*, pollen, allergen, Cha o 1, N-terminal amino acid sequence.

緒 言

これまでの報告⁽¹⁻⁶⁾から、ヒノキ花粉メジャーアレルゲン (Cha o 1) はスギ花粉メジャーアレルゲン (Cry j 1) と共通抗原性があり、またヒト Ig E 抗体は両者の共通エпитープを認識することがわかった。そこで Cha o 1 を単離して、そのN末端アミノ酸シーケンスを決定し、Cry j 1 と比較検討した。

また、Cha o 1 のN末端アミノ酸シーケンスペプチドをウサギに免疫して、抗ペプチド抗体を作成して更に検討した。

材料および方法

1. ヒノキ花粉

雄花の付いた枝を、水差しして開花採取したものを

Table 1. Procedures for a quick and convenient method for a partial purification of Cha o 1.

Step 1 : 40 g of pollen were extracted with 1000 ml of 0.1M Tris-HCl, pH8.0 by shaking the sample gently at 4°C for 16 hr. The sample was centrifuged at 10⁴ rpm for 15 min and the supernatant was collected.

Step 2 : The extracts were applied to a QAE-TOYOPEARL 550C column (20ml) equilibrated with 0.1M Tris-HCl, pH8.0, and the pass-through fraction was collected.

Step 3 : The pass-through fraction was dialyzed against 0.1M phosphate, pH5.0 and was applied to a SP-TOYOPEARL 550C column (40ml) equilibrated with 0.1M acetate, pH5.0 and the proteins were eluted with 0.2M phosphate, pH7.0. The major allergen was concentrated in this fraction.

使用時まで -80°C に保存した⁽⁷⁾.

2. 患者血清

ヒノキ花粉飛散期に花粉症症状のあった 38 名より採血し、血清を分離して -80°C に保存した。

3. 着色物質および多糖成分を除去したヒノキ花粉アレルギー画分, HT(QAE)SP, の調製 (Table 1)

ヒノキ花粉を 25 倍量 (W/V) の 0.1M, pH8.0 の Tris 緩衝液で抽出後、抽出液を同緩衝液で調整した QAE-トヨパールカラムを通すと、着色成分は吸着され、アレルギー活性は非吸着画分にくる。この非吸着画分を 0.1M, pH5.0 の酢酸緩衝液に透析し、同緩衝液で調整した SP-トヨパールカラムに負荷すると、活性成分は吸着し、多糖成分は非吸着画分にくる。吸着成分は 0.2M, pH7.0 のリン酸緩衝液で溶出してアレルギーを含むタンパク画分とした (Fig. 1)。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli の方法⁽⁸⁾を一部改変して行った。濃縮ゲル濃度を 4%, 分離ゲル濃度を 10%, または 12.5% としてミニスラブ法で行い、泳動試料は SDS 濃度を 2% として、2-メルカプトエタノール等の還元剤は添加せず、加熱処理もしないものを用いた。

5. 抗スギN末端ペプチド血清

Cry j 1 の N 末端 15 アミノ酸からなる合成ペプチド (NH₂-Asp-Asn-Pro-Ile-Asp-Ser-Cys-Trp-Arg-Gly-Asp-Ser-Asn-Trp-Ala-COOH) のシステイン残基の -SH を介してマレイミドで活性化したスカシガイヘモシアニン (KLH) と結合して抗原とした。

抗原の生理食塩溶液 (ペプチドとして 0.5 mg/ml) を等量の Freund's adjuvant (1 回目は complete,

2 回目以降は incomplete) と混じ、その 1 ml をウサギの鼠径部下数か所に 1 週おきに 3 回注射し、最後の注射から 1 週間目に採血して、抗スギN末端ペプチド血清を得た。マイクロプレートに合成ペプチドをコーティングして、ELISA にて抗血清の IgG 抗体を確認した。

6. ウェスタンブロット

SDS-PAGE 後、泳動されたタンパクをスラブゲルから PVDF メンブレン (Immobilon P, ミリポア) へトランスブロットした⁽⁹⁾。このメンブレンを第 1 抗体 (患者血清、またはウサギ抗スギN末端ペプチド血清)、第 2 抗体 (HRP 標識した抗ヒト IgE 抗体、または抗ウサギ IgG 抗体) の順に処理して、第 1 抗体の結合したタンパクバンドを ECL キット (アマージャム社) で検出した。

7. N末端側のアミノ酸配列の決定

SDS-PAGE 後、スラブゲルより PVDF メンブレン上にタンパクをトランスブロットし、目的バンド (事前にウェスタンブロットで確認した Cha o 1 に相当するタンパク) を切り取り試料とした。N末端アミノ酸シーケンスはプロテインシーケンサー (モデル 476A, アプライドバイオシステムズ) を用いて決定した。

結果および考察

1. 裸子植物花粉エキス調製の際、同時にペクチン様酸性多糖類や色素成分が大量に抽出されてくるので、抗原の分析や精製が困難であった。Table 1 に示した方法は、スギやヒノキ花粉においてアレルギーを短時間に濃縮し、しかも多糖や色素成分を除去したタンパク画分を得るのに有効であった。Fig. 1 に SP-トヨ

Table 2. N-terminal amino acid sequences of Cha o 1, Jun p 1⁽¹⁰⁾, Cry j 1⁽¹¹⁾ and Cry j 2⁽¹²⁾.

	1	5
Cha o 1	Asp-Asn-Pro-Ile-Asp-Ser- ? -Trp-	
Jun p 1	Asp-Asn-Pro-Ile-Asp-	
Cry j 1	Asp-Asn-Pro-Ile-Asp-Ser-Cys-Trp-Arg-Gly	
Cry j 2	Ala-Ile -Asn-Ile-Phe-Asn-Val-Glu-Lys-Tyr	

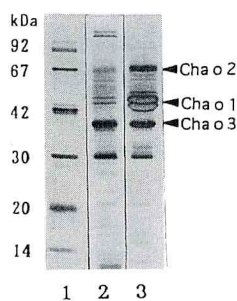
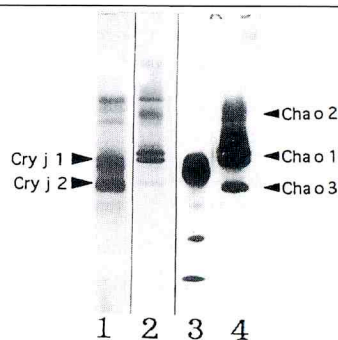


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of partially purified Cha o 1.

SDS-PAGE of molecular markers (lane 1), crude extracts (lane 2), and the partially purified fraction of Cha o 1 (lane 3) was carried out as described in "Materials and Methods". Proteins were stained with the use of "2D-SILVER STAIN" kit (DAIICHI P.CHEM.).

パールでの溶出画分の SDS-PAGE を示しているが、Cha o 1 はこの段階で約 50 倍程度精製された。

2. ヒノキ科樹木の開花期に花粉症症状を有するスギ花粉単独感作 38 例の血清を用いて、SDS-PAGE/イムノブロット法 (ウエスタンブロット) により、スギおよびヒノキ花粉成分への患者 IgE 抗体の反応性を調べた。その 1 例を Fig. 2-lane 1, 2 に示した。38 例のうち、スギ花粉アレルゲン Cry j 1, Cry j 2, ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 (45-50kDa), Cha o 2 (67kDa) と Cha o 3 (40kDa) に対して IgE 抗体が結合した症例数は、37 例 (97.4%), 14 例 (36.8%), 32 例 (84.2%), 11 例 (29.0%), 4 例 (1.1%) であった。この結果は、スギ花粉のメジャーアレルゲンは Cry j 1 であり、次に Cry j 2 であることを示すと共に、ヒノキ花粉の 45-50kDa の成分が、スギ花粉症患者のヒノキ花粉によるアレルギーの原因となっていることを示している。つまり、Cha o 1 はヒノキ花粉のメジャーアレルゲンである。

Fig. 2. Immunoblotting of crude extracts from *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* pollens.

Crude extracts from pollens of *C.japonica* (lane 1,3) and *C.obtusa* (lane 2,4) were electrophoresed by SDS-PAGE, transblotted, and analyzed by immunoblotting with a serum from a patient (lane 1,2) and a rabbit antiserum raised against a polypeptide with N-terminal 15 amino acids sequence of Cry j 1 (lane 3,4), as described in "Materials and Methods".

3. Cha o 1 の N 末端アミノ酸シーケンスは Table 2 に示したように、7 番目を除き N 末端から 8 番目までのシーケンスは全く同じであった。このことから、Cha o 1 と Cry j 1 の N 末端アミノ酸シーケンスの相同性が共通抗原性に関与している可能性が考えられた。

4. Cry j 1 の N 末端から 15 番目までのアミノ酸からなる合成ペプチドに対するウサギ抗血清を第 1 抗体、抗ウサギ IgG 抗体を第 2 抗体としてウエスタンブロットを試みた。ウサギ抗血清、つまり Cry j 1 の N 末端 15 アミノ酸ペプチド抗体は Cry j 1 のみならず、ヒノキ花粉の Cha o 1, Cha o 2, Cha o 3 と結合した (Fig. 2-lane 3,4)。なお、Fig. 3-lane 3 の Cry j 1 以外のバンドは免疫前のウサギ血清 (コントロール血清) でも検出されることから抗体の非特異的な結合によるものであろう。

この結果から、Cry j 1 の N 末端アミノ酸シーケンスと同じシーケンスが Cha o 1 のみならず、Cha o 2 や Cha o 3 にも存在することが確認された。この抗原決定基部分の花粉症に関する意義については今後の課題である。

これまでの報告⁽¹⁻⁶⁾と今回の報告から、ヒノキ花粉のメジャーアレルゲン、Cha o 1 の性質をまとめると、Cha o 1 は分子量 45 と 50kDa、等電点 6.5-6.8 の糖タンパク質である。45、50kDa の N 末端アミノ酸シーケンスはいずれも N-Asp-Asn-Pro-Ile-Asp-Ser-?-Trp- である。

なお、これまでの報告で HMA (Hinoki pollen Major Allergen) としてきたものを、ここでは国際命名法に準じて Cha o 1 と表記した。

結 語

- 1) 多糖類や色素を含まないヒノキ花粉アレルゲンエキスの簡便な調製法を開発した。
- 2) ヒノキ花粉メジャーアレルゲン Cha o 1 の N 末端アミノ酸シーケンスはスギやマウンテンシーダーと類似していることが判った (Table 2)。
- 3) 抗合成ペプチド抗体を用いたイムノアッセイからヒノキ花粉には Cha o 1 以外にも 2 種の Cha o 1 と類似アミノ酸シーケンスをもつ抗原の存在が示唆された。

引 用 文 献

- (1) 井手 武, 芦田恒雄, 田端司郎, 鳥居健三: ヒノキ花粉の抗原性に関する研究—ヒノキ花粉抗原の分析—(抄録). アレルギー 32, 596 (1983).
- (2) 井手 武, 芦田恒雄, 田端司郎, 鳥居健三: 高速液体クロマトグラフィの花粉抗原分析への応用; ゲル濾過カラムを用いた花粉の抗原分析. 花粉誌 34, 39-42 (1988).
- (3) 井手 武: スギ, ヒノキ花粉の抗原分析とスギ科, ヒノキ科花粉の共通抗原性. 日本鼻科学会誌 29, 311-312 (1990).
- (4) 井手 武, 芦田恒雄: スギ科・ヒノキ科樹木花粉の共通抗原性. アレルギーの臨床 11, 174-178 (1991). * 図 5 の説明に印刷ミスがある。正しくは説明(a)は下図, 説明(b)は上図である。
- (5) 井手 武, 芦田恒雄, 吉川恒男: スギ花粉症におけるヒノキ花粉の意義—ヒノキ特異的 IgE 抗体の存在—. 平成 4 年度厚生省アレルギー総合研究事業研究報告書, 厚生省 pp.178-180 (1993).
- (6) 井手 武, 芦田恒雄: スギ花粉症におけるヒノキ花粉の意義 (II) —SDS-PAGE/イムノブロットにみる IgE 抗体像—. 平成 4 年度厚生省アレルギー総合研究事業研究報告書, 厚生省 pp.163-165 (1994).
- (7) 井手 武, 松村有嘉子, 岡崎 旦, 芦田恒雄, 衛藤幸男, 吉川恒男: 風媒花樹木の成熟花粉採集法. 花粉誌 35, 39-42 (1989).
- (8) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- (9) 芦田恒雄, 井手 武, 衛藤幸男: 花粉アレルギー実験法. 花粉誌 39, 71-79 (1993).
- (10) Gross, G.N., J.M.Zimburean and J.D. Capra: Isolation and characterization of mountain cedar pollen. *Scand. J. Immunol.* 8, 437-441 (1978).
- (11) Taniai M., S.Ando, M.Usui, M.Kurimoto, M.Sakaguchi, S.Inoue and T.Matuhasi: N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS LETTERS* 239, 329-332 (1988).
- (12) Sakaguchi, M., S.Inoue, M.Tanniai, S.Ando, M.Usui and T.Matuhasi: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312 (1990).