

ISSN 0918-113X

研 究 報 告

第 14 号

2005. 3

秋田県森林技術センター

目 次

1. 不稔スギ作出に関する研究

－アレルゲン測定技術の開発－	佐々木 揚	1～10
----------------------	-------------	------

不稔スギ作出に関する研究

－ アレルゲン測定技術の開発 －

佐々木 揚

Development of Japanese Cedar Pollenosis Major Allergen Cry j 1 Quantification

Yoh Sasaki

要 旨

スギ花粉症とはスギ花粉に対するアレルギー反応である。このアレルギー症状を引き起こす原因物質であるアレルゲンはスギ花粉症の場合、花粉の表面と内部に存在する2種類のタンパク質（Cry j 1 とCry j 2）である。低アレルゲンスギが選抜できれば、花粉の少ないスギと組み合わせることにより、花粉症対策としてより有効な品種開発が可能になる。一般的にCry j 1の定量は免疫測定法の一つであるELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）で行われる。しかし、Cry j 1にはさまざまなサブタイプが知られており、従来法ではCry j 1すべてのサブタイプを1回で測定できなかった。そこで、本研究では1回ですべてのCry j 1を測定し、1）正確に定量できるサンドイッチELISAと2）多試料を容易、かつ迅速に定量できる簡便法ELISAの2種を開発した。

なお、本研究成果として2件の特許出願を行った。

①低アレルゲンスギ選抜に関する高精度Cry j 1免疫測定法（特願2003-287764）

出願平成15年8月6日

②低アレルゲンスギ選抜に関する簡便なCry j 1免疫測定法（特願2003-306429）

出願平成15年8月29日

I. はじめに

スギ花粉症はスギ花粉を原因とするアレルギーで、近年、患者数の増加とともに大きな社会問題になっており（1）、県内でも平成12年の外来患者数は平成8年と比較すると、2倍以上に増加している（平成13年度秋田県花粉症対策検討会）。この花粉症患者が増加した理由には、車社会の発達によって発生量が増加したディーゼル排出粒子に免疫増強作用がある（2）、都市化に伴って生活環境が衛生になったため、人間の免疫防御システムが変化し、アレルギーになりやすくなった（3）などが考えられる。また、1950年代から70年代にかけて木材生産を向上させるために拡大造林したスギが開花樹齢に達して、飛散花粉が増加し始めていることも大きな要因である（4）。

アレルギーの直接原因物質であるアレルゲンはスギ花粉症の場合、花粉に存在する2種類のタンパ

ク質 Cry j 1 (5) と Cry j 2 (6) である。そこで、花粉が多くてもアレルゲンが少ないスギ精英樹が選抜されれば、種子生産に適すると同時に花粉症対策としても育種効果が期待できる。また、花粉が少なく、なおかつアレルゲンが少ない精英樹は木材生産と花粉症対策を両立する最も有効な品種と考えられる。スギ花粉症アレルゲンについて、林業サイドでもさまざまな研究が取り組まれてきた (7 - 12)。その中で (7)、低アレルゲンスギ選抜という観点からみると、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量には 1 % 水準で有意な相関が認められ、Cry j 1 の少ない系統選抜によって低アレルゲンスギの選抜が可能であることが示されていた (図 - 1)。

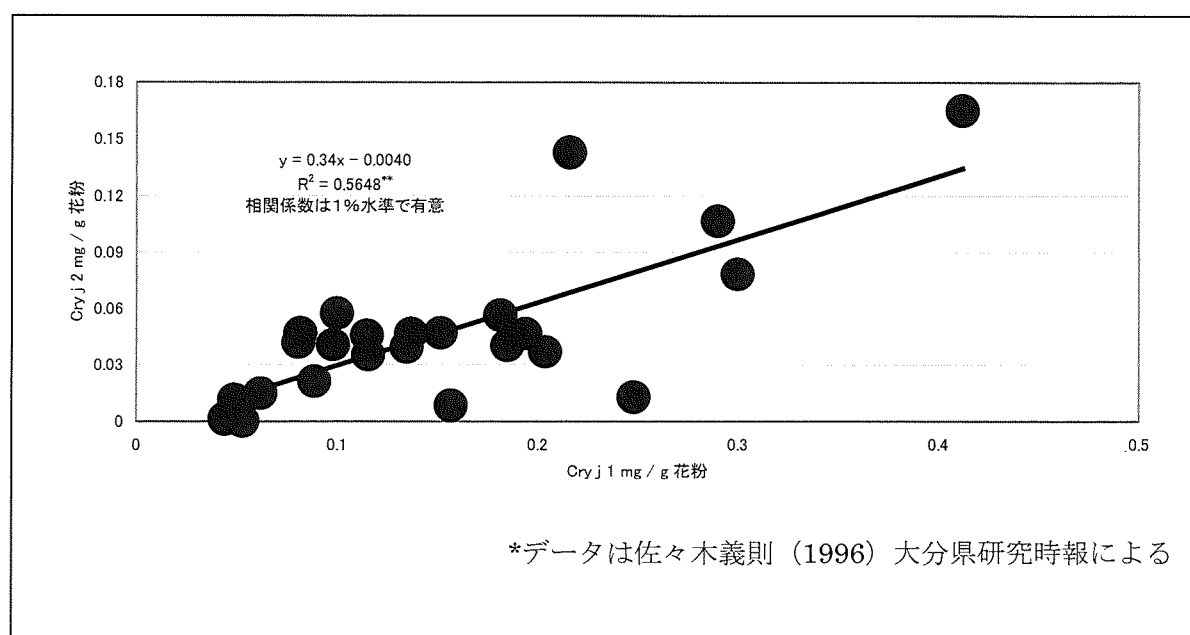


図 - 1 花粉抽出液中の Cry j 1 と Cry j 2 含量の相関

Cry j 1 の定量は免疫測定法の一つである ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) が一般的である。最近、これまでの Cry j 1 定量法は、不完全であることがわかってきた (12, 13)。Cry j 1 にはさまざまなサブタイプが知られているが、開発当初の Cry j 1 定量法では特定の Cry j 1 サブタイプが測定されないことが明らかになったのである。これを解決するために、Cry j 1 のポリクローナル抗体で固相化したマイクロプレートに花粉抽出液を加え、反応部域が異なる 2 種類のマウスのモノクローナル抗体で検出する方法が開発された (12)。

そこで、本研究では 1 回の測定ですべての Cry j 1 を測定し、1) 正確に定量できるサンドイッチ ELISA と 2) 多試料を容易、かつ迅速に定量できる簡便法 ELISA の 2 種を開発することを目的とした。

II. 材料と方法

供試材料は冬期に雄花を有する枝を精英樹採種園より採取し、実験室内で開葯させた後、使用するまで花粉を 4 °C で冷蔵保存した。Cry j 1 の抽出は花粉 20mg に 1mL の 0.125M NaHCO₃ (pH8.0) を

加え、4℃、1時間で行った。15,000rpm、10分の遠心分離を行ったのち、得られた上清100μLをエッペンドルフチューブに分注し、80℃で2分間の加熱処理をウォーターバスで行った。

1) ELISA の高精度化

一次抗体（マウスモノクローナル抗体 anti-Cry j 1 m Ab 026, Hayashibara）を、TBS（20mM Tris-HCl（pH7.5）、500mM NaCl）で100倍希釈し100μLを4℃、1晩マイクロプレート（マキシソープ, Nunk）に吸着させた。ブロッキングは200μLの5%BSA（アルブミンフリー, Sigma）in TBSで一昼夜もしくは37℃で1時間行った。TBSで3回洗浄後、抽出液の上清を0.125M NaHCO₃（pH8.0）で希釈し、マイクロプレートに100μLを分注し、4℃で1晩おいた。TBSで3回洗浄後、二次抗体（ウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体 Anti（MAP）Cry j 1, LSL）を37℃1時間、あるいは4℃一晩、反応させた。TTBS（0.05% Tween 20 in TBS）で3回、TBSで3回洗浄後、0.2%BSA in TBSで1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギヤギ IgG 抗体（Cappel）を37℃1時間、反応させた。TTBSで3回、TBSで3回洗浄後、BluePhos キット（KPL）で発色および発色反応を停止し、655nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（Model 550, Biorad）で測定した。

2) ELISA の簡便化

80℃で2分間の加熱処理を行った抽出液の上清を0.125M NaHCO₃（pH8.0）で希釈し、100μLを4℃、1晩マイクロプレートに吸着させた。ブロッキング以降、1）同様に免疫反応を行った。

3) ELISA の迅速化

抽出液の上清を脱気した0.125M NaHCO₃で希釈し、100μLをマイクロプレートに分注し、マイクロプレートごと80℃で3分間加熱処理した。ブロッキング以降、1）同様に免疫反応を行った。なお、いずれの方法もコントロールには精製スギ花粉アレルゲン Cry j 1（Hayashibara）を用いた。

Ⅲ. 結果と考察

1) ELISA の高精度化

Cry j 1 定量法であるサンドイッチ ELISA は、マイクロプレート（固相）に吸着させた抗体に、抗原（ここでは Cry j 1）が結合し、さらに別の抗体が結合して検出する方法である。しかし、これまでの Cry j 1 定量法では、特定の Cry j 1 サブタイプにしか反応しないため、Cry j 1 含量が著しく低く測定されるスギの系統があった（12）。現在までに報告されている Cry j 1 の cDNA 塩基配列から得られるアミノ酸配列の比較を行ってみた結果、Cry j 1 は5種類に分類されることが分かった（表-1）。Cry j 1 のアミノ酸配列は共通する部分の保存領域と共通しない部分の非保存領域が存在する。この表-1の結果から、これまでの2種類のモノクローナル抗体の組み合わせによるサンドイッチ ELISA は用いる抗体が Cry j 1 の非保存領域に結合するため、定量が不完全だったと考えられる。

表-1 Cry j 1 の cDNA の塩基配列から翻訳したアミノ酸配列

```

Cry j 1 A 1: DNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFSGSTMGGKGGDLTYVTNSDDDPVNPAPGTLRY
Cry j 1 B 1: .....
Cry j 1 C 1: .....
Cry j 1 D 1: .....
Cry j 1 E 1: .....
*****

Cry j 1 A 61: GATRDRPLWIIIFSGNMNIKLKMPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVVIHG
Cry j 1 B 61: .....
Cry j 1 C 61: .....
Cry j 1 D 61: .....
Cry j 1 E 61: .....H.....
*****

Cry j 1 A 121: LHLYGCSTSVLGNVLINESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSDGLVDVTL
Cry j 1 B 121: .Y.....
Cry j 1 C 121: .Y.....P.....
Cry j 1 D 121: .Y.....
Cry j 1 E 121: .....S.....
*****

Cry j 1 A 181: SSTGVTISNNLFFNHKVMLLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGRMPRARYGLVHV
Cry j 1 B 181: T.....S.....
Cry j 1 C 181: T.....
Cry j 1 D 181: T.....
Cry j 1 E 181: .....
*****

Cry j 1 A 241: ANNNYDPWTIYAIGGSSNPTILSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCSNVWQSTQ
Cry j 1 B 241: .....
Cry j 1 C 241: .....
Cry j 1 D 241: .....
Cry j 1 E 241: .....
*****

Cry j 1 A 301: DVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGATPQLTKNAGVLTCSLSKR
Cry j 1 B 301: .....H..Q.....
Cry j 1 C 301: .....
Cry j 1 D 301: .....
Cry j 1 E 301: .....
*****

```

Cry j 1A, B; Sone et al. (14), Cry j 1C; 稲葉ら (15)

Cry j 1D; Namba et al. (16), Futamura & Shinohara (17, 18)

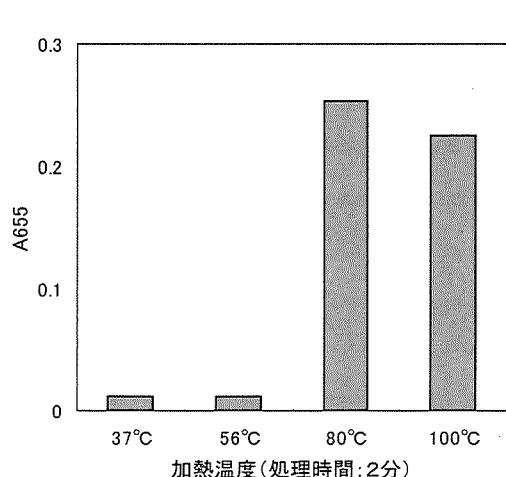
Cry j 1E; Wang et al. (19)

*は共通しているアミノ酸配列を示す。

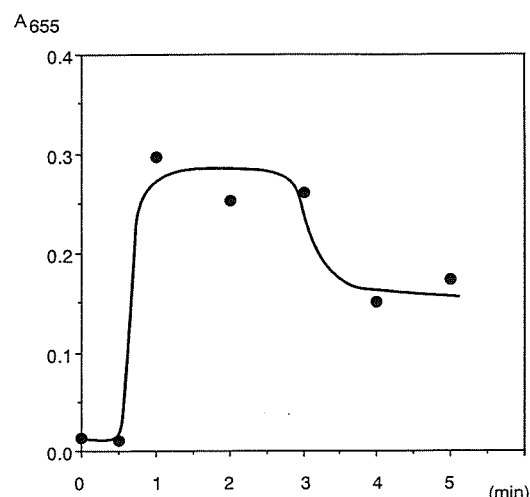
サンドイッチ ELISA を行うためには、抗体が2種類必要となるので、Cry j 1 の保存領域 N 末端配列を抗原決定基にする抗体（マウスモノクローナル抗体）を固相化抗体、Cry j 1 の内部配列を抗原決定基にする抗体（ウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体）を検出抗体として、サンドイッチ ELISA ができないか検討した。動物種の免疫グロブリン抗体は一般的にそれぞれ種特異的である。そこで、ウサギ免疫グロブリン抗体に特異的に反応するヤギの免疫グロブリン抗体、あるいはマウス免疫グロブリン抗体に特異的に反応するウサギの免疫グロブリン抗体などが世界中で広く ELISA に使われている。サンドイッチ ELISA では Cry j 1 に反応する検出抗体によって Cry j 1 量を定量することになるが、固相、検出に用いる抗体が同一動物種の場合、固相、検出抗体の両者を測定することになり、Cry j 1 を定量できない。そこで、同一動物種の抗体でサンドイッチ ELISA を行う従来法では、検出に用いる抗体をビオチンで標識する作業が必要であった。しかし、本研究のように異種動

物の抗体を組み合わせた場合（固相に用いる抗体がマウス、検出に用いる抗体がウサギ）、広く普及している種特異的な抗体に結合する抗体（発色酵素標識済み）が利用できるので、検出に用いる抗体のビオチン標識作業が不要となり、Cry j 1 定量作業の簡素化につながる。

Cry j 1 の N 末端のアミノ酸配列を認識するマウスモノクローナル抗体の特性については、すでに報告されている。しかし、検出に用いるウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体については、報告事例がないのでの反応特性を調べてみた。予備試験として Cry j 1 を含む花粉抽出液を固相化し、ウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体によって ELISA を行ったが、ほとんど検出されなかった。澤谷らは、アミノ酸配列を認識するマウスモノクローナル抗体で Cry j 1 を検出する場合、Cry j 1 を熱変性させると反応性が20%向上したと報告している（20）。そこで、抽出液の加熱処理温度とウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体との反応性を調べてみた結果、36度と56度2分の処理では Cry j 1 と抗体の反応は著しく低いものの、80度と100度2分では反応が認められ、Cry j 1 が検出されるようになった（図－2）。

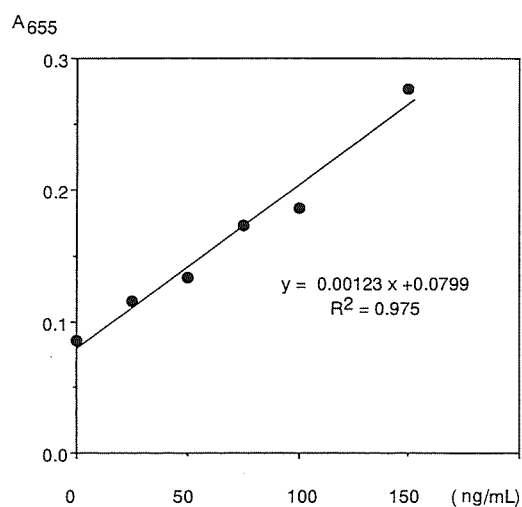


図－2 加熱処理温度による抗体の反応性

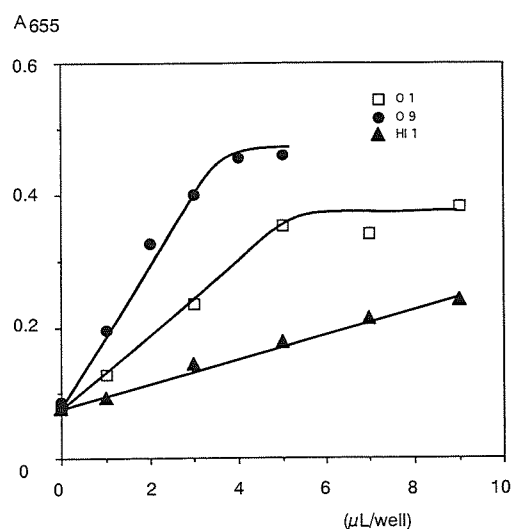


図－3 加熱時間による抗体の反応性

つぎに抽出液中の Cry j 1 とウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体との反応が加温時間によってどのように変化するか調べた。30秒の加温では、抽出液の Cry j 1 とウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体との反応性は著しく低い、1－3分の加温で Cry j 1 が検出された（図－3）。なお、4－5分の加温は、1－3分の加温より検出力がわずかに低くなる傾向が認められた。この理由は Cry j 1 の抗原決定基は非変性状態では立体構造の内部に存在するものの、熱変性によって外部に露出してウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体と反応し、加温時間が長くなると抗原決定基が変性し過ぎて抗体と反応しにくくなったと考えられる。



図ー 4 サンドイッチ ELISA の検出感度



図ー 5 サンドイッチ ELISA に必要な花粉抽出液量

そこで、マウスモノクローナル抗体を固相化し、ウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体で精製 Cry j 1 をサンドイッチ ELISA した場合の検出範囲を調べた結果、150ng/mL の Cry j 1 まで可能だった (図ー 4)。つぎに Cry j 1 を定量するこのサンドイッチ ELISA にどの程度の花粉抽出液を用いたらよいのか検討した。代表的な 3 系統 (雄勝 1 号, 雄勝 9 号, 平鹿 1 号) において花粉抽出液量 1 – 4 $\mu\text{L}/\text{well}$ の範囲において直線性が認められ、スギ花粉中の Cry j 1 含量を測定できることがわかった (図ー 5)。したがって、従来、Cry j 1 の ELISA では 2 とおりの測定が必要だったものが、1 回の定量で済む高精度な測定系を開発することができた。

2) ELISA の簡便化

免疫測定用のマイクロプレートは、ウェル表面にさまざまな物質を吸着できるので、直接、抽出液をマイクロプレートに吸着させ、Cry j 1 を 1 種の抗体で定量できないか調べた。まず、精製 Cry j 1 を用いて検出感度を調べた。その結果、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Cry j 1 まで比色定量による直線性が認められた (図ー 6)。また、簡便法によって Cry j 1 を定量する場合、どの系統もほぼ同様な傾向を示し、8 – 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ の花粉抽出液を用いると Cry j 1 含量を測定できることがわかった (図ー 7)。なお、反復試験を行った結果、変動係数は 9.7% と一般的な ELISA の範囲内 (10% 前後) だった。これらの結果から、Cry j 1 を定量する ELISA の簡便化を図ることができた。

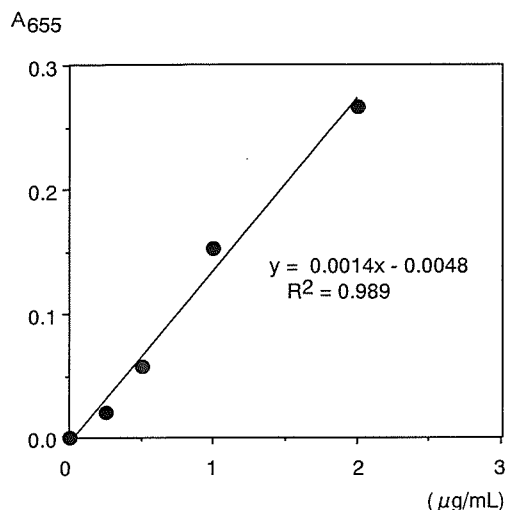


図-6 簡便法 ELISA の検出感度

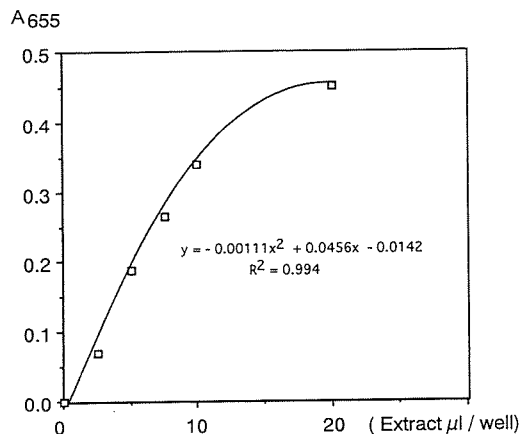


図-7 簡便法 ELISA に必要な花粉抽出液量

図-2, 3で明らかなように, 抽出液中のCry j 1はマイクロプレートに吸着されるものの, 抽出液にはCry j 1以外のタンパク質や多糖類も含まれる。これらCry j 1以外の物質が多ければ, 定量精度に影響を与える可能性も考えられる。そこで, この簡便法 ELISA とサンドイッチ ELISA との相関について調べた結果, 決定係数が1%水準で有意だったので, 簡便法 ELISA がCry j 1の定量に有効とわかった(図-8)。

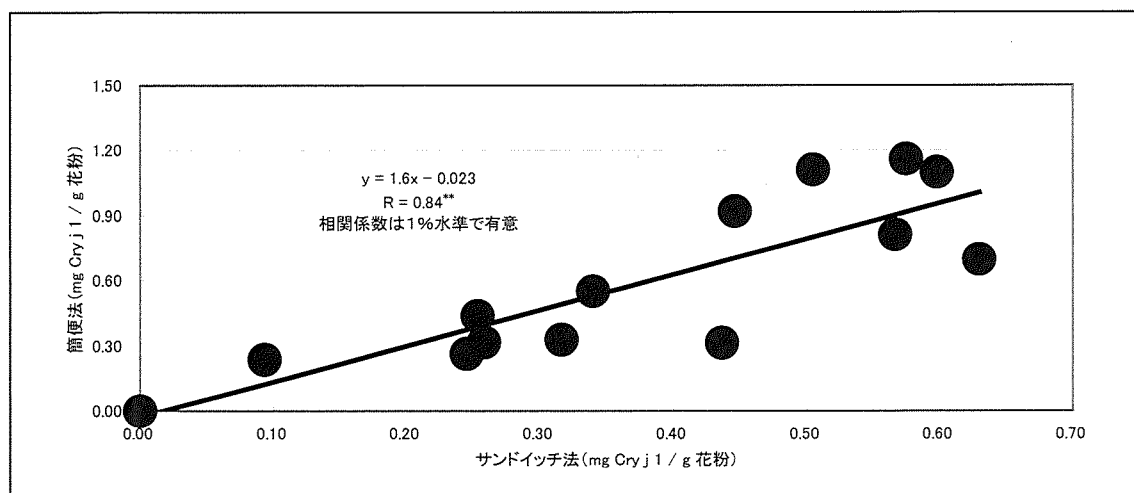
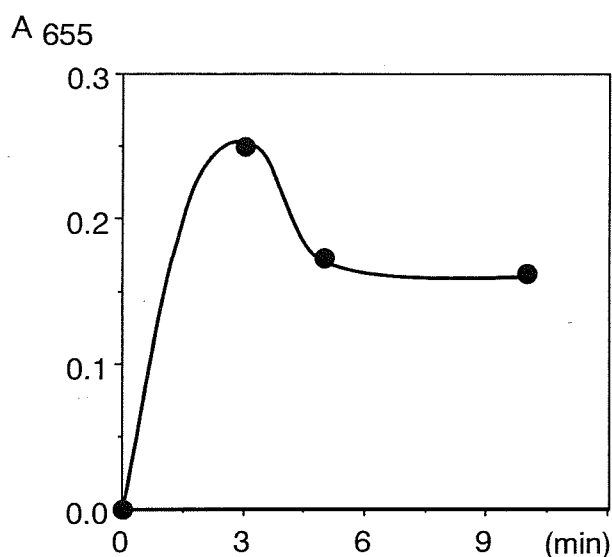


図-8 簡便法とサンドイッチ ELISA 法によるCry j 1量の相関

なお, 全体的にこの簡便法 ELISA では, サンドイッチ ELISA と比較してCry j 1含量が高めに測定された。この理由としてはサンドイッチ ELISA がCry j 1の2ヶ所に反応するのに対し, この簡便法 ELISA はCry j 1の1ヶ所のための反応であるから, サンドイッチ ELISA と比較すれば非特異的吸着が生じて精度が低下したためと考えられる。



図－9 マイクロプレート加熱時間による抗体の反応性

3) ELISA の迅速化

一般的に化学反応は温度が低い条件よりも高い条件で反応が早く進むので、抽出液をエッペンドルフチューブに分注して加温するかわりに抽出液を直接マイクロプレートに分注して加温し、同時にマイクロプレート上に Cry j 1 を吸着できないか調べた。その結果、80℃ 3 分の加温処理で Cry j 1 を吸着させることができ、作業行程の簡素化と同時に Cry j 1 の抽出から定量までに 3 日要したものが、この手法だとわずか半日で済むようになり、測定に要する時間が短縮化した（図－9）。反復試験を行った結果、変動係数は13.7%と一般的な ELISA の範囲内（10%前後）だった。今後、抽出液の調整が簡素化されれば多試料の解析が可能となり、より実用的な測定法になると考えられる。

V. おわりに

関東地方のスギ158系統の Cry j 1 含量の平均は0.54mg/g花粉（10）、また、関東以外の地域、東北、関西、九州の育種基本区における Cry j 1 含量の平均はそれぞれ0.44, 0.52, 0.34mg/g花粉と報告されている（12）。このサンドイッチ ELISA ではすべての Cry j 1 量を定量されてはいないものの、今回調べた秋田県のスギ精英樹11系統の中では、スギ花粉中の Cry j 1 含量の最も高い系統でも0.63 mg/g花粉であり、関東地方におけるスギ精英樹花粉の Cry j 1 含量の平均とほぼ同様であった。秋田県のスギは全国のスギと比較して Cry j 1 含量が少ないのか多いのか、今後、さらに他の精英樹についてスギ花粉中の Cry j 1 含量を定量して調べたい。また、秋田県内ではスギ精英樹の交雑実生苗を造林用種苗としてので、これら交雑実生苗について Cry j 1 含量がどのような分布になるか調べることも今後の重要課題である。

謝 辞

本研究の推進には新潟医療福祉大学の堀田康雄教授から有益な助言を賜りました。ここに厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- (1) 斎藤洋三, 井手 武: 花粉症の科学. 化学同人, 京都. (1994)
- (2) Muranaka, M., Suzuki, S., Koizumi, K., Takafuji, S., Miyamoto, T., Ikemori, R., and Tokiwa, H. Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates. 77: 616~623 (1986)
- (3) Strachman, DP: Hay fever, hygiene and household size. BMJ 229: 1259-1260 (1989)
- (4) 横山敏孝. 金指達郎: 花粉発生源としてのスギ林面積の推移: 村中正治 谷口 克偏 IgE 抗体産生と環境因子. 日本アクセル・シュプリンガー (1990)
- (5) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T. and Shida, T.: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77-86 (1983)
- (6) Sakaguchi, M., Inoue, S., Tanai, M., Ando, S., Usui, M. and Matsuhashi, T.: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. Allergy 45: 309-312 (1990)
- (7) 佐々木義則, 谷口美文, 正山征洋: スギ倍数体花粉のアレルゲン分析. 大分県研究時報 22: 8~12 (1996)
- (8) 斉藤真己, 寺西秀豊: マイクロプレートリーダーを用いた簡便なスギ花粉アレルゲン Cry j 1 の定量法の確立. 日林誌 81: 318~324 (1999)
- (9) 清藤城宏, 神保智一, 野村光男, 松野 智, 山本静雄: スギ精英樹花粉における Cry j 1 含量の変動. 山梨県森林総合研究所研究報告 20: 1-5 (1999)
- (10) 後藤陽子, 近藤禎二, 安枝 浩: 関東地方周辺のスギ精英樹花粉における Cry j 1 含量の変異. 花粉学会誌 45: 149-152 (1999)
- (11) 後藤陽子, 近藤禎二, 安枝 浩: スギ精英樹における花粉中のアレルゲン含量のクローン間変異. 林木の育種「特別号」: 19-20 (2001)
- (12) 後藤陽子, 近藤禎二, 井手 武, 山本恵三, 稲岡 心, 安枝 浩: Cry j 1 アイソフォームの cDNA シーケンスとモノクローナル抗体との反応性. 第113回 日林学術講: 330 (2002)
- (13) 高橋裕一, 安部悦子, 三浦直美, 荒木龍平, 安枝 浩, 阪口雅弘: 42年生スギにおける花粉中の Cry j 1 量の年較差および Cry j 1 定量法の検討. 花粉誌 48: 103~107 (2002)
- (14) Sone, T., Komiyama N., Shimizu, K., Kusakabe T., Morikubo, K., and Kino K.: Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I , a major allergen of Japanese cedar pollen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 619-625 (1994).
- (15) 稲葉常良, 鈴木幸吉, 星子 繁: スギ花粉抗原およびそれをコードする遺伝子. 特開平6-197768

(1994)

- (16) Namba, M., Kurose, M., Torigoe, K., Fukuda, S. and Kurimoto, M.: Molecular cloning of the major allergen Cry j I of japanese cedar Pollen. NCBI Accession No. D34639 (1994).
- (17) Futamura N., and Shinohara K.: Isolation and characterization of cDNAs encoding major allergen Cry j 1 from *Cryptomeria japonica* pollen. NCBI Accession No. AB081309 (2002a).
- (18) Futamura N., and Shinohara K.: Isolation and characterization of cDNAs encoding major allergen Cry j 1 from *Cryptomeria japonica* pollen. NCBI Accession No. AB081310 (2002b).
- (19) Wang Y., Mukai Y., Fukui M., Futamura N., Nagao A. and Shinohara K.: Pollen specific expression of the gene for an allergen, Cry j 1, in *Cryptomeria japonica*. J.For.Res.(3) 131-134 (1998)
- (20) 澤谷真奈美, 安枝 浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 臼井美津子, 安藤駿作, 栗本雅司, 松橋 直: スギ花粉アレルゲン Cry j II の免疫学的、物理科学的性質. アレルギー 42: 738~747 (1993)

研 究 報 告（第14号）

平成17年3月発行

編 集 編集委員長 高橋 正治
編 集 委 員 近藤吉久，三浦義之，伊藤精二
発 行 秋田県秋田市河辺戸島字井戸尻台47-2
秋 田 県 森 林 技 術 セ ン タ ー
郵便番号 019-2611
T E L 018-882-4511
F A X 018-882-4443
U R L <http://www.pref.akita.jp/morigi/index.htm>
e-mail : forest-c@pref.akita.lg.jp
印 刷 株式会社 三 戸 印 刷 所



古紙配合率100%再生紙を使用しています

BULLETIN
of
THE AKITA PREFECTURE FOREST TECHNOLOGY CENTER

No.14 2005. 3

Development of Japanese Cedar Pollenosis Major
Allergen Cry j 1 Quantification Yoh Sasaki 1 ~ 10