

(原著論文)

ツバキ花粉アレルゲンはエノラーゼである

田中 恒平・中村 紀雄*

横浜市立大学大学院総合科学研究科 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2
(2009年9月28日 受付, 2009年12月4日 受理)

An allergen enolase is isolated from camellia pollen

Kouhei TANAKA and Norio NAKAMURA

Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan.

Among proteins separated from an extract of *Camellia japonica* pollen by 2D-PAGE, three proteins, Cj 57, Cj 53 and Cj 50 with molecular weights of 57, 53 and 50 kDa respectively, were detected as allergens by Western blotting using serum from a patient with camellia pollinosis. Moreover, the protein Cj 50 was identified as an enolase by mass spectrometry, and the amino acid sequence deduced by cloning of the Cj 50 gene confirmed that the protein is an enolase. Furthermore, the protein partially purified by column chromatography was found to have enolase activity.

An antibody raised against Cj 50 recognized Cj 53 as well as Cj 50. Cj 53 may be an isoform of Cj 50 because it always was detected in the enolase fraction with Cj 50. These proteins were detected in the extracts of pollen grain, flower and leaf by Western blotting using the antibody, but Cj 53 was detected only in the pollen grain.

Immuno-electron microscopy detected the labels of the antibody in the cytosol and generative cell nucleus of pollen, and in the cell nucleus of leaf cells. The immuno-labeling in the nucleus suggests that Cj 50 and/or Cj 53 have another physiological function besides enolase activity.

Key Words: *Camellia japonica*, camellia pollinosis, enolase, pollen allergen,

緒 言

花粉アレルゲンが同定され、それらの性質が調べられている。アレルゲン蛋白質は花粉症との関連で注目されるが、それらは本来花粉において何らかの生理的機能をもっていると考えられる。スギ花粉アレルゲンの Cry j 1 はペクトリナーゼ活性をもち⁽¹⁾、花粉発芽との関係が推測されている⁽²⁾。オリーブの Ole e 1 はトマト花粉の特異的蛋白質である LAT 52 と相同性がみられ^(3,4)、この蛋白質を欠いた花粉は正常に発芽せず、Ole e 1 も発芽に関わるのではないかと考えられている⁽⁴⁾。また Ole e 9 は β -1,3-グルカナーゼであり⁽⁵⁾、ホソムギの Lol p 1 とトウモロコシの Zea m 1 はエクспанシン様活性をもち、雌ずいの細胞壁との関係が考えられている⁽⁶⁾。アブラナの Bra r 1 は Ca^{2+}

結合蛋白質で、花粉管伸長への関与が推測されている⁽⁷⁾。オオアワガエリの Phl p Vb⁽⁸⁾ とカバノキの Bet v 1⁽⁹⁾ は RNA 分解活性をもち、花粉の抗菌性に関わっていることが推測されている。このように幾つかの種の花粉アレルゲンは、花粉の発芽・管伸長、受精などに関わって機能していることが考えられている。

我々は前報⁽¹⁰⁾において3種類のツバキ花粉アレルゲンを同定した。本研究では、それらがツバキ花粉においてどのような生理的働きをもっているのかを推測するため、アレルゲンのアミノ酸配列の解析とクローニングを行った。またさらにアレルゲンに対する抗体を作製し、免疫電子顕微鏡法によりアレルゲンの細胞内分布を調べたので、その結果について報告する。

* E-mail: nakanori@cosmos.ocn.ne.jp

材料と方法

1. 材料と花粉の培養

開花直前のツバキ (*Camellia japonica*) の花から葯を集め、30℃で開葯させたのち、篩を通して花粉のみを集めた。集めた花粉はシリカゲルと共に使用時まで-20℃で保存した。葉と花は花粉を採取した木と同じ個体から使用直前に採取した。

ツバキ花粉を0.1M ショ糖-1.5%寒天培地に散布し、25℃で培養した。

2. 蛋白質の抽出

蛋白質の抽出の操作は4℃で行った。花粉をpH 7.5の20mM Tris 緩衝液に懸濁し、ポッター型ホモジナイザー管を用いて破碎し、破碎した液を10000×gで20分間遠心分離した。上清をさらに80000×gで1時間遠心分離した。得られた上清に冷アセトンを終濃度が75%になるように加え、懸濁させ、2時間放置した。蛋白質が析出してきた液を10000×gで10分間遠心分離した。上清を捨てたのち、冷アセトンを加え、ペスルを用いて沈殿を破碎し、再度10000×gで10分間遠心分離した。上清を捨て、風乾させて得られた沈殿を成熟花粉の80000×g上清蛋白質とした。

葯(45mmの蕾から採取)、花卉、葉の蛋白質については、これら組織を乳鉢に入れ、液体窒素中で乳棒を用いて破碎した。粉状になった組織片をエッペンドルフチューブに移し、0.07% 2-メルカプトエタノールと10% TCAを含む冷セトンを加えてさらに破碎した。破碎液を遠心分離し、得られた沈殿をアセトンで洗った後、風乾させた。各組織の沈殿を125mM Tris 緩衝液(pH 6.8)-5% 2-メルカプトエタノール-2.5% SDS-10% グリセロール液に懸濁し、ペスルを用いてさらに破碎した。それぞれの組織破碎液を遠心分離し、得られた上清を電気泳動用試料とした。

3. 蛋白質濃度の測定

蛋白質濃度はBradford法⁽¹¹⁾により測定した。

4. 花粉蛋白質の二次元電気泳動(2D-PAGE)

2D-PAGEはO'Farrellの方法⁽¹²⁾に従って行った。精製した蛋白質(80000×g上清蛋白)を9.5M 尿素-2% Triton X-100-2% Biolyte 3/10-5% 2-メルカプトエタノール-5% PVP-40液に懸濁し、ペスルですりつぶした。蛋白質液を室温で1時間放置した後、10000×gで10分間遠心分離し、上清を使用した。一次元目の等電点電気泳動はチューブゲル電気泳動装置を使用して行った。両性担体はBiolyte 3/10とBiolyte 5/8を使用し、その割合は1:2とした。また電極液

には100mM リン酸と100mM NaOHを使用した。二次元目のSDS-PAGEはLaemmliの方法⁽¹³⁾に従って行い、スラブ電気泳動装置を使用し、10%アクリルアミドゲルで蛋白質を分離した。泳動後、ゲルを30%メタノール-10%酢酸液に浸して蛋白質を固定した後、CBB染色を行った。蛋白質の分子量は分子量マーカー(Bio-Rad社)を用いて算出した。

5. 花粉アレルゲンCj50とCj53の質量分析

HellmanらのIn gel Digestion法⁽¹⁴⁾に従って質量分析の試料を調製した。操作は全てエッペンドルフチューブを使って行った。CBB染色で十分染まったCj50とCj53のスポットを2D-PAGEゲルから切り出し、チューブに入れ、ゲルに60%アセトニトリルを加えて洗浄した。そして液を100%アセトニトリルに置換し、ゲルを十分乾燥させた。そして、ゲルに12.5ng トリプシン/ μ l-100mM NH_4HCO_3 溶液あるいは1ng リジルエンドペプチダーゼ/ μ l-100mM Tris 緩衝液(pH 9.0)を加え、4℃でゲルを膨潤させた。その後、ゲルに吸収されなかった過剰な酵素液を取り除き、トリプシンの場合には NH_4HCO_3 溶液を、リジルエンドペプチダーゼの場合にはTris 緩衝液を適量加え、37℃で一晩消化させた。ペプチドの溶出した液をC18カラムで脱塩し、Q-TOF micro (Micromass社)で分析した。得られたデータはMasslynx ver. 4.0を用いて解析した。またデータベースのエノラーゼやクローニングしたCj50をトリプシン処理した場合に得られるペプチドの質量とアミノ酸配列はMS-digest (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msdigest.htm>)を用いて推測した。

6. Cj50 遺伝子のクローニング

全RNA抽出はShirzadeganらの方法⁽¹⁵⁾に従って以下のように行った。液体窒素で凍結させた花粉を破碎し、2-3倍量の全RNA抽出液(pH 8.0の100mM Tris 緩衝液、10mM EDTA、100mM LiCl、1% SDS)に懸濁した。この懸濁液をフェノール-クロロホルム処理した後、1/3量の10M LiCl溶液を加え、-20℃で1時間以上静置した。これを遠心分離して得た沈殿を2M LiCl-50mM EDTA液に懸濁し、再度遠心分離してRNAの粗沈殿を得た。沈殿を1mM EDTAを含むpH 8.0の10mM Tris 緩衝液に溶かし、溶解した粗RNA溶液をフェノール-クロロホルム処理し、エタノール沈殿後に得た沈殿物を滅菌水に溶解し、RNA試料とした。得られたRNAは70℃で熱変性させた後、RNase 阻害剤存在下で逆転写反応を行った。逆転写反応は42℃×50分、70℃×15分で行った。逆転写して得たcDNAからCj50のcDNAを得るため、縮重プラ

イマー A (GGN AAY CCN ACV GTB GAG) と縮重プライマー B (GGN GAT GAY YTN TTR GTY AC) を用いて PCR を行った。PCR は $94^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒, $52^{\circ}\text{C} \times 1$ 分, $72^{\circ}\text{C} \times 2$ 分で 35 サイクル行った。次に Cj50 遺伝子に特異的な塩基配列 (TAATGGTTCACAAAAGATCTCAG G) を用いて 3'-RACE を行った。PCR 産物は TA クローニングキット (Invitrogen 社) を用いて pCR II ベクターに組み込み, DNA シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems 社) で塩基配列を読んだ。塩基配列は GENETYX ソフトウェア (Software Development 社) を用いて解析した。塩基配列から推測されたアミノ酸配列は BLAST, FASTA を使った DDBJ 相同性検索システム (<http://www.ddbj.nlg.ac.jp/>) を利用して解析した。

7. Cj50 の精製

Cj50 の精製は, ラテックスアレルギーのアレルゲンの精製方法⁽¹⁶⁾ に準じて行い, 全ての操作を 4°C で行った。

花粉 1.0g から 20mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) を用いて抽出液 ($10000 \times g$ で 20 分間遠心分離) を調製し, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (硫酸) 沈殿分画を行った。硫酸飽和濃度 0–45%, 45–60%, 60–75%, 75–100% の沈殿画分それぞれについて, ツバキ花粉症患者血清を用いてウェスタンブロットを行い, またエノラーゼ活性の測定を行った。次に, 血清と反応した 45–60% の硫酸画分の全量を Sephadex G-75 カラム ($\phi 1.6 \times h 120\text{cm}$, 分画 3ml) にかけて, 緩衝液で溶出, 分画した。それぞれの画分について, 血清を用いてウェスタンブロットを行い, またエノラーゼ活性の測定を行った。さらに, ゲルろ過の画分のうち血清と反応し, また最もエノラーゼ活性が高かった画分の活性の半分以上の活性を持つ画分を集めて, その液を DEAE-セルロースカラム ($\phi 1.2 \times h 10\text{cm}$, 分画 2ml) にかけた。溶出は 0.3M NaCl を含む緩衝液で行った。そしてそれぞれの画分について, 血清を用いてウェスタンブロットを行い, またエノラーゼ活性の測定を行った。

8. 酵素活性の測定

エノラーゼ活性は Westhead と McClain の方法⁽¹⁷⁾ に準じて測定した。蛋白質 $1\mu\text{g}$ を含む蛋白質液を反応液 (pH 7.5 の 67mM リン酸緩衝液, 1mM MgSO_4 , 2mM 2-ホスホグリセリン酸; 総量 1mL) に加え, 30°C で反応させ, 240nm の吸光度変化に基づき, 生成したホスホエノールピルビン酸量を測定した。酵素活性の値は, 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の基質を生成物に変化させる酵素量を 1 ユニットとして測定し, 国際単位系のカタール (kat) に変換して表示した。

9. 抗 Cj50 抗体の作製

CBB 染色した 2D-PAGE ゲルから Cj50 のスポットを切り出し, ゲルから蛋白質を抽出した。得られた Cj50 蛋白質溶液を 4 週令の Balb/c 雌マウスに腹腔注射した。1 回目は蛋白質溶液をフロイント完全アジュバントと混ぜ, 以後は不完全アジュバントと混ぜ, 10 日おきに計 4 回免疫した。抗体価はウェスタンブロットで確かめ, 心臓より全血採取し, その血清を抗 Cj50 抗体として使用した。

10. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットを行うため, 2D-PAGE あるいは SDS-PAGE によって分離した蛋白質をブロッティング装置を用いて, ゲルから NC 膜あるいは PVDF 膜へ転写した。膜を蒸留水で 5 分間洗浄したのち, ponceau S で染色し, 蛋白質のスポットを確認した。膜を 0.1% Tween-20 を含む PBS 液 (PBS-T) ($8.1\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1.5\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, 140mM NaCl , 2.7mM KCl) に浸し 3 回洗浄・脱色した後, 1% BSA を含む PBS-T に浸して 4°C で一晩振とうし, ブロッキングを行った。

A. ヒト血清を用いたウェスタンブロット

0.1% BSA を含む 0.9% NaCl 液で 4 倍に希釈したヒト血清に PBS-T で洗浄した膜をかぶせ, 25°C で 3 時間反応させた。膜を PBS-T で 3 回洗浄した。PBS-T で 2000 倍に希釈したヤギ由来ペルオキシダーゼ-抗ヒト IgE 液に膜をかぶせ, 30°C で 1 時間反応させた。膜を洗浄した後, ECL 反応液 (Amersham Biosciences 社) に浸して発光させ, X 線フィルム (RX-U, フジフィルム社) に感光させ抗体反応を検出した。

B. 抗 Cj50 抗体を用いたウェスタンブロット

10mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) – 150mM NaCl – 0.1% BSA 液で適宜希釈した抗 Cj50 抗体液に膜をかぶせ, 室温で 2 時間反応させた。膜を洗浄後, 2000 倍に希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体 (ウマ由来) と反応させた。次に PBS-T で洗浄し, 5000 倍希釈したセイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ結合アビジンと反応させた。検出は上記の通りに行った。

11. 抗 Cj50 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察

試料を 4% パラフォルムアルデヒド–0.5% グルタルアルデヒド–50mM カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) に浸し, マイクロウェーブ処理⁽¹⁸⁾ と脱気処理を行い, さらに一晩振とう固定した。試料をカコジル酸緩衝液で洗浄した後, 0.1% OsO_4 –1.5% $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 液に浸し, 1 時間振とう固定した。固定された試料を緩衝液で一晩振とうした後, エタノール系列で脱水し, LR-White 樹脂 (London Resin 社) に包埋した。作製

した超薄切片を Ni 製グリッドにのせ、一晚乾燥させた。

免疫染色は次のように行った。試料切片が載ったグリッドを TBS[®] (pH 7.2 の 50mM Tris 緩衝液, 150mM NaCl) で 30 倍に希釈した正常ヤギ血清液中に浸し、30 分間、室温でブロッキング処理をした。その後、TBS で 2000 倍希釈した抗 Cj50 抗体と 4℃ で一晚反応させた。50mM Tris 緩衝液 (pH 7.2) - 150mM NaCl - 0.2% BSA 液で洗浄した後、100 倍に希釈した 10nm 金コロイド標識ヤギ由来抗マウス IgG 液 (フナコシ社) と室温で 1 時間反応させた。試料を洗浄し、電子染色⁽¹⁹⁾を行った。さらに一晚乾燥させた試料を JEM 1200EX 透過型電子顕微鏡によって観察した。

〈略語〉

上述した略語の他に、以下の略語を使用した。

BSA: 牛血清アルブミン, CBB: クマシーブリリアントブルー R-250, EDTA: エチレンジアミン四酢酸, NC: ニトロセルロース, PCR: ポリメラーゼ連鎖反応, PVDF: ポリビニルデンジフторド, PVP-40: ポリビニルピロリドン-40, SDS-PAGE: ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, TCA: トリクロロ酢酸, Tris: 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール。

結 果

1. ツバキ花粉アレレルゲン Cj50 のアミノ酸配列解析

ツバキ花粉抽出液を 2D-PAGE で分離して検出された蛋白質とツバキ花粉症患者血清を反応させたところ、分子量 57, 53, 50 kDa の蛋白質スポットが反応を示した (Fig. 1)。そこで、この研究ではまず、50 kDa の蛋白質 (Cj50) に注目した。単離、抽出した Cj50 をトリプシン消化し、質量分析を行ったところ、Table 1 に示す質量とアミノ酸配列を持つペプチドが得られた。これらのペプチドについて FASTA プログラムを用いた相同性検索を行ったところ、複数のペプチドが植物・動物・酵母などのエノラーゼと相同性を示し、とくにパラゴムノキやシロイヌナズナのエノラーゼに高い相同性を示した。Cj50 の N 末端アミノ酸配列解析も行ったが、配列を読むことはできなかった。

2. Cj50 遺伝子のクローニング

質量分析で得られた Cj50 のアミノ酸配列に基づいて作製したプライマーを用いて、部分的な Cj50 遺伝子をクローニングした。全長の Cj50 遺伝子を得るには至らなかったが、428 アミノ酸を明らかにした。そして Cj50 塩基配列から推測されるアミノ酸配列は質

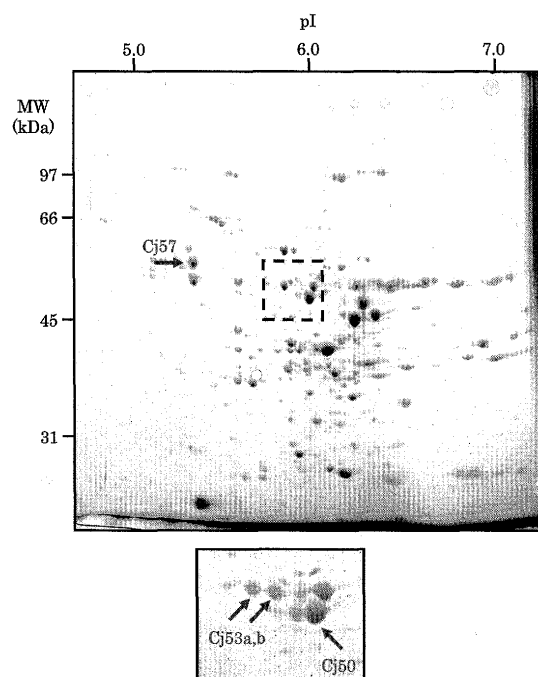


Fig. 1. 2D-PAGE of the extract from camellia pollen.

The extract from the mature quiescent pollen grains of *Camellia japonica* was subjected to 2D-PAGE. The spots of Cj 57, Cj 53(a, b) and Cj 50 proteins (arrows) were reacted with serum from a patient with camellia pollinosis. The proteins in the inset (dashed line) were concentrated and then developed once more by 2D-PAGE (lower figure).

Table 1. Amino acid sequences of the fragments of camellia pollen allergen Cj 50.

Molecular weights and amino acid sequences of the fragments revealed by mass spectrometry (upper lines) were compared with those of Hev b 9 which is an enolase in *Hevea brasiliensis*, and its sequence had the highest homology to that of Cj 50, and with that of an enolase in *Arabidopsis thaliana* (asterisk).

No	Mass	Amino acid sequence
1	1525.14	IQIVGDDLLVTL
	1509.73	VQIVGDDLLVTNPK
2	1572.90	VNQIGSVLVSIFAVK
	1572.84	VNQIGSVTESIEAVK
3	1679.86	PVPAPFNVIDLLVNL
	2118.38	NLVLPVPAPFNVIDGSHAGNK
4	1716.00	KLQVEVDISLLFL
	1681.75	* GNPTVEVDIHTSNGIK
5	2251.32	RLFSDETEIAPLSVGLLFSRI
	2251.13	SGTETEDTFIADLSVGLATGQIK
6	3015.61	SFVSEYLLALLLEFFDSPFAYAFIT
	2944.20	SFVAEYPIVSIEDPFDQDDWAHYAK

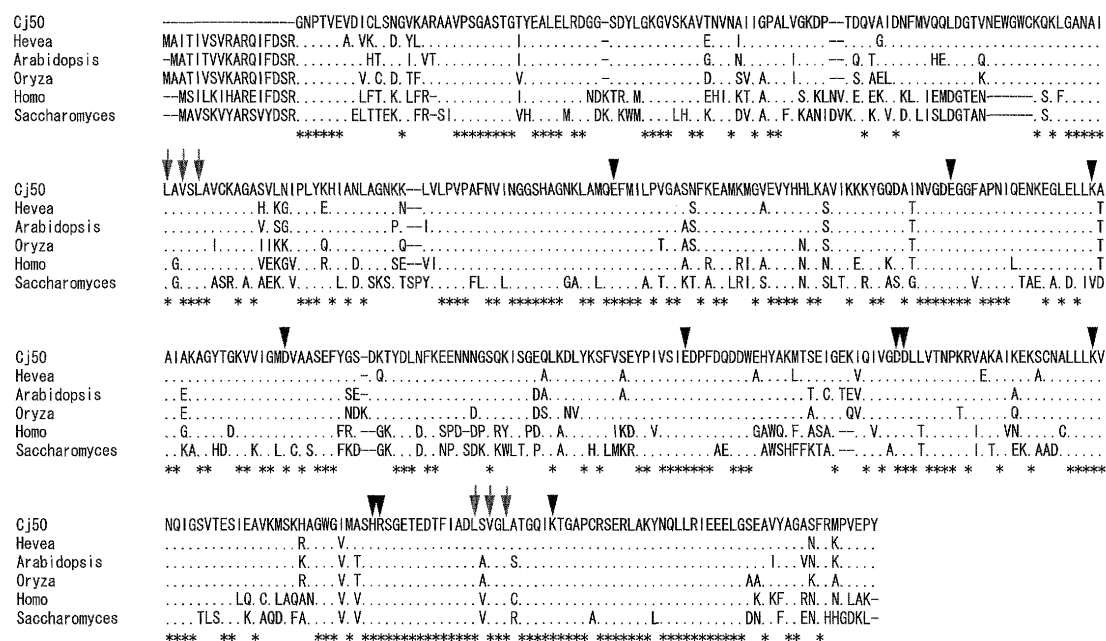


Fig. 2. Homology of amino acid sequences between Cj 50 and enolases from various species.

The amino acid sequence of Cj 50 was compared with those of *Hevea brasiliensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Cj 50 had the highest homology (92%) to *H. brasiliensis* and conserved all the amino acids needed for enolase activity (arrowheads), in addition to possessing two LXVXL motifs (arrows) related to transcriptional repression.

量分析の結果と同じように、植物・動物・酵母のエノラーゼに高い相同性を示した (Fig. 2). 最も相同性が高かったのはパラゴムノキのエノラーゼ Hev b 9 で 92% であり、多くの双子葉植物や単子葉植物のエノラーゼに対しても 80% 以上、ヒトとでは 69.5%, 酵母では 60.7% だった。とくに Mg^{2+} との結合部位などのエノラーゼ活性を示すのに必要なアミノ酸は全て保存されていることから^(20,21)、Cj50 はエノラーゼ活性をもつと推測される。

3. アレルゲンの精製とエノラーゼ活性

硫酸分画、ゲルろ過分画、陰イオン交換クロマトグラフィー (Fig. 3) を行い、Cj50 を部分精製した。Cj50 が含まれる陰イオン交換クロマトグラフィーの画分 14 のエノラーゼ活性は 80000 × g 上清液のそれに対して約 20 倍に精製された (Table 2)。また各精製段階において患者血清を用いたウェスタンブロットを行なってみると、最も強い活性分画に Cj50 と 53kDa の蛋白質 (Cj53) が共に含まれていることがわかった (Fig. 3)。またデータは示していないが、ツバキ花粉エノラーゼは活性を示すのに Mg^{2+} が必須であり、その活性は NaF によって阻害された。また最適 pH は 7.5、最適温度は 50°C であった。

4. Cj53 のアミノ酸配列解析

Cj50 の精製に際して、Cj53 は Cj50 と同じ分画に含まれていたため、Cj53 についてもトリプシン消化し、質量分析を行い、Table 3 に示すような質量とアミノ酸配列を持つペプチドが得られた。Cj53 のペプチドについて、FASTA プログラムを用いた相同性検索を行ったところ、6 個のペプチドが植物・動物・酵母などのエノラーゼと相同性を示した。質量が 1983.82 のペプチドだけはシロイヌナズナやパラゴムノキには相同性を示さず、イネやトウモロコシのエノラーゼ ENO2 にだけ相同性を示した。また Cj50 と Cj53 について質量分析装置で網羅的にペプチドの検出を試みたところ、それぞれ 58 個のペプチドを検出した (ほぼ同じ質量のペプチドが数個あった場合には 1 個と数え

Table 2. Partial purification of enolase in camellia pollen.

Purification step	Protein content (mg)	Enzyme activity (nkat/mg protein)	Purification (fold)
Extract (80000 × g supernatant)	170.28	24	1.0
Salting out with ammonium sulfate (45-60% saturation)	51.00	44	1.8
Gel filtration on Sephadex-G75	2.43	163	6.8
Anion exchange chromatography by DEAE-Cellulose	0.78	445	18.5

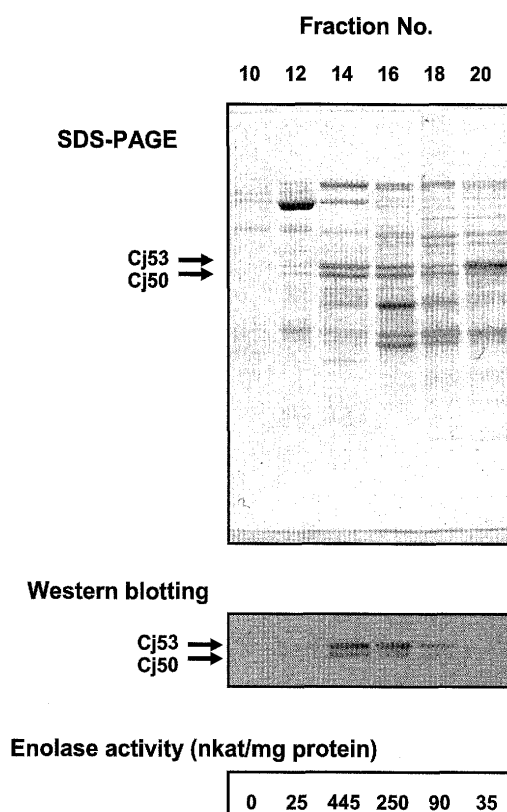


Fig. 3. Anion exchange chromatography of Cj 50 on DEAE-cellulose.

The fractions having high enolase activity on Sephadex G-75 gel filtration were subjected to DEAE-cellulose column chromatography. The fractions eluted with the buffer containing NaCl were collected and each fraction was analyzed by Western blotting and its enzyme activity determined.

た). Cj50 と Cj53 で質量が同じペプチドが 11 個得られたが, 異なるペプチドも 47 個検出された. 異なるペプチドは Cj50 と Cj53 で対応するペプチドが判明したものに関してそれぞれのペプチドの質量とアミノ酸配列を示した (Table 4). また Cj53 は 2D-PAGE では等電点の異なる 2 つのスポット a と b に分れるので (Fig. 1), それぞれについて質量分析を行ったが, 異なるペプチドは得られなかった.

5. 抗 Cj50 抗体を用いたウェスタンブロット解析

2D-PAGE で分離した Cj50 をマウスに免疫し, 抗 Cj50 抗体を作製した. 作製した抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ, この抗体は Cj50 だけでなく, Cj53 も認識した (Fig. 4). そこでこの抗体を用いて, ツバキの各組織におけるエノラーゼの検出を試みたところ, 抗 Cj50 抗体によって検出された 50 kDa のバンドは花粉以外にも葯, 葯を除いた花, 葉に

Table 3. Amino acid sequences of the fragments of camellia pollen allergen Cj 53.

The upper lines show the molecular weights and amino acid sequences of the fragments of Cj 53 obtained by mass spectrometry, and the lower lines show those of the corresponding fragments of Hev b 9, having high homology to Cj 53, and that of the corresponding fragment of the enolase (ENO2) from *Zea mays* (asterisk).

No	Mass	Amino acid sequence
1	1572.82	VNQIGSVTESIEAVK
	1572.84	VNQIGSVTESIEAVK
2	1983.82	GNPTVEADVFAACDDGTFVAVG
	1986.18	* GNPTVEVDVF - CSDGTFAR
3	3105.40	YGQDATNVGDEGGFAPNIQLLPNC . . .
	2324.35	YGQDATNVGDEGGFAPNIQENK
4	1826.86	IEEELGSEAVYAGASFR
	1856.01	IEEELGSEAVYAGANFR
5	2251.10	SGETEDTFIADLSHLLFDLQ
	2251.13	SGETEDTFIADLSVGLATGQIK
6	991.98	ARQIFDSR
	991.53	ARQIFDSR

Table 4. Comparison of mass and amino acid sequence between Cj 50 and Cj 53.

Cj 50 and Cj 53 were digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry. Common peptides in Cj 50 and Cj 53 were examined. Nos.1-11 shown in the table indicate the common peptides in Cj 50 and Cj 53 and in Nos.12-13, the upper lines represent the data for Cj 50 and the lower lines those for Cj 53. The data of Nos.1, 10, 12 (upper) and 12 (upper) were obtained by mass spectrometry, and the others were deduced from the data obtained by MD-digest analysis (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msdigest.htm>) of the amino acid sequence of the cloned Cj 50. ND: not determined.

No	Mass	Amino acid sequence
1	1023.59	LTIKSVHAR
2	1045.64	N.D.
3	1117.72	LAKYNQLLR
4	1152.63	N.D.
5	1281.67	DGGSDYLKGKGVSK
6	1292.76	ISGEQLKDLYK
7	1492.67	SERLAKYNQLLR
8	1791.08	AAVPSGASTGTYEALRL
9	1919.10	VNQIGSVTESIEAVKMSK
10	2251.19	SGETEDTFIADLSVGLATGQIK
11	3055.66	N.D.
12	3017.15	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWEHYAK
	2999.45	SFVAEYPIVSIEDPFDQDDWEHYAK
13	1943	GNPTVEVDICLSNGVKAR
	1983	GNPTVEADVFAACDDGTFVAVG

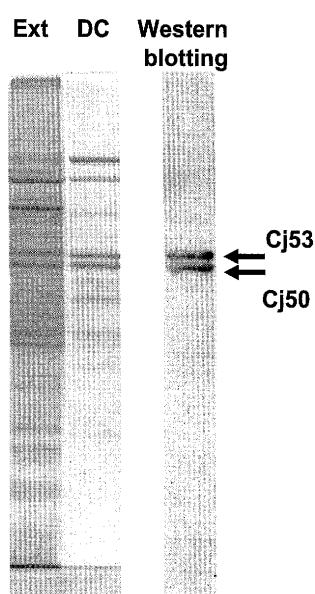


Fig. 4. Detection of Cj50 and Cj53 by Western blotting using anti-Cj50 antibody.

The extract from *C. japonica* pollen (Ext) and the most active enolase fraction (No. 14) obtained by DEAE-cellulose column chromatography (DC) were developed by SDS-PAGE. The active proteins in the enolase fraction (No. 14) developed by SDS-PAGE were detected by immunoblot. Ab: the antibody against Cj50 reactive with both Cj50 and Cj53.

も存在した。これに対して、53 kDa のバンドは花粉にのみ存在していた (Fig. 5)。

6. 抗 Cj50 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察

作製した抗 Cj50 抗体は Cj50 と Cj53 を認識したが、免疫電子顕微鏡観察で Cj50 と Cj53 それぞれの分布を区別して知ることはできないが、エノラーゼとしての分布を知ることはできる。そこでこの抗体を用いて、ツバキ花粉におけるエノラーゼの分布を調べた。成熟花粉及び発芽花粉において、金コロイド粒子のラベルは細胞質と核に広く分布しており、内壁にもわずかに見られたが、外壁には見られなかった (Fig. 6A-B)。またとくに雄原細胞の核 (Fig. 6B) に多くラベルが見られ、栄養核にもラベルがみられた (Fig. 6C)。また葉においても細胞質と核にラベルの分布が見られた (Fig. 6D)。

考 察

ツバキ花粉アレルゲンは少なくとも 3 種類存在し、その分子量は 63 kDa, 58 kDa, 55 kDa であることが報告⁽¹⁰⁾ されているが、その際使用した分子量マ

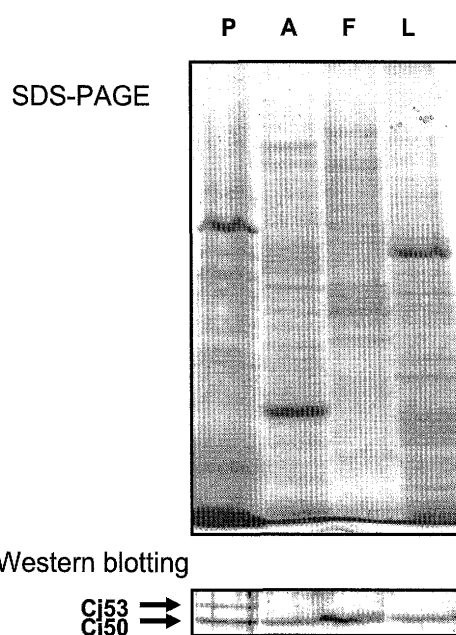


Fig. 5. Occurrence of Cj50 in different tissue of *C. japonica*

The proteins extracted from the pollen grain (P), anther from which pollen grains had been removed (A), flower from which anthers had been removed (F) and leaf (L) were subjected to SDS-PAGE and the separated proteins were examined with anti-Cj50 antibody. Cj50 was detected in all preparations and Cj53 was detected only in the pollen grain.

カーにその後問題があることが判明した。そこでこの研究でマーカーを変えて再度分子量の検討を行ったところ、3つのアレルゲンの分子量はそれぞれ 57kDa, 53kDa, 50kDa であることが判った (Fig. 1)。そして、質量分析によるアミノ酸配列解析 (Table 1, 3, 4)、遺伝子のクローニング (Fig. 2)、酵素活性測定 (Fig. 3, 4) から、Cj50 と Cj53 はエノラーゼであると考えられる。エノラーゼはこれまでも酵母のアレルギーやラテックスアレルギーのアレルゲンとして同定され、細胞質に局在する蛋白質で抗原性が高いと推測されており、ツバキ花粉症の場合も同じようなアレルゲンであろうと考えられる^(16, 22, 23)。

Cj50 と Cj53 については質量分析において質量が同じペプチドも多く得られたが、アミノ酸配列が異なるペプチドもあることから、その違いは修飾などの影響ではなく、これらは異なる遺伝子由来のアイソフォームであると考えられる (Table 4)。また、これまでに報告されているエノラーゼの最適 pH は 6.8~8.1 であり⁽²⁴⁾、ツバキ花粉のエノラーゼの最適 pH もこの範囲内に含まれていた。多くのエノラーゼは分子量の大きな二量体で働くと考えられている⁽²⁴⁾、Cj50 と Cj53 は 75kDa 以上の蛋白質を含むゲルろ過分画の際の Vo 画

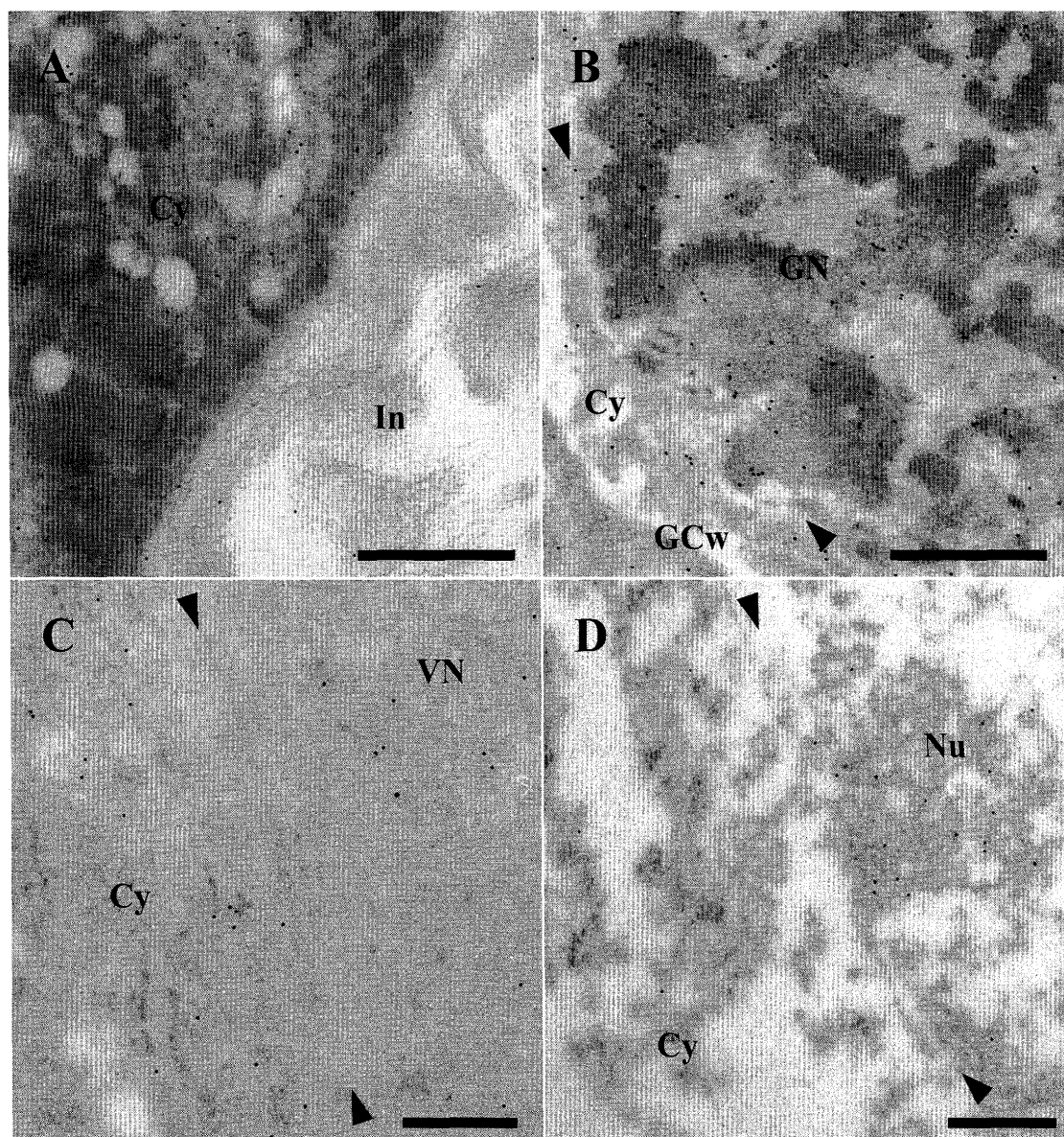


Fig. 6. Distribution of enolases in the germinating pollen and the leaf of *C. japonica*.

Immunolocalization of the enolases, Cj 50 and/or Cj 53, in the germinating pollen (A-C) and the leaf (D), was examined using the anti-Cj 50 antibody.

The enolase was also detected in the nucleus as well as the cytosol. Cy: cytosol, In: intine, GN: generative nucleus, GCw: generative cell wall, VN: vegetative nucleus, Nu: nucleus. Arrowheads show the position of the nuclear membrane.

分の SDS-PAGE には検出されなかった（データは示していない）。エノラーゼの二量体形成には Mg^{2+} が必須であるが、花粉の破碎やゲルろ過に用いた緩衝液に $MgSO_4$ などを加えても Vo 画分には Cj50 と Cj53 は検出されず、エノラーゼ活性も大変低かった。ツバキ花粉エノラーゼが単量体あるいは二量体で働いているのかについてはさらに検討が必要であるが、Cj50 と Cj53 は単量体として機能していることも考えられる。

作製した抗 Cj50 抗体はツバキ花粉の Cj50 だけでな

く Cj53 も認識したが（Fig. 4）、抗 Cj50 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、ツバキの葉や花の組織では 50kDa のバンドが検出され、53kDa のバンドは花粉のみに検出された（Fig. 5）。さらにデータは示していないがテッポウユリの花粉でも 53kDa のバンドが検出された。Cj50 と Cj53 の間には酵素の性質において違いがあり、花粉と葉や花など他の組織とそれぞれ独自に関係しているのかもしれない。性質が異なるエノラーゼが、発育時期や組織に応じて^(25, 26),

それぞれの細胞がおかれる環境に適した方のエノラーゼが発現していることが考えられている⁽²⁶⁾。

エノラーゼは解糖系の酵素であるために細胞質にのみ分布すると考えられ、それ以外の植物部位における分布についてはあまり調べられていない。そこで抗Cj50抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察によって、発芽したツバキ花粉におけるエノラーゼの分布を調べた。エノラーゼの局在を示すラベルは細胞質の他に核にも存在し、とくに雄原細胞の核のヘテロクロマチンに多くラベルが見られた (Fig. 6B)。エノラーゼは解糖系酵素ではあるが、他にも機能を持つことが報告されている⁽²⁷⁻³²⁾。原がん遺伝子の発現抑制に関わる蛋白質である myc 結合蛋白質 (MBP) は α -エノラーゼ遺伝子の蛋白質に翻訳される DNA の塩基配列中のメチオニンから翻訳されるが、核に存在することが報告されている⁽³⁰⁾。また MBP だけでなく α -エノラーゼにも myc 遺伝子のプロモーター領域との結合能があることが報告されている⁽³⁰⁾。エノラーゼが他の遺伝子のプロモーター領域と結合する現象は植物でもみられ、シロイヌナズナのエノラーゼ LOS2 は低温応答遺伝子の転写を抑制する *STZ/ZAT10* の発現を抑制することが報告されている⁽³¹⁾。また MBP と LOS2 が結合する塩基配列は同じではないが相同性があり、その配列との結合に必要とされる LXVXL モチーフ⁽³²⁾ は Cj50 にも存在した。このことは、ツバキ花粉の核に検出されたエノラーゼも何らかの遺伝子の転写調節に関わっていることを示唆しているのかもしれない。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、横浜市立大学木原生物研究所の平野久教授また横浜市立大学の最上則史博士には質量分析と遺伝子のクローニングにおいて大変お世話になりました。深く感謝の意を表します。

引用文献

- (1) Taniguchi, Y., A. Ono, M. Sawatani, M. Nanba, K. Kohno, M. Usui, M. Kurimoto and T. Matuhashi: Cry j 1, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* 50, 90-93 (1995).
- (2) 中村澄夫・佐藤文孝・中村紀雄: スギ花粉アレルゲン Cry j 1 と Cry j 2 の発芽花粉における局在性. 花粉誌 50, 15-22 (2004).
- (3) de Dios Alché, J., A. J. Castro, A. Olmedilla, M.C. Fernández, R. Rodriguez, M. Villalba and M.I. Rodriguez-Garcia: The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J. Cell Sci.* 112, 2501-2509 (1999).
- (4) Muschietti, J., L. Dircks, G. Vancanneyt and S. McCormick: LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.* 6, 321-338 (1994).
- (5) Huecas, S., M. Villalba and R. Rodríguez: Ole e 9, a major olive pollen allergen is 1,3- β -glucanase; Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 27959-27966 (2001).
- (6) Cosgrove D. J., P. Bedinger and D. M. Durachko: Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosing agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6559-6564 (1997).
- (7) Okada, T. and K. Toriyama: Pollen vegetative cell-specific expression of Bra r 1: useful tool for observation of the vegetative nucleus and identification of transgenic pollen by nuclear-targeted GFP. *Sex. Plant Reprod.* 13, 301-307 (2001).
- (8) Bufe, A., G. Schramm, M. B. Keown, M. Schlaak and W.-M. Becker: Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS letters* 363, 6-12 (1995).
- (9) Bufe, A., M. D. Spangfort, H. Kahlert, M. Schlaak, and W.-M. Becker: The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* 199, 413-415 (1996).
- (10) 吉田 直・井手 武・芦田恒雄・加藤博司・田中恒平・中村紀雄: ヤブツバキ花粉症とそのアレルゲン分析. 花粉誌 48, 85-93 (2002).
- (11) O'Farrel, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021 (1975).
- (12) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- (13) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- (14) Hellman, U., C. Wernstedt, J. Gonez and C. H. Heldin: Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224, 451-455

- (1995).
- (15) Shirzadegan, M., P. Christie and J. R. Seemann: An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 6055 (1991).
 - (16) Wagner, S., H. Breiteneder, B. Simon-Nobbe, M. Susani, M. Krebitz, B. Niggemann, R. Brehler, O. Scheiner and K. Hoffmann-Sommergruber: Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from *Hevea* latex and molds. Purification, characterization, cloning and expression. *Eur. J. Biochem.* 267, 7006–7014 (2000).
 - (17) Westhead, E.W. and G. McLain: A purification of Brewers' and Bakers' yeast enolase yielding a single active component. *J. Biol. Chem.* 239, 2464–2468 (1964).
 - (18) 水平敏和・長谷川博司・能登谷満: マイクロウェーブ固定法. 生体の化学 42, 148–159 (1991).
 - (19) 中村澄夫・三木寿子: 花粉の透過型電子顕微鏡試料作製法. 花粉誌 32, 145–148 (1986).
 - (20) Lebioda, L. and B. Stec: Mechanism of enolase: the crystal structure of enolase-Mg²⁺-2-phosphoglycerate/phosphoenolpyruvate complex at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 30, 2817–2822 (1991).
 - (21) Zhang, E., J. M. Brewer, W. Minor, L. A. Carreira, and L. Lebioda: Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0Å resolution. *Biochemistry* 36, 12526–12534 (1997).
 - (22) Baldo, B. A. and R. S. Baker: Inhalant allergies to fungi: reactions to bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and identification of bakers' yeast enolase as an important allergen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 86, 201–208 (1988).
 - (23) Eroles, P., M. Sentandreu, M. V. Elorza and R. Sentandreu: The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* 143, 313–320 (1997).
 - (24) 丸尾文治・田宮信治: 酵素ハンドブック 朝倉書店 pp. 684–685 (1983).
 - (25) Brady, S. T. and R. J. Lasek: Nerve-specific enolase and creatine phosphokinase in axonal transport: soluble proteins and the axoplasmic matrix. *Cell* 23, 515–23 (1981).
 - (26) Dzierszinski, F., M. Mortuaire, N. Dendouga, O. Popescu and S. Tomavo: Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 309, 1017–1027 (2001).
 - (27) Aaronson, R. M., K. K. Graven, M. Tucci, R. J. McDonald and H. W. Farber: Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J. Biol. Chem.* 270, 27752–27757 (1995).
 - (28) Williams, L. A., L. Ding, J. Horwitz and J. Piatigorsky: τ -Crystallin from the turtle lens: purification and partial characterization. *Exp. Eye Res.* 40, 741–749 (1985).
 - (29) Jolodar, A., P. Fischer, S. Bergmann, D. W. Buttner, S. Hammerschmidt and N. W. Brattig: Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta* 1627, 111–20 (2003).
 - (30) Feo, S., D. Arcuri, E. Piddini, R. Passantino and A. Giallongo: ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett.* 473, 47–52 (2000).
 - (31) Lee, H., Y. Guo, M. Ohta, L. Xiong, B. Stevenson and J-K. Zhu: *LOS2*, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* 21, 2692–2702 (2002).
 - (32) Ghosh, A. K., R. Steele, and R. B. Ray: Functional domains of c-myc promoter binding protein 1 involved in transcriptional repression and cell growth regulation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2880–2886 (1999).