

(学術資料)

ツバキ花粉蛋白質 Cj57 の性質と機能

中村 澄夫¹⁾・平野 由香²⁾・栗野 涼子²⁾・最上 則史²⁾・中村 紀雄^{2※)}¹⁾ 神奈川歯科大学生物化学教室 〒238-8580 横須賀市稲岡町 82²⁾ 横浜市立大学大学院総合理学研究科 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2

(2010 年 5 月 28 日 受理)

Properties and physiological role of Cj57 protein from *Camellia japonica* pollenSumio NAKAMURA¹⁾, Yuka HIRANO²⁾, Ryoko AWANO²⁾, Norifumi MOGAMI²⁾
and Norio NAKAMURA²⁾¹⁾ Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan²⁾ Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0027, Japan

Cj57 protein is a pollen allergen from *Camellia japonica* with a molecular weight of 57kDa and an isoelectric point of pI 5.4. To study the function of Cj57 during pollen germination, the properties of Cj57 were examined using a specific antibody directed against it. Cj57 was detected in different pollen grains, but was not present in the petals and sepals. The level of Cj57 in the cytoplasm was very low in mature quiescent pollen grains, but it increased rapidly after pollen hydration: the level also decreased after incubation of the pollen grains for 10min. During further expansion, germination and subsequent tube growth, Cj57 was scarcely detected. Immunoelectron microscopy confirmed these characteristic changes in the level of Cj57 during pollen growth. Cj57 was also analyzed by mass spectrometry and a sequence homology search indicated that it is related to heat shock proteins. These results suggest that Cj57 may be involved in the early stage of pollen germination, for example, the regulation of water stress after pollen hydration.

Key Words: *Camellia japonica*, Cj57 protein, Pollen allergen, pollen germination, pollen hydration

緒 言

花粉アレルゲンは花粉症の原因として注目されるが、花粉の発芽・管伸長過程で何らかの機能を果たしていると考えられ、その細胞内局在性ととも、多くの研究がなされてきている⁽¹⁻⁸⁾。前報^(9,10)においてツバキ花粉のアレルゲンとして3種の蛋白質、Cj57, Cj53, Cj50を報告し、これらのうちCj53とCj50はエノラーゼであることを示した⁽¹⁰⁾。この論文では、Cj57の性質について調べ、その機能について考察した。

材料と方法

1. 花粉の採取と花粉の培養

ツバキ (*Camellia japonica*)・サザンカ (*Camellia sasanqua*)・チャ (*Camellia sinensis*)・ボケ (*Chaenomeles speciosa*)・アメリカデイゴ (*Erythrina crasta-galli*)・サルスベリ (*Lagerstroemia indica*)・ハナタバコ (*Nicotiana sanderae*)・チューリップ (*Tulipa gesneriana*)・テッポウユリ (*Lilium longiflorum*)・クロマツ (*Pinus thunbergii*)・スギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉の採取は前報⁽¹⁰⁾に準じて行った。花粉の培養も前報⁽¹¹⁾に準じて行い、Ca(NO₃)₂を含むシヨ糖寒天培地を用いた。

※ E-mail: nakanori@cosmos.ocn.ne.jp

2. 花粉抽出液の調製, 蛋白質の抽出, 蛋白質量の測定

前報に準じて行った⁽¹⁰⁾. 蛋白質量の測定は Bradford 法⁽¹²⁾ を用いて行った.

3. 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 (SDS-PAGE) と二次元電気泳動 (2D-PAGE)

前報⁽¹⁰⁾ のように SDS-PAGE は Laemmli の方法⁽¹³⁾ に, また 2D-PAGE は O'Farrell⁽¹⁴⁾ の方法に従って行った. 泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色, あるいは銀染色を行った.

4. 抗 Cj57 抗体の作成

硫酸分画で得られた 0% ~ 45% 飽和画分の蛋白質を 2D-PAGE につけ, Cj57 スポットを回収した. 回収したゲルを破碎し, 一晚 4℃ で振盪した後, 遠心分離し, 得られた上清を凍結乾燥して粉末標品を得, 蒸留水に粉末標品を溶解して抗原液とした. 抗原液に等量のフロイントアジュバンド (1 回目不完全, 以後は完全アジュバンドを使用) を混ぜた液をラット (Wister, 雌, 4 週令) に 2 週間ごと注射した. 最終免疫の 10 日後にラットの心臓から採血し, 抗血清を得た. 得られた抗血清を Mab Trap Kit (Amersham Biosciences) を用いて IgG アフィニティーカラムクロマトグラフィーにつけ, 抗体を精製して抗 Cj57 抗体として使用した. また, 同様にマウスを用いても抗体を作製した.

5. ウェスタンブロット法

前報^(10,11) のように行った. SDS-PAGE または 2D-PAGE を行った後, ゲル中の蛋白質をポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (BIO-RAD) へ転写した. 蛋白質が転写された膜を洗浄した後, ブロッキング処理を行なった. 抗体希釈液で適宜希釈した抗 Cj57 抗体と室温で膜上の蛋白質と 2 時間反応させた. 膜を洗浄した後, ビオチン化ウサギ由来抗ラット IgG (Vector) を希釈し, 膜上の蛋白質と 1 時間反応させた. 膜を洗浄した後, 西洋ワサビペルオキシダーゼ-アビジン D (Vector) を希釈し, 膜上の蛋白質と 1 時間反応させた. 膜を洗浄した後, 化学発光検出した.

6. 電子顕微鏡 (電顕) 観察

前報⁽¹¹⁾ に準じて行った. 微細構造観察用切片の作成においては, 花粉をグルタルアルデヒドで前固定し, オスミウム酸を用いて後固定した. エタノール上昇系列とアセトンを用いて脱水し, Spurr 樹脂に包埋した. 免疫染色用切片の作成の場合は, 花粉をパラフォルムアルデヒド-グルタルアルデヒドで前固定し, 後固

定操作を行わず, エタノール上昇系列で脱水し, LR-White 樹脂 (medium grade; London resin) に包埋した. 樹脂の重合は, Spurr 樹脂は 70℃ で 10 時間, LR-White 樹脂は 60℃ で 24 時間行なった. 免疫電顕観察に際しては, 切片を希釈した一次抗体 (マウスを用いて作製した抗 Cj57 抗体) で処理し, 二次抗体 (金コロイド標識抗マウス IgG: Amersham) と反応させた. 酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色を行い, JEM1200EX 透過型電子顕微鏡 (日本電子) を用いて, 加速電圧 80kV で観察した.

7. 質量分析

2D-PAGE で分離した Cj57 を分解し, その分解産物を LC-MS にかけて分析した後, MASCOT で解析 (相同性検索) した.

結 果

1. Cj57 の分布

ツバキ花粉アレルゲンである Cj57, Cj53, Cj50 蛋白質のうち Cj57 の単離を試みた. 花粉抽出液を 0-45%, 45-60% 硫酸飽和分画し, それぞれを 2D-PAGE につけ, CBB 染色して蛋白質を検出したところ, Cj57 は 0-45% 硫酸分画に (Fig. 1), Cj53 と Cj50 は 45-60% 硫酸分画に含まれていることが分かった. このことを利用して Cj57 を集め, 抗 Cj57 抗

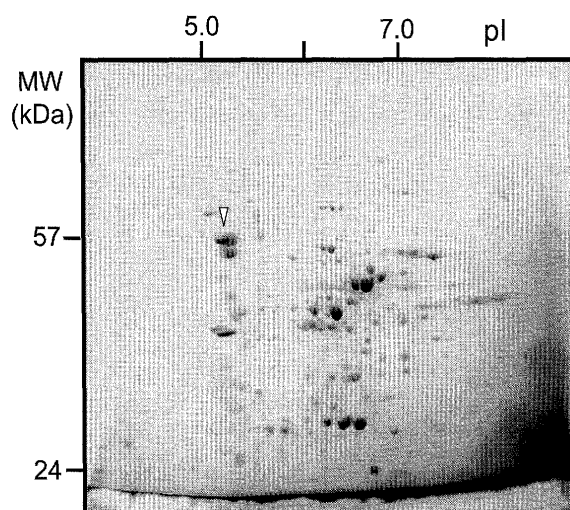


Fig. 1. Two-dimensional electrophoretic identification of Cj57 extracted from *Camellia japonica* pollen grains.

The pollen extract from *C. japonica* was fractionated with ammonium sulfate, and Cj57 was contained in the 0-45% saturated fraction. After dialysis, Cj57 was concentrated and subjected to 2D-PAGE. Proteins were stained with CBB.

体を作成した。

ウエスタンブロット法にて Cj57 蛋白質の種々の花粉における分布を調べた (Fig. 2)。サザンカ・チャ・ボケ・アメリカデイゴ・サルスベリ・ハナタバコ・チューリップ・テッポウユリの他に、裸子植物のクロマツ・スギ花粉にも分子量の違いはみられたが Cj57 様蛋白質の存在がみられた。また、ツバキの蕾 (全長 2.5, 3.5, 4.5cm) から取り出した葯にも抗体反応がみられ、花卉やガク片には抗体反応はみられなかった。

2. 花粉の発芽における Cj57 量の変化

花粉の発芽・管伸長に伴う Cj57 の量的変化をウエスタンブロット法で調べた (Fig. 3)。吸水後 5-10 分の時に花粉内の Cj57 量は急増し、その後減少した。培養 40-60 分で花粉の発芽がみられたが、この時は抗体の反応は非常に僅かであった。

このことをさらに確かめるために免疫電顕で細胞内の Cj57 の分布を調べた。花粉をオスミウム酸で後固定を行なうと抗体との反応性が落ちるので後固定を行わず、内部微細構造の観察には適してしないが、免疫反応が阻害されにくい LR-White 樹脂に包埋し、観察を行なった。並行して Spurr 樹脂に包埋した試料で微細構造を観察した。

成熟休止花粉においては Cj57 のラベルが細胞質内

に少量分布しているのがみられた (Fig. 4a)、培養 5 分後の花粉では吸水していない花粉に比べ、急激にラベルの量が増し (Fig. 4b)、10 分後にはさらにその量が増すことが確認された (Fig. 4c)。しかし、40 分後にはラベルはほとんど見られなかった (Fig. 4d)。培養 5 分、10 分後の花粉において、ラベルはゴルジ体や核には存在せず、細胞質に広く分布し、主に脂質体の周りを取り囲む小胞体上に存在していた。また、外壁とその周辺にも存在した。花粉内容物が細胞外に出る場合、それが放出される部位が発芽孔であるのかどうかを確認するために発芽孔周辺を観察したが、ラベルは細胞質と外壁に見られ、発芽孔部位 (内壁) や発芽孔付近に集中するなどの特別な変化は観察されなかった。

3. Cj57 の質量分析

2D-PAGE で単離した Cj57 は CBB 染色で 1 つのスポットとして見えたが、抗体反応では 2 つのアイソフォームを含んでいた。そこでそれぞれを質量分析し、アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、共に熱ショック蛋白質 (HSP) と類似性がみられた。相同性はいろいろな種の HSP70 にみられ、最も相同性の高かった蛋白質部分はハウレンソウの HSP と 32% の相

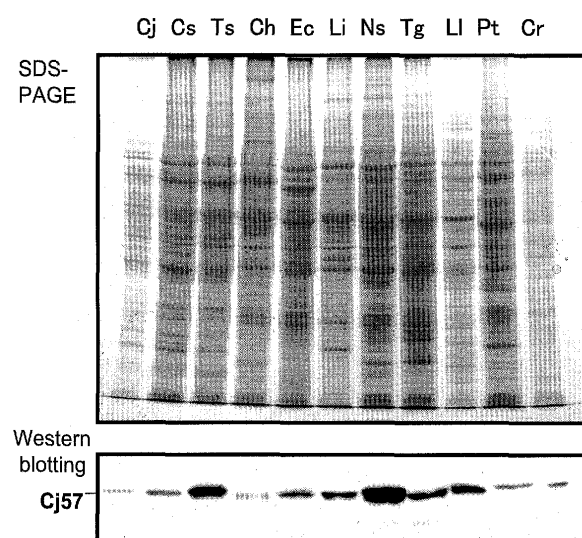


Fig. 2. Distribution of Cj57 in different pollen species. Pollen extracts from *Camellia japonica* (Cj), *C. sasanqua* (Cs), *C. sinensis* (Ts), *Chaenomeles speciosa* (Ch), *Erythrina crista-galli* (Ec), *Lagerstroemia indica* (Li), *Nicotiana glauca* (Ns), *Turipia gesneriana* (Tg), *Lilium longiflorum* (Ll), *Pinus thunbergii* (Pt), and *Cryptomeria japonica* (Cr) were fractionated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Proteins were stained with silver reagent.

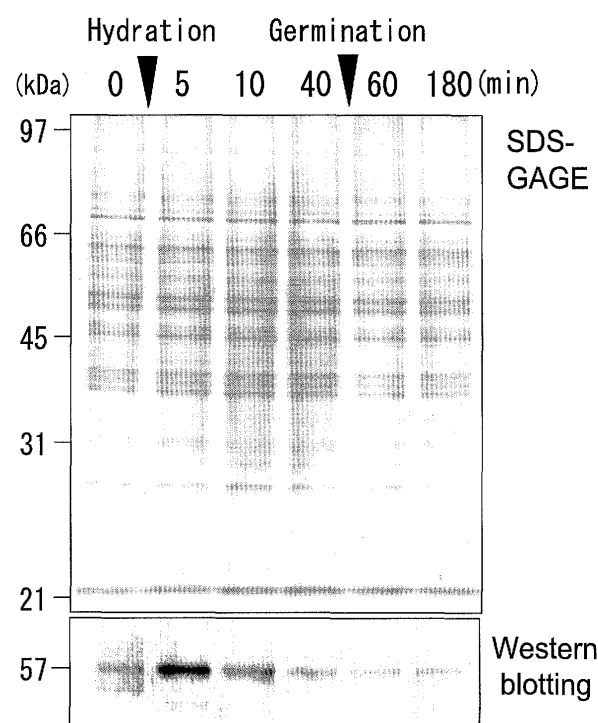


Fig. 3. Changes in the cytosolic level of Cj57 during pollen growth. Extracts prepared from pollen incubated for 0-180min, then the proteins contained in each extract were separated by SDS-PAGE, and Cj57 was detected by Western blotting.

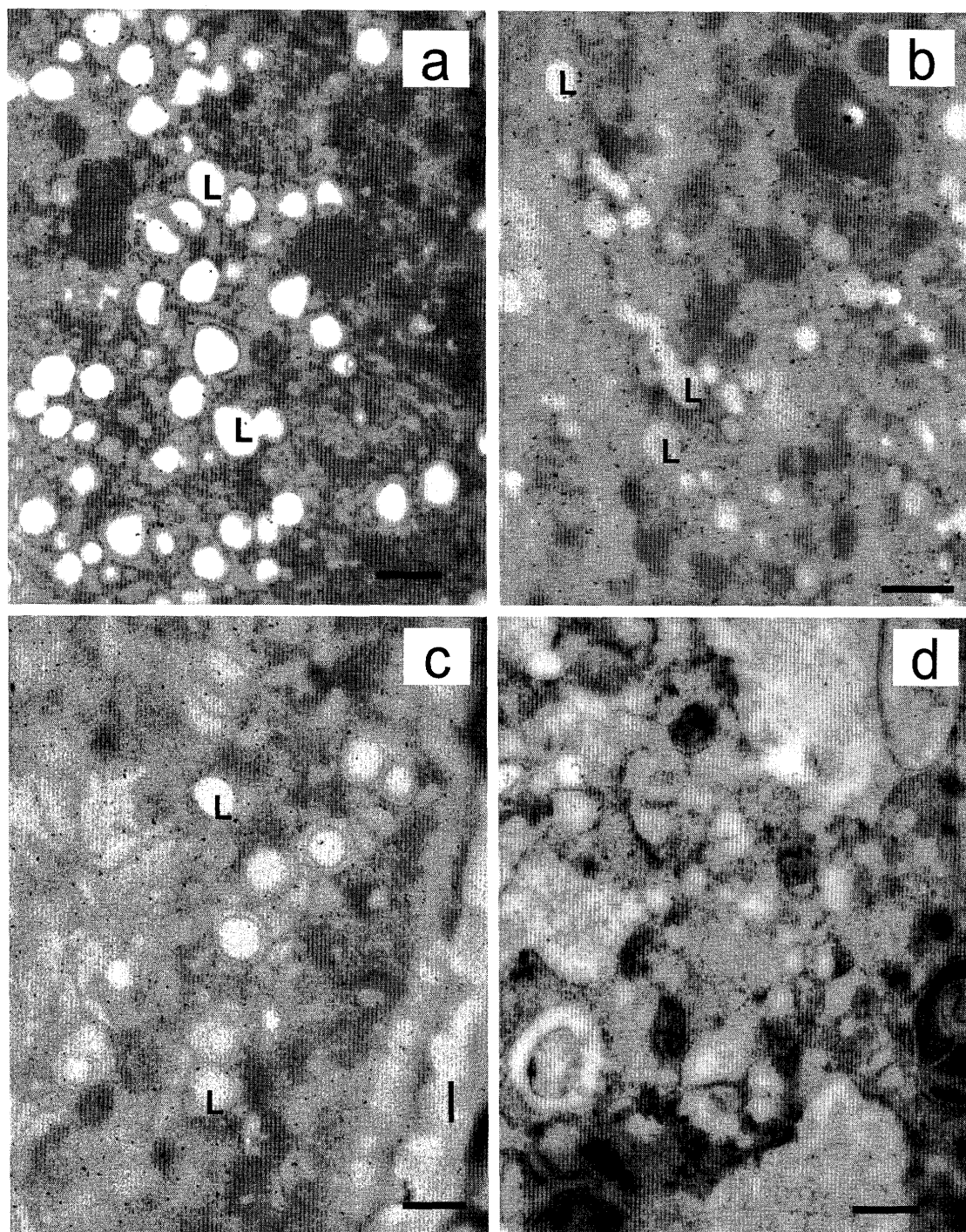


Fig. 4. Distribution of Cj57 protein in the cytosol of *Camellia japonica* pollen grains.

Slight immunolabeling was detected in quiescent pollen (a) and then increased rapidly in the grain incubated for 5min (b) or for 10min (c), followed by a rapid decrease in grains incubated for 40min (d). L: lipid body. Bar = 500nm.

同性がみられた (Fig. 5).

考 察

Cj57 は広く花粉に存在する蛋白質と考えられ、花粉独自の機能に関与していることを予測し、Cj57 の

細胞内分布について花粉の吸水後から発芽・管伸長過程を経時的にウエスタンブロット法と免疫電顕を用いて調べた。Cj57 は成熟休止花粉の細胞質に既に少量存在しており、吸水後5分-10分にかけてその量が急激に増え、培養40分後の発芽直前には細胞内にはほとんど存在しないという独自な変化を示した。Cj57

1 MAGKGEPAI GIDLGTYSYC VGVWQHDEVE LIANDQGHRT TPSYVAFTDS
 51 ERLIGDAAKN QVAMNPINTV FDAKRLIGRR FSDASVQADM KHUPFKVYSG
 101 PGEKPMIGVN YKGEKQFAA EEISSMVLTK NKEIAEATLG STVKHAWTV
 151 PATFNDSSQKQ ATKDAQWISG LNVMRIINEP TAAAIAYGLD KKATSVGEKN
 201 VLIFDLGGGT FDVSLLTIEE GIFEVKATAG DTHLGGEDFD NPMVMHFVQE
 251 FKRKNKKDIS GNPRALRLR TACERAKRTL SSTAQTITIEI DSLVEGVDFY
 301 SPITRARFEE LNMDLFRKCM EPVEKCLRDA KMDKSTVHDV VLVGGSTRIP
 351 KVQQLQDFF NGKELCKSIN PDEAVAYGAA VQAAILSGEG NEKVQDLLLL
 401 DVTPLSLGLE TAGGVMTWLI PRNTTIPTKK EQVFSTYSND QPGVLIQVYE
 451 GERTTRDMN LLGKFLSGI PPAPRGVQI NVCFDIDANG ILNVAEDKT
 501 TGQKNKIIT NDKGRLSKEE IEKNVQEAKE YKSEDEEHKK KVESNALENN
 551 YAYNMNNTVK DEKIGAKLSE ADKKKIEEAI DASIQWLDGN QLAEAEFD
 601 KNKELESICN PIIAKMYQGA GGDMGGGMD EGPTSGGGAG PKIEEVD

Fig. 5. Amino acid sequence of Cj57 protein.

Underlining indicates similarity between the amino acid sequence of Cj57 and that of the heat shock protein from *Spinacia oleracea*.

は主に細胞質に広く分布し、吸水後には外壁にもみられたが、ゴルジ体・核・脂質体内には存在しなかった。細胞質内微細構造の観察から、脂質体の周辺に小胞体を取り囲んでいる構造がみられ、免疫染色像と比較すると、この小胞体上にCj57が存在することが明らかになった。吸水後のCj57の急激な増加は、吸水をきっかけにCj57が小胞体で多量に生産されるためと考えられる。その後のCj57の速やかな減少は、花粉細胞内での分解あるいは細胞外への分泌によると考えられる。培養液にはCj57が検出されたが、その量はわずかで、発芽・管伸長に伴うその量的変化はみられず、ツバキ花粉では吸水による破裂や原形質吐出は観察されなかった。したがって、細胞質内のCj57の一部は細胞外に浸出あるいは分泌され、残りの多くは、細胞質内で分解されると考えられる。細胞外への浸出・分泌が花粉粒の内壁・外壁を通して行われるのか、発芽孔（ほとんど内壁）を通して行われるのか⁽¹⁵⁾を検討したが、発芽孔付近にCj57が多く局在しているような特別な分布は観察されなかった。Cj57がどのように細胞外へ移動するのか、また細胞内でどのように分解されるのかについては今後の課題である。Cj57の質量分析結果はHSPと相同性を示した。とくに様々な種のHsp70と高い相同性がみられた。HSPはストレス耐性蛋白質⁽¹⁶⁾として知られており、花粉の吸水後の水代謝と密接な関係があるのかもしれない。花粉は葯から出た時は非常に乾燥しており、ツバキ花粉では吸水により花粉形態は楕円体状から球状に変わる。水分量は劇的に変化し、浸透圧も大きく変化する。Cj57は吸水をきっかけに、細胞質で急速に生産され、ストレス緩和として機能するのも知れない。これらについてもさらに詳しく検討する必要がある。

謝 辞

蛋白質の質量分析については、田辺三菱製薬の田中恒平氏に大変お世話になりました。ここに厚くお礼、感謝申し上げます。

引用文献

- (1) Alché, J.D., A.J. Castro and M.I. Rodríguez-García: Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (*Ole e 1*) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR. *Micron* 33, 33-37 (2002).
- (2) Alché, J.D., M. M' rani-Alaoui, A. Castro and M. I. Rodríguez-García: Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is release to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol.* 45, 1149-1157 (2004).
- (3) Rozwadowski, K., R. Zhao, L. Jackman, T. Huebert, W.E. Burkhardt, S.M. Hemmingsen, J. Greenwood and S.J. Rothstein: Characterization and immunolocalization of a cytosolic calcium-binding protein from *Brassica napus* and *Arabidopsis* pollen. *Plant Physiol.* 120, 787-797 (1999).
- (4) Schenk, M.F., L.J.M.J. Gilissen, G.D. Esselink and M.J.M. Smulders: Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen. *BMC Genomics* 7, 168 (2006).
- (5) Fisher, S., M. Grote, B. Fahlbusch, W.D. Müller, D. Kraft and R. Valenta: Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98, 189-198 (1996).
- (6) Suck, R., S. Hagen, O. Cromwell and H. Fiebig: The high molecular mass allergen fraction pf timothy grass pollen (*Phleum pratense*) between 50-60kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13. *Clin. Exp. Allergy* 30, 1395-1402 (2000).
- (7) Tao, A-l. and S-h. He: Cloning, expression, and characterization of pollen allergens from *Humulus scandens* (Lour) Merr and *Ambrosia artemisiifolia* L.. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 1225-1232 (2005).
- (8) 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, 15-822 (2004)。
- (9) 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, 85-893 (2002)。

-
- (10) 田中恒平・中村紀雄：ツバキ花粉アレルゲンはエノラーゼである。花粉誌 55, 77-84 (2009).
- (11) 井上知己・森下直樹・井手 武・中村紀雄：ゴルジ小胞特異的蛋白質と発芽花粉のカロース壁との関係。花粉誌 55, 77-84 (2009).
- (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.* 7, 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) O'Farrel, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021 (1975).
- (15) Grote, M., H. Vik and S. Elsayed: Immunoelectronmicroscopic identification and localization of the antigenic proteins of tree pollen grains. *Allergy* 43, 603-613 (1988).
- (16) Young, T.E., J. Ling, C.J. Geisler-Lee, R.L. Tanguay, C. Caldwell and D.R. Gallie: Development and thermal regulation of the maize heat shock protein, HPS101. *Plant Physiol.* 127, 777-791 (2001).
-