

(原著論文)

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

中村 澄夫¹⁾・佐藤 文孝²⁾・中村 紀雄²⁾¹⁾神奈川歯科大学 生物学教室 〒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

(2004 年 1 月 13 日 受付, 2004 年 5 月 29 日 受理)

Immunocytochemical Localization of Cry j 1 and Cry j 2

— the Allergenic Proteins of Japanese Cedar Pollen — in the Germinated Pollen

Sumio NAKAMURA¹⁾, Fumitaka SATO²⁾ and Norio NAKAMURA²⁾¹⁾Biological Laboratory, Kanagawa Dental College,
Inaoka-cho, Yokosuka 238-8580, Japan²⁾Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Kanazawa-ku,
Yokohama 236-0027, Japan.

To study the involvement of Cry j 1 and Cry j 2 — the allergenic proteins of *Cryptomeria japonica* pollen — in pollen growth, we examined their distribution in the germinated pollen using monoclonal antibodies against both proteins. We also examined the localization of pectins and arabinogalactan proteins (AGPs) using JIM 5 and JIM 7 — monoclonal antibodies against pectins — and JIM 13 — a monoclonal antibody against AGPs — since Cry j 1 and Cry j 2 have degradation activity on pectins.

In immunoblot analysis, Cry j 1 was scarcely detected in the extract from germinated pollen. Cry j 2 was found in the extracts from mature quiescent pollen grains and the germinated pollen. Immunoelectron microscopy showed little labeling of every region of the germinated pollen with the anti-Cry j 1 antibody, whereas the anti-Cry j 2 antibody labeled only the starch grains in the pollen grains and germinated pollen. In contrast, JIM 5 and JIM 7 labeled the nexine layer, and JIM 13 labeled the starch grains and other regions. Thus, the distributions of Cry j 1 and Cry j 2 in the germinated pollen were not in accord with those of pectins. Also, the localization of Cry j 2 did not coincide with that of AGP, except for the presence of both of them in the starch grains. These results suggest that Cry j 1 and Cry j 2 are not involved in pollen germination and tube growth, and that Cry j 1, which exists in the boundary region between the nexine and the intine-1 layers, may contribute to separating the intine from the exine after hydration.

Key Words: Cry j 1, Cry j 2, *Cryptomeria japonica*, immunocytochemical localization, pollen growth.

緒 言

スギ花粉症の主要アレルゲンとして Cry j 1⁽¹⁾ と Cry j 2⁽²⁾ が知られている。Cry j 1 については全アミノ酸配列が明らかにされ、その配列はブタクサ花粉の主アレルゲンである Amb a 1 の配列と 46% の相同性があり⁽³⁾、また、それは植物病原菌が分泌するペクテート

リアーゼとも 47–59% の相同性がみられ、Cry j 1 もペクテートリアーゼ活性を持つことが報告されている⁽⁴⁾。さらに免疫電子顕微鏡観察によると、花粉細胞由来と思われる Cry j 1 も一部存在するが、ほとんどの Cry j 1 は若い葯のタペータムと成熟花粉の外壁とオービクルに存在する⁽⁵⁾ ので、Cry j 1 はタペータム由来であると考えられている。Cry j 2 も全アミノ酸

配列が決定され、それはアボカドとトマトの果肉熟成に関わっているポリガラクトナーゼ^(6, 7)に、またトウモロコシ花粉で発現するポリガラクトナーゼ⁽⁸⁾に、それぞれ43%, 40%, 34%の相同性がみられ⁽⁹⁾、さらにCry j 2もポリガラクトナーゼ活性を持つことが報告されている⁽¹⁰⁾。ただ、花粉におけるCry j 2の局在性はまだ明らかにされていない。

ペクチン分解酵素とポリガラクトナーゼはともに植物細胞壁の主要な構成多糖成分であるペクチンの分解酵素である。ペクチン分解酵素は、植物病原菌の植物体への侵入^(11, 12)、果物の成熟過程⁽¹³⁾に関連づけて研究されている。さらに、花粉の発芽や管伸長に関わるとの推測がなされ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾、スギ花粉アレルゲンがペクチン分解活性をもつことから、その生理的な役割は花粉の発芽や管伸長の促進にあると推測されている^(4, 9)。

しかし、裸子植物の多くは、被子植物とは異なり、被子植物の花粉管壁の主要な構成成分であるペクチンが花粉管壁にあまり見られない⁽¹⁷⁾。スギ花粉アレルゲンはペクチン分解酵素活性を持っているものの、実際に花粉管壁でペクチン分解酵素として働いているのかどうかは明らかではない。

この研究では、スギ花粉アレルゲンとペクチン性多糖に対するモノクローナル抗体を用いてスギ花粉アレルゲンとペクチン性多糖の局在を調べ、実際に花粉アレルゲンが花粉の発芽や管伸長に関与しているかどうか検討を行った。

材 料 と 方 法

1. 材 料

開葯前のスギ (*Cryptomeria japonica*) の雄花を採取し、室温で一晩乾燥させて開葯させ、篩 (0.1mm mesh) を通して花粉を集めた。集めた花粉はシリカゲル容器に入れ、使用時まで-20℃で保存した。培養に際しては、花粉を室温に1時間放置した後、0.1M ショ糖-1%寒天培地に散布し、30℃で72時間培養した。

2. タンパク質の抽出

花粉に2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -5%グリセリン-62.5mM Tris-HCl (pH 6.8) を一定量加え、ポッター型ホモジェナイザー管に入れ、0℃で10秒間磨砕し、30秒間冷却する操作を10回繰り返した後、10,000×gで10分間遠心分離して上澄液を回収した。この液をタンパク質試料とし、タンパク質量はBradford法⁽¹⁸⁾により求めた。

3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロット法

SDS-PAGE は、アクリルアミドゲルの濃度を10%とし、スラブ泳動装置を用いてLaemmliの方法⁽¹⁹⁾に準じて行った。タンパク質は1レーン10μgを泳動し、銀染色で検出した。

ウェスタンブロットはTowbinらの方法⁽²⁰⁾に準じて行った。SDS-PAGE (タンパク質は1レーン1μgを泳動) 後、ブロッティング装置を用いてタンパク質をゲルからポリビニリデンジフルオリド膜へ転写した。この膜を1%牛血清アルブミン (BSA) — Tween 20 — リン酸緩衝液-生理食塩水 (PBS) 液に4℃で一晩浸し、ブロッキング処理を行った。その後Tween-PBS液による膜の洗いとそれぞれの抗体との反応を交互に行った。抗体との反応はまず10,000倍に希釈した一次抗体 (抗Cryモノクローナル抗体) と30℃で2時間反応させた。次に5,000倍希釈した二次抗体 (ウマ由来抗マウスIgG-ビオチン, Vector社) と30℃で1時間反応させ、最後に10,000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ-アビジンD (Vector社) と30℃で30分間反応させた。反応後、膜を洗い、ECL ウェスタンブロット検出システム (Amersham Biosciences社) により化学発光させ、X線フィルムに感光させてアレルゲンを検出した。

4. モノクローナル抗体

抗Cry j 1モノクローナル抗体026と抗Cry j 2モノクローナル抗体T27は林原生物化学研究所製を使用した。また、非エステル化ペクチンに対する抗体であるJIM 5^(21, 22)、メチルエステル化ペクチンに対する抗体であるJIM 7⁽²²⁾、アラビノガラクトタンパク質 (AGPs) に対する抗体であるJIM 13⁽²³⁾は英国Leed大学のJ.P. Knox博士より提供していただいた。

5. 免疫電子顕微鏡観察

花粉を4%パラホルムアルデヒド-0.5%グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) に浸し、マイクロウェーブ法による固定⁽²⁴⁾を行なった後、室温で一晩振盪し、前固定した。標品を0.1M カコジル酸緩衝液 (洗浄液, pH 7.3) で、室温で一晩振盪した後、0.5%四酸化オスミウム-1.5%黄血カリに浸し室温で1時間振盪し、後固定⁽²⁵⁾した。標品を洗浄した後、中村・三木の方法⁽²⁶⁾に準じてエタノール上昇系列で脱水し、LR-White樹脂 (London Resin社) に包埋した。

免疫染色に際しては、超薄切片をコロジオン膜を貼ったニッケルグリッド (200メッシュ) にとり、非特異的吸着を防ぐため0.15M NaCl-50 mM Tris-HCl 液 (抗体用希釈液, pH 7.2) で30倍に希釈した正常ヤギ

血清（和光純薬工業社）液に室温で10分間浸した。次に切片を抗体希釈液で50倍に希釈した一次抗体（各種モノクローナル抗体）液に浸し、室温で30分間、さらに4℃で一晩反応させた。切片を0.15M NaCl-0.2%BSA-50 mM Tris-HCl（洗浄液, pH 7.2）で洗い、0.15M NaCl-1%BSA-0.1%NaN₃-20mM Tris-HCl (pH 8.2) で20~50倍に希釈した二次抗体（10nm 金コロイド標識ヤギー抗マウスIgG, フナコシ社）と室温で1時間反応させた。反応後切片を洗浄液で、次に超純水で洗い、JEM 1200EX 透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. スギ花粉の発芽

スギ花粉の発芽率は20~50%程度であった。スギ花粉は、Fig. 1に示すように吸水するとやや膨らみ、その後内壁が急激に膨潤して花粉細胞を含んだまま外壁から分離した。吸水後20時間以上になると花粉細胞の発芽が見られ、花粉管が伸長した。花粉管はやがて内壁を突き破り、ときに枝別れをしながら伸長した。外壁から分離した内壁はペクチンを染色するルテニウムレッドやアルシアンブルーで染色された。電子顕微鏡（電頭）観察によると、内壁と離れた外壁には内壁層はみられず（Fig. 4c, d）、発芽花粉の花粉粒部分に

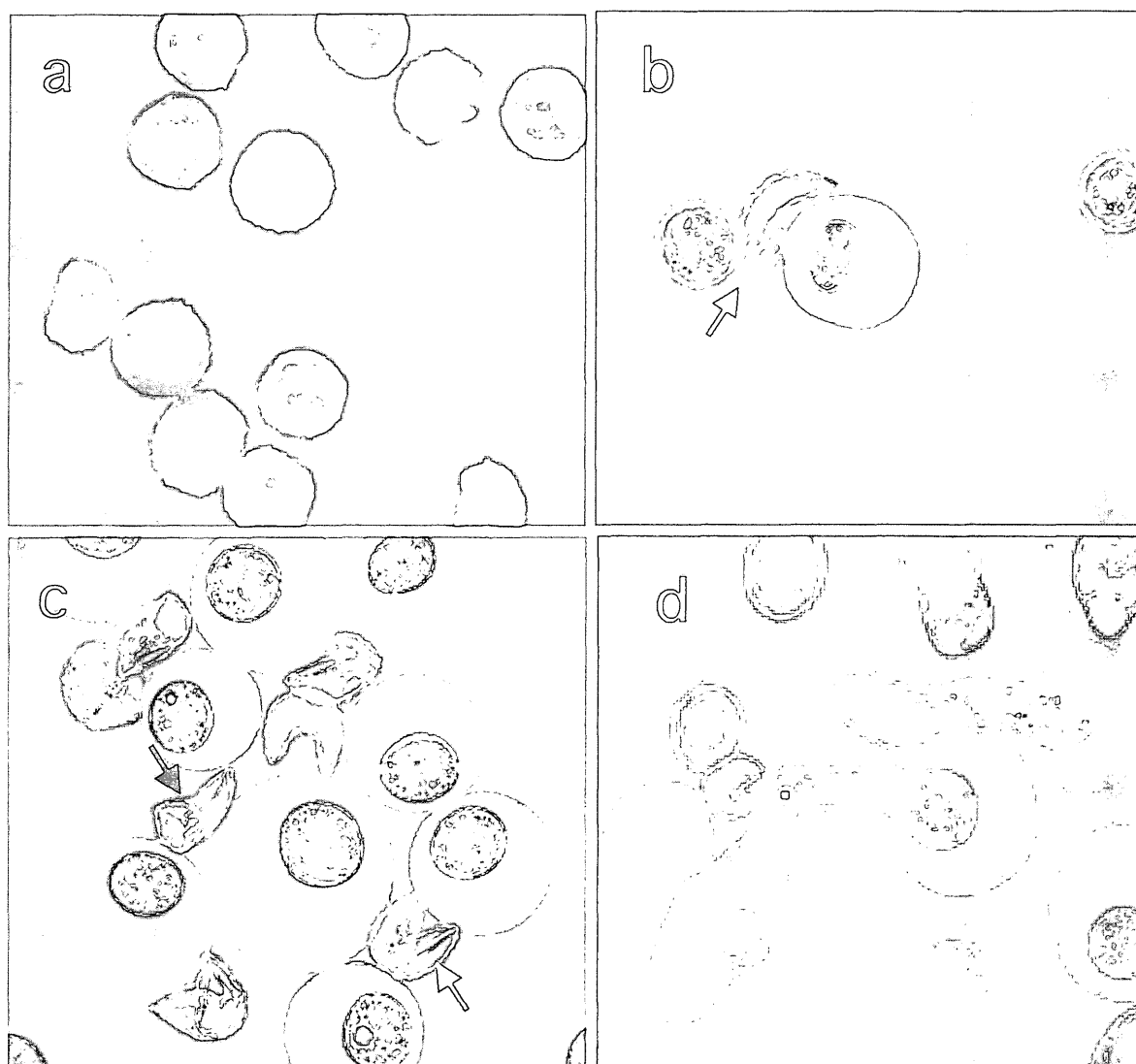


Fig. 1. Germination of Japanese cedar pollen.

a: dehydrated pollen. b, c: When the pollen grains were hydrated, the intine soon swelled markedly, and the intine surrounding the pollen cell separated from the exine (arrow symbols). The swollen intine was stained with alcian blue (b) and ruthenium red (c, d). d: germinated pollen.

は内壁第4層が、時に内壁第3層もみられた。花粉管壁部分は内壁第4層に連続しており、第4層の一部が花粉管となり、管は内壁（第1-3層）の中を伸長し、ある程度長くなると内壁層を突き破った。

2. スギ花粉抽出液とモノクローナル抗体との反応

スギ花粉アレルゲンに対するモノクローナル抗体と花粉抽出液との反応性をウェスタンブロット法により調べた (Fig. 2)。スギの成熟花粉と発芽花粉（培養72時間）の抽出液をSDS-PAGEで展開し、抗Cry j 1抗体と抗Cry j 2抗体を反応させたところ、抗Cry j 1抗体の反応では成熟花粉において分子量41kDaと44kDaの位置に強い2本のバンドが検出されたが、

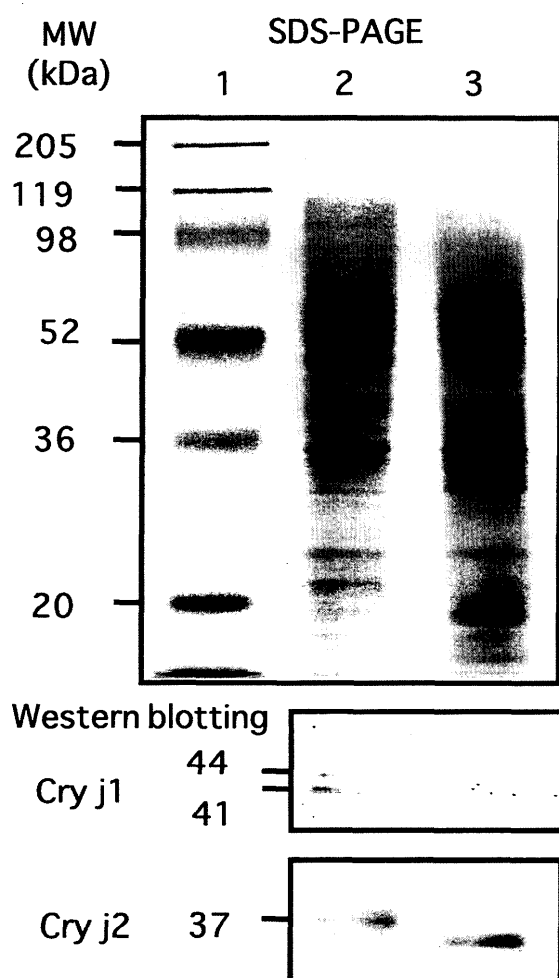


Fig. 2. SDS-PAGE and Western blotting of the pollen extract.

The extract (1 μ g protein/lane) from mature pollen grains (lane 2) reacted with the anti-Cry j 1 and Cry j 2 antibodies, but the extract from the germinated pollen (lane 3) reacted only with anti-Cry j 2 antibody. Lane 1: molecular weight markers.

発芽花粉にはバンドが検出されなかった。抗Cry j 2抗体の反応では、成熟花粉、発芽花粉において共に分子量37kDaの位置に強いバンドが検出された。

3. 免疫電子顕微鏡観察

成熟花粉粒における抗Cry j 1モノクローナル抗体のラベルの分布、つまりCry j 1の局在についてはすでに調べられているので⁽⁶⁾、抗Cry j 1抗体については発芽花粉について、抗Cry j 2抗体については成熟花粉と発芽花粉におけるそのラベルの分布を調べた。

抗Cry j 1モノクローナル抗体による金コロイドのラベルは、発芽花粉のどの部位においても検出されなかった。一方、抗Cry j 2モノクローナル抗体によるラベルは、成熟花粉粒のデンプン粒にのみ見られ (Fig. 3)、その他の部位にはみられなかった。また、発芽花粉でも、花粉粒部分のデンプン粒にのみラベルが見られ (Fig. 4a)、細胞質やどの内壁層にもラベルはみられなかった。発芽孔付近でも、ラベルはデンプン粒にのみ見られた (Fig. 4b)。花粉管内でもラベルはデンプン粒にのみ見られ、細胞質と花粉管壁にはラベルは見られなかった。

発芽花粉におけるペクチン性多糖の局在を知るために、JIM 5, JIM 7, JIM 13抗体を用いてラベルの分布を調べた。JIM 5による金コロイドのラベルは、外



Fig. 3. Localization of Cry j 2 in the quiescent pollen grain.

Anti-Cry j 2 antibody labeled only starch grains (arrows). In: intine, Ne: nexine, Se: sexine, St: starch grain, Cy: cytosol. Bar: 500nm.

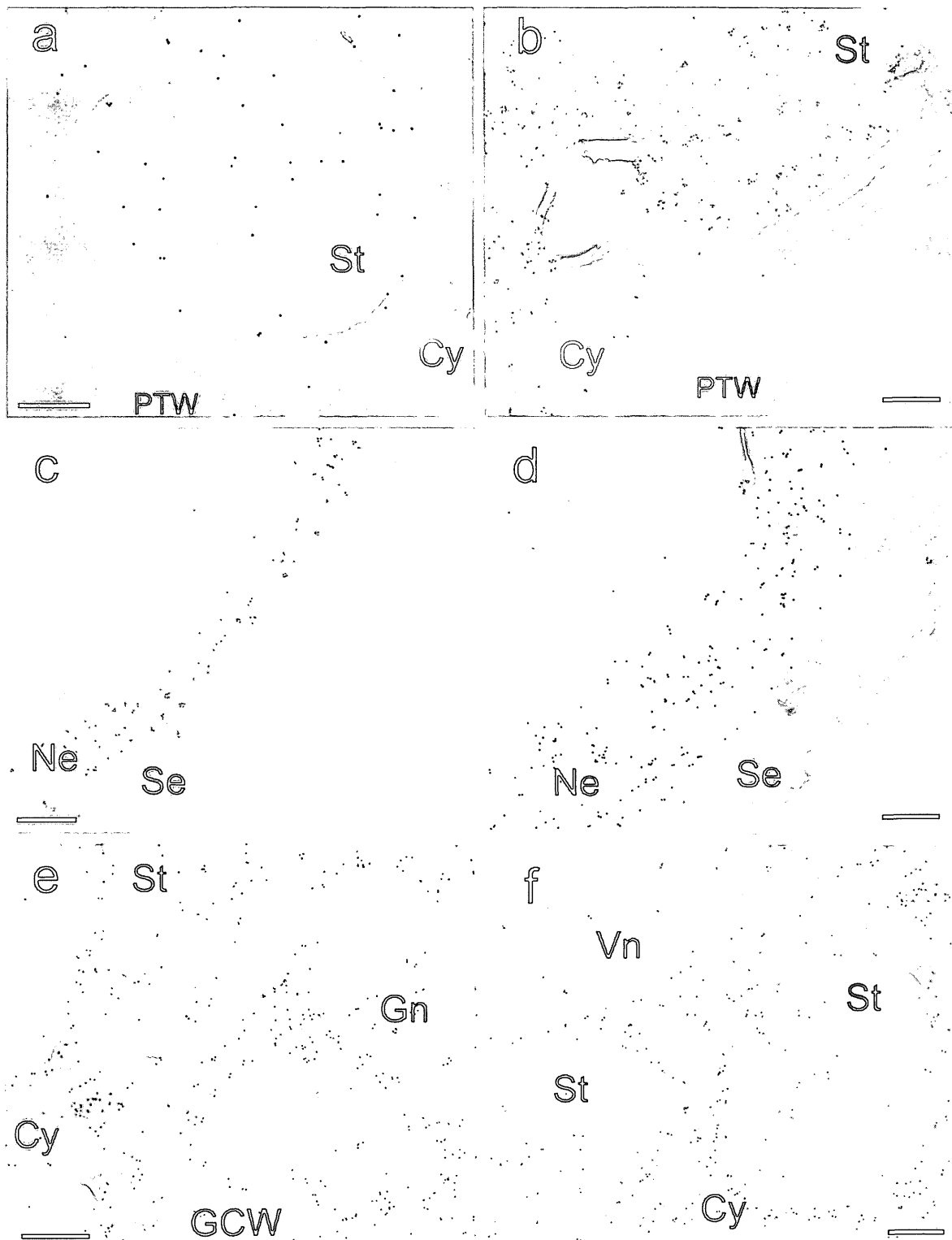


Fig. 4. Immunoelectron microscopy of the germinated pollen.

Anti-Cry j 2 antibody labeled only the starch grains in the pollen grain region (a), in the vicinity of the germinal aperture (b) and in other regions. JIM 5 (c) and JIM 7 (d) labeled the nexine layer of the exine separated from the intine. JIM 13 labeled the cytosol, the generative cell (e) and the starch grains (f). Cy: cytosol, GCW: generative cell wall, Gn: generative nucleus, Ne: nexine, Se: sexine, PTW: pollen tube wall, St: starch grain, Vn: vegetative nucleus. Bars: 500nm.

壁ネキシシ (Ne) 層のほぼ半分の部分、とくにセキシシ (Se) 層側に多く見られた。Se 層にはラベルは見られなかった (Fig. 4c)。そして花粉管壁などのその他の部位にはラベルは見られなかった。JIM 7 によるラベルは Ne 層全体に見られた。Se 層にはラベルは見られなかった (Fig. 4d)。また花粉管先端の花粉管壁、細胞質にわずかにラベルが見られた。JIM 13 のラベルは発芽花粉の花粉粒部分の細胞質、内壁第 4 層 (花粉壁) にみられ、生殖細胞の細胞質にもラベルがみられたが、生殖細胞壁にはみられなかった (Fig. 4e)。花粉粒部分のデンプン粒 (Fig. 4e) にはかならずラベルが見られた。そして花粉管部分では、細胞質、管壁、デンプン粒にラベルがみられた。

考 察

成熟花粉では、Cry j 1 は主に外壁 Se 層とオービクル外層に存在するが、外壁の Ne 層と内壁の第 1 層との境界領域にも存在する⁽⁵⁾。そしてこの分布と今回明らかになった Ne 層におけるペクチンの分布とから、Cry j 1 のペクチン分解活性が外壁の Ne 層と内壁の第 1 層の分離に関係していることが推測される。内壁 (第 1-3 層) のペクチンの分布については電顕観察が難しく抗体による確認はできなかったが、内壁成分には組織化学的知見 (Fig. 1) からペクチンが存在すると思われる、また単離した内壁の化学的分析⁽²⁷⁾ から主成分はガラクトース、ラムノース、アラビノース、ウロン酸からなるペクチン性多糖であることが示されている。ペクチンは吸水すると膨潤する性質があり、そのことにより機械的に外壁と内壁が分離することも考えられるが、花粉が吸水しても何の変化もみられない場合もあり、その分離にはペクチン分解活性が関係すると思われる。

これに対して、発芽花粉ではイムノブロットでも電顕観察でも Cry j 1 の存在を確認できなかった。成熟花粉では雄原細胞壁とゴルジ体にも Cry j 1 が存在するが⁽⁶⁾、それらは微量であり、かつ発芽花粉は Cry j 1 が存在する外壁を持たないので、検出できなかったと考えられる。また花粉管壁とこれに連続する花粉粒部分の花粉壁 (内壁第 4 層) にはペクチンは僅かしか含まれていない。スギ花粉の場合、これらの壁には Cry j 1 が存在しないので、壁ペクチンが微量であるのは多量に存在した壁ペクチンが Cry j 1 によって分解を受けて微量になったとは考えにくい。壁ペクチンの合成そのものが微量であったと考えられる。Cry j 1 は成熟花粉で検出されたが、伸長している花粉管のどの部分にも検出されなかったので、Cry j 1 は管伸長にはほとんど関与していないと考えられる。Cry j 1 が花粉管伸長にも関与しているかどうかについては、遺

伝子組み換えタバコの花粉を用いて Cry j 1 遺伝子のプロモーターが花粉管で発現することが示され、Cry j 1 の花粉管伸長への関与が推測されている⁽²⁸⁾。しかし、伸長しているスギ花粉管で Cry j 1 が検出されないことは、その生産がみられるとしても非常に僅かであるか、長時間続かないことを示唆しているのかも知れない。

Cry j 2 の細胞内分布についてはこれまで報告がなく、成熟花粉と発芽花粉について調べた。しかし、どちらの花粉の場合もデンプン粒にその存在がみられた以外、その他のどの部位にも Cry j 2 は存在しなかった。ペクチン性多糖の 1 種である AGPs とは、デンプン粒においてだけ分布の重なりがみられたが、花粉壁ペクチンの分布とは関連性がなく、したがって発芽にも管伸長にも Cry j 2 は関与していないと考えられる。何故 Cry j 2 がデンプン粒に存在するのかの理由是不明であるが、タンパク質とデンプンとの特殊な吸着が考えられる。また、デンプン粒の形態は種により生理的条件によりいろいろである。デンプン粒の形態の形成・分解にはデンプン合成酵素だけでなく何らかの他のタンパク質が関与していると考えられ、AGP や Cry j 2 もその一つであり、そのことに関与しているのかも知れない。

また、イネ科花粉に含まれるデンプン粒には花粉アレルゲンが存在することが知られている^(29, 30)。花粉より微小な粒子が花粉症の原因と考えられる場合、花粉内容物の飛散が考えられ、実際に空中に飛散するデンプン粒が捕らえられている⁽³⁰⁾。スギ花粉症においても同様の可能性が考えられる。

謝 辞

ペクチン、アラビノガラクトタンタンパク質の抗体を提供して下さった J.P. Knox 博士 (Centre for Plant Biochemistry and Biotechnology, University of Leeds, UK) に感謝いたします。

引 用 文 献

- (1) Yasueda, H., Y. Yui, T. Shimizu, and T. Shida: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 45, 77-86 (1983).
- (2) Sakaguchi, M., S. Inouye, M. Taniai, S. Ando, M. Usui, and T. Matuhasi: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312 (1990).
- (3) Sone, T., N. Komiyama, K. Shimizu, T. Kusakabe,

- K. Morikubo, and K. Kino: 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).
- (4) Taniguchi, Y., A. Ono, M. Sawatani, M. Nanba, K. Kohno, M. Usui, M. Kurimoto, and T. Matuhasi: Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* 50, 90-93 (1995).
- (5) Miki-Hirosige H., S. Nakamura, H. Yasueda, T. Shida, and Y. Takahashi: Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex. Plant Reprod.* 7, 95-100 (1994).
- (6) Dopico, B., A.L. Lowe, I.D. Wilson, C. Merodio, and D. Grierson: Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Mol. Biol.* 21, 437-449 (1993).
- (7) Sheehy, R.E., J. Pearson, C.J. Brady, and W.R. Hiatt: Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *Mol. Gen. Genet.* 208, 30-36 (1987).
- (8) Niogret, M.-F., M. Dubald, P. Mandaron, and R. Mache: Characterization of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in maize. *Plant Mol. Biol.* 17, 1155-1164 (1991).
- (9) Namba, M., M. Kurose, K. Torigoe, K. Hino, Y. Taniguchi, S. Fukuda, M. Usui, and M. Kurimoto: Molecular cloning of the second major allergen, Cry j II, from Japanese cedar pollen. *FEBS Letters* 353, 124-128 (1994).
- (10) Ohtsuki, T., Y. Taniguchi, K. Kohno, S. Fudaka, M. Usui, and M. Kurimoto: Cry j 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy* 50, 483-488 (1995).
- (11) Collmer, A., and N. T. Keen: The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 383-409 (1986).
- (12) Barras, F., F. van Gijsegem, and A.K. Chatterjee: Extracellular enzymes and soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 201-234 (1994).
- (13) Seymour, G.B. and K.C. Gross: Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News Inf.* 7, 45-52 (1996).
- (14) Wing, R.A., J. Yamaguchi, S.K. Larabell, V.M. Ursin, and S. McCormick: Molecular and genetic characterization of two pollen — expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol.* 14, 17-28 (1989).
- (15) McCormick, S.: Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet.* 7, 298-303 (1992).
- (16) Wu, Y., X. Qiu, S. Du, and L. Erickson: PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa. *Plant Mol. Biol.* 32, 1037-1042 (1996).
- (17) Yatomi, R., S. Nakamura, and N. Nakamura: Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen gymnosperms. *Grana* 41, 21-28 (2002).
- (18) Bradford, M.M.: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248-254 (1976).
- (19) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- (20) Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354 (1979).
- (21) Knox, J.P.: The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 171, 79-120 (1997).
- (22) Knox, J.P., P.J. Linstead, J. King, C. Cooper, and K. Roberts: Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissue of root apices. *Planta* 181, 512-521 (1990).
- (23) Knox, J.P., J. Peat, C. Cooper and K. Roberts: Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J.* 1, 317-326 (1991).
- (24) 水平敏知・長谷川博司・能登谷満: マイクロウェーブ固定法. 生体の科学 42, 148-159 (1991).
- (25) Tamaki H. and S. Yamashina: Improved method for post-embedding cytochemistry using reduced osmium and LR-White resin. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1285-1293 (1994).
- (26) 中村澄夫・三木寿子: 花粉の透過型電子顕微鏡試料作成法. 花粉誌 32, 145-148 (1986).
- (27) Hara, A., H. Yamashita and A. Kobayashi: Isolation of a polysaccharide from the inner cell wall, intine, of pollen of *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.* 18, 381-386 (1977).

-
- (28) Yamada, S, S. Kajita, T. Shiokawa and N. Morohoshi: Isolation and functional analysis of the promoter sequence of the Cry j 1 gene, which encodes a major allergenic protein in the pollen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Plant Biotech.* 20, 241-245 (2003).
- (29) Singh, M.B., T. Hough, P.Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, P.M. Smith, P. Taylor, R.J. Simpsom, L.D. Ward, J. McCluskey, R. Puy, and R.B. Knox: Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1384-1388 (1991).
- (30) Taylor, P.E., R.C. Flagan, R. Valenta, and M.M. Glovsky: Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 109, 51-56 (2002).
-