

〔原 著〕

スギ花粉の主要アレルゲン Cry j 2に対するモノクローナル抗体の作製
—N 末端ペプチド認識抗体との反応性を指標として—
精製した Cry j 2を用いて—

鳥居薬品研究所

本間玲子 上里有史 宮原 淳 木村洋美
 判谷吉嗣 伊藤吾朗 林部 慈 安藤 徹
 猪 好孝 山川洋志 来海正輝

Cry j 2の N 末端10残基のペプチドを化学合成し, hapten-carrier の形でウサギに免疫し抗体 (N-10 抗体)を得た. この抗体は, クロスプロットにより, hapten 部分を認識していることが示された. そこで, この抗体に対する反応性を指標に Cry j 2の精製を試みた. N-10抗体反応物は, 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の条件下, DEAE-Sephadex の非吸着分画に存在した. そこで非吸着分画を集め, 10 mM acetate buffer (pH 5.0) の条件下, CM-Sephadex 処理を行った. 以前の報告とは異なり, CM-Sephadex 吸着分画には N-10抗体反応物は存在せず, 非吸着分画に存在した. 非吸着分画を80%飽和硫酸で濃縮し, これを Superdex pg 200ゲルクロマトグラフィーにかけた. 主要ピークを final preparation とし, SDS-PAGE を実施した. 還元条件下では40kDa の, 非還元条件下では37kDa の明瞭なバンドが認められた. さらにスギ花粉症患者血清中の IgE との反応性を検討したところ, 強いアレルゲン活性が認められた. 以上の成績は, Cry j 2の報告と一致した. このことから, final preparation は Cry j 2である可能性が示唆された. final preparation をマウスに免疫し, モノクローナル抗体を作製した. final preparation と反応する11クローンが得られた. 本クローンが産生する抗体は, Cry j 1とは反応しなかった. 抗体の特異性を確認する目的でウエスタンブロットを実施した. その結果, 本抗体および N-10抗体はいずれも同じ蛋白を認識し, その分子量は40kDa であった. 以上のことから, Cry j 2に対するマウスモノクローナル抗体が得られた可能性が強く示唆された. また, アミノ酸配列が明らかになっている主要アレルゲンの精製には, N-末端ペプチド認識抗体を用いる方法が大変有用であることが示された.

Key words: Cry j 2 — *Cryptomeria japonica* — major allergen — monoclonal antibody
— N-terminal peptide

はじめに

各研究施設で独自に主要アレルゲンを単離しようとする場合, 一般的にアレルゲン活性分子量や等電点な

どの物理化学的性質をもとに精製を行う. しかし, 粗抽出エキス中には主要アレルゲン以外にも多くの蛋白質が存在し, またそれらの多くは多少なりともアレルゲン活性を示すため, その操作にはかなりの困難を伴う.

我々は以前にコナヒョウヒダニの主要アレルゲンである Der f 1および Der f 3が蛋白分解酵素であることを報告した^{1)~4)}. このことにより, 以後はその酵素活性を指標にカラム操作を行えばよく, Der f 1および Der f 3の精製が比較的容易に行えるようになった. このように, 主要アレルゲンを精製する場合, 簡易に測定できるなんらかの特異的マーカーが有れば, その精製操

Received: December 15, 1994

Accepted: March 10, 1995

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; BSA-PBS phosphate buffered saline containing 1% bovine serum albumin; HRPO horse radish peroxidase; KLH keyhole limpet hemocyanin; N-10 the peptide possessing N-terminal 10 amino acid sequence of Cry j 2; T-PBS phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20

作が大変容易になる。

主要アレルゲンのなかには、N末端アミノ酸配列が明らかになっているものがある⁵⁾⁻¹⁰⁾。このような主要アレルゲンの場合、N末端ペプチドを化学合成し、hapten-carrierの形で動物に免疫し、得られた抗体との反応性を指標に各種カラム操作を行えば容易に目的物質が得られるものと考えられた。そこで、今回、我々はスギ花粉中の主要アレルゲンCry j 2のN末端10残基ペプチドに対する抗体を作製し、この抗体の反応性を指標としてCry j 2を精製し、さらにCry j 2に対するマウスモノクローナル抗体を作製したので報告する。

材料および方法

1. N末端10残基ペプチドに対する抗体の作製

Fmoc法を用いるペプチド固相合成法でFmoc-Gly-樹脂から逐次Fmocアミノ酸誘導体を縮合させ、得られた保護ペプチド樹脂をトリフルオロ酢酸/フェノール/エタジオールで処理し、Cry j 2 (1-10)-Cys-OH (N-10)を得た。Lernerら¹¹⁾の報告に準じ、keyhole limpet hemocyanin (KLH)あるいはウシ血清アルブミン (BSA)にm-maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide esterを架橋試薬としてN-10ペプチドを結合した。アミノ酸分析計 (Waters社 Pico TAG アミノ酸分析計)を用いてペプチドの結合量を算出したところ、KLHの場合、蛋白1分子に対してペプチド350分子、BSAの場合ペプチド30分子であった。KLHに結合したN末端ペプチド (KLH N-10) 1mgをCFAとともにウサギ (日本エスエルシー社)に4回免疫し抗血清 (以下N-10抗体と略す)を得た。

2. N-10抗体を用いたdirect ELISA法

96穴マイクロプレート (Immulon II®)の各wellに検体50μlを入れ、室温で一夜放置した。0.05% Tween 20含有のリン酸緩衝液 (T-PBS)で洗浄したのち3%ゼラチン含有リン酸緩衝液を各wellあたり300μl入れ、室温で1時間放置した。wellを洗浄後1%BSA含有リン酸緩衝液 (BSA-PBS)で500倍に希釈したN-10抗体を各wellあたり50μl入れ、室温で2時間放置した。wellを洗浄後、BSA-PBSで10,000倍希釈したhorse radish peroxidase (HRPO)標識抗ウサギIgGヤギ血清 (Cappel社)を50μl入れ、室温で2時間放置した。各wellを洗浄後、0.006%過酸化水素、o-

phenylen-endiamine 0.4mg/ml含有のクエン酸緩衝液 (pH 5.0) 100μlを入れ、室温で30分放置した。2N硫酸100μlを加え酵素反応を停止させ、490nmにおける吸光度を測定した。

3. 電気泳動

Laemmli¹²⁾の方法に準じ、4~20%gradient gel厚さ1.5mmを用いSDS-PAGEを実施した。Lowry法で定量した蛋白量0.7μgの検体を各レーンに入れ、特に断らない限り還元条件下で27mAで90分間泳動した。還元剤としては2-mercaptoethanolを用いた。泳動後Coomassie brilliant blueで染色した。ウェスタンブロットの場合、SDS-PAGEで蛋白を分離した後、180mA、120分間ニトロセルロース膜へ転写した。転写されたニトロセルロース膜を3%ゼラチン含有Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)中にて2時間放置した後、2度洗浄した。一次抗体を加え室温で一夜反応させた後、洗浄し、酵素標識二次抗体を加えた。酵素標識二次抗体としては、HRPO標識抗ウサギIgG (Cappel社)あるいはHRPO標識抗マウスIgG (Cappel社)を用いた。TBSにて洗浄した後、コニカイムノステインHRP-1000®を用いて発色させた。

4. Cry j 2の精製

1990~1993年、千葉県下において採取された*Cryptomeria japonica* D. Don.の花粉を用いた。花粉は、採取後凍結乾燥を行い、使用時まで-80℃で凍結保存した。花粉乾燥重量100gあたり2000mlの125mM炭酸水素ナトリウム液を加え、スターラー攪拌下4℃で一夜抽出を行った。遠心分離 (10000×g, 30分, 4℃)後、上清を分取しスギ花粉粗抽出物とした。粗抽出物からのCry j 2の精製は阪口らの報告⁶⁾および澤谷らの報告¹³⁾に準じて行った。

5. モノクローナル抗体の作製

BALB/cマウス (日本エスエルシー社)の腹腔内にCry j 2 34μgとFCAの混液を2週間に1回、計6回投与し免疫した。最終免疫10日後、脾臓を摘出した。脾細胞とマウス骨髄腫細胞 (Sp2/0-Ag14株)とをpolyethylene glycol (4000)を用い融合させた。HAT培地を用い、非融合細胞を除去した後スクリーニングおよび限界希釈を行った。スクリーニングは、抗原として精製Cry j 1およびCry j 2を、2次抗体としてHRPO標識抗マウスIgG (Cappel社)を用い、実験方法2に従いdirect ELISA法により行った。得られたモノクローナル抗体のサブクラスは、Mouse MonoAB ID Kit® (Zymed社)を用いて確認した。

結 果

1. N-10抗体の特異性

N-10抗体の特異性をクロスブロッキング法により検討した (Fig. 1). 段階希釈したスギ花粉粗抽出物 (crude extract), 精製 Cry j 1, KLH N-10, BSA N-10, BSA の各々をニトロセルロース膜上に結合させた. 次に, これとは直角方向のレーンに段階希釈した N-10抗体 (anti N-10) を反応させた. N-10抗体は, 免疫原である KLH N-10と反応し, carrier 蛋白を変えた BSA N-10とも反応したが, BSA とは反応しなかった. また, この抗体は Cry j 1と反応せず, スギ花粉粗抽出物と反応した. さらに, 使用した抗原液の濃度および抗体液の濃度の両者に依存して発色した.

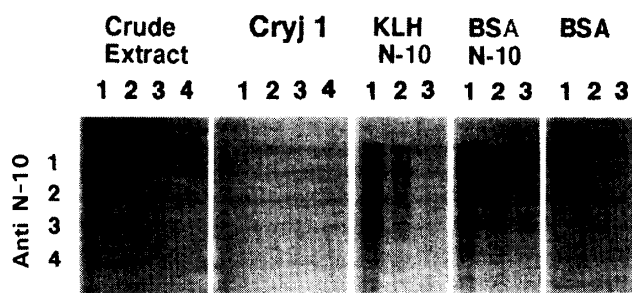


Fig. 1. Cross blot analysis of rabbit antibody to KLH N-10 peptide conjugate (anti N-10). Serially diluted (1~4) antigens were firstly immobilized on nitro cellulose membrane. After blocking and washing, the membrane was incubated with serially diluted (1~4) anti N-10.

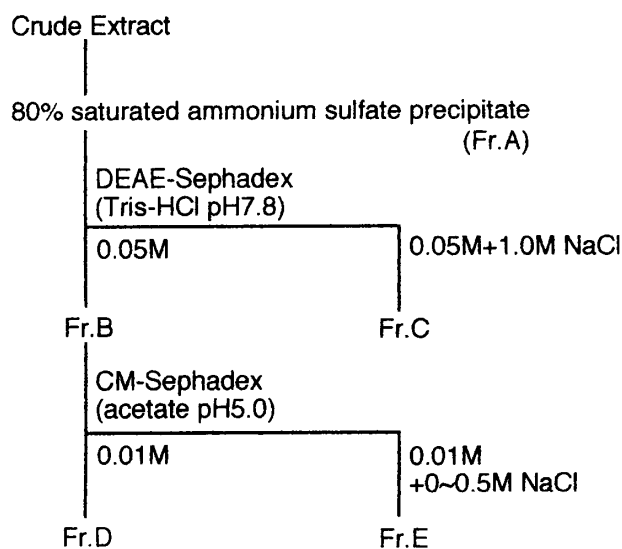


Fig. 2. Isolation procedure of Cry j 2.

2. Cry j 2の精製

以前の報告⁶⁾¹³⁾から Cry j 2は Fr. E に存在することが推測された (Fig. 2). そこで, スギ花粉粗抽出エキスを80%飽和硫酸処理を行い沈殿分画を得た. 次に, 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) にて平衡化した DEAE-Sephadex 樹脂を用い, バッチ法にてこの沈殿分画の陰イオン交換分離を行った. N-10抗体反応物質は DEAE-Sephadex 非吸着分画 (Fr. B) に存在した. これを10mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) にて透析し, 同緩衝液にて平衡化した CM-Sephadex 陽イオン交換クロマトグラフィーを行った. 0~0.5M の NaCl リニアグラジェントにて吸着画分を溶出させた (Fig. 3). NaCl 0.3M で溶出される位置に OD 280のピークと一致して Cry j 1のピークが認められた. しかし, N-10抗体と反応する物質は認められなかった. そこで Fr. A, C, D について N-10抗体に対する反応性を検討した (Fig.

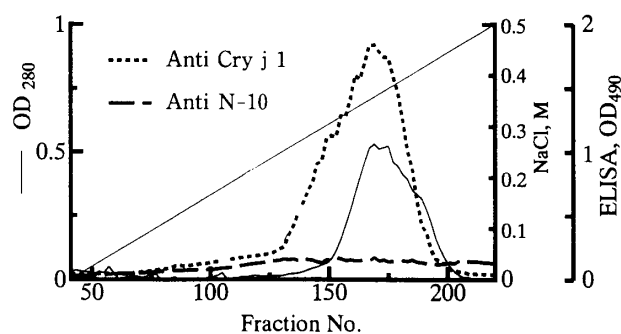


Fig. 3. Elution profile of CM-Sephadex adsorbed protein.

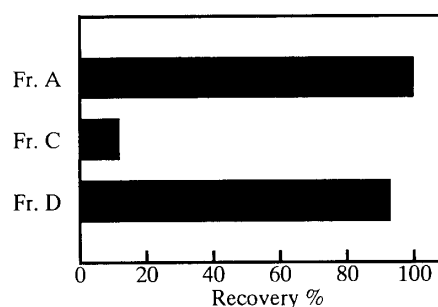


Fig. 4. Reactivity of various fractions to anti N-10 antibody. The protein contents of various fractions were adjusted to 1mg/ml. Serially diluted each fraction was added to microplate. Reactivity to N-10 antibody was measured by direct ELISA. Recovery % was calculated by the following equation. Recovery % = A × B A: fraction volume, B: reciprocal of dilution ratio of each fraction which shows the absorbance 1.0 by direct ELISA.

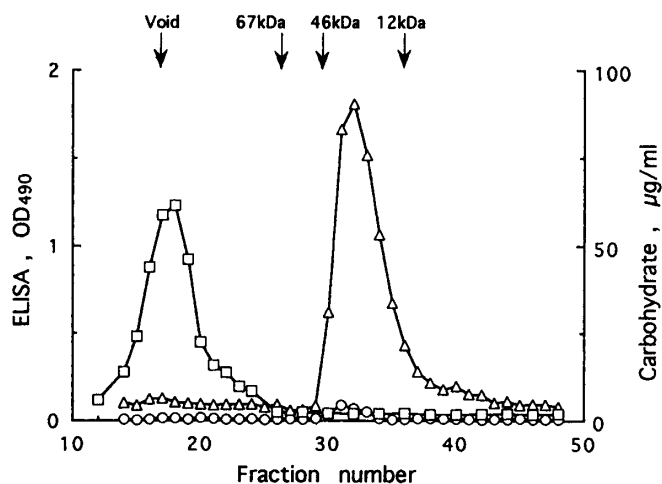
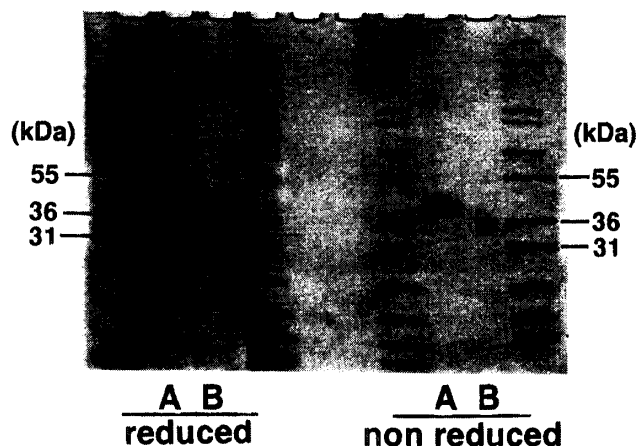


Fig. 5. Superdex pg 200 gel chromatography of the CM-Sephadex unadsorbed fraction. Anti-Cry j 1 (-○-), anti-N10 antibody (-△-), carbohydrate (-□-).

4). 精製の第一段階である, 80%飽和硫酸沈殿分画 (Fr. A) 中に含まれる N-10抗体反応物を100%とすると, この物質の93%は CM-Sephadex 非吸着分画 (Fr. D) に存在した. そこで Fr. D をさらに80%飽和硫酸処理し, 沈殿を分取し, Superdex pg 200ゲルクロマトグラフィーを行った (Fig. 5). N-10抗体と反応する物質は分子量約30kDa の位置に単一ピークを示した. また, Cry j 1のピークは認められなかった. アンスロン硫酸法にて測定した還元糖は, void 分画に存在し, N-10抗体反応物の単一ピーク部分には, 認められなかった. ピーク部分を集め, 濃縮し, final preparation とした. これを 4~20% gradient gel で電気泳動した結果を Fig. 6 に示した. final preparation 中の蛋白質 (N-10抗体反応物) は還元条件下では40kDa の, 非還元条件下では37kDa の位置に単一バンドが認められた.

3. モノクローナル抗体の作製

final preparation (Cry j 2) をマウスに免疫し, マウスモノクローナル抗体を作製した (Table 1). Cry j 2を認識するクローンが11クローン得られた. これらクローンが産生する抗体のサブクラスは 8 クローンは IgG1, 3クローンは IgG2b であり, いずれの抗体も Cry j 1とは反応しなかった. 次に, ウェスタンブロットにより, これらのマウスモノクローナル抗体が認識する物質と N-10抗体が認識する物質との同一性を検討した (Fig. 7). マウスモノクローナル抗体も N-10抗体も分子量40kDa の同一バンドに反応した.



A: purified Cry j 1 B: final preparation

Fig. 6. SDS-PAGE analysis. SDS-PAGE (4-20% gradient gel) was performed under reducing and non-reducing conditions, respectively.

Table 1 List of monoclonal antibodies to Cry j 2 fraction

No.	Clone	Subclass	Purified Cry j 1	Cry j 2 fraction
1	B2	G1	—	+
2	B12	G1	—	+
3	C10	G1	—	+
4	D6	G1	—	+
5	D7	G1	—	+
6	F12	G1	—	+
7	G12	G1	—	+
8	H5	G1	—	+
9	A10	G2b	—	+
10	G2	G2b	—	+
11	G11	G2b	—	+

考 察

最近 Masferrer ら¹⁴⁾は, Cyclooxygenase I と Cyclooxygenase II のそれぞれに特徴的なアミノ酸配列を選び, そのペプチドを化学合成し, これに対する抗体を用いて各々の酵素を測定していた. しかし, このような手法を主要アレルゲンの精製に応用した例はない. Cry j 1及び Cry j 2の N 末端アミノ酸配列は全く異なることが, 報告されている⁶⁾. そこで今回我々は, Cry j 2の N 末端アミノ酸10残基 (N-10ペプチド) を化学合成し, KLH 蛋白に結合させ, これをウサギに免疫し抗体を得た. この抗体は, クロスプロットの結果から hapten 部分を認識していることが確認され

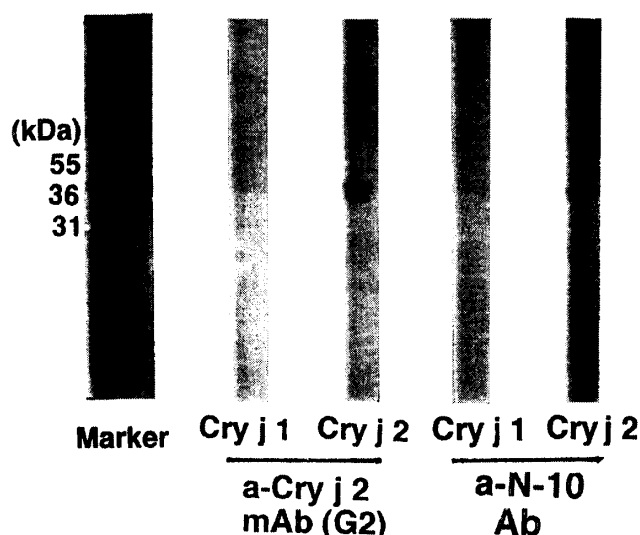


Fig. 7. Western blot analysis. Crude extract was subjected to SDS-PAGE (4-20% gradient gel) under reducing condition. After that, proteins were transferred to nitrocellulose membrane.

た。しかし, hapten 部分に対する抗体力価は弱く, この抗体を用いて直接 Cry j 2 を affinity 精製することは不可能であった。そこで, Fig. 2 に示す精製ステップを設定し, 各ステップでの Cry j 2 の確認に, 同抗体を用いることとした。その結果, N-10 抗体反応物は従来の報告どおり DEAE-Sephadex 非吸着分画に存在した。しかし, CM-Sephadex の場合は報告とは異なり, 非吸着分画に存在した。同分画を 80% 飽和硫酸処理し, 分子量分画を行い, N-10 抗体と反応するピーク部分を集め, final preparation とした。この final preparation 中の還元糖は, 検出限界以下であった。また, N-10 抗体反応物は, SDS-PAGE において, 還元条件下では 40 kDa, また非還元条件下では 37 kDa の分子量を示した。この結果は, Cry j 2 の報告⁶⁾と完全に一致した。さらに, 本結果では示していないが, final preparation はアレルゲン活性を有することが, 確認されている。以上のことから, final preparation は Cry j 2 である可能性が強く示唆された。従来の報告とは異なり, 本実験では Cry j 2 は CM-Sephadex 非吸着分画に存在した。アレルゲンを抽出する場合, 抽出方法(静置抽出, 転倒抽出, 攪拌抽出等)によりその抽出液の組成は大きく異なる。今回の実験では, スターラー攪拌で抽出を行った。そのため, スギ花粉よりアミノ糖がより多く抽出され, CM-Sephadex 樹脂への Cry j 2 の結合を阻害した可能性が一因として考えられた。

一般的に, 主要アレルゲンを精製する場合, モノク

ローナル抗体を用いた, affinity 精製を行うことが多い。そこでこの final preparation を用い Cry j 2 に対するマウスモノクローナル抗体の作製を試みると同時に, 得られたモノクローナル抗体の確認に N-10 抗体を使用した。その結果 Cry j 2 を認識すると考えられるクローンが 11 クローン得られた。ウエスタンブロットにより, これらクローンが産生する抗体と N-10 抗体は同一の蛋白バンドと反応した。また結果では示していないが, N-10 抗体とこれらクローンが産生する抗体との間でサンドイッチ ELISA 系が組めた。以上の結果は, 本モノクローナル抗体が Cry j 2 を認識していることを示している。これらの結果から, アミノ酸配列が明らかになっているアレルゲンの確認およびその同定において, 本法のような hapten-carrier 認識抗体を用いることの有用性が示唆された。

本論文の要旨は, 第 44 回日本アレルギー学会総会(東京)で発表した。

文 献

- 1) Ino, Y., Ando, T., Haida, M., Nakamura, K., Iwaki, M., et al.: Characterization of the proteases in the crude mite extract. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **89**, 321-326, 1989.
- 2) Ando, T., Ino, Y., Haida, M., Homma, R., Maeda, H., et al.: Isolation of cysteine protease in the crude mite extract, *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **96**, 199-205, 1991.
- 3) Ando, T., Homma, R., Ino, Y., Ito, G., Miyahara, A., et al.: Is a trypsin-like protease of mites a *Der f* III allergen? *アレルギー* **41**, 704-707, 1992.
- 4) Ando, T., Homma, R., Ino, Y., Miyahara, A., Yanagihara, T., et al.: Trypsin-like protease of mites: Purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides farinae*, Relationship between trypsin-like protease and *Der f* III. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 777-784, 1993.
- 5) Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., et al.: N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Lett.* **239**, 329-332, 1988.
- 6) Sakaguchi, M., Inouye, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M. and Matuhashi, T.: Identification of the second major allergen of Japanese cedar

- pollen. *Allergy* **45**, 309-312, 1990.
- 7) 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.
 - 8) Komiyama, N., Sone, T., Shimizu, K., Morikubo, K. and Kino, K.: cDNA cloning and expression of *Cry j* II, the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1021-1028, 1994.
 - 9) Mecheri, S., Peltre, G. and David, S.: Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: The Ag Dg1. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **78**, 283-289, 1985.
 - 10) Klysner, S., Welinder, K., Løwenstein, H. and Matthiesen, F.: Group V allergens in grass pollens. IV. Similarities in amino acid compositions and NH₂-terminal sequences of the group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clin. Exp. Allergy* **22**, 491-497, 1992.
 - 11) Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Liu, F.-T., Sutcliffe, J.G. and Shinnick, T.M.: Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3403-3407, 1981.
 - 12) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4 bacteriophage. *Nature* **227**, 680-681, 1970.
 - 13) 澤谷真奈美, 安枝 浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 他: スギ花粉アレルゲン *Cry j* II の免疫学的, 物理化学的性質. *アレルギー* **42**, 738-747, 1993.
 - 14) Masferrer, J.L., Reddy, S.T., Zweifel, B.S., Seibert, K., Needleman, P., et al.: In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 1340-1344, 1994.

PRODUCTION OF A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST *Cry j* 2

Reiko Homma, Naofumi Uesato, Atsushi Miyahara, Hiromi Kimura, Yoshitsugu Hantani,
Goro Ito, Megumi Hayashibe, Thoru Ando, Yoshitaka Ino,
Hiroshi Yamakawa and Masateru Kurumi

Section of Allergology, Research Laboratories, Torii PHARMACEUTICAL CO., LTD.

The peptide possessing N-terminal 10 amino acid sequence of *Cry j* 2 was chemically synthesized and conjugated to KLH-carrier protein. Rabbits were immunized with this haptenized protein and the antibody (N-10 antibody) was obtained. Cross-blot analysis revealed that N-10 antibody recognized the hapten moiety. Purification of *Cry j* 2 was carried out with monitoring its reactivity with N-10 antibody. The substance reactive to N-10 antibody existed in the DEAE-Sephadex unadsorbed fraction. The substance reactive to N-10 antibody was subjected to CM-Sephadex equilibrated with 10 mM acetate buffer (pH 5.0). In contrast to the previous report on *Cry j* 2, the substance reactive to N-10 antibody existed in the CM-Sephadex unadsorbed fraction. The CM-Sephadex unadsorbed fraction was concentrated with 80% saturated ammonium sulfate, and applied to a Superdex pg 200 column. The major peak of protein was regarded as the final preparation and was subjected to SDS-PAGE. The substance reactive to N-10 antibody had a MW of 40 kDa under reducing and 37 kDa under non-reducing conditions, respectively.

Furthermore, the substance reactive to N-10 antibody showed potent allergenic activity. These data completely agreed with the previous data on *Cry j* 2 and strongly suggested that the final preparation contained a large amount of *Cry j* 2. BALB/c mice were immunized intraperitoneally with the final preparation to produce a monoclonal antibody against *Cry j* 2. Eleven clones reacting to the final preparation were obtained, and the antibodies produced from these clones did not react with purified *Cry j* 1. Western blot analysis was performed to confirm whether these clones recognized *Cry j* 2 or not. Both the monoclonal antibody and N-10 antibody reacted with the protein band of 40 kDa. These data suggest that the monoclonal antibodies obtained possess antigen specificity to *Cry j* 2. In conclusion, the antibody recognizing N-terminal peptide is a beneficial tool for the purification of major allergens whose N-terminal amino acid sequences are already determined.