

花粉中の Cry j 2 抽出法の改良及び Cry j 2 含量に おけるスギ個体間変異の検討

¹⁾ 森林総合研究所林木育種センター北海道育種場

²⁾ 国立病院機構相模原病院臨床研究センター

³⁾ 森林総合研究所林木育種センター

福田陽子¹⁾ 安枝 浩²⁾ 齋藤明美²⁾ 近藤禎二³⁾

【目的】近年深刻化しているスギ花粉症の対策として、アレルゲン含量が少ないスギ品種の育成が進められている。花粉中の Cry j 2 含量を評価するため、Cry j 2 含量の抽出法を検討した後、Cry j 2 含量のスギ個体間変異を調査した。

【方法】抽出溶媒の pH、イオン種、塩化ナトリウム濃度及び抽出時間を検討し、効率のよい Cry j 2 抽出法を確立した。この方法により、スギ 140 個体の Cry j 2 含量及び Cry j 1 含量を調査した。

【結果】0.125M 炭酸水素ナトリウム+0.5M 塩化ナトリウム水溶液が、最も Cry j 2 の抽出効率が高いと考えられた。この方法で推定された Cry j 2 含量の平均値と標準偏差は $404 \pm 189 \mu\text{g/g}$ であり、Cry j 1 含量の $435 \pm 169 \mu\text{g/g}$ と同程度であった。

【結論】本研究の方法により、花粉から Cry j 1 と同程度の Cry j 2 が抽出できること、Cry j 2 含量にも Cry j 1 含量と同様に顕著な個体間変異があることが明らかになった。

Key words: clonal variation — *Cryptomeria japonica* — Cry j 2 — Cry j 1 — pollinosis

はじめに

スギ花粉症は現在、日本において最も深刻なアレルギー疾患のひとつである。その主要アレルゲンとして、Yasueda et al. が初めて Cry j 1 (SBP) を単離、同定した後¹⁾、1990 年には Sakaguchi et al. が Cry j 2 を報告しており²⁾、最近では Kawamoto et al., Fujimura et al. が新規のアレルゲンを報告している³⁾⁻⁵⁾。このうち、Cry j 1 及び Cry j 2 についてはサンドウィッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による簡便な定量法が確立されており、これらのアレルゲンの花粉中の含量が採取地や採取年、またはスギの個体によって顕著に異なることが明らかにされている⁶⁾⁻⁹⁾。特に Cry j 1 含量はスギ個体間で顕著に異なるだけでなく、それが遺伝的形質であることも明らかにされていることから⁹⁾¹⁰⁾、林業における花粉症対策の

ひとつとして、アレルゲン含量の少ない品種の選抜と利用が検討されている。Cry j 1 と Cry j 2 は、いずれも高い感作率を示すことから⁶⁾¹¹⁾、花粉症対策を効率的に進めるためには、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量がともに少ないスギを選抜する必要がある。しかし、Cry j 1 と比較して、Cry j 2 含量の個体間変異に関する報告は少ない。その理由のひとつとして、Cry j 2 の抽出量が抽出方法によって大きく変動することが挙げられる。

Cry j 2 は Cry j 1 と同様弱塩基性のタンパク質であることから、既存の研究では、従来 Cry j 1 の抽出に用いられている弱塩基性溶媒により抽出し、その抽出量から花粉中の Cry j 2 含量を推定している⁶⁾⁷⁾。その結果から、Cry j 2 含量は Cry j 1 含量の 10 分の 1 から 3 分の 1 程度であり、Cry j 1 含量と比較して個体間や年次間、採取地間の変動が大きいとされている。しかし、野原ら¹²⁾が花粉を破碎してから 0.125M 炭酸水素ナト

Received: October 13, 2006

Accepted: April 27, 2007

Abbreviation: ELISA enzyme linked immunosorbent assay

福田陽子：森林総合研究所林木育種センター北海道育種場〔〒069-0836 北海道江別市文京台緑町 561-1〕

E-mail: gomama@affrc.go.jp

リウム水溶液により抽出を行ったところ、抽出量は破碎しない場合の約5倍に増加した。その理由として、野原らは、Cry j1 が主に花粉の外壁や表面に付着しているオービクルスに局在するのに対し¹³⁾、Cry j2 が花粉細胞内部のアミロプラスト中のデンプン粒に局在するため¹⁴⁾、花粉細胞を破壊しないと Cry j2 は十分に抽出されない、と推定している。一方、日本アレルギー学会が定めたスギ花粉エキス標準品¹⁵⁾の調製には、50% グリセリン食塩液中セラミックボールとともに振盪抽出するという方法が用いられており、この抽出法では従来の塩基性緩衝液による抽出よりも Cry j2 の抽出量が大幅に増加することが明らかにされている¹⁶⁾。しかし、これらの方法はいずれも、花粉の高圧下での破碎、セラミックボールによる物理的破碎という特殊な方法を用いている。そこで、より一般的な抽出方法で Cry j2 の抽出量を増加させることを目的として予備検討を行った結果、抽出液のイオン強度上昇による Cry j2 抽出効率の向上が示唆されたので、本研究では緩衝液の種類、イオン強度について検討を加えて Cry j2 の抽出方法の最適化を試みた。

まず、ベースとなる溶媒として、既報⁷⁾で使用されている 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液、澤谷ら⁶⁾がそれに加えて比較検討している 0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液、トリス—塩酸緩衝液による抽出量を比較した。また、Cry j2 が静電的な相互作用によりデンプン粒に局在している場合には、等電点付近でその分子間相互作用が低下する可能性がある。Cry j2 の等電点は pI 9-10 と報告されており²⁾⁴⁾、先述の3種の溶媒の pH よりも高めである。そこで、炭酸水素ナトリウム水溶液と炭酸ナトリウム水溶液を 4:1 及び 1:1 の比で混合して pH 9.4 及び 10.1 の炭酸—炭酸水素緩衝液を調製し、これらの溶媒による Cry j2 の抽出量の差異を調べた。次に、抽出効率の高かった溶媒をベースとして最適な塩化ナトリウム濃度を決定した後、抽出時間についても検討した。また、Cry j1 についても、溶媒の種類及び塩濃度が抽出量に与える影響を調べた。これらの結果から最適と考えられた方法によって、関東地方のスギ精英樹 140 個体における花粉中の Cry j1 含量及び Cry j2 含量を調べ、その個体間変異について検討した。

方 法

1. 材料

材料には、林木育種センター（茨城県日立市）内のスギ交配園に植栽されているスギ精英樹 140 個体から採取した花粉を使用した。2001 年 7 月上旬に花粉を採取する個体に対してジベレリン (GA₃, 協和発酵) を用いた着花促進処理を行った。翌 2002 年 2 月に着花枝を採取してグラシン紙製交配袋（東洋理工器）をかけて水挿しし、開葯後花粉を採集した。採集した花粉は 4℃ でシリカゲルと共存下で乾燥させた後、-30℃ で保存した。抽出法の検討には、140 個体のうち 4 個体（足柄下 2 号、県秩父 3 号、多賀 14 号、東加茂 10 号）を使用した。

2. 抽出方法

100mg の花粉に対して 5ml の溶媒を加えて転倒混和し、2℃ で抽出を行った。抽出後、2000×g で 15 分間遠心分離を行い、上澄みを採取して直ちに -30℃ で冷凍保存した。予備実験において、Cry j1, Cry j2 濃度ともに 1 度の凍結・溶解による影響はないことを確認した。

3. Cry j2 の定量

Cry j2 の定量は 2 種類のモノクローナル抗体¹⁷⁾、J2A01 及び J2A07 を用いたサンドウィッチ ELISA 法により行った。一次抗体として J2A07、二次抗体としてビオチン化した J2A01 を使用した。マイクロプレート (Nunc, Denmark) の各ウェルに 0.1M 炭酸ナトリウム—炭酸水素ナトリウム溶媒 (pH 9.6) で 2ng/μl に希釈した J2A07 を加えて 37℃ で 1 時間インキュベートした後、4℃ で一晚吸着させた。次に 1% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS をウェルに加えて 37℃ で 1 時間ブロッキングし、0.2% の Tween 20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄後、0.1% の BSA 及び 0.2% の Tween 20 を含む PBS (PBS-T-BSA) で希釈した精製 Cry j2 標品（和光純薬）及び花粉抽出液を加え、37℃ で 2 時間半反応させた。PBS-T で洗浄後、PBS-T-BSA で 1 ng/μl に希釈したビオチン化 J2A01 を加え、37℃ で 1 時間インキュベートした後、4℃ で一晚反応させた。PBS-T で洗浄後、抗原抗体複合物を PBS-T で洗浄後、ストレプトアビジン標識 β-ガラクトシダーゼ及び o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシドにより検出し、415 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。精製 Cry j2 標品（和光純薬）を 20, 40, 80, 160ng/ml の 4 段階の濃度で 3 反復ずつ測定した結果

Table 1 Comparisons of Cry j 1 extraction, Cry j 2 extraction and percentage of ruptured pollen among six different kinds of buffer. Mean $\pm$ standard error is shown.

tree	buffer	pH	Cry j 1 ($\mu\text{g/g}$)	Cry j 2 ($\mu\text{g/g}$)	% of ruptured pollen
A02	0.125M NaHCO ₃	8.7	201 $\pm$ 3	173 $\pm$ 8	93.4 $\pm$ 2
	0.125M NH ₄ HCO ₃	8.3	202 $\pm$ 20	116 $\pm$ 7	93.6 $\pm$ 4.7
	Tris-HCl	8.7	208 $\pm$ 5	48 $\pm$ 3	93.6 $\pm$ 1.2
	cabonate buffer (4 : 1)	9.4	198 $\pm$ 11	103 $\pm$ 0	84.1 $\pm$ 3.4
	carbonate buffer (1 : 1)	10.1	170 $\pm$ 1	< 20	38.8 $\pm$ 5.4
	0.125M NaHCO ₃ + 0.5MNaCl		204 $\pm$ 9	264 $\pm$ 10	82.8 $\pm$ 2.3
C03	0.125M NaHCO ₃		424 $\pm$ 4	87 $\pm$ 4	98.5 $\pm$ 0.4
	0.125M NH ₄ HCO ₃		421 $\pm$ 14	143 $\pm$ 6	96.1 $\pm$ 3.0
	Tris-HCl		476 $\pm$ 21	< 20	98.8 $\pm$ 0.1
	cabonate buffer (4 : 1)		436 $\pm$ 17	428 $\pm$ 5	92.7 $\pm$ 1.2
	carbonate buffer (1 : 1)		416 $\pm$ 11	266 $\pm$ 0	92.0 $\pm$ 1.8
	0.125M NaHCO ₃ + 0.5MNaCl		458 $\pm$ 1	435 $\pm$ 16	93.1 $\pm$ 0.6
H10	0.125M NaHCO ₃		282 $\pm$ 10	160 $\pm$ 5	97.0 $\pm$ 1.9
	0.125M NH ₄ HCO ₃		311 $\pm$ 5	184 $\pm$ 10	89.5 $\pm$ 0.7
	Tris-HCl		227 $\pm$ 4	23 $\pm$ 1	95.0 $\pm$ 0.1
	cabonate buffer (4 : 1)		328 $\pm$ 6	254 $\pm$ 6	96.8 $\pm$ 0.4
	carbonate buffer (1 : 1)		275 $\pm$ 9	188 $\pm$ 8	78.8 $\pm$ 2.7
	0.125M NaHCO ₃ + 0.5MNaCl		242 $\pm$ 33.6	314 $\pm$ 21	90.0 $\pm$ 1.7

A02: Ashigarashimo 2, C03: Chichibu 3, H10: Higashikamo 10

により標準曲線を描き、花粉抽出液を 100 倍, 200 倍, 400 倍, 800 倍の 4 段階に希釈して各 2 反復ずつ測定した結果から花粉抽出液中の Cry j 2 濃度を推定した。結果には、花粉抽出液中の Cry j 2 濃度を花粉 1g あたりの Cry j 2 抽出量に換算して示した。

4, Cry j 1 の定量

Cry j 1 はモノクローナル抗体 J1B01 を一次抗体, ビオチン化した抗 Cry j 1 ウサギ IgG を二次抗体とするサンドウィッチ ELISA 法により定量した¹⁸⁾。手順は Cry j 2 の定量とほぼ同じであり、変更点は以下の通りである。1) スギ花粉標準品¹⁴⁾を一次スタンダードとして Cry j 1 濃度を決定した二次スタンダードを使用し、濃度は 8.13, 4.06, 2.03, 1.02ng/ml として標準曲線を描いた。2) 花粉抽出液の希釈倍率は 800 倍, 1600 倍, 3200 倍, 6400 倍とした。3) 一次抗体と Cry j 1 との反応時間を 2 時間とした。4) ビオチン化二次抗体を 0.25ng/ μl に希釈して使用した。

5, 花粉の脱皮率の計測

抽出後、溶媒中に花粉を分散させた後、スライドガラスに溶媒を滴下して花粉を酢酸カーミンで染色し、カバーガラスをかけて観察した。1 回当たり花粉総数 70~140 粒程度について、脱皮しているか否かを調べた。観察は 3 回繰り返した。

結 果

1, 溶媒及び塩化ナトリウム濃度が Cry j 2 抽出量に与える影響

足柄下 2 号, 県秩父 3 号, 東加茂 10 号の 3 個体の花粉を使用して、溶媒による Cry j 2 抽出量の比較を行った。使用した溶媒の種類と、抽出時の温度である 2℃で測定した pH を Table 1 に示した。抽出は 2 反復ずつ行い、Cry j 2 抽出量の平均値と標準誤差を Table 1 に示した。県秩父 3 号と東加茂 10 号は、炭酸—炭酸水素緩衝液 (pH9.4) で最も抽出量が多かったのに対し、足柄下 2 号では 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液が最も高い抽出量を示した。この結果に基づき、炭酸—炭酸水素緩衝液 (pH9.4) と 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて、塩化ナトリウム濃度の検討を行った。これらの溶媒に 0.25M, 0.5M 及び 1M の塩化ナトリウムを加えた溶媒を用いて Cry j 2 を抽出した。その抽出量を Fig.1 に示した。0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液をベースとした場合、いずれの個体においても塩化ナトリウム濃度が 0.5M のときに最も抽出量が多く、1M では抽出量が低下した。炭酸—炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH9.4) をベースとした場合、県秩父 3

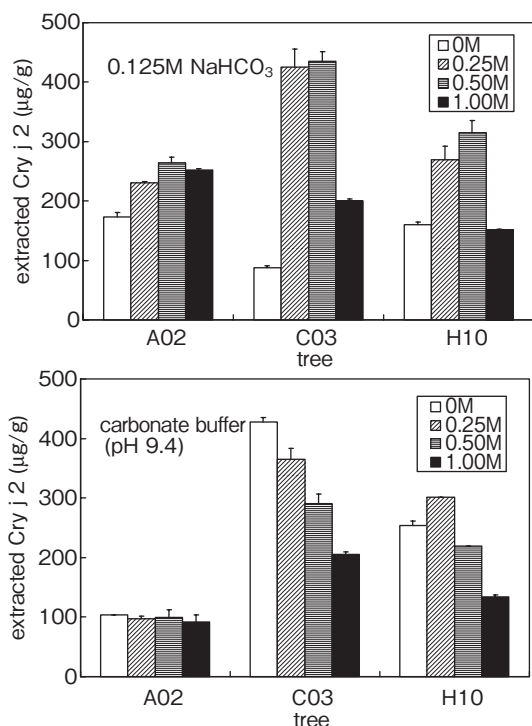


Fig. 1. Effects of NaCl concentration on Cry j 2 extraction. (A02: Ashigara-shimo 2, C03: Chichibu 3, H10: Higashikamo 10)

号と東加茂 10 号では塩化ナトリウムを加えないときに最も抽出量が多く、塩化ナトリウム濃度が上昇すると抽出量が低下した。足柄下 2 号では、塩化ナトリウムの添加の影響は認められなかった。いずれの個体においても 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液に 0.5M の塩化ナトリウムを加えた溶媒 (0.125M 炭酸水素ナトリウム + 0.5M 塩化ナトリウム水溶液) による抽出量が最も多かったため、この溶媒が Cry j 2 の抽出に最適であると判断した。

2. 溶媒による花粉の脱皮率の比較

各溶媒で抽出したときの脱皮率を Table 1 に示した。0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液、0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液、トリス-塩酸緩衝液、炭酸-炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 9.4) 及び 0.125M 炭酸水素ナトリウム + 0.5M 塩化ナトリウム水溶液で抽出した場合、いずれの個体の花粉においても高い脱皮率が認められた。炭酸-炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 10.1) による抽出では、足柄下 2 号の脱皮率が著しく低く、39% であった。

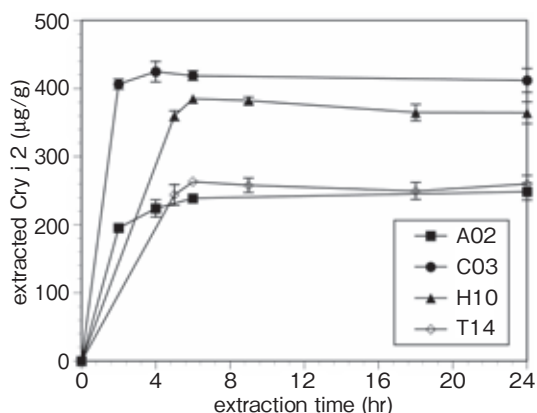


Fig. 2. Changes of Cry j 2 extraction with time. (A02: Ashigara-shimo 2, C03: Chichibu 3, H10: Higashikamo 10, T14: Tago 14)

3. 抽出時間による Cry j 2 抽出量の変化

0.125M 炭酸水素ナトリウム + 0.5M 塩化ナトリウム水溶液により抽出した場合の、2 時間から 24 時間までの抽出量の変化を調べ、Fig. 2 に示した。足柄下 2 号、県秩父 3 号の 2 個体を用いて抽出開始後 2 時間、4 時間、6 時間、24 時間、東加茂 10 号、多賀 14 号の花粉を用いて抽出開始後 5、6、9、24 時間における Cry j 2 抽出量を調べた。その結果、抽出後 6 時間までは抽出量が増加するが、その後はほとんど変化がないことが明らかになった。したがって、抽出時間は 6 時間以上がよいと判断し、Cry j 2 含量の個体間変異を調査するにあたり、抽出時間は 24 時間とした。

4. Cry j 1 抽出量の検討

Cry j 2 の抽出で検討した pH の異なる溶媒 (0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液、トリス-塩酸緩衝液、炭酸-炭酸水素ナトリウム緩衝液) 及び Cry j 2 の抽出効率が最も高かった 0.125M 炭酸水素ナトリウム + 0.5M 塩化ナトリウム水溶液による Cry j 1 抽出量を調べた。いずれにおいても、抽出時間は 24 時間とした。その結果、Cry j 2 と異なり、Cry j 1 抽出量はいずれの溶媒を用いても顕著な差異はなく、ほぼ一定であった (Table 1)。この結果から、Cry j 1 も Cry j 2 と同じく 0.125M 炭酸水素ナトリウム + 0.5M 塩化ナトリウム水溶液を用いて抽出できることが明らかになった。

5. 花粉中の Cry j 1 含量及び Cry j 2 含量の個体間変異

140 個体のスギ精英樹の花粉から 0.125M 炭酸水素

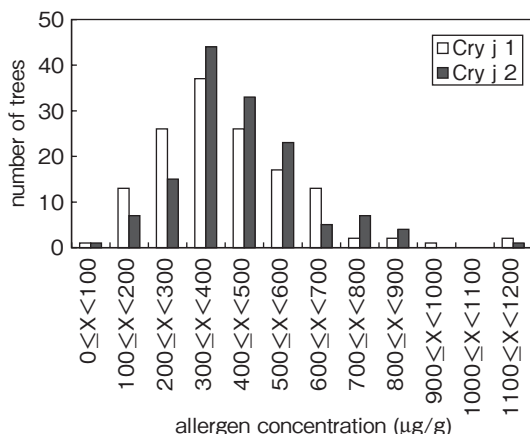


Fig. 3. Variation of Cry j 2 concentration in pollen among 140 trees.

ナトリウム+0.5M塩化ナトリウム水溶液を用いて Cry j 1 及び Cry j 2 を抽出し、花粉中の Cry j 1 含量及び Cry j 2 含量の変異を調べた。その頻度分布を Fig.3 に示した。花粉 1g あたりの Cry j 1 含量の最小値は 81 μg, 最大値は 1131μg, 平均値及び標準偏差は 435 ± 169 μg であったのに対し、Cry j 2 含量の最小値は 59μg, 最大値は 1146μg, 平均値及び標準偏差は 404 ± 189 μg であり、スギ花粉中には Cry j 1 と同程度の Cry j 2 が含まれていることが明らかになった。また、いずれも平均値付近をピークとする山型の分布を示し、最大値と最小値では Cry j 1 では 14 倍、Cry j 2 では 20 倍の差があることが明らかになった。また、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量の相関係数は 0.60 であり、1% 水準で有意な正の相関が認められた (Fig. 4)。

考 察

本研究において、筆者らは多数のスギを対象に Cry j 2 含量の変異を明らかにするため、簡便で効率のよい Cry j 2 の抽出法の確立を試みた。その結果、従来用いられていた弱塩基性溶媒に塩化ナトリウムを加えることによって、特殊な機器を使用せずに Cry j 2 の抽出効率を大幅に向上させ得ることが明らかになった。また、pH や塩化ナトリウムの濃度の組み合わせにより Cry j 2 の抽出量が大きく変化し、その傾向がスギの個体によっても異なったことから、Cry j 2 の溶出には様々な要因が関与すると考えられる。

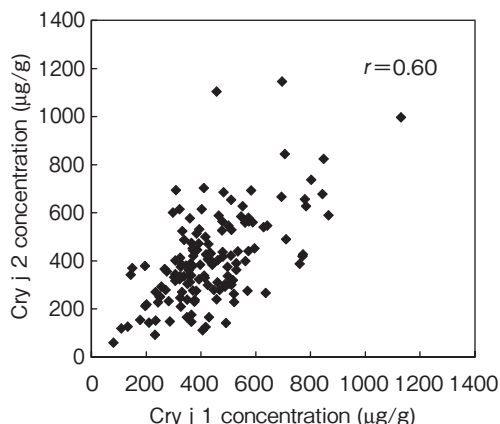


Fig. 4. Correlation between Cry j 1 and Cry j 2 concentration in pollen.

既報¹⁵⁾でも、酸性や中性の溶媒では Cry j 2 はほとんど溶出されず、弱塩基性溶媒で最も多量の Cry j 2 が溶出されることが明らかにされている。その理由のひとつとして、花粉の脱皮現象が弱塩基性の溶媒中で顕著であることが考えられる¹⁵⁾。また、澤谷ら⁶⁾は3種の弱塩基性溶媒 (0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液, 0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液, トリス—塩酸緩衝液) の間で、Cry j 2 の抽出量に差がなかったことを報告している。本研究では当初、確認のためにこれらの溶媒における Cry j 2 の抽出量を比較した後、最適と考えられる溶媒をベースとして塩化ナトリウム濃度を検討する予定であった。しかし、澤谷らの結果とは異なり、これらの弱塩基性溶媒の間で Cry j 2 の抽出量が顕著に異なったことから、溶媒の溶質及び pH が Cry j 2 の抽出量に与える影響について、さらに検討することにした。また、光学顕微鏡により溶媒中の花粉の形態を観察するとともに脱皮率を求め、花粉の形態の変化と Cry j 2 の抽出量の関係についても調べた。

0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液とトリス—塩酸緩衝液は pH がほぼ同じであるが、抽出量は著しく異なっており、特にトリス—塩酸緩衝液での抽出量は少なかった。塩濃度が影響している可能性も考え、トリス—塩酸緩衝液に 0.125M 塩化ナトリウムを加えた溶媒による抽出も行ったが、Cry j 2 の抽出量はわずかに増加したものの、他の2種の溶媒による抽出量には及ばなかった(データ示さず)。すべての溶媒中で、ほぼ 90% 以上の花粉が脱皮していたことから、0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液とトリス—塩酸緩衝液にお

る Cry j 2 抽出量の差異は、花粉の脱皮率の差異によるものではないことが明らかであり、溶媒に含まれているイオンの種類が影響を及ぼしている可能性が考えられる。一方、炭酸—炭酸水素緩衝液 (pH10.1) を用いて足柄下 2 号の花粉から Cry j 2 を抽出した時、花粉の脱皮率と Cry j 2 抽出量がいずれも極端に低かった。これらの結果から、Cry j 2 の抽出には花粉の脱皮が不可欠であるが、それだけでは十分ではなく、溶媒の性質も重要な要因であると考えられる。また、0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH8.7) 及び炭酸—炭酸水素緩衝液 (pH 9.4) に異なる濃度の塩化ナトリウムを加え、Cry j 2 抽出量を比較した結果、塩化ナトリウム濃度が Cry j 2 抽出量に顕著に影響することが明らかになった。最も Cry j 2 抽出量が多かったのは 0.125M 炭酸水素ナトリウム + 0.5M 塩化ナトリウム水溶液であり、抽出量は塩化ナトリウムを加えなかった場合と比較して 1.5~5 倍増加した。一方、炭酸—炭酸水素緩衝液 (pH9.4) では、塩化ナトリウムを加えないときに Cry j 2 抽出量が最も多い傾向が認められた。これらの 2 種類の溶媒は構成イオン種が同じであるものの、最適な塩化ナトリウム濃度が異なったことから、pH と塩濃度の組み合わせによって Cry j 2 抽出量は大きく変化すると考えられる。また、既報において、花粉を破碎処理した上で弱塩基性バッファー及び 50% グリセリン食塩液を用いて抽出したときの Cry j 2 抽出量は 110~130 $\mu\text{g/g}$ ¹²⁾ 及び 200~360 $\mu\text{g/g}$ であり¹⁶⁾、スギの個体による差はあるものの、本研究で得られた Cry j 2 抽出量の方が多い傾向にあったことから、抽出バッファーを最適化することによって Cry j 2 を簡便かつ効率的に抽出できることが明らかになった。

Cry j 2 の等電点は pI 9~10 と報告されている²⁾⁴⁾。Cry j 2 の抽出量が等電点付近で増加すること、さらにイオン強度やイオン種に影響を受けることから、デンプン粒上の Cry j 2 と結合している物質と Cry j 2 との間には静電的引力や水素結合、あるいは疎水の結合といった分子間相互作用が存在し、その相互作用が低下する条件下で Cry j 2 が抽出されてくると考えられる。その場合、等電点異なるアイソフォーム間では抽出に最適な条件が異なる可能性がある。Fujimura et al.⁴⁾ が Cry j 2 には等電点異なるアイソフォームが存在することを報告していることから、足柄下 2 号は他の 2 個体とは等電点異なるアイソフォームを生産しているために、抽出の傾向が異なったのかもしれない。一方、Cry j 1 においては、溶媒の pH や塩濃度による

抽出量の変化が小さかった。この結果は既報⁶⁾と一致するものであり、弱塩基性の溶媒であれば、Cry j 1 はほぼ全量を抽出可能であることが確認できた。このように Cry j 1 と Cry j 2 が異なる挙動を示す理由は明らかではないが、それぞれの局在だけではなく、機能も関係するのかもしれない。Cry j 1 の機能は、受粉後、吸水時の外壁と内壁の分離を助けることであると推定されているため¹⁴⁾、外壁やオービクルスに局在する必要性が低く、局在を決定する分子間相互作用が弱いかもしれない。Cry j 2 については、成熟花粉及び発芽花粉のデンプン粒に局在すること¹³⁾、メチルガラクトロナーゼの機能を持つことが明らかにされているものの¹⁹⁾、花粉の形成や発芽においてどのような役割を果たしているのか明らかにされていない。しかし、中村ら¹³⁾が推定しているように、Cry j 2 がデンプン粒の形成・分解に関与しているとすれば、Cry j 2 のデンプン粒における局在は、機能を果たす上での必要条件であるだろう。

今回確立した方法によって、単位花粉重量あたりの Cry j 1 含量及び Cry j 2 含量のスギ精英樹 143 個体における個体間変異を調査した結果、花粉 1g あたりの Cry j 1 含量の平均値は 435 μg 、Cry j 2 含量の平均値は 404 μg であり、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量は同程度であった。また、標準偏差は Cry j 1 含量が 169、Cry j 2 含量が 189 であった。佐々木ら⁷⁾が 22 個体における Cry j 1 含量及び Cry j 2 含量における変異を調査した結果では、Cry j 1 含量の平均値は 143 μg 、Cry j 2 含量の平均値は 48 μg であり、Cry j 2 含量は Cry j 1 含量よりも小さく、変異が大きかった。また、澤谷ら⁶⁾は異なる年次、産地で採取した花粉中の Cry j 1 含量及び Cry j 2 含量を調査し、Cry j 1 含量は概ね 350 μg 程度で変動が小さく、Cry j 2 含量は 29~140 μg と Cry j 1 含量と比較して少ないものの、変動が大きかったことを報告している。しかし、本研究の結果では、Cry j 2 含量は Cry j 1 含量と同程度であり、その変異も同程度であった。鼻粘膜上で溶出する Cry j 2 の量は Cry j 1 と比較して少ないと推定されているが¹²⁾²⁰⁾、花粉症患者の Cry j 2 に対する IgE 抗体保有率は Cry j 1 に対する IgE 抗体保有率と同程度であることを考慮すると⁶⁾¹¹⁾、Cry j 1 と同程度の Cry j 2 が鼻粘膜上で溶出している可能性もあるだろう。本研究で検討した Cry j 2 の抽出条件は、花粉症患者の鼻汁や鼻粘膜上で Cry j 2 が溶出する機構を考察する上で十分なものではないが、鼻汁の性状によっては花粉細胞が破壊され

なくとも Cry j 1 と同程度の Cry j 2 が溶出する可能性を支持するものである。また、Cry j 2 のアレルゲンとしての重要性が、量的な面からも明らかになったことから、アレルゲン含量の少ない品種を選抜する際には、Cry j 1 含量とともに Cry j 2 含量も考慮する必要がある。Cry j 1 含量と Cry j 2 含量の間には有意な正の相関が認められたことから、いずれもが少ない品種を選抜できるものと期待される。

文 献

- 1) Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, Shida T. Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 77-86.
- 2) Sakaguchi M, Inouye S, Taniyai M, Ando S, Usui M, Matuhasi T. Identification of the second major allergen of Japanese cedar. *Allergy* 1990; 45: 309-12.
- 3) Kawamoto S, Fujimura T, Nishida M, Tanaka T, Aki T, Masubuchi M, et al. Molecular cloning and characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant isoflavone reductase family. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1064-70.
- 4) Fujimura T, Shigeta S, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, et al. Two-dimensional IgE-binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133: 125-35.
- 5) Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, et al. Molecular cloning of a class IV chitinase allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and competitive inhibition of its immunoglobulin E-binding capacity by latex C-serum. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 234-43.
- 6) 澤谷真奈美, 安枝 浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 白井美津子, 他. スギ花粉アレルゲン Cry j II の免疫学的, 物理学的性質. *アレルギー* 1993; 43: 738-47.
- 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. *大分県林試研究時報* 1996; 22: 8-12.
- 8) 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. *花粉誌* 1999; 45: 149-52.
- 9) 斎藤真己, 寺西秀豊, 平 英彰. 全国 25 道県におけるスギ花粉アレルゲン—Cry j 1—量の変異と遺伝率の推定. *日林誌* 2003; 85: 312-7.
- 10) Goto Y, Kondo T, Hayashi E, Kuramoto N, Takahashi M, Yasueda H. Influences of genetic and environmental factors on the concentration of the allergen Cry j 1 in sugi (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Tree Physiol* 24: 409-14.
- 11) Hashimoto M, Nihi H, Sakaguchi M, Inouye S, Imaoka K, Miyazawa H, et al. Sensitivity to two major allergens (Cry j I and Cry j II) in patients with Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 848-52.
- 12) 野原 修, 今井 透, 遠藤朝彦, 実吉健策, 大森剛哉, 斎藤三郎, 他. スギ花粉粒子の形態的变化と主要抗原の溶出との関係. *アレルギー* 1997; 46: 1235-42.
- 13) Miki-Hiroshige H, Nakamura S, Yasueda H, Shida T, Takahashi Y. Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex Plant Reprod* 1994; 7: 95-100.
- 14) 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* 2004; 50: 15-22.
- 15) 日本アレルギー学会アレルゲン検討委員会. 委員会報告—我が国におけるアレルゲン標準化の基本方針とスギ花粉アレルゲンエキスの標準化—. *アレルギー* 1996; 45: 416-21.
- 16) 安枝 浩. スギ花粉症とスギ・ヒノキ科花粉のアレルゲン. *花粉誌* 2000; 46: 29-38.
- 17) Yasueda H, Saito A, Sakaguchi M, Ide T, Saito S, Taniguchi Y, et al. Identification and characterization of a group 2 conifer pollen allergen from *Chamaecyparis obtusa*, a homologue of Cry j 2 from *Cryptomeria japonica*. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 546-50.
- 18) Goto Y, Kondo T, Ide T, Yasueda H, Kuramoto N, Yamamoto K. Cry j 1 isoforms derived from *Cryptomeria japonica* trees have different binding properties to monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1754-61.
- 19) Ohtsuki T, Taniguchi Y, Kohno K, Fukuda S, Usui M, Kurimoto M. Cry j 2, major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy* 1995; 50: 483-8.
- 20) 野原 修. スギ花粉からの主要抗原溶出に対する鼻汁の影響—in vitro における抗原溶出に影響を与える諸因子について—. *耳展* 1996; 39: 483-95.

INVESTIGATION OF THE VARIATION OF CRY J 2 CONCENTRATION IN POLLEN AMONG SUGI
(*CRYPTOMERIA JAPONICA* D. DON) TREES USING A NEWLY ESTABLISHED
EXTRACTION METHOD

Yoko Goto-Fukuda¹⁾, Hiroshi Yasueda²⁾, Akemi Saito²⁾ and Teiji Kondo³⁾

¹⁾ *Hokkaido Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute*

²⁾ *Clinical Research Center, National Hospital Organization, Sagamihara Hospital*

³⁾ *Forest Tree Breeding Center, Forest and Forest Products Research Institute*

Background: Selection of low-allergen trees is under consideration for the reduction of Sugi (*Cryptomeria japonica*) pollinosis. The extraction method of Cry j 2 was established and then the variation of Cry j 2 concentrations in pollen among Sugi trees was investigated.

Methods: The extraction efficiency of Cry j 2 was compared among buffers with different pH, ionic species and NaCl concentration. The Cry j 2 concentration in the pollen of 140 trees was measured using the most efficient buffer.

Results: NaHCO₃ (0.125 M) + 0.5 M NaCl buffer showed the highest Cry j 2 extraction efficiency. The mean and standard deviation of Cry j 2 concentration among 140 trees was $404 \pm 189 \mu\text{g/g}$ pollen, which was equivalent to that of Cry j 1 ($435 \pm 169 \mu\text{g}$).

Conclusion: We revealed that the variation of Cry j 2 concentrations was as large as that of Cry j 1 in the pollen among trees using the newly developed extraction method.
