

オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの クローニングと大腸菌での発現

奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

吉川 恒 男

CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSION IN *Escherichia coli* OF THE MAJOR ALLERGEN FROM ALDER (*Alnus sieboldiana*) POLLEN

TSUNEO YOSHIKAWA

Department of Otorhinolaryngology, Nara Medical University

Received October 14, 1998

Abstract: Pollen of the alder (*Alnus sieboldiana*) is one of the main causes of Type I allergies in Japan, especially in densely cultivated areas. cDNA clones coding for the major alder pollen allergen, Aln s 1, were isolated. The clones contained an open reading frame of 477 nucleotides. Comparison of the deduced amino acid sequence of Aln s 1 to the major allergens from Betulaceae pollen such as Aln g 1, Bet v 1, Cor a 1 and Car b 1 showed identities of 95.8 %, 87.6 %, 85.1 %, and 85.7 %, respectively. The Aln s 1-encoding cDNA was ligated into expression plasmid, pKP 1500, and expressed in *Escherichia coli* as a full-length nonfusion protein. The recombinant protein was able to bind specific IgE antibodies present in sera of alder pollen-allergic subjects. However, COOH terminally truncated form of Aln s 1 had no IgE-binding capacity.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 453~464, 1998)

Key words: alder pollen, cDNA cloning, expression, major allergen, recombinant allergen

はじめに

北ヨーロッパでは、カバノキ科植物の花粉はアレルギー疾患の主な発生源である¹⁾。日本、特にそれが密に植林されている地域においても、カバノキ科植物であるオオバヤシャブシ (*Alnus sieboldiana*) が産生する花粉は I 型アレルギーの重要な原因となっている²⁾。

アレルゲンエキスの標準化には主アレルゲンの同定が欠かせないことから、共同研究者の衛藤はオオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンについて検討し、それが分子量 17 kDa, 等電点 5.7 のタンパク質であることを報告した³⁾。彼はまた、オオバヤシャブシ花粉症患者の約 90 % の血清中 IgE 抗体がこの主アレルゲンと結合したとも述べている。

しかし、この主アレルゲンをさらに特徴づけるために、

近年急速な進歩を遂げた、cDNA クローニング、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, 以下 PCR) などの分子生物学的手技を用いて全塩基配列を決める報告が増えてきた。

そこで、衛藤の研究をさらに進め、これら分子生物学的手技によりオオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの全塩基配列を決定するとともに、発現させた組換え体 (以下, recombinant) タンパク質が同花粉症患者血清中の IgE 抗体と特異的に結合し得るかどうかの検討を目的として実験をおこなった。またその過程で、C 末端から 16 個のアミノ酸残基が欠損した clone を得たので、これから発現させた recombinant protein とオオバヤシャブシ花粉症患者の IgE 抗体との反応から、そのタンパク質がもつ C 末端構造の意義を検討したのであわせて報告する。

1962 年から 1964 年にかけて King らはブタクサ花粉

の主アレルゲンを分離し、これを AgE と名づけた^{4,5)}。その後、I 型アレルギー疾患の原因となる種々の物質についてアレルゲン分析がおこなわれるようになったが、各研究者が精製したアレルゲンにそれぞれ独自に命名したためかなり混乱を生じていた。そこで、WHO の International Union of Immunological Societies (IUIS) Sub-Committee は 1986 年、命名法の統一を提唱した⁶⁾。それは、高度に精製されたアレルゲンについては、属名の最初の 3 字、スペース、種名の最初の 1 字、スペース、数字 1 字(アレルゲンが精製・分離された順に)とすることであった。各研究者はこれにしたがひ、ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*) 花粉の AgE はその後 Amb a 1 と呼ばれている。同 Committee はこのとき、精製されたアレルゲンの条件として、分子量、等電点、免疫化学的性質、疎水性、N 末端・C 末端のアミノ酸配列、アミノ酸組成を決定する必要があるとしていた。しかし、前述のように進歩した分子生物学的手法によって全塩基配列を決定することによりアレルゲンを特徴づけられることから、同 Committee は 1994 年、アレルゲンの命名に際し、前記条件ではなく、可能であれば全塩基配列を決定することを求めている⁷⁾。

オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの全塩基配列を決定した報告はこれまでにないことと、本論文の簡明化を期して、以下、このアレルゲンを Aln s 1 と呼ぶことにする。

材 料

1. 制限酵素は宝酒造(天津市)と New England Biolabs Inc. のものを、T 4-ligase は Toyobo の Ligation High™ を用いた。発現 vector には Miki らが構築した pKP 1500⁸⁾ を用いた。塩基配列の決定には、plasmid vector として pUC 18 と、Marathon™ cDNA Amplification Kit (CLONTECH Lab. Inc.) を使用した。

RNA LA PCR Kit (AMV) と DNA Blunting Kit は宝酒造から購入した。Table 1 に示した oligonucleotide primer は宝酒造に合成を依頼した。他の化学薬品は市販の特級を使用した。

2. オオバヤシャブシ花粉は、表六甲山麓で開花直前の雄花が豊富な小枝を切り取り、既報⁹⁾ のように他の汚染物質がない状態で採集し、使用まで -80℃ に保存した。

3. 血清

患者血清は、オオバヤシャブシ開花期にくしゃみ発作、水性鼻汁、鼻閉、眼のかゆみなどのいわゆる花粉症症状を有し、オオバヤシャブシ花粉から抽出したアレルゲンエキスによる皮膚試験および radioallergosorbent test (RAST) が陽性の 42 名から得た。また、このうち IgE 抗体価の高い (RAST クラスが 3 以上) 15 名の血清を等量ずつ混和してプール血清とした。対照として、花粉症症状がなく、RAST がオオバヤシャブシ花粉エキスに陰性の 3 名の血清を用いた。これらの血清は、使用まで -80℃ に保存した。

方 法

オオバヤシャブシ花粉から mRNA を精製し、cDNA の合成から主アレルゲンの発現とその全塩基配列決定に至る手順を Fig. 1 に示した。

以下、それぞれについて述べる。

1. total RNA の抽出

total RNA 抽出の flow chart を Fig. 2 に示した。1 g の凍結成熟花粉から 1.7 mg の total RNA を得た。

2. mRNA の分離、精製

mRNA の分離、精製には JSR (Tokyo) のキットを用いた。その flow chart を Fig. 3 に示した。1.7 mg の total RNA から 20 μg の精製 mRNA が得られた。RNase free の蒸留水に溶解した精製 mRNA を使用まで -80℃ に保存した。

Table 1. Nucleotide sequence of oligomers used in the PCR

Name	Nucleotide sequence
OY-F1	5'-ATGGGTGTTTTCAATTACGAACACGAAACXCC-3'
OY-R1	5'-TTAGTTGTAGGCATCAGAGTGXGC-3'
OY-GSP-1	5'-TCATGGTCGCCTTTGGTGTGGTACTT-3'
OY-GSP-2	5'-GTACGTAAAGGAGAGGGTTGATGAGG-3'
OY-F2	5'-ATGGGAATTTTCAATTACGAGGCTGAG-3'
ACDT25	5'-TTCTAGAATTCAGCGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTN-3'
OY-F3	5'-ATGGGTGTTTTCAATTACGAGGCAGAGACC-3'
OY-R4	5'-AATTAAGCTTAATTTAGTTGTAGGCATC-3'
1500FWD	5'-CGTTCGTATTTAATCTGTATCAGGC-3'
1500RV	5'-CTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAG-3'

3. Reverse transcription and PCR(RT-PCR)

RT-PCRにはRNA LA PCR Kitを用い、そのプロトコールにしたがってcDNAを合成した。

3-1. 逆転写反応

オオバヤシャブシと同じハンノキ属の植物であり、すでにその全塩基配列が決められた *Alnus glutinosa* 花粉主アレルゲン(Aln g 1)¹⁰⁾の3'末端塩基配列を参考にして primer OY-R1を合成した。Kit付属の各試薬に primer OY-R1, mRNA 50 ng と AMV 逆転写酵素を加えて全量を20 μ lとし、これに mineral oil 50 μ lを重層したのち、50°C 30分、99°C 5分のプログラムで1本鎖cDNAを合成した。

3-2. PCR

逆転写反応で得た1本鎖cDNAを鋳型(template)とし、衛藤が報告³⁾したN末端アミノ酸配列を参考にして合成した primer OY-F1を用い、94°C 2分、94°C 30

秒、55°C 1分、72°C 3分を40 cycle反応させることによって2本鎖cDNAを得た。

4. 塩基配列の決定

1.2%アガロースゲル電気泳動において、上記RT-PCR産物は約500 base pairs(bp)の単一バンドを呈した。これは natural Aln s 1の分子量にほぼ等しく、主アレルゲンをcodeしていると考えられたことから、この産物を以下の実験に使用した。

Sma Iで切断した plasmid vector pUC 18にPCR産物を連結し、competent cellである大腸菌 JM 109に導入してこれを形質転換した。recombinant cDNAがクローン化したことを確認後、その塩基配列を調べた。塩基配列の決定には、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)と、M 13 forward and reverseの両 primerを用いた。

5. Rapid Amplification of cDNA Ends(RACE)

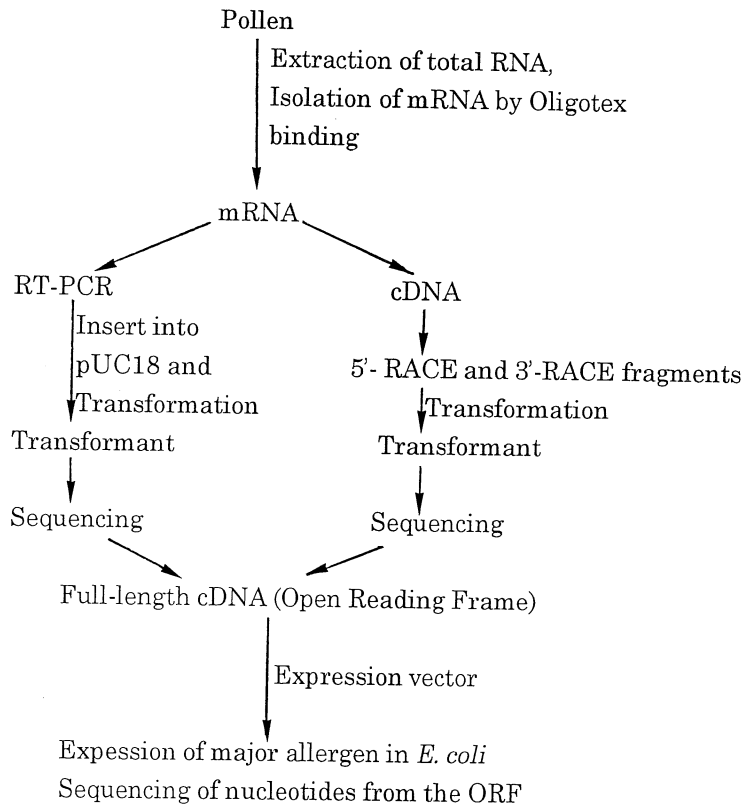


Fig. 1. Diagram of cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Aln s 1, the major allergen of alder (*Alnus sieboldiana*) pollen.

4. で得た塩基配列は、両 primer 部分以外はオオバヤシャブシ花粉のものであるが、両 primer 部分は同花粉が本来有しているものであるかどうかはわからない。それを明らかにするために 2 本鎖 cDNA を合成後、5' RACE と 3' RACE を施行した。

5-1. 2 本鎖 cDNA の合成

RACE のための 2 本鎖 cDNA 合成には Marathon cDNA Amplification Kit を使用した。メーカーの指示書にしたがって、2 μ g の mRNA から 2 本鎖 cDNA を合成した。これに Kit 付属の AP adaptor を繋いで RACE の template とした。

5-2. 5' RACE

AP1 primer と、inner antisense primer として合成した OY-GSP-1 との間で PCR を施行した。

5-3. 3' RACE

AP1 primer と、inner sense primer として合成した OY-GSP-2 との間で PCR を実施した。

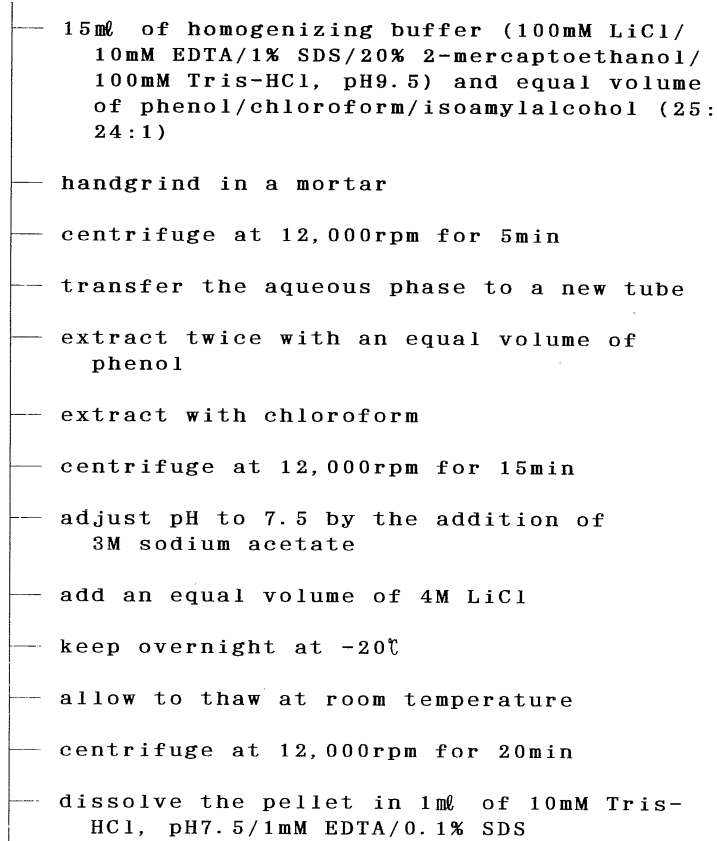
5-4. 塩基配列

PCR 産物の塩基配列を 4. と同じ方法により決定した。

6. 全塩基配列の決定

3' RACE で得た産物は、電気泳動で特異的なバンドが認められなかったことから、C 末端塩基配列を決めるために、下流 primer として合成した ACDT 25 と、5'

dried mature pollen (1g)



total RNA (1.7mg)

Fig. 2. Flow chart for extraction of total RNA

RACEの結果から決定したN末端塩基配列をもとに合成した上流 primer(OY-F2)とを用いて RT-PCRをおこない、その産物の塩基配列を4.と同じ方法で決定した。

7. recombinant Aln s 1(rAln s 1)の発現

開始 codon から始まる上流 primer(OY-F3)と、終止 codon を含み、そのすぐ下流に *Hind* III の restriction

site を組み込んだ下流 primer(OY-R4)を用いて RT-PCRをおこない、その産物を *Hind* III で分解した。別に、発現 vector である pKP 1500 を *Eco*R I で分解後、Blunting Kit で平滑末端とし、他端を *Hind* III site として先の DNA を挿入し、大腸菌 JM 109 を形質転換した。recombinant protein の発現には ampicillin 50 μ g/ml を添加した Luria-Bertani 培地を用いた。形質転換

total RNA (1.7mg)

- add 1mℓ of Oligo(dT)-Latex suspended in 10 mM Tris-HCl, pH7.5/1mM EDTA/0.1% SDS/0.1% NaN₃
- heat to 65℃ for 5min
- cool on ice for 3min
- add 0.2mℓ of 5M NaCl
- incubate at 37℃ for 10min
- centrifuge at 15,000rpm for 3min
- suspend the pellet in 1mℓ of washing buffer (10mM Tris-HCl, pH7.5/1mM EDTA/0.5M NaCl/0.1% SDS)
- centrifuge at 15,000rpm for 3min
- collect the pellet
- add 1mℓ of RNase free TE buffer (10mM Tris-HCl, pH7.5/1mM EDTA)
- heat to 65℃ for 5min
- chill on ice
- centrifuge at 15,000rpm for 5min
- add 3M sodium acetate to a final concentration of 0.3M to the precipitate
- add 2.5 volume of 99% ice-cold ethanol
- stand at -80℃ for 1.5hr
- centrifuge at 15,000rpm for 20min
- redissolve the pellet in 70% ethanol treated with 0.1% diethylpyrocarbonate
- centrifuge at 15,000rpm for 5min
- dry the pellet under vacuum
- redissolve in 20 μ ℓ of RNase free distilled water

purified mRNA (20 μ g)

Fig. 3. Flow chart for isolation and purification of mRNA

菌株を 37°C で培養し、660 nm の吸光度で濁度が 0.6 のときに isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を最終濃度 1 mM になるように加え、さらに培養を 5 時間続けた。この培養液から遠心分離法によって菌体を集め、50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に懸濁したのを凍結し、超音波で菌体を破碎した。

8. Western blotting

rAln s 1 がオオバヤシバシ花粉症患者血清中の IgE 抗体と特異的に結合し得るかどうかを検討するため、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) をおこなったのち、膜支持体に転写し、免疫染色した。

8-1. SDS-PAGE

Laemmli の方法¹¹⁾ に準じて 12.5 % の泳動ゲルを作製し、ミニスラブ法で電気泳動した。

8-2. Western blotting

SDS-PAGE 後のゲルを転写用緩衝液 (0.1 M Tris, pH 8.4/0.192 M glycine/20 % methanol) で洗浄し、セミドライ型転写装置を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後、この PVDF 膜を TBST 液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0/0.15 M NaCl/0.05 % Tween 20) で洗浄し、3 % skim milk を含む TBST に浸すことによって非特異的なタンパク質の吸着を防いだ。TBST で洗浄後、一次抗体として 0.1 % bovine serum

pKP1500/OY13, 15, 17, 19

I *Sna*BI/*Hind*III digestion

II *Sna*BI/*Pvu*I digestion

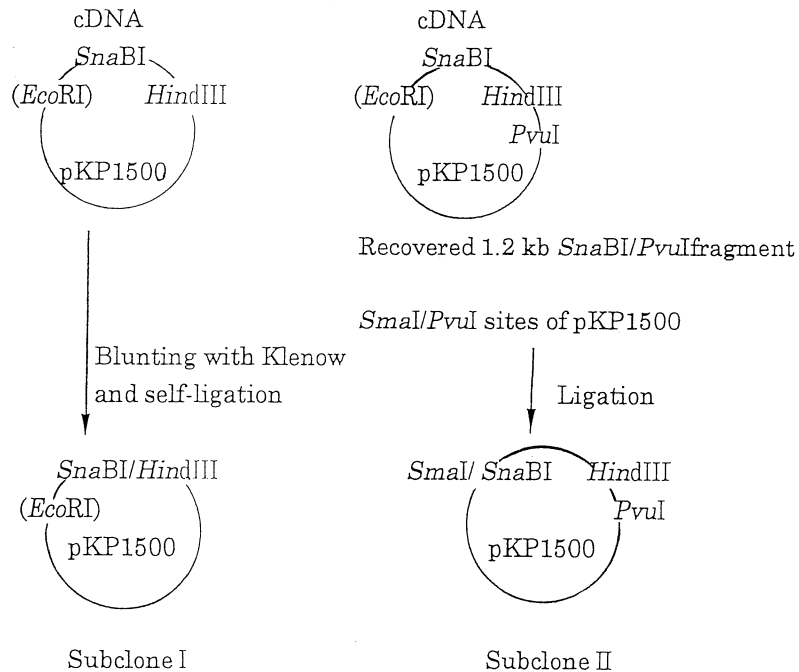


Fig. 4. Sequencing strategy of cDNA encoding Aln s 1. Both strands of clones pOY-13, pOY-15, pOY-17, pOY-19 and their subclones were sequenced using 1500FWD and 1500RV shown in Table 1 as forward and reverse primer, respectively.

Inserted cDNA is represented from *Eco*RI via *Sna*BI to *Hind*III on a plasmid circle.

albumin(BSA)含有 TBST で 10 倍に希釈したプール血清あるいは対照血清と 37°C で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、二次抗体として、0.1% BSA を含む TBST で 5,000 倍に希釈した horseradish peroxidase で標識した抗ヒト IgE 抗体と 37°C で 1 時間振盪、反応させた。TBST で洗浄後、ECL Western Blotting Detection System(Amersham)により、被検血清中の IgE 抗体と結合するバンドをレントゲンフィルム上に検出した。

9. rAln s 1 の塩基配列

8. の結果から、rAln s 1 を発現している clone 3 株 (pOY-13, pOY-17, pOY-19) と、分子量がすこし小さい pOY-15 の塩基配列を正確に決定するため、それぞれを subcloning し、それらの両鎖の塩基配列を解読した。rAln s 1 を code している cDNA は約 500 bp で、その中間に *Sna*B I site があることを確認した。その部位で切断するとそれぞれの cDNA は約 250 bp ずつになるので両鎖を正確に解読することができる。

9-1. Subclone I

pOY-13, pOY-15, pOY-17, pOY-19 それぞれの plas-

```

TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGTC ATG GGT GTT TTC AAT TAC GAG GCA GAG ACC CCC TCC GTT ATC   42
Met Gly Val Phe Asn Tyr Glu Ala Glu Thr Pro Ser Val Ile

CCA GCG GCT CGG CTG TTC AAG GCC TTT GTC CTT GAT GGC GAT AAG CTC ATT CCA AAG GTT  102
Pro Ala Ala Arg Leu Phe Lys Ala Phe Val Leu Asp Gly Asp Lys Leu Ile Pro Lys Val

GCA CCT GAA GCA GTT AGC AGT GTT GAG AAC ATT GAA GGA AAT GGA GGA CCT GGA ACC ATC  162
Ala Pro Glu Ala Val Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ile

AAG AAG ATC ACC TTT CCT GAA GGC AGC CCT TTC AAG TAC GTA AAG GAG AGA GTT GAT GAG  222
Lys Lys Ile Thr Phe Pro Glu Gly Ser Pro Phe Lys Tyr Val Lys Glu Arg Val Asp Glu

GTT GAT CGC GTA AAC TTC AAA TAC AGC TTC AGC GTG ATC GAG GGT GGT GCT GTG GAC CAC  282
Val Asp Arg Val Asn Phe Lys Tyr Ser Phe Ser Val Ile Glu Gly Gly Ala Val Asp His

ACA TTG GAG AAG ATC TGT AAC GAG ATC AAG ATA GTG GCA GCC CCT GAT GGA GGA TCC ATC  342
Thr Leu Glu Lys Ile Cys Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Ala Pro Asp Gly Gly Ser Ile

TTG AAG ATC AGC AAC AAG TAC CAC ACC AAA GGC GAC CAT GAG ATA AAT GCA GAG CAG ATT  402
Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Ile Asn Ala Glu Gln Ile

AAG ATT GAA AAA GAA AAG GCC GTG GGA CTT TTG AGG GCC GTT GAG AGC TAC CTC TTG GCA  462
Lys Ile Glu Lys Glu Lys Ala Val Gly Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala

CAC TCT GAT GCC TAC AAC TAA ATTCTGCTTAATTCTGATCTGCTTGCATATGTTTTTGTCAAGCCATAAATA  534
His Ser Asp Ala Tyr Asn

CTGCTTAATTTTCGGCTTGCTAATAAAATGAAGCTGTGTAGTCGTTTATGAGTACGTAATAACGACATGCACCAAAACATA  613
TGGAGCCAATTGCTCATGAATAGAAGTTAAGTTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 5. Nucleotide sequence including flanking region and deduced amino acid sequence of Aln s 1. Nucleotides are numbered, starting with A of the initiation ATG codon. Bold faced nucleotides are equivalent to the N-terminal amino acids obtained by Edman degradation. A putative polyadenylation signal is underlined.

mid を *Sna*B I と *Hind* III で分解し, cDNA の *Sna*B I /*Hind* III 断片と, cDNA の一部を含む pKP 1500 をアガロースゲル電気泳動で分離, 精製した. *Hind* III site を Klenow fragment で平滑末端としたのち self-ligation をおこない, 大腸菌 JM 109 に導入した.

9-2. Subclone II

cDNA の *Sna*B I site と pKP 1500 の *Pvu* I site で切断した断片を Subclone I の場合と同様に分離, 精製した. これと, *Pvu* I, *Sma* I で分解した pKP 1500 の断片とを連結し, JM 109 に導入した.

これらの方法を Fig. 4 に示した. 各 clone と, それらから得た Subclone I, II のいずれについても, 1500 FWD と 1500 RV を primer として両鎖の塩基配列を解読することにより全塩基配列を決定した.

その他の遺伝子工学的手法は Sambrook らの labora-

tory manual¹²⁾ にしたがった.

結 果

1. オオバヤシブシ花粉主アレルゲンを code する cDNA の増幅とその塩基配列

オオバヤシブシ花粉から精製した mRNA を template とし, primer として OY-F 1 と OY-R 1 を用いて RT-PCR をおこなったところ, 主アレルゲンの分子量から推定される長さの PCR 産物(500 bp)が単一バンドとして得られた. この塩基配列を解読したのち, 5' および 3' 末端部分の塩基配列を決めることにより, 全長の塩基配列を決定することができた. それは, 開始 codon と終止 codon を除いて 477 の塩基からなっていた(Fig. 5). その塩基配列から演繹した 159 のアミノ酸配列をもとに分子量を計算すると 17,364 となり, 衛藤が SDS-PAGE

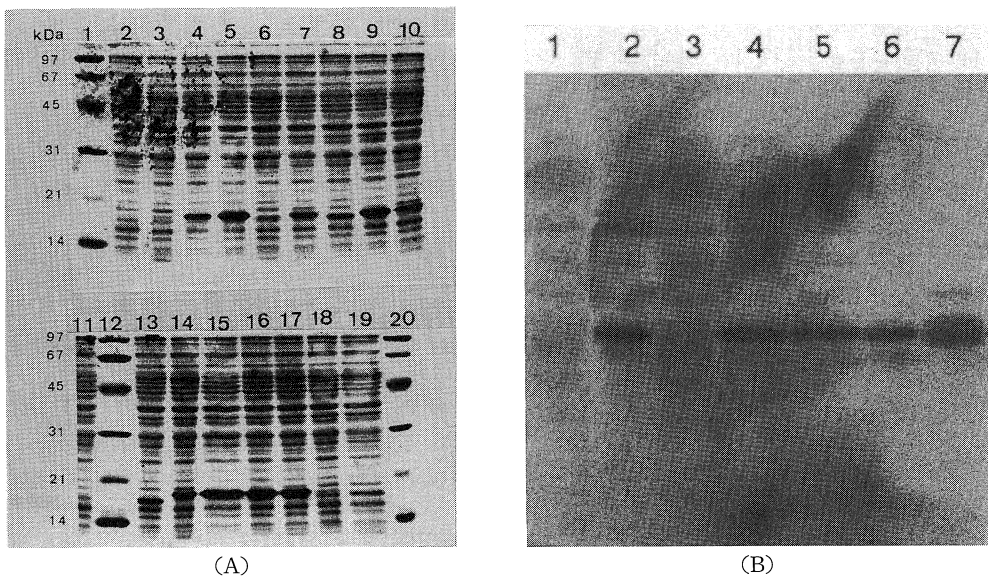


Fig. 6. SDS-PAGE (12.5%) and Westernblotting analysis of Aln s 1. Molecular mass marker (kDa) is denoted on the left. Aln s 1 was expressed as a soluble nonfusion protein in expression vector pKP1500. Details are in "Methods". (A): SDS-separation of total alder pollen proteins. Staining was done with Coomassie brilliant blue R-250. Lanes 1, 12, 20: Molecular marker, lanes 2, 11: negative control (pKP1500), lanes 3~10: pOY-7pOY-14, lanes 13~19: pOY-15~pOY-21. (B): Binding of IgE antibody obtained from alder-pollen sensitive patients on Western blots of recombinant Aln s 1. lane 1: negative control (pKP1500), lane 2: pOY-13, lane 3: pOY-15, lane 4: pOY-17, lane 5: pOY-18, lane 6: pOY-19, lane 7: positive control (natural Aln s 1).

で得た主アレルゲンの分子量とよく一致していた。

2. rAln s 1 の発現

オオバヤシャブシ花粉 mRNA を template とし, OY-F3 と OY-R4 を primer として RT-PCR をおこない, その産物を発現 vector pKP 1500 に組み込んで, 大腸菌で発現させた。

2-1. rAln s 1 を発現する clone とその塩基配列

SDS-PAGE の結果, いくつかの clone が 17 kDa の位置にバンドをもっていた(Fig. 6A)。Western blotting により, 17 kDa のバンドとオオバヤシャブシ花粉症患者から得たブール血清中の IgE 抗体とが結合することが確かめられた。この結果を, オオバヤシャブシ花粉から部分精製した 17 kDa の主アレルゲンが同血清と結合した結果と合わせて Fig. 6B に示した。次に, Fig. 4 に示した方法で rAln s 1 を発現しているいくつかの clone についてその塩基配列を調べた。

pOY-15 と pOY-17 の二つの clone について, 得た読み取り枠(open reading frame, ORF)の塩基配列を Fig. 7 に示した。pOY-13, pOY-18, pOY-19 の塩基配列は pOY-17 と同じであった。

2-2. C 末端アミノ酸部分欠損 clone

SDS-PAGE の結果, pOY-15 が発現した可溶性タンパク質の分子量は, 他の clone が発現したタンパク質のそれより約 10 % 小さかった。その塩基配列を pOY-17 のそれと比較すると, 開始 codon から数えて 410 番目の 1 塩基が欠損していた。その結果, フレームが 1 塩基ずれ, 435 番目に新しく終止 codon ができたために C 末端から 16 個のアミノ酸残基が欠損したタンパク質を生成していることがわかった。

pOY-15 が発現したタンパク質は, Western blotting の結果, オオバヤシャブシ花粉症患者血清中の IgE 抗体と結合しなかった。

pOY-17	ATG GGT GTT TTC AAT TAC GAG GCA GAG ACC CCC TCC GTT ATC CCA GCG GCT CGG CTG TTC AAG	63
pOY-15	---- --A--	
pOY-17	GCC TTT GTC CTT GAT GGC GAT AAG CTC ATT CCA AAG GTT GCA CCT GAA GCA GTT AGC AGT	123
pOY-15	---- --A--	
pOY-17	GTT GAG AAC ATT GAA GGA AAT GGA GGA CCT GGA ACC ATC AAG AAG ATC ACC TTT CCT GAA	183
pOY-15	---- --G--	
pOY-17	GGC AGC CCT TTC AAG TAC GTA AAG GAG AGA GTT GAT GAG GTT GAT CGC GTA AAC TTC AAA	243
pOY-15	---- --G-- --A--	
pOY-17	TAC AGC TTC AGC GTG ATC GAG GGT GGT GCT GTG GAC CAC ACA TTG GAG AAG ATC TGT AAC	303
pOY-15	---- --A-- --T-- --G-- --A-- C-- --T--	
pOY-17	GAG ATC AAG ATA GTG GCA GCC CCT GAT GGA GGA TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC AAG TAC	363
pOY-15	---- --T-- --T-- --A--	
pOY-17	CAC ACC AAA GGC GAC CAT GAG ATA AAT GCA GAG CAG ATT AAG ATT GAA AAA GAA AAG GCC	423
pOY-15	---- --A--	
pOY-17	GTG GGA CTT TTG AGG GCC GTT GAG AGC TAC CTC TTG GCA CAC TCT GAT GCC TAC AAC TAA	483
pOY-15	---- --A--	

Fig. 7. Nucleotide sequence in open reading frame of pOY-17 and C-terminally truncated form of Aln s 1, pOY-15. Horizontal bars represent identities to pOY-17. 410th nucleotide deleted position of pOY-15 is represented as ↑. Stop codon of pOY-15 is underlined.

考 察

1988年にヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteromyssinus*) の主アレルゲンである Der p 1 の塩基配列が報告された¹³⁾。これが端緒となり、種々のアレルゲンについて塩基配列が決定され、続々と報告されてきている。それらの大多数は、精製した mRNA から cDNA library を構築し、抗体から作製した probe を用いて目的とする cDNA を分離、増幅して塩基配列を決定するという方法がとられている。しかし、N 末端アミノ酸配列がある程度判明しているタンパク質や、すでに全塩基配列が決定しているタンパク質に類似するものの塩基配列を決めようとする場合には、mRNA さえ損傷なく精製されていれば、それらを参考にして primer を合成し、RT-PCR で得た cDNA を plasmid vector に ligation, competent cell への導入と形質転換, sequencing へと進むことができる。

オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンについては、N 末端から 10 個のアミノ酸配列が判明していること³⁾や、オオバヤシャブシと同じハンノキ属の植物である *A. glutinosa* の花粉の主アレルゲンの全塩基配列が報告されていること¹⁰⁾ から、本報告では cDNA library を構築することなく、後者の方法による。

この方法で決定できた flanking region をも含むオオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの全塩基配列 (Fig. 5) によれば、5' flanking sequence からみて最初に現われる ATG が開始 codon になっている。この配列と、オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの N 末端アミノ酸配列とは、methionine に続く glycine から 9 個のアミノ酸が一致している。すなわち、オオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンでは、通常よくみられるタンパク質と同じように、N 末端の methionine が欠落している。ORF には糖鎖形成部位は存在しなかったが、3' flanking region には AATAAA という polyadenylation signal があり、その後 poly(A)-tail が続いていた。

オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンを code する cDNA の ORF は 477 の塩基からなっていた。 *Alnus glutinosa* の Aln g 1¹⁰⁾, *Betula verrucosa* の Bet v 1¹⁴⁾, *Corylus avellana* の Cor a 1¹⁵⁾, *Carpinus betulus* の Car b 1¹⁶⁾ など、他のカバノキ科植物花粉の主アレルゲンもまったく同じ数の塩基からなっていることが報告されている。これらの塩基配列を比較すると、Aln s 1 と Aln g 1, Bet v 1, Cor a 1, Car b 1 とはそれぞれ 95.8%, 87.6%, 85.1%, 85.7% の相同性を示した。塩基配列から演繹したアミノ酸配列についてもこれらを比較すると、同

じ順に、95.0%, 81.8%, 75.5%, 74.2% の一致がみられた。

これらの結果から、ORF はオオバヤシャブシ花粉由来のもと考えられた。

そこで次に、この cDNA を発現 vector に挿入し、大腸菌で発現させたタンパク質がオオバヤシャブシ花粉症患者血清中の IgE 抗体と結合するかどうかを検討した。

発現したいくつかの clone が recombinant protein を作り、そのうちの一つである pOY-17 はオオバヤシャブシ花粉症患者血清中の IgE 抗体と結合することが証明された。さらに、その塩基配列は、RT-PCR 産物で得た ORF のそれと完全に一致していた。このことは、オオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンである Aln s 1 を大腸菌で発現させたことを意味している。

recombinant protein を発現した clone の一つ pOY-15 の塩基配列は、pOY-17 のそれと比較して 18 個の塩基 (アミノ酸として 10 残基) に相異がみられた。さらに pOY-17 と比べて pOY-15 では C 末端のアミノ酸残基が 16 個すくなかった。pOY-15 が発現した recombinant protein がオオバヤシャブシ花粉症患者の IgE 抗体と結合しなかったことの原因として、両 clone の一部の塩基あるいはアミノ酸の相異を否定することはできないものの、オオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンが血清中の特異抗体と結合するには、C 末端のアミノ酸残基が重要な役割を担っていると考えられる。

最近、アレルゲンの機能を明らかにすることを目的として、その構造解析がおこなわれるようになってきた。Gajhede らは、Aln s 1 と相同性の高い Bet v 1 について、結晶を X 線で、溶液を nuclear magnetic resonance spectroscopy によってその三次構造を明らかにした¹⁷⁾。この研究がさらに進み、アレルゲンの構造面からアレルゲンと IgE 抗体の相互作用が明らかになれば、その相互作用を妨害する peptide を構築し、治療法の一つとして花粉症の実地臨床に応用が可能となるであろう。

いくつかのアレルゲンについては、その生理活性が証明されているが、カバノキ科花粉の主アレルゲンについては十分解明されたとはいえない。Bet v 1 がエンドウの疾患防御反応に関与する遺伝子と 55% の相同性を示したこと¹⁴⁾ と、それが *B. verrucosa* 花粉に特異的な RNase であるという報告¹⁸⁾ があるにすぎない。この点については今後の研究が待たれる。

ま と め

1. オオバヤシャブシ花粉から total RNA を抽出し、mRNA を分離、精製した。

2. その mRNA を template として RT-PCR により cDNA を合成した。

3. その cDNA の塩基配列を決定した。

4. その ORF は 477 の塩基からなっていた。

5. 他のカバノキ科花粉主アレルゲンの ORF もまったく同じ塩基数であり、さらにその配列は互いに高い相同性を示した。

6. この cDNA をタンパク質発現 vector に挿入し、recombinant protein を発現させた。

7. pOY-17 と名付けた clone から発現した可溶性タンパク質は、オオバヤシャブシ花粉症患者の IgE 抗体と結合することが証明された。さらに、その塩基配列は、RT-PCR 産物で得た ORF のそれと完全に一致していた。

8. 上記の成績から、この主アレルゲンを Aln s1 と名付けた。

9. clone pOY-15 の塩基配列は、pOY-17 のそれと 18 個の塩基(アミノ酸として 10 残基)に相異がみられた。また、pOY-17 と比べて pOY-15 では C 末端のアミノ酸残基が 16 個すくなかった。pOY-15 が発現した recombinant protein がオオバヤシャブシ花粉症患者の IgE 抗体と結合しなかったことの原因として、両 clone の一部の塩基あるいはアミノ酸の相異を否定することはできないものの、オオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンが血清中の特異抗体と結合するには、C 末端のアミノ酸残基が重要な役割を担っていると考えられる。

10. アレルゲンの全塩基配列を決定することは、アレルゲンエキスの標準化に有用であるとともに、site-directed mutant を構築することによって花粉症の現地臨床に役立つものである。

本論文作成にあたり、ご指導とご校閲をいただいた奈良県立医科大学松永 喬教授、同皮膚科学教室白井利彦教授、生化学教室吉原紘一郎教授に深甚なる謝意を表します。本研究は奈良県立医科大学化学教室との共同研究の一部であり、実験に際して直接ご指導いただき、また、論文の作成にあたって貴重な助言をいただいた化学教室田端司郎教授に深く感謝いたします。また、化学教室井手 武助手、山本恵三助手、耳鼻咽喉科学教室芦田恒雄非常勤講師に感謝の意を表します。

文 献

- Ipsen, H. and Lowenstein, H.: Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). J. Allergy Clin. Immunol. **72**: 150-159, 1983.
- 中原 聰, 芦田恒雄, 衛藤幸男, 吉川恒男, 井手武, 田端司郎: オオバヤシャブシ花粉症の 1 例とその疫学調査. アレルギー **39**: 104-109, 1990.
- 衛藤幸男: オオバヤシャブシ花粉のアレルゲン分析. 奈医誌. **47**: 38-52, 1996.
- King, T. P. and Norman, P. S.: Isolation studies of allergens from ragweed pollen. Biochemistry **1**: 709-720, 1962.
- King, T. P., Norman, P. S. and Connell, J. J.: Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen. II. Biochemistry **3**: 458-468, 1964.
- Marsh, D. G., Goodfriend, L., King, T. P., Løwenstein, H. and Platts-Mills, T. A. E.: Allergen nomenclature. Bull WHO **64**: 767-770, 1986.
- King, T. P., Hoffman, D., Løwenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A. E. and Thomas, W.: Allergen nomenclature. Bull WHO **72**: 797-806, 1994.
- Miki, T., Yasukochi, T., Nagatani, H., Furuno, M., Orita, T., Yamada, H., Imoto, T. and Horiuchi, T.: Construction of a plasmid vector for the regulatable high level expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*: an application to overproduction of chicken lysozyme. Protein Engineering **1**: 327-332, 1987.
- 井手 武, 松村有嘉子, 岡崎 旦, 芦田恒雄, 衛藤幸男, 吉川恒男: 風媒花樹木の成熟花粉採集法. 花粉誌 **35**: 39-42, 1989.
- Breiteneder, H., Ferreira, F., Reikerstorfer, A., Duchene, M., Valenta, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Kraft, D. and Scheiner, O.: Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of Aln g 1, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). J. Allergy Clin. Immunol. **90**: 909-917, 1992.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature **227**: 680-685, 1970.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: Molecular cloning 1-3. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Chua, K. Y., Stewart, G. A., Thomas, W. R.,

- Simpson, R. J., Dilworth, R. J., Plozza, T. M. and Turner, K. J.** : Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J. Exp. Med.* **167** : 175-182, 1988.
- 14) **Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O. and Breitenbach, M.** : The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J* **8** : 1935-1938, 1989.
- 15) **Breiteneder, H., Ferreira, F., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D. and Scheiner, O.** : Four recombinant isoforms of Cor a 1, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. *Eur. J. Biochem.* **212** : 355-362, 1993.
- 16) **Larsen, J. N., Strøman, P. and Ipsen, H.** : PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen Car b 1 from *Carpinus betulus*, hornbeam. *Mol. Immunol.* **29** : 703-711, 1992.
- 17) **Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F. M., Ipsen, H., Larsen, J. N., Joost Van Neerven, R. J., Schou, C., Løwenstein, H. and Spangfort, M. D.** : X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Struct. Biol.* **3** : 1040-1045, 1996.
- 18) **Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M. and Becker, W-M.** : The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* **199** : 413-415, 1996.