

遺伝子工学を用いたスギ花粉アレルギーに関する研究*

Studies on Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don)
Pollen Allergen using Genetic Engineering

山田 晋也

Shinya Yamada

*東京農工大学大学院生物システム応用科学府審査論文 2009年（平成21年）

目 次

序 章	1
1 研究の背景	1
2 スギ花粉アレルゲンに関する既往の研究	1
3 本研究の目的	2
第1章 スギ花粉アレルゲン遺伝子のプロモーター領域の単離と解析	4
1 緒言	4
2 プロモーター領域の単離	4
2-1 実験材料	4
2-2 方法	5
3 結果および考察	7
4 プロモーター領域の解析	8
4-1 実験材料	8
4-2 方法	9
5 結果および考察	11
第2章 フェージディスプレイ法を用いた抗スギ花粉アレルゲン scFv抗体の単離と分子特性	14
1 緒言	14
2 実験材料	14
3 方法	15

4	結果	18
5	考察	22
	終章	24
1	要約	24
2	今後の展望	25
	謝辞	27
	引用文献	28

序 章

1 研究の背景

スギ(*Cryptomeria japonica* D. DON)は、日本固有の針葉樹で、鹿児島県・屋久島から青森県南部まで天然に分布する。スギはわが国の重要な林業樹種であり、通直性、材質に優れ、造林が容易で成長が早いため、日本各地に広く植栽されている。スギ造林の歴史は古く、奈良県の吉野林業、京都府の北山林業、静岡県の天竜林業など、いわゆる有名林業地の大半は藩政時代からスギが植栽されてきた。また、戦後の増大する木材需要にこたえるため、1957年から1960年代後半にかけて天然木を伐採した跡地や原野において、スギを主とした人工造林を積極的に推進する、いわゆる拡大造林政策が実施された。しかし、1960年代に入って外国産輸入材が激増の一途をたどり1960年代後半には石油に次ぐ輸入品目となったため、国内産材の利用は減少し、植栽されたスギの長伐期化が進み、多くの山林が放置されるようになった。

一方、1964年にスギ花粉症が「アレルギー」誌で報告¹⁾され、その主原因はスギ花粉であることが確かめられた。また、二次的原因として、大気汚染物質の増加、食生活の欧米化等が発症を促進すると考えられている²⁾。スギは20~30年生で雄花が着き始めると言われ、スギ人工林の約6割が26年生以上に達した現在、毎年大量の花粉が日本中を飛散している。1998年および2001年に実施された全国疫学調査では、スギ花粉症の罹患率は各々16.2%、13.1%であり、東京都においては都民の5人に1人がスギ花粉症患者であるとも言われる状況となった²⁾。さらに、伐期に達したスギが放置されているため、今後、伐採面積が現在の水準にとどまるならば、花粉を飛散するスギは増加し続け、今後20年以上にわたってスギ花粉飛散数は増加すると予想されている³⁾。

上述のような状況にあるものの、スギは長い造林の歴史から育林の施行体系や木材加工技術がほぼ確立された樹木であるため、花粉症問題のみを理由として他の樹種による代替的な造林を進めることは極めて困難である。このような背景から、着花や花粉量を抑制するための方策として枝打ち・間伐、薬剤散布及び育種等による雄花着花抑制が取り組まれてきた⁴⁾。育種的な施策としては、少花粉スギ・低アレルギースギ・無花粉スギの選抜が実施された⁵⁾。少花粉スギについては、林野庁の精英樹選抜事業において選抜されたスギの中から(独)森林総合研究所林木育種センターと各都府県が連携して少花粉スギが選抜された。その結果、平成20年度末時

点で少花粉スギとして135品種が公表された⁵⁾。この成果を受けて、都府県では造林用苗木の花粉生産量を減らすため、少花粉スギ精英樹で構成されるミニチュア採種園の造成が実施され始めている⁶⁾。花粉症の起こしやすさは、花粉生産量とアレルギー含量の積によって求められるアレルギーの総生産量で決まる⁷⁾。低アレルギースギとしては、雄花着生量が少ない精英樹146クローンのうち、静岡県で選抜された精英樹の天竜17号が最もアレルギーが少ない品種として平成18年度に公表されている⁵⁾。無花粉スギは、1992年に富山県内における社寺林において初めて発見された⁸⁾。その後、他県においても発見され、2005年の時点では合計18本が見つかった⁹⁾。

しかし、上記の如く選抜された品種や候補木には幾つかの課題が存在することも明らかになっている。無花粉スギは、苗木の量的な確保を考えた場合、人工交配家系等の中から無花粉のものを植栽前に選別しなければならないことから、現段階では十分な量の苗木を確保することが難しい状況にある。また、育種を効率的に進めるにあたり育種期間を短縮する必要があるが、品種作出に戻し交配が必要な場合もあり、短期間で品種を確立するのは困難であると考えられる。一方、少花粉スギは、アレルギー量の個体間変異が15~80倍であることから⁷⁾、単純に花粉生産量のみを評価するだけでは、個体が生産するアレルギーの総量を正確に評価することができない。また、スギ花粉アレルギーにはアミノ酸配列の一部が異なる分子種が存在するため¹⁰⁾、特定の分子種のアレルギーを標的として評価するだけでは、花粉の持つアレルギーの総量を厳密に見積もることはできない。これらのことから、多様な分子種のアレルギーに対して正確な定量を行うことが、少花粉スギを選抜する際には重要であると思われる。

2 スギ花粉アレルギーに関する既往の研究

スギ花粉症の原因となる主要なアレルギータンパク質として、Cry j 1とCry j 2が知られている¹¹⁻¹³⁾。これまでに、上記のタンパク質が引き起こすアレルギー反応やアレルギー症状に関して精力的な研究が行われ、花粉症のメカニズムと予防・治療方法が報告されている^{12,14)}。Yasuedaら¹¹⁾はスギ花粉からCry j 1を精製することに成功し、これが約40 kDa、pI 8.9-9.2の糖タンパク質であることを明らかにした。また、SoneらはRT-PCRを

用いて *Cry j 1* の 2 つの異なる分子種をコードする cDNA を単離することに成功している¹⁵⁾。単離した cDNA の塩基配列から推定される *Cry j 1* のアミノ酸配列と組換え *Cry j 1* の酵素化学的な解析により、*Cry j 1* はペクトリアーゼファミリーに属することが明らかにされた^{15,16)}。さらに、*Cry j 1* の発現について調べられた結果、花粉において盛んに行われ、他の組織（葉、茎、根、雌花）においては検出されなかった¹⁷⁾。Fukui らと Futamura らは雄花において *Cry j 1* の転写を検出している^{18,19)}。さらに、*Cry j 1* はセキシン、ネキシン、オービクルス、生殖細胞壁などに局在することが明らかになっている²⁰⁾。*Cry j 1* の発現と同様に、花粉におけるペクトリアーゼ様タンパク質の遺伝子の特異的または優先的な発現が、他の植物種においても報告されている²¹⁻²⁷⁾。一方、ペクチン代謝酵素に関係する、*Cry j 2* のようなポリガラクトソナーゼ様タンパク質の遺伝子と、ペクチンメチルエステラーゼの遺伝子も花粉において発現する²⁸⁻³¹⁾。スギでは珠心上部の細胞壁を崩壊させながら花粉管を伸長させていることから³²⁾、*Cry j 1* および *Cry j 2* による産物を含むこれらのペクチン代謝酵素は、細胞間に存在するペクチンの代謝を要求する花粉管の伸長に重要な役割をすると考えられる²³⁾。

大気中に浮遊するスギ花粉アレルゲンの測定や、アレルゲン含量の少ない花粉を生産するスギを効率的に選抜するため、これまでに免疫学的方法により *Cry j 1* や *Cry j 2* を定量する方法が提案されてきた。*Cry j 1* や *Cry j 2* に対するモノクローナル抗体は、マウスやウサギを用いて調製されており³³⁻³⁷⁾、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるアレルゲンの定量^{36,38,39)}が行われてきた。また、これら定量法を基に、異なるスギのクローンの間でのアレルゲン量の違いや³⁹⁻⁴²⁾、気象条件⁴³⁾、標高⁴⁴⁾が花粉中のアレルゲン量に及ぼす影響なども評価されてきたが、これらの方法に供試された抗体は大変高価なものであり、実験の作業工程も煩雑なため、免疫学的方法は一部の育種研究において試行されているのみである。

3 本研究の目的

花粉症対策において、前述のとおり、雄花着生量が少ないクローンの中から低アレルゲンスギを選抜することが有効とされ、平成 18 年度に林木育種センターが精英樹の天竜 17 号を低アレルゲンスギとして公表している。現在、少花粉スギで構成されるミニチュア採種園の造成が各県で行われているところであるが、今後、さらに低アレルゲンスギの選抜が進めば、それらで構成される採種園へ移行することも予想される。DNA マーカー

を用いた複数のスギ採種園における交配実態の調査では、採種園外から流入した花粉による交配率が 35%～66%であることを報告している⁴⁵⁾。従って、低アレルゲンスギは、少花粉スギの中から選抜されることから生産する花粉量も少ないため、従来の採種園と比べて採種園外から流入する花粉の影響がさらに大きくなることが予想される。また、低アレルゲンスギを用いた採種園においては、花粉の発芽や花粉管の伸長に関与すると考えられる *Cry j 1* と *Cry j 2* の量が低下する。これらをコードする cDNA の塩基配列や酵素としての機能は明らかにされたが、その発現時期や様式について詳細な解析がされていないため、交配にどのような影響を与えるかは明らかではない。

低アレルゲンスギを選抜するためにはアレルゲン定量が必須である。現在、一般的な定量方法として ELISA があげられるが、本法に使用する *Cry j 1* や *Cry j 2* に対する抗体は開発されているものの、育種現場においてアレルゲンを定量する試薬としては大変高価であるため、選抜を進めにくい要因の一つとなっている。

そこで本研究では、低アレルゲンスギを用いた交雑育種を実施するのに必要な知見を得るため、以下の 2 つの項目について検討を行った。

- ・低アレルゲンスギを用いて交配をした場合、どのような問題が生じるのか基礎的知見を得るために、スギ花粉アレルゲン遺伝子のプロモーター解析を行うことでアレルゲンの器官・時期特異的発現を確認した。

- ・低アレルゲンスギの選抜を安価に且つ容易に行うことを可能とする低価格で高品質な抗体を提供するため、組換え法を用いて抗体の作製を行った。

プロモーター解析は、近年、植物形質転換技術を利用し、レポーター遺伝子を用いて遺伝子発現を簡便に解析することが、多くの研究において試みられている⁴⁶⁾。これは、解析しようとする遺伝子のプロモーター配列の下流に、レポーター遺伝子のコード領域を接続したキメラ遺伝子を用い、レポーター遺伝子による遺伝子産物を定量的にまたは組織化学的に測定することにより、プロモーターの機能解析を行うものである。本研究では、レポーター遺伝子として、近年、多くの植物の研究において用いられている^{23,47-51)}、大腸菌由来の β -D-glucuronidase gene (*uidA*) を用いた。この手法を用いて、*Cry j 1* の器官・時期特異的発現、プロモーター上に存在していると思われるシス配列等の有無による転写量の解析を行った。

抗体は、近年、ファージディスプレイ法と呼ばれる遺伝子工学的手法を用いて作製することが可能になった⁵²⁾。この方法は、1985 年に Smith G. が繊維状ファージ

の表面にランダムにペプチドの提示が可能であることを *Science* 誌に報告した⁵³⁾のを発端に、現在は進化学研究等に使用される手法である。本法を用いれば、大腸菌に産生させる組換えタンパク質として、抗体と同様の機能を持つ分子の作製が従来の方法と比べて簡単にできる。また、得られた抗体の遺伝子情報も獲得できるため、抗体の機能を改変することもできる⁵⁴⁾。そこで本研究では、ファージディスプレイ法を利用し、抗スギ花粉アレルギー抗体を作製し、その抗体の評価を行った。

本論文の構成は以下のとおりである。第1章では、スギ花粉アレルギー遺伝子のプロモーター領域の単離と解析、第2章では、ファージディスプレイ法を用いた抗スギ花粉アレルギー scFv 抗体の単離と分子特性、終章では、本研究を総括し、今後の展望について述べる。

第1章 スギ花粉アレルゲン遺伝子のプロモーター領域の単離と解析

1 緒言

スギの採種園が各地に整備され、育種種子の生産が行われるに伴い、採種園の管理に関する研究が進歩した。しかし、種子生産や交雑育種を目的とした交配技術を進歩させるために不可欠な受粉や受精に関する基礎的な研究が進められるようになったのは比較的最近である。

スギの受精のメカニズムは、早春に開花した雌花の珠孔から、開花後しばらくすると珠孔液(受粉液)の分泌が始まり、飛来した花粉は受粉液に補足されて胚珠内へと運ばれ発芽する。胚珠内で発芽した花粉は、珠心上部へ接合し、細胞壁を崩壊させながら花粉管を伸長させ、約12週後に卵細胞へ到達する³²⁾。受粉液に補足され、胚珠内へ花粉が取り込まれる段階では、ポリエチレン粒子、熱処理をしたスギ花粉、他樹種の花粉でも胚珠内へ運ばれることが観察されている⁵⁵⁾。

花粉管の伸長時には、種間交雑の可否の決定や自家受粉と他家受粉の競争など交雑育種をおこなう上で重要な生理現象がおこるといわれているが、詳細な解析は行われていない。スギでは、マトリックス多糖で構成されている珠心細胞の細胞壁を崩壊しながら花粉管が伸長することから、そこでは細胞壁分解酵素が働いていることが予想される。スギ花粉アレルゲンの *Cryj1* と *Cryj2* は、それぞれペクトリアーゼとポリガラクトソナーゼの活性があることから、花粉管伸長、花粉発芽、種の識別に何らかの機能を果たしていることも予想される。

本章では、スギの交雑育種に関する基礎的知見を得ることを目的として、*Cryj1* および *Cryj2* のプロモーター領域(プロモーターとして機能すると推定される5'非翻訳領域)の単離と、単離した *Cryj1* のプロモーター領域の解析を行うことで器官・時期特異的発現を確認した。

近年、植物形質転換技術を利用し、簡便にプロモーターを解析することが、多くの研究において試みられている⁴⁶⁾。これは、解析をする遺伝子のプロモーター配列の下流に、レポーター遺伝子のコード領域を接続したキメラ遺伝子を作製し、レポーター遺伝子の遺伝子産物を定量的にまたは組織化学的に測定することで、プロモーターの解析を行うものである。本章では、レポーター遺伝子として、近年多くの植物の研究において用いられている、大腸菌由来の β -D-glucuronidase (GUS) をコードする *uidA* を用いた。GUS が触媒する酵素反応の基質として、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide

(X-Gluc.)を用い、この基質がGUSによる加水分解を受けた後、酸化により二量体化し、インジゴ系の青色の色素を生成する。この結果、GUSを発現する細胞は青色に呈色するため、プロモーターの転写活性を検出することができる。この手法を用いて、*Cryj1* プロモーター領域によるGUSの器官・時期特異的発現の確認、プロモーター上に存在すると思われるシスエレメントの有無による転写量について解析を行った。植物を形質転換させるにあたり、スギを用いることが望ましいが、実験を行う段階では安定した形質転換系が構築されていなかった。そのため、形質転換技術が確立され、裸子植物の *Pinus radiata* や被子植物の *Brassica napus* のプロモーターが植物体内において組織特異性を持って機能することが確認されている^{50,51)} *N.tabacum* を用いた。

2 プロモーター領域の単離

2-1 実験材料

2-1-1 供試植物

スギは(独)森林総合研究所内に生育しているイバラキ1号であり、その未成熟葉を用いた。

2-1-2 使用菌株

大腸菌: DH5 α (遺伝子型: F⁻, Φ 80d *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r^{k-}mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*)

2-1-3 ベクター

クローニング用及び塩基配列決定用ベクターとして、pT7Blue T ベクター(Novagen)を用いた。

2-1-4 培地とその組成

(A) Luria-Bertani(LB)培地

1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-Yeast extract, 0.5% sodium chloride(1.5% agar)

(B) Terrific Broth(TB)培地

1.2% Bacto-tryptone, 2.4% Bacto-Yeast extract, 8% glycerol

抗生物質は必要に応じて ampicillin を 100 μ g/ml の濃度で添加した。

2-1-5 プライマー

以下のプライマーの作製は Amersham Pharmacia

Biotech に委託した。設計は既報の *Cry j 1* mRNA (Accession No. D34639) *Cry j 2* mRNA (Accession No. D29772, D37765)を参考にした。

(A) *Cry j 1* プロモーター領域単離用プライマー

Cryj1F1, 5'-TGGGCACAAAACAGAATGAAGCTCGC-3'

Cryj1R1, 5'-TTGGTAGCAGAGTAGAATGTC-3'

Cryj1F2, 5'-CAGATTGTGCAGTGGGCTTCGGA-3'

Cryj1R2, 5'-ATACGGCTATGCTATGATTATGA-3'

Cryj1PF1, 5'-GATCTAAACTTTAAATGTAAAAATGATCT-3'

Cryj1PR1, 5'-TTTTGGTAGCAGAGTGTAGAATTTCTTC-3'

(B) *Cry j 2* プロモーター領域単離用プライマー

Cryj2F1, 5'-CAATGTGGAAAAATATAGGCGC-3'

Cryj2R1, 5'-TCACTGTCCAACATAATTTGGGCAGA-3'

Cryj2F2, 5'-CATTTTCAACAGCATGGCAAGC-3'

Cryj2R2, 5'-GATCTTCTGCTGCCGCCATTA-3'

Cryj2PF1, 5'-CCATGGATGACACTAATGTTGACA-3'

Cryj2PR1, 5'-TTTAATAAAAAGAAAATTTCTTCTATAGTTG-3'

2-2 方法

2-2-1 total DNA の単離

イバラキ 1 号からの total DNA の単離は CTAB 法⁵⁶⁾を基に以下の改良を加えて行った。スギでは多糖類含量が多く従来の方法では良質の total DNA を得ることが困難であるため、試料調製が容易な未成熟葉を液体窒素下で乳鉢と乳棒を用いて微細化し、HEPES buffer で多糖類などを予備抽出した。抽出 buffer の組成及び方法を下に記す。

(A) 抽出 buffer の組成

○HEPES buffer

0.1 M HEPES (NaOH で pH8.0 に調整)

0.5% 2-メルカプトエタノール

0.5% スペルミジン

0.5% スペルミン

20 mM EDTA

○Lysis buffer

0.35 M sorbitol

0.1 M Tris-HCl (pH8.0)

0.5% 2-メルカプトエタノール

0.5% スペルミジン

0.5% スペルミン

○2×CTAB solution

2% cetyl trimethyl ammonium bromide

0.1 M Tris-HCl (pH9.5)

20 mM EDTA

0.5% 2-メルカプトエタノール

1.4 M NaCl

(B) 方法

1) HEPES buffer 5 ml の中に試料 0.5 g を入れて混合した。

2) 10,000 rpm, 10 分間, 遠心, 上清を取り除いた。

3) 除去した上清が粘らなくなるまで, この操作を約 3 回繰り返した。得られた沈殿に, Lysis buffer 2.5 ml, 1% ザルコシン, 20 mM EDTA を添加し, 10 分間室温で静置した。

4) 2×CTAB solution 4 ml を添加し, 10 分間室温で静置した。

5) 6 ml クロロホルム液 (クロロホルム: イソアミルアルコール=24:1) を添加し, 2 時間穏やかに攪拌した。

6) 2,800 rpm で 10 分間遠心し, 上清を回収し, この操作を 2 回行った。

7) イソプロパノール沈殿によって DNA を回収した。

8) 風乾後, 3 ml の TE に溶解し, フェノール抽出, イソプロパノール沈殿によって DNA を回収した。

9) 風乾後, 150 μ l の TE に溶解した。

10) 調製した total DNA は, アガロース電気泳動と分光光度計により DNA のサイズと溶液の濃度を確認した。

2-2-2 制限酵素等の使用方法

すべてタカラバイオの製品を購入し, 供給者の説明書に従って使用した。

2-2-3 プロモーター領域の増幅 (IPCR: Inverse polymerase chain reaction 法)

1) 100 μ l スケールで, *Cry j 1* プロモーター領域の増幅実験の total DNA は制限酵素 *Bgl* II で 6 時間, *Cry j 2* プロモーター領域の増幅実験の total DNA は *Hinc* II で 3.5 時間, 各々 5 μ g ずつ処理した。

2) phenol/chloroform/isoamyl alcohol (24:24:1) 処理を行い, エタノール沈殿, 乾燥し, 10 μ l の TE に溶解した。TaKaRa Ligation Kit Ver.2 (タカラバイオ) を用いてセルフライゲーションを行った(16°C/30 min.)。

3) エタノール沈殿, 乾燥を行い, 10 μ l の TE に溶解し, これを IPCR の鋳型に用いた。

4) 既報の *Cry j 1* mRNA の配列から 1st primer(Cryj1F1, Cryj1R1)と 2nd primer(Cryj1F2, Cryj1R2)を, 既報の *Cry j 2* mRNA の配列から 1st primer(Cryj2F1, Cryj2R1)と 2nd primer(Cryj2F2, Cryj2R2)を作成し, 以下の条件にて IPCR を行った。

(A) *Cry j 1* プロモーター領域

○反応液量

TaKaRa Ex-Taq™ 1 µl (5 unit), TaKaRa Ex-Taq™ Buffer 10 µl, dNTP Mixture(2.5 mM each) 8 µl, template DNA 10 µl, Cryj1F1 1.0 µM(final conc.), Cryj1R1 1.0 µM(final conc.), dH₂O up to 100 µl.

○反応条件

94°C/5 min.→(94°C/1 min.・56°C/1 min.・72°C/5 min.)×30 cycles→72°C/5 min.→4°C/∞.

(B) *Cryj2* プロモーター領域

○反応液量

TaKaRa Ex-Taq™ 1 µl (5 unit), TaKaRa Ex-Taq™ Buffer 10 µl, dNTP Mixture(2.5 mM each) 8 µl, template DNA 10 µl, Cryj2F1 1.0 µM(final conc.), Cryj2R1 1.0 µM(final conc.), dH₂O up to 100 µl.

○反応条件

94°C/5 min.→(94°C/1 min.・57.9°C/1 min.・72°C/5 min.)×30 cycles→72°C/5 min.→4°C/∞.

- 5) 増幅した PCR 産物を鋳型として 5 µl 使用し, 2nd プライマー(Cryj1F2, Cryj1R2), (Cryj2F2, Cryj2R2) を用いて 2 回目の PCR 反応をおこなった. 条件はプライマーの種類を除き, それぞれ 1 回目と同様にした.
- 6) 反応後, 反応液を用いてアガロースゲル電気泳動を行ったところ, *Cryj1* プロモーター領域の増幅実験の PCR 産物が約 1,800 bp, *Cryj2* が約 1,500 bp にバンドが確認でき, この増幅産物を pT7Blue T ベクターにクローニングし, 大腸菌の形質転換に用いた.

2-2-4 大腸菌の形質転換

2-2-4-1 大腸菌のコンピテントセルの調製

遺伝子工学実験ノート・上⁵⁷⁾に従い, 以下のように改良して行った.

- 1) 大腸菌 DH5 α 株を培養した LB 固体培地からコロニーを 2 ml の LB 培地に接種し, Overnight で振盪培養した.
- 2) 1) の培養液を 40 ml の LB 培地に 400 µl 加え, 2~4 時間振盪培養し, 600 nm の吸光度が 0.5~0.8 となったところで, 氷上で冷やしておいた 50 ml チューブに培養液を移し, 氷上で 30 分冷却した.
- 3) 3,000 rpm, 0°C, 15 min. 遠心, 上清を捨て, 10% グリセロールを 30 ml/Tube 加え, 氷中にて静かに攪拌し, ペレットを溶解した.
- 4) 再度 3,000 rpm, 0°C, 15 min. 遠心. 上清を捨て, 10% グリセロールを 10 ml/Tube 加え, 氷中にて静かに攪拌し, ペレットを溶解した.
- 5) 5,000 rpm, 0°C, 15 min. 遠心, 上清を捨て滅菌冷

10%グリセロールを 300 µl 加え, 氷中で静かに攪拌して菌を均一にした.

- 6) あらかじめ冷やしておいた 1.5 ml チューブに菌体を 50 µl ずつ分注し, 使用するまで-80°Cで保存した.

2-2-4-2 エレクトロポレーション法

エレクトロポレーション法により大腸菌を形質転換した. 方法は遺伝子工学実験ノート・上⁵⁷⁾に従い行った. ライゲーション産物は, エタノール沈殿によりライゲーションバッファーを, 5 µl の滅菌水に置換して用いた. エレクトロポレーションには, ジーンパルサー II (バイオラッド) を用いた.

2-2-5 コロニーダイレクト PCR によるインサートチェック

プライマーに M13-21U(5' -TGTA AACGACGGC CAGT-3') と M13-Reverse (5' -TTTCACAGGAAACA GCTA-3') を用い, 20 µl スケールで PCR 反応を行った. 方法は遺伝子工学実験ノート・上⁵⁷⁾に従った.

2-2-6 プラスミドベクターの回収

2-2-5 記載の方法によりインサートが挿入されていると確認されたベクターを含む菌体を 2 ml TB 培地中にて増幅させ QIAprep® Spin Miniprep Kit(キアゲン)によりプラスミドベクターを回収した.

2-2-7 塩基配列の決定

シーケンス用プライマー-M13-21U, M13-Reverse と BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PE Biosystems)を用い, シーケンス反応を行い, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer(PE Biosystems)を使用し, 使用説明書に記載されている条件に従って実験を行った. さらにシーケンスデータを GENETYX-WIN Version 3.2.1(ゼネティクス)にて配列の解析を行った.

2-2-8 プロモーター領域の単離

2-2-7 から得られた配列からプライマー(Cryj1PF1, Cryj1PR1 および Cryj2PF1, Cryj2PR1)を作成し, 以下の条件で PCR を行い予想される *Cryj1* プロモーター領域, *Cryj2* プロモーター領域を増幅した. 増幅条件は以下のとおりである.

(A) *Cryj1* プロモーター領域

○反応液量

TaKaRa Ex-Taq™ 1 µl (5 unit), TaKaRa Ex-Taq™ Buffer 10 µl, dNTP Mixture(2.5 mM each) 8 µl, template DNA 10 µl, Cryj1PF1 1.0 µM(final

conc.), *Cryj1*PR1 1.0 μ M(final conc.), dH₂O up to 100 μ l.

○反応条件

94°C/5 min.→(94°C/1 min.・59°C/1 min.・72°C/1.5 min.)×30 cycles→72°C/5 min.→4°C/∞.

(B)*Cryj2*プロモーター領域

○反応液量

TaKaRa Ex-Taq™ 1 μ l (5 unit), TaKaRa Ex-Taq™ Buffer 10 μ l, dNTP Mixture(2.5 mM each) 8 μ l, template DNA 10 μ l, *Cryj2*PF1 1.0 μ M(final conc.), *Cryj2*PR1 1.0 μ M(final conc.), dH₂O up to 100 μ l.

○反応条件

94°C/5 min.→(94°C/1 min.・57.9°C/1 min.・72°C/1.5 min.)×30 cycles→72°C/5 min.→4°C/∞.

得られたフラグメントはそれぞれ pT7Blue T ベクターに挿入し、塩基配列を決定した。

3 結果および考察

2-2-8の実験で得られたDNA断片の3'末端と、The National Center for Biotechnology Information (NCBI)のDNAデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されている *Cryj1* (Accession No. D34639) および *Cryj2* (Accession No. D37765) のmRNAの5'末端をそれぞれ比較したところ、連続して一致する配列がそれぞれ70bpと60bp存在し、*Cryj1* および *Cryj2*の5'非翻訳領域、すなわちプロモーターとして機能すると考えられる領域の1,511bpおよび1,032bpをそれぞれ単離することができた。Okadaら⁵⁰⁾やMoyleら⁵¹⁾の報告ではおよそ500~1,500bpのプロモーター領域をレポーター遺伝子につなぎ、異種植物体に導入し形質転換植物を作成して発現解析を実施していることから、本研究で単離した *Cryj1* および *Cryj2* のプロモーター領域も同様の解析が可能であることが考えられた。

独立に増幅させた9つの *Cryj1* プロモーター領域の塩基配列を比較した結果、7箇所の塩基置換を持つ2つのグループに分類することができた(Accession No. AB080241, AB080242)。既往の研究において、Wangら¹⁷⁾はスギの2倍体ゲノムには5~8コピーの *Cryj1* が存在していることを報告している。また、安枝ら¹¹⁾は、*Cryj1*には4種類の構造があることを明らかにしている。これらの知見は今回の結果を裏づけするものであり、少なくとも2つの異なる *Cryj1* がスギのゲノム上でペクトリアーゼをコードすることを示している。*Cryj2* プロモーター領域では2つの1,032bpの5'末端配列

を得ることができた(Accession No. AB084068, AB084069)。

Cryj1 と *Cryj2* のプロモーター領域の比較により、初期転写に関係すると予想される11bpの共通配列(TATAGAAAGAA)が、*Cryj1*では-34から-23(翻訳開始点を+1とする)、*Cryj2*では-26から-16に有することが明らかになった(Fig. 1,2)。さらに、*Cryj1* プロモーター領域では、タバコやトマトの花粉において優先的に発現する遺伝子のプロモーター領域で確認されている^{25,48,58,59)}56/59box (GAAMTTGTGA, MはAまたはC)に類似したシスエレメント(GAACATGTGT)を有することが明らかになった(Fig. 1)。トマトの花粉において成熟後期に発現するLAT52の塩基配列に発見されたGAAAモチーフ(AGAAATAAT)の11コピーのコア配列(GAAA)も、*Cryj1* プロモーター領域において発見された。さらに、-131から-120と-398から-387に位置するCCACCACAACACとCCACCAAAACGTのエレメントは、タバコのLIM-様タンパク質(Ntlm1)の共通配列と同一または11/12箇所(CCACMANMNYMN, MはAまたはC; NはACGT; YはCまたはT)が同一であった(Fig. 1)。このタンパク質はPAL box結合タンパク質の転写要因として同定されている⁶⁰⁾。また、植物のLIMタンパク質(PLIM-1)の遺伝子はヒマワリの花粉において特異的に発現することが明らかにされている⁶¹⁾。

Cryj1, *Cryj2* プロモーター領域はPCR法を用いてスギゲノムから単離したため、dNTPの取り込みエラーの可能性もある。そこで、独立して増幅させた9つの *Cryj1* プロモーター領域の塩基配列を比較し、1つのクローンのみの塩基置換の変異は、DNA polymeraseのdNTPの取り込みエラーと考えて検討したところ、AB080242の配列には取り込みエラーの確率が低いと考えられたため、*Cryj1* プロモーター領域の解析に用いることとした。

```

-1511 GATCTAAACTTTAAATGTGAAAAATGATCTACATAAAAAATGGCATAGAGAACCCTCGTCTGTGATGC
-1441 TTTTATTAGATTTTTAAAGATGTGGAGCCAAAGGATATTTTTGAGGAGCATTCAATCTAGATTCATTCT
-1371 CATTGGTTAACTCTAACCCGGCTACCTATATTTTTGAAAAATCTATGTAAGGAGCCTCGAGAGATATCAT
-1301 CTTTCAAAGGATGTAATGCTTACTATACTGAATCTAAACTTTTAAATACCTAATAAAAACTAAAGAAAC
-1231 ATATAATGTAATAGATAGACATATATCATACATACGGATTGAATATTTTTGCCTAATAATACAAATG
-1161 TTTCTCTCTTCTACTCTGATTACTTATAGCTTATAATTCTCGCTCAATTTTTCTCATCCTGTATAGCTTA
-1091 TAGTCTCCTCTGAGTTTCTTATCTTCTATAGCTTCAACTAAACAAGTAATGCTATAACATGAAATATT
-1021 TACTTTATTTGCTTTAGATATCTTCTTATGCTGATCTTATGATCTAGATCGCTTACCCTAATGCGAAAA
-951 GGGCCTAATTTCTCTTTGCAACACGCTAAGTACTTAGAAAAATAGAAATATATTATAAATCACAA
-881 TGAAAAATAAAAAATGAGAAATCAATGCCAAAACATGACAAGGTCATCTTCAAAAAGGTAATCACCAACA
-811 CAAAGAAGACAAATCGATAATCAAAATCAAAATTTTATTCACATAATCTATTTTCAATAAATTAATTTTCC
-741 TTAATAATAAAAAAGCTATTAATTTAATTTGATCTTCTTGTATATCTCTCAATATATATTTTA
-671 ACATATATTTTACTATAGATATAACCTTTAAACCTCCTTTTAAATCAATCAAGCTTTTTGAGTCACTGA
-601 GATTATTAATCTGTATACACTTTTATGCTCTAAAATGGTGGCCCAATTTTCAACCATATAGAGTTATAAA
-531 TTAGAAACTTATTAACCTGGCTATCTAGTACGTTGAAGAAAAAGAACTGATCACACGATCTTAACCTGCA
-461 AGAAACTTAGTAAATGGAAGCGCTTTTCTGGCCAAACACAAACTTAAATCCTTCAATAAACCCCAA
-391 AAGCTTTCTAAAGCAACATGTTTCCAGTTACATCGCCAAAAGCAATCAAAATTTTATCAGACATGCAAC
-321 AGCATTTTATTTCTACGATCTGATGCTTCTAATCAAAATCAGAGTGGCCCACTTGTATATCTGCA
-251 ATCCAGATCATACACACACGCTGCCATTTGTTATACACTAAATGATCTTCAACGCTCAGATATAACTTTG
-181 AATGTTGTTCTCCCTGAGAAATAAATAGGCAACAAAGACATATAATCCGACCAACACTCCAATTTG
-111 GGTCTCTATATAAACCCTCACAAAGATCATCTCACAACTCAACCAAGCAGTCAATCTGCTCATAATCATAGC
-41 ATAGCCGTATAGAAAGAAATTTCTACACTCTGCTACCAAAAAATG

```

Fig. 1. *Cry j 1* のプロモーター領域の塩基配列

予想される翻訳開始コドン（太字）の1塩基前を-1として塩基数を左端に示す。アンダーライン、囲み枠、囲み枠に太字は、タバコのLIM様タンパク質の共通配列、56/59box, TATAboxにそれぞれ予想される塩基配列を示す。グレーの背景は *Cry j 2* のプロモーター領域との共通配列を示す。

```

-1032 CCATGGATGACACTAATGTTGACATTTATCAATTTGCTTAATTTATATATTTTTGTTTATAAATTTGAAC
-962 TCGATCCCACTAGAAATTCATGAACCTACCCCTTCTACTAGCCTAATTTTTTCAATACATATATATATAT
-892 TTTTTTCATTTTAAACAAAATAAGTAAAGATATCTTTAAATATGAATGACTCTAAAATTTCTTTT
-822 AAAAACTTAAATTTAAATTTAAATCCACTTTGGGAATGAGCTAAGTAAACATTTATATATGTTTT
-752 TCTCTAAAACCTCCATACAAAACAAAGGCTCAACCCACAGAAAGCAAAAAGTCAAAAGTTGCAATGG
-682 AACTTGTAAATCCTAATGACGAAATATACCAAGAGGTAACCGTGGTAACTAGAAGTAAACCAAGTT
-612 TAAAAATGATAGATATTCTTGGAGCCTTCAAGCAAAAAACTAAAAGAAGTATAATCCTCCTCGATACG
-542 TGTTATATCATCTGACCCCTGGGATTCCTGCTACTTCAACAAGTCTAAACGGTTCCAACAAGTTTAAATC
-472 GATGAAATATCGTGTCCATCGAAAACATGCTTTAAAAGTTCTATGACGGCTGGTGGCTGGACTGTAG
-402 ATGACTGCAGAACTTCCGAAAAATCTCTAAAATAAAGTGCCTTGATACTATCCATCACCTCATACT
-332 GAAAAACAATCACGGCATATCAATTCATCTATTCACTTACCCTATGATATTGATGATCTTTATAAGCATT
-262 AAACGAGATTGTAACGTGTAATTCAGAGTTGGATTTGCAAGAGGAAGTGCACAGAATCTTCTGATAT
-192 GGTGCTAAGAAAAAGCATTGTTGAAATTCAGATCCTGCAGTACCATTTTTTCTGGATTGCTCCTCTA
-122 TCGAAATGAAATACCCATAGGCGACATGTTAAATTTGAAACAGTGATTTCCCATCACAACATGTTTTT
-52 TTCTCTATAGTTGAGTTCGAGACAATATAGAAAGAAATTTTTCTTTTATAAATG

```

Fig. 2. *Cry j 2* のプロモーター領域の塩基配列

予想される翻訳開始コドン（太字）の1塩基前を-1として塩基数を左端に示す。太字に囲み枠は予想されるTATAboxを示す。グレーの背景は *Cry j 1* のプロモーター領域との共通配列を示す。

4 プロモーター領域の解析

4-1 実験材料

4-1-1 供試植物

N. tabacum SR-1 株を形質転換に用いた。

4-1-2 使用菌株

(A)大腸菌

遺伝子のサブクローニング等の一般操作には DH5 α 株及び JM110 株を用いた。

DH5 α (遺伝子型: F^- , Φ 80d *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k^- mk^+), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thr1*, *gyrA96*, *relA1*)

JM110 (遺伝子型: *dam*, *dcm*, *supE44*, *hsdR17*, *thi*, *leu*, *rpsL1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *thr*, *tsx*, Δ (*lac-proAB*)/ F^+ [*traD36*, *proAB*⁺, *lac F*, *lacZ* Δ M15])

(B)アグロバクテリウム

植物の形質転換を行うために *A. tumefaciens* LBA4404(pAL4404)株を用いた。

4-1-3 培地とその組成

(A)大腸菌用培地

LB 培地及び TB 培地(2-1-4 参照)を用いた。

抗生物質は必要に応じて下記の濃度で添加した。

ampicillin 100 μ g/ml または kanamycin 25 μ g/ml

(B)アグロバクテリウム用培地

YEB 培地 0.5% Beef Extract, 0.1% Yeast Extract, 0.1% Bacto Pepton, 0.5% Sucrose, 0.0012 M $MgSO_4$ (1.2% agar)

抗生物質は必要に応じて下記の濃度で添加した。

rifampicin は *ver helper Ti plasmid* を持つ菌体を選択するために添加した。

kanamycin 50 mg/l

rifampicin 50 mg/l

(C)植物組織培養培地

植物用培地には Murasige-Skoog Complete Medium-50 \times (MS 培地)を用いた(Gibco BRL). 固化剤として 0.5%ジェランガム(和光純薬)を用いた。シュート分化培地には植物ホルモンを添加したMS培地を用いた。

シュート分化培地へ添加した植物ホルモンは下記のとおり。

6-ベンジルアミノプリン 200 mg/L

α -ナフタレン酢酸 200 mg/L

抗生物質は必要に応じて下記の濃度で添加した。

claforan[®] 250 μ g/ml

kanamycin 100 µg/ml

4-1-4 ベクター

(A)pT7CjIP

Cry j 1 プロモーター領域(Accession No. AB080242)が挿入されている pT7Blue T ベクター.

(B)pBI101.1

プロモーター解析用のバイナリーベクターとして pBI101.1(CLONTECH)を用いた. pBI101.1 には, グルクロン酸と種々のアグリゴンとの縮合体である β-D-glucuronide を加水分解する酵素をコードする, 大腸菌由来の *uidA* が挿入されている. 選択マーカー遺伝子として NPT II 耐性遺伝子を用いた.

(C)pBI121

pBI121 ベクターをコントロールとして用いた. pBI121 は上に記した pBI101.1 の *Hind* III と *Bam* HI サイトに 800 bp のカリフラワーマザイクウイルス (CaMV)35s プロモーター の断片が組み込まれたベクターである. CaMV35s プロモーターは, タバコ植物細胞へ Ti-mediate transformation を行った場合, 高レベルで転写を行う.

4-2 方法

4-2-1 DNA 実験操作に関する技術, 大腸菌の形質転換, プラスミドベクターの回収, 塩基配列の決定

2-2 に記した方法と同様にして行った.

4-2-2 DNA 断片のアガロースゲルからの回収法

適当な制限酵素にて消化した DNA はアガロースゲル電気泳動により分離し, エチジウムブロミド染色した後, 366 nm の紫外線照射下において目的のバンドをナイフで切り出し, 以下に示す 2 種の方法の, どちらか一方でゲルから回収した.

- (1) EasyTrap™ (タカラバイオ) を使用して, NaI によりアガロースゲルを溶解し, ガラス・パウダーに DNA を吸着させることにより回収した.
- (2) ウルトラフリーUFC30HV100 (ポリミア) を用い, 遠心分離により DNA を回収した.

4-2-3 *uidA* 発現バイナリーベクターの構築

2-2 で単離した 5 つのプロモーターの全配列を両鎖から決定し, グループ分けをした. その結果 AB080242 の配列が最も変異の少ないプロモーターであったため, このクローンについてプロモーター解析を行うことを決定した. また, プロモーター領域の制御因子等の解析

のため, デリジョンをかけた様々な長さのプロモーターを用いた *uidA* 発現バイナリーベクターを構築した. 以下にその概要を示し, Fig. 3 にプラスミドマップを示す.

(A) プロモーター領域が 1,511 bp のベクター

Ti プラスミドベクター pBI101.1 の *Hind* III と *Bam* HI のサイトに pT7CjIP の *Cry j 1* プロモーター領域 1,511 bp の *Hind* III サイトと *Bam* HI サイトで消化したものをつなげ pBICj1 と命名した.

(B) プロモーター領域が 932 bp のベクター

pBICj1 をマスターベクターとし 1,511 bp のプロモーター領域内にある *Xba* I と pBICj1 のマルチクローニングサイト *Xba* I でデリジョンをかけ pBICj3 を構築した. なお, プロモーター領域内の *Xba* I サイトは *dam* メチル化されているため, JM110 株を用いて回収した pBICj1 ベクターを用いて構築し, pBICj3 と命名した.

(C) プロモーター領域が 499 bp のベクター

適当な制限酵素サイトが存在しなかったため *Cry j 1* プロモーターの上流 499 bp を PCR により増幅, pT7Blue T ベクターに挿入し配列決定をし, このコンストラクトを pT7B500CryjI と命名した. pT7B500CryjI の *Cry j 1* プロモーター領域が pBICj1 のプロモーター領域と相違がないことを確認した上で, pT7B500CryjI を *Hind* III と *Bam* HI サイトで消化したフラグメントを pBI101.1 の *Hind* III と *Bam* HI サイトへつなげベクターを構築し, pBICj4 と命名した.

(D) *Cry j 1* プロモーター領域が 223 bp のベクター

適当な制限酵素サイトが存在しなかったため *Cry j 1* プロモーターの上流 223bp を PCR により増幅, pT7Blue T ベクターに挿入し配列決定をし, このコンストラクトを pT7B250CryjI と命名した. pT7B250CryjI の *Cry j 1* プロモーター領域が pBICj1 のプロモーター領域と相違がないことを確認した上で, pT7B250CryjI を *Hind* III と *Bam* HI サイトで消化したフラグメントを pBI101.1 の *Hind* III と *Bam* HI サイトへつなげ, ベクターを構築し pBICj6 と命名した.

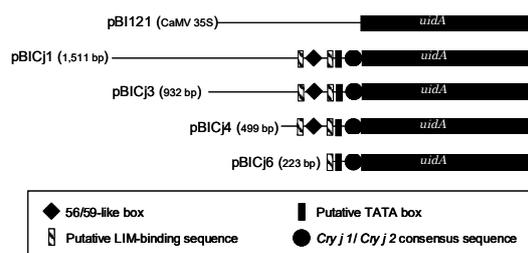


Fig. 3. 形質転換に用いた *Cry j 1* プロモーター::*uidA* コンストラクト *Cry j 1* の 5' 非翻訳領域と GUS コード領域はラインとバーでそれぞれ示し, 予想されるシスエレメントの部分を示した.

4-2-4 *A. tumefaciens* へのベクター導入

4-2-4-1A. *tumefaciens* コンピテントセルの調製

- 1) 使用する菌 (*A.tumefaciens* LBA4404 株) のグリセロールストックを解凍した。
- 2) 白金耳などでグリセロールストックを YEB 培地 (rifampicin 50 mg/l) に播種, 暗黒下にて培養した (28°C, 2~3 日)。
- 3) 形成されるシングルコロニーを白金耳などで拾い上げ, 3 ml の液体培地に接種し, 振盪培養した(200 rpm, 1~2 日)。
- 4) 菌の培養液 2 ml を採り, 40 ml の液体培地に加え, 600nm の吸光度が 0.8 になるまで 150 rpm で振盪培養した。(4~8 時間)。
- 5) 培養液を氷上で冷却。50 ml の遠心管に移し, 遠心機にて菌体を沈殿させた(4,000 rpm, 4°C, 10 min.)。
- 6) 上清を捨て, 遠心機で再度集菌した(4,000 rpm, 4°C, 10 min.)。
- 7) 沈殿物を氷冷した 1 ml の 50 mM-phosphate buffer (pH7.0)に懸濁した。
- 8) 1.5 ml チューブに 200 μ l ずつ分注した。
- 9) 液体窒素で急冷させ, -80°Cで使用するまで保存した。

4-2-4-2 *A. tumefaciens* の形質転換

- 1) 4-2-4-1 のストック液を氷上で融解し, 1 μ l の DNA を加えて緩やかに懸濁して, 30 秒以上氷上に静置した。
- 2) 懸濁液をキュベットに移し, 蓋をして中身が底に沈むようにした。
- 3) キュベット内の泡を抜き, チャンバーの水分をよく拭き取り, キュベットを装置に装着した。
- 4) ジーンパルサー II (バイオラッド)を以下の条件に合わせて通電した。
電圧 2.5 kV, capacitance 25 μ F, 抵抗 200 Ω
- 5) キュベット内に, YEB 培地を 1 ml 加えて, 先細チップで懸濁した。
- 6) 懸濁液を 1.5 ml の遠心管に移し, 28°Cで 2~4 時間静置培養した。
- 7) 30 秒, 10,000 rpm で遠心分離した。
- 8) 沈殿物を 100~200 μ l 残し, 上清をデカンテーションで取り除いた。
- 9) 残った菌体を緩やかに懸濁し, 形質転換体を選択するために固体培地(28°C, YEB + kanamycin 50 mg/l)で培養した。

4-2-5 *N. tabacum* の形質転換

- 1) 目的のバイナリーベクターを保持した *A.tumefaciens* LBA4404 を培地からかきとり, kanamycin 50 mg/L rifampicin 50 mg/L を含む 10 ml の YEB 培地で 28°C, 1 晩培養し前培養液とした。
- 2) 前培養液から 1 ml 取り kanamycin 50 mg/L rifampicin 50 mg/L を含む 10 ml の YEB 培地 28°C で培養し, 600nm の吸光度が 0.8~1.3 になるように調製した。
- 3) 5 min., 3,000 rpm で遠心をし, *A.tumefaciens* を集菌した。
- 4) 培地を捨て同様量の YEB 培地を加え攪拌し, 感染に使用した。
- 5) 無菌状態で生育したタバコの葉からリーフディスクを作成し, 菌体培養液を入れたシャーレに気孔を上にして浮かべ, 15 分間静置して感染を行った。

4-2-6 *N. tabacum* の再生

- 1) 感染処理の終了したリーフディスクより, 滅菌濾紙で水分を除去後, シュート分化培地上に気孔を上にして移植した。
- 2) 25°C, 暗所で 3 日間培養した。
- 3) シュート分化培地で 3 日間培養したリーフディスクを, claforan® 250 mg/L, kanamycin 100 mg/L を含むシュート分化培地に移植し, 25°C, 2,000 ルクス, 16 時間日長の条件下で培養し, 2~3 週間おきに新しいシュート分化培地に植えかえた。
- 4) 分化した不定芽は, 3~4 cmに成長した時点で, カルスから切り取り, MS 固体培地に移植し, 培養を続けた。
- 5) total DNA をそれぞれの個体から回収し, 目的の遺伝子が導入されている個体を PCR をかけて確認し, 選抜した。

4-2-7 花粉の発芽実験

花粉管における GUS 活性を観察するため, 花粉をシヨ糖寒天培地 (10%シヨ糖, 1.5%粉末寒天) を用いて培養した。ナス科の花粉の寿命は 5 日程度といわれているため, 開花後間もない花粉を使用した。以下にその方法を示す。

- 1) 容器の中に滅菌水で湿らせたキムタオルを敷き, その上にシヨ糖-寒天培地を重層したスライドガラスを乗せた。
- 2) スライドガラス上へ花粉を薄く捲き 28°Cで 2 時間程度, もしくは 24 時間培養した。
- 3) 光学顕微鏡もしくは実体顕微鏡を用いて観察を行っ

た。

4-2-8 GUS 活性の組織化学的・蛍光定量的検出

○GUS 活性の組織化学的検出

Twell ら⁴⁹⁾の方法に準じて以下のとおり検出をした。

(A)花粉, 花全体の場合

- 1) 組織を数 ml の固定液(0.3 %ホルマリン, 10 mM MES(pH5.6), 0.3 M マンニトール)にて室温で 45 分浸した。
- 2) 50 mM NaH₂PO₄(pH6.9), 1 % Triton X-100 の溶液に 37°C で 1 時間浸した。
- 3) 50 mM NaH₂PO₄(pH6.8) で 2 回洗浄。サンプルを適量の 1 mM X-Gluc. (50 mM NaH₂PO₄(pH6.8):メタノール(99 %)=4:1 の溶液に溶解)に浸した。
- 4) 真空装置を用いて, 10 分間吸引して試料内部までよく染み込むようにした。
- 5) 37°C, 1 時間インキュベート。
- 6) スライドグラスにのせ, 顕微鏡で観察した。

(B)発芽花粉の場合 4-2-7 の方法に従いスライドグラス上で発芽させた。

- 1) 50 mM NaH₂PO₄(pH6.9), 1 % Triton X-100 の溶液をスライドグラスに重層し, 乾燥しないように 37°C で 1 時間インキュベートした。
- 2) スライドグラスを斜めにし 50 mM NaH₂PO₄ (pH6.8) で 2 回すすいだ。
- 3) スライドグラスに適量の 1 mM X-Gluc.(50 mM NaH₂PO₄(pH6.8):メタノール(99 %)=4:1 の溶液に溶解)を重層した。
- 4) 真空装置を用いて 10 分間吸引して試料内部までよく染み込むようにした。
- 5) 37°C, 1 時間, 乾燥しないようにインキュベートし, 光学顕微鏡を用いて観察した。

○GUS 活性の蛍光定量的検出

Morikawa ら⁶²⁾の方法に従って実施した。

5 結果および考察

単離した *Cry j 1* プロモーター領域(Accession No. AB080242)は, 器官・時期特異的発現を与えるか, 推定したシスエレメントは遺伝子発現を制御しているかを確認するため, 異なる長さの *Cry j 1* プロモーター領域に *uidA* を融合したコンストラクト [pBICj1(1,511 bp), pBICj3(932 bp), pBICj4(499 bp), pBICj6(223 bp)] を構築し, これらをアグロバクテリウム法によるタバコの形質転換に使用した。また, ポジティブコントロールとして CaMV35s プロモーターに制御されている *uidA* が組み込まれた pBI121 を導入した形質転換タバコを複製し

た。

Cry j 1 プロモーター::*uidA* コンストラクトによる GUS 発現量の評価のため, Twell ら⁴⁹⁾の方法に従って, 形質転換タバコの幾つかの器官と組織 (花弁, がつ片, 雄ずい, 花粉, 花粉管, 葉, 茎) において GUS 活性の組織化学的検出を実施した。pBICj1 で形質転換したタバコの花, 葉, 茎における検出の結果, Fig. 4A に示すとおり, 花粉が含まれる葯全体において GUS 活性を検出した。この葯特異的活性は花粉粒の飛散後には消えていた (Fig. 4B)。また, 葉や茎において活性は検出されず (Fig. 4C), 形質転換植物における GUS 発現は花粉とタペータムに限定されていると考えられた。本研究では形質転換植物のタペータムにおける GUS 活性を確認することはできなかったが, 長いプロモーター領域 (1,511bp) に加え, 全ての長さのプロモーター領域において葯から放出された花粉粒で優先して直接的発現をすることを明らかにした。花の異なる成熟段階において花粉を採取し, 組織化学的検出を行った結果, 花粉における GUS 発現は花の成熟段階に依存することを示した。未成熟の花から採取した花粉 (A, B) と成熟した花から採取した花粉 (C) の GUS 活性を比較すると, A と比較して B の花粉は若干の活性を示し, C の花粉は高い活性を示した (Fig. 5)。さらに, *in vitro* で発芽させた後の花粉管においても活性を検出した (Fig. 5)。Fukui らは, スギにジベレリン処理後の 16~25 週の間, スギの雄花において *Cry j 1* が発現することを確認している¹⁸⁾。また, Miki-Hirosige ら²⁰⁾は, *Cry j 1* は成熟の早い段階の花粉の細胞壁, タペータム由来の花粉外壁のセキシンやオービクルスに局在していると示している。本研究結果と上述の既往の研究結果は, *Cry j 1* は花粉成熟と受精に重要な働きを示唆した。*Cry j 1* は, ペクトリアーゼ活性を示し, さらに本研究において花粉管伸長時に GUS 活性があることを確認したことからも, 花粉成熟の細胞壁変化と花粉管伸長に重要な働きをすることが考えられた。また, 裸子植物であるスギの *Cry j 1* プロモーターが被子植物である *N. tabacum* において種を越えて組織特異的に機能することから *Cry j 1* の生理的機能は植物の生殖において基本的かつ重要な役割を担っている可能性がある。スギの場合, 花粉管の伸長する期間が約 12 週であり³²⁾, 花粉管の伸長能力は受粉時の花粉間の競争などに影響を与える。従って, アレルゲンが少ないスギ花粉は, アレルゲンの多い花粉と比較してペクトリアーゼ活性が低いことが考えられ, 花粉管伸長能力の低下が予想され, 交配時の競争で劣勢になることが考えられる。

前述の組織化学的検出に加え, 蛍光定量的検出⁶²⁾を用

いて、T₀形質転換植物の成熟花粉粒とT₁植物の葉と茎のGUS活性を確認した。Table 1に示すとおり、pBICj1形質転換植物の花粉におけるGUS活性は他のuidA融合コンストラクトで形質転換した植物由来の花粉よりも有意に高かった。同様に、pBICj3の形質転換植物の花粉はpBICj4、pBICj6、pBI121よりも有意に高かった。これらの結果は、少なくとも2つの独立したシスエレメントがCryj1プロモーター領域の-1,511から-935と-932から-499の間の場所にあることを示している。成熟花粉の高いGUS活性とは対照的に、pBICj1形質転換植物における葉や茎における活性は野生株と同様に低い値であった。これらの結果は、GUS活性の組織化学的検出のデータと一致した。

pBICj4(-499から-1)とpBICj6(-223から-1)のコンストラクトの結果から、質的および量的な違いは示されず、本研究で予想されたスギの56/59-like box(-378から-371)は*N. tabacum*においては機能しない、または機能を持たない可能性がある。組織化学的、蛍光定量的検出の結果は、シスエレメントによる一時的、局所的な遺伝子の発現が223 bpの5'非翻訳領域によって制御されていることを示している。さらに、Cryj1およびCryj2の両方に存在する11 bpの5'非翻訳領域の保存配列と、LIM結合エレメントに類似した配列(-131から-120)は、花粉特異的に発現を制御するシスエレメントの候補であると考えられる。本結果のみでは、予想したシスエレメントが定性的、局所的に花粉における発現をコントロールしているか判断できないため、Cryj1プロモーターにおけるシスエレメントの更なる研究により、裸子植物シスエレメントの被子植物における活性や、花粉に関連した発現において裸子植物と被子植物間で同じ役割をするシスエレメントの塩基配列の違いを明らかにする必要がある。さらに、形質転換タバコのタペータムにおけるGUS発現の確認には更なる解析が必要のため、単離したプロモーター領域とcDNA配列を用いて、Cryj1発現抑制のコンストラクトを作製し、形質転換スギの作出をし、形質の変化を観察する必要がある。

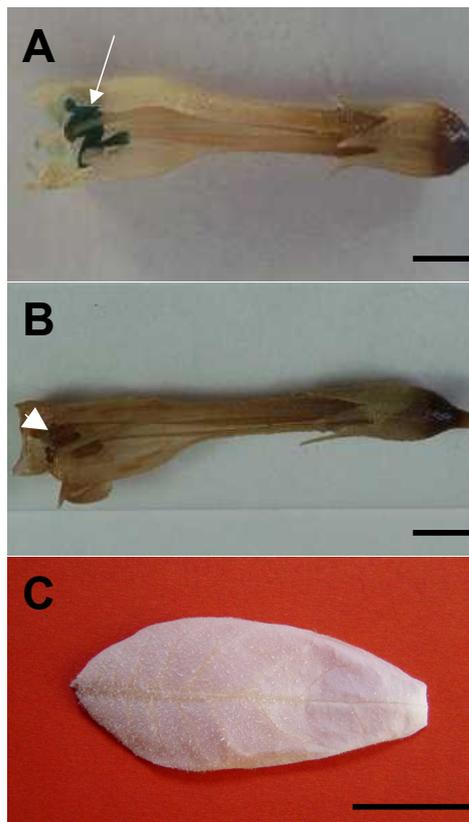


Fig. 4. pBICj1による形質転換植物における花の花粉飛散前(A)と後(B)および葉(C)のGUS組織化学的検出

組織は5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide(X-Gluc.)で染色し、エタノールで脱色(クロロフィルの抽出)を行った。花粉飛散前の雄花(A矢印)は前述の方法で染色された。一方、花粉飛散後の雄花では検出されなかった。Bのかすかな青色の染色は残っている花粉によるものであった。Bars=1 cm

Table 1. 異なる長さのCryj1プロモーター::uidAコンストラクトにより形質転換されたタバコの組織別のGUS活性の蛍光定量的検出

	GUS activity (4-MU pmole min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹) ¹⁾		
	Mature pollen	Leaf	Stem
pBI121	80 ± 43 ³⁾	690 ± 61 ⁷⁾	835 ± 41 ⁸⁾
pBICj1	4493 ± 2019 ⁴⁾	51 ± 6 ⁸⁾	52 ± 8 ⁸⁾
pBICj3	1476 ± 84 ⁵⁾	ND	ND
pBICj4	346 ± 82 ⁶⁾	ND	ND
pBICj6	340 ± 8 ⁶⁾	ND	ND
Wild type ²⁾	ND	61 ± 8 ⁸⁾	51 ± 1 ⁸⁾

¹⁾活性は4-methylumbelliferone(4-MU)産物の量の時間(pmole/min/mg protein)によって示された(±標準誤差;n=3)

²⁾非形質転換タバコ

³⁻⁶⁾有意に異なる結果を異なる数字で示した

ND: データなし

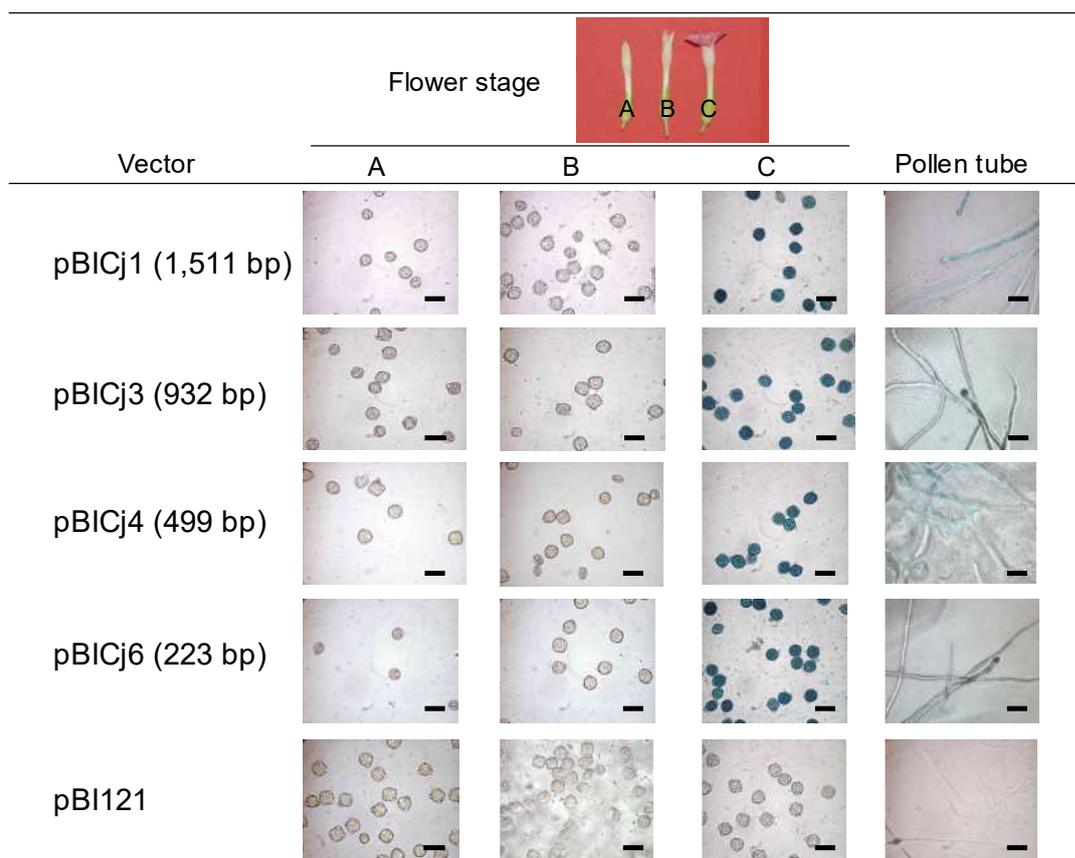


Fig. 5. 形質転換植物における花粉粒と花粉管のGUS組織化学的検出

*Gry j 1*プロモーター::*uidA*コンストラクト (pBICj1, pBICj3, pBICj4, pBICj6) およびポジティブコントロール (pBI121) が組み込まれた形質転換タバコの花粉と花粉管をX-Gluc. で染色した. 上段の赤い背景の写真に示す3つの異なる花の成熟過程 (A, B, C) の葯より花粉を採取した. 花粉管は *in vitro* で発芽させてから染色した. Bars=50 μ m

第2章 ファージディスプレイ法を用いた抗スギ花粉アレルゲン scFv 抗体の単離と分子特性

1 緒言

Cry j 1, *Cry j 2*にコードされる2つのスギメジャーアレルゲンは、花粉症を引き起こすことで日本において重大な問題とされている¹¹⁻¹³。これらアレルゲンによる症状は精力的に研究され、花粉症のメカニズムと予防や治療の方法について報告されている^{1,2,14}。

*Cry j 1*や*Cry j 2*に対するモノクローナル抗体はマウスやウサギから単離されている³³⁻³⁷。また、これら抗体を用いたELISAによる*Cry j 1*および*Cry j 2*の定量^{36,38,39}などが報告され研究が推進されてきた。一方、林木育種分野では、これら定量法を基にスギクローン間³⁹⁻⁴²、気象条件⁴³、標高⁴⁴の影響による、花粉中のアレルゲン量の比較などを行っている。しかし、*Cry j 1*にはアミノ酸配列の一部に異なる分子種が存在するため¹⁰抗体の種類によっては幾つかの精英樹のアレルゲンに対する結合力が弱く、定量に使用できる抗体は上述のものでは限界があること、方法によって抽出されるアレルゲン量が異なることより品種間のアレルゲンの正確な定量ができない課題もある。また、林木育種の現場において、アレルゲンの定量を普及させるためには、検査方法をより安価にする必要がある。アレルゲン定量において、市販されている抗体を使用した場合、費用の9割以上が抗体の価格となる。2009年時点の市販抗体の価格で、斎藤ら³⁹の方法でかかる費用を試算すると100検体当たり約1万5千~2万5千円となる。

モノクローナル抗体の作製方法は1975年にKöhler G.とMilstein C.によって細胞融合法を用いて確立されたことにより、上述の抗体以外にも様々な抗体が作製されるようになった。現在では、医学、生物学、農学、食品学などにおける基礎研究から応用研究に至るまで、モノクローナル抗体は物質の同定、分析、定量、精製などに利用されている。しかし、抗体を産生する動物細胞を培養するためにはコストがかかることから、診断・研究用の試薬として利用することが多く、用途に限りがある。近年、様々な生物を利用した抗体の生産方法が考案され、抗体が産業製品にも利用されるようになった。ファージディスプレイ法と呼ばれる遺伝子工学的手法を用いた組換え抗体の作製方法⁵²は、1985年にSmith G.

が繊維状ファージの表面にランダムにペプチドの提示が可能であることをScience誌に報告⁵³したのを発端に、現在は主に進化学研究などに使用される手法である。

本法を用いれば、大腸菌に産生させる組換えタンパク質として、抗体と同様の機能を持つ分子が、動物の飼育器や動物細胞の培養器といった大掛りな設備を必要とせずに作製できる。また、得られた抗体の遺伝子情報が分かるため、抗体性状の改変⁵⁴や、得られた抗体を遺伝学的に分類することも可能である。

組換え抗体は様々な分子が設計されており、scFv, Fab, Fv型等、IgGよりも小さい分子でありながら抗原認識機能を有するものである。小型化分子の設計目的として、scFv型の抗体は細胞内へ浸透することが確認されていることから、ドラッグデリバリーシステムや腫瘍マーカーへの応用が考えられる。また、大腸菌などにおける異種タンパク質発現系において、天然由来の抗体と比較して小型であるscFv型の方が発現し易い理由等も考えられる。

上述のとおり分子設計による抗体様機能を有した様々な分子が作製されているが、抗スギ花粉アレルゲン抗体の報告はない。そこで本研究では、ファージディスプレイ法を用いて抗スギ花粉アレルゲンscFv抗体を作製し、その評価を行った。

2 実験材料

2-1 供試動物

マウス BALB/cBy 7週齢 ♀

2-2 使用菌株

(A) 大腸菌

遺伝子のクローニング等の一般操作にはXL1-Blueを用いた。scFv抗体の産生はHB2151およびBL21 (DE3)を用いた。

XL1-Blue (遺伝子型：*hsdR17, supE44, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lacF'* [*proAB*⁺, *lac F*, *lacZ* Δ M15::Tn1(*tet*^r)] (ストラタジーン)

HB2151 (遺伝子型：K12, *ara*, Δ(*lac-pro*), *thi, FproA*⁺*B*⁺, *lac*^qZ ΔM15 (ストラタジーン)

BL21 (DE3) (遺伝子型: *E. coli* B, F⁻, *ompT*, *hsdS_B*(rB⁻ mB⁻), *gal*, *dcm*(DE3) (メルク)
 (B)ファージ ヘルパーファージ M13KO7 (インビトロジェン)

2-3 ベクター

- (A) ファージミドベクターとして pCANTAB5E (アマシャム) を用いた.
- (B) タンパク質発現用ベクターとして pET20b(+) (メルク)を用いた.

2-4 培地とその組成

- (A) LB 培地 (1.0%トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1.0% NaCl)
 - (B) 2×YT 培地 (1.7%トリプトン, 1.0% 酵母エキス, 0.5% NaCl)
- 抗生物質は必要に応じて下記の濃度で添加した.
 ampicillin 100 µg/ml または kanamycin 25 µg/ml

2-5 プライマー

以下のプライマーの作製はインビトロジェンに委託した. プライマーの設計は Pope ら⁶³⁾を参考にした. 混合塩基は IUB コードで示した.

VH1FOR:5' ,
 -TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCCTTGGCCCC-3'
 VH1BACK:5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3'
 MJK1mixFONX:5'-CCGTTTBATTTCCARCTTKGTSCC-3'
 VK2BACK:5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3'
 VH1BACKSfi:5' ,
 -GTCCCTCGCAACTGCGGCCAGC
 CGGCCATGGCCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3'
 JK1NOT10:5' ,
 -GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTGTATTCCA
 GCTTGGTGCC-3'
 JK2NOT10:5' ,
 -GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTCAG
 CTTGGTCCC-3'
 JK4NOT10:5' ,
 -GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTCCAA
 CTTTGTCCC-3'
 JK5NOT10:5' ,
 -GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTCAGCTCCA
 GCTTGGTCCC-3'
 linker:5' ,

-GGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAG
 GCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGG
 CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCA-3'
 pCANTAB5-R1:5'-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3'
 pCANTAB5-R2:5'-CGATCTAAAGTTTTGTCTTTCC-3'
 pCANTAB5-S3:5'-GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG-3'
 pCANTAB5-S4:5'-CCAGAGCCACCTCCGCTGAACC-3'

3 方法

3-1 scFv 抗体遺伝子の作製

マウスにスギ花粉アレルギーの免疫をつけさせるために, スギ花粉から抽出・精製した糖タンパク質で, Cry j 1 および Cry j 2 が含まれる Purified Sugi Basic Protein (林原生物化学研究所)を 0.025 mg/匹の量で約 14 日毎に腹腔内に 4 回注射することで感作させた. 抗原と混合するアジュバンドは 1 回目は Imject® Freund's アジュバンド (PIERCE), 2~4 回目においては Ribi アジュバンド (Ribi ImmunoChem Reserch) を使用した.

初回感作日と感作後 38 日目に部分採血を行い, 力価測定を行った. 方法は, ①固相化反応, ②洗浄, ③ブロック反応, ④一次反応, ⑤洗浄, ⑥二次反応, ⑦洗浄, ⑧発色反応の合計 8 工程で行い, 各工程の詳細は① Purified Sugi Basic Protein を 5 µg/ml 濃度で, マイクロプレートへ 50 µl/well 投入し, 自然吸着により固相化した. ②PBS にて 3 回洗浄, ③Blocker™ Casein in PBS (PIERCE) 200 µl/well を投入し, 20°C, 1 時間反応した. ④抗血清 (0 日, 38 日) を Blocker™ Casein in PBS にて 10²~10⁵ 希釈し, 50 µl/well 投入し, 20°C, 1 時間反応した. ⑤PBS にて洗浄, ⑥POD 標識抗マウス IgG 抗体 (ZYMED) を Blocker™ Casein in PBS で 1000 倍希釈したものを 50 µl/well 投入し, 20°C, 1 時間反応した. ⑦PBS にて 4 回洗浄, ⑧基質 ABTS (PIERCE) を 50 µl/well 投入し, 室温, 15 分反応後, 150 mM シュウ酸 50 µl/well の添加により発色を停止し, 405 nm の吸光度を測定した.

4 回目の注射の 3 日後にマウスより脾臓を摘出し, 組織より ISOGEN (日本ジーン) を用いて totalRNA を抽出した.

cDNA の合成は SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェン) を使用して以下の条件にて RT-PCR を行った. TotalRNA 2 µl (2 µg), random hexamers primer 5 µl (50 ng/µl), 10 mM dNTP mix 1 µl, DEPC-water 2 µl を混合後, 65°C/5 min.. 次に 10×RT buffer 2 µl, 25 mM MgCl₂ 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, RNaseH OUT 1 µl を混合後, 25°C

/10min.→42°C/50 min.→70°C/15 min.→4°C保存。次に、RNaseH を 1 μ l 加え、37°C/20 min.→4°C保存した。
 scFv 抗体遺伝子の合成方法は Pope ら⁶³⁾の方法を改良して以下のように行った。合成した cDNA を鋳型として、V_H および V_L の遺伝子を 3 回の PCR を組み合わせて合成した。V_H および V_L の cDNA は 25 pmol の VH1FOR と VH1BACK および MJK1mixFONX と VK2BACK プライマーと各 cDNA 10 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 2.5 mM dNTP 8 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, TaKaRa LA Taq 5 μ l, H₂O 15 μ l を混合し、以下の反応条件で PCR を実施した。反応条件:96°C 3min.→(96°C 30sec. 55°C 45sec. 72°C 60sec.) \times 25cycles, →72°C 7min.。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後に目的サイズの DNA を切り出して QIAquick[®] Gel Extraction Kit (キアゲン) により精製をした。1 回目の PCR 後に、V_H (50 ng), V_L(50 ng) および linker を混合し、94°C 60 sec.→63°C 4 min.を 7 サイクル実施し、V_H および V_L 遺伝子を linker で連結した。3 段階目の PCR で制限酵素サイト *Sfi*I および *Not*I サイトを付加するために、VH1BACKSfi, JK1NOT10, JK2NOT10, JK4NOT10, JK5NOT10 プライマーを 2.5 pmol になるように調整し、PCR 条件のアニーリング温度を 65°C に変更した他は 1 段階目の PCR と同様に実施した。

3-2 発現ベクターへの scFv 抗体遺伝子の導入

PCR で増幅した scFv 抗体遺伝子と pCANTAB5E ベクターを制限酵素 *Not*I および *Sfi*I で処理をし、アガロースゲル電気泳動で目的の DNA を分離して QIAquick[®] Gel Extraction Kit により精製をした。それらは T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ) で 16°C, 16 時間反応させることにより連結をした。次にそれら大腸菌宿主 XL1-Blue にジーンパルサー II (パイオラッド) を用いて導入し、ライブラリーとした。ライブラリーは 2 \times YT 培地 (ampicillin100 μ l/ml, グルコース 20 g/l 添加) 30°C で培養した。

3-3 Cry j 1 および Cry j 2 に特異的な scFv 抗体のスクリーニング

ライブラリーよりファージ抗体 (コートタンパク質の g3p の一部に scFv 抗体を提示した M13 ファージ) のスクリーニングを行った。ライブラリーを対数増殖期まで増殖させ、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ抗体を大腸菌で産生させた。産生されたファージ抗体は PBS と 20% polyethylene glycol と 2.5 M NaCl で沈殿させた。次にそれらを 2% スキムミルクと混合し 1 時間室温で放置することで、非特異的なファ-

ージ抗体を除いた。マイクロプレートに 5 μ g/ml の精製された Cry j 1 (生化学工業) または Cry j 2 (生化学工業) を 50 μ l/well で添加し、4°C で一昼夜放置した後、内容物を除いて 2% スキムミルクを添加し 1 時間放置した。アレルゲンがコートされたマイクロプレートにライブラリーを添加し、1 時間放置した。放置後、マイクロプレートを PBS-T (PBS に 0.05% Tween 20 を加えたもの) で 10 回洗浄した。結合したファージ抗体を 0.1 M Glycine buffer (pH 2.2) を 100 μ l/well 加えることで溶出し、それらを中和するために 1 M Tris-HCl (pH 6.8) を加えた。溶出したファージ抗体を大腸菌宿主 XL1-Blue に 37°C, 250 rpm の培養条件で感染させた。次のスクリーニングのために、10 ml のファージ抗体が感染した大腸菌を 200 ml の 2 \times YT 培地 (ampicillin100 μ g/ml, グルコース 20 g/l) へ添加し、対数増殖期まで培養した。次に、ヘルパーファージを添加し、ファージ抗体を大腸菌に産生させることで、目的の scFv 抗体を有するファージ抗体をスクリーニングした。

3-4 ELISA を用いた scFv 抗体のスクリーニング

ファージ抗体のスクリーニング後、それぞれのファージ抗体を産生する大腸菌クローンを、2 \times YT (200 μ l/well) を入れたマイクロプレートで培養し、ヘルパーファージを添加してファージ抗体を回収した。回収したファージ抗体は 2% スキムミルクと混合後、1 時間放置し、Cry j 1, Cry j 2, BSA が塗布されているマイクロプレート上に添加した。1 時間放置後、マイクロプレートは 3 回 PBS-T で洗浄、HRP 標識抗 M13 ファージモノクローナル抗体 (アマシヤム) を添加し 1 時間放置した。PBS で洗浄後、2',2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS) を加え、405 nm の吸光度を測定した。

ファージ ELISA (ファージ抗体をモノクローナル抗体やポリクローナル抗体の代わりに使用した ELISA) 後、それぞれ陽性の大腸菌クローンからプラスミドベクターを抽出し、大腸菌宿主 HB2151 に導入した。この大腸菌を用いて抗体分子を産生させるとファージ部分が除かれた scFv 抗体の状態で産生される。大腸菌の形質転換後、それぞれのクローンはマイクロプレート (2 \times YT 400 μ l/well, 1 M IPTG および ampicillin 50 mg/l) 30°C で培養した。形質転換された大腸菌のペリプラズム画分より scFv 抗体を抽出し、2% スキムミルクと混合し 1 時間放置後、Cry j 1, Cry j 2, BSA が塗布されているマイクロプレートに添加した。1 時間の放置後、マイクロプレートは PBS-T で洗浄し、HRP 標識抗 E Tag モノクローナル抗体 (アマシヤム) を添加し 1 時間

ートの各ウェルに、1 μg のマウスの免疫に使用した Purified Sugi Basic Protein (Cry), Cry j 1, Cry j 2, ヒノキ花粉抽出物(コスモバイオ), マツ花粉抽出物(Greer Laboratories) をそれぞれ塗布し、4°Cで一昼夜静置した。1% スキムミルクで1時間のブロッキングの後、精製を行った各 scFv 抗体を各ウェルに添加した。1時間の室温における静置の後、抗 6 \times His Tag モノクローナル抗体を scFv 抗体のウェルに添加し、PBS-T で洗浄後、100 ng/ml の HRP 標識抗マウス IgG モノクローナル抗体を添加しマイクロプレートを一時間室温でインキュベートした。各ウェルを洗浄後、ABTS 溶液を添加し 405 nm の吸光度を測定した。

3-10 表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた scFv 抗体の評価

抗体のカイネティクス解析のために、BIAcore X (ピアコア) を用いて、25°Cの条件下、HEPES-buffered saline (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH 7.4) を緩衝液として測定を実施した。CM-5 センサーチップ(ピアコア)を標準的なスタンダードアミンカップリング法で活性化させ、7分間 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide (NHS) と 0.2 M *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide の混合液でチップ上を活性化し、10 μg の Cry j 1 または Cry j 2 タンパク質を 10 mM acetate buffer (pH 4.0) にそれぞれ溶解させて、センサーチップ上へ固定化した。過剰な活性化 NHS は 1 M ethanolamine hydrochloride で不活性化をした。固定化の結果、約 1,000 resonance units (RU) の固定化にそれぞれ成功した。scFv 抗体の結合後のチップ再生は、10 μl の 100 mM glycine-HCl buffer を用いて 20~30 回行った。結合速度および解離速度の算出は BIAevaluation 2.1 software (Biosensor) を用いて行った。また、解離定数 (K_d) は次のように算出した； $K_d = \text{解離速度定数}(k_{off}) / \text{結合速度定数}(k_{on})$ 。

抗 Cry j 1 scFv 抗体および抗 Cry j 2 scFv 抗体のエピトープ認識特性を定性的に比較するために、BIAcore X を用いて実施した。実験方法は、各抗体のペアを作り、一方の抗体を約 1 μM 、もう一方の抗体を約 1 μM 、両方を混合した抗体をそれぞれインジェクションする⁶⁵⁾ことで、センサーチップ上の Cry j 1 または Cry j 2 に結合する量 (RU) を測定した。

4 結果

4-1 ライブラリーの構築

3 回目の Purified Sugi Basic Protein の注射後の 38

日目にマウスより部分採血し、抗体価の上昇を確認したところ、免疫した 3 匹のマウスすべてにおいて初回感作日と比較して 10³ 倍以上の抗体価の上昇が確認できたため、4 回目の注射の 3 日後に脾臓を摘出し totalRNA を抽出した。totalRNA より cDNA を合成した後、PCR によって V_H と V_L をコードしている遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子はフレキシブルリンカーで連結した後に、pCANTAB5E ヘクローニングした。作製したプラスミドベクターを用いた大腸菌の形質転換の結果、10⁸ 以上のライブラリーを作成することができた。90% 以上のクローンは適正のサイズ (約 750 bp) の scFv 抗体遺伝子を保有していることが PCR スクリーニングによって示された (データ示さず)。

4-2 ファージ抗体の選抜と特徴づけ

Cry j 1 および Cry j 2 に結合するファージ抗体 (コートタンパク質の g3p に scFv 抗体を提示した M13 ファージ) をライブラリーより単離するため、形質転換した大腸菌よりファージ抗体を産生させ、精製された Cry j 1 または Cry j 2 を固相化したマイクロプレート上で選抜した。最初に、4.0 \times 10¹² plaque-forming units (pfu) のファージ抗体からそれぞれの抗原に結合するクローンを選抜した。最初の選抜の結果、Cry j 1 および Cry j 2 に結合するファージ抗体を 893 および 1,103 pfu それぞれ選抜した。1 回目に選抜したファージ抗体を増幅し 2 回目の選抜を行ったところ、Cry j 1 および Cry j 2 に特異的なファージ抗体が 80 万および 60 万倍にそれぞれ濃縮された。最終のスクリーニングでは、さらに濃縮され、合計 3 回のスクリーニングによって Cry j 1 および Cry j 2 に特異的なファージ抗体は 1 回目のスクリーニング後と比較して 190 万および 90 万倍にそれぞれ濃縮された。“over-selection”⁶⁶⁾ を避けるため、96 クローンをそれぞれのスクリーニングの回数ごとにランダムに選抜し、ファージ ELISA (ファージ抗体をモノクローナル抗体やポリクローナル抗体の代わりに使用した ELISA) で確認した。選抜の結果、Cry j 1 および Cry j 2 に結合する 86 および 105 のファージ抗体のクローンをそれぞれ得ることができた。対照として、スクリーニングをかけていないライブラリーを用いてファージ ELISA を実施した結果、Cry j 1 および Cry j 2 に対する反応は見られなかった。本結果は Cry j 1 および Cry j 2 に対する親和性をもつファージ抗体を、作製したライブラリーよりアフィニティスクリーニングによって選抜したことを示した。

4-3 scFv 抗体産生クローンの塩基配列

選抜したクローン (Cry j 1 および Cry j 2 に対する 86

および105クローン)の塩基配列を基にした特徴づけのために、それぞれのクローンのscFvコード領域の塩基配列を決定した。その結果、Cry j 1 およびCry j 2 に特異的クローンは37および39に集約され、それらはV_H, V_L, リンカーの配列を有し、全てのクローンは可変領域の塩基配列が固有で、V_Hの超可変領域3(CDR3-H)の特徴で分類することができた。Table 1 およびTable 2 は CDR3-H の配列を基にした分類を示し、CDR3-H の決定はIMGT/IGT-QUEST program at the IMGT database (<http://imgt.cines.fr/>)を利用して行った。抗Cry j 1 scFv抗体はCDR3-Hのアミノ酸の長さに基づくグループ分けの結果、大きく分けて4つのグループに分類された。CDR3-Hのアミノ酸の数が15個(Group1)の抗Cry j 1 scFv抗体は配列を基にさらに9のサブグループに分類された。同様に、CDR3-Hのアミノ酸の数が13個(Group2)および9個(Group3)のグループは、アミノ酸配列を基にそれぞれ2つおよび4つのサブグループに分類された(Table 1)。抗Cry j 1 scFv抗体と同様に抗Cry j 2 scFv抗体はCDR3-Hのアミノ酸の長さに基づくグループ分けの結果、大きく分けて4つのグループに分類された。大部分の抗Cry j 2 scFv抗体クローンはCDR3-Hのアミノ酸の数が14個(Group1)および12個(Group3)のグループに分類された。配列の種類は前者が3に対して後者は12であった(Table 2)。

Table 1. 抗Cry j 1 scFv抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列による特徴づけ

Group	Subgroup	Clone	CDR3 sequence	Phage ELISA	ELISA	
1	1-1	Cj1-2		+++	++++	
		Cj1-3		+	+	
		Cj1-4	ARPLYGSRYYYAMDY	++	+	
		Cj1-6		++++	++	
		Cj1-63		+	++++	
		Cj1-67*		++	++++	
		1-2	Cj1-27	T-----	+	+
			Cj1-10		++	++++
			Cj1-51	-----G---	++++	++++
	1-3	Cj1-68		++	++++	
		Cj1-31	-----S-----	+	++++	
	2	1-4	Cj1-17		+	+++
			Cj1-47	T-----G---	+	+++
		Cj1-49		+	++++	
		1-5	Cj1-70	-----N-----G---	++++	++++
			Cj1-5	-----K---GL---	+	++
		1-6	Cj1-29		+	+
			Cj1-30	--GGLRLQTG----	+	+
		1-8	Cj1-69*		+	++++
			Cj1-65*	--GYGSRVGD---F	+	++++
3		2-1	Cj1-84*	ARRDMIATDAMDY	++	++++
	Cj1-86*		-----F	++	++++	
	2-2	Cj1-19		+	+++	
		Cj1-22		+++	++++	
		Cj1-25		+	+	
		Cj1-46		++	++++	
		Cj1-52	NAGGNSFPAY	+	+++	
		Cj1-53		+++	++++	
		Cj1-54		+	++	
		Cj1-55		+++	++++	
Cj1-56*		+	++++			
Cj1-79		++	++++			
3-2	Cj1-83	-----A-T-	++	++++		
	Cj1-13	-----S-----	+	+		
	Cj1-78	-----Y-----	+	++++		
3-4	Cj1-16		+	+		
	Cj1-73*	ARDGNFPAY	+	++++		

37クローンはCDR3-H領域のアミノ酸配列とその長さによって、4つのグループと16のサブグループにそれぞれ分類された。同じアミノ酸配列はダッシュ(—)で示した。ファージが提示しているscFv抗体とscFv抗体単独の精製Cry j 1に対する親和性は+から++++の記号で弱いものから強いものを示した。更なる解析はアスタリスク(*)で示したクローンで実施した。

Table 2. 抗Cry j 2 scFv抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列による特徴づけ

Group	Subgroup	Clone	CDR3 sequence	Phage ELISA	ELISA	
1	1-1	Cj2-24		+	++	
		Cj2-42		++	++++	
		Cj2-46	ARHEGNMVTDAMDY	+	+	
		Cj2-47		+	++	
		Cj2-59		++++	++++	
		Cj2-61		++++	++++	
	1-2	Cj2-48		+	++++	
		Cj2-75		+	+++	
		Cj2-76		++	++++	
		Cj2-77	-----L--	+++	++++	
		Cj2-80*		+	++++	
		Cj2-92		+	++++	
2	1-3	Cj2-40	--DY-STYGVYF-V	+	+	
		Cj2-33	ARNHGYDGTWFAY	+	+	
	2-1	Cj2-64	ARSGGHDFDFDY	++++	++++	
		Cj2-88		+	+	
	3-2	Cj2-85	-----R--Y---	+	+++	
		Cj2-43		++	++++	
	3	3-3	Cj2-44		+++	++++
			Cj2-63		++++	++++
		Cj2-65	----D---Y---	++++	++++	
		Cj2-66		++++	++++	
		Cj2-101		+++	++++	
		Cj2-103*		++	++++	
3-4		Cj2-87	----D---YL--	+++	++++	
		Cj2-30	----A---Y---	+	++++	
3-5		Cj2-10		++++	++++	
		Cj2-50	----A---Y-E-	+	++++	
3-6	Cj2-67		++++	++++		
	Cj2-68	-K-----Y---	+	+++		
3-7	Cj2-9		++++	++++		
	Cj2-84	-K---R--Y---	+++	++++		
3-8	Cj2-54*		++++	++++		
	Cj2-71	---N-Y-TR-A-	++	++++		
3-9	Cj2-52		++++	+		
	Cj2-74	---N-Y-TW-A-	+	+++		
3-10	Cj2-105	---NNR--V---	+	++++		
	Cj2-90*	---NYK-S--E-	+	++++		
4	4-1	Cj2-51	AGGAY	+	+	

39クローンはCDR3-H領域のアミノ酸配列とその長さによって、4つのグループと17のサブグループにそれぞれ分類された。同じアミノ酸配列はダッシュ(—)で示した。ファージが提示しているscFv抗体とscFv抗体単独の精製Cry j 2に対する親和性は+から++++の記号で弱いものから強いものを示した。更なる解析はアスタリスク(*)で示したクローンで実施した。

4-4 scFv抗体を用いたELISA

ファージELISAによって選抜したクローンのscFv抗体の親和性を確認するため、ファージ本体からscFv抗体を切り離れた状態でELISAを行った。Table 1, 2で示したクローンからプラスミドベクターを抽出し、大腸菌宿主HB2151に導入しファージ部分が無いscFv抗体を産生させた。それぞれのscFv抗体を準備し、マイクロプレートにCry j 1 およびCry j 2 を固相化させてELISAを行った。Table 1, 2に示すとおり、scFv抗体を用いたELISAによる親和性は、それぞれのクローンによって異なり、ファージELISAの結果とも異なった。

scFv 抗体を用いた ELISA の場合、ファージ抗体を用いた場合と比較して 49 クローン吸光度は高くなり、17 クローンは同じ、10 クローンは低くなった。

4-5 scFv 抗体の精製と特徴づけ

6 つの抗 Cry j 1 scFv 抗体(Cj1-56, -65, -67, -69, -73, -84)と 4 つの抗 Cry j 2 scFv 抗体(Cj2-54, -80, -90, -103)を任意に選抜した。それらはファージ ELISA, ELISA による評価で高い親和性を示し、CDR3-H のアミノ酸配列が異なるクローンである。効率的に scFv 抗体を産生するために、発現ベクターを pCANTAB5E から pET20b(+)-へ変換し、6 × His Tag を付加させた。6 × His Tag を付加した scFv 抗体はそれぞれのプラスミドベクターで質転換した大腸菌 BL21(DE3)株で産生させ、抗体はアフィニティークロマトグラフィーと size-exclusion クロマトグラフィーで精製した。Fig. 1 に示すように、精製した抗体のサイズを確認し、塩基配列から推定した分子量と矛盾がないことを確認した。

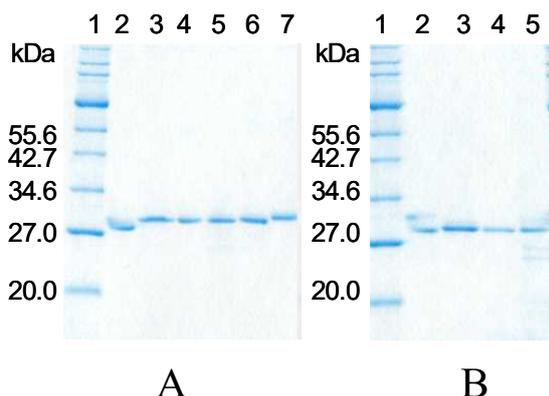


Fig. 1. 精製scFv抗体のSDS-PAGE

A: 抗Cry j 1 scFv抗体のSDS-PAGE. レーン1: 分子量マーカー; レーン2～7: Cj1-56, Cj1-65, Cj1-67, Cj1-69, Cj1-73, Cj1-84. B: 抗Cry j 2 scFv抗体のSDS-PAGE. レーン1: 分子量マーカー; レーン2～5: Cj2-54, Cj2-80, Cj2-90, Cj2-103.

精製した scFv 抗体の親和性を比較するため、マウスの免疫に使用した Cry j 1 と Cry j 2 を含むスギ花粉アレルゲン (Cry) と精製された Cry j 1, Cry j 2, ヒノキ花粉抽出物, マツ花粉抽出物, BSA, 対照の抗体として Cry j 1 および Cry j 2 に対する市販のモノクローナル抗体 (Cj1mAb13, Cj1mAb26, Cj2mAb27) を用いた ELISA を行った。抗 Cry j 1 scFv 抗体の場合、すべてのクローンは Cry j 1 と Cry に結合した (Fig. 2A)。モノクローナル抗体と scFv 抗体の価数をそろえ、精製された Cry j 1

および Cry j 2 に対する親和性 (吸光度) を比較した結果、5 つの抗 Cry j 1 scFv 抗体 (Cj1-65, -67, -69, -73, -84) の親和性は、Cj1mAb26 よりも高く、Cj1mAb13 と同等の値を示した。一方、抗 Cry j 1 scFv 抗体の Cry j 2 に対する交差反応は Cj1mAb13, 26 よりも有意に低かった。抗 Cry j 2 scFv 抗体の場合、すべての精製した抗体は Cry j 2 と結合し、Cj2mAb27 と同等の値を示した。抗 Cry j 2 scFv 抗体の Cry j 1 に対する交差反応は、Cj2-80, -90, -103 が Cj2mAb27 と比べて有意に低かった (Fig. 2B)。上記に示した抗原に対する親和性に加え、全 scFv 抗体の BSA に対する非特異的な結合は Cj1mAb13, Cj1mAb26, Cj2mAb27 と比較して有意に低かった。これらの結果は、得られた scFv 抗体が購入した抗体よりも目的の抗原以外のタンパク質に対する交差反応が低いことを示した。

4-6 SPR を用いた scFv 抗体の Cry j 1 および Cry j 2 に対する親和性等の測定

SPR を用いて Cry j 1 および Cry j 2 に対する scFv 抗体の親和性を評価した。結合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) を決定し、解離定数 (K_d) をそれぞれの抗体について算出した。 k_{on} は 1 M の溶液の存在下で 1 秒間に形成される複合体の数を表す。 k_{off} は 1 秒間に解離する複合体の割合を示す。 K_d は結合の強さを示す。抗 Cry j 1 scFv 抗体に関して、 k_{on} と k_{off} の範囲はそれぞれ $3.35 \times 10^4 \sim 2.03 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ と $7.08 \times 10^{-4} \sim 8.37 \times 10^{-3} (s^{-1})$ の範囲であり、 K_d に関しては $4.84 \times 10^{-9} \sim 1.62 \times 10^{-7} M$ であった (Table 3)。抗 Cry j 1 scFv 抗体の k_{on} の値は Cj1mAb13 と比較して $10^2 \sim 10^3$ 倍低い値を示した。Cj1-84 は単離した抗 Cry j 1 scFv 抗体の中で最も高い K_d を示した。

抗 Cry j 2 scFv 抗体の場合、 k_{on} と k_{off} は $5.67 \times 10^3 \sim 6.74 \times 10^4 (M^{-1}s^{-1})$ と $1.13 \times 10^{-3} \sim 1.72 \times 10^{-2} (s^{-1})$ をそれぞれ示し、 K_d は $1.11 \times 10^{-7} \sim 4.21 \times 10^{-7} M$ を示した (Table 3)。Cry j 2 に対する抗 Cry j 2 scFv 抗体の k_{on} は 0.82 ～ 10 倍 Cj2mAb27 よりも高い値を示した。抗 Cry j 2 scFv 抗体の k_{off} は Cj2mAb27 と比較して 10 ～ 10^2 倍低い値を示した。

Table 3. 精製した scFv 抗体の結合特性

Antibody	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_d (M)$
Cj1-56	1.12×10^5	1.67×10^{-3}	1.49×10^{-8}
Cj1-65	6.72×10^4	1.39×10^{-3}	2.07×10^{-8}
Cj1-67	2.03×10^5	1.31×10^{-3}	6.46×10^{-9}
Cj1-69	3.35×10^4	9.01×10^{-4}	2.69×10^{-8}
Cj1-84	1.46×10^5	7.08×10^{-4}	4.84×10^{-9}
Cj1-73	5.16×10^4	8.37×10^{-3}	1.62×10^{-7}
Cj1mAb13	4.06×10^7	2.04×10^{-1}	5.02×10^{-9}
Cj1mAb26	4.51×10^5	1.41×10^{-1}	3.12×10^{-7}
Cj2-54	6.74×10^4	1.72×10^{-2}	2.55×10^{-7}
Cj2-80	5.67×10^3	1.13×10^{-3}	1.99×10^{-7}
Cj2-90	9.86×10^3	4.15×10^{-3}	4.21×10^{-7}
Cj2-103	3.94×10^4	4.39×10^{-3}	1.11×10^{-7}
Cj2mAb27	6.93×10^3	2.19×10^{-4}	3.16×10^{-8}

とおり、6つの抗Cryj1 scFv抗体は異なるエピトープを認識する4つの独立したグループに分類された。一方、1つの抗Cryj2 scFv抗体は1つのグループに属した。

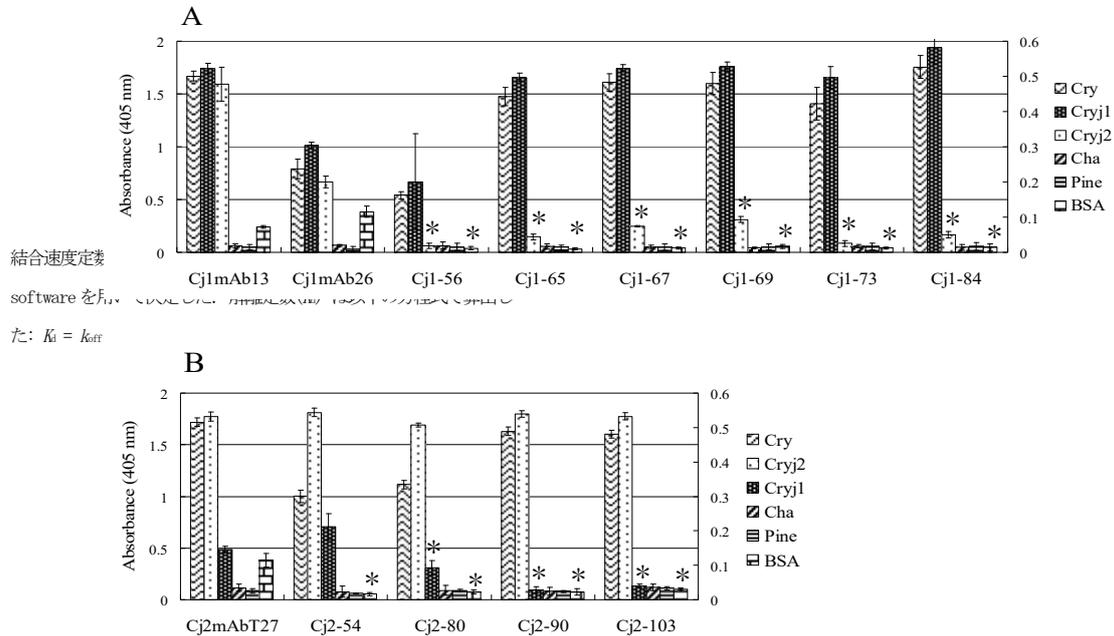


Fig. 2. 精製scFv抗体のELISA

マイクロプレートは1 μgのスギ花粉抽出物 (Cry), Cry j 1, Cry j 2, ヒノキ花粉抽出物(Cha), マツ花粉抽出物, BSAでそれぞれ固相化した。精製scFv抗体を各ウェルに投入・インキュベーション後、材料・方法に示したとおり親和性を測定した。A: 精製抗Cry j 1 scFv抗体の結果。 B: 精製抗Cry j 2 scFv抗体の結果。 X軸の左側はCry j 1(A)またはCry j 2 (B) と対応し、右軸はその他のものと対応する。*はCj1mAb13 (A) またはCj2mAbT27 (B) と Student's t-test で $p < 0.05$ の有意差があるものを示す。

4-7 SPRを用いたscFv抗体のエピトープ認識による分類

Cry j 1 およびCry j 2 に特異的な scFv 抗体のエピトープ認識による分類を2つの scFv 抗体をチップ上で飽和させる方法で実施した。scFv 抗体の混合物のインジェクションにより増加したRUの値は、ペアのそれぞれのRUの値と比較して、増加した場合は、ペアの抗体は異なるエピトープを認識すると仮定した (Fig. 3)。すなわち、RUの値が増加しない場合は、ペアの抗体は同じエピトープを認識する、または、近くのエピトープを認識すると仮定した (Fig. 4)。

Table 4はSPRによるペアワイズインタラクションの解析結果を示す。抗Cryj1 scFv抗体の場合、互いに阻害をしているペアはCj1-65, Cj1-67 と Cj1-73, Cj1-84 (Tableの灰色の背景で示したペア)で観察された。他のペアの結果は、それぞれの値の合計値とほぼ一致していることから、これらの抗体は抗原に対して互いに阻害しないことを示している。一方、抗Cryj2 scFv抗体のエピトープ認識は1つのエピトープを認識する、または、近辺のエピトープを認識すると考えられ、Fig. 5に示す

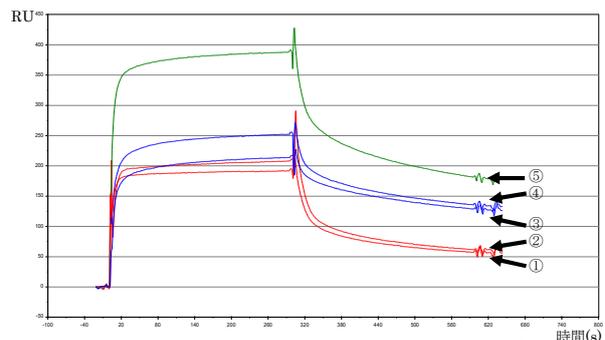


Fig. 3. SPRを用いたscFv抗体のエピトープ認識による分類

ペアの scFv 抗体が異なるエピトープを認識する場合を示す。Cj1-56を約1Mインジェクション (①) し、飽和状態であることを確認するために2倍量のCj1-56をインジェクション (②) した。次にCj1-65を約1Mインジェクション (③) し、飽和状態であることを確認するために2倍量のCj1-65をインジェクション (④) した。次にCj1-56とCj1-65を各約1Mずつ混合インジェクション (⑤) した。⑤のインジェクションによるRU値は、Cj1-56とCj1-65のそれぞれのRU値 (①, ③) よりも高い値を示すことから、Cj1-56とCj1-65は異なるエピトープを認識すると仮定した。

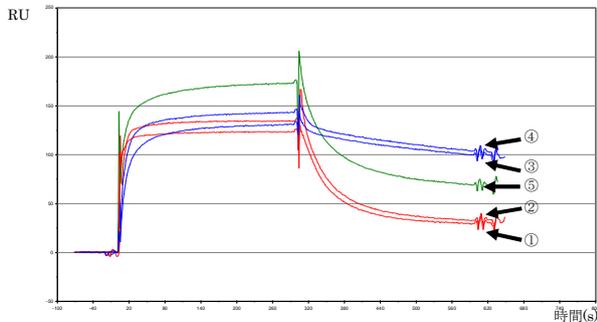


Fig. 4. SPRを用いたscFv抗体のエピトープ認識による分類

ペアのscFv抗体が同じエピトープを認識または重複して認識する場合を示す。Cj1-54を約1Mインジェクション(①)し、飽和状態であることを確認するために2倍量のCj1-54をインジェクション(②)した。次にCj1-80を約1Mインジェクション(③)し、飽和状態であることを確認するために2倍量のCj1-80をインジェクション(④)した。次にCj1-54とCj1-80を混合しインジェクション(⑤)した。⑤のインジェクションによるRU値は、Cj1-80のRU値(③)よりも低い値を示すことから、Cj1-54とCj1-80は同じエピトープまたはお近くのエピトープを認識すると仮定した。

Table 4. SPRを用いたscFv抗体のエピトープ認識による分類

Co-injection scFv	Injection scFv					
	Cj1-56	Cj1-65	Cj1-67	Cj1-69	Cj1-73	Cj1-84
None	55.7	134.3	219.3	152.6	137.3	238.1
Cj1-56	-	183.6	266.7	215.3	195.2	292.5
Cj1-65	-	-	214.6	245.1	254	330.9
Cj1-67	-	-	-	262.7	356.6	388
Cj1-69	-	-	-	-	203.6	390.7
Cj1-73	-	-	-	-	-	226
Cj1-84	-	-	-	-	-	-

Co-injection scFv	Injection scFv			
	Cj2-54	Cj2-80	Cj2-90	Cj2-103
None	33.5	99.5	43.3	46.7
Cj2-54	-	73.6	47.4	47.4
Cj2-80	-	-	88.8	92.7
Cj2-90	-	-	-	46.4
Cj2-103	-	-	-	-

結果は抗Cry j 1および抗Cry j 2 scFv抗体の対応する抗原の相互作用によるペアワイズインタラクション解析による resonance units (RU)の値で示した。Cry j 1またはCry j 2がコートされている表面へ結合するscFv抗体の値をマトリクス上部の行に示す。競合させたscFv抗体の値をマトリクスに示した。阻害、非阻害の相互作用は灰色と白色の背景でそれぞれ示した。

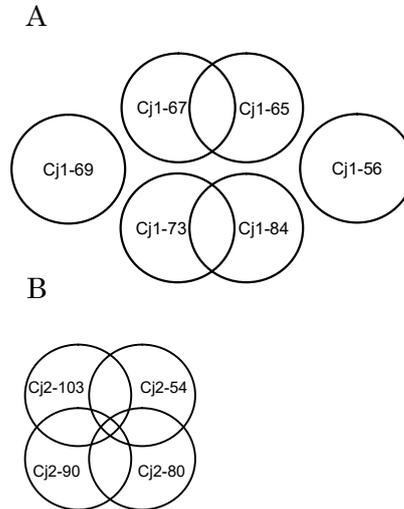


Fig. 5. SPRを用いたscFv抗体のエピトープ認識による分類結果の模式図

Cry j 1(A)およびCry j 2(B)のエピトープの違いの模式図。円の重複している部分はscFv抗体の競合している部分を示す。

5 考察

抗体は微生物や他の外来物質の接種による反応である免疫システムによって産生される。モノクローナル抗体の作製技術においては、無限増殖が可能な腫瘍細胞が抗体を産生する動物細胞と融合される。この融合の結果はハイブリドーマとよばれ、抗体を継続的に産生する。ハイブリドーマにより生産された抗体は高価なため応用先に限りがある。ファージディスプレイ法はハイブリドーマを使用しない安価な抗体の生産方法である。動物細胞の培養は不要であり、scFvやFabといった抗体を大腸菌によって産生する。

スギ花粉アレルゲンに対する市販の抗体はハイブリドーマによって生産されている。これら抗体は研究用試薬として利用されるが、比較的高価(200円以上/μg)なことからその応用先に限りがある。スギ花粉アレルゲンに対する抗体が安価・大量に作製することが可能ならば、多くの他の方法に利用が可能になる。例えば、林木育種分野において、アレルゲンの少ないスギ精英樹を選抜する際に、安い抗体を利用したスクリーニング法は効果的であろう。

本研究において、2つの主要スギ花粉アレルゲン(Cry

j1およびCryj2)に対するscFv抗体をファージディスプレイ法で作製したことを初めて報告した。作製したライブラリーは 10^8 以上の独立したクローンを含み、他の報告のライブラリーサイズと同程度であった。ライブラリーよりCryj1またはCryj2に結合するクロンのスクリーニングとファージELISA、ELISA、塩基配列の比較による選抜によって、抗Cryj1 scFv抗体と抗Cryj2 scFv抗体を、それぞれ37クローンおよび39クローンを選抜することができた。Table 1, 2に示したとおり、ファージELISAとELISAの親和性は異なる結果となった。理由として、各抗体の立体構造の違いにより大腸菌における産生効率が異なり、抗体の濃度が異なっていたこと、2次抗体の親和性が異なること、ファージ部分の有無による立体構造の違いによる親和性の変化などが考えられた。最終的に6つと4つのCryj1およびCryj2にそれぞれ特異的なscFv抗体を任意に選抜した。選抜した抗Cryj1 scFv抗体と抗Cryj2 scFv抗体は、スギ花粉抽出物およびCryj1またはCryj2に対して、市販の抗体(Cj1mAb13, Cj1mAb26, Cj2mAb27)と同様の特異性を示した。一方、市販の抗体と比較して、抗Cryj1 scFv抗体はCryj2およびBSAに対して、抗Cryj2 scFv抗体はCryj1およびBSAに対して交差反応が有意に低い結果であった。ただし、選抜をした10のscFv抗体のうちCj2-54のみCryj1に対する交差反応が市販の抗Cryj2モノクローナル抗体と比較して有意差が認められなかった(Fig. 2A, 2B)。本結果は、選抜した10の抗体がCryj1およびCryj2にそれぞれ特異性を示し、さらに9つの抗体は市販の抗体と比較して、交差反応が有意に低かったことから、花粉アレルギーに対する特異性の高い抗体を生産する方法としての有用性を示した。

大きな結合速度定数(k_{on})と小さな解離速度定数(k_{off})は抗体の抗原に対する早い結合と遅い解離をそれぞれ示す。解離定数(K_d)は k_{on} と k_{off} で計算することができ、これは抗体が抗原に対する親和性の強さを示す値として有用である。小さな K_d は抗体が抗原に対して強く結合することを示す。Table 3に示すように、抗Cryj1 scFv抗体の k_{on} と k_{off} の値は購入した抗体よりも小さな値であった。加えて、Cj1-67とCj1-84の K_d はCj1mAb13と同程度であり、Cj1mAb26よりも低い値であった(Table 3)。この結果は、これらの2つのscFv抗体は少なくともELISAを実施するにあたり、購入した抗体と同様に利用することが可能であるが、Cj1mAb13とCj1mAb26よりもCryj1に対して結合は遅く、解離も遅いことを考慮した条件検討が必要である。抗Cryj2 scFv抗体の k_{on} は、Cj2mAb27より約10倍

高いクローンが存在しが、Cj2mAb27よりも低い k_{off} を有する抗体は無かった(Table 3)。抗Cryj2 scFv抗体はCj2mAb27と比較して、ELISAを実施するにあたり、Cryj2に対して結合は早く解離は遅いことを考慮した条件検討が必要であることが示された。片倉らはスクリーニングコンディションの違いは選抜される抗体の結合・解離速度定数に対して大きな影響を持つと報告⁶⁷⁾している。スクリーニング条件の変更により、本研究で作製したライブラリーから異なる種類の抗体を単離できる可能性がある。

抗体は6つの超可変領域を持っており、CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H、CDR1-L、CDR2-L、CDR3-Lと命名されている⁶⁸⁻⁷⁰⁾。これらの領域の活性構造は、CDR3-Hの場合を除いて、カノニカル構造特異的に制限されている。CDR3-HはV、D、Jドメインのリンカーの役割をはたし、抗原認識に重要な役割をはたしているという報告がある⁷¹⁾。Table 1と2に示すように、獲得したscFv抗体におけるCDR3-Hのアミノ酸配列の長さは合計8種類であり、長さによってエピトープ認識が異なることが予想された。しかしながら、SPRを用いたscFv抗体のエピトープ認識の結果は、Cryj1およびCryj2のそれぞれ4つおよび1つのエピトープを認識していると示された(Table 4, Fig. 5)。本結果はCDR3-Hにおけるアミノ酸配列の長さの違いによる分類は、必ずしも認識するエピトープが異なることを示すものではないことを示唆した。また、エピトープが重なっているまたは近くと判断されたものについては、合成ペプチドを用いた解析をすることで、詳細なエピトープ認識部位を特定することが可能であると考えられた。

本研究において得られた抗体はCryj1およびCryj2に対して特異性の高いものであり、これらの抗体は大腸菌で産生させるためハイブリドーマ由来の抗体と比較して簡便に調製できる。さらに、遺伝子情報が分かるため、変異を加えれば抗体の特性を改良することが可能であり、育種現場において安価な低アレルギースギ精英樹の選抜システムを構築できる可能性が示唆された。

終章

1 要約

スギは通直性、材質に優れ、造林が容易で成長が早い
ため、造林の対象樹種として古くから植栽されてきた。
近年、その花粉に含まれるアレルゲンによってスギ花粉
症を引き起こすことが分かり、育種目標に生長、材質、
病害抵抗性などの有用形質に加え、花粉やアレルゲンの
少ない形質を併せ持つスギが加わるようになった。

花粉症対策においては、“花粉の少ないスギ品種”の
中から“アレルゲンも少ない品種”を選抜することが有
効⁷⁾とされているが、今後、低アレルゲンスギを活用し
た育種を進める場合、それらで構成される採種園の造成
が想定されるため、低アレルゲンであることが交雑育種
による種子生産にどのような影響を与えるのか明らか
にする必要がある。5ヶ所のスギ採種園の外部花粉混入
率についてDNAマーカーを用いて調査した結果、35%
~66%とされている⁴⁹⁾ことから、花粉生産量の少ない低
アレルゲンスギの採種園では、外部花粉の影響はさらに
大きくなることが予想される。また、前述のとおり、交
配時に重要な役割を担うことが予想されるスギ花粉ア
レルゲンであるCryj1とCryj2については、これらを
コードするcDNAの塩基配列や酵素としての機能は明
らかにされてきたものの、その発現時期や様式について
詳細な解析がされていないことから、交雑時にどの場所
でアレルゲンが酵素として働き、どのような役割を担っ
ているのか不明である。また、アレルゲン定量に必要な
Cryj1やCryj2に対する抗体は開発されているものの、
育種現場においてアレルゲンを定量する試薬としては
大変高価であり、一部の育種研究で利用されているのみ
である。

そこで、本研究ではスギの交雑育種に関する基礎的知
見を得ることを目的として、Cryj1およびCryj2のプロ
モーター領域の単離と、単離したCryj1のプロモー
ター領域の解析を行うことで器官・時期特異的発現を確
認した。次に、育種現場で安価に使用できる汎用性の高
い抗体を得るため、ファージディスプレイ法を用いて
Cryj1およびCryj2に対する抗体の作製を実施すると
共に、得られた多数の抗体の性質を調べた。

即ち、第2章に記載のとおり、スギ花粉で発現する
Cryj1のプロモーター領域を、inverse-PCR法により
totalDNAを鋳型にして単離した。単離したCryj1プロ
モーター領域とレポーター遺伝子を連結したコンスト

ラクトを構築し、これを用いてタバコを形質転換するこ
とで、花粉の発達段階ごとに特徴的な β -D
-glucuronidase(GUS)の発現特性を確認した。このプロ
モーター領域の4つのデリーション変異体を用いた
GUS発現の組織化学的解析では、花粉粒の成熟段階に
よる発現の違いと223bpの5'非翻訳領域が、花粉管や
花粉における一時的・部分的な遺伝子発現に十分な領域
であることを示した。本章の結果は、スギのプロモー
ター配列はタバコにおいて花粉に関連して発現するこ
とを示し、種を越えて組織特異的に機能することからCry
j1の生理的機能は植物の生殖において基本的かつ重要
な役割を担っていると推察された。GUS発現の器官特
異性の評価では、花粉飛散前の葯、花粉、花粉管におい
て発現が確認できたことより、Cryj1は花粉成熟中に花
粉に蓄えられ、雌花における花粉管伸長時にも発現また
は機能していることが考えられた。このことによって、
低アレルゲンスギで構成される採種園では、低アレルゲ
ン花粉の花粉管の伸長能力がアレルゲンの多い花粉と
比較して弱くなることが予想され、外部花粉との競争で
劣勢になることが考えられた。

第3章に記載のとおり、抗体のスクリーニングの結果、
Cryj1およびCryj2にそれぞれ親和性を示す86およ
び105のクローンを得ることができた。そのうち抗原に
対する親和性が高く、塩基配列が異なる抗体を任意に6
および4クローンそれぞれ選抜した。市販の抗体を比較
対照とし、産生・精製したscFv抗体を用いて抗原特異
性を調べたところ、抗Cryj1 scFv抗体はCryj2に対
して交差反応が有意に低かった。一方、抗Cryj2 scFv
抗体もCryj1に対して交差反応が有意に低かった。表
面プラズモン共鳴を用いて抗Cryj1 scFv抗体の k_{on} お
よび k_{off} を測定したところ、市販の抗体と比べて k_{on} は
約100倍、 k_{off} は約1000倍低い値を示した。すなわち、
市販の抗体と比較すると結合速度および解離速度が遅
いことを示した。一方、抗Cryj2 scFv抗体は市販の抗
体と比べて k_{on} は約10倍、 k_{off} は約10倍高い値を示し
た。すなわち、市販の抗体と比較すると結合速度および
解離速度が速いことを示した。例えば、アッセイの迅速
性が要求される凝集法には k_{on} が大きい抗体が、洗浄プ
ロセスがあるELISAには k_{off} が小さい抗体が適してい
ることから、市販の抗体と比べて、単離したCryj1に
対する抗体はELISA、Cryj2に対する抗体は凝集法に
適していることが考えられた。

本研究において得られた抗体は Cry j 1 および Cry j 2 に対して特異性の高いものであり、これらの抗体は大腸菌で産生させるためハイブリドーマ由来の抗体と比較して簡便に調製できる。さらに、遺伝子情報が分かるため、変異を加えれば抗体の特性を改良することが可能であり、育種現場において安価な低アレルギースギ精英樹の選抜システムを構築できる可能性が示唆された。

2 今後の展望

花粉症対策として有効なスギの選抜方法は、雄花着花性が比較的低いクローンの中からアレルギーの少ないスギを選抜することである。本研究によって解決されたことも含め、アレルギーの少ないスギの選抜における課題・原因・対策について以下に示す。

①アレルギー定量方法の標準化

・方法による抽出効率の違い

アレルギー定量をする場合、雄花より花粉を収集し抽出液中で攪拌することでアレルギーを抽出させるが、既往の研究は各々で抽出方法が異なる。これら方法には、抽出効率の差異、抽出時間の差異による活性の低下など、不確定な要素があるため、抽出方法の標準化をして一定条件におけるアレルギー抽出物による相対評価を進めることが効率的である。

・試薬による測定値の違い

一般的な定量方法として、モノクローナル抗体を用いた ELISA が考えられる。しかし、アレルギーにはアミノ酸配列の一部が異なる分子種が存在し、使用する抗体によって各々のアレルギーに対する反応性が異なる理由から、反応性の悪いアレルギーを多く有する対象木では正確な定量を行うことができない。従って、多様なアレルギーに対して安定的に結合する抗体の開発が必要である。そのためには、アレルギーのエピトープの中で保存性の高い部分の特定と、それに対する抗体の開発が必要である。本研究において単離した scFv 抗体の遺伝子情報を把握できるため、抗体の選別や反応性等の機能改変を行うことが可能である。また、幾つかの scFv 抗体を組み合わせることで人工的にポリクローナル抗体を作製することも考えられる。特定の scFv 抗体を大量に産生させ、それらを混合しポリクローナル抗体としてサンドイッチ ELISA の系を構築し、多様なアレルギーに対しても定量ができるようにすることも可能である。

抗体毎に解離速度や結合速度は異なるので、実験条件によって測定値が変動する。既往の研究で使用されている抗体は様々であるため、多くのスギで比較をするならば測定に使用する抗体および実験条件を統一

する必要がある。また、コントロールとして使用するアレルギーは、使用する抗体によって反応性が異なることから検量線の作成に注意が必要である。測定ミスの防止のために、定量試験で少ない値を示したものは DNA 解析による推定アミノ酸配列の比較も有効である。

・アレルギー量の比較基準の違い

少花粉系統の選抜に利用されてきた基準は着花指数である。着花指数とは、雄花の着生状態を目視により評価し指数評価するものである⁷²⁾。一方、アレルギー量の評価に基準の設定はなく、花粉重量や花粉一粒あたりなど様々である。花粉重量はクローン間に約 1.9 倍の差異があることから、一定花粉重量よりも花粉 1 個のアレルギー量を評価することがより精度の高いアレルギー量とされている⁴⁾。しかし、花粉一粒あたりの評価は、雄花一つあたりに含まれる花粉粒数が異なる可能性があり、着花指数と合わせて評価する場合には検討の余地が残されていると思われる。さらに、花粉表面に散在する小粒体のオービクルスに含まれるアレルギーについては、花粉の採取過程で剥がれてしまい失われている可能性も考えられる。本研究の Cry j 1 プロモーターの解析では、薬内の花粉において GUS 活性が検出され、花粉飛散後の薬では検出されなかった。このことはスギにおいても花粉飛散後の雄花にはアレルギーが残っていないことが考えられるため、花粉飛散直前の雄花 1 つあたりのアレルギー量を評価し、アレルギー量を着花指数と同様に指数評価（アレルギー指数）を行い、着花指数×アレルギー指数で各クローンの総アレルギー量を評価することがより精度の高い方法と考えられる。アレルギー指数は、着花指数と同様、経年観察した上で決定する必要がある。

②アレルギー定量方法の低コスト・簡略化

前述のとおり、定量方法は ELISA が主流であり、本方法は抗体を用いた方法である。抗体は、ハイブリドーマ由来であるため、試薬として大変高価であり定量実験の実施にはコストがかかる。一方、本研究において作製した scFv 抗体は組換えタンパク質として大腸菌を用いて産生することができるので、ハイブリドーマ由来の抗体と比較して安価である。

近年、ELISA と比較して簡便に評価できるイムノクロマト法が開発されている。イムノクロマト法は、ニトロセルロースなどのメンブレンフィルター上で抗原抗体反応を行うもので、反応時間は 10~30 分程度である⁷³⁾。また、scFv 抗体を用いたイムノクロマト法も開発されている⁷⁴⁾ことから、本研究で作製した抗体を用いれば、より低コスト・簡便化を図ることが

可能である。

③少アレルゲンスギで構成される採種園管理法

少アレルゲンスギの選抜は、雄花着花性が比較的低いクローンの中からアレルゲンの少ないスギを選抜することになるため、花粉生産量は通常のスギより少ない。精英樹で構成される採種園において、外部花粉の流入率が3割以上であった報告がある。したがって、少花粉系統で構成される採種園ではさらに外部花粉の影響は大きくなると考えられる。本研究のプロモーター解析により、花粉管伸長時に *Cryj 1* が働くことが示唆されたことから、アレルゲン量が少ないことにより、花粉管の伸長能力が低下することが考えられ、交配時の競争で劣勢になることも考えられる。従って、交配袋や閉鎖系の採種園など外部花粉の影響を少なくする対策が必要である。

その他、スギ花粉症対策として遺伝子組換えスギを用いる方法がある。林木は永年性であり、生殖活動を開始するまでの期間が極めて長く、従来の育種技術により人間が望む新たな品種を作出することは非常に困難であるため、スギの有用形質を保持させたまま、単一の形質を選択的に改変できる遺伝子組換え技術が注目されている⁷⁵⁾。その手段の一つとして RNAi 法があげられる⁷⁶⁾。本方法は目的形質の構造遺伝子断片の逆鎖 RNA を発現させることで、目的形質の RNA は翻訳が阻害され個体の形質を変えることができる。*Cryj 1* を抑制するために上述の方法を用いた場合、使用するプロモーターの候補として、本研究で単離・解析した *Cryj 1* プロモーターが *Cryj 1* の発現時期、発現場所で転写を行うことができると予測されるため、*Cryj 1* プロモーターを使用することが効率的であると推察される。

ファージディスプレイ法は、培養細胞の継代や動物の飼育をすることなく試験管内で大腸菌に抗体を産生させることが可能であり、従来のハイブリドーマ法と比べて生産コストを抑えることができる。抗体や酵素といったバイオ素材をフィルターに応用する試みは、以前から研究開発が行われてきたが、バイオテクノロジーの急速な進歩によって、近年、実用化のレベルまで到達できるようになり、抗体を工業製品に応用することも可能になってきた⁷⁷⁾。例えば、ダイキン工業㈱では抗体を用いたバイオフィルターを搭載した空気清浄機を実用化販売している。現在上市されている抗スギアレルゲン抗体の多くは、他の多くの抗体と同様にハイブリドーマ法によって生産されている。これらの抗体は主に診断・研究用試薬として使用されているが、高価であることから他の用途への応用に限界があるのが現状である。仮にスギアレ

ルゲン抗体を安価で大量生産することができれば、工業製品の用途展開が期待できる。例えば、フィルターに抗体を担持させれば、スギ花粉粒本体の捕捉だけではなく、多くのマスクを通過することができる約 430nm のオービクルに含まれる *Cryj 1*²⁰⁾ を捕捉・不活化することが可能になるかもしれない。

本研究において、スギ花粉アレルゲン遺伝子のプロモーター領域の単離と解析、スギ花粉アレルゲンに対する組換え抗体の作製を行うことができた。これら試みはこれまでになくのものであり、今後、単離されたプロモーターや抗体が活用され、スギ花粉症の克服へ向けた対策が進み、さらには林業の発展につながることを信じる。

謝 辞

本研究の全般に渡り、的確且つ適切なお指導を頂いた、東京農工大学・梶田真也准教授に深謝致します。

多くの有益な御助言を頂きました岐阜大学・向井謙教授、東京農工大学・諸星紀幸教授、片山義博教授、川合伸也准教授に多謝致します。

プロモーター解析に使用した試料をご提供いただきました森林総合研究所・石井克明博士に心から厚く御礼いたします。

プロモーター解析の実験にご協力いただきました、片山研究室・大塚祐一郎博士、補永文子氏、梶田研究室・上杉幹子氏に心から厚く御礼いたします。

ファージディスプレイ法を用いた抗スギ花粉アレルギー scFv 抗体の研究の機会を与えて下さいました、静岡県沼津工業技術支援センター・太田俊也博士、共に研究・議論を交わした飯塚千佳世氏、並びに、しずおかファルマバレーセンター・小澤一道博士に心から厚く御礼いたします。

抗スギ花粉アレルギー scFv 抗体の塩基配列の決定にご協力いただきました静岡県立がんセンター・秋山靖人先生、丸山宏二博士、川口善浩氏、しずおかファルマバレーセンター小桜充久氏に心から厚く御礼いたします。

たくさんの議論を交わし示唆に富む御助言を頂きました梶田研究室・塩川貴広氏、並びに、同研究室の皆様方に心から厚く御礼いたします。

ご指導・ご支援いただきました静岡県沼津工業技術支援センター、並びに、静岡県森林・林業研究センターの諸先輩、同僚の皆様方に心から厚く御礼いたします。

以下、有形無形の御協力を下さった方々に切に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Horiguchi S and Saito Y (1964): Japanese cedar pollinosis in Nikko. *Jpn Allergy*, 13, 16-18.
- 2) 斎藤洋三, 井手武, 村山貢司 (2006): 花粉症の化学. 化学同人, 京都.
- 3) 平 英彰 (2005): 日本人はスギ花粉症を克服できるか. 新潟日報事業社, 新潟.
- 4) 斎藤真己 (2006): スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) の雌性不稔性と低花粉アレルゲン (Cry j 1) 性に関する林木育種学的研究—スギ花粉症の軽減に向けた育種的な対策—. 富山県林業技術センター研究報告, 19.
- 5) 独立行政法人森林総合研究所 (2009): 花粉症対策品種の開発 - 林木育種からのアプローチ - .
- 6) 中村博一, 宇津木寛 (2006): 花粉の少ないスギ品種ミニチュア採種園について. 林木の育種, 特別号, 21-24.
- 7) 後藤陽子 (2005): スギにおける花粉アレルゲンの遺伝的変異に関する研究. 林育研報, 21, 1-66.
- 8) Taira H, Teranishi H, and Kenda Y (1993): A case study of male sterility in sugi (*Cryptomeria japonica*). *J Jpn For Soc*, 75, 377-379 (in Japanese with English summary).
- 9) 高橋誠, 星比呂志, 岩泉正和, 久保田正裕, 福田陽子, 武津英太郎, 栗延晋 (2005): 無花粉スギ「爽春」の特性と雌性不稔を取り入れた今後の育種の展開. 林木の育種, 216, 55-58.
- 10) Goto Y, Kondo T, Ide T, Yasueda H, Kuramoto N, and Yamamoto K (2004): Cry j 1 isoforms derived from *Cryptomeria japonica* trees have different binding properties to monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy*, 34, 1754-1761.
- 11) Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, and Shida T (1983): Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol*, 71, 77-86.
- 12) Taniai M, Ando S, Usui M, Kurimoto M, Sakaguchi M, Inoue S, and Matuhasi T (1988): N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Lett*, 239, 329-332.
- 13) Sakaguchi M, Inouye S, Taniai M, Ando S, Usui M, and Matuhasi T (1990): Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy*, 45, 309-312.
- 14) Shibamura K and Nishimura Y (1991) Japan cedar pollinosis on the immunogenetics. *Kagaku*, 61, 93-97 (in Japanese).
- 15) Sone T, Komiyama N, Shimizu K, Kusakabe T, Morikubo K, and Kino K (1994): Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem Biophys Res Commun*, 199, 619-625.
- 16) Taniguchi Y, Ono A, Sawatani M, Nanba M, Kohno K, Usui M, Kurimoto M, and Matuhasi T (1995): Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy*, 50, 90-93.
- 17) Wang Y, Mukai Y, Fukui M, Futamura N, Nagao A, and Shinohara K (1998): Pollen-specific expression of the gene for an allergen, Cry j I, in *Cryptomeria japonica*. *J For Res*, 3, 131-134.
- 18) Fukui M, Futamura N, Mukai Y, Wang Y, Nagao A, and Shinohara K (2001): Ancestral MADS box genes in Sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don (Taxodiaceae), homologous to the B function genes in angiosperms. *Plant Cell Physiol*, 42, 566-575.
- 19) Futamura N, Mukai Y, Sakaguchi M, Yasueda H, Inouye S, Midoro-Horiuchi T, Goldblum RM, and Shinohara K (2002): Isolation and characterization of cDNAs that encode homologs of a pathogenesis-related protein allergen from *Cryptomeria japonica*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 2495-2500.
- 20) Miki-Hirosige H, Nakamura S, Yasueda H, Shida T, and Takahashi Y (1994): Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex Plant Reprod*, 7, 95-100.
- 21) Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, and McCormick S (1989): 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.
- 22) Budelier KA, Smith AG, and Gasser CS (1990) : Regulation of a stylar transmitting tissue-specific gene in wild-type and transgenic tomato and tobacco. *Mol Gen Genet*, 224, 183-192.
- 23) McCormick S (1991) : Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet*, 7, 298-303.
- 24) Rafnar T, Griffith IJ, Kuo MC, Bond JF, Rogers BL, and Klapper DG (1991) : Cloning of Amba I (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J Biol Chem*, 266, 1229-1236.
- 25) Rogers HJ, Harvey A, and Lonsdale DM (1992) : Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specifically expressed during microsporogenesis. *Plant Mol Biol*, 20, 493-502.
- 26) Turcich MP, Hamilton DA, and Mascarenhas JP (1993) : Isolation and characterization of pollen-specific maize genes with sequence homology to ragweed allergens and pectate lyases. *Plant Mol Biol*, 23, 1061-1065.
- 27) Kim SR, Finkel D, Chung YY, and An G (1994) : Abundance patterns of lily pollen cDNAs: characterization of three pollen-preferential cDNA clones. *Sex Plant Reprod*, 7, 76-86.
- 28) Brown SM and Crouch ML (1990) : Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell*, 2, 263-274.
- 29) Niogret MF, Dubald M, Mandaron P, and Mache R (1991) : Characterization of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in maize. *Plant Mol Biol*, 17, 1155-1164.
- 30) Mu JH, Stains JP, and Kao T (1994) : Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol Biol*, 25, 539-544.
- 31) Wakeley PR, Rogers HJ, Rozycka M, Greenland AJ, and Hussey PJ (1998) : A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol Biol*, 37, 187-192.
- 32) 横山敏孝 (1975) : スギにおける胚の形成と球果の成長. 林業試験場研究報告, 277.
- 33) Kawashima T, Taniai M, Taniguchi Y, Usui M, Ando S, Kurimoto M, and Matuhasi T (1992) : Antigenic analyses of sugi basic protein by monoclonal antibodies: I. Distribution and characterization of B-cell-tropic epitopes of Cry j I molecules. *Int Arch Allergy Immunol*, 98, 110-117.
- 34) Homma R, Uesato N, Miyahara A, Kimura H, Hantani Y, Ito G, Hayashibe M, Ando t, Ino Y, Yamakawa H, and Kurumi M (1995) : Production of a monoclonal antibody against Cry j 2. *Jpn J Allergol*, 44, 461-466 (in Japanese with English summary).
- 35) Watanabe M, Tamura M, Nagoya T, Takahashi Y, Katagiri S, and Oka T (1992) : An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen, Cry j I, using monoclonal antibodies. *Jpn J Allergol*, 41, 1535-1539 (in Japanese with English summary).
- 36) Yasueda H, Akiyama K, Maeda Y, Hayakawa T, Kaneko F, Hasegawa M, and Shida T (1991) : An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitation of Sugi pollen and Dermatophagoides mite allergens and its application for standardization of allergen extracts. *Jpn J Allergol*, 40, 1218-1225 (in Japanese with English summary).
- 37) Suzuki M, Ito M, Ito H, Baba S, Takagi I, Yasueda H, and Ohta N (1996) : Antigenic analysis of *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* using anti-Cry j 1 monoclonal antibodies. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 525, 85-89.
- 38) Sawatani M, Ono A, Kohno K, Kawashima T, Taniguchi Y, Ikegami H, Usui M, and Kurimoto M (1994) : Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of Cry j I and Cry j II. *Jpn J Allergol*, 43, 467-473 (in Japanese with English summary).
- 39) Saito M and Teranishi H (1999) : Development of the simple quantitative method for Cry j 1 in sugi pollen using microplatereader. *J Jpn For Soc*, 81, 318-324 (in Japanese with English summary).

- 40) Sasaki Y, Taniguchi Y, and Shoyama Y (1996) : Analysis of allergens present in the pollen of polyploid species of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). Res Rep Oita Pref For Exp Stat, 22, 8-12 (in Japanese).
- 41) Goto Y, Kondo T, and Yasueda H (1999) : The variation of Cry j 1 content in pollen among Japanese cedar plus trees selected in Kanto breeding region. Jpn J Palynol, 45, 149-152 (in Japanese with English summary).
- 42) Sawatani M, Yasueda H, Akiyama K, Shida T, Taniguchi Y, Usui M, Ando S, Kurimoto M, and Matuhashi T (1993) : Immunological and Physicochemical properties of Cry j II, the second major allergen of Japanese cedar pollen (*Cryptomeria japonica*). Jpn J Allergol, 42,738-747 (in Japanese with English summary).
- 43) Goto Y, Kondo T, Hayashi E, Kuramoto N, Takahashi M, and Yasueda H (2004) : Influences of genetic and environmental factors on the concentration of the allergen Cry j 1 in sugi (*Cryptomeria japonica*) pollen. Tree Physiol, 24, 409-414.
- 44) Saito M and Teranishi H (2002) : Immunologic determination of the major allergen, Cry j 1, in *Cryptomeria japonica* pollen of 117 clones in Toyama prefecture: Some implications for further forestry research in pollinosis prevention. Allergology International, 51, 191-195.
- 45) 森口喜成 (2003) : DNA マーカーによるスギの遺伝・育種に関する研究—DNA マーカーを用いた採種園改良のための基礎的研究—. 林木の育種, 208, 9-10.
- 46) 岩渕雅樹, 岡田清孝, 島本功 (2000) : モデル植物ラボマニュアル. p231-241, シュプリンガー・フェアラーク, 東京.
- 47) Höfig KP, Moyle RL, Putterill J, Walter C (2003) : Expression analysis of four *Pinus radiata* male cone promoters in the heterologous host *Arabidopsis*. Planta, 217, 858-867.
- 48) Twell D, Yamaguchi J, Wing RA, Ushiba J, McCormick S (1991) : Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. Genes Dev, 5, 496-507.
- 49) Twell D, Yamaguchi J, and McCormick S (1990) : Pollen specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. Development, 109, 705-713.
- 50) Okada T, Sasaki Y, Ohta R, Onozuka N, and Toriyama K (2000) : Expression of *Bra r 1* gene in transgenic tobacco and *Bra r 1* promoter activity in pollen of various plant species. Plant cell physiol, 41, 757-766.
- 51) Moyle R, Moody J, Phillips L, Walter C, and Wagner A (2002) : Isolation and characterization of a *Pinus radiata* lignin biosynthesis-related *O*-methyltransferase promoter. Plant Cell Rep, 20, 1052-1060.
- 52) Winter G and Milstein C (1991) : Man-made antibodies. Nature, 349, 293-299.
- 53) Smith GP (1985) : Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the viron surface. Science, 228, 1315-1317.
- 54) Sundberg EJ, Urrutia M, Braden BC, Isern J, Tsuchiya D, Fields BA, Malchiodi EL, Tormo J, Schwarz FP, and Mariuzza RA (2000) : Estimation of the hydrophobic effect in an antigen-antibody protein-protein interface. Biochemistry, 39, 15375-15387.
- 55) 向井謙, 横山敏孝 (1985) : 珠孔液から見たスギの受粉のチャンス. 林木の育種, 特別号, 25-27.
- 56) Rogers SO and Bendich AJ (1985) : Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol Biol, 5, 69-76.
- 57) 遺伝子工学実験ノート・上 (1997) : 羊土社, 東京.
- 58) Kulikauskas R and McCormick S (1997) : Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. Plant Mol Biol, 34, 809-814.
- 59) Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, Lonsdale DM, and Twell D (2001) : Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. Plant Mol Biol, 45, 577-585.
- 60) Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, Endo S, Yamada K, Ebinuma H, (2000) : Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved

- in lignin biosynthesis. *Plant J*, 22, 289-301.
- 61) Baltz R, Domon C, Pillay DT, and Steinmetz A (1992) : Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein. *Plant J*, 2, 713-721.
- 62) Morikawa M, Yamakawa T, Washino T, Kodama T, and Igarashi Y (1999) : Delayed recovery of β -glucuronidase activity driven by an Arabidopsis heat shock promoter in heat-stressed transgenic *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Rep*, 19, 473-497.
- 63) Pope AR, Embleton MJ, and Mernaugh R (1996) : Construction and use of antibody gene repertoires. In: McCafferty J, Hoogenboom H, Chiswell D (eds) *Antibody Engineering*. Oxf Univ Press, Oxford, pp1-40.
- 64) Skerra A, Plückthun A (1988) : Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240, 1038-1041.
- 65) Regnault V, Arvieux J, and Lecompte T (1999) : Both kinetic data and epitope mapping provide clues for understanding the anti-coagulant effect of five murine monoclonal antibodies to human β 2-glycoprotein I. *Immunology*, 97, 400-407.
- 66) Russel M, Lowman HB, and Clackson T (2004) : Introduction to phage biology and phage display. In: Clackson T and Lowman HB (eds) *Phage Display*. Oxf Univ Press, Oxford: pp1-26.
- 67) Katakura Y, Zhuang G, Nakatani T, Furuta T, Omasa T, Kishimoto M, Suga K, and Shioya S (2004) : A practical kinetic model for efficient isolation of useful antibodies from phage display libraries. *J Mol Catalysis B Enzymatic*, 28, 191-200.
- 68) Wilson IA, and Stanfield RL (1994) : Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol*, 4, 857-67.
- 69) Padlan EA (1994) : Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 31, 169-217.
- 70) Kabat EA, Wu TT, Perry H, Gottesman K. and Foeller C (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. NIH Publication, 91, 3242.
- 71) Xu J and Davis M (2000) : Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*, 13, 37-45.
- 72) 林野亨 (1991) : 雄花着花性に関する調査実施要領. 平成3年6月6日付け3林野普第82号 林野庁長官通達.
- 73) 太田俊也, 飯塚千佳世, 山田晋也, 望月剛, 難波靖治 (特願2006-237181) 単鎖可変部抗体を用いたイムノクロマト法.
- 74) 太田俊也 (2003) : イムノクロマト法キットによる微生物・ウイルスの迅速簡易検出. *生物工学会誌*, 81, p264.
- 75) 篠原健二, 伊ヶ崎知弘, 二村典宏, 毛利武, 清野嘉之, 長尾精文 (2006) : スギ花粉症対策を考える. *林業と薬剤*, 175, 10-17.
- 76) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- 77) 新井潤一郎 (2004) : バイオ抗体フィルター—インフルエンザウイルスを1分以内に不活化する空気質フィルターの技術開発—. *バイオインダストリー*, 10, 35-39.