

大気汚染物質によるスギ花粉アレルゲン Cry j 1 の変性に関する基礎研究

プロジェクト代表者：王 青 躍（理工学研究科 環境科学・社会基盤部門・准教授）

1 研究の背景と目的

近年、地球温暖化に伴って、春夏季にスギ、ヒノキ、イネ科等の花粉飛散数の急増、生物由来の大気浮遊粒子状物質の発生、花粉症発症の低年齢化、大気汚染物質の関与が発表された(環境省, 2005)。花粉症はアレルギー症の1つである。花粉表面やその内部に含まれるアレルゲン Cry j 1 が生体内に侵入し、これが生体内に存在する抗体に認識されることで発症する。本プロジェクト研究は、我が国において最も深刻化している、また海外においても人体健康に懸念されつつある春夏季の花粉症原因物質の花粉アレルゲン・生物起源などに着目し、Cry j 1 含有微粒子形成機構研究に加え、人体健康影響への関連研究を行い、微小粒子状のバイオエアロゾルの放出による大気汚染化学種(水溶性有機炭素成分(Water soluble organic carbon, WSOC))としての自然生物起源の寄与率を推定し、春夏季における複合的な大気汚染現象形成への関与メカニズムを把握、人体への侵入経路や環境汚染化学種とのアレルゲン Cry j 1 の複合粒子の暴露機構を解明していくことを目的とし、科研費・新学術領域と連携して行っている。

2 実験方法

2.1 様々な地点のスギ花粉中および大気中 Cry j 1 の抗体との反応性の調査

スギ花粉を採取した地点は、栃木県塩谷町（山道脇）、茨城県日立市、埼玉県秩父市（秩父湖周辺の山道脇）、埼玉県さいたま市（埼玉大学近くの稲荷神社）、東京都多摩市（東京農工大学 FM 多摩丘陵内）である。採取期間は2009年2~3月のスギ花粉飛散期に採取した。同時に、国道463号沿いの埼玉大学校内において、2008年2月11日~3月22日の間、アンダーセンハイボリュームエアサンプラーにて566 L/min、47時間の条件で大気中のスギ花粉アレルゲンを捕集した。本実験では、微小粒子(PM_{1.1})を捕集したフィルターを分析した。各地点で捕集したスギ花粉中のアレルゲン及びこの期間に捕集した大気サンプルのアレルゲン濃度を測定し、さらに、これらのサンプルとCry j 1 モノクローナル抗体(Cry j 1 Mab)との反応性を調査した。

上記サンプル中のアレルゲン濃度及びCry j 1 Mabとの反応性を調査するため、本研究では、表面プラズモン共鳴法を利用した装置(Biacore J; GEヘルスケア製)Biacore Jシステムを用いた。

2.2 スギ花粉タンパク質への汚染物質曝露実験

2.1の実験結果から、大気中のCry j 1は都市部大気にさらされていないCry j 1に比べ、Cry j 1 Mabとの結合力が増加していることが分かった。他の研究者らによって、花粉アレルゲンは大気汚染物質と接触することで、タンパク質のニトロ化¹⁾や酸性化²⁾などの変性を引き起こすことが調査されている。そのため、スギ花粉においても同様に大気汚染物質との接触によってCry j 1の変性が引き起こされている可能性を確かめるため以下の実験を行った。

2.2.1 スギ花粉タンパク質溶液への汚染物質曝露

都市部大気にさらされていない花粉から抽出したタンパク質溶液5 mLに、液相均一反応の汚染物質として選択した45 mM Peroxynitrite 溶液2 mL (90 μmol)、1 M 硝酸水溶液2 mL (2 mmol)、1 M 硫酸水溶液2 mL (2 mmol)、1 M 過酸化水素水2 mL (2 mmol)をそれぞれに加え、振盪させた。その後、遠心分離し、上清をSDS-PAGEにて分析し、スギ花粉タンパク質の変性評価を行った。

3 研究の成果

3.1 様々な地点及び大気中スギ花粉 Cry j 1 濃度と抗原との反応性の測定

様々な地点およびPM_{1.1}中Cry j 1の濃度及びCry j 1 Mabへの結合定数(k_a)、解離定数(k_d)、結合解離定数(K_D)それぞれの値をTable 1に示す。埼玉県さいたま市、茨城県日立市、東京都多摩市のスギ花粉中Cry j 1含有量について、変化は見られなかった。各地点による k_a 、 k_d 、 K_D にはほとんど差が見られなかったが、さいたま市におけるPM_{1.1}試料中のCry j 1では明らかに値の変化が見られた。大気試料の K_D が他と比べると低いということは、Cry j 1-Cry j 1 Mabとの親和性が強く、解離が生じにくいことを示している。

様々な地点で採取したスギ花粉は葯から直接採取したものであるのに対して、大気中のスギ花粉は種々の大気汚染物質と接触している。また、地域によるCry j 1-Cry j 1 Mabの反応性に変化は見られなかった。そのため、大気汚染物質と接触したスギ花粉中Cry j 1はタンパク質の変性を引き起こし、Cry j 1-Cry j 1 Mab反応性に変化を引き起こした可能性がある。大気汚染物質によるアレルゲンの変性に関しては、O₃によるアレルゲンの酸性化やNO₂によるアレルゲンのニトロ化などがあるが、スギ花粉アレルゲンに対するこれらの影響を評価した報告はない。そのため、次の項ではその影響について室内実験を通じて評価を行った。

3.2 Cry j 1 標準サンプルの炭素組成分析

スギ花粉タンパク質溶液に種々の汚染物質を加えた後、タンパク質をSDS-PAGEにより分離検出した結果をFig. 1に示す。Peroxynitrite aq (Line 2)とH₂O₂ aq (Line 5)をそれぞれ加えたサンプルは、スギ花粉タンパク質溶液 (Line 1) よりもバンドが全体的に薄く、タンパク質濃度が低く観測された。さらに、分子量約44 kDaと41 kDa (2本のバンド)はCry j 1、約37 kDaはCry j 2に相当するため、スギ花粉アレルゲンの変性が示唆された。HNO₃ aq (Line 3)とH₂SO₄ aq (Line 4)をそれぞれ加えた場合はCry j 1とCry j 2に相当するバンドが検出されなかった。本研究から、液相均一反応を仮定した反応場、すなわちスギ花粉飛散期の降雨中においてスギ花粉アレルゲンが変性することが明らかになった。

Table 1. Cry j 1 concentrations of various sites and values of k_a , k_d and K_D between Cry j 1 and Cry j 1 Mab.

Samples (sites)	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	Cry j 1 conc. (mg/mL)
Pollen (Saitama)	4.76×10^5	8.51×10^{-4}	1.79×10^{-9}	5.144
Pollen (Ibaraki)	2.44×10^6	3.21×10^{-3}	1.32×10^{-9}	5.177
Pollen (Tama)	1.76×10^5	5.92×10^{-4}	3.37×10^{-9}	5.156
PM _{1.1} (Saitama)	2.22×10^8	3.90×10^{-6}	1.76×10^{-14}	-

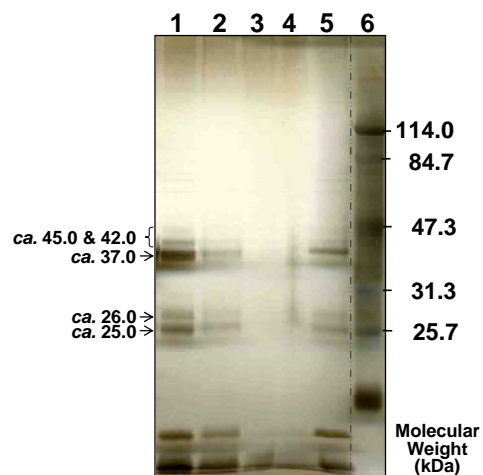


Fig. 1. SDS-PAGE profile using silver staining method. Line 1: Japanese cedar pollen extract (JCPE), Line 2: JCPE + Peroxynitrite aq, Line 3: JCPE + HNO₃ aq, Line 4: JCPE + H₂SO₄ aq, Line 5: JCPE + H₂O₂ aq, Line 6: Molecular weight marker.

参考文献

- 1) T. Franze, Michael G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl, 2003, Enzyme immunoassays for the investigation of protein nitration by air pollutants, *Analyst*, **128**, 824-831.
- 2) Rogerieux, F., Godfrin, D., Sènechal, H., Motta, A. C., Marlière, M., Peltre, G., Lacroix, G., 2007, Modifications of *Phleum pratense* Grass Pollen Allergens following Artificial Exposure to Gaseous Air Pollutants (O₃, NO₂, SO₂), *International Archives of Allergy and Immunology*, **143**, 127-134.