

# スギ花粉アレルゲン種の変性とその生体影響の評価に関する基礎研究

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

スギ花粉症は1964年に日本で初めて報告され、スギ花粉症の罹患人口は1980年代から年々増加傾向にあり、国内で最も罹患人口の多い疾患の1つとなっている。2008年、26%以上の国民がスギ花粉症を発症しており、特に関東地方においてはスギ花粉症の有病率が39.6%と全国平均を遥かに上回るため<sup>1)</sup>、大気汚染物質の影響が懸念される。

スギ花粉は一般的に山間部から飛散し移流中にスギ花粉から、スギ花粉症の原因物質であるCry j 1の局在するユービッシュ小体が剥離し大気中に放出される。さらに、剥離したユービッシュ小体は都市部へと移流し、ユービッシュ小体中のCry j 1は都市部の大気汚染物質と反応し化学的変性を起こす可能性がある。Cry j 1はアミノ酸であるチロシン残基を16個有しており、チロシン残基はベンゼン環を有している。ベンゼン環を有するチロシンは大気中のNO<sub>3</sub>ラジカルやOHラジカルとの反応により3-ニトロチロシンを生成するため、同ラジカルとの反応によるCry j 1中のチロシン残基のニトロ化の可能性が考えられる。3-ニトロチロシン残基を含むペプチドやタンパク質はIFN- $\gamma$ の産生を高め、免疫原性を増大させる報告がある。さらに、3-ニトロチロシンは細胞の細胞死を誘導するため、3-ニトロチロシン含有タンパク質は元のタンパク質よりも人体に高い毒性を示し、アレルギー反応を促進させる可能性がある。したがって、都市部において生成した3-ニトロチロシン含有Cry j 1(ニトロ化Cry j 1)を吸引することで、アレルギー反応が促進され、都市部におけるスギ花粉症の有病率が増加したと推測できる。そこで、本研究では大気中に存在するニトロ化タンパク質を測定し、さらに3-ニトロチロシンの上皮様細胞への毒性を評価した。

## 2 実験方法

### 2.1 都市部大気中粒子状スギ花粉アレルゲンの捕集

都市部大気中に存在する可能性のある3-ニトロチロシン含有タンパク質を捕集するため、2010年3月14日～16日にアンダーセンハイボリウムエアサンプラー(AHV)を用い、埼玉大学廃液処理センター横にて大気捕集を行った。捕集流速は566 L/minとし、71時間捕集を行った。その後、大気捕集を行ったフィルターからタンパク質成分を抽出し片側ELISA法のサンプルとした。

### 2.2 片側ELISA法によるニトロチロシン残基の検出

片側ELISA法により大気中タンパク質に含まれる3-ニトロチロシン残基の検出を試みた。

～実験方法～

96穴ELISA用マイクロプレートに2.1で調製したタンパク質含有サンプルを添加し、その後、3-ニトロチロシンモノクローナル抗体をウェルに添加した。さらに、ペルオキシダーゼ標識IgG抗体、発色基質であるo-フェニレンジアミンをウェルに添加し、プレートリーダー(定波長492 nm、対照波長630 nm)で吸光度を測定した。

### 2.3 ニトロチロシンのHeLa細胞への毒性評価とFITC-Annexin VによるHeLa死細胞の識別

本研究では、3-ニトロチロシン含有Cry j 1の細胞に対する毒性を評価することを目的としている。今回はその基礎実験として、上皮様細胞であるHeLa細胞に対する3-ニトロチロシンの細胞死誘導能を評価し、3-ニトロチロシンがアポトーシス(細胞の自殺)を引き起こすのか、それともネクローシス(細胞の他殺)を引き起こすのかを判別した。

～実験方法～

培養した HeLa 細胞に 3-ニトロチロシンを添加し HeLa 細胞死を誘導した。その後、HeLa 死細胞に FITC-Annexin V を添加し、蛍光顕微鏡で HeLa 死細胞の観察を行った。

### 3 研究の成果

#### 3.1 都市部大気中3-ニトロチロシン含有タンパク質の検出(大気汚染物質による Cry j 1 の変性の基礎研究)

本研究で用いた AHV すべての段のタンパク質溶液においてブランクよりも高い吸光度が観測されたため、2010年3月14日～16日の大気中タンパク質には3-ニトロチロシン残基が含まれていることが明らかとなった。さらに、Cry j 1 が主に存在する5段目、すなわち粒径範囲 1.1  $\mu\text{m}$  以下のタンパク質含有溶液中においても3-ニトロチロシン残基が検出されたため、大気中における3-ニトロチロシン含有 Cry j 1 の存在が示唆された。

#### 3.2 ニトロチロシンの HeLa 細胞への毒性評価と FITC-Annexin V による HeLa 死細胞の識別結果

HeLa 細胞に 500  $\mu\text{M}$  3-ニトロチロシンを添加したところ、HeLa 細胞の細胞死が観測された (Fig. 1)。したがって、3-ニトロチロシンは HeLa 細胞死を誘導したため、3-ニトロチロシン含有 Cry j 1 も同様に HeLa 細胞死を誘導すると考えられる。また、FITC-Annexin V による HeLa 死細胞の識別の結果、僅かではあるが3-ニトロチロシンが HeLa 細胞のアポトーシスを誘導することが判明した。3-ニトロチロシンは上皮様細胞である HeLa 細胞のアポトーシスを誘導したため、ニトロ化 Cry j 1 も同様に HeLa 細胞のアポトーシスを誘導する可能性が高い。さらに、3-ニトロチロシン含有ペプチドで感作したマウスのリンパ節細胞を同3-ニトロチロシン含有ペプチドで刺激した際、通常の2倍程度の IFN- $\gamma$  の放出が観測されているため、元のペプチド・タンパク質よりも3-ニトロチロシン含有ペプチド・タンパク質の方が高い免疫反応誘発能を有すると言える<sup>2)</sup>。したがって、ニトロ化 Cry j 1 による上皮様細胞のアポトーシスの誘導により、IFN- $\gamma$  が大量に放出され、その

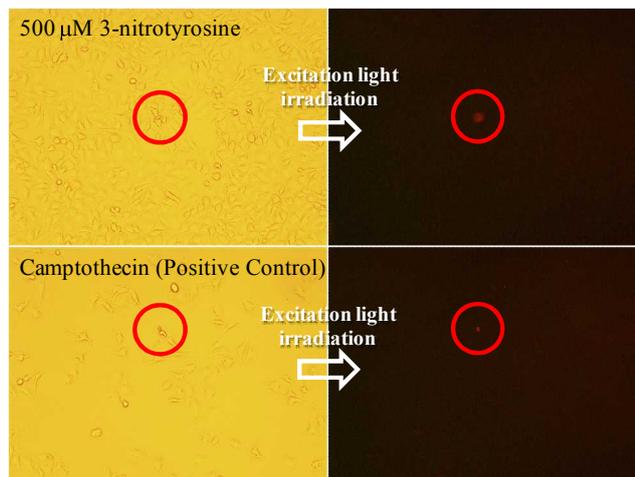


Fig. 1. Fluorescence micrographs of HeLa dead cells treated by FITC-Annexin V. Upper stage : HeLa cells treated by 500  $\mu\text{M}$  3-nitrotyrosine, Lower stage : HeLa cells treated by Camptothecin. Left fluorescence micrographs : pre-irradiation of excitation light, Light fluorescence micrographs : post-irradiation of excitation light. (Shutter speed : 1.2 s).

後マクロファージが活性化され、ニトロ化 Cry j 1 が抗原として認識されやすくなり、スギ花粉症アレルギー反応が悪化・誘発される可能性がある。今後、大気中 Cry j 1 に含まれる 3-ニトロチロシンの検出を Sandwich-ELISA 法により行い、スギ花粉アレルゲン種の変性<sup>3)</sup> を評価し、さらに、NO<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> ガス曝露により調製した 3-ニトロチロシン含有 Cry j 1 の HeLa 細胞への毒性評価を行う予定。

#### 参考文献

- 1) 村山貢司ら、スギ花粉症有病率の地域差について、アレルギー, **59**, 47-54 (2010).
- 2) Chaim. B. H., Anne-Marie Lemay, Debbie Ka Yee Lam, Rose Goldstein, Webb R. John, "Cutting Edge: MHC class II-Restricted Peptides Containing the Inflammation-Associated Marker 3-Nitrotyrosine Evade Central Tolerance and Elicit a Robust Cell-Mediated Immune Response", *The Journal of Immunology*, **171**, 528-532 (2003).
- 3) Wang, Q., Morita, J., Gong, X., Nakamura, S., Suzuki, M., Lu, S., Sekiguchi, K., Nakajima, T., Nakajima, D., Miwa, M., Characterization of the physical form of allergenic Cry j 1 in the urban atmosphere and determination of Cry j 1 denaturation by air pollutants, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **6**(1), 33-40 (2012).