(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3575802号
(P3575802)
(45)発行日　平成16年10月13日(2004.10.13)　(24)登録日　平成16年7月16日(2004.7.16)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA
A61K 39/36	A61K 39/36	
A61K 39/395	A61K 39/395	N
C07K 14/415	C07K 14/415	
C07K 16/16	C07K 16/16	

請求項の数 10　(全 37 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平5-502370
(86)(22)出願日　平成4年7月10日(1992.7.10)
(65)公表番号　特表平6-508994
(43)公表日　平成6年10月13日(1994.10.13)
(86)国際出願番号　PCT/US1992/005661
(87)国際公開番号　WO1993/001213
(87)国際公開日　平成5年1月21日(1993.1.21)
審査請求日　平成11年7月7日(1999.7.7)
(31)優先権主張番号　729,134
(32)優先日　平成3年7月12日(1991.7.12)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　730,452
(32)優先日　平成3年7月15日(1991.7.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502169504
イミユロジク・フアーマシユーチカル・コーポレーシヨン
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１５４ウオルサム・リンカーンストリート６１０
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　グリフイス，アーウイン・ジエイ
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０１８６４ノースリーデイング・サウスウイツクロード１３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】日本杉花粉からのアレルゲン性蛋白質及びペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号:1のヌクレオチド配列又は該配列のコーディング配列を含んで成ることを特徴とする、日本杉花粉アレルゲンCry　j　Ｉをコードする単離された核酸。

【請求項２】

配列番号:1のヌクレオチド配列を有する日本杉花粉アレルゲンCry　j　Ｉの抗原性フラグメントをコードし、かつ、該アレルゲンのエピトープの少なくとも一つを含むことを特徴とする、単離された核酸。

【請求項３】

該核酸が配列番号:1の塩基66－1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求項１に記載の核酸。

【請求項４】

配列番号:2のアミノ酸配列を含む日本杉花粉アレルゲンCry　j Ⅰ又はその成熟蛋白質をコードすることを特徴とする、単離された核酸。

【請求項５】

配列番号:2のアミノ酸配列を含む日本杉花粉アレルゲンCry　j Ⅰの抗原性フラグメントをコードし、かつ、該アレルゲンのエピトープの少なくとも一つを含むことを特徴とする、単離された核酸。

【請求項６】

エピトープがＴ細胞エピトープであることを特徴とする、請求項５に記載の核酸。

【請求項７】
エピトープがＢ細胞エピトープであることを特徴とする、請求項５に記載の核酸。
【請求項８】
請求項１－７のいずれかに記載の核酸を含むことを特徴とする、発現ベクター。
【請求項９】
請求項１－７のいずれかに記載の核酸によりコードされた蛋白質又はペプチドを発現するように該核酸で形質転換されたことを特徴とする、宿主細胞。
【請求項１０】
請求項９に記載の宿主細胞を、日本杉花粉蛋白質アレルゲンCry　j　Ｉまたは該アレルゲンのエピトープの少なくとも一つを含むペプチドを発現する培地で培養し、そして培養物から該蛋白質アレルゲンまたはペプチドを単離することを特徴とする、日本杉花粉蛋白質アレルゲンCry　j　Ｉまたは該アレルゲンのエピトープの少なくとも一つを含むペプチドの生産方法。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
人口の約10%を成す遺伝的に疾病素質を有する固体は、彼らがさらされる多様な環境的源からの抗原に過敏性（アレルギー性）となる。即時及び／又は遅延型の過敏性を誘起する抗原はアレルゲンとして既知である。（King,T.P.,Adv.Immunol.23:77－105（1976））。花粉症、喘息及びじんましんの症状を誘起するアナフィラキシー又はアトピーは即時型アレルギーの１つの形態である。それは芝、木、雑草、動物のふけ、昆虫、食物、薬剤及び化学品の製品などの多様なアトピー性アレルゲンにより起こり得る。
アトピー性アレルギーに付随する抗体は主に免疫グロブリンのIgEの種類に属する。IgEは肥満細胞及び好塩基球に結合する。肥満細胞又は好塩基球と結合したIgEと特異的なアレルゲンが組み合わさると、IgEが細胞表面上で架橋し、IgE－抗原相互作用の生理学的効果を生ずる。これらの生理学的効果には他の物質の中でもヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、好酸球及び／又はロイコトリエンに関する化学走性因子、C4、D4及びE4の放出が含まれ、それは長期間の気管支平滑筋の収縮を起こす（Hood,L.E.et　al.Immunology（2nd　ed.）,The　Benjamin/Cumming　Publishing　Co.,Inc.（1984））。放出されたこれらの物質は、IgEと特定のアレルゲンの組み合わせにより起こるアレルギー症状を生ずる媒介者である。アレルゲンの効果はそれらを通じて現れる。それらの効果は抗原が体に入る経路及び肥満細胞又は好塩基球上にIgEが沈着するパターンに依存して全身的又は局所的性質であり得る。局所的現れは一般にアレルゲンが体に入った位置の上皮表面に起こる。全身的効果にはアナフィラキシー（アナフィラキシーショック）が含まれ、それは循環（血管内）抗原へのIgE－好塩基球応答の結果である。
日本杉（Sugi:クリプトメリア　ジャポニカ（Cryptomeria　japonica））花粉症は日本における最も重大なアレルギー疾患の１つである。この疾患にかかる患者の数は増加しており、いくつかの地域では人口の10%より多くが罹患している。日本杉花粉抽出物を投与してアレルゲンに対して脱感作することによる日本杉花粉症の処置が試みられた。しかし日本杉花粉抽出物を用いた脱感作は、高投薬量を用いるとアナフィラキシーを誘引することがあり、アナフィラキシーを避けるために低投薬量を用いると抽出物に対する耐性を確立するために処置を数年続けなければならないという欠点を有する。
日本杉花粉からの主要アレルゲンが精製され、スギ塩基性蛋白質（Sugi　basic　protein）（SBP）又はCry　j　Ｉと命名された。この蛋白質は分子量が41－50kDaでありpIが8.8の塩基性蛋白質であると報告されている。アレルゲンには多数のイソ型があると思われ、それは一部には異なるグリコシル化によると思われる（Yasueda　et　al.（1983）J.Allergy　Clin.Immunol.71:77－86;及びTaniai　et　al.（1988）FEBS　Letters　239:329－332）。Cry　j　ＩのＮ－末端の最初の20個のアミノ酸の配列及び16個の内部アミノ酸配列が決定された（Taniai同上）。
日本杉花粉からのCry　j　IIとして知られる分子量が約37kDaの第２のアレルゲンも報告された（Sakaguchi　et　al.（1990）Allergy　45:309－312）。このアレルゲンはCry

j Ｉとの免疫学的交差反応性を持たないことが見いだされた。日本杉花粉症に罹ったほとんどの患者はCry j Ｉ及びCry j IIの両方に対するIgE抗体を有するが、何人かの患者からの血清はCry j Ｉ又はCry j IIのみと反応することが見いだされた。
低投薬量の日本杉花粉抽出物を用いた日本杉花粉症患者の脱感作の他に、1990年７月３日にMatsuhashi et al.に与えられた米国特許第4,939,239号は日本杉花粉アレルゲンに共有結合したサッカリドを含む、日本杉花粉に感受性の患者の脱感作のための脱感作薬を開示している。この脱感作薬はIgG及びIgE抗体の生産を強化するが、アレルゲンに特異的でアナフィラキシー及びアレルギーを担うIgE抗体の生産を減少させると報告されている。
脱感作薬に用いられるアレルゲンはAsp－Asn－Pro－Ile－Asp－Ser－Ｘ－Trp－Arg－Gly－Asp－Ser－Asn－Trp－Ala－Gln－Asn－Arg－Met－Lys－のNH_2－末端アミノ酸配列を有し、ここでＸはSer、Cys、Thr又はHisである（配列番号:1）であることが好ましい。さらにUsui et al.（1990）Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.91:74－79はスギ塩基性蛋白質（即ちCry j Ｉ）－プルラン複合体がアルチュス反応を誘引する能力は顕著に低下し、本来のスギ塩基性蛋白質の薬1,000倍低いと報告し、スギ塩基性蛋白質－プルラン複合体は杉花粉症に対する脱感作治療のための優れた候補であると示唆した。
クリプトメリア ジャポニカ中で見いだされたCry J Ｉアレルゲンは、クプレススセムペルビレンス（Cupressus sempervirens）を含む他の種の木からの花粉中のアレルゲンと交差反応性であることも見いだされた。Panzani et al（Annals of Allergy 57:26－30（1986）は皮膚テスト、RAST及びRAST阻害においてクプレスス セムペルビレンスとクリプトメリア ジャポニカの花粉中のアレルゲンの間に交差反応性が検出されたことを報告した。山杉（Mountain Ceder）（ジュニペルス サビノイデス（Juniperus sabinoides））から単離された50kDaのアレルゲンはNH_2－末端配列AspAsnProIleAsp（配列番号:25）を有し（Gross et al,（1978）Scand.J.Immunol.８:437－441）、それはCry j ＩアレルゲンのNH_2－末端の最初の５個のアミノ酸と同一の配列である。Cry j Ｉアレルゲンは以下の種の木ともアレルゲン的に交差反応性であることが見いだされた：クプレスス アリゾニカ（Cupressus arizonica）、クプレスス マクロカルパ（Cupressus macrocarpa）、ジュニペルス ビルギニアナ（Juniperus virginiana）、ジュニペルス コムニス（Juniperus communis）、ツヤ オリエンタリス（Thuya orientalis）及びカマエシパリス オブツサ（Chamaecyparis obtusa）。
日本杉花粉症アレルゲンが注目されたにもかかわらず、人々に与える悪影響を担うアレルゲンの定義又は特性化は完全から程遠い。現在の脱感作治療は、高投薬量の花粉抽出物を投与した場合のアナフィラキシーの危険、又は低投薬量の花粉抽出物を投与した場合の長い脱感作期間を伴う花粉抽出物を用いた処置を含む。

発明の概略

本発明はクルプトメリア ジャポニカ花粉主要アレルゲンCry j Ｉ及びそのフラグメントをコードする核酸配列を提示する。本発明は、Cry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントをコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製Cry j Ｉ及び少なくとも１個のそのフラグメントならびに合成的に製造されたCry j Ｉのフラグメントも提示する。本明細書で用いられる場合、Cry j Ｉの全アミノ酸配列をコードする核酸配列のフラグメントは、Cry j Ｉ及び／又は成熟Cry j Ｉの全アミノ酸配列をコードする核酸配列より少量の塩基を有する核酸配列を言う。Cry j Ｉ及びそのフラグメントは日本杉花粉症の診断、処置及び予防に有用である。本発明は添付する請求の範囲にさらに特定して記載され、以下の説明中の好ましい態様に記載されている。

【図面の簡単な説明】

図1aは、10mMの酢酸ナトリウム（pH5.0）及び0.15MのNaClで平衡化したSuperdex75（2.6×60cm）上でアフィニティー精製したCry j Ｉのグラフ図である。
図1bは、図1aに示されている主ピークからの画分のSDS－PAGE（12.5%）分析を示す。
図２は、SDS－PAGEにより分離され、mAB CBF2を用いて精査された本来の精製Cry j Ｉ蛋白質のイソ型のウェスタンブロットを示す。

図３は、15人のアレルギー性患者のプールからの血漿を用いて精製した本来のCry　j　Ｉの異なる精製画分のアレルギー性血清力価のグラフ図である。
図4a－ｂは、Cry　j　Ｉをコードする２つのオーバーラップクローン JC71.6及びpUC19JC91Aからの混成核酸配列を示す。Cry　j　Ｉの完全cDNA配列は1312ヌクレオチドから成り、５′非翻訳配列の66ヌクレオチド、開始メチオニンのコドンで始まる1122ヌクレオチドの読み取り枠、及び３′非翻訳領域を含む。図4a－ｂはCry　j　Ｉの推定アミノ酸配列も示す。
図5aは、塗布抗原（coating　antigen）が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物（SPE）である場合のIgE結合活性の結果のグラフ図である。
図5bは、塗布抗原が精製した本来のCry　j　Ｉである場合のIgE結合活性の結果のグラフ図である。
図６は、塗布抗原が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物（SPE）である場合の、15人の患者からプールしたヒト血漿（PHP）を用いた競争的ELISA（competetion　ELISA）の結果のグラフ図である。
図７は、塗布抗原が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物（SPE）であり、競争抗原が精製した本来のCry　j　Ｉである場合の、各患者（患者番号により示す）からの血漿を用いた競争的ELISAの結果のグラフ図である。
図8aは、塗布抗原が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物（SPE）である場合の、７人の各患者（患者番号により示す）からの血漿を用いた直接結合ELISAからの結果のグラフ図である。
図8bは、塗布抗原が還元剤DTTの存在下で煮沸することにより変性させた変性可溶性花粉抽出物である場合の、７人の各患者（患者番号により示す）からの血漿を用いた直接結合ELISAからの結果のグラフ図である。
図９は、ウェルに組み替えCry　j　Ｉ（ｒCry　j　Ｉ）を塗布し、各患者につきIgE結合を分析した直接ELISAのグラフ図である。
図10aは、ウェルにCBF2（IgE）mAbを塗布し、負の抗原標準としてPBSを用い、抗原が精製組み替えCry　j　Ｉである場合の、15人の患者からプールしたヒト血漿を用いた捕獲ELISA（capture　ELISA）の結果のグラフ図である。
図10bは、ウェルに20μg/mlのCBF2（IgE）を塗布し、負の抗原標準としてPBSを用い、抗原が精製組み替えCry　j　Ｉである場合の、ウサギ抗－Amb　a　I及びIIを用いた、捕獲ELISAの結果のグラフ図である。
図11は、添加抗原として日本杉花粉からのSPE、精製した本来のCry　j　Ｉ及び組み替えCry　j　Ｉを用い、１人の日本杉花粉アレルギー患者につき行ったヒスタミン放出分析のグラフ図である。
図12は、抗原が組み替えCry　j　Ｉ蛋白質、精製した本来のCry　j　Ｉ蛋白質又は組み替えAmb　a　1.1である場合の、患者番号＃999からの血液を用いたＴ細胞増殖分析の結果のグラフ図である。

発明の詳細な説明

本発明は日本杉花粉中で見いだされる主要アレルゲンであるCry　j　Ｉをコードする核酸配列を提示する。Cry　j　Ｉをコードする核酸配列は図4a及び4bに示す配列（配列番号:1）を有するのが好ましい。図4a及び4bに示すCry　j　Ｉをコードする核酸配列（配列番号:1）は、塩基66から塩基128までの21のアミノ酸のリーダー配列を含む。このリーダー配列は塩基129から1187までによりコードされる成熟蛋白質から切断される。Cry　j　Ｉの推定アミノ酸配列も図4a及び4bに示す（配列番号:2）。本発明の核酸配列は推定分子量が38.5kDaであり、pIが7.8であり、５個のＮ－結合グリコシル化可能部位を有する蛋白質をコードする。これらのグリコシル化部位を用いると分子量が増加し、成熟蛋白質のpIに影響するであろう。本発明の核酸配列によりコードされる成熟蛋白質に関する推定アミノ酸配列はTaniai　et　al.,同上により報告された既知のNH_2－末端及び内部アミノ酸配列と同一である。Taniai　et　al.,同上により報告されたCry　j　ＩのNH_2－末端は、配列番号:18に示す配列を有する。Taniai　et　al.,同上により報告された内部配列は、

配列GluAlaPheAsnValGluAsnGlyAsnAlaThrProGlnLeuThrLys（配列番号:19）を有する。本発明の核酸配列には配列多型性が観察される。例えば配列番号:1のアミノ酸38、51及び74をコードするコドンにおける１個の独立したヌクレオチド置換（それぞれGAAに対するGGA、GCGに対するGTG及びGAGに対するGGG）はこれらの部位におけるアミノ酸多型性（それぞれＥに対するＧ、Ａに対するＶ及びＥに対するＧ）を生ずる。さらに日本で収集されたクリプトメリア　ジャポニカ花粉から誘導された１個のcDNAクローン中に１個のヌクレオチド置換が検出された。配列番号:1のアミノ酸60のコドンにおけるこの置換（CATに対するTAT）は、この部位におけるアミノ酸多型性（Ｈに対するＹ）を生じ得る。さらの別のサイレントヌクレオチド置換が検出された。さらに別の配列多型性があることが予想され、各クリプトメリア　ジャポニカ植物の間でCry　j　Ｉをコードする核酸配列の１個又はそれより多いヌクレオチド（最高ヌクレオチドの約１％）が自然の対立遺伝子の変動により変化することは、当該技術における熟練者にはわかるであろう。そのようなヌクレオチドの変化及びその結果生ずるアミノ酸多型性のいずれも、及びすべてが本発明の範囲内である。さらにCry　j　Ｉのファミリーメンバーが１個から又はそれ以上あるであろう。そのようなファミリーメンバーは、Cry　j　Ｉと機能及びアミノ酸配列が関連しているが別の遺伝子座の遺伝子によりコードされる蛋白質として定義される。

Cry　j　Ｉのフラグメントをコードする核酸配列のフラグメントも本発明の範囲内である。本発明の範囲内のフラグメントには哺乳類、特にヒトにおける免疫応答、例えば最小量のIgEの刺激、IgEの結合、IgG及びIgM抗体の生産の誘起、又は増殖などのＴ細胞応答及び／又はリンホカイン分泌及び／又はＴ細胞アネルギーの誘導などを引き起こす、Cry　j　Ｉの一部をコードするフラグメントが含まれる。前記のCry　j　Ｉのフラグメントは本明細書にて抗原性フラグメントと呼ばれる。本発明の範囲内のフラグメントには、Cry　j　Ｉと交差反応性のアレルゲンの検出のためのスクリーニング案で用いられる他の植物種からの核酸とハイブリッド形成することができるフラグメントも含まれる。本明細書中で用いられる場合、Cry　j　Ｉをコードする核酸配列のフラグメントは、Cry　j　Ｉ及び／又は成熟Cry　j　Ｉの全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列より塩基の数が少ないヌクレオチド配列を言う。一般にCry　j　Ｉのフラグメントをコードする核酸配列は成熟蛋白質をコードする塩基から選ばれるが、ある場合にはフラグメントのすべて又は一部を本発明の核酸配列のリーダー配列部分から選ぶのが望ましい。本発明の核酸配列はリンカー配列、修飾制限エンドヌクレアーゼ部位及びCry　j　Ｉ又はそのフラグメントのクローニング、発現あるいは精製に有用な他の配列も含むことができる。

Cry　j　Ｉをコードする核酸配列はクロプトメリア　ジャポニカ植物から得ることができる。しかし出願人等は商業的に入手可能なクリプトメリア　ジャポニカ花粉からCry　j　Ｉをコードするmrnaを得られないことを見いだした。花粉からmrnaを得られないのは、商業的に入手可能な花粉の保存又は輸送に伴う問題のためであろう。出願人等は、新しい花粉及び雄球果（staminate　cone）がCry　j　Ｉ　mrnaの良い供給源であることを見いだした。Cry　j　Ｉをコードする核酸配列はゲノムdnaから得ることもできる。クリプトメリア　ジャポニカは周知の杉の種であり、植物材料は野生の、栽培された又は観葉の植物から得ることができる。Cry　j　Ｉをコードする核酸配列は本明細書に記載の、又は遺伝子の単離及びクローニングのための他の適した方法を用いて得ることができる。本発明の核酸配列はdna又はrnaであることができる。

本発明は本発明の核酸配列の発現のための発現ベクター及び形質転換された宿主細胞を提示する。Cry　j　Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントをコードする核酸は、大腸菌などのバクテリア細胞、昆虫細胞（バクロウィルス）、酵母又は哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）中で発現することができる。適した発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現調節要素は、Sambrook　et　al.Molecular Cloning:A　Laboratory　Manual.second　edition,Cold　Spring　Harbor　Laboratory　Press.Cold　Spring　Habor,New　York（1989）にて見いだすことができる。他の適した発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現要素は当該技術における熟練者に既知である。哺乳類、酵母又は昆虫細胞における発現は、組み替え体の部分的又は完全

なグリコシル化及び鎖間あるいは鎖内ジスルフィド結合の形成に導く。酵母における発現に適したベクターにはYepSec1（Baldari et al.（1987）Embo J.6:229－234）;pMFa（Kurfan and Herskowitz（1982）Cell 30:933－943）;JRY88（Schultz et al.（1987）Gene 54:113－123）及びpYES2（Invitrogen Corporation,San Diego,CA）が含まれる。これらのベクターは自由に入手可能である。バクロウィルス及び哺乳類発現系も入手可能である。例えば昆虫細胞における発現のためにバクロウィルスが商業的に入手でき（PharMingen,San Diego,CA）、哺乳類細胞における発現のためにpMSGベクターが商業的に入手できる（Pharmacia,Piscataway,NJ）。

大腸菌における発現の場合、適した発現ベクターには中でもpTRC（Amann et al.（1988）Gene 69:301－315）;pGEX（Amrad Corp.,Melbourne,Australia）;pMAL（N.E.Biolabs,Beverly,MA）;pRIT5（Pharmacia,Piscataway,NJ）;pET－11d（Novagen,Madison,WI）Jameel et al.,（1990）J.Virol.64:3963－3966;及びpSEM（Knapp et al.（1990）Bio Techniques 8:280－281）が含まれる。例えばpTRC及びpET－11dを用いると非融合蛋白質の発現に導く。pMAL、pRIT5、pSEM及びpGEXを用いるとマルトースＥ結合蛋白質（pMAL）、プロテインＡ（pRIT5）、切断（trancated）β－ガラクトシダーゼ（PSEM）又はグルタチオン Ｓ－トランスフェラーゼ（pGEX）に融合したアレルゲンの発現に導く。Cry j Ｉ又はそのフラグメントが融合蛋白質として発現される場合、キャリヤー蛋白質とCry j Ｉ又はそのフラグメントの間の融合連結部分に酵素切断部位を導入するのが特に有利である。その後Cry j Ｉ又はそのフラグメントを酵素部位における酵素切断、ならびに蛋白質及びペプチドの精製のための従来の方法を用いた生化学的精製により融合蛋白質から回収することができる。適した酵素切断部位には、血液凝固因子Xa又はトロンビンのための部位が含まれ、それらの切断に関する適した酵素及びプロトコールは、例えばSigma Chemical Company,St.Louis,MO及びN.E.Biolabs,Beverly,MAから商業的に入手できる。異なるベクターは異なるプロモーター領域も有し、構成性発現又は例えばIPTG誘導（PRTC,Amann et al.,（1988）同上;pET－11d,Novagen,Madison,WI）あるいは温度誘導（（pRIT5,Pharmacia.Piscataway,NJ）を用いた誘導性発現を可能にする。組み替えCry j Ｉを、組み替えにより発現された蛋白質を分解する能力が違う異なる大腸菌中で発現するのも適している（例えば米国特許第4,758,512号明細書）。別の場合、発現される蛋白質のアミノ酸配列に影響を与えないような核酸配列の改変を行い、大腸菌が用いる傾向のあるコドンを用いるのが有利である。

宿主細胞は、リン酸カルシウム又は塩酸カルシウム共沈、DEAE－デキストラン－媒介トランスフェクション又はエレクトロポレーションなどの従来の方法を用い、本発明の核酸配列を発現するように形質転換することができる。宿主細胞の形質転換のための適した方法は、Sambrook et al.同上及び他の実験書にて見いだすことができる。

本発明の核酸配列は、標準的方法を用いて合成することもできる。

本発明は、日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントをコードするDNA配列を用いて形質転換した宿主細胞を、該日本杉花粉アレルゲン又は少なくとも１個のそのフラグメントを含む細胞と培地の混合物を生産するのに適した培地中で培養し、混合物を精製して実質的に純粋な日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを生産する段階を含む、精製日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを生産する方法も提示する。Cry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントをコードするDNAを含む発現ベクターを用いて形質転換した宿主細胞を、宿主細胞に適した培地中で培養する。Cry j Ｉ蛋白質及びペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動及びCry j Ｉ又はそのフラグメントに特異的な抗体を用いた免疫精製を含む当該技術においてペプチド及び蛋白質の精製に関して既知の方法を用い、細胞培地、宿主細胞又は両方から精製することができる。単離された、及び精製されたという用語は本明細書で互換的に用いられ、組み替えDNA法を用いて生産された場合は細胞物質又は培地を、あるいは化学的に合成された場合は化学的前駆体又は他の化学品を実質的に含まないペプチド、蛋白質、蛋白質フラグメント及び核酸配列を言う。

本発明の他の特徴として、日本杉花粉アレルゲンCry j Iの全体又は一部をコードするDNA配列を用いて形質転換された宿主細胞中で合成された、あるいは化学的に合成された日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも１個のそのフラグメントを含む組成物、ならびに本発明の核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルゲンCry j I蛋白質又は少なくとも１個のその抗原性フラグメントを提示する。本発明の好ましい態様の場合、Cry j I蛋白質は少なくとも成熟Cry j I蛋白質をコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産される。

所望の抗原応答を引き出す日本杉花粉からのアレルゲン、好ましくはCry j Iのフラグメント（本文では抗原性フラグメントと呼ぶ）は、例えばそのようなペプチドをコードする本発明の核酸配列の対応するフラグメントから組み替えにより生産された、当該技術における熟練者に既知の方法を用いて化学的に合成された、又はアレルゲンの化学的切断により生産されたペプチドのスクリーニングにより得ることができ、アレルゲンはペプチドのオーバーラップのない所望の長さの断片に任意に分ける、好ましくはペプチドのオーバーラップのない所望の長さのフラグメントに分ける、あるいは好ましくは所望の長さのオーバーラップフラグメントに分けることができる。フラグメントは試験をしてその抗原性を決定する（例えば免疫応答を誘起するフラグメントの能力）。日本杉花粉アレルゲン、例えばCry j Iのフラグメントを治療目的で用いる場合、賦活などのＴ細胞応答（すなわち増殖又はリンホカイン分泌）を引き出すことができる、及び／又はＴ細胞アネルギーを誘起することができる日本杉花粉アレルゲンのフラグメントが特に望ましく、最小IgE賦活活性を有する日本杉花粉のフラグメントも望ましい。さらに治療目的の場合、精製日本杉花粉アレルゲン、例えばCry j I及びそのフラグメントは、日本杉花粉に特異的なIgEと結合しない、あるいは本来の精製日本杉花粉アレルゲンがそのようなIgEと結合する場合より実質的に低い程度でそのようなIgEと結合するのが好ましい。精製日本杉花粉アレルゲン又はそのフラグメントがIgEと結合する場合、そのような結合により肥満細胞又は好塩基球から媒介物（例えばヒスタミン）が放出されないのが好ましい。最小IgE賦活活性は、本来のCry j I蛋白質により賦活されるIgE生産の量より少ないIgE賦活活性を言う。

日本杉花粉からの精製蛋白質アレルゲン又はその好ましい抗原性フラグメントは、日本杉花粉感受性患者、又は日本杉花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲン、例えばクプレス　セムペルビレンス又はジュニペルス　サビノイデスなど（前記で議論）の花粉からのアレルゲンにアレルギー性の患者に投与すると、日本杉花粉又はそのような交差反応性アレルゲンへの患者のアレルギー応答を改変することができ、好ましくは患者のアレルゲンに対するＢ－細胞応答、Ｔ－細胞応答又はＢ－細胞及びＴ－細胞応答の両方を改変することができる。本明細書で用いられる日本杉花粉アレルゲンに感受性の患者のアレルギー応答の改変は、標準的臨床法により決定されるアレルゲンに対する非応答性又は症状の軽減として定義することができる（例えばVarney et al.British Medical Journal,302:265－269（1990）を参照）。

精製Cry j I蛋白質又はそのフラグメントは、日本杉花粉症の哺乳類モデル、例えばTamura et al.（1986）Microbiol.Immunol.30:883－896又は米国特許第4,939,239号明細書に開示されているマウスのモデル、あるいはChiba et al.（1990）Int.Arch.Allergy Immunol.93:83－88に開示されている霊長類のモデルで試験するのが好ましい。蛋白質又はそのフラグメントへのIgE結合の最初のスクリーニングは、実験動物又はヒトのボランティアへの乱切皮膚試験又は皮内試験により、あるいはRAST（ラジオアレルゴソルベント試験（radioallergocorbent test））、RAST阻害、ELISA分析、ラジオイムノアッセイ（RIA）、又はヒスタミン放出などの試験管内系において行うことができる（実施例７及び８を参照）。

Ｔ細胞賦活活性を有し、従って少なくとも１個のＴ細胞エピトープを含む本発明の抗原性フラグメントは特に望ましい。Ｔ細胞エピトープは、アレルギーの臨床的症状に対応する蛋白質アレルゲンへの免疫応答の開始及び永続に関与するものと思われる。これらのＴ細

胞エピトープは、抗原提示細胞の表面の適したHLA分子に結合し、関連するＴ細胞の下部集団を刺激することによりＴヘルパー細胞のレベルで初期の事象を起こすと思われる。これらの事象はＴ細胞増殖、リンホカイン分泌、局所的炎症反応、部位への追加の免疫細胞の補給、及び抗体の生産に続くＢ細胞カスケードの活性化に導く。これらの抗体のイソ型の１つであるIgEは基本的にアレルギー症状の発現に重要であり、その生産は分泌されるリンホカインの性質によりＴヘルパー細胞のレベルで事象のカスケードの初期に行われる。Ｔ細胞エピトープはＴ細胞レセプターによる認識の基本的要素又は最小単位であり、エピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含む。Ｔ細胞エピトープのアミノ酸配列を模しており、蛋白質アレルゲンへのアレルギー応答を改変するアミノ酸配列は本発明の範囲内である。

少なくとも１個のＴ細胞エピトープを含み、蛋白質アレルゲンから誘導された本発明の精製蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性フラグメントに患者を暴露すると、適したＴ細胞下部集団を耐性又はアネルギー性とすることができ、それらは蛋白質アレルゲンに非応答性となり、そのような暴露における免疫応答の賦活に関与しなくなる。さらに少なくとも１個のＴ細胞エピトープを含む本発明の蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性フラグメントの投与は、天然に存在する蛋白質アレルゲン又はその一部への暴露と比較してリンホカイン分泌プロファイルを改変することができる（例えばIL－４の減少及び／又はIL－２の増加を起こす）。さらにそのような抗原性フラグメント又は蛋白質アレルゲンへの暴露は、通常アレルゲンへの応答に関与するＴ細胞下部集団に影響し、これらのＴ細胞を通常アレルゲンに暴露される部位（例えば鼻粘膜、皮膚及び肺）から遠ざけ、フラグメント又は蛋白質アレルゲンの治療的投与の部位に引っ張る。このＴ細胞下部集団の再分布は、アレルゲンに通常暴露される部位における通常の免疫応答を賦活する患者の免疫系の能力を改善又は低下させ、アレルギー症状を軽減することができる。

精製Cry j Ｉ蛋白質及びそれから誘導されたフラグメント又は一部（ペプチド）は、日本杉花粉アレルゲン又は交差反応性蛋白質アレルゲンへのアレルギー反応の診断、処置及び予防の方法において用いることができる。かくして本発明は、Cry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを発現するように形質転換された宿主細胞において生産された精製日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメント、ならびに製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含む治療組成物を提示する。本発明の治療組成物は合成により製造されたCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメント、並びに製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含むこともできる。本発明の治療組成物の脱感作するべき患者への投与は、既知の方法を用いて行うことができる。Cry j Ｉ蛋白質又は少なくとも１個のそのフラグメントは、例えば適した希釈剤、担体及び／又はアジュバントと組み合わせて患者に投与することができる。製薬学的に許容し得る希釈剤には食塩水及び緩衝水溶液が含まれる。製薬学的に許容し得る担体にはポリエチレングリコール（Wie et al.（1981）Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.64:84－99）及びリポソーム（Strejan et al.（1984）J.Meuroimmunol 7:27）が含まれる。Ｔ細胞アネルギー誘導の目的の場合、治療組成物は非免疫原形態で、例えばアジュバントを含まない形態で投与するのが好ましい。そのような組成物は一般に注射（皮下、静脈内など）、経口投与、吸入、経皮適用又は直腸投与により投与される。本発明の治療組成物は、日本杉花粉感受性の患者に、日本杉花粉に対する患者の感受性の低下（すなわちアレルギー応答の低下）に有効な投薬量及び期間で投与される。治療組成物の有効量は、患者の日本杉花粉に対する感受性の程度、患者の年令、性別及び体重ならびにCry j Ｉ蛋白質又はそのフラグメントが患者において抗原応答を引き出す能力などの因子に従って変わるであろう。

Cry j Ｉ cDNA（又はそれが転写される基のmRNA）あるいはその一部を用いていずれの種類又は型の植物においても類似の配列を同定することができ、従ってCry j Ｉ cDNA又はmRNAあるいはその一部とハイブリッド形成するのに十分な相同性を有する配列、例えばクプレスス セムペルビレンス、ジュニペルス サビノイデスなどのアレルゲンからのDNAを低緊縮条件下で同定又は“引き出す（pull out）”ことができる。十分な相同性（一般に40％より多い）を有する配列を選び、本明細書に記載の方法を用いてさらに評

価することができる。代わりに高緊縮条件を用いることができる。この方法の場合、本発明のDNAを用いて他の種類の植物、好ましくは関連する科、属又は種、例えばジュニペルス又はクペルススの植物において、日本杉花粉アレルゲンCry j Iと類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列を同定することができ、従って他の種におけるアレルゲンを同定することができる。かくして本発明はCry j Iのみでなく、本発明のDNAとハイブリッド形成するDNAによりコードされる他のアレルゲンも含む。さらに本発明は、例えば抗体交差反応性又はT細胞交差反応性によりCry j I又はそのフラグメントに免疫学的に関連している単離アレルゲン性蛋白質又はそのフラグメントを含み、抗体交差反応性の場合単離アレルゲン性蛋白質又はそのフラグメントは本発明の蛋白質及びペプチドに特異的な抗体と結合することができ、T細胞交差反応性の場合単離アレルゲン性蛋白質又はそのフラグメントは本発明の蛋白質又はペプチドに特異的なT細胞を賦活することができる。

本発明のcDNAによりコードされる蛋白質又はペプチドは、例えば“精製”アレルゲンとして用いることができる。そのような精製アレルゲンは日本杉花粉症の診断及び治療の重要試薬であるアレルゲン抽出物の標準化において有用である。さらにCry j Iの核酸配列に基づくペプチドを用いることにより、標準的方法を用いて抗－ペプチド抗血清又はモノクローナル抗体を製造することができる。これらの血清又はモノクローナル抗体はアレルゲン抽出物の標準化に用いることができる。

本発明のペプチド及び蛋白質を用い、一貫性があり、十分に定義された生物学的活性を有する組成物を製造し、治療目的で（例えば日本杉感受性患者のそのような木の花粉へのアレルギー応答を改変するために）投与することができる。そのようなペプチド又は蛋白質の投与は、例えばCry j IアレルゲンへのB細胞応答、Cry j IアレルゲンへのT細胞応答又は両応答を改変することができる。精製ペプチドはクリプトメリア ジャポニカアレルギーの免疫治療の機構の研究及び免疫治療で有用な改変誘導体又は類似体の設計にも用いることができる。

他の研究者による研究により、高投薬量のアレルゲンが一般に最良の結果を与える（すなわち症状の最良の軽減）ことが示された。しかし多くの人々はアレルゲンに対するアレルギー反応のために高投薬量のアレルゲンに耐えることができない。天然に存在する対応するアレルゲンと同一又は強化された治療性を有するが副作用の減少した（特にアナフィラキシー反応）改変ペプチド又は改変アレルゲンが生産されるように、天然に存在するアレルゲンの改変を設計することができる。これらは例えば本発明の蛋白質又はペプチド（例えばCry j Iのアミノ酸配列の全体又は一部を有するもの）、あるいは改変蛋白質又はペプチドあるいは蛋白質又はペプチド類似体であることができる。溶解度の向上、治療又は予防効率、あるいは安定性の強化（例えば生体外における保存寿命及び生体内における蛋白質分解への抵抗性）の目的で本発明の蛋白質又はペプチドの構造を改変することができる。免疫原性の改変及び／又はアレルゲン性の低下のためにアミノ酸置換、欠失又は付加などによってアミノ酸配列が変えられた、又は同目的のために成分が加えられた改変蛋白質又はペプチドを生産することができる。例えばT細胞エピトープ機能に必須のアミノ酸残基を既知の方法を用いて決定することができる（例えば各残基の置換及びT細胞活性の存在又は不在の決定）。必須であることが示された残基を改変することができ（例えばその存在がT細胞活性を強化することが示された他のアミノ酸による置換）、同様にT細胞活性に必要でない残基も改変することができる（例えばその挿入がT細胞活性を強化するが関連するMHCへの結合を減少させない他のアミノ酸による置換により）。蛋白質又はペプチドの改変の他の例は、システイン残基を、好ましくはアラニン、セリン、トレオニン、ロイシン又はグルタミン酸で置換してジスルフィド結合による二量化を最低にすることである。本発明のペプチドの改変の他の例は、アミノ酸側鎖の化学的修飾又はペプチドの環化による。

安定性及び／又は反応性の強化のために、本発明の蛋白質又はペプチドを改変し、自然の対立遺伝子変動から生ずる蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列における多型性を１個又はそれより多く挿入することもできる。さらにD－アミノ酸、非－天然アミノ酸又は非－アミ

ノ酸類似体を置換又は付加して本発明の範囲内の改変蛋白質又はペプチドを製造することができる。さらに本発明の蛋白質又はペプチドをA.Sehon及び共同研究者等（Wie et al.同上）のポリエチレングリコール（PEG）法を用いて改変し、PEGと複合した（conjugated）蛋白質又はペプチドを製造することができる。さらに本発明の蛋白質又はペプチドの化学合成の間にPEGを加えることができる。蛋白質又はペプチドあるいはその一部の改変には還元／アルキル化（Tarr 於:Method of Protein Microcharacterization,J.E.Silver ed.Humana Press,Clifton,NJ,pp155－194（1986））；アシル化（Tarr、同上）；適した担体への化学的カップリング（Mishell and Shiigi,eds,Selected Methods in Cellular Immunology,WH Freeman,San Francisco,CA（1980）；米国特許第4,939,239号明細書；又は穏やかなホルマリン処理（Marsh International Archives of Allergy and Applied Immunology,41:199－215（1971））も含まれる。

本発明の蛋白質又はペプチドの精製を容易にし、おそらく溶解度を向上させるために、ペプチド主鎖にリポーター基を付加することができる。例えばポリ－ヒスチジンをペプチドに付加し、固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー上でペプチドを精製することができる（Hochuli,E.et al.,Bio/Technology,6:1321－1325（1988））。さらに必要ならリポーター基とペプチドのアミノ酸配列の間に特異的エンドプロテアーゼ切断部位を導入し、無関係な配列を含まないペプチドの単離を容易にすることができる。蛋白質抗原に対する患者の脱感作に成功するために、ペプチドに官能基を加えるか又はペプチド中に疎水性Ｔ細胞エピトープあるいは疎水性エピトープを有する領域を含まない、あるいは蛋白質又はペプチド中に疎水性領域を含まないことにより、蛋白質又はペプチドの溶解度を上げることが必要である。

おそらくペプチド内のＴ細胞エピトープの適した抗原プロセシングを助けるために、それぞれ少なくとも１個のＴ細胞エピトープを含む領域間に規定プロテアーゼ感受性部位を、組み替え又は合成により操作することができる。例えばKK又はRRなどの帯電アミノ酸対を、ペプチドの組み替え構築中にペプチド内の領域間に導入することができる。得られるペプチドはカテプシン及び／又は他のトリプシン－様酵素切断に感受性となり、１個又はそれより多いＴ細胞エピトープを含むペプチドの部位を生成することができる。さらにそのような帯電アミノ酸残基はペプチドの溶解度を向上させる。

本発明のペプチド又は蛋白質（例えばCry j Ｉ又はそのフラグメント）をコードするDNAの特定部位の突然変異誘発を用い、当該技術において既知の方法によりペプチド又は蛋白質の構造を改変することができる。そのような方法には中でも縮重オリゴヌクレオチドを用いたPCR（Ho et al.,Gene,77:51－59（1989））又は突然変異遺伝子の全合成（hostomsky,Z.et al.,Biochem.Biophys,Res.Comm.,161:1056－1063（1989））が含まれる。

バクテリア発現の強化のために、上記の方法を他の方法と組み合わせて用い、本発明の蛋白質又はペプチドをコードするDNA構築物における真核コドンを大腸菌、酵母、哺乳類細胞又は他の真核細胞で用いられる傾向のあるコドンに変えることができる。

現在利用できる構造に関する情報を用い、日本杉花粉感受性患者に十分な量で投与すると日本杉花粉に対する患者のアレルギー応答を変えるであろうCry j Ｉペプチドを設計することができる。これは例えばCry j Ｉの構造を調べ、（発現系を用いて、合成により、又は他の方法で）ペプチドを生産し、日本杉花粉感受性患者におけるＢ細胞及び／又はＴ細胞応答に影響するそれらの能力に関して調べ、細胞により認識されるエピトープを含む適したペプチドを選択することにより行うことができる。エピトープにつき言及すると、エピトープはレセプター、特に免疫グロブリン、組織適合性抗原及びＴ細胞レセプターによる認識の基本的要素又は最小単位であり、エピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含む。エピトープのアミノ酸配列を模してあり、Cry j Ｉに対するアレルギー応答を調節して下げることができるアミノ酸配列も用いることができる。

ここで、日本杉花粉アレルゲンが日本杉花粉感受性患者においてアレルギー反応を誘起する能力を遮蔽又は阻害することができる試薬又は薬剤を設計することも可能である。そのような試薬は例えば関連する抗－Cry j Ｉ IgEに結合し、かくしてIgE－アレルゲン結合及びその後の肥満細胞の脱顆粒を妨げるように設計することができる。別の場合、そ

のような試薬は免疫系の細胞成分と結合し、クリプトメリア ジャポニカ花粉アレルゲンのアレルギー応答の抑制又は脱感作を生ずることができる。この例は、日本杉花粉へのアレルギー応答を抑制するための本発明のcDNA/蛋白質構造に基づく適したＢ及びＴ細胞エピトープペプチド、又はその改変物の利用であるがこれらに限られるわけではない。これは日本杉花粉感受性患者からの血液成分を用いた試験管内研究においてＢ及びＴ細胞機能に影響を与えるＢ及びＴ細胞エピトープペプチドの構造を定義することにより行うことができる。

本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体は、日本杉花粉症の検出及び診断に用いることもできる。例えばこれは、日本杉花粉に対する感受性を評価しなければならない患者から得た血液又は血液生成物（blood products）をCry j Ｉの単離抗原性ペプチド又は単離Cry j Ｉ蛋白質と、血液中の成分（例えば抗体、Ｔ細胞、Ｂ細胞）とペプチド又は蛋白質の結合に適した条件下で合わせ、そのような結合が起こった程度を決定することにより行うことができる。

本発明は、Cry j Ｉの全体又は少なくとも１個のフラグメントをコードするDNAを含む発現ベクターを含む宿主細胞を、Cry j Ｉ又は少なくとも１個のフラグメントの発現に適した条件下で培養することを含む、Cry j Ｉ又はそのフラグメントの製造法も提示する。発現された生成物をその後既知の方法を用いて回収する。別の場合Cry j Ｉ又はそのフラグメントを既知の機械的又は化学的方法を用いて合成することができる。

本発明のいずれの態様において用いられるDNAも、本明細書に記載の要領で得られるcDNAであることができ、又は別の場合本明細書に示されている配列の全体又は一部を有するいずれのオリゴヌクレオチド配列、又はそれらの機械的同等物であることもできる。そのようなオリゴヌクレオチド配列は、既知の方法を用いて化学的又は酵素的に製造することができる。オリゴヌクレオチド配列の機能的同等物は、１）配列番号:1の配列（又は対応する配列部分）又はそのフラグメントがハイブリッド形成する相補的オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成することができる配列、又は２）配列番号:1に相補的な配列（又は対応する配列部分）及び／又は３）配列番号:1の配列（又は対応する配列部分）によりコードされる生成物と同一の機能的特性を有する生成物（例えばポリペプチド又はペプチド）をコードする配列である。機能的同等物が１つ又は両方の基準を満たしていなければならないかどうかは、その用途に依存する（例えばオリゴプローブとしてのみ用いる場合、第１又は第２の基準のみを満たすことが必要であり、Cry j Ｉアレルゲンを製造するのに用いる場合、第３の基準のみを満たすことが必要である）。

本発明を以下の実施例によりさらに例示するが、これらは制限ではない。

実施例１

本来の日本杉花粉アレルゲン（Cry j Ｉ）の精製

以下は、主要アレルゲンCry j Ｉを本来の形態で生化学的に精製するために行った研究の説明である。精製は、公開されている方法からの修正法である（Yasuda et al.,J. Allergy Clin.Immunol.71:77,1983）。

日本から得た100gの日本杉花粉（Hollister－Stier,Spokane,WA）を1Lのジエチルエーテル中で３回脱脂し、濾過の後に花粉を集め、真空中でエーテルを乾燥した。

脱脂した花粉を、最終濃度で50mMのトリス－HCl、Ph7.8、0.2MのNaCl及びプロテアーゼインヒビター、大豆トリプシンインヒビター（２μg/ml）、ロイペプチン（１μg/ml）、ペプスタチンＡ（１μg/ml）及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（0.17mg/ml）を含む2Lの抽出緩衝液中にて４℃で終夜抽出した。不溶性物質を1.2Lの抽出緩衝液を用い、４℃の終夜再抽出し、両抽出物を併せ、抽出緩衝液で平衡化したWhatman DE－52DEAEセルロース（乾燥重量200g）を用いたバッチ吸着により脱色した。

脱色した材料をその後80%飽和にて硫酸アンモニウム沈澱により分別し（４℃）、それにより低分子量物質の多くが除去された。得られた部分的精製Cry j ＩはPBS緩衝液中で透析してＴ細胞研究に用いるか（実施例６を参照）、又は下記の要領でさらに精製した。

濃縮されたCry j Ｉ材料をその後４℃にて、プロテアーゼインヒビターと共に50mMの酢酸Na、pH5.0に対して透析した。非結合物質（塩基性蛋白質）をその後、４℃にてプロ

テアーゼインヒビターを含む10mMの酢酸Na、pH5.0を用いて平衡化した50mlのカチオン交換カラム（Whatman CM－52）にかけた。Cry j Ｉは0.3M NaClの直線勾配の初期画分で溶離した。濃縮されたCry j Ｉ物質を凍結乾燥し、その後25℃で300mlのSuperdex 75カラム（Pharmacia）上のFPLCにより10mMの酢酸Na、pH5.0中で30ml/時間の流量にて精製した。

精製されたCry j Ｉをさらに25℃にて０－1MのNaCl直線勾配を用いたFPLC－Ｓ－Sepharose 16/10カラムクロマトグラフィー（Pharmacia）にかけた。主ピークとして溶離したCry j Ｉを第２のゲル濾過グロマトグラフィーにかけた。FPLC Superdex 75カラム（2.6×60cm）（Pharmacia,Piscataway,NJ）を、25℃にて30ml/時間の流量で0.15MのNaClを含む10mMの酢酸Na、pH5.0の下方への流れで溶離した。図1aはゲル濾過上のクロマトグラフィーを示す。Cry j Ｉのみが検出された（図1b、２列から８列）。銀染色を用いたSDS－PAGEにより分析してCry j Ｉは３バンドに分別された（図1b）。図1bに示す通り、図1aに示されている主ピークからの画分のSDS PAGE（12.5%）分析は、還元条件下で行った。ゲルを、Bio－Radからの銀染色キットを用いて銀染色した。各列の試料は以下の通りである:1列、オボアルブミン（43,000kD）、カルボニックアンヒドラーゼ（29,000kD）及びα－ラクトグロブリン（18,400kD）を含む予備染色標準蛋白質（Gibco BRL）;2列、画分36;3列、画分37;4列、画分38;5列、画分39;6列、画分41、７列、画分43;及び８列、画分44。すべての画分は、図1aに示す。

これらの蛋白質を、マウスモノクローナル抗体CBF2を用いたウェスタンブロットによっても分析した（図２）。図２に示す通り、図１で示すSuperdex 75から精製した画分36（１列）、画分39（２列）及び画分43（３列）のアリコートをSDS－PAGEにより分離し、ニトロセルロース上にエレクトロブロッティングし、mABCBF2を用いて精査した。第２抗体としてビオチン化（biotinlylated）ヒツジ抗－マウスIgを用い、結合抗体を^{125}Ｉ－ストレプタヒジンにより明らかにした。モノクローナルCBF2はDr.D.Klapper（Chapel Hill,N.Carolina）により、ぶたくさアレルゲンAmb ａ Ｉに対して誘起された。Amb ａ Ｉ及びCry j Ｉ配列の間の相同性の理由で、Amb ａ Ｉに対して誘起された多数の抗体をCry j Ｉとの反応性に関して調べた。結果は、CBF2がELISA及びウェスタンブロックティングにより検出される通り変性Cry j Ｉを認識することを示した。さらにウェスタンブロッティングは、予想された分子量範囲のCry j Ｉ以外に他のバンドがCBF2により検出されないことも示した（図２）。これらの結果は蛋白質配列決定からの発見と一致した。画分44及び画分39（図1b）につきＮ－末端配列決定を行うと、Cry j Ｉ配列のみが検出される。

要するに、花粉抽出物から分子量の異なる３種類のCry j Ｉイソ型が精製された。SDS－PAGEにより算出された分子量は、還元及び非還元条件下の両方で40－35kDの範囲であった。これらのイソ型の等電点は約9.5－8.6であり、平均plは9.0であった。Ｎ－末端の20個のアミノ酸配列はこれらの３つのバンドにおいて同一であり、以前に公開されたCry j Ｉ配列（Taniai et al.同上）と同一であった。３個のイソ型は、プールされた15人のアレルギー患者の血漿を用いたCry j Ｉの別の精製細分画分のアレルギー性血清力価において示される通り、すべてモノクローナル抗体CBF2により認識される。それらはすべてアレルギー患者のIgEと結合する（図３）。分子量及び等電点における差は、翻訳後修飾、例えばグルコシル化、リン酸化に一部起因し、あるいは脂質含有率がこれらのイソ型において異なるかもしれない。これらの異なるイソ型がプロテアーゼ分解によるという可能性は、抽出及び精製の間に４種類の異なるプロテアーゼインヒビターが用いられたという事実からありそうでないとは言っても現在除外することができない。他の可能性は、遺伝子における多型性又はmRNAにおけるスプライシングの変更によるものであるが、cDNAクローニング研究においては１個の主形態のCry j Ｉ蛋白質が検出されたのみである（実施例４を参照）。

本来のCry j Ｉ又は組み替えCry j Ｉの精製に用いることができる他の方法は、免疫アフェニティークロマトグラフィーである。この方法は、モノクローナル抗体及び抗原の間の相互作用の特異性の故に非常に選択的な蛋白質精製を与える。Cry j Ｉ－反応

性モノクローナル抗体の製造の目的のために、雌のBalbl/cマウスをJackson Labsから入手した。各マウスを最初にフロイント完全アジュバント中に乳化した70－100μｇの精製した本来のCry ｊ Ｉ（図1bに示す通り＞99%純度の低バンド）を用いて腹腔内により免疫化した。最初の注射の54日後に、PBS中の10μｇの精製した本来のCry ｊ Ｉをさらに１回静脈注射した。３か後に脾臓を取り出し、骨髄腫系SP2.0を用いて記載の通りに（Current Protocols in Immunology,1991,Coligan et al,eds.）骨髄腫融合（myeloma fusion）を行った。細胞を10%ウシ胎児血清（Hybrimax）、ヒポキサンチン及びアザセリン中で培養し、ハイブリドーマ細胞のコロニーを含むウェルを抗原－結合ELISAを用いて抗原生産に関してスクリーニングした。

陽性のウェルからの細胞を、10%ウシ胎児血清（Hybrimax）、ヒポキサンチン中の10分の３細胞／ウェルにてクローニングし、陽性のクローンをさらにもう１回ヒポキサンチン培地中でサブクローニングした。第２及び第３のスクリーニングに、捕獲ELISA（capture ELISA）（実施例７を参照）を用いた。この分析は、本来の蛋白質を認識するクローンを選択することができ、従って免疫アフィニティー精製に有用であるという利点を与える。従ってmAbsは花粉抽出物からのCry ｊ Ｉの精製における有用な手段となる。同様に、組み替えCry ｊ Ｉに結合するモノクローナル抗体も免疫アフィニティークロマトグラフィーに用いることができる。さらに生成されたモノクローナル抗体は診断目的にも有用である。これらのCry ｊ Ｉの異なるイソ型に対していくらかの特異性を示し、従ってこれらのイソ型の特性化の有用な手段となる異なるmAbsを誘起することも可能である。

実施例２

日本杉花粉からのRNAの抽出の試み

商業的に入手可能な、非脱脂クリプロメリア ジャポニカ（日本杉）花粉からRNAを得る多くの試みが成された（Hollister Stier,Seattle,WA）。最初、試料を4Mのグアニジン緩衝液中に懸濁して溶解し、液体窒素下で粉砕し、超遠心により5.7Mの塩化セシウムを介してペレット化するSambrook et al.,Molecular Cloning.A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York（1989）の方法が用いられた。量の異なるグアニジンライシス緩衝液（10及び25ml）中で種々の量（３、５及び10g）の花粉を試した。セシウムを介した遠心により管の底に粘性の材料が生じ、そこからRNAペレットを回収することはできなかった。この案を用いて脱脂したアンブロシア アルテミシイフォリア（Ambrosia artemisiifolia）（ぶたくさ）花粉からRNAを得ることはできたが（Greer Laboraories,Lenior,NC）、グアニジン抽出の前にクリプロメリア ジャポニカ花粉をアセトンで脱脂してもA_{260}における吸収により決定してRNAは得られなかった。

Sambrook et al.,同上における方法に従った、クリプロメリア ジャポニカ花粉からのRNAの酸フェノール抽出が試みられた。花粉を4.5Mのグアニジン溶液中で粉砕し、剪断し、2Mの酢酸ナトリウムを加えて酸性化し、水－飽和フェノール及びクロロホルムを用いて抽出した。沈澱の後ペレットを4Mの塩化リチウムで洗浄し、10mMトリス/5mM EDTA/1%SDS中に再溶解し、クロロホルムで抽出し、NaCl及び無水エタノールで再沈澱させた。この方法を用いてアンブロシア アルテミシイフォリアの抽出はできたがクリプトメリア ジャポニカRNAは抽出できなかった。

次に4gのクリプトメリア ジャポニカ花粉を10mlの抽出緩衝液（50mMトリス、pH9.0、0.2M NaCl、10mM酢酸Mg及び0.1%までジエチルピロカーボネート（DEPC））中に懸濁し、ドライアイス上の乳鉢及び乳棒にて粉砕し、１%SDS、10mM EDTA及び0.5%のＮ－ラウリルサルコシンと共に遠心管に移し、混合物を温フェノールで５回抽出した。最後の遠心の後、水相を回収し、2.5体積の無水エタノールを加え、混合物を４℃で終夜インキュベートした。遠心によりペレットを回収し、65℃に加熱することにより1mlのdH_2Oに再懸濁し、0.1体積の3M酢酸Na及び2.0体積のエタノールを加えることにより再沈澱された。A_{260}における吸収及びゲル電気泳動による判断でペレット中に検出可能なRNAは回収されなかった。

最後に、500mgのクリプトメリア ジャポニカ花粉をドライアイス上の乳鉢及び乳棒によ

り粉砕し、Frankis and Mascarhenas（1980）Ann.Bot.45:595－599の以前の記載の通り0.1%のDEPCで終夜処理した0.2M NaCl、1mM EDTA、１％のSDSを含む5mlの50mMトリスpH9.0中に懸濁した。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1で混合）で５回抽出した後、0.1体積の3M酢酸Na及び２体積のエタノールを用いて材料を水相から沈澱させた。遠心によりペレットを回収し、dH_2Oに再懸濁し、65℃に加熱した沈澱材料を可溶化した。塩化リチウムを用いてさらに沈澱させることはしなかった。A_{260}における吸収及びゲル電気泳動により決定して、検出できるRNAは回収されなかった。

要するに、市販の花粉からRNAを回収することはできなかった。RNAが保存又は輸送の間に分解したかどうか、又はこの実施例で用いた案が現存するRNAを回収できなかったのかどうかはわからない。しかしRNAは新しいクリプロメリア ジャポニカ花粉及び雄球果試料から回収した（実施例３を参照）。

実施例３

日本杉花粉及び雄球果からのRNAの抽出及びCry j Ｉのクローニング

Arnold Arboretum（Boston,MA）にて１本のプリプトメリア ジャポニカ（日本杉）の木から集めた新しい花粉及び雄球果試料は、直後にドライアイス上で凍結した。基本的にFrankis and Mascarenhas、同上により記載の要領で500mgの各試料からRNAを調製した。試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒を用いて粉砕し、0.1%DEPCで終夜処理した0.2M NaCl、1mM EDTA、１％SDSを含む5mLの50mMトリスpH9.0中に懸濁した。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1で混合）で５回抽出した後、0.1体積の2mM酢酸Na及び２体積のエタノールを用いてRNAを水相から沈澱させた。遠心によりペレットを回収し、dH_2O中に再懸濁し、65℃に５分間加熱した。2mlの4M塩化リチウムをRNA試料に加え、それらを０℃で終夜インキュベートした。遠心によりRNAペレットを回収し、1mlのdH_2O中に再懸濁し、再度3Mの酢酸ナトリウム及びエタノールを用いて終夜沈澱させた。最終的ペレットを100μｌのdH_2O中に再懸濁し、－80℃にて保存した。

商業的に入手可能なキット（cDNA合成系キット、BRL、Gaithersburg,MD）を用い、Gubler and Hoffman（1983）Gene 25:263－269の方法に従ってオリゴdTプライミングにより、８μｇの頭状花及び４μｇの花粉RNAから第１鎖cDNAを合成した。縮重オリゴヌクレオチドCP－１（これは配列５′－GATAATCCGATAGATAG－３′を有し、ここで位置３のＴはＣであることもでき、位置６のＴはＣであることもでき、位置９のＧはＡ、Ｔ又はＣであることもでき、位置12のＡはＴ又はＣであることもでき、位置15のＴはＣであることもでき、位置16のＡはＴであることもでき、位置17のＧはＣであることもできる、配列番号:3）、及びプライマーEDTならびにEDを用いてCry j Ｉをコードするc DNAを増幅する試みが成された。プライマーEDTは配列５′－GGAATTCTCTAGACTGCAGGTTTTTTTTTTTTTT－３′（配列番号:24）を有する。プライマーEDは配列５′－GGAATTCTCTAGACTGCAGGT－３′（配列番号:23）を有する。CP－１はCry j Ｉのアミノ末端の最初の６アミノ酸（AspAsnProIle AspSer、配列番号:1のアミノ酸１－６）をコードする縮重オリゴヌクレオチド配列である。EDTは遺伝子のポリＡ尾部とハイブリッド形成する。オリゴヌクレオチドはすべてResearch Genetics,Inc.Huntsville,ALにより合成された。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は商業的に入手可能なキット（GeneAmp DNA増幅キット、Perkin Elmer Cetus,Norwalk,CT）を用い、それによりdNTPsを含む10μｌの10x緩衝液を１μｇのCP－１及び１μｇのED/EDTプライマー（ED:EDTは3:1モル比）、cDNA（20μｌの第１鎖cDNA反応混合物から３－５μｌ）、0.5μｌのAmplitaqDNAポリメラーゼと混合し、蒸留水で100μとすることにより行った。

試料は、プログラム可能熱制御器（MJ Research,Inc.,Cambridge,MA）を用いて増幅した。増幅の最初の５ラウンドは94℃における１分間の変性、45℃における1.5分間のプライマーの鋳型へのアニーリング、及び70℃にて２分間の鎖延長を含む。増幅の最後の20ラウンドは、上記の変性、55℃にて1.5分間のアニーリング及び上記の延長を含む。その後この最初の増幅の５％（５μｌ）を用い、それぞれ１μｇのCP－２（これは配列５′－GGGAATTCAATTGGGCGCAGAATGG－３′を有し、ここで位置11のＴはＣであることもでき、位置17のＧはＡ、Ｔ又はＣであることもでき、位置20のＧはＡであることもでき、位置23のＴは

Ｃであることもでき、位置24のＧはＣであることもできる）（並列番号:4）、組み込まれたプライマー（nested primer）及び上記のEDを用いて第２の増幅を行った。プライマーCP－２中の配列５′－GGGAATTC－３′（配列番号:4の塩基１－８）は、クローニングの目的で加えられたEco R I部位を示し、残りの縮重オリゴヌクレオチド配列はCry j Iのアミノ酸13－18（AsnTrpAlaGlnAsnArg、配列番号:1のアミノ酸13－18）をコードする。多重（multiple）DNAバンドを１％GTGアガロースゲル（FMC,Rodkport,ME）上で分析し、そのいずれもSambrook et al.同上の方法に従って行ったサザンブロットにおいて^{32}P末端－標識プローブCP－３（配列番号:5）とハイブリッド形式しなかった。従って特定のCry j I DNAバンドを選択することができず、この方法は続行しなかった。CP－３は配列５′－CTGCAGCCATTTTCIACATTAAA－３′を有し、位置９のＡはＧであることもでき、位置12のＴはＣであることもでき、位置18のＡはＧであることもでき、位置21のＡはＧであることもできる（配列番号:5）。イノシン（Ｉ）は、縮重度を減少させるために位置15でＧ又はＡ又はＴ又はＣの代わりに用いられる（Knoth et al.（1988）Nucleic Acids Res.16:10932）。プライマーCP－３中の配列５′－CTGCAG－３′（配列番号:5の塩基１－６）はクローニングの目的で加えられたPst Ｉ部位を示し、残りの縮重オリゴヌクレオチド配列は、Cry j Ｉの内部配列からのアミノ酸PheAsnValGluAsnGly（配列番号:1のアミノ酸327－332）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。

第1PCRをやはり上記のCP－１（配列番号:3）及びCP－３（配列番号:5）を用いて第１鎖cDNAに関して行った。第2PCRはCP－２（配列番号:4）及びCP－３（配列番号:5）を用い、第１反応物の５％を用いて行った。再び多重バンドが観察され、そのいずれもサザンブロットにおいてCry j Ｉと特に同定することができず、この方法も続行しなかった。

その後約４μｇ（花粉）又は８μｇ（頭状花）のRNAから、商業的に入手可能なキット（cDNA 合成系キット、BRL、Gaithersburg、MD）を用いて二重鎖cDNAを合成した。フェノール抽出及びエタノール沈澱の後、T4 DNAポリメラーゼ（Promega,Madison,WI）を用いてcDNAを平滑化し、Rafnar et al.（1991）J.Biol.Chem.266:1229－1236;Frohman et al.（1990）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:8998－9002;及びRoux et al.（1990）Biotech.8:48－57の方法に従い修正固定PCR反応（modified Anchored PCR reaction）で用いるために、エタノール沈澱させ、自己アニーリングしたAT（配列番号:20）及びAL（配列番号:22）オリゴヌクレオチドに連結した。オリゴヌクレオチドATは配列5'－GGGTCTAGAGGTACCGTCCGATCGATCATT－３′（配列番号:20）（Rafnar et al.同上）を有する。オリゴヌクレオチドALは配列５′－AATGATCGATGCT－３′（配列番号:22）（Rafnar et al.同上）を有する。Cry j Ｉのアミノ末端を、連結されたcDNA（20μｌの反応物から３μ）から、それぞれ１μｇのオリゴヌクレオチドAP（配列番号:21）及び縮重Cry j IプライマーCP－８（これは配列５′－TTCATICGATTCTGGGCCC－３′を有し、ここで位置８のＧはＴであることもでき、位置９のＡはＧであることもでき、位置12のＣはＴであることもでき、位置15のＧはＡ、Ｔ又はＣであることもできる）（配列番号:6）を用いて増幅した。イノシン（Ｉ）は縮重を減少させるために位置６にてＧ又はＡ又はＴ又はＣの代わりに用いられる（Knoth et al.同上）。縮重オリゴヌクレオチドCP－７（配列番号:6）は、Cry j Ｉのアミノ末端からのアミノ酸14－20（TrpAlaGlnAsnArgMetLys（配列番号:1のアミノ酸14－20）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。オリゴヌクレオチドAPは配列５′－GGGTCTAGAGGTACCGTCCG－３′（配列番号:21）を有する。

第1PCR反応は、本明細書に記載の通りに行った。この最初の増幅の５％（５μｌ）をその後、本明細書に記載の通りそれぞれ１μｇのAP（配列番号:21）及び縮重Cry j IプライマーCP－８（配列番号:7）ならびに内部組み込みCry j Ｉオリゴヌクレオチドプライマーを用いた第２の増幅に用いた。プライマーCP－８は配列５′－CCTGCAGCGATTCTGGGCCCAAATT－３′を有し、位置９のＧはＴであることもでき、位置10のＡはＧであることもでき、位置13のＣはＴであることもでき、位置16のＧはＡ、Ｔ又はＣであることもでき、位置23のＡはＧであることもできる（配列番号:7）。ヌクレオチド５′－CCTGCAG－３′（配列番号:7の塩基１－７）は、クローニングの目的で加えられたPst Ｉ制限部位を示す。残りの縮重オリゴヌクレオチド配列は、Cry j Ｉのアミノ末端からのCry j I

のアミノ酸13－18（AsnTrpAlaGlnAsnArg、配列番号:1のアミノ酸13－18）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。増幅の主生成物は、エチジウムブロミド（EtBr）－染色３％GTGアガロースゲル上で視覚化した通り、約193塩基対のDNAバンドであった。

順にクロロホルム、フェノール及びクロロホルムを用いた抽出及びその後0.5体積の7.5酢酸アンモニウム及び1.5体積のイソプロパノールを用いて－20℃で沈澱させることにより増幅DNAを回収した。沈澱及び70％エタノールを用いた洗浄の後、15μｌ反応にてDNAをXba Ｉ及びPst Ｉで同時に消化し、分取３％GTG NuSieve低融点ゲル（FMC,Rockport,ME）を通して電気泳動させた。適した大きさのDNAバンドをEtBr染色により視覚化し、切り出し、商業的に入手可能な配列決定キット（Sequenaseキット,U.S.Biochemicals,Cleveland,OH）を用い、ジデオキシ連鎖停止法（Sanger et al.（1977）Proc.Natl Acad Sci.USA 74:5463－5476）により配列決定するために、適当に消化されたM13mp18中に結合した。最初は連結可能な材料が雄球果－誘導RNAのみから誘導できたと思われた。しかしその後の実験で、連結可能な材料が花粉－誘導RNAから、及び雄球果－誘導RNAから生成されたPCR生成物から回収できたことが示された。

JC71.6と称されたクローンはCry j Ｉの部位的配列を含むことが見いだされた。これは開示されているCry j ＩのNH_2－末端配列（Taniai et al.同上）と完全に同一であることにより、Cry j Ｉの真性（authentic）クローンとして確認された。位置７のアミノ酸はシステイン（Cys）であることが決定され、米国特許第4,939,239号明細書に開示されている配列と一致した。アミノ酸の番号付けは成熟蛋白質の配列に基づき、アミノ酸１はCry j ＩのNH_2－末端として開示されている（Taniai et al.同上）アスパラギン酸（Asp）に対応する。開始メチオニンは成熟蛋白質の第１アミノ酸に関してアミノ酸21であることが見だされた。開始メチオニンの位置は、上流の枠内停止コドン（in－frame－stop codon）の存在、及び回りのヌクレオチド配列がLutcke et al.（1987）EMBO J.6:43－48により報告された開始メチオニンを含む植物の共通配列と78％相同であることから支持された。

Cry j Ｉ遺伝子の残りをコードするcDNAは、第1PCR反応でオリゴヌクレオチドCP－９（これは配列５′－ATGGATTCCCCTTGCTTA－３′を有する）（配列番号:8）及びAP（配列番号:21）を用いることにより結合されたcDNAからクローニングした。オリゴヌクレオチドCP－９（配列番号:8）は、Cry j Ｉのリーダー配列からのCry j Ｉのアミノ酸めたMetAspSerProCysLeu（配列番号:1のアミノ酸21－16）をコードし、部分的Cry j ＩクローンJC76.1に関して決定されたヌクレオチド配列に基づく。

第2PCR反応は、それぞれ１μｇのAP（配列番号:21）及びCP－10（これは配列５′－GGGAATTCGATAATCCCATAGACAGC－３′を有する）（配列番号:9）及び組み込まれたプライマーを用い、最初の増幅混合物の５％につき行った。プライマーCP－10のヌクレオチド配列５′－GGGAATTC－３′（配列番号:9の塩基１－８）は、クローニングの目的で加えられたEco R I制限部位を示す。残りのオリゴヌクレオチド配列はCry j Ｉのアミノ酸１－６（AspAsnProIleAspSer）（配列番号:1のアミノ酸１－６）をコードし、部分的Cry j ＩクローンJC76.1に関して決定されたヌクレオチド配列に基づく。増幅されたDNA生成物を上記の要領で精製し、沈澱させ、その後Eco R I及びXba Ｉで消化し、分取１％低融点ゲルを通して電気泳動させた。DNA主バンドを切り出し、配列決定のためにM13mp19及びpUC19に連結した。この場合も連結可能な材料は花粉－誘導RNA及び雄球果－誘導RNAから生成されたcDNAから回収された。消化されたpUC19JC91a及びpUC19JC91dの２つのクローンを全長配列決定のために選択した。その後これらが同一の配列を有することが見いだされた。

商業的に入手可能なキット（Sequenaseキット（U.S.Biochemcals,Cleveland,OH））を用い、ジデオキシ連鎖停止法（Sanger et al.同上）によりDNAを配列決定した。M13前進（forward）及び逆プライマー（reverse primer）（N.E.Biolabs,Beverly,MA）ならびに内部配列決定プライマーCP－13（配列番号:10）、CP－14（配列番号:11）、CP－15（配列番号:12）、CP－16（配列番号:13）、CP－18（配列番号:15）、CP－19（配列番号:16）及

びCP－20（配列番号:17）を用いて両鎖を完全に配列決定した。CP－13は配列５′－ATGCCTATGTACATTGC－３′（配列番号:10）を有する。CP－13（配列番号:10）はCry j Ｉのアミノ酸82－87（MetProMetTyrIleAla、配列番号:1のアミノ酸82－87）をコードする。CP－14は配列５′－GCAATGTACATAGGCAT－３′（配列番号:11）を有し、CP－13（配列番号:10）の非コード鎖配列に対応する。CP－15は配列５′－TCCAATTCTTCTGATGGT－３′（配列番号:12）を有し、これはCry j Ｉのアミノ酸169－174（SerAsnSerSerAspGly、配列番号:1のアミノ酸169－174）をコードする。CP－16は配列５′－TTTTGTCAATTGAGGAGT－３′（配列番号:13）を有し、Cry j Ｉのアミノ酸335－340（ThrProGlnLeuThrLys、配列番号:1のアミノ酸335－340）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。CP－18は配列５′－TAGCAACTCCAGTCGAAGT－３′（配列番号:15）を有し、これはCP－18（配列番号:15）の第４ヌクレオチドが正しいヌクレオチドＴではなくＣとして合成されている以外は、Cry j Ｉのアミノ酸181－186（ThrSerThrGlyValThr、配列番号:1のアミノ酸181－186をコードするコード鎖配列に実質的に対応する非コード鎖配列である。配列５′－TAGCTCTCATTTGGTGC－３′（配列番号:16）を有するCP－19は、Cry j Ｉのアミノ酸270－275（AlaProAsnGluSerTyr、配列番号:1のアミノ酸270－275）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。CP－20は配列５′－TATCGAATTGGTGGGAGT－３′（配列番号:17）を有し、これはCry j Ｉのアミノ酸251－256（TyrAlaIleGlyGlySer、配列番号:1のアミノ酸251－256）のコード鎖配列である。配列決定したDNAは図4a及び4bに示す配列（配列番号:1）を有することが見いだされた。これは２つのオーバーラップクローンJC71.6及びpUC19J91Aからの混成（composite）配列である。Cry j Ｉの完全cDNA配列は、５′非翻訳配列の66ヌクレオチド、開始メチオニンのコドンで始まる1122ヌクレオチドの読み取り枠、及び３′非翻訳領域を含む1312ヌクレオチドを含む。３′非翻訳領域25ヌクレオチド５′ポリＡ尾部中に共通ポリアデニル化シグナル配列がある。開始メチオニンの位置は、枠内上流停止コドンの存在により、及び開始メチオニンを含む植物共通配列との78％の相同性（Lutcke et al.（1987）EMBO J.6:43－48の植物の場合のAACAAUGGC共通配列と比較してCry j Ｉ中に見いだされたAAAAAUGGA（配列番号:1の塩基62－70））により確証された。読み取り枠は374アミノ酸の蛋白質をコードし、その最初の21アミノ酸は成熟蛋白質から切断されたリーダー配列を含む。成熟蛋白質のアミノ末端は公開されているNH_2－末端配列（Taniai et al.（1988）同上）、及び精製された本来のCry j Ｉの直接アミノ酸分析により決定された配列との比較により同定された。353アミノ酸を含む成熟蛋白質の推定アミノ酸配列は、NH_2－末端に関する最初の20アミノ酸及び16個の連続内部アミノ酸を含んで公開されているCry j Ｉの蛋白質配列（Taniai et al.同上）と完全な配列同一性を有する。成熟蛋白質は、共通配列Ｎ－Ｘ－S/Tに対応するＮ－結合グリコシル化部位の可能性のある５個の部位も含む。

実施例４

日本で収集された日本杉花粉からのRNAの抽出

日本でプールされたクリプトメリア ジャポニカ（日本杉）の木から収集した新しい花粉を直後にドライアイス上で凍結した。基本的にFrankis and Mascarenhas Ann,Bot.45:595－599に記載の要領で500mgの花粉からRNAを調製した。試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒を用いて粉砕し、0.1％DEPCで終夜処理した0.2M NaCl、1mM EDTA、１％SDSを含む5mlの50mMトリスpH9.0中に懸濁した。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1で混合）で５回抽出した後、0.1体積の3M酢酸Na及び２体積のエタノールを用いてRNAを水相から沈澱させた。遠心によりペレットを回収し、dH_2O中に再懸濁し、65℃に５分間加熱した。2mlの4M塩化リチウムをRNA試料に加え、それらを９℃で終夜インキュベートした。遠心によりRNAペレットを回収し、1mlのdH_2O中に再懸濁し、再度3Mの酢酸ナトリウム及びエタノールを用いて終夜沈澱させた。最終的ペレットを100μｌのdH_2O中に再懸濁し、－80℃にて保存した。

Gubler and Hoffman（1983）Gene 25:263－269の方法に従い、オリゴdTプライミングを用いてcDNA合成系キット（BRL）により８μｇの花粉RNAから二重鎖cDNAを合成した。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）はGeneAmp DNA増幅キット（Perkin Elmer Cetus）を用い

、それによりdNTPsを含む10μｌの10x緩衝液をそれぞれ100pmolのセンスオリゴヌクレオチド及びアンチ－センスオリゴヌクレオチド、（400μｌの二重鎖cDNA反応混合物中の10μｌ）、0.5μｌのAmplitaq　DNAポリメラーゼと混合し、蒸留水で100μｌとして行った。

試料は、MJ　Research,Inc.（Cambridge,MA）からのプログラム可能熱制御器を用いて増幅した。増幅の最初の５ラウンドは94℃における１分間の変性、45℃における１分間のプライマーの鋳型へのアニーリング、及び72℃にて１分間の鎖延長を含む。増幅の最後の20ラウンドは、上記の変性、55℃にて１分間のアニーリング及び上記の延長を含む。

二重鎖cDNAの増幅に以下の７種類のCry　j　Ｉプライマー対を用いた:CP－９（配列番号:8）及びCP－17（配列番号:14）、CP－10（配列番号:9）及びCP－17（配列番号:14）、CP－10（配列番号:9）及びCP－16（配列番号:13）、CP－10（配列番号:9）及びCP－19（配列番号:16）、CP－10（配列番号:9）及びCP－18（配列番号:15）、CP－13（配列番号:10）及びCP－17（配列番号:14）、ならびにCP－13（配列番号:10）及びCP－19（配列番号:16）。CP－17（配列番号:14）は配列５′－CCTGCAGAAGCTTCATCAACAACGTTTAGA－３′を有し、アミノ酸SKRC＊（配列番号:1のアミノ酸350－353及び停止コドン）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列に対応する。ヌクレオチド配列５′－CCTGCAGAAGCTT－３′（配列番号:14の塩基１－13）はクローニングの目的で加えられたPst　Ｉ及びHin　d　III制限部位を示す。ヌクレオチド配列５′－TCA－３′（配列番号:14の塩基13－15）は停止コドンの非コード鎖配列に対応する。エチジウム－ブロミド（EtBr）－染色アガロースゲル上で見ると、増幅はすべて予想の大きさの生成物を与えた。これらのプライマー対の２つを増幅に用い、その生成物を全長配列決定のためにpUC19中にクローニングした。CP－10（配列番号:9）及びCP－16（配列番号:13）を用いて二重鎖cDNAにつき行つたPCR反応は、約1.1kbのバンドを与え、それをJC130と称した。８μｇの花粉RNAを用いて上記の要領で別の第１鎖cDNA反応を行い、オリゴヌクレオチドプライマーCP－10（配列番号:9）及びCP－17（配列番号:14）を用いて増幅した。この増幅は成熟蛋白質のアミノ末端から停止コドンまでの全長cDNAを与え、それをJC135と称した。

増幅されたDNAを順にクロロホルム、フェノール及びクロロホルムで抽出し、その後0.5体積の7.5酢酸アンモニウム及び1.5体積のイソプロパノールを用いて－20℃にて沈澱させることにより回収した。沈澱及び70％エタノールを用いた洗浄の後、T4ポリメラーゼでDNAを平滑化し、15μｌ反応にて、JC130の場合はEco　R Iで消化し、あるいはJC135の場合はEco　R I及びPst　Ｉで同時に消化し、分取１％SeaPlaque低融点ゲル（FMC）を通して電気泳動させた。EtBr染色により適した大きさのDNAバンドを視覚化し、切り出し、商業的に入手可能な配列決定キット（Sequenaseキット、U.S.Biochemicals,Cleveland,OH）を用いたジデオキシ連鎖停止法（Sanger　et　al.（1977）Proc.Natl.Acad.Sci.USA　74:5463－5476）によるジデオキシDNA配列決定のために、適当に消化したpUC19に連結した。

両鎖はM13前進及び逆プライマー（N.E.Biolabs,Beverly,MA）ならびに内部配列決定プライマーCP－13（配列番号:10）、CP－15（配列番号:12）、CP－16（配列番号:13）、CP－18（配列番号:15）、CP－19（配列番号:16）及びCP－20（配列番号:17）を用いて配列決定した。配列決定により、増幅JC130からの２個のクローン（JC130a及びJC130b）ならびに増幅JC135からの１個のクローン（JC135g）がCry　j　Ｉクローンであることが見いだされた。クローンJC130a及びJC130gのヌクレオチド及び推定アミノ酸配列は以前から既知のCry　j　Ｉ配列（配列番号:1）と同一であった。クローン130bは以前から既知のCry　j　Ｉ配列（配列番号:1）と１個のヌクレオチドの差を含むことが見いだされた。クローンJC130bは配列番号:1のヌクレオチド位置306に以前に記載のＣではなくＴを有した。このヌクレオチドの変更は、成熟Cry　j　Ｉ蛋白質のアミノ酸60におけるTyrからHisへの推定アミノ酸変更を生ずる。この多型性はまだ、独立して誘導されたPCRクローンにより、又は直接アミノ酸配列決定により確認されていない。しかし一次ヌクレオチド（primary　nucleotide）及びアミノ酸配列におけるそのような多型性は予想される。

実施例５

Cry　j　Ｉの発現

Cry j Ｉの発現は以下の通りに行われた。10μｇのpUC19JC91aをXba Ｉで消化し、沈澱させ、T4ポリメラーゼを用いて平滑化した。Bam H Iリンカー（N.E.Biolabs,Beverly,MA）をpUC19JC91aに終夜平滑末端連結し、NACSイオン交換ミニカラム（BRL、Gaithersburg,MD）を通す濾過により過剰のリンカーを除去した。その後結合されたcDNAをEco R I及びBam H Iで同時に消化した。この消化物を１％SeaPlaque低融点アガロースゲルを通して電気泳動することにより、Cry j Ｉ挿入片（成熟蛋白質のアミノ末端をコードするヌクレオチドから停止コドンを経て延びる）を単離した。その後ATG開始コドンの３′の直後に６ヒスチジン（His6）をコードする配列を含み、その後にユニークEco R Iエンドヌクレアーゼ制限部位が続くように修正され、適当に消化された発現ベクターpET－11d（Novagen,Madison,WI;Jameel et al.（1990）J.Virol.64:3963－3966）中に挿入片を連結した。ベクター中の第２のEco R Iエンドヌクレアーゼ制限部位は、隣接するCla Ｉ及びHind IIIエンドヌクレアーゼ制限部位と共にEco R I及びHind IIIを用いた消化によりあらかじめ除去し、平滑化し、連結した。ヒスチジン（His_6）配列は、Ni^{2+}キレートカラム（Hochuli et al.（1987）J.Chromatog.411:177－184;Hochuli et al.（1988）Bio/Tech.６:1321－1325）上の組み替え蛋白質（Cry j Ｉ）のアフィニティー精製のために加えた。組み替えクローンを用い、T7ポリメラーゼをコードする遺伝子の前にイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（IPTG）－誘導性プロモーターを有するプラスミドが内在する大腸菌（Escherichia coli）株BL21－DE3を形質転換した。IPTGを用いた誘導により多量のT7ポリメラーゼが発現され、それはT7プロモーターを有するpET－11dにおける組み替え蛋白質の発現に必要である。クローンpET－11dΔ$HRhis_6$JC91a.dは、CP－14（配列番号:11）を用いたジデオキシ配列決定（Sanger et al.同上）により、発現のための正しい読み取り枠におけるCry j Ｉクローンであることが確認された。

組み替え蛋白質の発現は最初の小培養（50ml）において確認された。クローンpET－11dΔ$HRhis_6$JC91a.dの終夜培養物を用い、アンピシリン（200μg/ml）を含む50mlの培地（Brain Heart Infusion Media,Difco）に接種し、A_{600}＝1.0まで成育し、その後IPTG（1mM、最終濃度）で２時間誘導した。1mlのバクテリアのアリコートを誘導の前後に集め、遠心によりペレット化し、50mMトリスHCl、pH6.8、2mM EDTA、１％SDS、１％β－メルカプトエタノール、10%グリセロール、0.25%ブロモフェノールブルー（Studier et al.,（1990）Methods in Enzymology 185:60－89）中で５分間ペレットを煮沸することにより粗細胞ライセートを調製した。組み替え蛋白質の発現は、Sambrook et al.同上に従い、40μｌの粗ライセートを負荷したクーマシーブルー－染色SDS－PAGEゲル上の約38kDaの予想された分子量を有するバンドとして視覚化された。負の標準は、Cry j Ｉを有するプラスミドを含む非誘導バクテリアからの粗ライセート及びプラスミドを含まないバクテリアからの誘導ライセートを含んだ。

その後pET－11dΔ$HRhis_6$JC91a.dクローンを、組み替え蛋白質発現及び精製のために大規模に成育した。組み替えプラスミドを含む2mlの培養バクテリアを８時間成育し、固体培地（例えば200μg/mlのアンピシリンを含むLB培地（Gibco－BRL,Gaithersburg,MD）中の1.5%アガロースを含む６個のペトリ皿（100×15mm）上に線状に接種し、終夜成育して密集させ、その後アンピシリン（200μ/ml）を含む9Lの液体培地（Brain Heart Infusion media,Difco）中にこすり落とした。培養をA_{600}が1.0となるまで成育し、IPTGを加え（最終濃度1mM）、さらに２時間培養を成育した。

遠心（7,930xg、10分）によりバクテリアを回収し、90mlの6Mグアニジン－HCl、0.1M Na_2HPO_4、pH8.0中で１時間激しく振って溶解した。遠心（11,000xg、10分、４℃）により不溶性物質を除去した。ライセートのpHをpH8.0に調節し、6Mのグアニジン HCl、100mMのNa_2HPO_4、pH8.0で平衡化した80mlのニッケルNTAアガロースカラム（Qiagen）にライセートを適用した。カラムを6Mのグアニジン HCl、100mMのNa_2HPO_4、10mMのトリス－HCl、pH8.0、その後8Mのウレア、100mMのNa_2HPO_4、pH8.0、及び最後に8Mのウレア、100mMの酢酸ナトリウム、10mMのトリス－HCl、pH6.3で順に洗浄した。カラムは、通過液がA_{280}≦０。05となるまで各緩衝液で洗浄した。

組み替え蛋白質Cry j Ｉは、8Mのウレア、100mMの酢酸ナトリウム、10mMのトリス－HC

l、pH4.5を用いて溶離し、10mlのアリコートとして集めた。各画分の蛋白質濃度は、A_{280}及びプールされたピーク画分により決定した。集めた組み替え蛋白質のアリコートをSambrook et al.同上の方法に従い、SDS－PAGE上で分析した。
最初の9Lの試料JCpET－１は、クーマシーブルー染色SDS－PAGEゲルのデンシトメトリー（Shimadzu Flying Spot Scanner,Shimadzu Scientific Instruments,Inc.,Braintree,MA）により決定して30mgのCry j Ｉを約78％の純度で与えた。同様にして調製した第２の9Lの試料、JCpET－２は41mgのCry j Ｉを約77％の純度で与えた。

実施例６

Cry j Ｉ－杉花粉主要抗原を用いた日本杉花粉アレルギー患者のＴ細胞研究

杉花粉抗原ペプチドへのＴ細胞応答

末梢血単核細胞（PBMC）を、季節的な鼻炎の臨床的症状を示し、日本杉花粉に関するMAST及び皮膚テストで陽性の日本杉花粉アレルギー患者からの60mlの末梢血のリンパ球分離培地（LSM）遠心により精製した。完全培地（RPMI－1640、2mM Ｌ－グルタミン、100U/mlペニシリン／ストレプトマイシン、５×10^{-5}M2－メルカプトエタノール、及び５％の熱不活化ヒトAB血清を補足した10mM HEPES）の大量培養中の２×10^{6}PBL/mlを20μg/mlの部分的に精製された本来のCry j Ｉ（図２の３つのバンドに類似の３つのバンドを含む純度75％）を用い、加湿５％CO_2インキュベーター中37℃にて７日間賦活することにより長期Ｔ細胞系を樹立し、Cry j Ｉ反応性Ｔ細胞を選択した。この初回免疫抗原の量は、ほとんどの杉花粉アレルギー患者からのＴ細胞の活性化に最適であるように決定した。生存細胞をLSM遠心により精製し、５単位の組み替えヒトIL－2/ml及び５単位の組み替えヒトIL－4/mlを補足した完全培地中で、細胞がもはやリンホカインに応答せず、“休止”と思われるまで最高３週間培養した。その後組み替えCry j Ｉ（ｒCry j Ｉ）、精製した本来のCry j Ｉ又は組み替えAmb ａ I.1（rAmb aI.1）に対するＴ細胞増殖の能力を評価した。分析のために、96ウェルの丸底プレートにおいて二重又は三重のウェル中の200μｌの完全培地中で2x10^{4}の休止細胞を、４×10^{4}のオートロガス エプスタイン－バールウィルス（EBV）－形質転換Ｂ細胞（下記の通りに調製）（25,000RADSでガンマ線照射）の存在下で２－50μg/mlのｒCry j Ｉ、精製した本来のCry j Ｉ又はrAmb ａ I.1を用い、２－４日間再賦活した。最適インキュベーションは３日であることが見いだされた。その後各ウェルに１μCiのトリチウム化チミジンを16－20時間与えた。挿入されたカウントを液体シンチレーション計数のためにガラス繊維フィルターマット上に集め、加工した。図12は組み替えCry j Ｉ、精製した本来のCry j Ｉ及び組み替えAmb ａ I.1を用いた分析における抗原投薬量の変化の効果を示す。図12の結果は、患者番号999が組み替えCry j Ｉ及び精製された本来のCry j Ｉに良く応答するが組み替えAmb ａ I.1に応答しないことを示している。これはCry j Ｉ Ｔ細胞エピトープがこの特定のアレルギー患者からのＴ細胞により認識され、ｒCry j Ｉがそのようなエピトープを含むことを示唆している。

抗原提示細胞として用いるための（EBV）－形質転換Ｂ細胞の調製

オートロガスEBV－形質転換細胞系を25,000Radでγ－線照射し、二次増殖分析及び二次大量賦活における抗原提示細胞として用いた。これらの細胞系は免疫蛍光フローサイトメトリー分析における標準としても用いられる。これらのEBV－形質転換細胞系は、12×75mmのポリプロピレン丸底Falconスナップキャップチューブ（Becton Dickinson LAbsware,Lincoln Park,NJ）中で37℃にて６時間、１μg/mlのホルボール12－ミリステート13－アセテート（PMA）の存在下で1mlのＢ－59/8Marmoset細胞系（ATCC CRL1612、American Type Culture Collection,Rockville,MD）で状態調節した培地を用いて５×10^{6}のPBLをインキュベートすることにより形成した。その後これらの細胞を、10％の熱不活化ウシ胎児血清を補足する以外は上記で記載の通りのRPMI－1640中で1.25×10^{6}細胞/mlに希釈し、目に見えるコロニーが検出されるまで平底培養プレート中の200μｌのアリコートとして培養した。その後、細胞系が樹立されるまでそれらをより大きなウェルに移した。

実施例７

主要杉花粉アレルゲンとしてのCry j Ｉ

日本杉花粉の主要アレルゲンとして報告されているCry j Iの重要性を調べるために、直接及び競争的ELISA分析の両方を行った。直接ELISA分析の場合、日本杉花粉に関する可溶性花粉抽出物（SPE）又は精製した本来のCry j I（蛋白質配列決定により純度90%にて分析）のいずれかをウェルに塗布し、これらの抗原へのヒトIgE抗体の結合を分析した。日本杉花粉MASTの得点が2.5かそれより大の15人の患者からの等体積の血漿を含む、プールされたヒト血漿及び２つの各患者の血漿試料をこの分析で比較した。図５はこれらの２つの抗原との結合の反応性の結果を示す。結合の全体的パターンは、塗布抗原がSPE（図5a）であっても又は精製された本来のCry j I（図5b）であっても非常に類似している。

競争的分析の場合、ELISAウェルに日本杉花粉SPEを塗布し、その後競争する精製された本来のCry j Iが溶液中に存在する下でアレルギー患者のIgE結合を測定した。これらの分析におけるアレルギー性IgEの供給源は15人の患者からプールされた血漿（PHPと記す）又は日本杉MASTの得点が2.5又はそれより大の患者からの７個のそれぞれの血漿試料であった。プールされたヒト血漿試料を用いた競争的分析は、精製された本来のCry j Iの競争的結合能力を日本杉花粉SPE及び無関係のアレルゲン供給源、どくむぎSPEと比較する。図６はプールされたヒト血漿を用いた競争的ELISAの結果のグラフを示す。日本杉花粉SPE中に存在する蛋白質の濃度は各競争点において精製された本来のCry j Iより約170倍高い。この分析から、精製された本来のCry j Iが日本杉花粉可溶性花粉抽出物中に存在する蛋白質の全範囲に対するIgE結合に関して非常に良く競争することが明らかである。これはほとんどの抗－Cry j I IgEの反応性が精製された本来のCry j Iに向かうことを意味する。負の標準は特異的競争反応性を示さず、競争する溶液中のSPEが完全に塗布ウェルへの結合を除去することができる。この分析を、アレルギー性集団内のIgE応答の範囲の尺度として各患者の場合に繰り返した。図７はこの結果を示し、この場合は精製された本来のCry j IをSPEへの結合の競争を行った。患者は日本杉花粉SPEに対して異なる投薬量応答を示すが、日本杉花粉SPEへの７人の患者のそれぞれのIgE結合は、精製された本来のCry j Iと競争することができたことを結果が示している。これらのデータの意味は、各患者の場合にIgEの反応性はCry j Iに向かうものが主であるが、患者の間でこの反応性には変動があることである。全体としての結果は、Cry j Iが日本杉花粉の主要アレルゲンであるという以前の発見（Yasueda et al.,（1988）同上）をこれらのデータが支持していることである。

杉花粉アレルギー患者からのIgEの花粉蛋白質への反応性は、これらの蛋白質が変性されていると劇的に低下する。この性質の分析の方法の１つは直接結合ELISAによる方法であり、その場合塗布抗原は日本杉花粉SPE又は還元剤DTTの存在下で煮沸することにより変性した変性日本杉花粉SPEである。これをその後アレルギー患者の血漿を用いてIgE結合反応性に関して調べる。図8aは７つのそれぞれの血漿試料を用いたSPEへの直接結合分析を示す。図8bにおいて、変性SPEを用いた結合の結果は、この処置の後の反応性が顕著に低下することを示している。ELISAウェルへのCry j I結合の程度を決定するために、Amb a I＆II蛋白質の種類に対するウサギポリクローナル抗血清を用いてCry j Iを検出した。これらの蛋白質はCry j Iと高度の配列の同一性（46%）を有し、この抗血清を交差反応性抗体検出系として用いることができる。結局、これらのデータはSPEの変性の後、IgE反応性が顕著に失われることを示す。

実施例８

IgE反応性及びヒスタミン放出分析

バクテリア中で発現され、その後精製された（実施例５に記載の通り）組み替えCry j I蛋白質（rCry j I）をIgE反応性に関して調べた。この試験に適用された最初の方法は直接ELISAであり、ウェルに組み替えCry j Iを塗布し、各患者につきIgE結合を分析した。図９はこの直接ELISAのグラフ図である。このデータの組における唯一の陽性の信号は、ウサギポリクローナル抗－Amb a I＆II（Rabbit anti－Amb a I＆II）及びCry j IとAmb a Iに対して誘起されたモノクローナル抗体であるCBF2の２つの標準抗血清からの信号である。この方法により調べたすべての患者が

組み替えCry j IとのIgE反応性を示さなかった。
組み替えCry j IへのIgE反応性を調べるために適用された他の分析法は捕獲ELISAであった。この分析の基礎は定義された抗体、この場合はCBF2を用い、抗原に結合させ、他のエピトープ部位に抗体を結合させるということである。この捕獲ELISAの形式は、１）ウェルにMAbCBF2を塗布し、２）抗原又はPBS（１種の負の標準として）を加え、塗布されたMAbとの特異的相互作用により捕獲させ、３）標準抗体抗－Amb a I＆II（図10b）又はヒトアレルギー性血漿（図10b）を検出抗体として加え、４）抗体結合の検出を評価することである。図10a及び10bはこれらの分析の結果のグラフである。IgE分析の場合、プールされたヒト血漿（15患者）を用いた。これらの結果からの結論は、この分析法によりヒトアレルギー性IgEのｒCry j Iへの特異的な結合は示されなかったということである。しかし、図10bに示される標準抗体結合曲線により証明される通り、ｒCry j Iは捕獲される。ｒCry j IへのIgE結合の欠如は炭水化物又は他の翻訳後修飾がないため、及び／又は大多数のIgEが変性Cry j Iと反応できないためであり得る。RAST、競争的ELISA及びウェスタンブロットデータもｒCry j Iへの特異的なIgE反応性を示さない（データは示していない）。
日本杉花粉SPE、精製された本来のCry j I及びCry j Iを抗原として加え、１人の日本杉花粉アレルギー患者につきヒスタミン放出分析を行った。この分析は、ヒトの好塩基球の媒介物の放出を介したIgE反応性の尺度である。図11に示すこの分析の結果は、広い濃度範囲にわたる精製された本来のCry j I及び日本杉花粉SPEの両方の場合の強いヒスタミン放出を示している。Cry j Iの場合に測定可能なヒスタミン放出がある唯一の点は、50μg/mlの最高濃度の点である。ｒCry j Iによるこの放出に関して可能な２つの説明は、１）非常に低い割合の抗－Cry j I IgEが特異的反応性が組み替え形態のCry j Iを認識することができることか、又は２）最高の抗原濃度においてのみ観察される、存在量の少ないバクテリア汚染物により起こる非特異的放出である。これまでのところ、この結果は１人の患者において示されたのみである。さらに、示されたデータは各蛋白質濃度における１個のデータ点からのものである。
大腸菌発現物質はＴ細胞反応性を有するので（実施例６）、組み替えにより発現されたこのCry j I蛋白質を免疫治療に用いることができるが、クリプトメリア ジャポニカ アトープからのIgEと結合しないと思われ、又試験管内でそのようなアトープの肥満細胞及び好塩基球からヒスタミンを放出させない。IgEと結合することができるｒCry j Iの発現は、酵母、昆虫（バクロウィルス）又は哺乳類細胞（例えばCHO、ヒト及びマウス）において行うことができた。活発IgEと結合できるｒCry j Iは組み替え物質を診断目的で利用する場合に重要である。
本発明の主な態様は次のとおりである。
1. 日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも１個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的同等物。
2. 該核酸配列が配列番号:1の塩基66－1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記１に記載の核酸配列。
3. 該核酸配列が配列番号:1の塩基129－1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記１に記載の核酸配列。
4. 該核酸配列が基本的に配列番号:1の核酸配列のコード部分の少なくとも１個のフラグメントを含むことを特徴とする、前記１に記載の核酸配列。
5. 日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも１個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的同等物を含む発現ベクター。
6. 該核酸配列が配列番号:1の塩基66－1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記５に記載の発現ベクター。
7. 該核酸配列が配列番号:1の塩基129－1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記５に記載の発現ベクター。
8. 該核酸配列が基本的に配列番号:1の核酸配列のコード部分の少なくとも１個のフラグメントを含むことを特徴とする、前記５に記載の発現ベクター。

9. 前記１、２、３又は４に記載の核酸配列によりコードされる蛋白質又はペプチドを発現するように形質転換された宿主細胞。
10. 該宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする、前記９に記載の宿主細胞。
11. 前記１、２、３又は４に記載の核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のその抗原性フラグメント。
12. 該日本杉花粉アレルゲンが日本杉花粉に関して特異的な免疫グロブリンIgEと結合しないか、又は該免疫グロブリンＥへの日本杉花粉アレルゲンの結合が起こる場合、そのような結合が肥満細胞又は好塩基球からのヒスタミンの放出を生じないことを特徴とする、前記11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン。
13. 該日本杉花粉アレルゲンが、精製された本来の日本杉花粉アレルゲンが免疫グロブリンＥに結合する場合より実質的に低い程度で該免疫グロブリンＥに結合することを特徴とする、前記11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン。
14. 宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする、前記11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン又はその抗原性フラグメント。
15. ａ）日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又はそのフラグメントをコードするDNA配列を用いて形質転換された宿主細胞を、該日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを含む細胞及び培地の混合物の生産に適した培地中で培養し、ｂ）該混合物を精製して実質的に純粋な日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを生産する段階を含む、日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントの生産法。
16. 日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉの全体又は一部をコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で合成された日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。
17. 少なくとも１個のその該フラグメントが抗原性フラグメントであることを特徴とする、前記16に記載の蛋白質組成物。
18. 化学的に合成された日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。
19. 該Cry j Ｉが配列番号:1のアミノ酸配列を有することを特徴とする、前記16又は18に記載の蛋白質組成物。
20. 日本杉花粉からのアレルゲンの単離抗原性フラグメント。
21. 日本杉花粉からの該アレルゲンがCry j Ｉであることを特徴とする、前記20に記載の抗原性フラグメント。
22. 該抗原性フラグメントが少なくとも１個のＴ細胞エピトープを含むことを特徴とする、前記20又は21に記載の抗原性フラグメント。
23. 該抗原性フラグメントが最小の免疫グロブリンＥ賦活活性を有することを特徴とする、前記22に記載の抗原性フラグメント。
24. 該抗原性フラグメントが日本杉花粉に特異的な免疫グロブリンに結合しないか、又は該免疫グロブリンＥへのフラグメントの結合が起こる場合、そのような結合は肥満細胞又は好塩基性細胞からヒスタミンを放出させないことを特徴とする、前記22に記載の抗原性フラグメント。
25. 該抗原性フラグメントが、精製された本来の日本杉花粉アレルゲンが免疫グロブリンＥに結合する場合より実質的に低い程度で該免疫グロブリンＥに結合することを特徴とする、前記20に記載の抗原性フラグメント。
26. 該精製アレルゲン又は該抗原性フラグメントが、それを投与した日本杉花粉感受性患者において、日本杉花粉に対するアレルギー応答を改変することができることを特徴とする、前記11、20、21又は22に記載の精製アレルゲン又は抗原性フラグメント。
27. 該精製アレルゲン又は該抗原性フラグメントが患者の日本杉花粉アレルゲンに対するＢ細胞応答、患者の日本杉花粉抗原に対するＴ細胞応答、又は患者の日本杉花粉アレルゲンに対するＢ細胞応答とＴ細胞応答の両方を改変することがでいきることを特徴とする

、前記26に記載の精製アレルゲン又は抗原性フラグメント。
28. 前記20に記載の日本杉花粉アレルゲンの単離抗原性フラグメントをコードする核酸配列。
29. 日本杉花粉感受性患者に投与すると日本杉花粉アレルゲンに対する患者のアレルギー応答を低下させる、改変日本杉花粉アレルゲン。
30. 該改変日本杉花粉アレルゲンが改変Cry j Ｉ蛋白質であることを特徴とする、前記29に記載の改変杉花粉蛋白質アレルゲン。
31. 日本杉花粉感受性患者に投与すると日本杉花粉アレルゲンに対する患者のアレルギー応答を低下させる、日本杉花粉アレルゲンの少なくとも１個の改変フラグメント。
32. 少なくとも１個の該改変フラグメントがCry j Ｉ蛋白質の改変フラグメントであることを特徴とする、前記31に記載の少なくとも１個の改変フラグメント。
33. Cry j Ｉ又はそのフラグメントに免疫学的に関連する単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。
34. 該蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメントがCry j Ｉ又はそのフラグメントに特異的な抗体と結合することを特徴とする、前記33に記載の単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。
35. 該蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメントがCry j Ｉ又はそのフラグメントに特異的なＴ細胞を賦活できることを特徴とする、前記33に記載の単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。
36. 精製日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のそのフラグメント、及び製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含む、治療組成物。
37. Cry j Ｉが配列番号:1のアミノ酸１－353の配列を有することを特徴とする、前記36に記載の治療組成物。
38. 哺乳類に治療的有効量の前記16又は18に記載の該蛋白質組成物を投与することを含む、日本杉花粉アレルゲン又は日本杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応性のアレルゲンに感受性の哺乳類において、該アレルゲンに対する感受性を処置する方法。
39. 例えば日本杉花粉アレルゲン又は日本杉花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲンに対する患者の感受性の処置など治療において用いるための前記16又は18に記載の蛋白質組成物。
40. 哺乳類から得た血液試料を、前記１に記載の核酸配列を用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルゲン又はこの抗原性フラグメントと、血液成分と蛋白質又はそのフラグメントの結合に適した条件下で合わせ、結合が起こる程度を決定する段階を含む、哺乳類における日本杉花粉アレルゲンに対する感受性の検出法。
41. 結合が起こる程度をＴ細胞機能、Ｔ細胞増殖、Ｂ細胞機能、蛋白質又はそのフラグメントの血液中に存在する抗体との結合、又はそれらの組み合わせの評価により決定することを特徴とする、前記40に記載の方法。
42. 前記１に記載の核酸配列を用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又はその抗原性フラグメントを哺乳類中でアレルギー応答を起こすのに十分な量で該哺乳類に投与し、該患者において該日本杉花粉アレルゲン又はその抗原性フラグメントに対するアレルギー応答が起こるかどうかを決定する段階を含む、日本杉花粉アレルゲンに対する哺乳類の感受性の検出法。
43. 日本杉花粉アレルゲンCry j Ｉ又は少なくとも１個のその抗原性フラグメントと特異的に反応性のモノクローナル抗体。
配列表
配列番号:1
配列の長さ:1337
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA
起源
生物名：クリプトメリア ジャポニカ（Cryptomeria japonica）
配列の特徴
特徴を表す記号:CDS
存在位置:66..1187
配列の特徴
特徴を表す記号:mat_peptide
存在位置:129..1187
配列

```
AGTCAATCTG CTCATAATCA TAGCATAGCC GTATAGAAAG AAATTCTACA CTCTGCTACC    60

AAAAA ATG GAT TCC CCT TGC TTA GTA GCA TTA CTG GTT TTC TCT TTT        107
      Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe
      -21 -20                 -15                 -10

GTA ATT GGA TCT TGC TTT TCT GAT AAT CCC ATA GAC AGC TGC TGG AGA     155
Val Ile Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg
        -5                   1               5

GGA GAC TCA AAC TGG GCC CAA AAT AGA ATG AAG CTC GCA GAT TGT GCA     203
Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala
 10                  15                  20                  25
```

```
GTG GGC TTC GGA AGC TCC ACC ATG GGA GGC AAG GGA GGA GAT CTT TAT     251
Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr
                30                  35                  40

ACG GTC ACG AAC TCA GAT GAC GAC CCT GTG AAT CCT GCA CCA GGA ACT     299
Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr
            45                  50                  55

CTG CGC TAT GGA GCA ACC CGA GAT AGG CCC CTG TGG ATA ATT TTC AGT     347
Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser
        60                  65                  70

GGG AAT ATG AAT ATA AAG CTC AAA ATG CCT ATG TAC ATT GCT GGG TAT     395
Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr
    75                  80                  85

AAG ACT TTT GAT GGC AGG GGA GCA CAA GTT TAT ATT GGC AAT GGC GGT     443
Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly
90                  95                  100                 105

CCC TGT GTG TTT ATC AAG AGA GTT AGC AAT GTT ATC ATA CAC GGT TTG     491
Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu
                110                 115                 120

TAT CTG TAC GGC TGT AGT ACT AGT GTT TTG GGG AAT GTT TTG ATA AAC     539
Tyr Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn
            125                 130                 135

GAG AGT TTT GGG GTG GAG CCT GTT CAT CCT CAG GAT GGC GAT GCT CTT     587
Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu
        140                 145                 150

ACT CTG CGC ACT GCT ACA AAT ATT TGG ATT GAT CAT AAT TCT TTC TCC     635
Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser
    155                 160                 165

AAT TCT TCT GAT GGT CTG GTC GAT GTC ACT CTT ACT TCG ACT GGA GTT     683
Asn Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val
170                 175                 180                 185

ACT ATT TCA AAC AAT CTT TTT TTC AAC CAT CAT AAA GTG ATG TTG TTA     731
Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu
                190                 195                 200

GGG CAT GAT GAT GCA TAT AGT GAT GAC AAA TCC ATG AAG GTG ACA GTG     779
Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val
            205                 210                 215

GCG TTC AAT CAA TTT GGA CCT AAC TGT GGA CAA AGA ATG CCC AGG GCA     827
Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala
        220                 225                 230

CGA TAT GGA CTT GTA CAT GTT GCA AAC AAT AAT TAT GAC CCA TGG ACT     875
Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr
    235                 240                 245

ATA TAT GCA ATT GGT GGG AGT TCA AAT CCA ACC ATT CTA AGT GAA GGG     923
Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly
250                 255                 260                 265
```

```
AAT AGT TTC ACT GCA CCA AAT GAG AGC TAC AAG AAG CAA GTA ACC ATA   971
Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile
                270                 275                 280

CGT ATT GGA TGC AAA ACA TCA TCA TCT TGT TCA AAT TGG GTG TGG CAA  1019
Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln
            285                 290                 295

TCT ACA CAA GAT GTT TTT TAT AAT GGA GCT TAT TTT GTA TCA TCA GGG  1067
Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly
        300                 305                 310

AAA TAT GAA GGG GGT AAT ATA TAC ACA AAG AAA GAA GCT TTC AAT GTT  1115
Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val
    315                 320                 325

GAG AAT GGG AAT GCA ACT CCT CAA TTG ACA AAA AAT GCT GGG GTT TTA  1163
Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu
330                 335                 340                 345

ACA TGC TCT CTC TCT AAA CGT TGT TGATGATGCA TATATTCTAG CATGTTGTAC  1217
Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys
                350

TATCTAAATT AACATCAACA AGAAAATATA TCATGATGTA TATTGTTGTA TTGATGTCAA  1277

AATAAAAATG TATCTTTTAC TATTAAAAAA AAAAATGATC GATCGGACGG TACCTCTAGA  1337
```

配列番号:2
配列の長さ:374
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：蛋白質
配列

```
Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe Val Ile
-21 -20                 -15                 -10

Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 -5                   1                   5                  10

Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
             15                  20                  25

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr Thr Val
         30                  35                  40

Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg
     45                  50                  55

Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn
 60                  65                  70                  75

Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr
                 80                  85                  90

Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys
             95                 100                 105

Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu Tyr Leu
        110                 115                 120

Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser
    125                 130                 135

Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu
140                 145                 150                 155

Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser
                160                 165                 170

Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val Thr Ile
            175                 180                 185

Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His
        190                 195                 200

Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
    205                 210                 215

Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr
220                 225                 230                 235

Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr
                240                 245                 250

Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
            255                 260                 265

Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile
        270                 275                 280

Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr
    285                 290                 295

Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr
300                 305                 310                 315

Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn
                320                 325                 330

Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys
            335                 340                 345

Ser Leu Ser Lys Arg Cys
        350
```

配列番号:3
配列の長さ:17
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列
GAYAAYCCNA THGAYWS
配列番号:4
配列の長さ:25
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列
GGGAATTCAA YTGGGCNCAR AAYSG
配列番号:5
配列の長さ:23
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の特徴
特徴を表す記号:modified base
存在位置:15
他の情報:/mod base= i
配列
CTGCAGCCRT TYTCNACRTT RAA
配列番号:6
配列の長さ:20
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の特徴
特徴を表す記号:modified base
存在位置:6
他の情報:/mod base= i
配列
TTCATNCKRT TYTGNGCCCA
配列番号:7
配列の長さ:25
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列
CCTGCAGCKR TTYTGNGCCC AARTT
配列番号:8
配列の長さ:18
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

ATGGATTCCC CTTGCTTA

配列番号:9
配列の長さ:26
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

GGGAATTCGA TAATCCCATA GACAGC

配列番号:10
配列の長さ:17
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

ATGCCTATGT ACATTGC

配列番号:11
配列の長さ:17
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

GCAATGTACA TAGGCAT

配列番号:12
配列の長さ:18
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

TCCAATTCTT CTGATGGT

配列番号:13
配列の長さ:18
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

TTTTGTCAAT TGAGGAGT

配列番号:14
配列の長さ:30
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

CCTGCAGAAG CTTCATCAAC AACGTTTAGA

配列番号:15
配列の長さ:19
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列

TAGCAACTC AGTCGAAGT

配列番号:16
配列の長さ:17
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列
TAGCTCTCAT TTGGTGC

配列番号:17
配列の長さ:18
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トロポロジー：直鎖状
配列
TATGCAATTG GTGGGAGT

配列番号:18
配列の長さ:20
配列の型：アミノ酸
トロポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型:N－末端フラグメント
起源
生物名：クリプトメリア　ジャポニカ（Cryptomeria　Japonica）
配列の特徴
特徴を表す記号:Modified－site
存在位置:7
他の特徴：記＝“７位のアミノ酸はSer、Cys、Thr又はHis"
配列
Asp Asn Pro Ile Asp Ser Xaa Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln
1 5 10 15

Asn Arg Met Lys
20

配列番号:19
配列の長さ:16
配列の型：アミノ酸
トロポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント
起源
生物名：クリプトメリア　ジャポニカ（Cryptomeria　Japonica）
配列
Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys
1 5 10 15

配列番号:20
配列の長さ:30
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖

トポロジー：直鎖状
配列
GGGTCTAGAG GTACCGTCCG ATCGATCATT
配列番号:21
配列の長さ:20
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列
GGGTCTAGAG GTACCGTCCG
配列番号:22
配列の長さ:13
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列
AATGATCGAT GCT
配列番号:23
配列の長さ:21
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列
GGAATTCTCT AGACTGCAGG T
配列番号:24
配列の長さ:35
配列の型：核酸
鎖の数:1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列
GGAATTCTCT AGACTGCAGG TTTTTTTTTT
TTTTT
配列番号:25
配列の長さ:5
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型:N－末端フラグメント
起源
生物名：ジュニペルス　サビノイデス（Juniperus　sabinoides）
配列
Asp Asn Pro Ile Asp

【図１ａ】

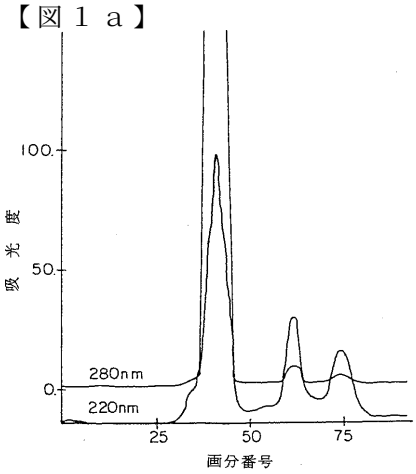


Fig. 1a

【図３】

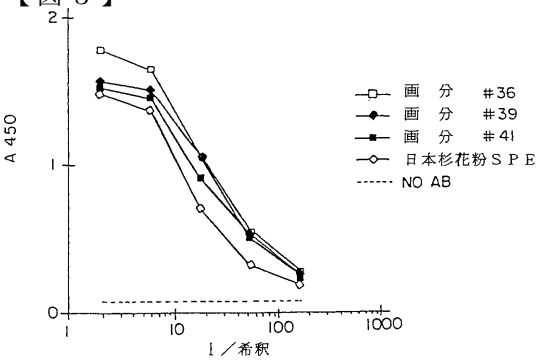


Fig. 3

【図１ｂ】

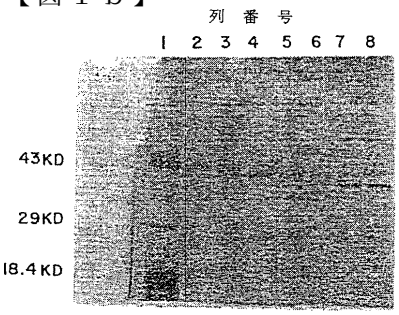


Fig. 1b

【図２】

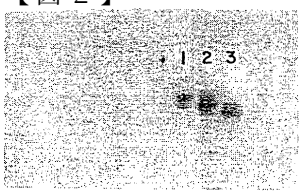


Fig. 2

【図５ａ】

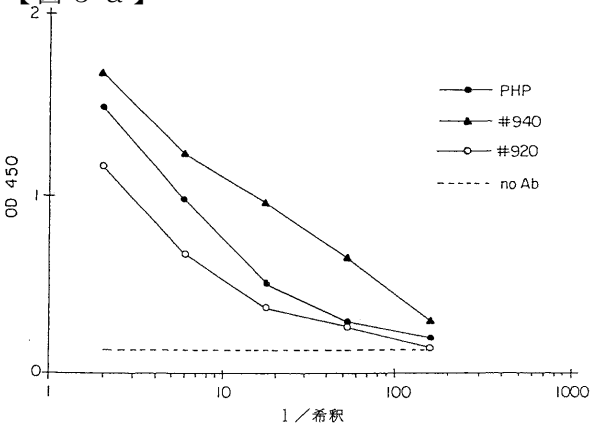


Fig. 5a

【図４ａ】

```
5'-AGTCAATCTG CTCATAATCA TAGCATAGCC GTATAGAAAG AAATTCTACA CTCTGCTACC    60

AAAAA ATG GAT TCC CCT TGC TTA GTA GCA TTA CTG GTT TTC TCT TTT           107
      Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe
     -21 -20             -15                 -10

GTA ATT GGA TCT TGC TTT TCT GAT AAT CCC ATA GAC AGC TGC TGG AGA         155
Val Ile Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg
       -5                  1                   5

GGA GAC TCA AAC TGG GCC CAA AAT AGA ATG AAG CTC GCA GAT TGT GCA         203
Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala
 10                  15                  20                  25

GTG GGC TTC GGA AGC TCC ACC ATG GGA GGC AAG GGA GGA GAT CTT TAT         251
Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr
                 30                  35                  40

ACG GTC ACG AAC TCA GAT GAC GAC CCT GTG AAT CCT GCA CCA GGA ACT         299
Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr
             45                  50                  55

CTG CGC TAT GGA GCA ACC CGA GAT AGG CCC CTG TGG ATA ATT TTC AGT         347
Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser
         60                  65                  70

GGG AAT ATG AAT ATA AAG CTC AAA ATG CCT ATG TAC ATT GCT GGG TAT         395
Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr
     75                  80                  85

AAG ACT TTT GAT GGC AGG GGA GCA CAA GTT TAT ATT GGC AAT GGC GGT         443
Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly
 90                  95                  100                 105

CCC TGT GTG TTT ATC AAG AGA GTT AGC AAT GTT ATC ATA CAC GGT TTG         491
Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu
                110                 115                 120

TAT CTG TAC GGC TGT AGT ACT AGT GTT TTG GGG AAT GTT TTG ATA AAC         539
Tyr Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn
            125                 130                 135

GAG AGT TTT GGG GTG GAG CCT GTT CAT CCT CAG GAT GGC GAT GCT CTT         587
Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu
        140                 145                 150

ACT CTG CGC ACT GCT ACA AAT ATT TGG ATT GAT CAT AAT TCT TTC TCC         635
Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser
    155                 160                 165
```

Fig. 4a

【図４ｂ】

```
AAT TCT TCT GAT GGT CTG GTC GAT GTC ACT CTT ACT TCG ACT GGA GTT      683
Asn Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val
170                 175                 180                 185

ACT ATT TCA AAC AAT CTT TTT TTC AAC CAT CAT AAA GTG ATG TTG TTA      731
Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu
                190                 195                 200

GGG CAT GAT GAT GCA TAT AGT GAT GAC AAA TCC ATG AAG GTG ACA GTG      779
Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val
            205                 210                 215

GCG TTC AAT CAA TTT GGA CCT AAC TGT GGA CAA AGA ATG CCC AGG GCA      827
Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala
        220                 225                 230

CGA TAT GGA CTT GTA CAT GTT GCA AAC AAT AAT TAT GAC CCA TGG ACT      875
Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr
    235                 240                 245

ATA TAT GCA ATT GGT GGG AGT TCA AAT CCA ACC ATT CTA AGT GAA GGG      923
Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly
250                 255                 260                 265

AAT AGT TTC ACT GCA CCA AAT GAG AGC TAC AAG AAG CAA GTA ACC ATA      971
Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile
                270                 275                 280

CGT ATT GGA TGC AAA ACA TCA TCA TCT TGT TCA AAT TGG GTG TGG CAA     1019
Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln
            285                 290                 295

TCT ACA CAA GAT GTT TTT TAT AAT GGA GCT TAT TTT GTA TCA TCA GGG     1067
Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly
        300                 305                 310

AAA TAT GAA GGG GGT AAT ATA TAC ACA AAG AAA GAA GCT TTC AAT GTT     1115
Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val
    315                 320                 325

GAG AAT GGG AAT GCA ACT CCT CAA TTG ACA AAA AAT GCT GGG GTT TTA     1163
Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu
330                 335                 340                 345

ACA TGC TCT CTC TCT AAA CGT TGT TGATGATGCA TATATTCTAG CATGTTGTAC     1217
Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys
            350

TATCTAAATT AACATCAACA AGAAAATATA TCATGATGTA TATTGTTGTA TTGATGTCAA    1277

AATAAAAATG TATCTTTTAC TATTAAAAAA AAAAATGATC GATCGGACGG TACCTCTAGA-3' 1337
```

Fig. 4b

【図５ｂ】

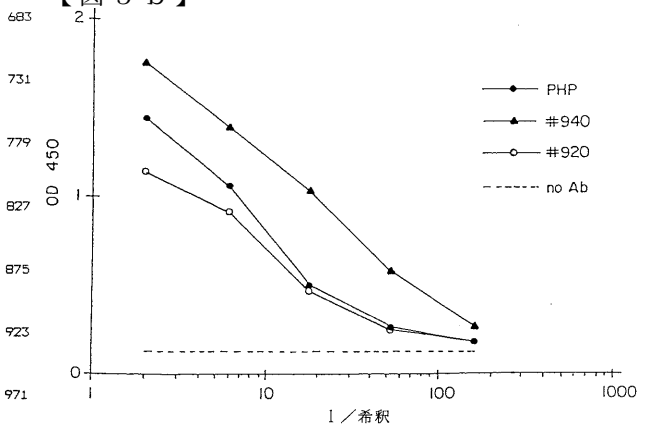


Fig. 5b

【図６】

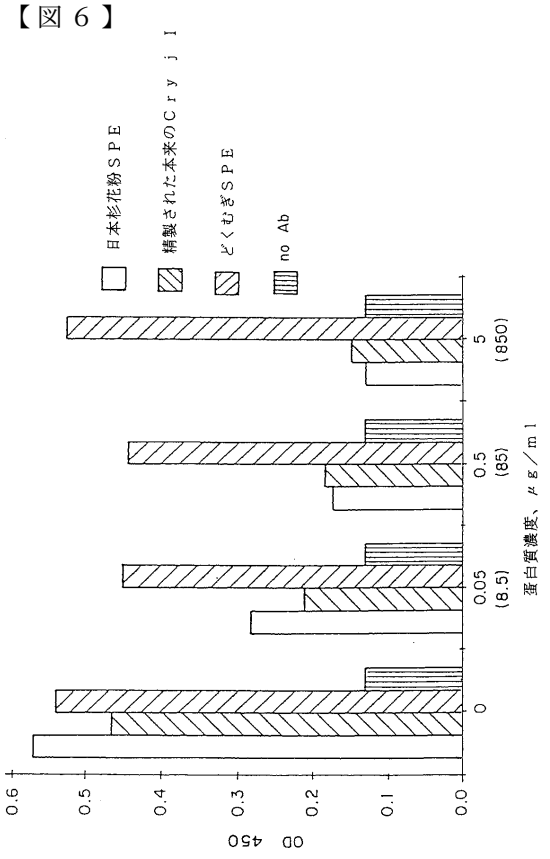


Fig. 6

【図７】

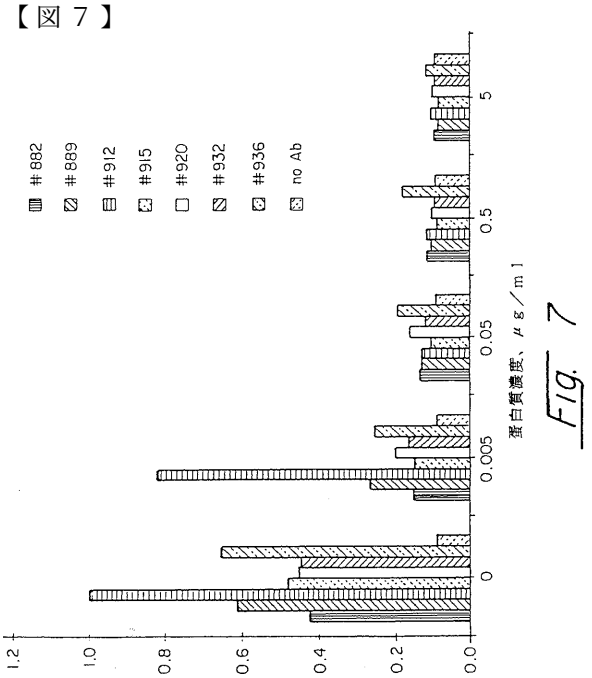
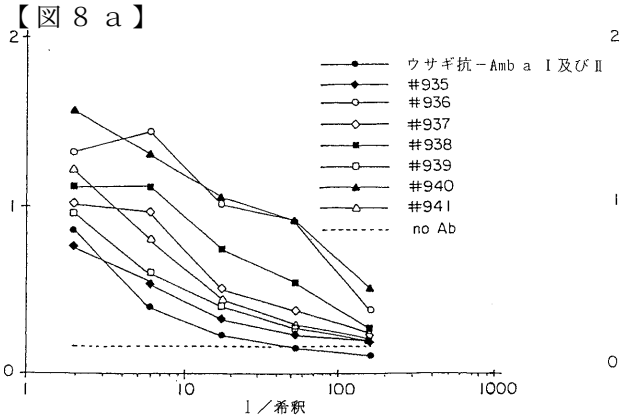


Fig. 7

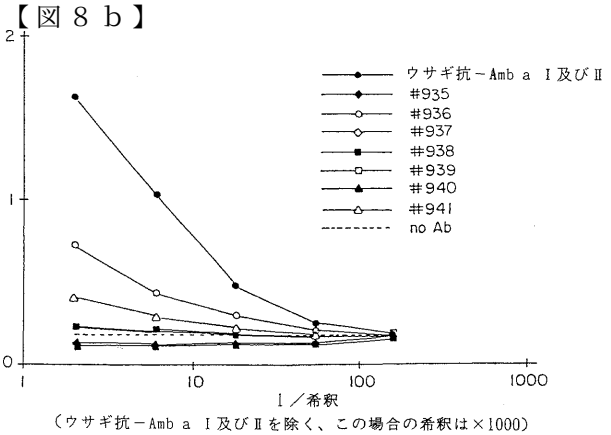
【図８ａ】



（ウサギ抗－Amb a Ⅰ及びⅡを除く、この場合の希釈は×1000）

Fig. 8a

【図８ｂ】



（ウサギ抗－Amb a Ⅰ及びⅡを除く、この場合の希釈は×1000）

Fig. 8b

【図９】

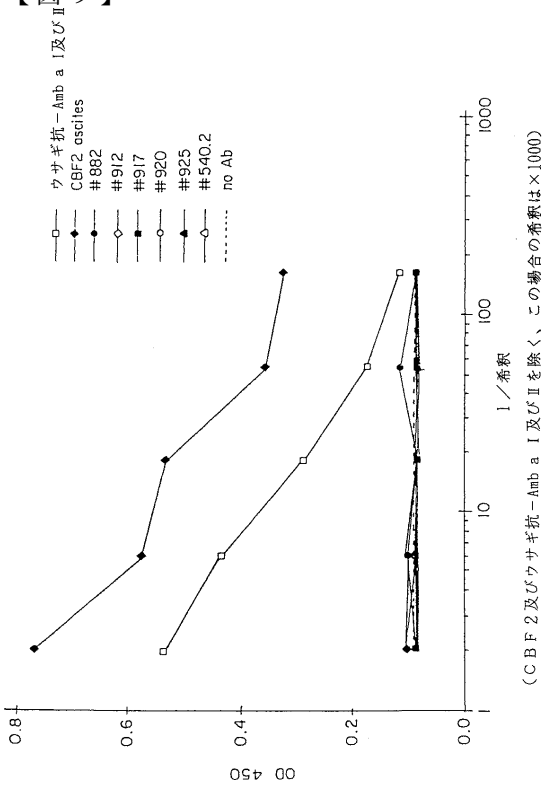


Fig. 9

【図１０ａ】

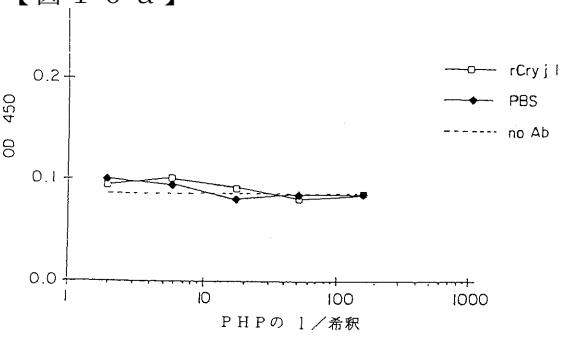


Fig. 10a

【図１０ｂ】

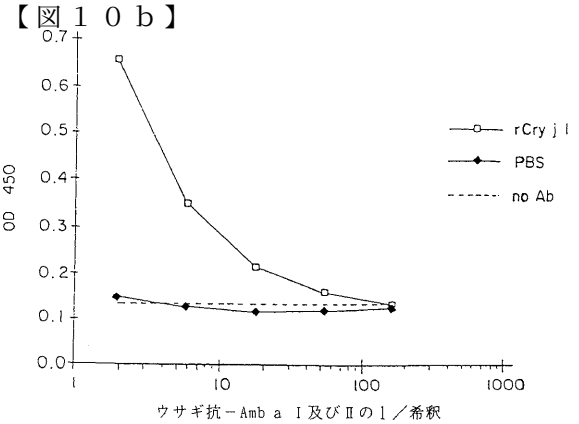


Fig. 10b

【図１１】

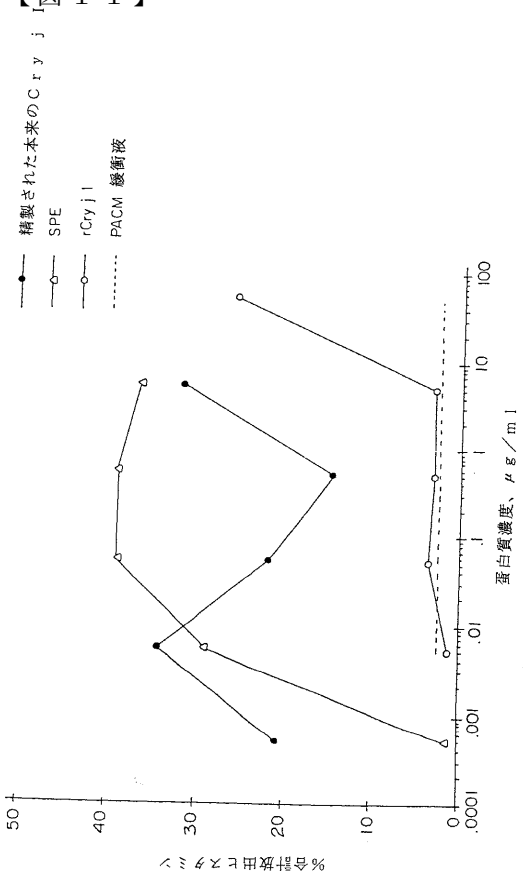


Fig. 11

【図１２】

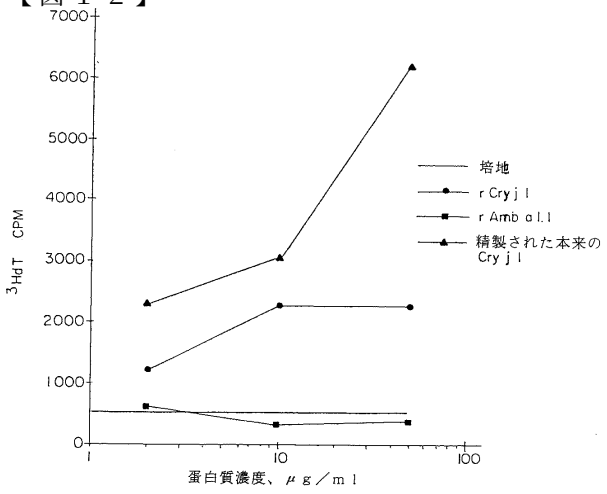


Fig. 12

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI		
Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｑ
Ｇ０１Ｎ	33/577	Ｇ０１Ｎ	33/577	Ｂ
//(Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ１２Ｐ	21/02	
Ｃ１２Ｒ	1:19)	Ｃ１２Ｒ	1:19	

(72)発明者 ポロツク，ジヨアン
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１７４アーリントン・ニユーコームストリート５１
(72)発明者 ボンド，ジユリアン，エフ
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１８８ウエイマウス・コマーシヤルストリート２９４

審査官 田村 明照

(56)参考文献 特開平０１－１５６９２６（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－１５９３２４（ＪＰ，Ａ）
FEBS Letters,Vol.239,No.2,pp.329-332(1988)
アレルギー、３５巻、８号、第８９２頁(1986)

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12N 15/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
MEDLINE(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq