

ラテックスアレルゲンとしての植物の生体防御蛋白質<sup>#1</sup>矢上 健<sup>#2</sup>Plant Defense-Related Proteins as Latex Allergens<sup>#1</sup>Takeshi Yagami<sup>#2</sup>

Immediate-type allergic reactions to latex products made from natural rubber are called latex allergy. One of the notable features of latex-allergic people is their cross-reactivity to various vegetable foods and pollen. The structurally similar proteins which most kinds of plants potentially induce must be responsible for these cross-reactions. However, the taxonomical dissimilarity among the causative plants has kept us from concrete explanations of such cross-reactive allergens. We have speculated that plant defense-related proteins are a possible cause of the latex allergy. The well-known serologic relationships and sequence similarities of these ubiquitous plant proteins can explain the cross-reactivity without difficulty. Rubber trees cultured in plantation farms are repeatedly tapped and treated with phytohormones. These stresses would result in the significant induction of defense-related proteins. Indeed, we were able to detect defense-related enzymes in latex extracts. Moreover, three hydrolytic enzymes ( $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase/lysozyme, and carboxylesterase) that are very likely to take a defensive role were specifically recognized by the IgE antibodies of latex-allergic people and atopic patients. These experimental results strongly support our hypothesis. Because of their conserved structures, defense-related proteins should form a family of plant pan-allergens.

**Keywords:** latex allergy, cross-reactivity, defense response, conserved protein, pathogenesis-related protein

## はじめに

80年代後半から、天然ゴム製品が原因となって発症する即時型（I型）アレルギーが各国で報告されるようになった<sup>1-3</sup>。天然ゴム製品がゴムの木（*Hevea brasiliensis*）の樹液（ラテックス）を原料として作られることから、このアレルギーはラテックスアレルギーと呼ばれている（Table 1）。原因となる天然ゴム製品は、手術用手袋やカテーテル、ラバーダムといった医療用具・歯科材料を始め、家庭用手袋、ゴムバンド、ゴム風船といった各種の日用品・玩具に至るまで、多種多様に及んでいる<sup>1-3</sup>。つまりラテックスアレルギーは、特殊な天然ゴム製品や一部の粗悪な製品だけでなく、天然ゴムを含むあらゆる製品により引き起こされる可能性がある。

ラテックスアレルギーのハイリスクグループは、医療従

Table 1. Characteristics of latex allergy

<b>Causes</b>	Gloves, catheters, rubber dam, balloons, etc.
<b>Prevalence</b>	5 to 15 % of medical personnel are IgE positive
<b>Symptoms</b>	Local to generalized urticaria, anaphylaxis
<b>Allergens</b>	Proteins in natural rubber and their derivatives
<b>Cross-reaction</b>	Vegetable foods, pollen, medical plants, etc.

事者や先天性疾患を持つ患者など、日常的に天然ゴム製品に接する機会が多い人であると考えられている<sup>1-3</sup>。しかし、天然ゴム製品に直接接触した場合にのみアレルギー症状が出現するとは限らない。例えば、ラテックス製手袋に塗布されているパウダーが、アレルゲンを吸着したまま室内に飛散し、既に感作が成立している患者に喘息等の即時型アレルギーを引き起こすことが明らかにされている<sup>4</sup>。また、浮遊しているパウダーが、アジュバント様の作用を有するエンドトキシンにより高度に汚染されている可能性も疑われている<sup>5,6</sup>。このような状況から、パウダーが塗布されたラテックス製手袋の使用を禁止する病院も現れ始めた。浮遊微粒子の量を減らすことで、ラテックスアレルギーの発生率が低下すると共に、感作される患者の数も減少

<sup>#1</sup> The views stated in this article are those of the author and do not reflect the official policy of National Institute of Health Sciences and the Ministry of Health and Welfare, Japan.

<sup>#2</sup> To whom correspondence should be addressed: Takeshi Yagami; Kamiyoga 1-18-1, Seatagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-4842; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: yagami@nihs.go.jp

の傾向を示したと報告されている<sup>4,7</sup>。一方、ラテックスアレルゲンを伴ったゴムタイヤの摩耗粉が、幹線道路の周辺に飛散しているという知見も報告された<sup>8,9</sup>。このようにラテックスアレルギーは、天然ゴム製品に接する機会が多い人にとっての驚異となっているだけでなく、浮遊アレルゲンを吸入する恐れがある全ての人にとっての環境汚染という側面も有する。

天然ゴム製品によるアレルギーとしては、接触性の皮膚炎を主な症状とする遅延型（IV型）アレルギーが以前から知られており、ゴムアレルギーと呼ばれている。ゴムアレルギーの原因物質（アレルゲン）は、天然ゴム製品の製造過程で添加される低分子量の化学物質（加硫促進剤あるいは老化防止剤）やその変化体であることが、既に解明されている。一方、ラテックスアレルギーの原因物質は、ゴムの木の樹液に含まれる複数の蛋白質やその変化体であることが、これまでの各国における研究により明らかにされてきた<sup>3,10</sup>。蛋白性のアレルゲンが患者のIgE抗体に結合して架橋構造を形成し、蕁麻疹やアナフィラキシーショックといった症状の発生に至る即時型アレルギーが、ラテックスアレルギーである（Table 1）。しかし、ラテックスアレルゲンの具体的な特徴や、ゴムの木の中におけるそれらの生理的な役割については、現在でも不明な点が多い。

ラテックスアレルギーに関して最も注目すべき点は、交差反応性である<sup>1-3,11</sup>。ラテックスアレルギーの患者がバナナやアボカドといった果物に対してもアレルギー反応を示すケースがあることは、当初の段階から指摘され、

latex-fruit syndrome と呼ばれてきた<sup>12,13</sup>。その後、交差反応性が確認された植物の種類は急増し、果物・野菜・穀類といった植物性食品に限らず、ある種の木の花粉や薬草に対する交差反応例も報告された<sup>14</sup>。現在では、食物アレルギーやアトピー病歴を有する患者も、ラテックスアレルギーのハイリスクグループを形成すると考えられている<sup>1-3</sup>。前述の通り、天然ゴム製品が原因となって発症に至る即時型アレルギーを、ラテックスアレルギーと呼んできた。しかし、50%を超える患者が何らかの植物に対して交差反応性を示す実状から判断すると<sup>12,13</sup>、一般的な植物アレルギーの一断面としてラテックスアレルギーを理解する方が、より正確であると思われる。

ラテックスアレルギーの患者が広範囲な植物に対して交差反応性を示す理由は、植物に普遍的に含まれる、構造の似た蛋白質がラテックスアレルゲンであり交差反応性抗原であるからだと考えられる。しかし、形態学的な分類法によれば、原因となる植物群が近縁種に属しているとはいえない。したがって、具体的にどのような蛋白質がラテックスアレルゲンであり交差反応性抗原になっているのかは、これまで全く解明されていなかった。

著者は、天然ゴム製品の安全性試験や患者の診断法を確立する上で不可欠な、ラテックスアレルゲンの特定化に関する研究を進めてきた。その過程で、患者の大多数が広範囲な植物に対してもアレルギー反応を示すという事実により、早く着目した。そして、植物の生体防御<sup>15,16</sup>に関わるような蛋白質<sup>17-22</sup>は進化の過程で保存されているという知見

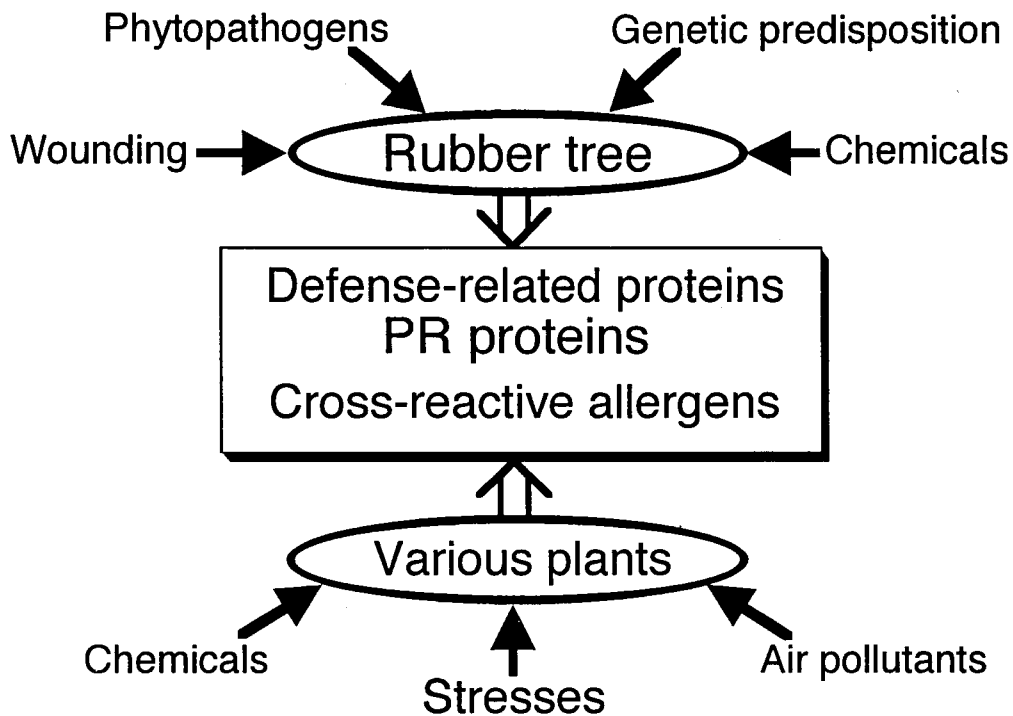


Fig. 1 Relevance of plant defense-related proteins to latex allergy

を考え合わせ、「植物の生体防御蛋白質群がラテックスアレルギーであり、交差反応性抗原である」という仮説を立てた。農園で栽培されているゴムの木は、様々なストレスを受けており、生体防御に関与する蛋白質を多量に誘導していると予想される。また、このような蛋白質がアレルギーであると仮定すると、植物種によらない一定の構造類似性があることから<sup>17-22)</sup>、ラテックスアレルギーに伴う幅広い交差反応性を合理的に説明することができる (Fig. 1)。本稿では、植物の生体防御蛋白質について簡単に解説した後、ラテックスアレルギーと生体防御蛋白質との関連性について、著者らの研究成果<sup>23-33)</sup>を中心に記述する。

## 1. 植物の生体防御

### 1. 1. 生体防御蛋白質<sup>17)</sup>

高等植物は、動物の免疫機構とは全く異なった生体防御システムを有している。病原菌の感染や傷害、重金属や植物ホルモンの適用、干ばつや塩水害、紫外線やオゾンといった生物的・無生物的ストレスを受けた植物は、その身を守るため、一連の生体防御反応 (defense responses) を起こす<sup>15,16)</sup>。この生体防御反応の過程で誘導される蛋白質群が、生体防御蛋白質 (defense-related proteins) である。これまでに知られている様々な生体防御蛋白質は、その生理的な役割や誘導要因から大まかに分類される。一つは、細菌やウイルスが侵入した局所細胞の外壁を強化し、植物体全体への感染を阻止するような働きがある蛋白質群である。このような生体防御蛋白質には、hydroxyproline-rich glycoprotein (extensin) や glycine-rich protein (GRP) が含まれる。もう一つは、植物種に特有な低分子性抗菌物質 (phytoalexin) の生合成に必要とされる酵素群である。抗菌活性を有する植物性レクチン類も、生体防御に関わる蛋白質であると考えられている<sup>34,35)</sup>。そして重要なのは、pathogenesis-related proteins (PR 蛋白質) と従来より呼ばれている一群の生体防御蛋白質である。

### 1. 2. pathogenesis-related proteins (PR 蛋白質)<sup>18-22)</sup>

タバコの葉にウイルスが感染した際に誘導される蛋白質群については、古くから研究が進められてきた。その後、多くの植物種で同様な誘導現象が確認され、このような蛋白質群は感染特異的蛋白質 (pathogenesis-related proteins; PR 蛋白質) と呼ばれるようになった。1992年8月にスイスで開かれた国際会議において、PR 蛋白質とは「病原体が植物に感染し、植物が病的状態あるいはそのような状態に陥ると、宿主である植物から誘導される蛋白質群」と定義された。また、ウイルスや細菌・カビによる感染の他、エチレンなどの植物ホルモンや、キチン・キトサンなど生物に由来する因子で誘導される蛋白質は PR 蛋白質とするが、無生物的なストレスにより誘導される蛋白質は PR 蛋白質とは呼ばないように提唱された。

しかし、無生物的なストレスも、エチレンなど植物ホルモンの発生を促し、PR 蛋白質の誘導要因となることがその後の研究で明らかにされた<sup>20-22)</sup>。また、植物体の特定部位 (根や花粉) に、あるいは成長過程の一時期に、同種の蛋白質が定常的に誘導される場合があることも報告された<sup>18-22,36)</sup>。現在では、生物的・無生物的なストレスを受けた植物に誘導される蛋白質群を指して、包括的に PR 蛋白質と呼んでいることが多いのではないかとと思われる。

PR 蛋白質の誘導量は、比較的大きい。強いストレスが加わった植物では、全蛋白質の十数%を PR 蛋白質が占めるとも言われている<sup>21)</sup>。PR 蛋白質の多くは、5~50 kD の水溶性蛋白質であり、多重遺伝子族によってコードされ、細胞間隙 (apoplast) や液胞に蓄積される傾向がある。さらに PR 蛋白質は、他の植物性蛋白質に比べて酸性溶液中で安定であり、また内因性・外因性の protease 活性に対して抵抗性を示すことが知られている<sup>21)</sup>。このような PR 蛋白質の一般的特徴は、現在までに知られている植物性アレルギーの諸性質に一致する点が多く<sup>37)</sup>、注目に値する。

多くの植物種からこれまでに見いだされた PR 蛋白質は、その血清学的・免疫学的な相関性やアミノ酸配列の類似性、酵素活性の特徴に基づいて、幾つかのファミリーに分類されている。最近推奨されている分類法を<sup>38)</sup>、代表的な蛋白質と共に Table 2 に示す。

PR-1 ファミリーは、15~17 kD の分子量を有する蛋白質群から成る。その生理的な機能は、抗カビ活性を示すとの報告もあるが、依然として不明な点が多い。PR-2 ファミリーは、endo- $\beta$ -1,3-glucanase 活性を示す蛋白質群であり、30~35 kD の分子量を有するものが多い。PR-3 ファミリーは、endochitinase 活性を示す約30 kD の蛋白質群 (クラス I, II, IV chitinases) から成る<sup>39,40)</sup>。クラス I endochitinase は、ゴムラテックスに含まれる hevein という蛋白質に相当するキチン結合領域を<sup>41,42)</sup>、共通して N-末端部に含んでいる。植物に  $\beta$ -1,3-glucanase と endochitinase を同時に発現させると、相乗的に作用し合い、病原菌に対する抵抗性が高まるとされている<sup>40)</sup>。endochitinase 活性と lysozyme 活性を合わせ持つ蛋白質 (クラス III chitinases) は、PR-8 ファミリーに分類されている<sup>43)</sup>。PR-8 ファミリーに属する蛋白質と PR-3 ファミリーに属する蛋白質の間に、アミノ酸配列の相同性は見られない。PR-4 ファミリーに属する蛋白質は、傷を付けたジャガイモに誘導される *win* 遺伝子の翻訳物に類似したアミノ酸配列を有し、*win*-like proteins と呼ばれる<sup>17-22)</sup>。ゴムラテックスに含まれる hevein 前駆体 (prohevein) の C-末端部領域は、PR-4 ファミリーの蛋白質に高い相同性を示す<sup>42)</sup>。PR-5 ファミリーの蛋白質は *thaumatin-like proteins* と呼ばれ、*thaumatin* という甘味蛋白質に類似したアミノ酸配列を特徴とする。このファミリーに属する蛋白質の

配列は、 $\alpha$ -amylase/protease インヒビター類のアミノ酸配列にも類似している。しかし、酵素阻害活性が実際に検出された例は報告されていない。一方、穀類に含まれるアレルゲンの多くが、PR-5 ファミリーの蛋白質や $\alpha$ -amylase/protease インヒビター類に相同なアミノ酸配列を有することは<sup>44)</sup>、注目に値する。植物に塩ストレスを加えた際に誘導される osmotin 類や、トウモロコシの zeamatin という抗カビ蛋白質も、PR-5 ファミリーに属すると考えられている。PR-5 ファミリーに分類される幾つかの蛋白質 (permeatins) は、細胞膜にポアを形成することで抗カビ活性を発現する<sup>22)</sup>。protease 類に対するインヒビター活性を実際に有する植物性蛋白質は、PR-6 ファミリーに分類されている。また、endoprotease 類は PR-7 ファミリーに、peroxidase 類は PR-9 ファミリーに分類されている。PR-10 ファミリーは、ribonuclease 活性を有するような蛋白質で構成される。白樺 (*Betula verrucosa*) 花粉のメジャーアレルゲンとして有名な Bet v 1 も<sup>45,46)</sup>、PR-10 ファミリーに属する蛋白質である。

PR 蛋白質の分類に関して重要な点は、各蛋白質の血清学的・免疫学的な相関性やアミノ酸配列の類似性、酵素活性の特徴が判断材料であり、由来する植物種は顧慮されないという点である<sup>38)</sup>。これは他方で、ストレスが加わった植物に誘導される蛋白質群は、進化の過程で劇的に変化することなく、保存されてきたことを意味している。この植物種を超えた PR 蛋白質の類似性を念頭に置けば、例えば PR-10 ファミリーに属するある蛋白質に対してアレルギー反応を示す患者は、PR-10 ファミリーに属する蛋白質を含む全ての植物に対してもアレルギー反応を示す可能性があると予想される。事実、白樺花粉のアレルゲン (Bet

v 1) に対して感作が成立した患者は、相同な蛋白質 (Bet v 1-related proteins; PR-10 ファミリー) を含む、木や雑草の花粉、植物性食品に対しても、アレルギー反応を示すことが知られている。

### 1. 3. 生体防御反応<sup>15,16)</sup>

高等植物における、生体防御蛋白質の全体的な誘導過程は、以下のようにまとめられる。まず、生物的・無生物的なストレスのシグナルが核に伝わり、生体防御遺伝子 (defense-related genes) の転写が促進される。この遺伝子の翻訳物が、生体防御蛋白質である。extensin や GRP はストレスを受けた局所細胞に誘導され、細胞壁の強化に関与する。peroxidase の一部も、外壁の強化に加わる。細胞内では、phytoalexin の生合成に必要な酵素が誘導される。一方、 $\beta$ -1,3-glucanase や endochitinase, lysozyme, protease inhibitor, ribonuclease といった PR 蛋白質は、侵入してきた病原菌に直接作用すると推測され、その多くは apoplast や液胞内に分泌される。また、糖質加水分解酵素群は、植物や病原菌の細胞壁からオリゴ糖類を遊離させ、生体防御反応に正のフィードバックをもたらす。

植物の生体防御反応は、ストレスを受けた局所における早くて強い反応 (hypersensitive response; HR) に限らない。ストレスのシグナルは遠く離れた細胞にも伝達され、抗菌活性を有するような PR 蛋白質が植物体の各所に誘導される。つまり、一度ストレスを受けた植物は、PR 蛋白質を隈無く誘導し、次のストレスに対して抵抗性を示すようになると考えられる。HR に続くこのような生体防御反応は、systemic acquired resistance (SAR) と呼ばれている<sup>47)</sup>。

PR 蛋白質を誘導することで植物が病原菌に対する抵抗

Table 2. Recommended classification of pathogenesis-related proteins

Family	Type member	Properties
PR-1	tobacco PR-1a	antifungal, 14-17 kD
PR-2	tobacco PR-2	endo- $\beta$ -1,3-glucanases, 31-35 kD
PR-3	tobacco P, Q	type I, II, and IV endochitinases, ~30 kD
PR-4	tobacco R	antifungal, <i>win</i> -like proteins, 13-15 kD
PR-5	tobacco S	antifungal, thaumatin-like, osmotins, zeamatin
PR-6	tomato inhibitor I	protease inhibitors, 6-13 kD
PR-7	tomato P	endoproteases
PR-8	cucumber chitinase	type III chitinases, chitinase/lysozyme
PR-9	lignin-forming peroxidase	peroxidases, peroxidase-like proteins
PR-10	parsley PR-1	ribonucleases, Bet v 1-related proteins
PR-11	tobacco class V chitinase	type V chitinases

性を獲得するならば、このような蛋白質を多く発現する品種は農耕的な価値が高いということになる。従来より行われてきた品種改良の一部は、病原菌に強い変種を生み出すことを目的としてきた。また最近では、PR蛋白質をコードする遺伝子の5'上流域を操作して常時多量に発現させたり、PR蛋白質の遺伝子を新たに導入することで、耐病性を示す植物を作り出そうとする試みが盛んに行われている<sup>48,49)</sup>。さらに、農薬の代わりとしてSARを誘導するような低毒性の物質を散布し、病原菌による被害を未然に防ぐとする発想もある。

前述のように著者は、ストレスの加わった植物に誘導される生体防御蛋白質群、特に植物体全体に誘導される水溶性のPR蛋白質が、ラテックスアレルギーやそれに伴う交差反応の原因物質になっているのではないかと推測した。次に、植物の生体防御蛋白質とラテックスアレルギーとの関連性について記述する。

## 2. ラテックスアレルギーと植物の生体防御蛋白質

### 2. 1. 生体防御蛋白質の誘導

プランテーションで栽培されているゴムの木は、短期間でより多くのゴムラテックスを収穫することができるよう、遺伝的に選択されてきた品種である。そしてこの過程において、生体防御蛋白質を過剰に誘導するような性癖が、追隨して選択されてきた感がある。Kushらは、遺伝的に選択されたゴムの木の、ラテックス生産細胞 (laticifers) を調べた。その結果、ゴムの生合成に関与する酵素の遺伝子及び生体防御遺伝子が、葉部より20~100倍及び10~50倍それぞれ多く発現していたことがわかった<sup>50)</sup>。あるいは、生体防御蛋白質を多く誘導するような品種は、農耕上有利であるため、必然的に選択されてきたのかも知れない。

天然ゴムラテックスは、ゴムの木の幹に螺旋状の傷を付け (tapping)、流れ出る樹液を貯留することにより採取される。しばらくするとラテックスが凝集して傷口を塞ぎ、樹液の流出が停止する。よって、tappingは繰り返し行われることになる。ゴムの木にとっては強いストレスに他ならない。また、ラテックスの流出時間を引き延ばしたり、流出した分の樹液を短期間で生合成させることを目的とし、ethephonという化学物質が度々ゴムの木に投与されている。ethephonは、植物ホルモンの一種であるエチレンを発生させる物質である。したがって、この操作もまた、生体防御蛋白質を多量に誘導させる要因となり得る<sup>51)</sup>。事実、抗菌活性を有するheveinや、chitinase活性を有するラテックス蛋白質の発現量が、ethephonで処理することにより著しく増加したという結果が報告されている<sup>52)</sup>。またethephon処理に限らず、ゴムの木を傷付けたり abscisic acidで処理した場合にも、hevein類をコードする遺伝子の転写量が5倍程度に増加したと報告されている<sup>53)</sup>。

以上のような状況から、農園で栽培されているゴムの木から得られたラテックスには、植物の生体防御蛋白質、特に水溶性のPR蛋白質が多量に含まれているのではないかと推測される。そこで著者は、市販されている天然ゴム製品や、その直接の製造原料であるアンモニアラテックスから、植物の生体防御に関与するような蛋白質が実際に抽出されるかどうかを調べることにした。

### 2. 2. ラテックス抗原の分離とその性質

#### a) 生体防御蛋白質の検出<sup>24)</sup>

市販されている代表的な天然ゴム製品として、家庭用及び手術用の手袋を選び、約1cm<sup>2</sup>の薄片に切断した。次に、ゴムの薄片1gあたり5mlのリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) を加え、室温で2時間振とうすることにより各手袋の抽出液を調製した。天然ゴム製品の直接の製造原料であるアンモニアラテックスの抽出液や、天然ゴムラテックス (ノンアンモニアラテックス) の抽出液も、同様に調製した。各抽出液中に植物の生体防御蛋白質が存在するかどうかは、PR蛋白質に特徴的な酵素の活性を測定することにより判断した。

その結果、植物の生体防御に直接関与すると考えられる lysozyme (EC 3.2.1.17) や endochitinase (EC 3.2.1.14)、 $\beta$ -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6 あるいは EC 3.2.1.39) の活性が、全ての抽出液中に検出された。また、生体防御との関連性が明確ではないものの、carboxylesterase (EC 3.1.1.1) の活性も、全ての抽出液中に検出された。さらに天然ゴムラテックスの抽出液には、上記四種の酵素活性に加えて、ribonucleaseの活性や、アルカリ性 protease に対するインヒビターの活性が検出された<sup>28)</sup>。

続いて、検出された各酵素が、文献<sup>54)</sup>に記載されているラテックスアレルギー群に類似した特徴を有するかどうかを、熱安定性及び非変性条件下における分子量という面から調べた。各酵素の熱安定性は、アンモニアラテックスの抽出液を100℃で20分間処理した後、残存する酵素活性を測定することにより判断した。非変性条件下における分子量は、アンモニアラテックスの抽出液をゲルろ過カラムに添加し、各酵素の溶出液量を標準蛋白質の溶出液量と比較することにより求めた。

その結果、アンモニアラテックスに含まれる lysozyme, endochitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase は、いずれも25~45 kDの蛋白質であることがわかった。一方、非変性条件下における carboxylesterase の分子量は、60 kD以上であった。また、アンモニアラテックスの抽出液を加熱処理した後も、lysozyme, endochitinase 及び  $\beta$ -1,3-glucanase の活性が明確に検出された。こうした各酵素の熱安定性や分子量は、ラテックスアレルギーの特徴に良く一致した<sup>24,54)</sup>。

以上のように、ゴムラテックスから調製した全ての抽出液中に、植物の生体防御に関与すると考えられる複数の酵

素活性が検出された。また、これらの酵素が、ラテックスアレルゲンに類似した特徴を有することも明らかになった。そこで、各酵素を分離精製し、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体によって特異的に認識される、ラテックス抗原であるかどうかを調べることにした。

#### b) 家庭用手袋に含まれる lysozyme<sup>23,25)</sup>

家庭用手袋の抽出液から lysozyme 活性を有する塩基性蛋白質を分離し、果物や野菜に含まれる lysozyme に類似した特徴を有するかどうかを確認した。また、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体によって特異的に認識される、ラテックス抗原の一つであるかどうかを調べた。

まず、家庭用手袋の抽出液に70%飽和度になるまで硫酸アンモニウムを加え、溶解していた蛋白質を塩析した。次に、*Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体に対する溶菌活性を指標にしながら、カルボキシメチルセルロースカラムを用いる陽イオン交換クロマトグラフィー、続いて、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、lysozyme を分離した。約800gの家庭用手袋から、5.2mgの塩基性 lysozyme を得ることができた。

二段階のクロマトグラフィーで精製した lysozyme は、逆相 HPLC においてほぼ単一のピークとして検出された。また、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) では分子量約27 kDの単一バンドとして、等電点電気泳動 (IEF) では pI (isoelectric point) 約9.5のマルチプルバンドとして検出された。なお、手術用手袋やアンモニアラテックスの抽出液を SDS-PAGE や IEF で分析した場合も、分離した lysozyme と同じ位置に蛋白質のバンドが検出された。各抽出液に含まれる蛋白質のほとんどは、ランダムに分解されているようであり、SDS-PAGE や HPLC での分析が困難であった。著者が分離した lysozyme は、SDS-PAGE に続く色素染色で検出することができる、数少ないバンドの一つであった。

この塩基性 lysozyme は、イオン強度0.03の酢酸緩衝液中で *Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体を基質とした場合、pH 4.4及び70°Cにおいて最大活性を示した。また、反応溶液のイオン強度が小さくなるにつれて、その溶菌活性が強くなる傾向が認められた。さらに、lysozyme 活性に対する各種阻害剤の影響を調べた結果、histamine が0.02 Mで約60%という強い阻害効果を示すのに比べ、*N*-acetyl-D-glucosamine の阻害効果は0.4 Mで約20%と非常に弱いことがわかった。またこの蛋白質は、コロイド状キチンやグリコールキチンに対して endochitinase 活性を示した。塩基性 lysozyme のこういった諸性質は、パパイヤやイチジクといった植物に含まれる chitinase/lysozyme の特徴に、良く一致した<sup>25,40)</sup>。しかし、卵白に含まれる lysozyme の特徴とは、かなり異なっていた。

次に、分離した lysozyme の抗原性を、ラテックスアレ

ルギー患者の血清を用いるイムノブロッティングで調べた。まず、各種の抽出液と分離した酵素を SDS-PAGE に適用した後、ニトロセルロース膜に転写し、非結合域をブロッキングした。続いて、5分の1の濃度に希釈した各血清に膜を浸し、室温で一晩保った。最後に、即時型アレルギーの原因となり得る IgE 結合性蛋白質を、抗ヒト IgE 抗体を用いて検出し、膜上の蛋白質を色素染色した結果と比較した。ラテックスアレルギー患者の血清としては、国内の病院から提供された2サンプルを用いた。また対照実験には、アレルギー病歴のない健康人から採取した血清(1サンプル)を使用した。

その結果、いずれのラテックスアレルギー患者の血清を使用した場合にも、分離した塩基性 lysozyme が、IgE 抗体が認識する蛋白質の一つとして検出された。一方、健康人の血清を用いて行った対照実験では、IgE 抗体が結合した蛋白質のバンドは全く検出されなかった。よってこの塩基性 lysozyme が、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体によって特異的に認識される、ラテックス抗原の一つであることが明らかになった。

#### c) アンモニアラテックスに含まれる carboxylesterase<sup>26)</sup>

アンモニアラテックスの抽出液から carboxylesterase を分離し、この酵素がゴムの木の生体防御に関与するような蛋白質であるかどうかを調べた。また、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体によって特異的に認識される、ラテックス抗原の一つであるかどうかを確認した。

まず、アンモニアラテックスの抽出液に70%飽和度になるまで硫酸アンモニウムを加え、蛋白質を塩析した。次に、*p*-nitrophenyl acetate に対する carboxylesterase 活性を指標にしながら、DEAE セルロースカラムを用いる陰イオン交換クロマトグラフィー、続いて、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、carboxylesterase を分離した。500 ml のアンモニアラテックスから、700 µg の carboxylesterase を得ることができた。アンモニアラテックスから抽出される蛋白質は、ほとんどがランダムに分解されているようであり、通常的手法による分析が困難であった。著者が分離した carboxylesterase は、平板ゲル電気泳動法で検出することができる、数少ないバンドの一つであった。

分離した酵素は、非変性条件下において約80 kDの分子量を有していた。この酵素を Davis 法による PAGE に適用後、銀染色した結果、単一のバンドとして検出された。またそのバンドの位置は、esterase の活性染色により検出されたバンドの位置に一致した。以上の結果は、carboxylesterase が非変性条件下での電気泳動法的に単一になるまで精製されたことを示すものであると考えられた。一方、この酵素を変性条件下での電気泳動法である SDS-PAGE に適用したところ、45 kDのバンドをメインとして、複数のバンド(14, 16, 24, 25, 28, 39 kD)が検出された。

また、IEF では pI 4.2~5.2 のマルチプルバンドとして検出された。一連の分析結果は、この carboxylesterase が複数のユニットからなる高次構造体として存在することを示すものであると推測された。

次に、*p*-nitrophenyl acetate を基質に用い、分離した蛋白質の安定性や esterase 活性の特徴について調べた。この酵素は酸性からアルカリ性の広い pH 域にわたって安定であり、各 pH の溶液中に 20°C で 30 分間保った後でも、esterase 活性が明確に検出された。また、pH 7.1 の Tris-塩酸緩衝液中では、60°C で 30 分間までの熱処理に対して安定であった。この蛋白質が esterase 活性を示す最適温度は、pH 7.1 の溶液中における 10 分間の反応という条件では 60°C であった。また、30°C における 10 分間の反応という条件での最適 pH は、7.1 であった。

一方、この加水分解酵素の基質選択性を検討した結果、様々な脂肪酸の *p*-nitrophenyl ester に対して carboxylesterase 活性を示す他、牛血清アルブミンに対して非常に弱い protease 活性を示すことがわかった。また、この蛋白質の carboxylesterase 活性は、セリン残基やヒスチジン残基、カルボキシル基の修飾剤により阻害されたが、チオール基の修飾剤では阻害されなかった。

続いて、アンモニアラテックスから分離した carboxylesterase の生化学的な特徴とアミノ酸組成比を、ゴムの木に由来する esterase として文献<sup>55)</sup>に記載されている hevain *a*, *b*, *l* のデータと比較し、その生理的な役割について推量した。その結果この酵素は、ゴムの木の lutoids という器官から分離された hevain *l* に、最も類似していることがわかった。lutoids は液胞に相当する器官であり、PR 蛋白質が蓄積する場所でもある<sup>56)</sup>。しかし、分離した carboxylesterase と hevain *l* が、全ての点で一致しているというわけではなかった。したがって、この酵素がゴムの木の生体防御に関与するような蛋白質であるかどうかを、明らかにすることはできなかった。

分離した carboxylesterase の抗原性は、ラテックスアレルギー患者の血清を使用するイムノブロッティングで調べ

た。まず、精製した酵素を非変性条件下での Davis 法による PAGE あるいは SDS-PAGE に適用した後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。次に、膜を適当な大きさに切り分け、一部をコロイダルゴールド法による蛋白質検出に、別の一部を esterase の活性染色に、残りをイムノブロッティングに用いた。ラテックスアレルギー患者の血清としては、国内の病院から提供された 2 サンプルを用いた。また対照実験には、アレルギー病歴のない健常人から採取した血清 (1 サンプル) を使用した。

その結果、Davis 法による PAGE に続くイムノブロッティングでは、ラテックスアレルギー患者の血清に浸した PVDF 膜にのみ、IgE 結合性蛋白質の単一バンドが検出された。しかもそのバンドの位置は、コロイダルゴールド法で検出された蛋白質のバンドや、esterase の活性染色で得られたバンドの位置に一致した。この結果は、アンモニアラテックスから分離した carboxylesterase が、患者血清中の IgE 抗体により特異的に認識される、ラテックス抗原の一つであることを示すものである。また、SDS-PAGE に続くイムノブロッティングでも、carboxylesterase の構成ユニット、特に 45 kD と 39 kD の蛋白質が、IgE 結合性蛋白質のバンドとして強く検出された。一方、健常人の血清を用いて行った対照実験では、IgE 抗体が結合した蛋白質のバンドは全く検出されなかった。一連の実験結果から、esterase 活性を保持する非変性状態の蛋白質のみならず、変性条件下で解離したその構成ユニットも、ラテックス抗原の一つであることが明らかになった。

#### d) 天然ゴムラテックスに含まれる $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase/lysozyme 及び carboxylesterase<sup>32)</sup>

ラテックス製手袋やその製造原料であるアンモニアラテックスに含まれる蛋白質は、生産工程で添加された様々な化学物質により修飾されている可能性がある。また、製造原料がアンモニアルカリ性の溶液として長期間保存されることから、含まれている蛋白質が部分的に変化している可能性も高い。そこで、ゴムの木の樹液 (ノンアンモニアラテックス) から三種の加水分解酵素を分離し、その性質

Determined sequence	F	D	E	N	X	K	Q	X	E	V	-	E	K	H	F	G	L	F	F	P	D
$\beta$ -1,3-Glucanase from																					
Rubber tree	.	.	.	.	K	.	.	P	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tobacco	.	.	.	.	E	.	.	G	.	I	T	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	N
Green pea	.	.	.	.	Q	.	S	P	.	L	-	.	.	.	.	.	V	.	Y	.	N
Potato	.	.	.	.	N	.	N	P	.	L	-	.	.	.	.	.	.	.	S	.	N

Fig. 2 Amino acid sequences of plant  $\beta$ -1,3-glucanase. The N-terminal sequence of a peptide obtained from the BrCN cleavage of latex  $\beta$ -1,3-glucanase is shown at the top. Several residues expressed by X were not strictly determined. This sequence is compared with that of  $\beta$ -1,3-glucanase from various plants. Dots indicate the same amino acid residue as the determined sequence, and dashes are introduced for the maximum similarity.

や部分アミノ酸配列を調べることにした。さらに、ラテックスアレルギー患者やアトピー患者の血清を用い、各酵素の抗原性について検討した。

ゴムの木 (*Hevea brasiliensis*, clone RRIM 600) の樹液は、The Rubber Research Institute of Malaysia より購入した。まず、樹液の固まりを圧搾して得た溶液に硫酸アンモニウムを飽和させ、溶解していた蛋白質を塩析した。次いで、生成した沈殿を吸引ろ過で集め、ゲルろ過カラムを用いて脱塩した。このようにして得た粗ラテックス蛋白質から、 $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase/lysozyme 及び carboxylesterase を精製した。

$\beta$ -1,3-glucanase 活性を有する蛋白質は、laminarin に対する酵素活性を指標にしながら分離した。まず、粗ラテックス蛋白質を炭酸塩緩衝液 (20 mM, pH 10.5) に溶解し、同緩衝液で平衡化させた陰イオン交換樹脂のカラムに添加した。その結果、 $\beta$ -1,3-glucanase 活性を有する蛋白質は、素通り画分に回収された。この  $\beta$ -1,3-glucanase 画分を SDS-PAGE で分析したところ、三本のバンド (35, 36.5, 38 kD) が検出された。非変性条件下における PAGE でも、複数のバンドが検出された。しかし、そのほとんど全てが、 $\beta$ -1,3-glucanase の活性染色で検出されたバンドの位置に一致した。この結果から、SDS-PAGE で検出された三本のバンドは、不純物に由来するものではなく、ゴムの木の塩基性  $\beta$ -1,3-glucanase がイソ酵素群として存在することを示すものであると判断した。

次に、塩基性  $\beta$ -1,3-glucanase のイソ酵素群をそのまま Edman 分解法によるシークエンス解析に適用し、N-末端アミノ酸配列の決定を試みた。その結果、アミノ酸誘導体は全く検出されず、イソ酵素群の N-末端は一様にブロックされていることがわかった。そこで、イソ酵素群を 70% ギ酸に溶解し、約 1% の濃度になるようにプロモシアンを加え、暗所にて室温で 18 時間反応させた。逆相 HPLC で精製した断片化ペプチドの一つについて N-末端シークエ

ンス解析を行ったところ、Fig. 2 に示すような配列が決定された。この配列は、既に登録されていたラテックスアレルゲン Hev b 2 の配列に<sup>57,58)</sup>、構成アミノ酸を正確に決定できなかった X の位置を除いて完全に一致した。また、データベースを用いて相同なアミノ酸配列を有する蛋白質を検索した結果、タバコやエンドウ、ポテトといった植物に由来する  $\beta$ -1,3-glucanase が、類似した配列を有することが明らかになった (Fig. 2)。

chitinase/lysozyme 活性を有する蛋白質は、家庭用手袋に含まれる塩基性 lysozyme の場合と同様な操作により分離し、逆相 HPLC を用いてさらに精製した。得られた chitinase/lysozyme (29.6 kD) の N-末端アミノ酸配列は、ゴムの木から既に単離されていた hevine の配列に<sup>59)</sup>、X の位置を除いて完全に一致した (Fig. 3)。さらに、相同なアミノ酸配列を有する蛋白質を検索した結果、ツタやブドウ、クレソン、キュウリ、アズキ、タバコ、ひよこ豆といった植物に由来する chitinase/lysozyme が、非常に類似した配列を有することが明らかになった (Fig. 3)。

carboxylesterase 活性を有する蛋白質は、アンモニアラテックスに含まれる carboxylesterase の場合と同様な操作により分離し、陰イオン交換 HPLC を用いてさらに精製した。得られた酵素は、アンモニアラテックスから分離した carboxylesterase に類似した性質を有し<sup>20)</sup>、SDS-PAGE では 44 kD をメインとした複数のバンドとして、IEF では pI 約 4.6 のマルチプルバンドとして検出された。続いて、メインバンド (44 kD) の N-末端シークエンス解析を試みたが、有意な情報を得ることができなかった。そこで、 $\beta$ -1,3-glucanase の場合と同様な手順により、プロモシアン分解を行った。しかし、純度の高い断片化ペプチドを得ることはできなかった。

各酵素の抗原性は、ラテックスアレルギー患者の血清とアトピー患者の血清を用い、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) とイムノブロットングで調べた。ELISA

Determined sequence	G	G	I	A	I	Y	W	G	Q	N	G	N	E	G	T	L	T	Q	T	X	S	T	R	K	Y
Chitinase/lysozyme from																									
Rubber tree	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
Ivy	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	N	.	G	.
Vine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	N	.	G	.
Cress	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	S	A	.
Cucumber	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	A	S	.
Azuki bean	.	.	.	.	S	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	A	D	A
Tobacco	.	D	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	A	D	.
Chickpea	-	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	Q	D	A

Fig. 3 Amino acid sequences of plant chitinase/lysozyme. The N-terminal sequence of latex chitinase/lysozyme is presented at the top. Refer to legend of Fig. 2 for description.



法では、各酵素をプレートに固定した後、非結合域をブロッキングし、10分の1の濃度に希釈した各血清を加えて室温で一夜保った。プレート上の酵素に結合したIgE抗体は、抗ヒトIgE抗体を用いて検出した。イムノブロッティングでは、まず各酵素をSDS-PAGEに適用した後、PVDF膜に転写し、非結合域をブロッキングした。続いて、PVDF膜を短冊状に切断した後、10分の1の濃度に希釈した各血清に浸し、室温で一夜保った。最後に、IgE抗体が結合した蛋白質のバンドを、抗ヒトIgE抗体を用いて検出した。ラテックスアレルギー患者の血清としては、日本国内の病院から提供された血清と PlasmaLab International (Everett, Wash.) から購入した血清の、計15サンプルを用いた。さらに、ラテックスアレルギーとは診断されなかったものの、ラテックス蛋白質に対するIgE抗体の陽性反応が認められた食物アレルギー患者の血清(7サンプル)は、アトピー患者の血清として区別し、ELISAとイムノブロッティングに用いた。また対照実験には、アレルギー病歴のない健康人の血清(6サンプル)と、IgE myeloma serum(1サンプル)を使用した。

その結果、 $\beta$ -1,3-glucanase イソ酵素群に対するIgE抗

体の陽性反応が認められたサンプルの数は、ラテックスアレルギー患者の血清で6/15(イムノブロッティング及びELISA)であり、アトピー患者の血清では5/7(イムノブロッティング)あるいは4/7(ELISA)であった(Fig. 4A)。 $\beta$ -1,3-glucanase イソ酵素群のイムノブロッティングでは、分子量の大きい二本のバンド(36.5 kDと38 kD)がIgE結合性蛋白質として検出され、分子量が最も小さい35 kDのバンドは検出されなかった。塩基性 chitinase/lysozyme に対するIgE抗体の陽性反応が認められたサンプルの数は、ラテックスアレルギー患者の血清で4/15(イムノブロッティング)あるいは2/15(ELISA)であり、アトピー患者の血清では1/7(イムノブロッティング及びELISA)であった(Fig. 4B)。さらに、carboxylesterase に対するIgE抗体の陽性反応が認められたサンプルの数は、ラテックスアレルギー患者の血清で6/15(イムノブロッティング)あるいは10/15(ELISA)であり、アトピー患者の血清では5/7(イムノブロッティング及びELISA)であった(Fig. 4C)。一方、対照実験では、どの酵素に対するIgE抗体の結合も全く認められなかった。以上の結果から、天然ゴムラテックスより分離した三種の加水分解酵素が、ラ

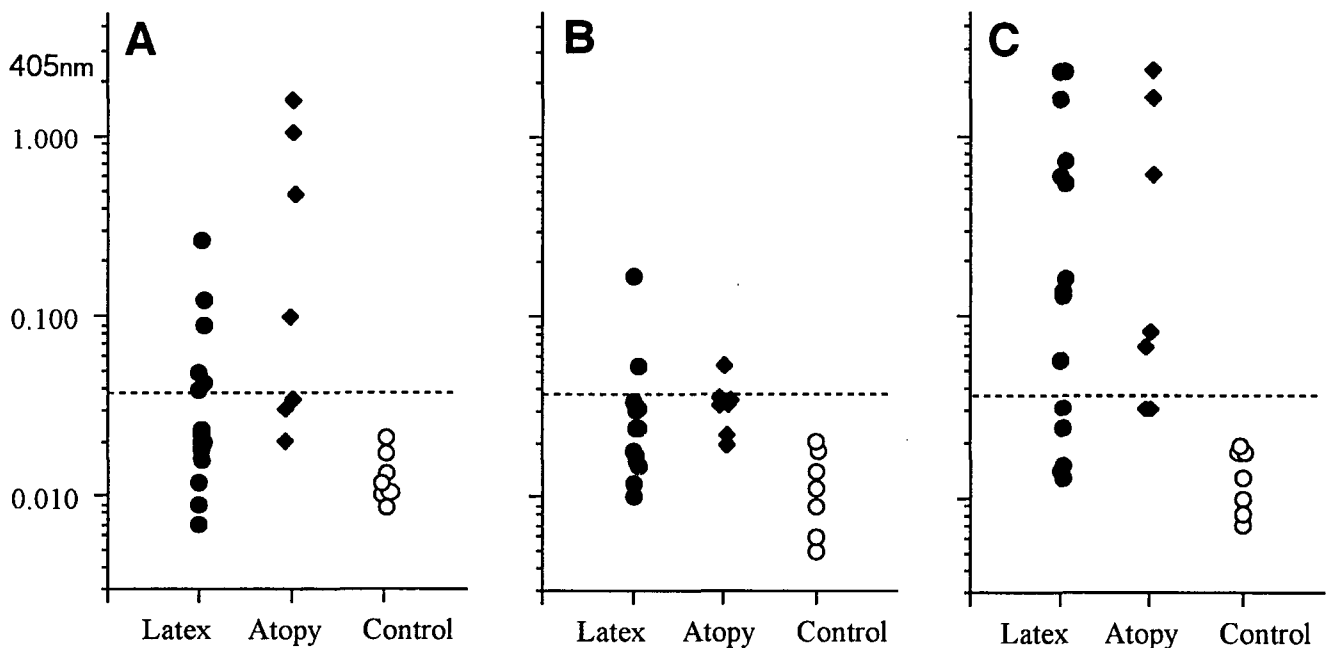


Fig. 4 ELISA of specific antibody (IgE) to  $\beta$ -1,3-glucanase (A), chitinase/lysozyme (B), and carboxylesterase (C). Antigens were adsorbed onto microtiter plates by incubating overnight at room temperature. Following blocking of the unoccupied sites, diluted serum (1:10) was poured into the respective wells and incubated overnight. Each serum was donated by latex -allergic people (*Latex*) or by atopic subjects (*Atopy*) who had IgE antibodies to crude latex proteins but had subjective symptoms to vegetable foods rather than to latex. In the control experiments (*Control*), each serum from healthy individuals or IgE myeloma serum was used. The IgE antibodies binding to the antigens were then reacted with phosphatase-labeled goat anti-human IgE for 1 hour. After complete washing, *p*-nitrophenyl phosphate solution was added to every well. The color development was continued for 2 hours, and the absorbance at 405 nm was measured. Every assay on a serum was done in triplicate and averaged. Border line (*broken line*) was arbitrarily set at 0.036 for definition of IgE-positive sera. This blank-subtracted absorbance corresponds to the mean + 5  $\times$  SD of all the control sera.

テックスアレルギー患者やアトピー患者のIgE抗体により認識される、ラテックス抗原であることがわかった。また、一部の患者に対するプリックテストや、ヒスタミン遊離テストの結果から、三種の酵素が実際にアレルギーを引き起こす蛋白質であることも示された<sup>30)</sup>。

#### e) $\beta$ -1,3-glucanaseの糖鎖部分が抗原性に果たす役割<sup>20)</sup>

天然ゴムラテックスから分離した $\beta$ -1,3-glucanaseイソ酵素群の部分アミノ酸配列は、ラテックスアレルゲンHev b 2の配列に一致した (Fig. 2)。Hev b 2の全配列中には、糖鎖結合のコンセンサス部位が一箇所だけ存在する<sup>58)</sup>。著者は、このコンセンサス部位に結合する糖鎖構造の違いにより、 $\beta$ -1,3-glucanaseがSDS-PAGEで三本のバンド (35, 36.5, 38 kD) として検出されるのではないかと考えた。そこで、 $\beta$ -1,3-glucanaseイソ酵素群をconcanavalin Aのアフィニティークロマトグラフィーに適用し、糖鎖を有する蛋白質であるかどうかを調べると共に、糖鎖構造の違いに基づく各イソ酵素の分離を試みた。

まず、天然ゴムラテックスから分離した $\beta$ -1,3-glucanaseイソ酵素群(G)を、塩化ナトリウム(1M)を含む酢酸緩衝液(50 mM, pH 6.0)に溶解し、同緩衝液で平衡化させたconcanavalin A-agaroseカラムに添加した。親和性を示さなかった蛋白質(GⅢ)に続き、弱く結合した糖蛋白質(GⅠ)を同緩衝液で溶出させ、さらにmethyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (0.3 M) を含む同緩衝液で強く結合した糖蛋白質(GⅡ)を溶出させた。次いで、このようにして得た三種のイソ酵素(GⅠ, GⅡ, GⅢ)を、分離前の $\beta$ -1,3-glucanaseイソ酵素群(G)と共にSDS-PAGEに適用し、PVDF膜に転写した。各イソ酵素が糖鎖を有する蛋白質であるかどうかは、膜上の全蛋白質をコロイダルゴールド法で検出した結果と、糖鎖を特異的に検出した結果とを比較することにより確認した。また、各イソ酵素の抗原性を、ラテックスアレルギー患者の血清を用いるイムノブロッティングで調べた。

SDS-PAGEによる分析の結果、GⅢは35 kDのバンドに、GⅠは36.5 kDのバンドに、GⅡは38 kDのバンドに相当することがわかった (Fig. 5)。concanavalin Aに親和性を示したことから、GⅠとGⅡは糖蛋白質であることが予想されたが、この予想は糖鎖を特異的に検出した結果からも支持された (Fig. 5)。さらに、糖鎖を有するGⅠとGⅡはラテックスアレルギー患者のIgE抗体により認識されるが、糖鎖を持たないGⅢはほとんど認識されることがわかった (Fig. 5)。一方、健常人のプール血清やIgE myeloma serumを用いて行った対照実験では、いずれのイソ酵素もIgE結合性蛋白質としては検出されなかった (Fig. 5)。以上の実験結果から、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体による $\beta$ -1,3-glucanaseの特異的な認識に、この酵素の糖鎖部分が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

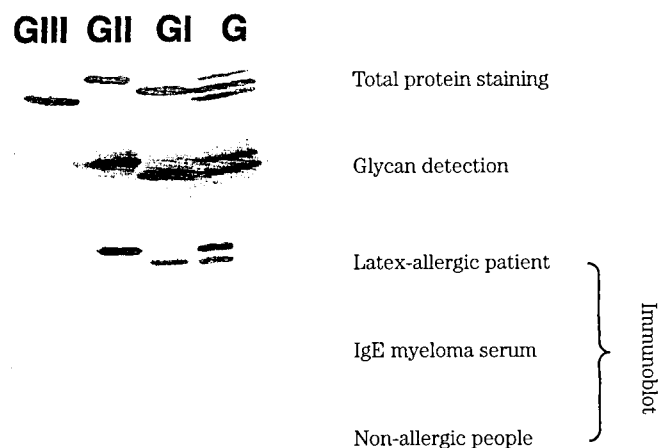


Fig. 5 SDS-PAGE and immunoblotting of  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzymes. The basic  $\beta$ -1,3-glucanases (GI, GII, and GIII) were applied to SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane, and subjected to the respective analyses. The first column represents the total protein staining with colloidal gold. In the second column, glycoproteins were specifically detected. The lower three columns indicate the results of immunoblotting where the proteins recognized by the IgE antibodies were immunochemically detected. Lane G corresponds to the partially purified latex  $\beta$ -1,3-glucanase from which the isoenzymes were separated by affinity chromatography on concanavalin A-agarose.

抗原認識に果たす糖鎖部分の役割を確認するため、各イソ酵素を過ヨウ素酸ナトリウムで処理して糖鎖構造を酸化分解し<sup>60)</sup>、IgE抗体の結合性に変化が現れるかどうかを調べた。まず、GⅠ, GⅡ及びGⅢをELISA用のプレートに固定した後、20 mMの過ヨウ素酸ナトリウムを含む酢酸緩衝液(0.1 M, pH 6.0)を加え、室温で6時間保った。過ヨウ素酸ナトリウムを含まない酢酸緩衝液(0.1 M, pH 6.0)を加える対照実験も、並行して行った。続いて、非結合域をブロッキングした後、10分の1の濃度に希釈したラテックスアレルギー患者の各血清 (PlasmaLab International から購入, 13サンプル) を加え、室温で一晩保った。最後に、プレート上の抗原に結合したIgE抗体を、抗ヒトIgE抗体を用いて検出した。

その結果、GⅠやGⅡの糖鎖構造を酸化分解すると、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体によりほとんど認識されなくなることがわかった。また、糖鎖構造を持たないGⅢは、酸化処理の有無に関わらず、IgE抗体によりほとんど認識されなかった。以上の実験結果から、ラテックスアレルギー患者のIgE抗体による塩基性 $\beta$ -1,3-glucanaseの特異的な認識に、この酵素の糖鎖部分が重要な役割を果たすことが明らかになった。

#### 2. 3. ラテックスアレルゲンとしての生体防御蛋白質

著者は、ラテックスアレルギーの患者が様々な植物性食

品や花粉に対してもアレルギー反応を示すことに着目し、「植物の生体防御蛋白質群がラテックスアレルゲンであり、交差反応性抗原である」という仮説を立てた。そしてこの仮説の検証を通し、ラテックスアレルゲンの特定化を試みた<sup>27,28,33</sup>。ラテックス製手袋やアンモニアラテックスの抽出液を分析したところ、植物の生体防御に関与すると考えられる酵素が一様に検出された<sup>24</sup>。この結果は、天然ゴム製品に植物の生体防御蛋白質群が広く含まれていることを示すものであると考えられる。さらに、家庭用手袋から分離した chitinase/lysozyme やアンモニアラテックスから分離した carboxylesterase、天然ゴムラテックスから精製した上記二種の酵素と  $\beta$ -1,3-glucanase の全てが、ラテックスアレルギー患者の IgE 抗体により特異的に認識された。一連の実験結果は、ゴムの木に誘導された植物の生体防御蛋白質群が、ラテックスアレルゲンの構成要素となっている可能性を、強く示すものであると考えられる。

天然ゴムラテックスから分離した塩基性  $\beta$ -1,3-glucanase の部分アミノ酸配列は、既に登録されていたラテックスアレルゲン Hev b 2 (34, 36 kD; pI 9.5) の配列<sup>56</sup>に一致した (Fig. 2)。また、この酵素の N-末端はブロックされていたが、Hev b 2 の N-末端もブロックされていたと報告されている<sup>57</sup>。したがって、アミノ酸配列から判断する限り、著者が分離した塩基性  $\beta$ -1,3-glucanase とラテックスアレルゲン Hev b 2 は、同一物であると考えられる。このアレルゲンを最初に報告した The Rubber Research Institute of Malaysia のグループも、Hev b 2 が  $\beta$ -1,3-glucanase 活性を有していたことを確認している<sup>57</sup>。しかし彼らの報告では、Hev b 2 が  $\beta$ -1,3-glucanase 活性を有することが予想された経緯について、全く言及されていない。著者は、 $\beta$ -1,3-glucanase が植物の生体防御に深く関わる酵素 (PR-2 ファミリー) であることに基づいて分離を進めた。そしてこの酵素が、ラテックスアレルギー患者の IgE 抗体により認識される、ラテックス抗原の一つであることを実証した。仮説を検証する目的で分離した蛋白質が、全く独立に特定化されたアレルゲンと同一物であったという結果は、当初に立てた仮説の正当性を強く支持するものであると考えられる。

多くの植物病原菌の細胞壁には、 $\beta$ -1,3-glucan が含まれている。したがって、植物に誘導される  $\beta$ -1,3-glucanase のある部分は、このような病原菌に対して生体防御の役割を果たす蛋白質ではないかと古くから考えられてきた<sup>18-21</sup>。また、ストレスが加わった多種の植物に、血清学的に類似した  $\beta$ -1,3-glucanase が誘導されることも知られている。実際、断片化ペプチドのアミノ酸配列に類似した配列を有する蛋白質を検索したところ、幾つかの植物に由来する  $\beta$ -1,3-glucanase がリストアップされた (Fig. 2)。この結果は、天然ゴムラテックスに含まれていた  $\beta$ -1,3-glucanase が、

ゴムの木の生体防御に関与する蛋白質であったことを示唆している。また、様々な植物に誘導される構造の似た  $\beta$ -1,3-glucanase が、交差反応をも引き起こすアレルゲンになる可能性を示すものであると考えられる。

一方、ラテックスアレルギー患者の IgE 抗体により  $\beta$ -1,3-glucanase が強く認識されるためには、糖鎖構造を有することが必要であった (Fig. 5)。IgE 抗体による抗原認識に糖蛋白質の糖鎖部分が重要な役割を果たす例は、これまでも報告されている<sup>61</sup>。今後、患者の IgE 抗体が  $\beta$ -1,3-glucanase の糖鎖だけを認識しているのか、あるいは糖鎖を含めた立体構造を認識しているのかを、解明する必要があると思われる<sup>60,61</sup>。また、この糖鎖の詳細な構造を解析することにより、植物性糖蛋白質に特有な complex glycan が、ラテックスアレルギーに伴う幅広い交差反応性に寄与しているのかどうかという点についても<sup>62</sup>、明らかにすることができると期待される。さらに Churugchow らは、 $\beta$ -1,3-glucanase の中でも糖鎖を多く有するイソ酵素がゴムの木の生体防御に深く関わっているという見方を報告しており<sup>63</sup>、植物の生体防御蛋白質とラテックスアレルギーの関連という観点からも興味を持たれる。

ところで、糖蛋白質の糖鎖部分 (cross-reactive carbohydrate determinants; CCD) が B-cell エピトープである場合、細胞膜上で IgE 抗体の架橋構造が形成されることはなく、アレルギー症状の発現には至らないという理解が一般的である<sup>64,65</sup>。他方、糖鎖エピトープだけでアレルギー症状が誘発される例も知られている<sup>66</sup>。したがって、Hev b 2 の真のアレルゲン性については、単離した酵素を用いてヒスタミン遊離テストやプリックテストを繰り返し、慎重に検討する必要があると思われる。

天然ゴムラテックスから分離した chitinase/lysozyme の N-末端アミノ酸配列は、ゴムの木から既に単離されていた hevine (29.6 kD; pI 9.5) の配列に一致した (Fig. 3)。hevine は、ゴムの木の生体防御に関わることが以前から指摘されている chitinase/lysozyme である<sup>59,67</sup>。植物に対する病原菌の中には、lysozyme の基質となるような外壁構造を持つ細菌や、細胞壁にキチン構造を有するカビが含まれる。したがって、植物に誘導される chitinase/lysozyme は、このような病原菌に対して生体防御の役割を果たす蛋白質ではないかと古くから考えられてきた<sup>49</sup>。植物体内にこの酵素の基質となる分子が存在しないことも、生体防御蛋白質であることを裏付ける一因となっている。また、ストレスを受けた多種の植物に、血清学的に類似した chitinase/lysozyme が誘導されることも知られている。実際、決定された N-末端アミノ酸配列に類似した配列を有する蛋白質を検索したところ、多くの植物に由来する chitinase/lysozyme がリストアップされた (Fig. 3)。こうしたアミノ酸配列の類似性から、多種の植物に誘導される chitinase/

lysozyme が交差反応をも引き起こすアレルゲンとなる可能性が、 $\beta$ -1,3-glucanase の場合と同様に疑われる。Lavaud らも、天然ゴムラテックスに含まれる30 kD の lysozyme が交差反応性アレルゲンである可能性を指摘している<sup>68,69</sup>。

一方, carboxylesterase を構成するサブユニット(44 kD) のN-末端は、ブロックされている可能性が高かった。Beezhold らも同程度の分子量を有するラテックスアレルゲン Hev b 7 (46 kD; SDS-PAGE) を報告しているが、そのN-末端はブロックされていなかった<sup>11,70</sup>。Hev b 7 の部分アミノ酸配列は、ポテトに含まれる patatin という蛋白質に類似していたと報告されている<sup>11,70</sup>。patatin はセリン残基が重要な役割を果たす加水分解酵素であり、esterase 活性や lipid acyl hydrolase 活性を示す。さらに、害虫の成長を阻害するような生体防御蛋白質としての働きがあることも知られている<sup>71</sup>。このような状況から、Hev b 7 もゴムの木の生体防御に関わる蛋白質であると推測されるに至っている<sup>72,73</sup>。Hev b 7 が esterase 活性を示したことも発表された<sup>73,74</sup>。著者が分離した carboxylesterase も、セリン残基が重要な役割を果たす加水分解酵素であり、patatin に類似している点が幾つかあった。また Subroto らは、patatin に類似した内部アミノ酸配列を有するラテックス蛋白質 (43 kD; SDS-PAGE) のN-末端は、ブロックされていたと報告している<sup>75</sup>。したがって、分離した carboxylesterase と Hev b 7 は全く関係がないのか、あるいは同種の加水分解酵素であるのかを判断するためには、内部アミノ酸配列の決定を含め、さらに詳細な検討が必要である。もし著者が得た carboxylesterase が patatin 様蛋白質の一つであるならば、ゴムの木に誘導される生体防御

蛋白質とラテックスアレルギーとの関連性が、この酵素についても明確化されることになる。

その他にも、ゴムの木の生体防御に関与すると考えられる幾つかの蛋白質が、ラテックスアレルゲンとして知られていている。Alenius ら<sup>76,77</sup> Chen ら<sup>78</sup> は、hevein (Hev 6.02) やその前駆体 (prohevein または hevein preprotein; Hev b 6.01) が主要なラテックスアレルゲン群 (hevein-related allergens) であると主張している。hevein は、数種の植物病原菌に対して抗菌活性を示すことが知られている<sup>41</sup>。また、prohevein のC-末端側蛋白質 (Hev b 6.03) のアミノ酸配列は<sup>53</sup>、PR-4 ファミリー (*win*-like proteins) に属する蛋白質の配列に酷似している<sup>42</sup>。一方 Sunderasan らは、microhelix というゴムの木の器官に含まれる蛋白質が、重要なラテックスアレルゲン (Hev b 4) であると報告している<sup>57</sup>。この蛋白質の詳細については、現在でもあまり知られていない。しかし、microhelix がゴムの木に ethephon を適用した際などに強く誘導される器官であることから<sup>57</sup>、Hev b 4 も生体防御反応に何らかの関連性を持つ蛋白質ではないかと推測される。さらに Posch らは、クラス II endochitinase や superoxide dismutase に類似したN-末端配列を有するラテックス蛋白質群が、患者のIgE抗体により特異的に認識されたと報告している<sup>79</sup>。これまでに登録されているラテックスアレルゲン (Hev b 1~Hev b 7) を、予想される生理的な役割と共にまとめると、Table 3 のようになる。この表からも、生体防御蛋白質群がラテックスアレルゲンの主要な部分を占めていることは明らかである。

2. 4. 交差反応性アレルゲンとしての生体防御蛋白質

天然ゴムラテックスに含まれる植物の生体防御蛋白質、

Table 3. Registered natural rubber-latex allergens

Name	Trivial name	Predicted physiological role	References
Hev b 1	rubber elongation factor	rubber biosynthesis	79,80
Hev b 2	$\beta$ -1,3-glucanases	defense-related	57,58
Hev b 3	small rubber particle protein	latex coagulation?	52,81
Hev b 4	microhelix component	defense-related?	57
Hev b 5	acidic protein	?	82,83
Hev b 6.01	prohevein, hevein preprotein		
6.02	hevein	defense-related, latex coagulation	76,77,78
6.03	prohevein C-terminal domain		
Hev b 7	patatin-like protein	defense-related	11,70

特に水溶性のPR蛋白質がラテックスアレルゲンであるとすると、多くのラテックスアレルギー患者が経験する幅広い交差反応性を合理的に説明することができる。前述の通り、植物のPR蛋白質は進化の過程で良く保存されており、近縁種ではない植物であっても血清学的に類似したPR蛋白質を誘導する<sup>15-22,38)</sup>。したがって、ゴムの木のPR蛋白質に対してアレルギー反応を示す患者は、類似したPR蛋白質を含むあらゆる植物に対しても、アレルギー反応を示す可能性があると予想される (Fig. 1)。

特に, hevein (4.7 kD) がラテックスアレルゲンの一つであることは<sup>77,78)</sup>、注目に値する。この蛋白質は、クラス I endochitinase に共通な N-末端構造単位であると共に、wheat germ agglutinin などキチンに結合する性質を有する植物性レクチン類の、基本的な構造単位でもある<sup>42,84)</sup>。したがって、hevein に対してアレルギー反応を示す患者は、クラス I endochitinase やキチン結合性レクチンを含む全ての植物に対しても、アレルギー反応を示す可能性がある。実際 Akasawa らは、アボカド (*Persea americana*) の抽出液からラテックスアレルギー患者の IgE 抗体が認識する蛋白質を分離精製し、その交差反応性抗原が endochitinase に相当するアミノ酸配列を有していたことを発表している<sup>85)</sup>。Vanek-Krebitz らも、アボカドの cDNA ライブラリーからメジャーアレルゲン (Pers a 1) の遺伝子を取り出し、その塩基配列がクラス I endochitinase の配列に相当したことを報告している<sup>86)</sup>。また Mikkola らは、ラテックスアレルギー患者の IgE 抗体が認識するバナナの蛋白質を分析し、その N-末端及び内部アミノ酸配列が endochitinase の配列に高い相同性を示したことを発表している<sup>87)</sup>。さらに Alenius ら<sup>88,89)</sup> Beezhold ら<sup>90)</sup> は、ラテックスアレルギー患者の IgE 抗体により、wheat germ agglutinin を含めた数種の植物性レクチンが特異的に認識されたという実験結果を報告している。一連の研究結果は、進化の過程で保存されてきた hevein という構造単位が B-cell エピトープとなり、近縁種ではない植物の間にも交差反応が引き起こされるということを明示している。

上記のように、植物の生体防御蛋白質群が交差反応の原因となり得ることが、各国での研究により明らかにされつつある。しかし、PR蛋白質やレクチン類は、量の多少はあるものの、果物や野菜、穀類に含まれるごく一般的な蛋白質である。経口摂取によりこれらの蛋白質に対して新たにアレルギー反応を示すようになる人は、それほど多くはないと想像される。つまり、多くの PR蛋白質やレクチン類は、既に感作が成立している患者に oral allergy syndrome (OAS) などのアレルギー症状を引き起こす経口 elicitor にはあるが、新たに感作を成立させる経口 sensitizer ではないと考えることができる。

経口摂取により新たに感作を成立させるような蛋白質は、

胃や腸で消化されにくいという特徴を持つとされている<sup>91,92)</sup>。このような蛋白質抗原は complete food allergens と呼ばれ、感作を成立させる sensitizer であると同時にアレルギー症状を引き起こす elicitor でもある<sup>93)</sup>。一方、胃や腸で容易に消化されてしまうような蛋白質は、経口摂取しても sensitizer にはなり得ない<sup>91,92)</sup>。しかし、吸入や粘膜接触により感作が成立する可能性は充分にあると考えられる。そして、どのような経路であるにせよ、ある蛋白質に対する感作が一旦成立すれば、同一あるいは交差反応性を有する蛋白質 (non-sensitizing elicitor) を吸入したり経口摂取した場合、アレルギー症状が現れると推測される<sup>93,94)</sup>。食物を摂取した際に出現する即時型アレルギーを食物アレルギーと呼んでいるが、経口摂取により感作が成立したとは限らないし<sup>95)</sup>、消化されにくい蛋白質が elicitor であるとも限らないのである<sup>94)</sup>。

例えば、白樺の花粉に対してアレルギー反応を示す患者の大多数は、雑草の花粉や植物性食品に対してもアレルギー反応を示すことが知られており、birch-pollen syndrome と呼ばれている<sup>96,97)</sup>。幅広い交差反応性が見られる理由を詳細に解析した結果、まず白樺花粉中のメジャーアレルゲン (Bet v 1) を吸入することで感作が成立し、その後、交差反応性を有する蛋白質 (Bet v 1-related allergens; PR-10 ファミリー) を吸入あるいは経口摂取した際にアレルギー症状が出現することがわかった<sup>98-100)</sup>。リンゴ (*Malus domestica*) に含まれる Bet v 1-related allergen である Mal d 1 のみにアレルギー反応を示し<sup>100-102)</sup>、白樺花粉に対してアレルギー反応を示さない患者は、ほとんど見いだされていない<sup>94)</sup>。幅広い交差反応性の原因となるもう一つのアレルゲン群 (pan-allergens) として、真核生物が共通に持つアクチン結合性蛋白質である profilin 類が知られている<sup>103)</sup>。このアレルゲン群の場合も、まず花粉などに含まれる profilin を吸入することで感作が成立し、その後、交差反応性を有する profilin 類を吸入したり経口摂取した際にアレルギー症状が出現すると理解されている<sup>93,94,99)</sup>。注意すべきことは、多くの Bet v 1-related allergens も profilin 類も、経口摂取した場合は容易に消化されてしまうような蛋白質であり<sup>94,104)</sup>、経口 sensitizer にはなり得ないということである。しかし、経口 elicitor にはなり得る。このような "non-sensitizing elicitor" は、交差反応性に基づくアレルゲンであると考えられ<sup>105)</sup>、進化の過程で保存されてきた酵素や結合性蛋白質 (binding proteins) がそれに該当すると推測される<sup>106,107)</sup>。

花粉症の場合と同様に、ラテックスアレルギーの感作経路の一つとして、アレルゲンが吸着したパウダーを吸入するルートがある<sup>4)</sup>。また、ラテックス製品が粘膜に直接接触することによる感作も、当然想定される<sup>1)</sup>。いずれの経路であるにせよ、天然ゴム製品には PR蛋白質が含まれてい

るので、これらに対する感作が成立する可能性がある。そして一旦感作が成立すれば、胃や腸で容易に消化されてしまうようなPR蛋白質を含む植物性食品に対しても、OASなどのアレルギー反応を示すようになると予想される。一方、一部の生体防御蛋白質は、酸性条件や酵素分解に対して非常に安定であるため、complete food allergenとして作用する可能性もある。この場合、まずそのようなPR蛋白質を含む食物に対するアレルギーが出現し、その後、ラテックス製品にも反応するようになるケースがあると考えられる。

## おわりに

著者は、植物の生体防御蛋白質群が天然ゴム製品による即時型アレルギーの原因物質ではないかと推測し、研究を進めてきた。植物に生体防御蛋白質を誘導させる要因は、病原菌や傷害、植物ホルモンを含めた化学物質<sup>47)</sup>やオゾン<sup>108)</sup>などの大気中物質、紫外線や厳しい生育環境などである。このような要因は、農園のゴムの木に限らず、他の多くの植物に対しても加わっているのではないだろうか？ そうだとすると、様々な植物に誘導される生体防御蛋白質群が、植物成分による即時型アレルギーの増加傾向に、何らかの形で関与しているのではないかと考えることができる。

例えば、周辺環境のオゾン濃度が高い木の花粉ほど、グループVと呼ばれるアレルギーの量が多かったという結果が報告されている<sup>109)</sup>。同様に、白樺の花粉を二酸化窒素やオゾンにさらすと、メジャーアレルギーであるBet v 1の量が増加したという実験結果が発表された<sup>110)</sup>。また、ピーナッツに含まれるアレルギーの一つが、乾燥ストレスにより誘導される蛋白質であることが最近明らかにされた<sup>111)</sup>。さらにHänninenらは、カブ(*Brassica rapa*)をethephonやsalicylic acidで処理するとIgE抗体が認識する蛋白質の量が10倍以上にも増加することを示し、植物の生体防御機構を刺激することがアレルギー量を著しく増加させることにつながると結論している<sup>112)</sup>。生体防御反応との関連性が明白ではないものの、ヒマラヤスギ(*Juniperus ashei*)花粉のアレルギーの一つ(Jun a 3)は、PR-5ファミリーの蛋白質に相同なアミノ酸配列を有していた<sup>113)</sup>。一方、キク科雑草(*Parthenium hysterophorus*)の花粉アレルギー(Par h 1)のアミノ酸配列は、extensinの配列に類似していた<sup>60)</sup>。また、コショウに含まれるアレルギーの一つは塩ストレスにより誘導される蛋白質に、パプリカやbell pepperに含まれるアレルギーはPR-5ファミリーの蛋白質に相同性を示した<sup>114,115)</sup>。さらに、大豆(*Glycine max*)に含まれるアレルギーの一つ(Gly m 2)も、エンドウの生体防御蛋白質に類似したアミノ酸配列を有していた<sup>116)</sup>。植物に加わる様々なストレスが、植物成分に

よる即時型アレルギーの増加傾向に寄与しているのかどうか、今後のさらなる研究の発展が期待される。

一方、病原菌に抵抗性を示す植物を作り出す一手法として、生体防御蛋白質を利用するケースが増えている<sup>16)</sup>。通常の品種改良法により耐病性を有するような種を作り出す試みは、古くから行われてきた。加えて最近では、遺伝子工学的な手法を用いて病原菌に強い植物を作り出す試みが盛んである<sup>48,49)</sup>。植物が誘導する生体防御蛋白質群のアレルギー性という観点からは、このようにして作り出された農作物に関心を持たざるを得ない。農園で栽培されているゴムの木も、農耕的な価値を追求し、遺伝的に選択されてきた品種なのである<sup>50,52)</sup>。

現に、prohevein(Hev b 6.01)をコードする遺伝子を導入することにより開発された、病原菌に強いという性質を持つトマトが報告されている<sup>117)</sup>。このトマトをラテックスアレルギー患者やアトピー患者が食べた場合、アレルギー反応を起こす可能性は否定できない。また、endochitinaseをコードする遺伝子を導入することで耐病性を高めようとする試みが、多くの作物について行われている<sup>40,118,119)</sup>。しかし、hevein(Hev b 6.02)やアボカドのendochitinase(Pers a 1)がメジャーなアレルギーとして登録されている現実を、見逃すことはできない。このような蛋白質を人為的に発現させた農産物が食品として市場に出る際には、各国におけるガイドラインに基づき、その安全性や取り扱いが慎重に検討されることになる<sup>91,120)</sup>。Inschlagらも、サクランボ(*Prunus avium*)に含まれるメジャーアレルギー(Pru a 2)がthaumatin-like proteins(PR-5ファミリー)に相同なアミノ酸配列を有することを示し、こうした蛋白質を発現させる遺伝子改変作物の安全性について注意を喚起している<sup>121)</sup>。近未来に予想される食糧不足の解決に、遺伝子改変植物は切り札的な役割を果たすと期待されている。その信頼性を損なわないためにも、新たに開発された農作物がアレルギーの原因とならないかどうか、最新の知見をもって評価されることが望まれる。

## 謝 辞

患者の血清をご提供いただきました、横浜市立大学医学部附属浦舟病院皮膚科部長 池澤善郎 博士、しょうの皮膚科院長 生野麻美子 博士、及び国立小児病院アレルギー科医長 赤澤 晃 博士に、深く感謝いたします。また、アミノ酸配列分析にご協力をいただきました、新潟薬科大学薬品製造学研究室教授 北川幸己 博士、及び新潟薬科大学化学研究室助教授 小宮山忠純 博士に、深く感謝いたします。「天然ゴム製品によるI型アレルギーと植物由来の防御蛋白質との関連性究明に関する研究」は、平成6~8年度厚生科学研究費補助金(厚生科学特別研究事業若手研究分)を元に行われた。

## 文 献

- 1) Slater, J. E.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 139-149 (1994)
- 2) Turjanmaa, K., Alenius, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Reunala, T. and Palosuo, T.: *Allergy*, **51**, 593-602 (1996)
- 3) Sussman, G. L. and Beezhold, D. H.: *J. Long-Term Eff. Med. Implants*, **7**, 219-223 (1997)
- 4) Tomazic, V. J., Champaine, E. L., Lamanna, A., Withrow, T. J., Adkinson, N. F. and Hamilton, R. G.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **93**, 751-758 (1994)
- 5) Williams, P. B. and Halsey, J. F.: *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **79**, 303-310 (1997)
- 6) Holmdahl, L. and Chegini, N.: *J. Long-Term Eff. Med. Implants*, **7**, 225-234 (1997)
- 7) Baur, X., Chen, Z. and Allmers, H.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 24-27 (1998)
- 8) Williams, P. B., Buhr, M. P., Weber, R. W., Volz, M. A., Koepke, J. W. and Selner, J. C.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 88-95 (1995)
- 9) Miguel, A. G., Cass, G. R., Weiss, J. and Glovsky, M. M.: *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1180-1186 (1996)
- 10) Posch, A., Chen, Z., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X.: *Clin. Exp. Allergy*, **28**, 134-140 (1998)
- 11) Beezhold, D. H., Sussman, G. L., Liss, G. M. and Chang, N.-S.: *Clin. Exp. Allergy*, **26**, 416-422 (1996)
- 12) Blanco, C., Carrillo, T., Castillo, R., Quiralte, J. and Cuevas, M.: *Ann. Allergy*, **73**, 309-314 (1994)
- 13) Brehler, R., Theissen, U., Mohr, C. and Luger, T.: *Allergy*, **52**, 404-410 (1997)
- 14) Pfützner, W., Thomas, P., Rueff, F. and Przybilla, B.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 281-282 (1998)
- 15) Kombrink, E. and Somssich, I. E.: *Adv. Bot. Res.*, **21**, 1-34 (1995)
- 16) Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M.: *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 16-22 (1998)
- 17) Bowles, D. J.: *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 873-907 (1990)
- 18) Bol, J. F., Linthorst, H. J. M. and Cornelissen, B. J. C.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **28**, 113-138 (1990)
- 19) Linthorst, H. J. M.: *Crit. Rev. Plant Sci.*, **10**, 123-150 (1991)
- 20) Ohashi, Y. and Ohshima, M.: *Plant Cell Physiol.*, **33**, 819-826 (1992)
- 21) Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B.: *Biochimie*, **75**, 687-706 (1993)
- 22) Shewry, P. R. and Lucas, J. A.: *Adv. Bot. Res.*, **26**, 135-192 (1997)
- 23) Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A. and Shono, M.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **104**, 307 (1994)
- 24) Yagami, T., Sato, M. and Nakamura, A.: *J. Nat. Rubb. Res.*, **10**, 100-107 (1995)
- 25) Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A. and Shono, M.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 677-686 (1995)
- 26) Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A. and Shono, M.: *Food Agric. Immunol.*, **8**, 121-136 (1996)
- 27) 矢上 健, 中村晃忠: "The 3rd Symposium of Asthma in Tokyo", 監修 飯倉洋治, 伊藤孝治, ライフサイエンス出版, 東京, pp. 17-28 (1996)
- 28) 矢上 健: 日本ラテックスアレルギー研究会会誌, **1-1**, 38-41 (1997)
- 29) 矢上 健, 配島由二, 中村晃忠, 小宮山忠純, 北川幸己: 日本ラテックスアレルギー研究会会誌, **1-2**, 67-71 (1997)
- 30) 大砂博之, 山本美穂, 高橋さなみ, 武川るみ, 宮沢めぐみ, 大沼すみ, 大沢純子, 北村和子, 池澤善郎, 椿和文, 矢上 健: 日本ラテックスアレルギー研究会会誌, **1-2**, 72-77 (1997)
- 31) Akasawa, A., Tanaka, K., Hsieh, L.-S., Yagami, T., Slawek, S., Saito, H. and Ikura, Y.: "Progress in Allergy and Clinical Immunology", Vol. 4, eds. by Oehling, A. K. and López, J. G. H., Hogrefe & Huber Publishers, Seattle, pp. 124-126 (1997)
- 32) Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A., Komiyama, T., Kitagawa, K., Akasawa, A. and Ikezawa, Z.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 379-385 (1998)
- 33) Yagami, T.: *Environ. Dermatol.*, **5**, in press (1998)
- 34) Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. M.: *Plant Physiol.*, **109**, 347-352 (1995)
- 35) Shibasaki, M., Sumazaki, R., Isoyama, S. and Takita, H.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **98**, 18-25 (1992)
- 36) Dickinson, H.: *Nature*, **367**, 517-518 (1994)
- 37) Taylor, S. L.: *Food Technol.*, 146-152 (1992)
- 38) Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, Th. and Conejero, V.: *Plant Mol. Biol. Report.*, **12**, 245-264 (1994)
- 39) Sahai, A. S. and Manocha, M. S.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**, 317-338 (1993)
- 40) Graham, L. S. and Sticklen, M. B.: *Can. J. Bot.*, **72**, 1057-1083 (1994)
- 41) Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J. and Peumans, W. J.: *Planta*, **183**, 258-264 (1991)
- 42) Raikhel, N. V., Lee, H.-I. and Broekaert, W. F.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**, 591-615 (1993)
- 43) Düring, K.: *Plant Mol. Biol.*, **23**, 209-214 (1993)
- 44) James, J. M., Sixbey, J. P., Helm, R. M., Bannon, G. A. and Burks, A. W.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 239-244 (1997)
- 45) Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M. and Becker, W.-M.: *Planta*, **199**, 413-415 (1996)
- 46) Swoboda, I., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordáin, G., Scheiner, O., Heberle-Bors, E. and Vicente, O.: *Physiol. Plant.*, **96**, 433-438 (1996)
- 47) Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 439-459 (1994)
- 48) Lamb, C. J., Ryals, J. A., Ward, E. R. and Dixon, R. A.: *BioTechnology*, **10**, 1436-1445 (1992)
- 49) Strittmatter, G. and Wegener, D.: *Z. Naturforsch.*, **48c**, 673-688 (1993)
- 50) Kush, A., Goyvaerts, E., Chye, M.-L. and Chua, N.-H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1787-1790 (1990)
- 51) d'Auzac, J., Bouteau, F., Chrestin, H., Clément, A., Jacob, J. L., Lacrotte, R., Prévot, J. C., Pujade-Renaud, V. and Rona, J. P.: *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.*, **16**, 205-210 (1993)
- 52) Chrestin, H., Gidrol, X. and Kush, A.: *Euphytica*, **96**, 77-82 (1997)
- 53) Broekaert, W., Lee, H.-I., Kush, A., Chua, N.-H. and Raikhel, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7633-7637

- (1990)
- 54) Tomazic, V. J., Withrow, T. J. and Hamilton, R. G.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 635-642 (1995)
- 55) Lynn, K. R. and Clevette-Radford, N.A.: *Phytochemistry*, **25**, 2279-2282 (1986)
- 56) d'Auzac, J., Prévôt, J.-C. and Jacob, J.-L.: *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, 765-777 (1995)
- 57) Sunderasan, E., Hamzah, S., Hamid, S., Ward, M. A., Yeang, H. Y. and Cardoso, M. J.: *J. Nat. Rubb. Res.*, **10**, 82-99 (1995)
- 58) Chye, M.-L. and Cheung, K.-Y.: *Plant Mol. Biol.*, **29**, 397-402 (1995)
- 59) Jekel, P. A., Hartmann, J. B. H. and Beintema, J. J.: *Eur. J. Biochem.*, **200**, 123-130 (1991)
- 60) Gupta, N., Martin, B. M., Metcalfe, D. D. and Rao, P. V. S.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 903-912 (1996)
- 61) Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M. J., Armentia, A., Salcedo, G. and Gomez, L.: *Glycobiology*, **6**, 471-477 (1996)
- 62) Fuchs, T., Spitzauer, S., Vente, C., Hevler, J., Kapiotis, S., Rumpold, H., Kraft, D. and Valenta, R.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 356-364 (1997)
- 63) Chungchow, N., Suntaro, A. and Wititsuwannakul, R.: *Phytochemistry*, **39**, 505-509 (1995)
- 64) Aalberse, R. C. and Van Ree, R.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 375-387 (1997)
- 65) Van der Veen, M. J., Van Ree, R., Aalberse, R. C., Akkerdaas, J., Koppelman, S. J., Jansen, H. M. and Van der Zee, J. S.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 327-334 (1997)
- 66) Shigeta, S., Okamura, M., Tsutsumi, M., Ono, K., Ohta, M., Matsuura, F., Takao, T. and Oka, S.: *J. Biochem.*, **108**, 47-52 (1990)
- 67) Martin, M. N.: *Plant Physiol.*, **95**, 469-476 (1991)
- 68) Lavaud, F., Prevost, A., Cossart, C., Guerin, L., Bernard, J. and Kochman, S.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 557-564 (1995)
- 69) Lavaud, F., Sabouraud, D., Deschamps, F. and Perdu, D.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 429-447 (1997)
- 70) Beezhold, D. H., Sussman, G. L., Kostyal, D. A. and Chang, N.-S.: *Clin. Exp. Immunol.*, **98**, 408-413 (1994)
- 71) Strickland, J. A., Orr, G. L. and Walsh, T. A.: *Plant Physiol.*, **109**, 667-674 (1995)
- 72) Beezhold, D. H., Kostyal, D. A., Hickey, V. L., Noti, J. D. and Sussman, G. L.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, S 266 (1997)
- 73) Sowka, S., Krebitz, M., Yusof, F., Yeang, H. Y., Scheiner, O. and Breiteneder, H.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S206 (1998)
- 74) Breiteneder, H. and Scheiner, O.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **116**, 83-92 (1998)
- 75) Subroto, T., Van Koningsveld, G. A., Schreuder, H. A., Soedjanaatmadja, U. M. S. and Beintema, J. J.: *Phytochemistry*, **43**, 29-37 (1996)
- 76) Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Mäkinen-Kiljunen, S., Yip, E. and Palosuo, T.: *Clin. Exp. Allergy*, **24**, 659-665 (1995)
- 77) Alenius, H., Kalkkinen, N., Reunala, T., Turjanmaa, K. and Palosuo, T.: *J. Immunol.*, **156**, 1681-1625 (1996)
- 78) Chen, Z., Posch, A., Lohaus, C., Raulf-Heimsoth, M., Meyer, H. E. and Baur, X.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 402-409 (1997)
- 79) Posch, A., Chen, Z., Wheeler, C., Dunn, M. J., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 385-395 (1997)
- 80) Czuppon, A. B., Chen, Z., Rennert, S., Engelke, T., Meyer, H. E., Heber, M. and Baur, X.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **92**, 690-697 (1993)
- 81) Yeang, H. Y., Cheong, K. F., Sunderasan, E., Hamzah, S., Chew, N. P., Hamid, S., Hamilton, R. G. and Cardoso, M. J.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 628-639 (1996)
- 82) Akasawa, A., Hsieh, L.-S., Martin, B.M., Liu, T. and Lin, Y.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 25389-25393 (1996)
- 83) Slater, J. E., Vedvick, T., Arthur-Smith, A., Trybul, D. E. and Kekwick, R. G. O.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 25394-25399 (1996)
- 84) Beintema, J. J.: *FEBS Lett.*, **350**, 159-163 (1994)
- 85) Akasawa, A., Hsieh, L., Tanaka, K., Lin, Y. and Iikura, Y.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 321 (1996)
- 86) Vanek-Krebitz, M., Sowka, S., Hsieh, L. S., Scheiner, O. and Breiteneder, H.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, S 479 (1997)
- 87) Mikkola, J., Alenius, H., Hänninen, A.-R., Kalkkinen, N., Reunala, T., Turjanmaa, K. and Palosuo, T.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S153 (1998)
- 88) Alenius, H., Mikkola, J., Turjanmaa, K., Reunala, T. and Palosuo, T.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, S503 (1997)
- 89) Alenius, H., Mikkola, J., Turjanmaa, K., Reunala, T. and Palosuo, T.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S200 (1998)
- 90) Beezhold, D. H., Kostyal, D. A. and Sussman, G. L.: *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 114-121 (1997)
- 91) Fuchs, R. L. and Astwood, J. D.: *Food Technol.*, 83-88 (1996)
- 92) Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L.: *Nature Biotechnol.*, **14**, 1269-1273 (1996)
- 93) Aalberse, R. C.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **4**, 55-60 (1997)
- 94) Vieths, S.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **4**, 61-70 (1997)
- 95) Aalberse, R. C.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **99**, 261-264 (1992)
- 96) Fritsch, R., Ebner, C. and Kraft, D.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 397-404 (1997)
- 97) Deviller, P. and Pauli, G.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 405-413 (1997)
- 98) Valenta, R. and Kraft, D.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 893-895 (1996)
- 99) Pastorello, E. A., Incorvaia, C., Pravettoni, V. and Ortolani, C.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 415-427 (1997)
- 100) Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. and Breiteneder, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 538-551 (1995)
- 101) Hsieh, L.-S., Moos, M. and Lin, Y.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 960-970 (1995)
- 102) Schöning, B., Vieths, S., Petersen, A. and Baltes, W.: *J. Sci. Food Agric.*, **67**, 431-440 (1995)



- 103) Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelman, H., Kraft, D. and Scheiner, O.: *J. Exp. Med.*, **175**, 377-385 (1992)
- 104) Kortekangas-Savolaninen, O., Savolainen, J. and Einarsson, R.: *Clin. Exp. Allergy*, **23**, 587-590 (1993)
- 105) Scheiner, O., Aberer, W., Ebner, C., Ferreira, F., Hoffmann-Sommergruber, K., Hsieh, L. S., Kraft, D., Sowka, S., Vanek-Krebitz, M. and Breiteneder, H.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **113**, 105-108 (1997)
- 106) Vuitton, D. A.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 367-374 (1997)
- 107) Musu, T., Grégoire, C., David, B and Dandeu, J.-P.: *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 485-498 (1997)
- 108) Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. and Langebartels, C.: *Trends Plant Sci.*, **3**, 47-50 (1998)
- 109) Masuch, G., Franz, J.-Th., Schoene, K., Müsken, H. and Bergmann, K.-Ch.: *Allergy*, **52**, 874-875 (1997)
- 110) Thomas, P., Strube, D., Valenta, R. and Przybilla, B.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S203 (1998)
- 111) Chung, S. Y., Champagne, E. T., Bannon, G. A. and Burks, A. W.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S240 (1998)
- 112) Hänninen, A.-R., Mikkola, J., Alenius, H., Turjanmaa, K., Reunala, T. and Palosuo, T.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S170 (1998)
- 113) Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R. M., Brooks, E. G. and Kurosky, A.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, S203 (1998)
- 114) Leitner, A., Jensen-Jarolim, E., Grimm, R., Wüthrich, B., Ebner, H., Scheiner, O., Kraft, D. and Ebner, C.: *Allergy*, **53**, 36-41 (1998)
- 115) Jensen-Jarolim, E., Santner, B., Leitner, A., Grimm, R., Scheiner, O., Ebner, C. and Breiteneder, H.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **116**, 103-109 (1998)
- 116) Codina, R., Lockey, R. F., Fernández-Caldas, E. and Rama, R.: *Clin. Exp. Allergy*, **27**, 424-430 (1997)
- 117) Lee, H.-I. and Raikhel, N. V.: *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **28**, 743-750 (1995)
- 118) Zhu, Q., Maher, E. A., Masoud, S., Dixon, R. A. and Lamb, C. J.: *Bio/Technology*, **12**, 807-812 (1994)
- 119) Grison, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J.-J. and Toppan, A.: *Nature Biotechnol.*, **14**, 643-646 (1996)
- 120) Kessler, D. A., Taylor, M. R., Maryanski, J. H., Flamm, E. L. and Kahl, L. S.: *Science*, **256**, 1747-1832 (1992)
- 121) Inschlag, C., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Ahorn, H., Ebner, C., Scheiner, O. and Breiteneder, H.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **116**, 22-28 (1998)