

スギにおける花粉アレルゲンの遺伝的変異に関する研究

後藤 陽子⁽¹⁾

Yoko Goto⁽¹⁾

Studies on Genetic Variation in Sugi (*Cryptomeria japonica* D.Don) Pollen Allergen

要旨: 現在日本におけるスギ花粉症の罹患率は1割を超えており、花粉症対策は林業における重要な課題のひとつとなっている。これまでに雄花着花性の低い「花粉の少ないスギ品種」の選抜と利用が進められているが、スギ花粉の主要アレルゲンであるCry j 1とCry j 2の花粉単位重量当たりの含量もまた、個体間で大きく異なることが報告されており、アレルゲン含量の少ないクローンを選抜して花粉対策に利用できる可能性がある。

スギは林業樹種であるため、花粉症対策品種に対しても林業において重要な成長特性や通直性、材質が優れていることが求められる。従って、それらの特性に優れた精英樹の中からアレルゲン含量の少ないクローンを選抜することが望ましい。そこで東北、関東、関西、九州の4つの育種基本区の精英樹を調査対象として、すでに定量法が確立されているCry j 1含量の個体間変異を調査した。その結果、Cry j 1含量はいずれの育種基本区の精英樹においても15~80倍の顕著な個体間変異があることが明らかになった。また、同一採種園内に植栽されているクローンをを用いて推定したCry j 1含量のクローン反復率は0.796、複数の採種園に共通で植栽されているクローンをを用いて推定したクローン反復率は0.600と高く、Cry j 1含量が強い遺伝的支配下にあることを示した。従ってCry j 1含量の少ないクローンを選択的に利用することにより、花粉症を軽減できると考えられる。

一方、本研究で行っているCry j 1の定量法(モノクローナル抗体J1B01, J1B07を用いたサンドウィッチELISA法)ではCry j 1が検出されないクローンが見出されたことから、これらのクローンはモノクローナル抗体との反応性が低いCry j 1のアイソフォームを生産している可能性が示唆された。その場合、定量の精度に問題が生じる。そこで定量法を改良するために、これらのアイソフォームのモノクローナル抗体との反応性およびアミノ酸配列を調べ、反応性に影響を与えているアミノ酸変異を明らかにした。さらに、これらのアミノ酸変異を特異的に検出するCAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)マーカーを開発して対立遺伝子頻度を推定し、各アイソフォームの頻度を推定した。その結果に基づいて定量法を改良し、Cry j 1含量のクローン間変異を調べたところ、約13倍のクローン間変異が見出された。改良前の方法で検出されたクローン間変異よりは小さかったものの、十分に改良の効果が期待できる結果であった。また、もうひとつの主要アレルゲンであるCry j 2についても定量法の検討を進め、確立した方法によってCry j 2のクローン間変異を調べた。その結果、スギ花粉中にはCry j 1と同程度のCry j 2が含まれており、約12倍のクローン間変異があることが明らかになった。従ってCry j 1のみならずCry j 2についても改良を進めることにより、効果の高い花粉症対策品種を育成できると考えられる。

(1) 林木育種センター

〒319-1301 茨城県日立市十王町伊師 3809-1

Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi,Juo,Hitachi,Ibaraki 319-1301 Japan

*本論文は北海道大学博士号(農学)請求論文である。

目 次

1 序論	
1.1 研究の背景	5
1.1.1 我が国におけるスギ花粉症問題と林木育種における花粉症対策	5
1.1.2 スギ花粉アレルゲンに関する研究の現状	6
1.1.3 スギ花粉中のアレルゲン含量の変異	7
1.2 本研究の目的	8
2 スギ花粉中の Cry j 1 含量のクローン間差異	
2.1 緒言	9
2.2 材料と方法	11
2.2.1 材料	11
2.2.2 Cry j 1 の抽出	12
2.2.3 サンドウィッチ ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)法による Cry j 1 の定量	12
2.3 結果	12
2.3.1 関東育種基本区で選抜された精英樹における Cry j 1 含量のクローン間差異	12
2.3.2 東北, 関西, 九州育種基本区で選抜された精英樹における Cry j 1 含量のクローン間差異	13
2.4 考察	14
2.5 結論	15
3 ジベレリン処理による雄花着花促進が Cry j 1 含量に及ぼす影響	
3.1 緒言	15
3.2 材料と方法	16
3.2.1 材料	16
3.2.2 Cry j 1 の抽出および定量	17
3.2.3 統計解析	17
3.3 結果	18
3.3.1 ジベレリン処理による雄花着花促進が Cry j 1 含量に及ぼす影響	18
3.3.2 花粉中の Cry j 1 含量の反復率	19
3.3.3 葉面処理によるジベレリン処理の Cry j 1 含量に対する影響	19
3.4 考察	20
3.5 結論	21
4 植栽場所の違いが Cry j 1 含量の変異に及ぼす影響	
4.1 緒言	22
4.2 材料と方法	22

4.2.1 材料	22
4.2.2 Cry j 1 の抽出および定量	23
4.2.3 統計解析	24
4.2.4 気象データ	24
4.3 結果	24
4.3.1 Cry j 1 含量の変異	24
4.3.2 Cry j 1 含量と気象要因との関係	26
4.4 考察	27
4.5 結論	28
 5 Cry j 1 アイソフォームにおけるモノクローナル抗体との結合性の差異	
5.1 緒言	29
5.2 材料と方法	30
5.2.1 材料	30
5.2.2 Cry j 1 の抽出	30
5.2.3 サンドウィッチ ELISA 法による Cry j 1 の定量	31
5.2.4 Cry j 1 をコードする cDNA およびゲノム DNA の合成	31
5.2.5 Cry j 1 をコードする cDNA およびゲノム DNA のクローニングとシーケンス	31
5.2.6 CAPS マーカーの開発	31
5.2.7 イワオスギの遺伝子連鎖地図上における Cry j 1 遺伝子の位置の推定	32
5.3 結果	32
5.3.1 3 種類のサンドウィッチ ELISA 法による Cry j 1 の定量	32
5.3.2 Cry j 1 の cDNA 塩基配列の比較	34
5.3.3 Cry j 1 アイソフォームとモノクローナル抗体との結合性	36
5.3.4 CAPS マーカーの開発	36
5.3.4.1 Cry j 1 をコードするゲノム DNA の構造	36
5.3.4.2 55 番目のアミノ酸変異を検出するための CAPS マーカーの開発	38
5.3.4.3 352 番目のアミノ酸変異を検出するための CAPS マーカーの開発	39
5.3.4.4 352 番目のアミノ酸変異と J1B07 との結合性の関係	39
5.3.4.5 55 番目のアミノ酸変異と J1B07 との結合性の関係	40
5.3.5 イワオスギの遺伝子連鎖地図における Cry j 1 遺伝子の位置の推定	40
5.3.6 55B と 352B の遺伝子頻度の推定	41
5.4 考察	42
5.4.1 アイソフォームにおけるクローン間変異	42
5.4.2 アイソフォームの臨床医学的意義	43
5.5 結論	44

6	改良された定量法によるアレルギー含量のクローン間差異の検討	
6.1	緒言	44
6.2	材料と方法	45
6.2.1	材料	45
6.2.2	Cry j 1 の定量	45
6.2.3	Cry j 2 の定量	46
6.2.4	Cry j 2 の抽出方法の検討	46
6.3	結果	47
6.3.1	Cry j 2 の抽出方法の検討	47
6.3.2	Cry j 1 および Cry j 2 含量におけるクローン間差異	49
6.4	考察	50
6.5	結論	51
7	総合討論	
7.1	緒言	52
7.2	「アレルギーの少ないスギ品種」の林業における重要性	53
7.3	臨床医学におけるアレルギーの量的および質的変異の重要性	54
7.4	さらなるスギ花粉症対策品種の創出	57
	摘要	58
	謝辞	59
	引用文献	60
	参考文献	66

1 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 我が国におけるスギ花粉症問題と林木育種における花粉症対策

初めて花粉症に関する記述が公表されたのは、1819年のことである。イギリスの医師、Bostwick は枯草を集める時期に喘息や目の痒みといった症状が起きることから、この病気を枯草熱として報告した。この時点ではまだ花粉が枯草熱の原因であることは分かっていなかったが、その後 1873 年に同じくイギリス人の医師、Blackley がそれを実験的に証明した。現在でも欧米の牧草地の多い国々においてイネ科花粉症は深刻な問題となっており、ヨーロッパにおいては花粉症の 20~80% はイネ科の花粉によるものである。アメリカ合衆国においてもブタクサに次ぎイネ科花粉症の罹患率が高いことが報告されている。また、現在では様々な風媒花植物の花粉が花粉症を引き起こすことが明らかになっており、ヨーロッパ北部ではカバノキ科やブナ科の林木による花粉症、また地中海地方や南北アメリカでは栽培植物であるオリーブの花粉症が問題になっている。

現在、日本において最も深刻な花粉症はスギ花粉症である。スギ花粉症患者数は人口の 1 割以上にのぼり、都市部における罹患率はそれ以上であるとも言われている。毎年 2、3 月頃になるとニュースや天気予報で花粉飛散情報が流れ、街のいたるところにマスクをした人が見られるのも、喜ばしくない風物詩のひとつになりつつある。さらに患者数の増加だけではなく発症の低年齢化も懸念されており、スギ花粉症はまさに深刻な国民病と言える。

スギ花粉症は、1964 年に堀口と斎藤によって発見された。斎藤らはスギ並木で有名な日光市において 3 月から 4 月にかけて、くしゃみ、水様性鼻漏過多、鼻閉などを主な症状とした季節性のアレルギー症状を呈する 21 症例を観察し、その原因がスギ花粉であることを明らかにした。草地の多い欧米においてイネ科花粉症が多いとすれば、古くから最も多く造林樹種として用いられ、広い面積に植栽されてきたスギの花粉が花粉症を引き起こすことは理解に難くない。大部分の樹木が開花する 1~6 月に各地で飛散する花粉の数を調査したところ、北海道、沖縄および日本海側の一部を除くほとんどの地域において、スギ花粉が半数以上を占めたことが報告されている（長野ら、1992）。花粉飛散数は特に関東、東海地域で多く、この結果はスギ花粉症の罹患率における地域特性と一致するものである（宇佐神ら、1988、井上ら、1988、中村ら、1999）。

スギの利用の歴史は弥生時代にまで遡ると言われ、造林もまた長い歴史を持つが、現在のように森林面積の約 20% という広い面積を占めるようになったのは第二次世界大戦後のことであり、戦災地の復興需要もあって積極的に造林が進められてきた結果である。スギの拡大造林は昭和 37 年（1962 年）にピークを迎えるまで続き、その後は造林対象地の減少や労働力の不足のために造林面積は減少した。現在、拡大造林期に植栽されたスギ林は花を着け始める 20~30 年生を過ぎて成熟し、ほとんどの個体が着花する樹齢に達している。従来のスギの伐期は約 50 年であるため、伐期に達した木を伐採して苗木による再造林を行うというサイクルが順調に機能していれば、花粉の生産量は一定レベルに留まり現在のように増加することはなかっただろう。しかし現在、安い外国産木材の流入によるスギ材価格の低迷や山村の過疎化による労働力不足のため、伐期を迎えたスギ林においても伐採が進まず放置されていることが多い。このような林業を取り巻く状況の悪化も、スギ花粉症患者の増加の一因である。

スギ花粉症はスギ花粉飛散量の増加だけではなく、大気汚染の進行や食生活の欧米化など、様々な社会的背景

の変化の中で顕在化した文明病とすることができる (Takenaka et al. 1995, 宮本昭正ら, 1998, Terada et al. 1999, Fahy et al. 1999, 岡野, 2002)。そのため医療のみならず食品産業, 花粉を生活環境から排除することを目的とした家庭用電化製品の開発や自動車の装備, あるいはリアルタイムに正確な花粉飛散情報を提供するための技術開発など, 多方面からその改善に向けた努力が進められている。しかしそれらはあくまでも対症療法であり, その原因となる花粉を減らすという根本的な解決は林業においてしかなし得ず, それは時間を要するが最も効果的な花粉症対策である。また, スギは長い間日本人に利用されてきた利用価値の高い樹種であり, 施業や加工の技術における蓄積も多いことから, すぐに他の樹種で代用できるものではない。また, 昭和 31 年に発足した林木育種事業で選抜されたスギ精英樹の成長や材質, 病虫害抵抗性などの特性に関する情報が蓄積されつつあり, 精英樹を母材とする優良材の効率的な生産に向けて研究が進められている。林木の育種には長大な時間がかかるため, スギの育種において蓄積されてきた技術, 研究成果は非常に貴重なものである。これらを生かしてゆくためにはスギ花粉症を軽減するための対策を講じることが必要であり, それは林業にとって現在最も重要な課題のひとつと言えるだろう。

これまでの研究において, 年ごとの花粉飛散量と来院する患者数や花粉症患者の血清中のスギ花粉のアレルゲン抽出液に対する IgE (Immunoglobulin E) 量の間に正の相関関係が認められており, 空中花粉量が多いほど花粉症が悪化することが明らかになっている (Okawa 2002, Ozasa 2002)。したがって, スギによる花粉生産量を減少させることによって花粉症を軽減できると考えられる。そこで花粉症対策の一環として, 林野庁, 林木育種センター, 都府県は連携して「花粉の少ないスギ品種」の選抜に取り組んできた。北海道育種基本区を除く東北育種基本区, 関東育種基本区, 関西育種基本区, 九州育種基本区の精英樹について雄花着花量を調査し, その結果をもとにそれぞれ 11, 57, 14, 31 クローンを「花粉の少ないスギ品種」として公表し, 現在それらの普及を進めている。また, 平らは雄性不稔のスギ個体を発見し, その遺伝性を調査するなど実用化に向けた研究を行っている (平ら, 1993, Taira et al. 1999)。一方, 林木は伐期に至るまでに長い年月がかかり, その間様々な病虫害や環境の変化に耐えなくてはならないため, それぞれの林分が広い遺伝的多様性をもっていることが望ましい。また, 地域によって適応する品種が異なるため品種の選択の可能性は大きい方が望ましく, 多様な花粉症対策品種が求められている。

1.1.2 スギ花粉アレルゲンに関する研究の現状

アレルギーの原因となる物質を総称してアレルゲン (allergen) と呼ぶ。スギ花粉の主要アレルゲンとしてこれまでに Cry j 1, Cry j 2 の 2 種類のタンパク質が報告されており (Yasueda et al. 1983, Sakaguchi et al. 1990), それぞれの cDNA 塩基配列から全アミノ酸配列が決定されている (Taniguchi et al. 1988, Sone et al. 1994, Namba et al. 1994)。さらにそのアミノ酸配列からそれぞれの機能が pectate lyase, polygalacturonase であることが推定され, 単離した Cry j 1, Cry j 2 を用いた *in vitro* の実験により実際にその活性を持つことが確認されている (Taniguchi et al. 1995, Ohtsuki et al. 1995)。切断様式は異なるがいずれもペクチン分解酵素であることから, 花粉管が伸長する際に胚珠の細胞壁中のペクチンを分解し, 伸長を助ける機能を持つと推定されている。Yamada et al. (2003) は Cry j 1 のプロモーターを単離し, プロモーターとレポーター遺伝子を連結させたコンストラクトをタバコに導入して発現の時期や特異性を調べた結果, 開葯前の葯や成熟花粉だけでなく, 伸長する花粉管においても発現が確認されたことを報告している。また, polygalacturonase は他の植物においても成熟

花粉や発芽花粉および伸長中の花粉管に存在すること (Mascarenhas, 1990, Pressey, 1991), または mRNA の発現が確認されているほか (Brown et al. 1990, Torki et al. 1999), 種子の発芽や実生の伸長, あるいはさやの伸長において発現していることが報告されており (Kristen et al. 1998, Turki et al. 1999), 細胞壁のペクチンを分解することによって細胞の伸長を助ける役割があると考えられている。従って Cry j 2 の場合は, 花粉管の伸長そのものに関わっている可能性もある。

Miki-Hirosige et al. (1994) は, 9 月に採取した発達中の葯を観察し, Cry j 1 は主に葯中のタペータムや外壁 (sexine と nexine), 花粉表面のオービクルスに局在することを明らかにしている。タペータムはオービクルスの分泌を介して外壁の構成成分や栄養分を供給する働きを持つことから, 花粉表面に局在する Cry j 1 は主にタペータムで合成されたものだと考えられる。2 月に採取された成熟花粉においては, さらに細胞質のゴルジ体や粗面小胞体にも Cry j 1 が観察されている。また, Fukui et al. (2001) は発達後期の花粉および成熟花粉から Cry j 1 をコードする mRNA を検出していることから, 花粉の発達後期には花粉内部でも Cry j 1 が合成されていると考えられる。Cry j 1 は N-結合型の糖鎖を持つ分泌型の糖タンパク質 (Sone et al. 1994, Hino et al. 1995) であることから, 花粉内部で合成された Cry j 1 は花粉管伸長の際には細胞外へ分泌され, 胚珠の細胞壁中のペクチンを分解する機能を果たすのだろう。一方, Cry j 2 は成熟花粉のアミロプラスト中のデンプン粒に局在することが明らかになっているが (中村, 2000), 合成される時期や器官については不明である。主に花粉表面に局在する Cry j 1 と比較して, 細胞内部に局在する Cry j 2 は鼻粘膜上で溶出しにくいように思われるが, ほとんどの花粉症患者が Cry j 1 と同様 Cry j 2 にも感作されている (澤谷ら, 1993, Hashimoto et al. 1995)。また, カバノキ属の主要アレルゲン Bet v 1 や牧草 (ホソムギ, rye-grass) の主要アレルゲン Lol p 5 も同様にデンプン粒に局在し, これらは花粉が雨により破裂し空气中に放出されることによって, アレルゲンとして作用すると考えられている (El-Ghazaly et al. 1996, Knox et al. 1996)。

スギ花粉には Cry j 1 と Cry j 2 以外にもアレルゲンが存在する可能性も示唆されており (Midoro-Horiuti et al, 2000, Kawamoto et al. 2002, Futamura et al. 2002), 今後そのアレルゲンとしての重要性が明らかにされるだろう。しかし, 花粉症患者の 90%以上が Cry j 1 と Cry j 2 に対する特異的 IgE 抗体を, すべての患者が少なくともいずれか一方に対する特異的 IgE 抗体を保有していることが報告されており (Hashimoto et al. 1995), Cry j 1 と Cry j 2 が最も重要性の高いアレルゲンであることは確かな事実である。

1.1.3 スギ花粉中のアレルゲン含量の変異

スギ花粉症の原因はスギ花粉そのものというよりもむしろスギ花粉中に含まれるアレルゲンであることから, 花粉中のアレルゲン含量を減らすことは花粉生産量を減少させるのと同様, 花粉症を軽減する効果があると考えられる。オリーブによる花粉症は地中海地方や南北アメリカにおいて一般的なアレルギー疾患のひとつであるが, Sanchez et al. (2002) は 6 つの品種から花粉を採取して主要アレルゲン Ole e 1 の花粉中の含量と *in vitro* で推定されたアレルゲン性の高さを品種間で比較し, Ole e 1 含量とアレルゲン性との間に相関性が認められたことを報告している。オリーブは近年, 商業目的だけではなく緑化木としても利用されることが多いことから, Sanchez et al. は公園や庭には花粉中のアレルゲン含量が少ない品種を選択して植栽することが望ましいと述べている。スギにおいても佐々木ら (1996) の研究によって, 花粉単位重量当たりのアレルゲン含量がクローンによって大きく異なることが明らかになったことから, 花粉症対策品種として「アレルゲン含量の少ないスギ品種」

を新たに利用できる可能性が示唆された。育種によって大きな効果を得るためには、変異が大きいだけでなく遺伝率が高いことが重要である。しかし、アレルゲン含量がどの程度遺伝的要因によって支配されているのか明らかにした研究はほとんどない。

また、アレルゲン含量は遺伝的要因だけではなく環境要因にも影響を受けると考えられる。澤谷ら(1993)は花粉単位重量当たりのアレルゲン含量が採取年や採取地によっても異なることを報告している。澤谷らの研究ではスギの品種やクローン、個体数などには考慮せずに採取した混合花粉を用いているため、その差異が環境の違いによるものか花粉を採取したスギ個体の遺伝的な違いによるものか明らかではないが、アレルゲン含量が環境の違いによって影響を受ける可能性を示唆するものである。また、Saito et al. (2000)も標高の異なる場所に植栽された同一クローンの8個体から採取した花粉中のCry j 1含量の変異を調べ、標高の高い場所に植栽されていた個体から採取した花粉中のCry j 1含量のほうが有意に低かったことを報告している。一方、高橋ら(2002)が2~3年間にわたり同一個体から採取した花粉中のCry j 1含量を調査した結果、年次間で大きな差が認められなかったことから、アレルゲン含量は環境の変化に対してある程度安定した形質であると考えられる。

「アレルゲンの少ないスギ品種」を実用化するためには、環境要因および遺伝的要因がアレルゲン含量にどのような影響を及ぼすか明らかにする必要がある。「アレルゲンの少ないスギ品種」の利用は、アレルゲン含量においてクローンが選抜地と同様の傾向を示す地域に限定することが望ましいので、環境の変化に対する遺伝的特性の安定性が高ければ広い範囲で利用が可能となる。逆にアレルゲン含量がわずかな環境の違いによって大きく影響を受ける場合には、「アレルゲンの少ないスギ品種」の実用化は困難になるだろう。一方、花粉症患者にとってもアレルゲン含量に対する気象条件の影響は重要な問題である。これまでに雄花着花量と気象条件の関係および花粉飛散量と花粉症の関係が明らかにされていて(横山ら, 1993, 平ら, 1997), その結果を統合すると7月に降水量が高く気温が高い、あるいは日射量が多いと翌年は花粉症が悪化すると考えられる。さらに、アレルゲン含量も気象条件に影響を受けるとすると、前年の気象条件が花粉症患者に与える影響はこれまで予想されている以上に大きい可能性がある。

1.2 本研究の目的

1.1.3 で述べてきたように、これまでに花粉単位重量当たりのアレルゲン含量には個体間および採取地、採取年によって変異があることが明らかにされているものの、その変異がどのような要因によって生じるものであるかは明らかではない。また、佐々木ら(1996)が調査に用いたスギは22クローンであり、スギ全体でどの程度の変異があるかは未知数である。将来「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜するにあたっては、アレルゲン含量だけではなく成長や通直性など林業において重要な形質も考慮する必要がある。従って、それらの形質に優れている精英樹から「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜することが望ましく、本研究では精英樹を対象にアレルゲン含量の変異を調査した。また、計画的に研究を進めるために目的の個体から確実に花粉を採取する必要があるため、そのためにはジベレリン処理による着花促進が有効である。しかしジベレリン処理が花粉単位重量当たりのアレルゲン含量に与える影響についてはまだ明らかにされていない。以上のことを踏まえ、アレルゲン含量における遺伝的変異を明らかにするために、本研究ではまず以下の項目について検討を行った。なお本研究に着手した当時、2つの主要アレルゲンのうちCry j 2については定量法が確立されていなかったため、まずCry j 1について研究を進めた。

- 東北、関東、関西、九州育種基本区のスギ精英樹における Cry j 1 含量のクローン間変異を明らかにする。
- ジベレリン処理が花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量に及ぼす影響を明らかにする。
- 複数の場所に共通に植栽されているクローンをを用い、Cry j 1 含量に対する環境要因と遺伝的要因の影響について検討する。

また、佐々木ら（1996）は Cry j 2 含量にも顕著なクローン間変異があることを報告しており、Cry j 2 含量にも考慮することにより、さらに効果の高い改良が可能となると考えられることから、並行して Cry j 2 の定量法を確立し、そのクローン間変異についても調査した。

さらに、当初は予期していなかったことであるが、スギ精英樹における Cry j 1 含量のクローン間変異を研究する中で、使用しているモノクローナル抗体との結合性が低いアイソフォーム（分子構造は異なるが同じ機能をもつタンパク質）を生産するクローンが存在することが明らかになった。定量に使用しているモノクローナル抗体との結合性が低いアイソフォームが存在すると、Cry j 1 の正確な定量が困難になる。本研究で使用している定量法は日本アレルギー協会によって配布されている研究用のアレルゲン抽出液の標準化にも使用されており（安枝ら、1996）、本法で検出できないアイソフォームがあることは重要な問題である。そこでそれらのアイソフォームとそれぞれのモノクローナル抗体との結合性を調べ、アイソフォーム特異性を示すモノクローナル抗体をポリクローナル抗体に置き換えることによって定量法の改良を試みた。また、モノクローナル抗体は Cry j 1 における B 細胞エピトープの研究にも用いられており（Taniai et al. 1993, Suzuki et al. 1996, Sakaguchi et al. 1997）、モノクローナル抗体との結合性の異なるアイソフォームに特異的なアミノ酸変異を推定することは B 細胞エピトープを推定する上で重要であると考えられる。そこでモノクローナル抗体との結合性の異なるアイソフォームを生産するクローンの花粉から Cry j 1 をコードする cDNA を合成して塩基配列を決定し、推定されたアミノ酸配列を比較してモノクローナル抗体との結合性に影響を与えているアミノ酸変異を明らかにした。次にこのアミノ酸変異を簡易に検出する CAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequences）マーカーを開発し、それを用いてスギ精英樹におけるアイソフォームの変異を明らかにするとともに、既報（Kuramaoto et al. 2000）のイワオスギの遺伝子連鎖地図上に Cry j 1 をコードする遺伝子の位置を推定した。

2 スギ花粉中の Cry j 1 含量のクローン間変異

2.1 緒言

林業におけるスギ花粉症対策として、これまでに「花粉の少ないスギ品種」が東北、関東、関西、九州育種基本区において選抜され、利用が進められている。スギ花粉症の主要アレルゲンは Cry j 1, Cry j 2 の 2 種類のタンパク質であることが既に明らかにされていて（Yasueda et al. 1983, Sakaguchi et al. 1990）、スギ花粉症患者の 90%以上がこれらのアレルゲンのいずれかまたは両方に対する特異的 IgE 抗体を保有していることが報告されている（Hashimoto et al., 1995）。近年、佐々木らの研究（1996）によって、花粉単位重量当たりの Cry j 1 および Cry j 2 含量には大きなクローン間変異があることが明らかになったことから、アレルゲンの少ないクローンを選抜し、花粉症対策に有用な「アレルゲンの少ないスギ品種」として利用できる可能性が示唆された。佐々木らの研究では、在来品種および精英樹合計 22 クローンにおいて Cry j 1 では約 10 倍、Cry j 2 では約 400 倍も

の変異が見出されていることから、スギ全体ではさらに大きな変異が存在すると考えられる。

花粉症の軽減は林業において最も解決が望まれる問題のひとつであるが、スギは本来木材生産に利用される樹種であるため、「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜にあたって重要なことは、選抜されたクローンが成長や材質など林業的に重要な特性において優れていることである。林木育種事業の発足以来、成長や通直性に優れた精英樹や気象害抵抗性品種、病虫害抵抗性品種が選抜され、種苗生産に利用されている。現在、精英樹を親として生産された種苗（育種種苗）はスギの造林本数の約 70% を占め（平成 12 年林木育種事業統計による）、種苗生産において主たる役割を果たしている。従って、「アレルゲンの少ないスギ品種」は精英樹の中から選抜するのが望ましい。なお、同様の理由で、既に花粉症対策品種として選抜されている「花粉の少ないスギ品種」も精英樹の中から選抜されている。また、精英樹などの優良品種の選抜や、これらを利用した品種改良および種苗生産は、5 つの育種基本区（北海道育種基本区、東北育種基本区、関東育種基本区、関西育種基本区、九州育種基本区、図 2-1）をベースとして行われているため、「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜は育種基本区ごとに行う必要がある。



図 2-1 育種基本区分と林木育種センターおよび各育種場の位置

そこで本章では、北海道を除く東北、関東、関西および九州の各育種基本区のスギ精英樹を対象に、Cry j 1 含量のクローン間変異を検討した。これらの育種基本区ではそれぞれ 600~1300 のスギ精英樹が選抜されているが、この中からランダムに選んだ 120~160 クローンについて Cry j 1 含量を調査し、クローン間変異を明らかにした。

さらに本章では関東育種基本区の精英樹を対象に、雄花着花性とアレルゲン含量との相関関係についても検討した。単純に言えば、ある個体のアレルゲン性すなわち花粉症を起こしやすさは、花粉生産量とアレルゲン含量の積によって求められるアレルゲンの総生産量で決まる。したがって雄花着花性とアレルゲン含量はどちらも重要な形質であることから、両方を満たすために「花粉の少ないスギ品種」の中から「アレルゲンも少ないスギ品種」が選抜できるとすれば、このような品種は花粉症対策において最も有用であると考えられる。選抜の際には雄花着花性とアレルゲン含量を考慮し総合的に評価する必要があるため、その相関関係についても検討した。

また、佐々木ら (1996)、Kondo et al. (1997) により三倍体の方が二倍体よりもアレルゲン含量が少ないということが報告され、花粉症対策における倍数性育種の重要性が提起されている。スギの三倍体は花粉や孔辺細胞など一部の器官の細胞のサイズが二倍体と比較して大きいという特徴があるが (近藤, 1986, 小田ら, 1988)、成長においては二倍体と同様にクローン間変異があり二倍体に対して特に優劣はない。従って、二倍体と比較して三倍体のアレルゲン含量が有意に少ないとすれば、成長や材質の優れた三倍体を優先的に利用することも花粉症対策の一環として有効であると考えられる。しかし、三倍体は雌花や雄花を着生するものの種子の不稔性が高いため、採種園における種子生産には不向きであり、さらに交雑育種が行えないという大きな欠点がある。従って、三倍体にこの欠点を踏まえた上でなお利用を進めるべき優位性があるかどうか、確認する必要がある。そこで本章では、関東育種基本区のスギ精英樹から発見された三倍体の Cry j 1 含量を二倍体と比較し、花粉症対策における三倍体の有用性について検討した。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

関東育種基本区のスギ精英樹については、平成 8 年と 11 年に林木育種センター交配園 (茨城県十王町) にて計 162 クローンより花粉を採取した。162 クローンの中には、平成 9 年に林野庁によって公表された「花粉の少ないスギ品種」15 クローンのうち 12 クローン (愛甲 1 号, 愛甲 2 号, 足柄下 6 号, 伊豆 8 号, 鰐沢 17 号, 片浦 5 号, 北三原 3 号, 群馬 4 号, 群馬 5 号, 多野 2 号, 津久井 3 号, 比企 13 号) および三倍体 5 クローン (新治 1 号, 久慈 30 号, 秩父県 11 号, 東加茂 1 号, 大井 5 号) が含まれている。また、東北育種基本区, 関西育種基本区, 九州育種基本区のスギ精英樹については、それぞれ平成 7 年, 平成 12 年, 平成 7 年に東北育種場 (岩手県滝沢村), 関西育種場 (岡山県勝央町), 九州育種場 (熊本県西合志町) において 129 クローン, 99 クローン, 132 クローンより花粉を採取した (図 2-1)。採取する前年の 7 月上旬にジベレリン処理による着花促進を行い, 2 月に雄花が着花している枝を採取してグラシン紙製の交配袋をかけて水挿しし, 開花後直ちに花粉を採取した。採取した花粉は 4℃でシリカゲルと共存させて乾燥させた後, -30℃で保存した。

2.2.2 Cry j 1 の抽出

澤谷らの報告 (1993) を参考にして, 5ml の 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液に花粉 100mg を懸濁し, 2℃ で 2 時間浸とう抽出を行った。その後 2000g で 15 分間遠心分離をおこない, 上澄を採取した。

2.2.3 サンドウィッチ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 法による Cry j 1 の定量

抽出液中の Cry j 1 濃度の定量は J1B01, J1B07 の 2 種類のモノクローナル抗体 (Miki-Hiroshige et al. 1994) を用いて行った。ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp, Nalge Nunc International, Rochester, NY USA) の各ウェルに, 0.1M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝溶液 (pH9.6) で 2ng/μl に希釈した J1B07 を 100 μl 加え 4℃で一晩吸着させた後, 1%のウシ血清アルブミン (BSA, w/v) を含むリン酸緩衝溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) を加え, 37℃で 1 時間ブロッキングした。次に, 0.2%の Tween 20 を含むリン酸緩衝溶液 (PBS-T, w/v) で 4 回洗浄後, 0.2%の BSA を含む PBS-T (PBS-T-BSA, w/v) で希釈した精製 Cry j 1 標準溶液 (日本アレルギー学会より供与) およびスギ花粉抽出液を 100μl 加えて 37℃で 2 時間反応させた。PBS-T で 4 回洗浄後, PBS-T-BSA で 1ng/μl に希釈したビオチン化した J1B01 を 100μl 加えて 37℃で 2 時間反応させた。PBS-T で 4 回洗浄後, 1 ウェル当たり 0.03U の β-ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を加えて 37℃で 1 時間反応させた。PBS-T で 4 回洗浄後, 0.02M リン酸二水素ナトリウム水溶液で調製した 5mM σ-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド 100μl を加えて 37℃で 1 時間酵素反応を行った。1.0M 炭酸ナトリウム溶液 100μl を加えて反応停止後, マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA USA) で 415nm での吸光度を測定し, 精製 Cry j 1 標準溶液の吸光度から求めた標準曲線に基づき, 各スギ花粉抽出液中の Cry j 1 濃度を算出した。Cry j 1 濃度の算出には Microplate manager II (Bio-Rad) を用いた。

2.3 結果

2.3.1 関東育種基本区で選抜された精英樹における Cry j 1 含量のクローン間変異

関東育種基本区で選抜された精英樹 162 クローンについて Cry j 1 含量を調査した結果, このうち 4 クローンにおいて Cry j 1 が検出されなかった。これらのクローンが Cry j 1 を生産しない突然変異体であれば, 花粉症対策品種として有望である。しかし, 定量法の問題で Cry j 1 が検出されなかった可能性も考えられることから, これらのクローンについては第 5 章にて詳細に検討することとし, 本章においてはこれらのクローンを除く 158 クローンを対象に検討を進めることにした。Cry j 1 含量のクローン間変異について表 2-1 および図 2-2 に示した。

表 2-1 各育種基本区のスギ精英樹における Cry j 1 含量のクローン間変異

育種基本区	Cry j 1 含量 (μg/g pollen)			
	平均値	最大値	最小値	Scheffeの多重比較
関東	539	1320	16	a
東北	441	1420	22	bc
関西	518	1200	37	ab
九州	341	910	61	c

※Scheffeの多重比較において5%水準で有意差のなかったものを同じアルファベットで示した。

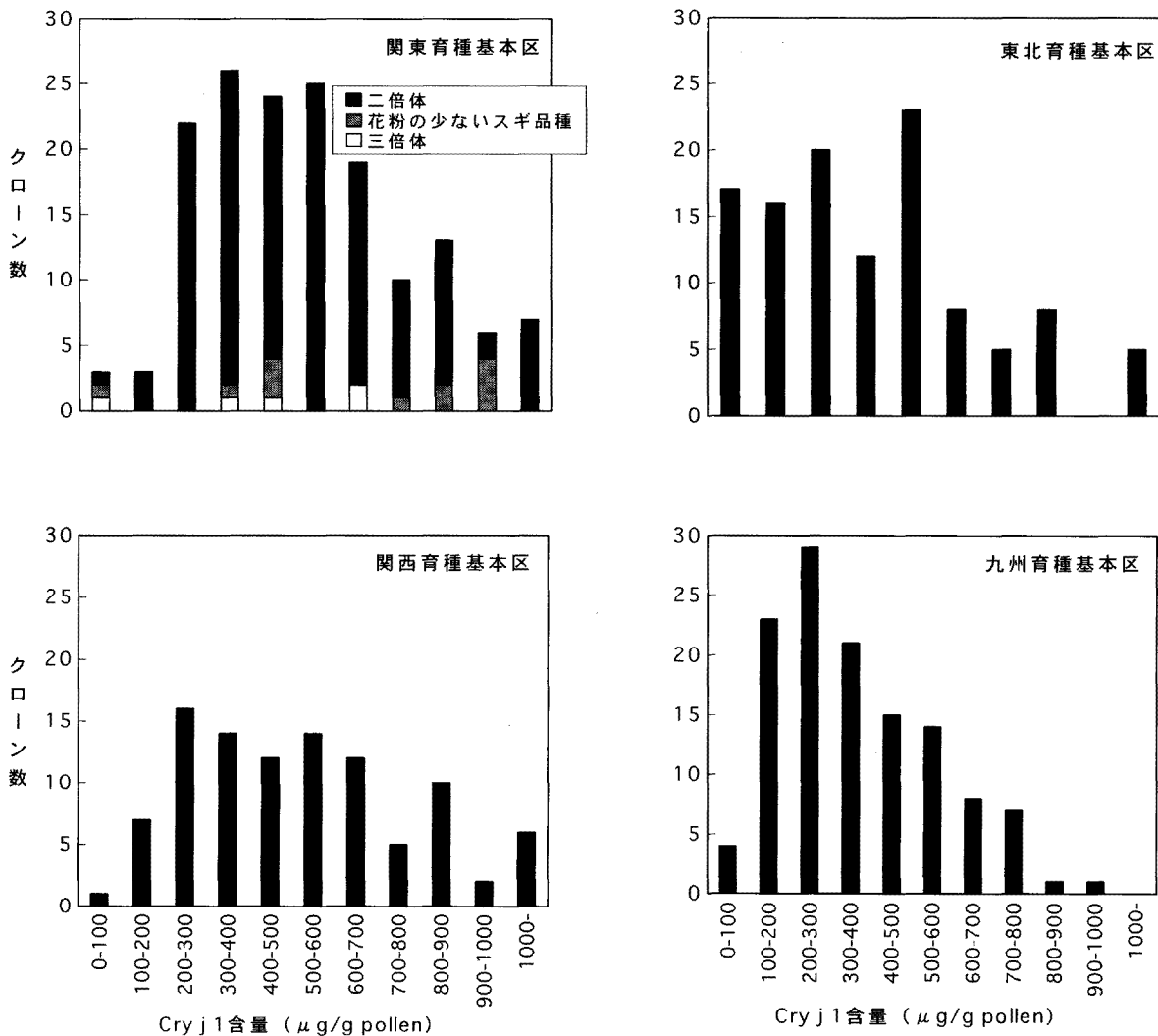


図 2-2 各育種基本区における Cry j 1 含量のクローン間変異

花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量の最大値は 1320μg, 最小値は 16μg であり, 約 80 倍の差があり, その頻度は花粉 1g 当たり 200~600μg を中心に山型の分布を示した (図 2-2)。また, 三倍体と二倍体の平均値を比較すると三倍体の方が少なかったが, 三倍体における最も少ないクローンは 66μg, 最も多いクローンは 632μg と約 10 倍のクローン間変異が認められ, すべての三倍体の Cry j 1 含量が少ないということではなかった (表 2-1, 図 2-2)。「花粉の少ないスギ品種」における花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量の平均値は 652μg であり, 全体の平均値 535μg よりも高めであった。しかし中には 16μg と Cry j 1 含量の少ないクローンも見出されたことから, 雄花着花性が低くアレルゲン含量も少ない品種が選抜できる可能性が示唆された。

2.3.2 東北, 関西, 九州育種基本区で選抜された精英樹における Cry j 1 含量のクローン間変異

東北育種基本区において 7 クローン, 九州育種基本区において 9 クローン, Cry j 1 が検出されないクローンがあったため, これらを除く 122 クローンおよび 123 クローンをを用いて Cry j 1 含量の変異について検討を行った。いずれの育種基本区の精英樹においても, Cry j 1 含量には関東育種基本区と同様顕著なクローン間変異が認めら

れた (図 2-2, 表 2-1)。Cry j 1 含量は育種基本区間で有意な差があり, その平均値は関東育種基本区, 関西育種基本区, 東北育種基本区, 九州育種基本区の順に高かった。Scheffe の多重比較の結果, 関東育種基本区の精英樹における Cry j 1 含量の平均値は東北育種基本区と九州育種基本区の精英樹における平均値よりも有意に高く, 関西育種基本区の精英樹における Cry j 1 含量の平均値は九州育種基本区の精英樹における平均値よりも有意に高かった ($p<0.05$, 表 2-1)。

2.4 考察

いずれの育種基本区においても Cry j 1 含量のクローン間変異は大きく, 最大値と最小値を比較すると 15~80 倍の顕著な差があった。さらに Cry j 1 含量の頻度を見ると, 山型の幅広い分布を示していた。従って, Cry j 1 含量が比較的少ないクローンを複数選抜できると考えられ, 遺伝的変異を保ちつつ改良を進めることが可能であることが示唆された。また, アレルゲン含量の少ないクローンを利用すると同時にアレルゲン含量の多いクローンを除くことによって, さらに花粉症の軽減をはかることができるだろう。

「花粉の少ないスギ品種」の 12 クローンにおける Cry j 1 含量の平均値は全体の平均値より高かったもののクローン間変異が認められ, 中には Cry j 1 含量の少ないクローンも存在したことから, 雄花着花性だけではなくアレルゲン含量にも着目することにより, より効果の高い花粉症対策品種を選抜できると考えられる。「花粉の少ないスギ品種」の選抜において既に多数のクローンについて雄花着花性に関するデータが蓄積されているので, これらのデータを基に比較的雄花着花性の低いクローンを選んで Cry j 1 含量を調査し, その中から「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜することが実行上望ましい。

二倍体と三倍体の Cry j 1 含量の平均値を比較すると, 二倍体よりも三倍体の方が小さかった。しかしすべての三倍体の Cry j 1 含量が少ないわけではなく, 三倍体においても二倍体と同様にクローン間変異が認められた。また, 三倍体において極端に Cry j 1 含量の少ないクローンが見出されることもなかった。佐々木ら (1996) は三倍体よりも二倍体におけるクローン間変異の方が大きいことを認めているものの, アレルゲン含量が二倍体よりも三倍体の方が少ない傾向があることから三倍体の重要性を述べている。しかし, 三倍体は全国の精英樹でも 40 クローン程度が報告されているのみであり, さらにそのすべてにおいて Cry j 1 含量が少ないわけではないため, 利用できるクローンは多くないだろう。また三倍体には, 種子の不稔性が高いため採種園方式による種子生産に馴染まず, さらに交雑による改良が難しいという欠点がある。九州を除く地域ではさし木よりも実生による苗木生産が好まれる傾向にあるため, 採種園での種子生産が不可能だと普及が進まない可能性が高い。また, スギは林業樹種であるため, アレルゲン含量が少ないというだけでは不十分であり, 成長や材質においても優れている必要がある。その点において二倍体は交雑による改良が可能であることから, Cry j 1 含量が少なくかつその他の特性においても優れたクローンを育成できる可能性がある。あるいは Cry j 1 含量の少ないクローン同士をかけ合わせることで, Cry j 1 含量がさらに少ない品種を創出できるかも知れない。また, 三倍体は種子の不稔性は低いものの, 雄花を発達させ花粉を生産するため, 花粉症対策において二倍体に対する優越性はない。「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜において特に三倍体に注目する必要はなく, むしろ二倍体を利用して改良を進める方が適切であると考えられる。

本研究に供試したスギ精英樹における花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量の平均値は, 東北育種基本区, 関東育種基本区, 関西育種基本区, 九州育種基本区においてそれぞれ 441 μ g, 539 μ g, 518 μ g, 366 μ g であった。澤谷ら (1993)

は複数年にわたり神奈川、福島、千葉、秋田、奈良の各県で採取した花粉中の Cry j 1 および Cry j 2 含量を調査し、Cry j 1 の平均値は 250~450 μ g 程度であったことを報告している。一方、主に九州の精英樹を対象とした佐々木らの研究（1996）では Cry j 1 含量の平均値は 181.6 μ g であり、澤谷らの結果と比較して低い傾向にあった。本研究における Cry j 1 含量の平均値は澤谷ら、佐々木らの報告と比較して高いが、澤谷らの研究では混合花粉を用いているため供試した個体および個体数が明らかではなく、佐々木らの研究では供試クローン数が少ないことから、単純に比較することは難しい。そして平均値は異なるものの、東北、関東、関西育種基本区では 200~600 μ g の範囲の頻度が高く、九州育種基本区では 100~400 μ g の範囲の頻度が高いことから、大きく異なる結果ではないと考えられる。

各育種基本区の Cry j 1 含量の平均値には有意差があり、特に関東育種基本区において高く九州育種基本区において低かった。東北、関東、関西で採取した花粉を用いた澤谷らの報告と九州で採取した花粉を用いた佐々木らの報告を比較すると、同様の傾向が認められ興味深い。材料に用いた精英樹は各育種基本区内で選抜されたものであり、現在では主に精英樹のさし木苗や実生苗が一般造林地に供されている。従って、各育種基本区の精英樹における Cry j 1 含量の変異は、各地で飛散している花粉中の Cry j 1 含量を反映しているものと考えられる。これまでの報告によると（井上ら、1988、宇佐神ら、1988、中村ら、1999）、スギ花粉症罹患率およびスギ花粉に対する抗体保有率は関東地方、東海地方、中部地方で高い。これらの地方でスギ・ヒノキ花粉の飛散量が多いことが第一の原因と考えられているが、これらの地方を含む関東育種基本区の精英樹における Cry j 1 含量が高かったことから、花粉飛散量だけではなく花粉中の Cry j 1 含量が多いことも影響している可能性が示唆された。

2.5 結論

東北、関東、関西、九州のいずれの育種基本区の精英樹においても、花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量には 15~80 倍のクローン間変異が認められたことから、Cry j 1 含量の少ないクローンを選抜して利用することにより、花粉症を軽減できる可能性が示された。また、三倍体においても二倍体と同様 Cry j 1 含量のクローン間変異が認められ、二倍体と比較して顕著に Cry j 1 含量が少ないという結果は得られなかった。

東北育種基本区、関東育種基本区、関西育種基本区、九州育種基本区における花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量の平均値は 441 μ g、539 μ g、518 μ g、366 μ g であり、Scheffe の多重検定の結果 5%水準で有意差が認められ、特に花粉症の罹患率が高い関東育種基本区および関西育種基本区のスギ精英樹における Cry j 1 含量が高いことが明らかになった。

3 ジベレリン処理による雄花着花促進が Cry j 1 含量に及ぼす影響

3.1 緒言

第 2 章において、花粉中の Cry j 1 含量には大きなクローン間変異があり、Cry j 1 含量の少ないクローンを選抜して利用することにより花粉症の軽減に寄与できる可能性を示した。花粉症対策品種として最も望ましいのは花粉（雄花）が少なく、かつアレルゲンも少ないクローンである。しかしこのようなクローンを選抜するためには、雄花を着けにくいクローンからも花粉を採取し、花粉中のアレルゲン量を調査する必要がある。また、確実にアレルゲン含量の少ないスギ品種を選抜するためには、複数年にわたりアレルゲン含量を調査する必要がある。しかしスギの雄花着花量には年次変動があり、林木育種センターの遺伝資源保存園（旧クローン集植所）におけ

る調査では、凶作年（雄花着花量が少ない年）には約 69%の個体で着花が認められなかったと報告されている（千田ら, 1998）。従って、雄花着花性の個体およびクローン間差、年次変動に影響されずにアレルゲン含量の調査を行うためには、人工的に雄花を誘導し花粉を採取することが望ましい。

人工的な着花促進は、採種園において効率的かつ持続的に種子生産を行うために不可欠な技術である。古くから用いられてきた着花促進技術のひとつがジベレリン（GA₃）処理である。ジベレリンは成長や花芽分化に関与する植物ホルモンとして知られるジテルペノイドであり、これまでに 100 以上のジベレリンが単離されている。このうち GA₃はスギの花芽分化期に葉中濃度が急激に増大することが明らかにされていて（本間, 2003）、GA₃を与えることにより花芽の形成が促進される。スギの場合、雄花が分化する 6 月下旬から 7 月上旬に GA₃の水溶液を葉面散布し、または GA₃を枝や幹に埋め込むことによって雄花着花が誘導され、7 月中旬から 8 月に同様の処理を行うと雌花着花が誘導される（加藤ら, 1958, 橋詰, 1959）。この方法により誘導した雄花を利用できれば、効率よくアレルゲン含量の調査を行うことができる。そのためにはまず、ジベレリン処理により花粉中のアレルゲン含量が影響を受けるかどうか明らかにしておく必要がある。そこで本章においては、精英樹 8 クローンについて、埋幹によるジベレリン処理を行った個体と行っていない個体、それぞれ 3-6 個体から花粉を採取し、その Cry j 1 含量を比較した。また、葉面処理によるジベレリン処理の影響を調べるために、同一個体内のジベレリン処理をした枝としていない枝から花粉を採取し、Cry j 1 含量の差異を調べた。

「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜効果すなわち遺伝獲得量は、選抜差と遺伝率の積で示されるため、高い選抜効果を得るためには変異が大きく遺伝率が高いことが必要である。遺伝率には狭義の遺伝率と広義の遺伝率とがあり、表現型分散に対する相加的遺伝分散の寄与率で表されるのが狭義の遺伝率であり、表現型分散に対する相加的遺伝分散と非相加的遺伝分散の和の寄与率で表されるのが広義の遺伝率である。

表現型分散（V_P）は遺伝子型分散（V_G）と環境分散（V_E）の和として表すことができ、遺伝子型分散はさらに相加的遺伝分散（σ²_A）、非相加的遺伝分散（σ²_D）、エピスタシス分散（σ²_I）に分けることができる。従って、広義の遺伝率および狭義の遺伝率は以下の式で表すことができる。

$$\text{狭義の遺伝率 } h^2 = \sigma^2_A / (\sigma^2_A + \sigma^2_D + \sigma^2_I + \sigma^2_E)$$

$$\text{広義の遺伝率 } h^2 = (\sigma^2_A + \sigma^2_D + \sigma^2_I) / (\sigma^2_A + \sigma^2_D + \sigma^2_I + \sigma^2_E)$$

狭義の遺伝率の算出には血縁関係の明らかな人工交配あるいは自然交配家系を用いる必要があるが、広義の遺伝率についてはクローン間の変異から算出することが可能であり、この場合求められる広義の遺伝率は反復率とも呼ばれる。採種園で生産される種子からの実生苗の利用を想定した遺伝獲得量の推定には狭義の遺伝率が必要であるが、クローン増殖を行う場合には遺伝子型はそのまま後代に伝わるため反復率を用いることができる。本章では「アレルゲンの少ないスギ品種」の効果を推定する上で必要な基本情報のひとつとして、クローンにおける反復率を求めた。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

2000 年 3 月、茨城県林業技術センター（茨城県那珂町）の 2 つの採種園（No. 1, No. 6）に植栽されているス

ギ精英樹 8 クローン (久慈 2 号, 久慈 3 号, 久慈 18 号, 久慈 20 号, 久慈 37 号, 多賀 4 号, 筑波 2 号, 那珂 3 号,) の計 71 個体から花粉を採取し, 供試した。No. 1 と No. 6 は同じ敷地内に隣接しており, それぞれ 1970 年と 1992 年に設定されたものである。No. 6 に植栽された個体はこれまでにジベレリン処理を行ったことがないため, これらをコントロール (無処理木) として用いた。No. 1 に植栽された個体に対して 1999 年 7 月に 1 個体あたり 5mg のジベレリンを幹に埋め込み, ジベレリン処理 (阿久沢, 1988) を行った。花粉採取は 2.2.1 の方法で行った。各採種園における各クローンの供試個体数を表 3-1 に示した。

表 3-1 供試した各クローンの個体数

クローン	GA 処理 (No.1)	無処理 (No.6)
久慈 2	4	5
久慈 3	5	3
久慈 18	5	5
久慈 20	2	4
久慈 37	5	5
那珂 3	6	3
筑波 2	5	4
多賀 4	5	5
合計	37	34

葉面処理によるジベレリン処理の Cry j 1 含量に対する影響については, 林木育種センター交配園 (茨城県十王町) に植栽されているスギ精英樹岩瀬 2 号 (1 個体), 田村 2 号 (2 個体), 田村 3 号 (3 個体) の計 6 個体を用いて検討した。葉面処理はジベレリン水溶液に枝を浸す浸漬法によって行った。噴霧器を用いる葉面散布と異なり, 浸漬法では特定の枝を確実に処理できるため, 多量の花粉を必要としないアレルゲン含量の調査に適していると考えられる。1999 年 7 月, 100ppm のジベレリン水溶液を浸漬処理してジベレリン処理を行い, 2000 年 2 月に各個体のジベレリン処理した枝とジベレリン処理していない自然着花している枝から花粉を採取した。

3.2.2 Cry j 1 の抽出および定量

2.2.2 の方法で行った。

3.2.3 統計解析

ジベレリン処理の Cry j 1 含量に対する影響を検討するために, Stat View v. 4.5 (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA USA) を用い, 処理の有無, クローン, クローン×処理の交互作用を要因とした分散分析を行った。クローン反復率は遺伝分散としてクローン間分散を, 環境分散としてクローン×処理 (採種園) の交互作用分散と誤差分散を考慮し, 以下の式により算出した。

$$R = V_G/V_P = \sigma_c^2/(\sigma_e^2 + \sigma_{ct}^2 + \sigma_c^2)$$

V_P =表現型分散

V_G =遺伝子型分散

σ_c = クローン間分散

σ_{ct} = クローン×処理の交互作用分散

σ_e = 誤差分散

3.3 結果

3.3.1 ジベレリン処理による雄花着花促進が Cry j 1 含量に及ぼす影響

各採種園における各クローンの Cry j 1 含量の平均値は 130~687 μ g であり、分散分析の結果、クローン間では有意差が認められた ($p<0.01$, 図 3-1, 表 3-2a)。一方、ジベレリン処理の有無においては有意差が認められなかったことから、ジベレリン処理は Cry j 1 含量に影響を与えないことが示唆されたものの ($p>0.05$, 表 3-2a), クローン $\times$ 処理の交互作用が有意となった ($p<0.01$)。この結果は、全クローンを込みにした平均値はジベレリン処理の有無により影響を受けないが、クローンによってはジベレリン処理によって Cry j 1 含量が大きく変化するものがあり、クローンの順位が入れ替わっていることを示している。そこでクローンごとにジベレリン処理した個体と無処理の個体の Cry j 1 含量の平均値を比較してみると、8 クローンのうち 7 クローンでは処理を行った個体における平均値と無処理の個体における平均値とがほぼ同程度であり、久慈 3 号のみが大きく異なる傾向を示した (図 3-1)。そこで久慈 3 号を除いた 7 クローンで分散分析を行ったところ、クローン間では有意差が認められたものの ($p<0.01$)、ジベレリン処理の有無による有意差は認められず、クローン $\times$ 処理の交互作用も有意ではなかった ($p>0.05$, 表 3-2b)。この結果から、8 クローンでの分散分析におけるクローン $\times$ 処理の交互作用は久慈 3 号によるものであることが確認された。また、久慈 3 号の個体ごとの Cry j 1 含量を比較してみると、ジベレリン処理した個体においてはほぼ同程度であったが、無処理の個体の間でばらつきがあり、3 個体のうち 1 個体はジベレリン処理した個体と同程度の Cry j 1 含量であったものの他の 2 個体はその半分程度であった (図 3-2)。

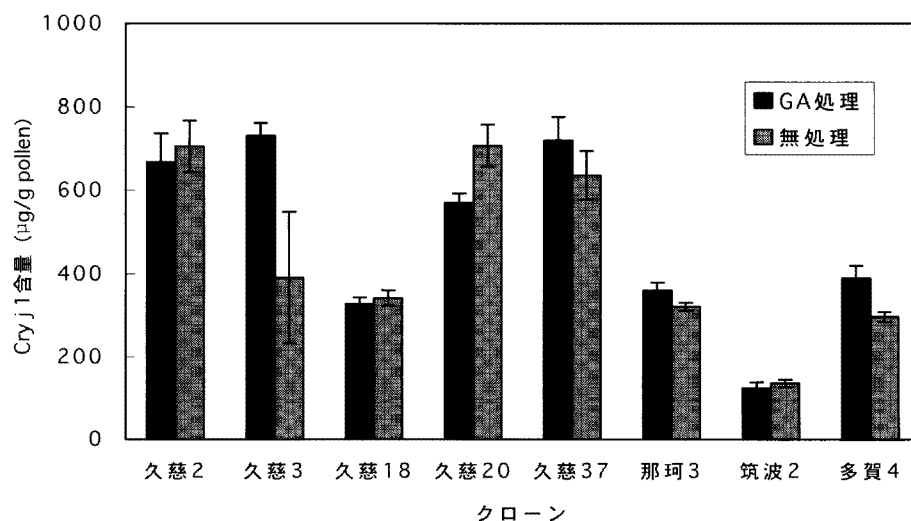


図 3-1 ジベレリン処理が Cry j 1 含量に及ぼす影響 (エラーバーは標準誤差を示す。)

表 3-2a 8 クローンにおける Cry j 1 含量に関する分散分析表

	自由度	平均平方	p	期待される分散成分
処理	1	0.0317	0.701	
クローン	7	0.3621	<0.0001	$\sigma_e^2 + 4.12 \sigma_{ct}^2 + 8.24 \sigma_c^2$
クローン $\times$ 処理	7	0.0349	0.0021	$\sigma_e^2 + 4.12 \sigma_{ct}^2$
誤差	55	0.0093		

表 3-2b 久慈 3 号を除く 7 クローンにおける Cry j 1 含量に関する分散分析表

	自由度	平均平方	p
処理	1	0.00004	0.9427
クローン	6	0.40679	<0.0001
クローン×処理	6	0.01845	0.1818
誤差	49	0.00699	

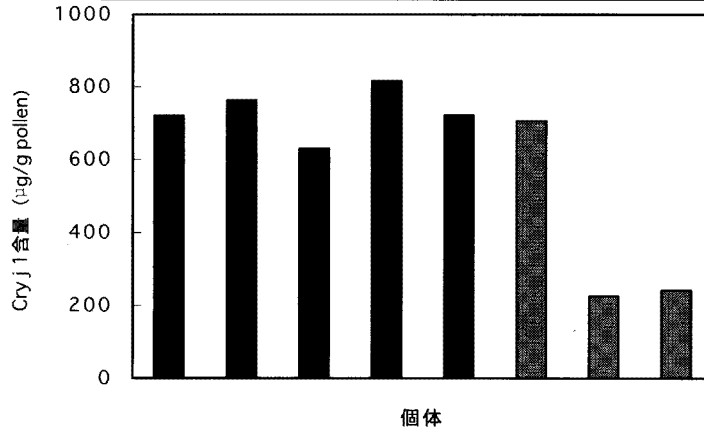


図 3-2 久慈 3 号における Cry j 1 含量の個体間変異

3.3.2 花粉中の Cry j 1 含量の反復率

8 クローンによる分散分析の結果から、クローン反復率を推定した。クローン間分散、クローン×ジベレリン処理の交互作用分散および誤差分散の推定値はそれぞれ 0.164, 0.033, 0.009 であり、分散成分の寄与率は 79.6%, 15.9%, 4.5%であった。従って、クローン反復率は 0.796 と推定された。

3.3.3 葉面処理によるジベレリン処理の Cry j 1 含量に対する影響

各個体のジベレリン処理枝から採取した花粉と自然着花枝から採取した花粉中の Cry j 1 含量について図 3-3 に示した。いずれの個体もジベレリン処理枝、自然着花枝とも同様の Cry j 1 含量を示した。同一クローン内で比較すると、田村 2 号の 2 個体はほぼ同量の Cry j 1 含量を示したが、田村 3 号では 3 個体のうち 1 個体における Cry j 1 含量が他の 2 個体と比較して小さく、約半分であった。

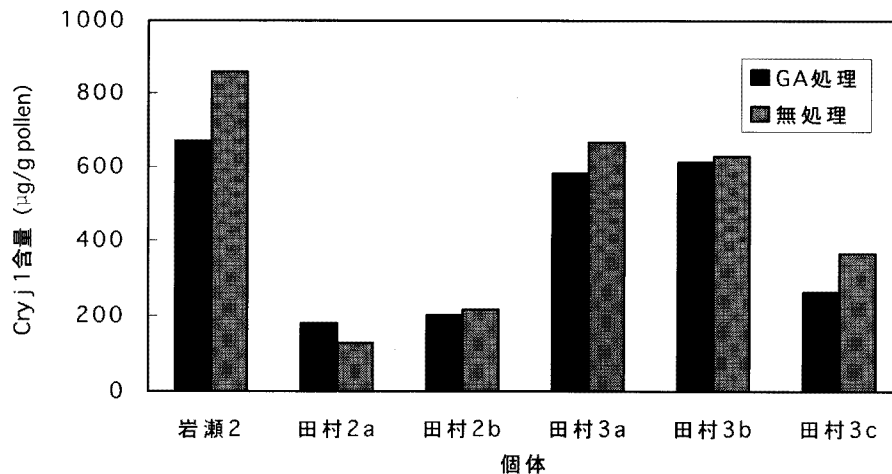


図 3-3 葉面処理によるジベレリン処理が Cry j 1 含量に及ぼす影響

3.4 考察

アレルゲンの変異を調査するに当たって確実に花粉を採取するためには、ジベレリン処理による着花促進を行うことが望ましい。そこで本章では、埋幹および葉面散布によるジベレリン処理の Cry j 1 含量に対する影響を調べた。

幹への埋め込みによりジベレリン処理を行った場合、その影響がどの程度の期間持続するものであるか分からないため、ここではコントロールとして設定後 1 度もジベレリン処理を行っていない比較的新しい採種園に植栽されている個体を使用した。ジベレリン処理を行った採種園 (No.1, 1970 年設定) と無処理の採種園 (No.6, 1992 年設定) は平坦地に隣接して設定されているため、採種園の環境には差がないと考えた。ジベレリン処理の有無、クローン、クローン×処理の交互作用を要因とした分散分析において、ジベレリン処理の有無において有意差は認められなかったが、クローン×処理の交互作用は有意となった。しかしこの交互作用は 8 クローンのうちの 1 クローン、久慈 3 号に起因するものであり、他の 7 クローンによる分散分析では交互作用は有意にならなかった。また、久慈 3 号の個体間で Cry j 1 含量を比較した結果、ジベレリン処理した個体としていない個体の平均値の差異は、ジベレリン処理の影響によるものではなく個体間のばらつきによるものであると考えられた。Saito et al. (2000) はジベレリン処理が花粉 1 粒当たりの Cry j 1 含量に対して影響を与えないことを報告しているが、本章の結果もそれを支持するものであり、ジベレリン処理による着花促進を利用して花粉中の Cry j 1 含量を評価することが可能であることが明らかになった。

久慈 3 号において個体間で Cry j 1 含量に差異が認められた原因のひとつとして、増殖や植栽の際のクローンの取り違えが考えられる。そこでクローンの取り違えを検出するために、既報 (金山ら, 2002) でスギ精英樹の個体識別に用いた Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) マーカーによる分析を行ったが、Cry j 1 含量の異なる個体の間でバンドパターンの違いは見出せなかった。従って、久慈 3 における個体間での Cry j 1 含量の差異は、ほかの原因によるものである可能性が高い。材料として用いた個体はすべて、平坦地に隣接して設定された 2 つの採種園に植栽されているため、同一の環境下に生育しているものと考えたが、土壌条件や水分条件、気象に微小な違いがある可能性がある。クローンによって立地環境の変化に対する反応性が異なり、久慈 3 号は微小な環境の違いに特に敏感に反応したのかも知れない。一方、葉面処理によるジベレリン処理の影響を調べた実験でも同様に、田村 3 号の 3 個体の中の 1 個体が他の 2 個体と比較して約半分と少ない Cry j 1 含量を示した。しかし、いずれの個体においても同一個体内のジベレリン処理した枝と無処理の枝との間には Cry j 1 含量に差異がなかったため、個体間の差異はジベレリン処理によるものではないと考えられた。

本章の結果からジベレリン処理は Cry j 1 含量に対して影響を与えないことが示され、ジベレリン処理による着花促進を利用して効率的に Cry j 1 含量の少ない品種の選抜を行うことができることが明らかになった。ただし、久慈 3 号のようにクローン内での個体間変異が大きいクローンが存在する可能性があることから、確実に Cry j 1 含量の少ないクローンを選抜するためには 2 段階で選抜を行う必要がある。まず、多くのクローンから効率的にスクリーニングするために、1 個体または少数の個体にジベレリン処理を行って花粉を採取し、Cry j 1 含量の少ない品種の候補クローンを選抜する。次に候補クローンの複数個体から複数年次にわたって花粉を採取して Cry j 1 含量を調査し、Cry j 1 含量が安定して少ないクローンを選抜する、といった手順である。また本章で用いた 2 つの採種園は設定年度が異なり樹齢が約 22 年違うにも関わらず、久慈 3 号を除く 7 クローンでは、ク

ローン×処理（採種園）の交互作用が有意ではなかったことから、「アレルゲンの少ないスギ品種」をクローン増殖した場合、増殖した年次に関わらず同一クローンの個体は同様に Cry j 1 含量が少ないことが期待できる。また、苗木の段階でジベレリン処理による着花促進により花粉を採取し、アレルゲン含量を評価できる可能性も考えられる。

本章で算出されたクローン反復率は 0.796 と高いものであり、Cry j 1 含量は比較的安定したクローン特性を示すことが明らかとなった。この結果は第 2 章で示された大きな個体間変異とともに、アレルゲン含量における改良の高い有効性を示唆するものである。また、斎藤ら（2003）は母親が共通した 11 の F₁ 家系を用いて花粉 1 粒当たりの Cry j 1 含量の遺伝率を推定した結果、1 以上の高い遺伝率が得られたことを報告している。斎藤ら（2003）によると花粉 1 粒当たりの重量はクローン間で大きな差がないことから、斎藤らの報告した遺伝率は花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量における遺伝率と言い換えることができる。従って、アレルゲンの少ないスギ品種から得られた実生苗もまたアレルゲン含量が少なく、さし木による増殖だけではなく採種園に「アレルゲンの少ないスギ品種」を導入することによってもアレルゲンの少ないスギを生産することが可能であると考えられる。

一方、花粉症対策において最も重要な形質である雄花着花性においても、大きなクローン間変異があることが明らかにされている（千田ら，1998，戸田ら，1996）。特に豊作年には、雄花着花性の高いクローンは樹冠全体に雄花が観察されるほど大量に雄花を着けるものの、雄花着花性の低いクローンはほとんど雄花を着けないことから、雄花着花性のクローン間変異はアレルゲン含量におけるクローン間変異よりも大きい可能性がある。しかし増田ら（1993）によって報告されている雄花着花量におけるクローン反復率は 0.076 および 0.106 であり、Cry j 1 含量のクローン反復率と比較してかなり低い。また、雄花着花性は定量的に評価することが難しく、同一クローンあるいは同一個体内でも日当たりなどの局所的な環境の違いによって影響を受けるという欠点がある（千田ら，1998）。一方アレルゲン含量は定量的でより正確な評価が可能である。雄花着花性とアレルゲン含量は、ともに花粉症対策において重要な形質であると同時に相互の欠点を補完し合う関係にあり、両方を考慮することによってより効果的に空中アレルゲン量を減少させることができると期待できる。

3.5 結論

幹への埋め込みおよび葉面処理によるジベレリン処理は、花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量に対して影響を与えないことが明らかになり、ジベレリン処理による着花促進を利用して効率的に Cry j 1 含量の調査を行うことができることが示された。

Cry j 1 含量のクローン反復率を推定した結果、0.796 と高い値が得られた。また、設定年度が異なる採種園に植栽されている同一クローンの個体間で Cry j 1 含量に差がなかったことから、増殖した年次に関わらずクローンであれば同様の Cry j 1 含量を示すと考えられ、「アレルゲンの少ないスギ品種」をクローンで利用した場合、高い効果が期待できることが明らかになった。しかし一方、個体間で Cry j 1 含量が安定しないクローンも見出されたことから、「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜においてはクローン内の変異にも注意を払う必要がある。従って、まず多数のクローンについて Cry j 1 含量を調査して候補クローンを絞り込み、さらに候補クローンについて複数個体を用いて Cry j 1 含量を調査した後に、最終的に「アレルゲンの少ないスギ品種」を決定すべきだと考えられる。

4 植栽場所の違いが Cry j 1 含量の変異に及ぼす影響

4.1 緒言

第 3 章において Cry j 1 含量が高いクローン反復率を示したことから、Cry j 1 含量は遺伝的にコントロールされていることが明らかになった。しかし、第 3 章ではほぼ同一の環境下に生育している個体を材料としていたため、ある一定の環境条件下ではクローンごとの Cry j 1 含量は安定したものであると言えるが、それが環境の変化に対してどの程度安定したものであるかは不明である。しかし実際に「アレルゲンの少ないスギ品種」の普及を進める際には、アレルゲン含量が環境の変化によって受ける影響について明らかにし、選抜地と同様のクローン特性が発現することを期待できる地域に配布を限定する必要がある。Saito et al. (2000) は標高の異なる 2 ヶ所に植栽された同一クローンの各 4 個体から採取した花粉中の Cry j 1 含量を比較した結果、Cry j 1 含量は標高の低い植栽地の個体において有意に少なかったことを報告している。また、Ahlholm et al. (1998) はカバノキ属花粉症の主要アレルゲンの 1 つである Bet v 1 について、2 ヶ所に植栽されたケカンバ (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii*) の半兄弟家系 8 家系を材料として同様の研究を行い、植栽地間で有意な差を見出している。しかし Ahlholm et al. の研究では、家系×植栽地の交互作用が有意ではなかったことから、Bet v 1 含量は植栽地の環境に影響されるものの、それぞれの植栽地における家系の順位には大きな変動がなかったと考えられる。「アレルゲンの少ないスギ品種」の配布区域を決定するときには、配布区域内で各クローンのアレルゲン含量そのものに変動があるかどうかよりも、むしろクローンの順位が変わらず、選抜されたクローンのアレルゲン含量が相対的に少ないことが重要である。関東育種基本区は気象や地形などの環境条件を考慮し、北関東育種区、関東平野育種区、中部山岳育種区、東海育種区の 4 つの育種区に細分されている。本章では、このうち北関東育種区に属する福島県郡山市、栃木県今市市と関東平野育種基本区に属する千葉県木更津市、茨城県十王町に共通して植栽されているクローンを用いて、Cry j 1 含量の変異を調査した。

これまで Ahlholm et al. (1998)、Saito et al. (2000) が指摘しているように、アレルゲン含量は植栽地の気象条件に影響を受ける可能性がある。これまでの研究で、雄花が分化する 7 月の降水量、気温、日射量が雄花着花量に影響を与えることが明らかにされているが (横山ら, 1993, 平ら, 1997)、アレルゲン含量に対する気象要因の影響について調査した例はない。春先の花粉飛散量と花粉症患者数や花粉症患者の血清中の IgE 抗体量との間に相関関係があることから (Ozasa et al. 2002, Okawa et al. 2002)、空中アレルゲン量が増加すれば花粉症も悪化すると考えられる。従って、アレルゲン含量が雄花着花量と同様に気象条件に影響を受けるとすると、前年の気象条件と花粉症の重症度との関係はこれまで予想されている以上に深いものである可能性がある。また長期的に見れば、近年問題となっている地球温暖化によって花粉中のアレルゲン含量が増加するのではないかとこの懸念もある (Ahlholm et al. 1998)。そこで本章では、雄花が分化する 7 月から開花する 2 月までの気温、降水量と Cry j 1 含量の相関関係についても検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

福島県林業研究センター採種園 (郡山市)、栃木県林業センター採種園 (今市市)、林木育種センター交配園 (茨城県十王町)、千葉県森林研究センター採種園 (木更津市) の合計 4 ヶ所のうち 2~3 ヶ所に共通して植栽されて

いる精英樹 8 クローン（岩瀬 2 号，久慈 18 号，久慈 25 号，東白川 4 号，東白川 9 号，東白川 10 号，双葉 1 号，西白河 3 号）を用いた（図 4-1）。2000 年 7 月に幹への埋め込み，または葉面処理によりジベレリン処理による着花促進を行い，2001 年 2 月に雄花が着花している枝を採取して水挿しし，花粉を採取した。調査に使用した各クローンの個体数を採種園および交配園ごとに表 4-1 に示した。

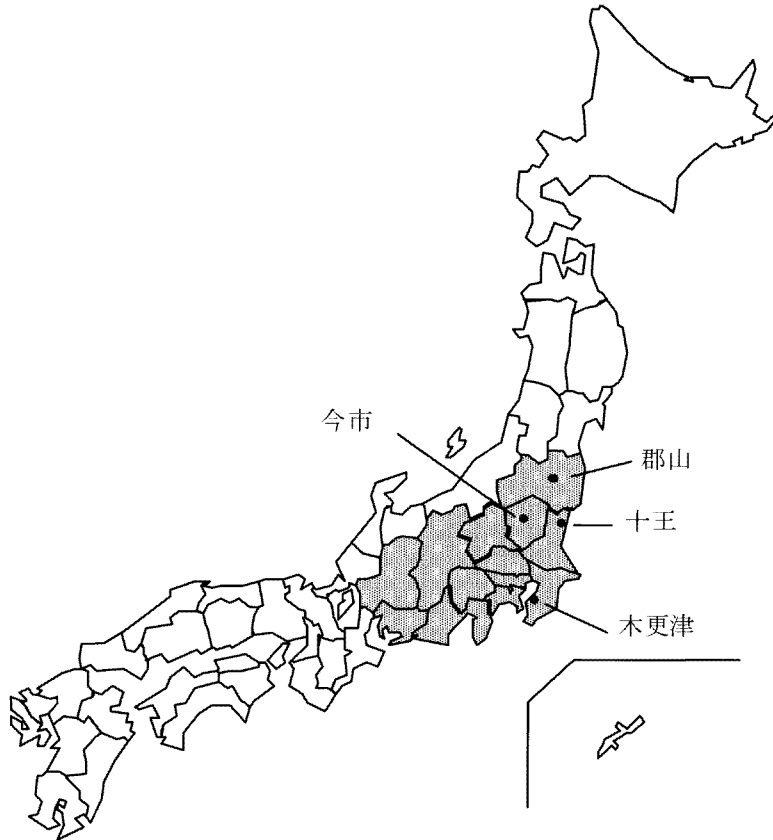


図 4-1 調査に用いた採種園の位置（関東育種基本区をグレーで示した。）

表 4-1 供試した個体数

クローン	植栽地			
	今市	木更津	郡山	十王
岩瀬2	3		3	1
久慈18		3		3
久慈25	3	3		3
西白河3		2	3	3
東白川4	3		3	
東白川9	3	3		2
東白川10	3		2	3
双葉1		2	1	3

4.2.2 Cry j 1 の抽出および定量

2.2.2.および 2.2.3 の方法で行った。

4.2.3 統計解析

欠測値があるため、各クローンおよび植栽地の Cry j 1 含量の平均値を最小自乗法により推定した。また、Cry j 1 含量に対する遺伝的要因と環境要因の影響を明らかにするために、クローン、植栽地、クローン×植栽地の交互作用を要因とした分散分析を行い、各要因および誤差の分散成分の寄与率を制限付き最尤法により推定した。最小自乗平均の推定および分散分析には SAS (SAS Institute Inc., Japan) の GLM (General Linear Model, 一般線形モデル) プロシジャを、分散成分の寄与率の推定には REML (Restricted Maximum Likelihood Variance Components Estimation) プロシジャを使用した。

4.2.3 気象データ

今市、木更津、郡山における気象データとして、気象庁の提供しているアメダスのデータを用いた。十王については、林木育種センター場内で記録している気象データを使用した。

4.3 結果

4.3.1 Cry j 1 含量の変異

各植栽地における各クロンの Cry j 1 含量の平均値を図 4-2 に示した。各クロンの花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量の平均値は 296~841 μ g であり、分散分析の結果 1%水準で有意差が認められた (図 4-3, 表 4-2)。また、各植栽地における Cry j 1 含量の平均値は木更津、郡山、十王では 600~650 μ g でほとんど変わらなかったが、今市においては 446 μ g と小さく、分散分析の結果 1%水準で有意差が認められた (図 4-4, 表 4-2)。しかしクローン×植栽地の交互作用が 5%水準で有意ではなかったことから、植栽地間でクロンの順位の大きな変動はないと考えられた。また、クローン、植栽地、クローン×植栽地の交互作用および誤差の分散成分の寄与率はそれぞれ 54.5%, 9.2%, 6.0%, 30.3%と推定された。

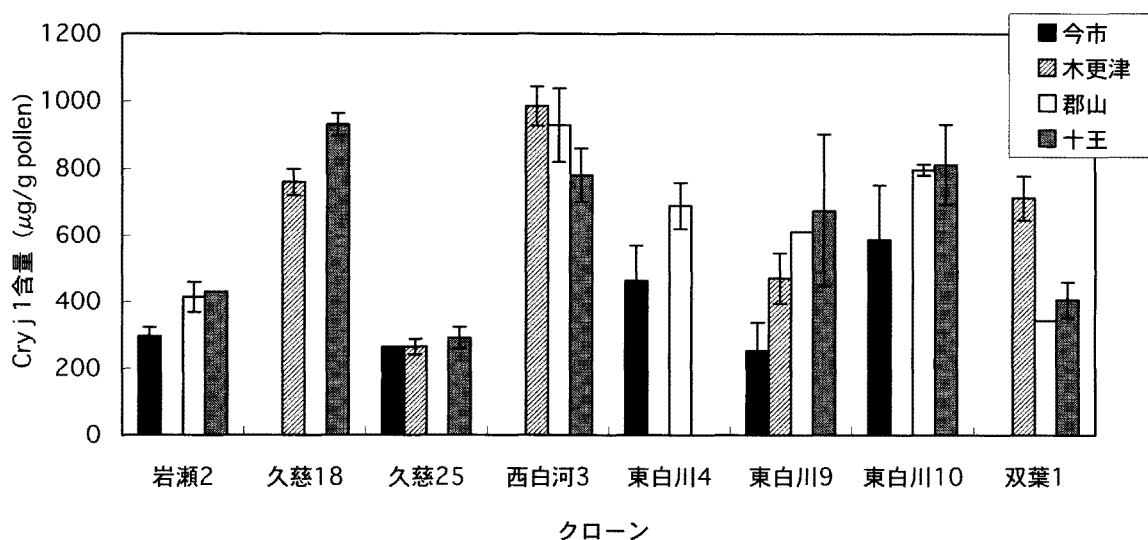


図 4-2 各クローンにおける植栽地間での Cry j 1 含量の変異 (エラーバーは標準誤差を示す。)

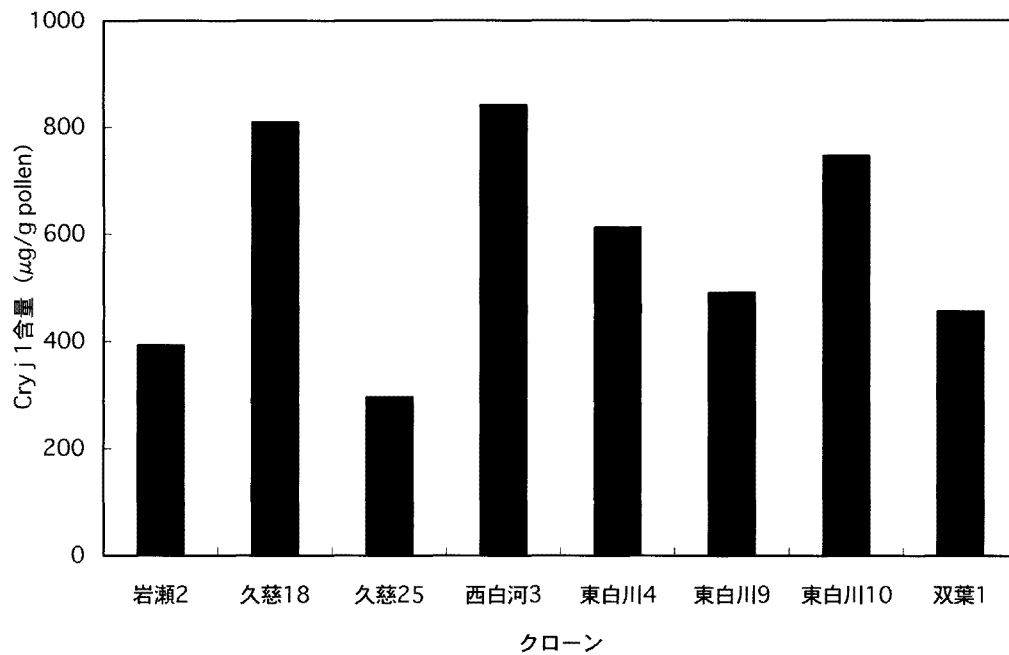


図 4-3 各クローンにおける Cry j 1 含量の最小自乗推定値

表 4-2 Cry j 1 含量に関する分散分析表

要因	自由度	平均平方	F	分散成分の寄与率(%)
クローン	7	0.30628	14.40 **	54.5
植栽地	3	0.10490	4.93 **	9.2
クローン×植栽地	12	0.03397	1.60	6.0
誤差	38	0.02127		30.3

** 1%水準で有意

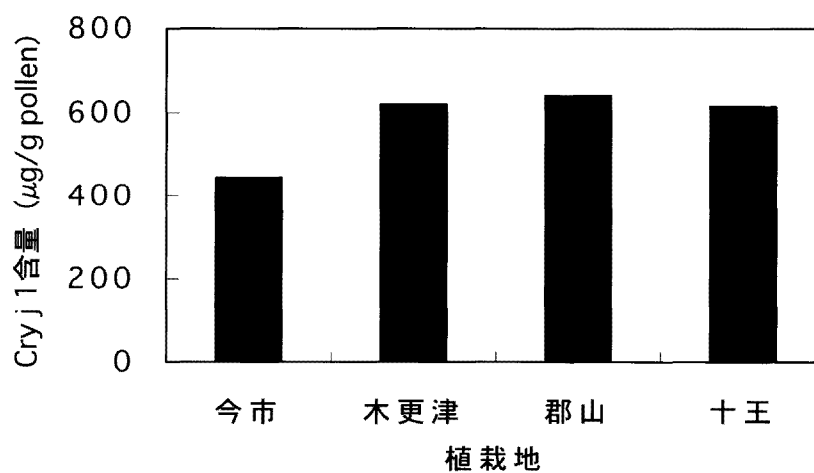


図 4-4 各植栽地における Cry j 1 含量の最小自乗推定値

4.3.2 Cry j 1 含量と気象要因との関係

植栽地間で Cry j 1 含量に有意差が認められたことから、各植栽地における Cry j 1 含量の平均値と 2000 年 7 月から 2001 年月までの平均気温および積算降水量との相関関係を調べた。各植栽地における平均気温と積算降水量を表 4-3 に示した。平均気温は木更津で最も高く 15.8℃、今市で最も低く 11.4℃であった。積算降水量は今市で最も高く 1226mm、郡山で最も低く 829mm であった。平均気温と Cry j 1 含量の平均値の間には有意な相関が認められなかったが、積算降水量と Cry j 1 含量の間には 1%水準で有意な負の相関が認められた ($r=-0.976$, 表 4-4)。さらに各月ごとの平均気温および平均日別降水量と Cry j 1 含量との相関関係について調べたところ、9 月の降水量が 1%水準で有意な負の相関を示した ($r=-0.997$, 表 4-4)。各植栽地における月ごとの平均日別降水量を図 4-5 に示した。

表 4-3 各調査地における気象条件

植栽地	平均気温(℃)	積算降水量(mm)
今市	11.4	1226
木更津	15.8	939
郡山	12.2	829
十王	13.4	855

表 4-4 各気象要因と Cry j 1 含量の相関関係の月変化

月	平均気温	平均日別降水量
7月	0.729	-0.868
8月	0.737	-0.859
9月	0.595	-0.997 **
10月	0.556	-0.322
11月	0.438	0.369
12月	0.519	0.556
1月	0.486	0.376
2月	0.481	0.173
平均値	0.562	-0.976 **

** 1%水準で有意

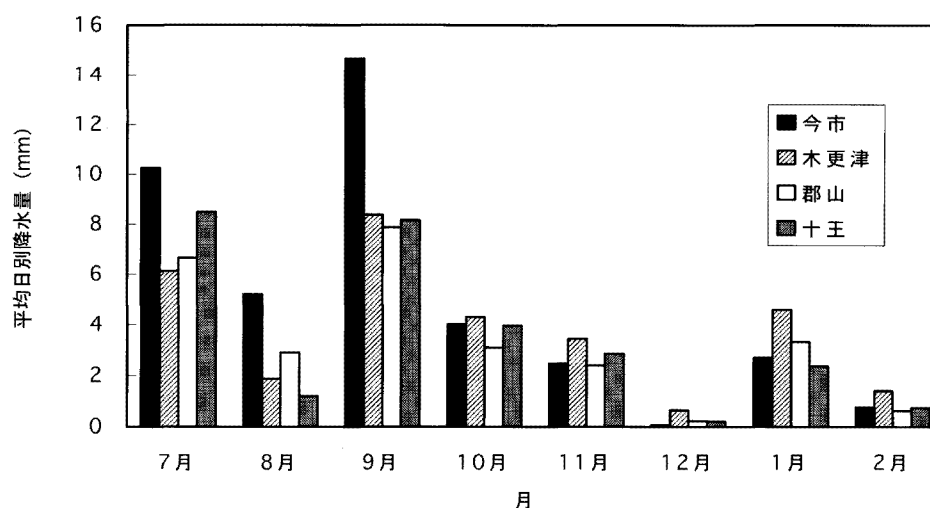


図 4-5 各植栽地における月ごとの平均日別降水量

4.4 考察

本章では、異なる場所に植栽された 8 クローンにおける Cry j 1 含量の変異を調べ、Cry j 1 含量に対する環境要因の効果について検討した。各植栽地における各クロンの Cry j 1 含量の平均値を比較してみると、東白川 9 号や双葉 1 号のように植栽地間で大きく異なるクローンもあったが、その他のクローンはほぼ同様の傾向を示した。特に岩瀬 2 号、久慈 25 号のようにいずれの植栽地においても小さい Cry j 1 含量を示したクローンが存在したことから、「アレルゲンの少ないスギ品種」はある程度環境の異なる地域にも配布可能であることが示唆された。また、東白川 10 号、久慈 18 号、西白河 3 号のように Cry j 1 含量の大きいクローンも植栽地間で安定した傾向を示したことから、「アレルゲンの少ないスギ品種」を利用すると同時にこのようなクローンを除くことによって、より効果的に花粉症を軽減できると考えられる。植栽地間ではクロンの順位が大きく変動せず、クローン、植栽地、クローン×植栽地の交互作用を要因とした分散分析の結果、クローン×植栽地の交互作用が有意ではなかった。またクローン間の分散成分の寄与率がクローン×植栽地の交互作用および誤差の分散成分の寄与率より大きく、分散全体の 50% 以上に相当することから、Cry j 1 含量は遺伝的要因に強く支配されていると考えられた。本章の結果から、林木育種センター本所での調査結果に基づき「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜した場合、今市、木更津、郡山と環境条件の類似した地域に配布可能であることが示唆された。また、これらの 4 ケ所での調査では交互作用が見出されなかったことから、今後さらに広い地域、たとえば関東育種基本区全体を対象に調査地間の交互作用の有無を明らかにし、配布区分を改めて検討する必要がある。様々な遺伝的特性が環境の変化によってどのような影響を受けるか明らかにするために、共通したクローンで構成された地域差検定林が育種基本区内全体にわたって設定されている。宮浦 (1994) は関東育種基本区内の 22 の地域差検定林における 10 年次の生存率や樹高におけるクローン特性の類似性に基づき、関東育種基本区を 2 つの育種区に区分することを提案している。本章での調査地はすべて 2 つの区分のうち的一方に含まれ、クローン×植栽地の交互作用が有意にならなかったことから、ある程度の地域においては、クローンはアレルゲン含量と成長特性のいずれにおいても類似した傾向を示すと考えられる。そのような地域を選抜および配布の単位区分とすれば、林業的にも花粉症対策の面からも有益なクローンを選抜し、利用することが可能となるだろう。

一方、分散分析の結果植栽地間においても有意差が認められたことから、Cry j 1 含量は環境条件の違い、例えば気象条件、土壌条件、水分条件などに影響を受ける可能性が示唆された。そこで本章では気象条件に着目し、Cry j 1 含量と花芽が分化、発達する 7 月から翌年 2 月の平均気温、積算降水量との相関関係を調べてみた。その結果、平均気温は有意な相関を示さなかったが積算降水量との間に有意な負の相関が認められた。そこで各月ごとの平均日別降水量と Cry j 1 含量の間の相関関係を調べた結果、9 月の平均日別降水量が有意な負の相関を示した。9 月の平均日別降水量は Cry j 1 含量の平均値が最も低かった今市において極端に高く、他の植栽地の約 1.8 倍であったため、相関係数が高くなったと推定される。

橋詰ら (1970)、Takahashi et al. (1989) によると、6 月下旬ごろに雄花が分化しはじめた後、9 月中旬には葯の中に花粉母細胞が観察され、9 月下旬から 10 月上旬には花粉四分子が認められる。四分子から分離した未熟花粉は 10 月に急速に成長して 12 月にはほとんどが成熟花粉となり越冬する。また、Takahashi et al. (1989) は 9 月から 3 月までに採取した花粉中の Cry j 1 含量を調べた結果、9 月には花粉 1g あたりの Cry j 1 含量は 0.04 μ g とわずかであったが、12 月および 3 月には 236 および 304 μ g まで増加したことを報告している。一方、Miki-Hiroshige et al. (1994) が葯および花粉中の Cry j 1 の局在を調べた研究では、9 月に採取した葯中の花粉

の外壁、オービクルスおよびタペータムに Cry j 1 が存在することが明らかにされた。タペータムはオービクルスの分泌を介して発達中の花粉に栄養分や外壁 (sexine) の構成成分を供給する機能を持つことから、9 月には花粉中の Cry j 1 含量がわずかなものであっても、タペータムにおける Cry j 1 の生合成はすでに始まっていると考えられる。従って、本章の結果は Cry j 1 含量は Cry j 1 が生合成される期間の気象条件に影響を受けることを示唆するものと考えられた。本章の結果から詳細なメカニズムを明らかにすることはできないが、Cry j 1 を含むオービクルスや sexine は花粉を保護する役割があると考えられるため、乾燥や紫外線によるストレスによりオービクルスの分泌が促進されて sexine が肥厚し、それにともない Cry j 1 含量が増加するのかも知れない。

また、本章では調査地の数が少ないため、ここで相関係数が有意とならなかった気象要因が Cry j 1 含量に影響を持たないと結論づけることはできない。例えば図 4-5 に示されたように、10 月、11 月の降水量は 4 ヶ所でほとんど変わらないため、有意な相関が認められなかったものと考えられる。従って 10 月、11 月の降水量が Cry j 1 含量に与える影響を明らかにするためには、より降水量の差が大きい地域間、あるいは年次間で Cry j 1 含量の変異を調査する必要がある。その際、本章で有意な相関係数を示した木更津と今市における 9 月の降水量の差はよい目安となるだろう。気温の影響についても同様であり、本章の結果から言えることは、本章における調査地間の気温差であれば、Cry j 1 含量におけるクローンの順位は影響を受けないということである。またこの結果は、Cry j 1 含量におけるクローン特性が気象条件、特に気温の変化に対して、これまでの報告から予想されていた以上に安定したものであることを示している。これまで気象条件がアレルゲン含量に及ぼす影響を調査した研究においては気温が最も重視されており、Ahlholm et al. (1998) および Saito et al. (2000) は、それぞれ 1.1℃ および 1.5℃ の気温の差が花粉中のアレルゲン含量に影響を与えている可能性を述べていた。しかし彼らの研究では、個々の気象要因とアレルゲン含量の相関関係については検討していない。本章では植栽地間で平均 4.4℃ の気温差があるにも関わらず、気温と Cry j 1 含量の間に有意な相関は認められず、むしろ降水量の方が Cry j 1 含量に大きく影響することが示唆された。スギの雄花着花量においても同様に、7 月の気温よりも降水量の方が高い相関を示すことが複数の研究で明らかにされている。7 月が高温少雨であると雄花の分化が促進されて雄花着花量、花粉飛散量が多くなると言われているが、さらに 7 月以降も降水量の少ない年は花粉中のアレルゲン含量も増加し、翌年は花粉症が特に悪化するのかも知れない。また、Ahlholm et al. (1998) は将来、地球温暖化によりカバノキ属の分布が拡大し花粉中のアレルゲン含量が増加することによって、花粉症患者に深刻なダメージを与える可能性があることを指摘している。気象条件の変化と花粉中のアレルゲン含量の関係は、花粉症患者にとって重要な問題であり、今後さらに調査を進める必要があるだろう。

4.5 結論

今市市 (栃木県)、木更津市 (千葉県)、郡山市 (福島県)、十王町 (茨城県) に共通して植栽されたクローンをを用いて、異なる植栽地間での Cry j 1 含量を調査した。各植栽地間の 7 月から 2 月までの平均気温および積算降水量の差は 4.4℃ および 397mm であった。クローン、植栽地、クローン×植栽地の交互作用を要因とした分散分析の結果、クローン×調査地の交互作用が有意ではなかったことから、Cry j 1 含量における遺伝的特性は環境条件の変化に対して安定したものであることが明らかになった。また、植栽地間で有意差が認められたことから植栽地の気象条件と Cry j 1 含量の相関を調べた結果、積算降水量および 9 月の降水量が有意な負の相関を示した。従って、花粉が発達する期間の降水量が低いと Cry j 1 含量が増加する可能性が示唆された。

5 Cry j 1 アイソフォームにおけるモノクローナル抗体との結合性の差異

5.1 緒言

モノクローナル抗体はある物質に特異的に結合する性質を持っていることから、本研究で行っているような目的物質の定量や *in situ* における検出などに広く利用されている。アレルギーに関しても研究のみならず、臨床的な場面でも利用されていて、例えば皮内テストや特異的減感作療法などの免疫治療に使用するアレルゲン抽出液の標準化や濃度測定などはしばしばモノクローナル抗体を用いた ELISA 法によって行われている。モノクローナル抗体と同様、ポリクローナル抗体もアレルゲン抽出液の標準化に用いられるが、モノクローナル抗体はポリクローナル抗体に対して特異性の高さと均質性という利点を持っている。一方、ポリクローナル抗体は抗原を免疫した動物の血清から直接精製するため、同じ抗原に対する多種多様な（ポリクローナルな）抗体により構成されている。同じ種でも個体によって作られる抗体が異なり、また同じ個体でも免疫する時期が違えば抗体の構成割合が異なってくる可能性があるため、常に均質な抗体を得ることが困難である。また、特異性の高いポリクローナル抗体を作製するためには抗体を作らせる動物を免疫するために用いる精製抗原の純度が重要であり、しばしば精製抗原中のわずかな混入物に対する抗体が同時に作られてしまい、ポリクローナル抗体が抗原と混入物との交差反応を示す原因となる。それに対し、モノクローナル抗体はひとつの抗体産生細胞を骨髓腫細胞（ミエローマ）と融合させて増殖させたハイブリドーマから生産、精製するため 1 種類の（モノクローナルな）抗体により構成されており均質である。また、ハイブリドーマは理論的には永久に増殖可能なので、いったん高い結合性と特異性を持つモノクローナル抗体を作製することができれば、ほぼ永久的にその抗体を利用することが可能となる。従って、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法は、高い特異性と再現性を持つことが期待できる。しかしその反面、モノクローナル抗体は特異性が高すぎるために、抗原特異的であるだけでなくアイソフォーム特異的であることがある（van Ree, 1997）。アイソフォームとは、同じ機能を持つが分子構造が異なるタンパク質のことを指す。抗体と結合する部位（エピトープ）の構造に変異があるアイソフォームでは、その抗体との結合性が低下する場合がある。様々なエピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗体を用いる場合は、一部のエピトープにおける変異は問題にならないが、モノクローナル抗体は特定のエピトープとしか結合しないため、その部分に変異が生じると結合性が失われてしまうことがある。従って、モノクローナル抗体を使用した ELISA 法では、そのエピトープに変異のあるアイソフォームが存在すると正しく定量することができない。このような問題を避けるためには、すべてのアイソフォームに対して同等の結合性を持つモノクローナル抗体を用いる必要がある。

第 2 章において、Cry j 1 が検出されないクローンが見出されたことを述べた。その原因として、定量に用いているモノクローナル抗体、J1B01 と J1B07 のいずれかとの結合性が極端に低いアイソフォームが存在することが考えられる。現在日本アレルギー学会によるアレルゲン抽出液の標準化も、J1B01 と J1B07 を用いたサンドウィッチ ELISA 法によって行われていることから（安枝ら, 1996）、この方法で検出できないアイソフォームの存在は重大な問題である。そこで、第 1 章において Cry j 1 が検出されなかった関東育種基本区の 4 クローン（上伊那 4 号、北会津 1 号、双葉 3 号、西多摩 5 号）と Cry j 1 含量が極端に少なかった 1 クローン（鰯沢 17 号）が生産する Cry j 1 のアイソフォームに対して結合性の低いモノクローナル抗体を明らかにし、それをポリクローナル抗体で置き換えることにより、モノクローナル抗体の利点を維持しつつすべてのアイソフォームを定量できるようにサンドウィッチ ELISA 法を改良することを試みた。

はじめに、前述の 5 クローンの花粉が生産するアイソフォームと各モノクローナル抗体との結合性を調べるために、各クローンから採取した花粉から *Cry j 1* を抽出し、一次抗体として J1B01 または J1B07、二次抗体としてポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法により定量を行った。この場合、これらのアイソフォームと結合性の高いモノクローナル抗体を用いた ELISA 法では *Cry j 1* の定量が可能であるが、結合性の低いモノクローナル抗体を用いた場合は *Cry j 1* が検出されないと予想される。次に、モノクローナル抗体との結合性の低下を引き起こしている *Cry j 1* 中のアミノ酸変異を推定するために、これらのクローンと、J1B01 と J1B07 を用いたサンドウィッチ ELISA 法で *Cry j 1* の定量が可能なクローンの花粉から *Cry j 1* をコードしている cDNA を単離して塩基配列を決定し、それらから推定されるアミノ酸配列を比較した。スギにおけるアイソフォームのクローン間変異は興味深い問題であるが、cDNA の塩基配列の決定には時間とコストがかかるため、簡易にこれらのアミノ酸変異を検出するために CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) マーカーを開発した。CAPS マーカーとは、cDNA 配列をもとに設計したプライマーを用いて DNA 中の特定の配列を増幅し、その産物を制限酵素処理することによって生じる DNA 断片長の違いを多型として検出する DNA マーカーである。つまり、PCR 増幅断片中の制限酵素認識配列の有無や位置の違いにより多型が検出できる。本章では開発した CAPS マーカーを用いて関東育種基本区のスギ精英樹におけるそれらのアミノ酸変異の頻度を推定し、さらに Kuramoto et al (2000) が作成したイワオスギの連鎖地図上の *Cry j 1* 遺伝子の位置を推定した。

5.2 材料と方法

5.2.1 材料

鰺沢 17 号、鬼泪 7 号、西多摩 5 号から *Cry j 1* をコードする mRNA を抽出するため、1999 年 3 月に花粉を採取し、ただちに -80℃ で保存した。1999 年、2002 年、2003 年に採取した 15 クローンの精英樹（飯山 15 号、飯山 17 号、鰺沢 17 号、上伊那 4 号、河津 29 号、北会津 1 号、鬼泪 7 号、久慈 29 号、群馬 2 号、下高井 23 号、西多摩 5 号、西多摩 10 号、双葉 3 号、古川 4 号、南設楽 1 号）の花粉を用い、*Cry j 1* アイソフォームとモノクローナル抗体との結合性を調べた。これらの花粉は採取後、4℃ でシリカゲルと共存させて乾燥させた後、-30℃ で保存した。

CAPS マーカーを開発する際、PCR の増幅断片長を推定するために、*Cry j 1* をコードする領域のゲノム DNA の塩基配列を決定したが、その材料として西多摩 5 号の新葉から濾過洗浄法（河原ら、1994）を一部改変した方法によって抽出した全 DNA サンプルを用いた。

開発した CAPS マーカーの遺伝分析には、在来品種であるボカスギとイワオスギの交配家系（67 個体）およびヤブクグリとクモトオシの交配家系（38 個体）を用いた。さらにボカスギ×イワオスギの交配家系を用いて、既存のイワオスギの遺伝子連鎖地図上の *Cry j 1* 遺伝子の位置を推定した。DNA サンプルは供試個体の新葉から CTAB 法により抽出した（Murray and Thompson, 1980）。この CAPS マーカーを用いて関東育種基本区のスギ精英樹 855 クローンから、J1B01 との結合性が低いアイソフォームを生産するクローンをスクリーニングした。スクリーニングには既報（金山ら、2002）において調製された全 DNA サンプルを用いた。

5.2.2 *Cry j 1* の抽出

2.2.2 の方法で行った。

5.2.3 サンドウィッチ ELISA 法による Cry j 1 の定量

モノクローナル抗体 J1B01 と J1B07, 抗 Cry j 1 ウサギ IgG 抗体 (ポリクローナル抗体, pAb) を組み合わせた ELISA 法により, Cry j 1 の定量を行った。それぞれの方法を, 一次抗体-二次抗体と表記することにした。本章では, *J1B07-J1B01*, *J1B01-pAb*, *J1B07-pAb* の 3 種類のサンドウィッチ ELISA 法を使用した。*J1B07-J1B01*, *J1B07-pAb* は 2.2.3 の方法で行った。*J1B01-pAb* は次に述べるように一部改変した方法によって行った。一次抗体の J1B01 がマイクロプレートに吸着されにくいため, 最初に 37℃ で 1 時間 J1B01 をインキュベートしてから 4℃ で一晩静置した。また, 二次抗体に pAb を使用する場合, pAb は各ウェルあたり 50ng ずつ加えた。鬼泪 7 号の花粉から抽出した Cry j 1 抽出液を安枝らの方法 (1996) にしたがって濃度調製し, スタンダードとして用いた。*J1B07-J1B01* および *J1B07-pAb* では, スタンダードは 0.39~12.5ng/ml の 2 倍希釈系列とし, 花粉からの抽出サンプルは 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 (高希釈系列) の 2 倍希釈系列で定量を行った。*J1B01-pAb* はこれらの ELISA と比較して若干感度が低いため, その 2 倍の濃度で定量を行った。また, 高希釈系列で Cry j 1 が検出されなかったサンプルについてはさらに, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 の 2 倍希釈系列 (低希釈系列) で定量を試みた。

5.2.4 Cry j 1 をコードする cDNA およびゲノム DNA の合成

全 RNA の抽出は Sone et al. の方法 (1994) により行った。Oligotex-dT30 (JSR Corp., Japan) を用いて全 RNA から mRNA を精製し, それをテンプレートとして既報 (Sone et al. 1994) の Cry j 1 cDNA 配列をもとに設計したプライマー (forward, 5'-TCATAATCATAGCATAGC-3', reverse, 5'-CAACATGCTAGAATATATATGC-3') を使用して RT-PCR を行った。RT-PCR は TaKaRa RNA LA PCR キット (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japan) と遺伝子増幅装置 9700 (Applied Biosystems Inc., USA) を用いた。逆転写反応は 50℃ で 30 分間行い, 続く PCR の条件は, 94℃ で 2 分間鋳型 DNA を変性させた後, 94℃ で 30 秒間変性, 55℃ で 1 分間アニーリング, 72℃ で 3 分間伸長反応のサイクルを 40 回行い, 最後に 72℃ で再度 2 分間伸長反応を行うものとした。反応液はキットに付属している使用書に従い調製した。ゲノム中の Cry j 1 をコードする領域については, RT-PCR における PCR と同一条件下で増幅を行った。PCR 後の反応液を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した後, 目的の DNA 断片に相当するバンドを切り出し, GENE CLEAN II (Qbio gene, Inc., Montreal, Canada) を用いて精製した。

5.2.5 Cry j 1 をコードする cDNA およびゲノム DNA のクローニングとシークエンス

Cry j 1 をコードする DNA 断片を TOPO TA クローニングキット (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA) を用いて pCR 2.1 プラスミドベクターにライゲーションした後, キットに含まれるケミカルコンピテントセルを形質転換し, クローニングを行った。培養後, GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences Corp. Piscataway, NJ USA) を用いてプラスミドを抽出, 精製した。得られたプラスミドを鋳型として ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) を用いてシークエンス反応を行った。塩基配列の決定には 373 シークエンサー (Applied Biosystems) を用い, 塩基配列からのアミノ酸配列の推定や塩基配列間の比較は DNASIS v 3.7 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Japan) を用いて行った。

5.2.6 CAPS マーカーの開発

鰯沢 17 号, 鬼泪 7 号, 西多摩 5 号の *Cry j 1* アイソフォームのアミノ酸配列の比較から, モノクローナル抗体との結合性に影響を与えていると考えられるアミノ酸変異を検出するための CAPS マーカーを開発した。はじめに Infobiogen ソフトウェア (<http://www.infobiogen.fr.services/analyseq>) を用いて, これらのアミノ酸変異を認識する制限酵素を選び出した。得られた cDNA の塩基配列および既報の cDNA 塩基配列を基に, その制限酵素認識部位を含む領域を増幅するためのプライマーを設計した。プライマーの設計には OLIGO 5.1 (National Biosciences Inc., Plymouth, MN USA) を使用した。PCR ではすべてのアイソフォームの遺伝子を増幅できることが望ましいので, 既知の cDNA の塩基配列 (Sone et al. 1994, Namba et al. 1994, Wang et al. 1998) および本章で検出された塩基配列を比較して保存性の高い部分にプライマーを設計するよう留意した。PCR は 5.2.4. と同じ条件で行った。PCR により増幅された DNA 断片を制限酵素で切断した後 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い, 多型を検出した。

5.2.7 イワオスギの遺伝子連鎖地図上における *Cry j 1* 遺伝子の位置の推定

5.2.6 で開発した CAPS マーカーを用いて, Kuramoto et al. (2000) が RAPD マーカーにより作成したイワオスギの遺伝子連鎖地図上の *Cry j 1* 遺伝子の位置を推定した。MAPMAKER/EXP 3.0 プログラムを用いて, 既存の RAPD マーカーとの連鎖を検出した。

5.3 結果

5.3.1 3 種類のサンドウィッチ ELISA 法による *Cry j 1* の定量

鰯沢 17 号, 上伊那 4 号, 北会津 1 号, 西多摩 5 号および双葉 3 号の花粉から抽出した *Cry j 1* について, *J1B01-pAb*, *J1B07-pAb*, *J1B07-J1B01* の 3 種類の ELISA 法による定量を行った。その結果を図 5-1 に示した。比較のために, いずれのモノクローナル抗体とも結合性を持つ鬼泪 7 号の花粉から抽出した *Cry j 1* における吸光度曲線を共に示した。*J1B01-pAb*, *J1B07-pAb* および *J1B07-J1B01* により推定した鬼泪 7 号の花粉 1g 当たりの *Cry j 1* 含量はそれぞれ 443, 436, 440 μ g であり, ほぼ同等の値であった (図 5-2a)。その他の 5 クローンのうち, 鰯沢 17 号を除く 4 クローン (上伊那 4 号, 北会津 1 号, 西多摩 5 号, 双葉 3 号) は同様の傾向を示した。これらのクローンの *Cry j 1* は *J1B07-J1B01*, *J1B07-pAb* で検出できず, *J1B01-pAb* でのみ濃度依存曲線を示した。*J1B01-pAb* で推定された *Cry j 1* 含量は上伊那 4 号, 北会津 1 号, 西多摩 5 号, 双葉 3 号の順に 284, 345, 236, 156 μ g であり, 2.3 に示された精英樹の *Cry j 1* 含量の変異の範囲に収まるものであった (図 5-2a)。一方, *J1B01-J1B07* では低希釈系列での定量も行ったが, 吸光度は検出限界 (花粉 1g 当たり *Cry j 1* 含量 0.8 μ g に相当) 以下であった。以上の結果から, これらの個体が生産するアイソフォームは *J1B07* との結合性が非常に低いか, もしくは失われていると推定された。鰯沢 17 号は高希釈系列の *J1B07-J1B01* では検出限界 (花粉 1g 当たりの *Cry j 1* 含量 15.6 μ g に相当) 以下であったが, 低希釈系列では濃度依存曲線を示し, *Cry j 1* 含量は 11 μ g と推定された。また, *J1B01-pAb* および *J1B07-pAb* のいずれにおいても濃度依存曲線を示し, *Cry j 1* 含量はそれぞれ 98 μ g および 96 μ g と推定された。これらの結果を考え合わせると, 鰯沢 17 号は *J1B01* と結合性の低いアイソフォーム, *J1B07* と結合性の低いアイソフォームの 2 種類のアイソフォームを生産していると推定された。そのため *J1B01-pAb* および *J1B07-pAb* ではいずれか一方のアイソフォームが検出されるものの, *J1B01-J1B07* ではいずれもほとんど検出されなかったのだと考えられる。

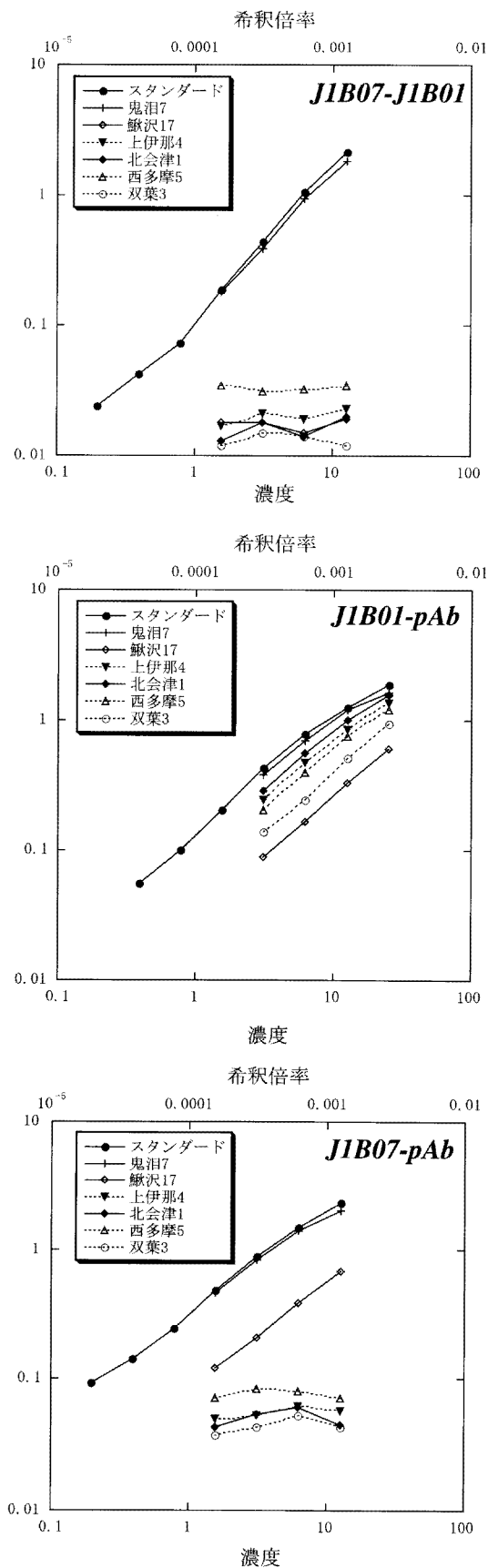


図 5-1 3 種類の ELISA 法による Cry j 1 の定量

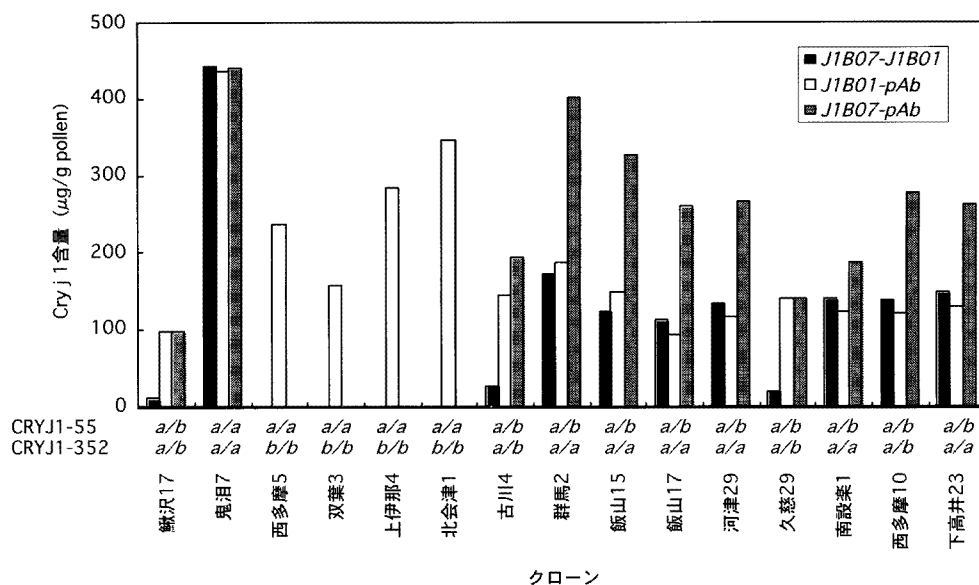


図 5-2a 3 種類の ELISA 法により推定した Cry j 1 含量と CAPS マーカーの遺伝子型

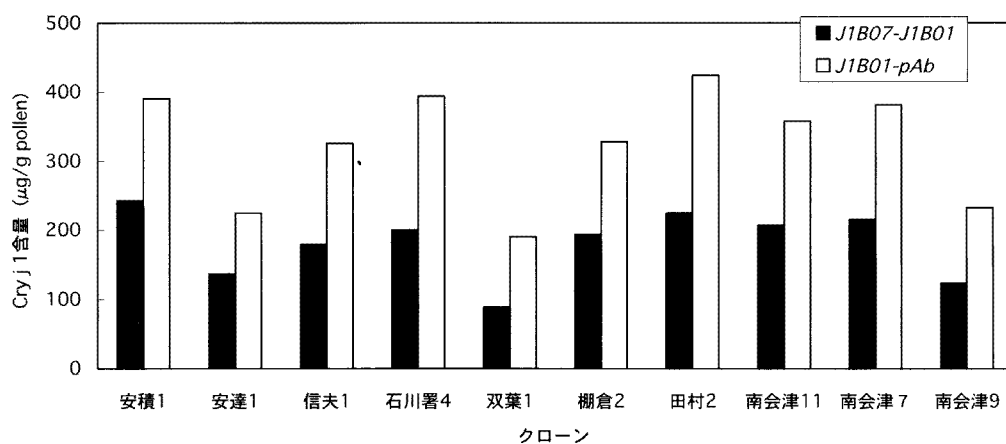


図 5-2b J1B07-J1B01 と J1B01-pAb により推定した 352a/b のクローンの Cry j 1 含量

5.3.2 Cry j 1 の cDNA 塩基配列の比較

鰺沢 17 号, 鬼泪 7 号, 西多摩 5 号より得られた Cry j 1 cDNA の塩基配列を決定した。鰺沢 17 号, 鬼泪 7 号, 西多摩 5 号からそれぞれ 2 種類, 1 種類, 2 種類の塩基配列が得られ, 共通した塩基配列もあったことから 3 クローン全体では 4 種類の塩基配列が見出された (図 5-3)。これらの 4 種類の塩基配列から推定されるアミノ酸配列はすべて異なっていた (図 5-4)。4 つのうち 1 つ, 鬼泪 7 号から検出された塩基配列は Namba et al. (1994) によってすでに GenBank に登録されている配列 (accession number D343649) および Wang et al. (1998) が報告している部分配列と一致していたが, その他の 3 つは新規のものであった。以下, Namba et al. (1994) によって報告されている塩基配列がコードするアイソフォームを Cry j 1a, それ以外のアイソフォームを Cry j 1b, Cry j 1c, Cry j 1d と記すことにする (図 5-3)。西多摩 5 号からは Cry j 1b と Cry j 1c, 鰺沢 17 号からは Cry j 1b と Cry j 1d をコードする塩基配列が検出された。

```

Cry j 1a -54 TCATAATCATAGCATAGCCGTATAGAAAGAAATTCTACACTCTGCTACCAAAAAATGGATTCCCCTTGCTTAGTAGCATTACTGGTTTTCTCTTTGTAA
Cry j 1b -54 .....C.....
Cry j 1c -54 .....T.....
Cry j 1d -54 .....T.....

Cry j 1a 47 TTGGATCTTGCTTTCTGATAATCCCATAGACAGCTGCTGGAGAGGAGACTCAAACCTGGGCACAAAACAGAATGAAGCTCGCAGATTGTGCAGTGGGCTT
Cry j 1b 47 .....G.....T.....
Cry j 1c 47 .....T.....A.....C.....
Cry j 1d 47 .....T.....A.....C.....

Cry j 1a 147 CGGAAGCTCCACCATGGGAGGCAAGGGAGGAGATCTTTATACGGTCACGAACTCAGATGACGACCCTGTGAATCCTGCAACCGAACTCTGCGCTATGGA
Cry j 1b 147 .....A.....A.....T.....T.....C.....
Cry j 1c 147 .....A.....A.....T.....T.....C.....
Cry j 1d 147 .....G.....G.....C.....A.....T.....

Cry j 1a 247 GCAACCCGAGATAGGCCCTGTGGATAATTTTCAGTGGGAATATGAATATAAAGCTCAAATGCCTATGTACATTGCTGGGTATAAGACTTTTGATGGCA
Cry j 1b 247 .....
Cry j 1c 247 .....
Cry j 1d 247 .....

Cry j 1a 347 GGGGAGCACAAAGTTTATATTGGCAATGGCGGTCCTGTGTGTTTATCAAGAGAGTTAGCAATGTTATCATACACGGTTTGTATCTGTACGGCTGTAGTAC
Cry j 1b 347 .....A.....G.....C.....T.....
Cry j 1c 347 .....A.....G.....C.....T.....
Cry j 1d 347 .....G.....T.....C.....G.....

Cry j 1a 447 TAGTGTGTTGGGGAATGTTTGTATAAACGAGAGTTTTGGGGTGGAGCCTGTTTCATCCTCAGGATGGCGATGCTCTTACTCTGCGCACTGCTACAAATATT
Cry j 1b 447 .....
Cry j 1c 447 .....
Cry j 1d 447 .....

Cry j 1a 547 TGGATTGATCATAATCTTTCTCCAATTCTTCTGATGGTCTGGTCGATGCTACTTACTTCGACTGGAGTTACTATTTCAAACAATCTTTTTTCAACC
Cry j 1b 547 .....C.....T.....
Cry j 1c 547 .....C.....T.....
Cry j 1d 547 .....A.....C.....

Cry j 1a 647 ATCATAAAGTGATGTTGTTAGGGCATGATGATGCATATAGTGATGACAAATCCATGAAGGTGACAGTGGCGTTCAATCAATTTGGACCTAACTGTGGACA
Cry j 1b 647 .....
Cry j 1c 647 .....
Cry j 1d 647 .....

Cry j 1a 747 AAGAATGCCAGGGCAGCATATGGACTTGTACATGTTGCAACAATAATTATGACCCATGGACTATATATGCAATTGGTGGGAGTTCAAATCCAACCATT
Cry j 1b 747 .....
Cry j 1c 747 .....
Cry j 1d 747 .....

Cry j 1a 847 CTAAGTGAAGGAATAGTTTCACTGCACCAATGAGAGCTACAAGAAGCAAGTAACCATACGTATTGGATGCAAAACATCATCATCTTGTCAAATTGGG
Cry j 1b 847 .....
Cry j 1c 847 .....
Cry j 1d 847 .....

Cry j 1a 947 TGTGGCAATCTACACAAGATGTTTTTATAATGGAGCTTATTTTGTATCATCAGGGAATATGAAGGGGTAATATACACAAAGAAAGAGCTTTCAA
Cry j 1b 947 .....
Cry j 1c 947 .....
Cry j 1d 947 .....

Cry j 1a 1047 TGTGAGAATGGGAATGCAACTCTCAATTGACAAAAATGCTGGGGTTTTAACATGCTCTCTCTAAACGTTGTTGATGATGCATATATTCTAGCATG
Cry j 1b 1047 .....C.....A.....
Cry j 1c 1047 .....C.....A.....
Cry j 1d 1047 .....T.....G.....

Cry j 1a 1147 TTGTACTATCTAAATTAACATCAACAAGAAATATATCATGATGTATATTGTTGT
pCCI-2-2
Cry j 1b 1147 ...
Cry j 1c 1147 ...
Cry j 1d 1147 ...

```

図 5-3 鬼泪 7 号, 鰺沢 17 号, 西多摩 5 号の花粉から得られた Cry j 1 をコードする cDNA の塩基配列。CRYJ1-55 および CRYJ1-352 のプライマーの位置をそれぞれ太い点線および細い点線で, 制限酵素の認識部位を白抜きで示した。また, CRYJ1-352 のプライマーを設計するために使用した既報の cDNA 配列 (pCCI-2-2, Sone et al. 1994) を下線で示した。

5.3.3 Cry j 1 アイソフォームとモノクローナル抗体の結合性

5.3.1 および 5.3.2 の結果から、それぞれのアイソフォームとモノクローナル抗体の結合性を推定した。西多摩 5 号から抽出された Cry j 1 が *J1B07-pAb* で検出されず *J1B01-pAb* では検出されたことから、Cry j 1b と Cry j 1c はいずれも J1B01 とは反応するものの、J1B07 との結合性が低いと考えられた。さらに Cry j 1b がそのような特性を持つとすると、鰐沢 17 号の *J1B07-pAb* で検出されたのは Cry j 1d であり、*J1B01-pAb* で検出されたのは Cry j 1b だと推定できる。つまり、Cry j 1d は J1B07 とは反応するものの J1B01 との結合性が低いと考えられる。他のアイソフォームと比較した場合、21 残基からなるシグナル配列を除く成熟 Cry j 1 の 352 番目のアルギニンからヒスチジンへの置換が Cry j 1b, Cry j 1c に共通して見出されたことから、このアミノ酸の置換が J1B07 に対する結合性の低下の原因であると考えられた。一方、55 番目のプロリンがロイシンに置換する変異が Cry j 1d 特異的に見出されたことから、このアミノ酸変異が J1B01 との結合性に影響していると考えられた。

5.3.4 CAPS マーカーの開発

5.3.4.1 Cry j 1 をコードするゲノム DNA の構造

352 番目のアミノ酸変異と J1B07 との結合性について明らかにするためには、J1B07 との結合性が低いアイソフォームを生産する他のクローン、たとえば上伊那 4 号、北会津 1 号、双葉 3 号においても同様のアミノ酸置換が起きているのか確認する必要がある。また、55 番目のプロリンからロイシンへの置換と J1B01 との結合性の低下の関係についても、55 番目に変異のあるアイソフォームのみを生産するクローンを用いて確認する必要がある。そこでこれらのアミノ酸変異を容易に検出するために、CAPS マーカーを開発した。確実に目的の変異を見出す CAPS マーカーを開発するためには、あらかじめ PCR による増幅断片長や制限酵素処理後の断片長を推定する必要があるが、CAPS マーカーでは cDNA ではなくゲノム DNA を鋳型として PCR を行うため、増幅される領域にイントロンが含まれれば cDNA の塩基配列から推定される増幅断片長よりも長くなる。そこで西多摩 5 号を材料とし、ゲノム DNA 中の Cry j 1 をコードする領域の塩基配列を決定した。その結果、Cry j 1 の開始コドンから終止コドンまでの長さは 2219bp であり、2 つのイントロンによって分割される 3 つのエキソンにより構成されることが明らかになった (図 5-5)。イントロンのエキソンに隣接する配列は GT/AG ルールに従っていた。また、cDNA と同様、2 種類の塩基配列が検出され、エキソンの配列は Cry j 1b, Cry j 1c と一致した。

```

Cry j 1a -21 MDSPCLVALLVFSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFSGSSTMGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPAPGTLR
Cry j 1b -21 .....S.....V.....P....
Cry j 1c -21 .....F.....A.....P....
Cry j 1d -21 .....F.....A.....I....
Cry j 1a 60 YGATDRPLWIIIFSGNMNIKMKPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVIIHGLYLYGCSTSVLGNVLINES
Cry j 1b 60 .....H.....
Cry j 1c 60 .....H.....
Cry j 1d 60 .....H.....
Cry j 1a 140 FGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLTSTGVTISNNLFFNHHKVMMLGHDDAYSDDKSMKVTVAF
Cry j 1b 140 .....
Cry j 1c 140 .....
Cry j 1d 140 .....
Cry j 1a 220 NQFGPNCGRMPRARYGLVHVANNYDPWTIYIAGSSNPTILSEGNSFTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCSNVWVQST
Cry j 1b 220 .....
Cry j 1c 220 .....
Cry j 1d 220 .....
Cry j 1a 300 QDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGATPQLTKNAGVLTCSLSKRC
Cry j 1b 300 .....H...
Cry j 1c 300 .....H...
Cry j 1d 300 .....R...

```

図 5-4 cDNA 配列から推定した Cry j 1 アイソフォームのアミノ酸配列

Cry j 1b	-54	TCATAATCATAGCATAGCCGTATAGAAAGAAATTCTACACTCTGCTACCAAAA ¹ ATGGATTCCCCTTGCTTAGTAGCATTACTGGTTTTCTCTTCTGTAA
Cry j 1c	-54	T.....
Cry j 1b	47	TTGGATCTTGCTTTTCTGATAATCCCATAGATAGCTGCTGGAGAGGAGACTCAAACCTGGGCACAGAACAGAATGAAGCTCGCAGATTGTGTAGTGGGCTT
Cry j 1c	47	A.....C.....
Cry j 1b	147	CGGAAGCTCCACCATGGGAGGCAAGGGAGGAGATCTTTATACAGTCACAACTCAGATGACGATCCTGTGAATCCTGCACCAGGAACCTGCGCTATGGA
Cry j 1c	147	
Cry j 1b	247	GCAACCCGAGATAGGCCCTGTGGATAATTTTCAGTGGGAATATGAATATAAGCTCAAATGCCTATGTACATTGCTGGGTATAAGACTTTTGATGGCA
Cry j 1c	247	
Cry j 1b	347	GGGGAGCACAAAGTTTATATTGGCAATGGCGGTCCTGTGTATTTATCAAGAGAGTGAGCAATGTTATCATACACGGTTTGATCTTTACGGCTGTAGTAC
Cry j 1c	347	
Cry j 1b	447	TAGTGTGTTGGGGAATGTTTGATAAACGAGAGTTTGGGGTGGAGCCTGTTTCATCCTCAGGATGGCGATGCTCTTACTCTGCGCACTGCTACAAATATT
Cry j 1c	447	
Cry j 1b	547	TGGATTGATCATAATTCTTCTCCAATCTTCTGATGGTCTGGTCGATGTCACCTTACTTCGACTGGAGTTACTATTTCGAATAATCTTTTTTCAACC
Cry j 1c	547	
Cry j 1b	647	⁶⁵⁴ ATCATAAAGTAAGCAAAATGCTTAAGTTTTGTCAATTGCATATTGAGTTATTAATTGGTGCATTTTTAATTATAATATAGGTGATGTTATTAGGGTATAGG
Cry j 1c	647	
Cry j 1b	747	GATATATATATTGTTTTGAAGAAAATTATTGATTTTTGTTTGATATTGAATAGGTGATATTGTTAGGCTAAAGCGATGCATATGTTCTTTTTAAGAAGA
Cry j 1c	747	
Cry j 1b	847	TGATTAAGAAAATTAGTAATTATAGTTGATATAGTTAGGGTATAGATACACATATTGTTTTTAAGAGAATTAAATGATTTTTGTTTGATATTGAATAGGT
Cry j 1c	847	
Cry j 1b	947	GATGATGTTAGGGTATAGTGATGCATATACTCCTTTTTAAAGAGAATTATCAATTATTGTTTGATATTGAATATGTCATGTTAGGGATGGGTGATGCATT
Cry j 1c	947	
Cry j 1b	1047	GGTTTTTAATTGAATACAAAGTTGATTAGTCAATTTTTCTTAGTTACATATGTGATGTTGTTATGATATAGGTGATGCATTTCTTTTTATGAAAAATT
Cry j 1c	1047	
Cry j 1b	1147	TAAGGAAGTTATTGTTATTAGGTATTGTTCAATTGAATAAATGATGTTGTTAGGGTATAGGTGATATATGCTTTTTAATTGTAATATAAAGTTGA
Cry j 1c	1147	T.....
Cry j 1b	1247	TTATTCATTTTTTTTAGATATTGAATAGGTTGATACATATATTGTTTTTAAAGAATTATTAATTATTGTTTGATATTGAATATGTCATGTTGTTAGCG
Cry j 1c	1247	A.....C.....
Cry j 1b	1347	CATAGGTGATGATTTGTTTTTAATTGTAATACATTGATGATTAATTAATTTTAAAGAAAAATTAATTTTGTTCATATTGAATAG ⁶⁵⁵ GTGATGTTGT
Cry j 1c	1347	
Cry j 1b	1447	TAGGGCATGATGATGCATATAGTGACAAATCCATGAAGGTGACAGTGGCGTTCAATCAATTTGGACCTAACTGTGGACAAGAATGCCAG ⁷⁵⁸ GTAATG
Cry j 1c	1447	T.....
Cry j 1b	1547	AAAAACAAGTTCATTCTTTTAATAGAGTAAATTTGAGTGAATAGAAGCATGATTTATGGAATGAAATATATTGTATACGAACAATTATTTTTAATGTT
Cry j 1c	1547	
Cry j 1b	1647	TCTATTGTAATCCTATTAATTGTATATATCTTTACTAATTTACTATGTCTAATTTAAATATCATATATATGCTCTATCAATTTGGTTTTTTAAAGTCAA
Cry j 1c	1647	
Cry j 1b	1747	ATATATTTATTTCTATAGAAAAATAATATATGGATTAATTTGTATGAAATTTCTTTTCTTTTATTGAAATTTATGAAAAACAAGGAAATGGAATTGT
Cry j 1c	1747	
Cry j 1b	1847	⁷⁵⁹ AGGGCACGATATGGACTTGTACATGTTGCAAAACAATAATTATGACCCATGGACTATATATGCAATTGGTGGGAGTTCAAATCCAACCATTTCTAAGTGAAG
Cry j 1c	1847	
Cry j 1b	1947	GGAATAGTTTCACTGCACCAAAATGAGAGCTACAAGAAGCAAGTAACCATACGTATTGGATGCAAAACATCATCATCTTGTTCAAATTTGGGTGTGGCAATC
Cry j 1c	1947	
Cry j 1b	2047	TACACAAGATGTTTTTATAATGGAGCTTATTTGTATCATCAGGGAAATATGAAGGGGTAAATATACACAAAGAAAGAGCTTTCAATGTTGAGAAT
Cry j 1c	2047	
Cry j 1b	2147	¹¹²⁵ GGGAATGCAACTCCTCAATTGACAAAAATGCTGGGGTTCTAACATGCTCTCTCTAAACATTGTTGATGATGCATATATTCTAGCATGTTG
Cry j 1c	2147	

図 5-5 西多摩 5 号のゲノム中の Cry j 1 をコードする遺伝子領域の塩基配列（エキソンを白抜きで示した。それ以外の部分はイントロン）

5.3.4.2 55 番目のアミノ酸変異を検出するための CAPS マーカーの開発

制限酵素 *Mva* I を使用することによって、55 番目のアミノ酸変異を引き起こしている塩基の多型を検出できることが明らかになった。そこで 55 番目のアミノ酸残基を含む 600bp の領域を増幅するようなプライマーを設計し (forward; 5'-GCATAGCCGTATAGAAAGAAAT-3', reverse; 5'-AGTGCGCAGAGTAAGAGC-3'), 鰺沢 17 号, 鬼泪 7 号, 西多摩 5 号の全 DNA を鋳型として PCR 後, 反応液を電気泳動したところ, ゲノム DNA の構造から予想される通り, およそ 600bp の位置に単一のバンドが検出された。*Mva* I はプロリンのコドン (CCA) を含む CCAGG という配列は認識するが, *Cry j 1d* におけるロイシンのコドン (CTA) を含む配列を認識しない。従って, 制限酵素処理後の PCR 産物を電気泳動すると, *Cry j 1a*, *Cry j 1b*, *Cry j 1c* に由来する増幅断片は *Mva* I によって切断されて 280bp と 320bp の 2 本のバンドを示すが, *Cry j 1d* に由来する PCR 断片長は切断されずに 600bp の単一のバンドを示すと予想される。鬼泪 7 号, 鰺沢 17 号, 西多摩 5 号からの PCR 産物を制限酵素処理後, 電気泳動したところ, 鬼泪 7 号は 320bp と 280bp, 鰺沢 17 号は 280bp, 320bp および 600bp, 西多摩 5 号は 600bp の位置にバンドを示し, それぞれから得られた cDNA の塩基配列から予想されるバンドパターンと一致していた (図 5-6)。

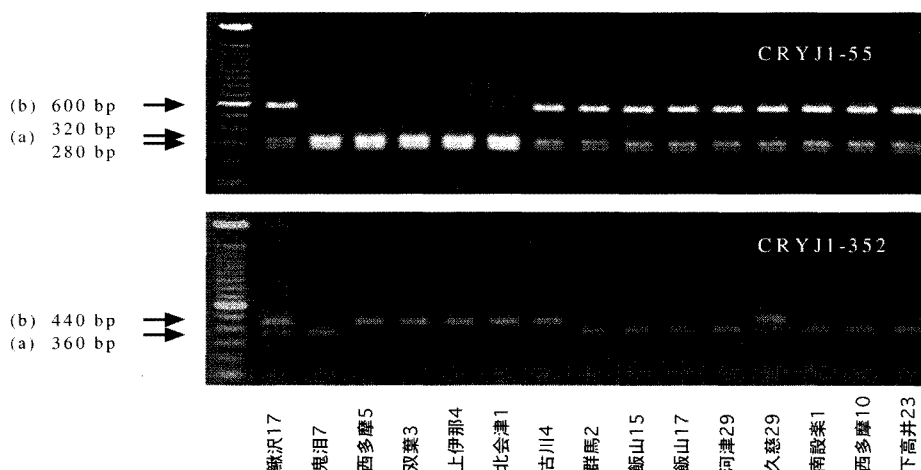


図 5-6 供試したクローンにおける開発した CAPS マーカーの遺伝子型

このマーカーの多型が単一の座に由来する対立遺伝子であるかどうか検定するために, ヤブクグリ×クモトオシの F_1 集団の 38 個体を用いて遺伝分析を行った。分析の結果, ヤブクグリは 280bp, 320bp, 600bp のすべてのバンドを示し, クモトオシは 280bp, 320bp の 2 本のバンドを示した。ここで上記の 2 種類のバンドパターンが 2 つの対立遺伝子を示すものと仮定し, 320bp と 280bp の 2 本のバンドで表現される対立遺伝子を *a*, 600bp の単一のバンドで表現される対立遺伝子を *b* と表すとする, ヤブクグリの遺伝子型を *ab*, クモトオシの遺伝子型を *aa* と表記することができる。ヤブクグリ×クモトオシの F_1 集団では, *aa* の遺伝子型を示す個体と *ab* の遺伝子型を示す個体が 1:1 の比で出現することが期待される。遺伝分析の結果, F_1 集団は *aa:ab=15:23* の分離比を示し, χ^2 検定の結果 1:1 の分離比に適合することが明らかになった ($\chi^2=1.68$, $p>0.05$)。従って, *Cry j 1* は単一の遺伝子座であり, *a*, *b* は *Cry j 1* をコードする遺伝子の塩基配列の多型による対立遺伝子であることが示された。このマーカーをアミノ酸変異の位置から CRYJ1-55 と名付け, それぞれの対立遺伝子を *55a*, *55b*, 遺伝子型については *55a/a*, *55a/b*, *55b/b* と記すことにした。

5.3.4.3 352 番目のアミノ酸変異を検出するための CAPS マーカーの開発

352 番目のアミノ酸変異を引き起こしている塩基置換を含む配列を認識する制限酵素を探索した結果、*Psp* 1406I が使用できる可能性が示唆された。そこで 352 番目のアミノ酸残基を示すコドンを含む領域を増幅するプライマーを設計し(forward; 5'-ACGATATGGACTTGTAC-3', reverse; 5'-ACAACAATATACATCATGAT-3'), 鰯沢 17 号, 鬼泪 7 号, 西多摩 5 号の全 DNA を鋳型として PCR を行い, その産物を電気泳動した結果, Cry j 1 をコードするゲノム DNA の配列から期待される通り, 440bp の位置に単一のバンドが観察された。*Psp* 1406I は Cry j 1 a, Cry j 1 d をコードする塩基配列に含まれる AACGTT という配列を認識して切断するが, Cry j 1 b, Cry j 1 c ではこの配列中の G が A に置換しているために認識されない。従って, Cry j 1 a, Cry j 1 d をコードする遺伝子からの PCR 産物を制限酵素処理した後電気泳動すると, 360bp と 80bp の 2 本のバンドが示されるが, Cry j 1 b, Cry j 1 c の場合は切断されず 440bp の単一のバンドが示されると予想される。鰯沢 17 号, 鬼泪 7 号, 西多摩 5 号からの PCR 産物を制限酵素処理し, 電気泳動してバンドパターンを観察した結果, 鰯沢 17 号は 80bp, 360bp, 440bp の位置に 3 本のバンド, 鬼泪 7 号は 360bp と 80bp の 2 本のバンド, 西多摩 5 号は 440bp に単一のバンドを示した (図 5-6)。この結果は, 各クローンから得られた cDNA の塩基配列と一致するものであった。

この CAPS マーカーについては, ボカスギ×イワオスギの F₁ 集団を用いて遺伝分析を行った。ボカスギおよびイワオスギについて分析を行った結果, ボカスギは 80bp と 360bp の 2 本のバンドを示し, イワオスギは 80bp, 360bp, 440bp のすべてのバンドを示した。2 種類のバンドパターンが単一遺伝子座の対立遺伝子を表すものと仮定し, 360bp と 80bp の 2 本のバンドで表現される対立遺伝子を *a*, 440bp の単一のバンドで表現される対立遺伝子を *b* と表すとすると, ボカスギの遺伝子型は *aa*, イワオスギの遺伝子型は *ab* と表すことができ, F₁ においては *aa:ab=1:1* の比で分離することが期待できる。遺伝分析の結果, *aa* の遺伝子型を持つ個体が 33 個体, *ab* の遺伝子型を持つ個体が 32 個体出現し, χ^2 検定の結果, 1:1 の分離比に適合することが明らかになった ($\chi^2=0.0154$, $p>0.05$)。従って, これらのバンドパターンは単一遺伝子座の対立遺伝子を表すものである。そこでこのマーカーを CRYJ1-352 と名付け, それぞれの対立遺伝子を *352a*, *352b*, 遺伝子型を *352a/a*, *352a/b*, *352b/b* と表記することにした。

5.3.4.4 352 番目のアミノ酸変異と J1B07 との結合性の関係

西多摩 5 号と同様, J1B07 との結合性の低いアイソフォームを生産する上伊那 4 号, 北会津 1 号, 双葉 3 号について CRYJ1-352 による分析を行った。その結果, 3 クローンすべてが *352b/b* であったことから, これらが生産するアイソフォームにおいても, 352 番目のアミノ酸の置換によって J1B07 との結合性が低下していると考えられた (図 5-6)。また, 2.3.1 で用いた 163 クローンのうち 88 クローンについて CRYJ1-352 による分析を行った結果, *352a/a* のクローンは 62 クローン, *352a/b* のクローンは 26 クローン検出された。*352b* のアイソフォームと J1B07 との結合性が低いとすると, *352a/b* のヘテロ接合体クローンから採取した花粉中の Cry j 1 含量を J1B07-J1B01 および J1B07-pAb で定量した場合, J1B01-pAb で定量した場合よりも少なくなると推定される。そこで *352a/b* のクローンのうち 10 クローンから採取した花粉中の Cry j 1 含量を J1B07-J1B01 と J1B01-pAb によって推定した結果, いずれのクローンにおいても J1B07-J1B01 によって推定される Cry j 1 含量は, J1B01-pAb によって推定される Cry j 1 含量のおよそ半分であった (図 5-2b)。この結果から, *352b* のアイソフォームと J1B07 の結合性が低いことが確認されるとともに, *352a* と *352b* のアイソフォームがほぼ等量ずつ生

産されていることが示唆された。

5.3.4.5 55 番目のアミノ酸変異と J1B01 との結合性の関係

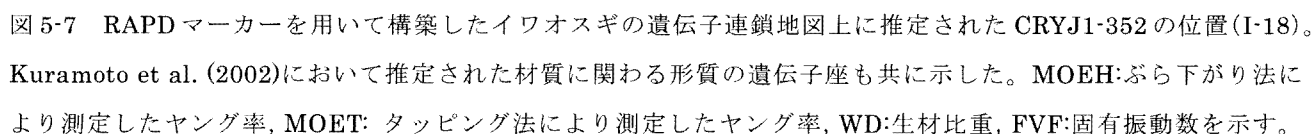
CRYJ1-55 を用いて、関東育種基本区のスギ精英樹 850 クロウンを対象に遺伝子型を調査した結果、55*b/b* のホモ接合体クロウンは検出できなかったものの、55*a/b* のヘテロ接合体クロウンが見出された。そこで 55*a/b* の 18 クロウンのうち、花粉が採取できた 9 クロウン（古川 4 号、群馬 2 号、飯山 15 号、飯山 17 号、河津 29 号、久慈 29 号、南設楽 1 号、西多摩 10 号、下高井 23 号）について 3 種類の ELISA による Cry j 1 の定量を行い、その結果からこれらのクロウンが生産するアイソフォームの J1B01 との結合性について検討することにした。また、CRYJ1-352 の遺伝子型を調べた結果、古川 4 号、久慈 29 号が 352*a/b*、その他の 7 クロウンは 352*a/a* であった（図 5-6）。

ELISA の結果、古川 4 号と久慈 29 号は鯉沢 17 号と同様 J1B07-J1B01 では吸光度が低く、Cry j 1 が定量できなかったが、J1B01-*pAb*、J1B07-*pAb* では Cry j 1 含量の推定が可能であった。J1B01-*pAb* および J1B07-*pAb* から推定される花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量は、古川 4 号がそれぞれ 145μg および 193μg、久慈 29 号では 139μg および 141μg であり、2 種類の ELISA から推定される Cry j 1 含量はほぼ同等であった（図 5-2a）。また、J1B07-J1B01 において低希釈系列で定量を行ったところ濃度依存曲線が得られ、花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量は古川 4 号が 27μg、久慈 29 号では 20μg と推定された。5.3.1 において、352*b* のアイソフォームは低希釈系列でも検出できなかったことから、ここで定量されたのは 55*b* であると考えられる。従って、55*b* のアイソフォームの J1B01 に対する結合性は他のアイソフォームの 10~15% 程度に低下していると考えられた。また、J1B01-*pAb* と J1B07-*pAb* から推定される Cry j 1 含量がほぼ同じ値であったことから、55*a* と 352*a* のアイソフォームはほぼ等量ずつ生産されていると考えられた。また、この結果から 55*b* と 352*b* の両方のアミノ酸変異を持つアイソフォームは関東育種基本区のスギ精英樹には存在しないと考えられた。

その他の 7 クロウンでは、J1B07-J1B01 および J1B01-*pAb* により推定された Cry j 1 含量はほぼ同等であったが、J1B07-*pAb* によって推定された Cry j 1 含量より大きく、およそ 2 倍であった（図 5-2a）。この結果は以下のように説明できる。J1B07-J1B01 および J1B01-*pAb* では 55*a/b* の遺伝子型のうち 55*a* のアイソフォームのみが検出され、55*b* のアイソフォームは検出されない。一方、J1B07-*pAb* では 55*a* のアイソフォームと 55*b* のアイソフォームのいずれもが検出されるため、トータルの Cry j 1 含量を推定できる。これらのクロウンにおいても J1B07-*pAb* により推定される Cry j 1 含量が他の方法で推定される Cry j 1 含量の約 2 倍であったことから、Cry j 1 含量の多少に関わらず 55*a* と 55*b* のアイソフォームがほぼ等量で生産され、両遺伝子間に優劣がないことから共優性（codominant）であることが示唆された。

5.3.5 イワオスギの遺伝子連鎖地図における Cry j 1 遺伝子の位置の推定

ボカスギ×イワオスギの F₁ 集団における CRYJ1-352 の遺伝分析の結果から、Kuramoto et al. (2000) によって作成されたイワオスギの遺伝子連鎖地図上の Cry j 1 遺伝子の位置を推定した。その結果、CRYJ1-352 は Kuramoto et al. が使用した RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカー、OPN13a と同じ分離パターンを示し、同じ位置に推定された（図 5-7）。



精英樹 855 クローンにおける CRYJ1-55 の分析結果から、55*b* の遺伝子頻度は 1.1% と推定された。また、5.3.4.4 で 88 クローンについて CRYJ1-352 による分析を行った結果と、3.3.4.3 で使用した 6 クローンにおける結果とを合わせて、94 クローンにおける 352*b* の遺伝子頻度を推定した（表 5-1）。その結果、352*a/a* を示したクローンは 63 クローン、352*a/b*、352*b/b* はそれぞれ 27 クローン、4 クローンであったことから、352*b* の遺伝子頻度は 18.6% と推定された。

		CRYJ1-352			
		<i>a/a</i>	<i>a/b</i>	<i>b/b</i>	計
CRYJ1-55	<i>a/a</i>	57	26	4	87
	<i>a/b</i>	6	1	0	7
	<i>b/b</i>	0	0	0	0
計		63	27	4	94

5.4 考察

5.4.1 アイソフォームにおけるクローン間変異

本研究の目的のひとつは、*J1B07-J1B01* で検出されなかったアイソフォームがいずれのモノクローナル抗体との結合性が低いのかを明らかにし、そのモノクローナル抗体をポリクローナル抗体で置き換えることにより、すべてのアイソフォームを定量できるように ELISA 法を改良することであった。しかし、*J1B01* との結合性が低いアイソフォームと *J1B07* との結合性が低いアイソフォームのいずれもが検出されたため、すべてのアイソフォームをひとつの ELISA 法で定量することは不可能であることが明らかになった。そこでそれぞれのアイソフォームの頻度を調べ、より頻度の高いアイソフォームを検出できるような ELISA 法を検討することにした。アイソフォームにおける *J1B01* および *J1B07* との結合性の低下はいずれの場合も 1 残基のアミノ酸変異によって引き起こされていることが明らかになったことから、これらのアミノ酸多型に基づいて CAPS マーカーを開発し、スギ精英樹におけるそれぞれのアイソフォームの頻度を推定した。その結果、*J1B01* との結合性が低いアイソフォームの遺伝子頻度は 1.1%であり、*J1B07* との結合性が低いアイソフォームの 18.6%と比較しても極めて低かった。従って、*J1B01-pAb* の方が *J1B07-pAb* よりも頻度の高いアイソフォームを定量可能であり、広く利用できると考えられる。そこで「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜においてはまず *J1B01-pAb* によりアレルゲン含量を評価するのが適切であろう。さらに候補となった Cry j 1 含量の少ないクローンについては CRYJ1-55 の遺伝子型を明らかにし、55b を保有するクローンについては *J1B07-pAb* による定量も行うという手順を踏むことにより、確実に「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜できる。

Cry j 1 については、これまでに *J1B01* および *J1B07* 以外にも多くのモノクローナル抗体が開発されていることから、これらのモノクローナル抗体を代用することも可能であるかも知れない(渡辺ら, 1992, Kawashima et al. 1992)。しかしその一部は *J1B01* と共通のエピトープを持つと推定されているものもあり、それらを代用することはできない(Sakaguchi et al. 1997)。また、本章で明らかにされた以外にもアイソフォームが存在する可能性があり、その他のモノクローナル抗体を代用するにあたっては、改めてアイソフォームとの反応特性を調べる必要がある。それは新たにモノクローナル抗体を開発する場合も同じである。従って現状では、他のモノクローナル抗体の代用を検討するよりは、反応特性が明らかな *J1B01* および *J1B07* を利用の方が実用的である。

本章では 1 クローン当たり 1 または 2 種類の cDNA の塩基配列が検出されたことから、Cry j 1 のアイソフォームは 1 つの遺伝子座に由来する対立遺伝子であることが示唆された。交配家系を用いた遺伝分析の結果、CRYJ1-55 および CRYJ1-352 のいずれもがメンデルの法則に従う分離比を示し、さらに CRYJ1-352 は既存のマーカーと同じ分離パターンを示し、イワオスギの遺伝子連鎖地図上の位置が推定されたことも、それを支持するものである。従って、スギ全体では様々なアイソフォームが存在する一方で、1 個体が生産するアイソフォームは 1 または 2 種類であると考えられる。また、55a/b および 352a/b のヘテロ接合体のクローンから採取した花粉中の Cry j 1 含量を抗体の組み合わせの異なる ELISA 法で推定し、比較したところ、いずれのクローンも 2 種類のアイソフォームをほぼ等量ずつ生産しており、アイソフォーム間で発現量に差がないことが明らかになった。従って、CAPS マーカーの遺伝子型はクローンが生産するアイソフォームの種類だけではなく、その比も示すと考えられる。このことはアレルゲン抽出液中に含まれるアイソフォームは花粉を採取するクローンによって大きく異なることを示しており、医療や臨床医学的な研究に用いるアレルゲン抽出液を調製する際、考慮すべき事実である。例えば現在アレルギー学会が配布している Cry j 1 の標準品のように、*J1B07-J1B01* により濃度を測定

するものについては鬼泪7号のように、*55a/a*かつ*352a/a*のクローンから採取した花粉から調製する必要がある。また、アイソフォームによって免疫化学的な特性、例えばT細胞の増殖やIgEとの結合性が異なるとすれば、アレルゲン抽出液の調製にどのようなクローンから採取した花粉を使用するかということはさらに重要な問題となる。例えばIgEとの結合性が低いアイソフォームは特異的減感作療法に用いることができる可能性がある反面、花粉症の診断には用いることができない。

5.4.2 アイソフォームの臨床医学的意義

アレルゲンが体内に取り込まれると、抗原提示細胞によって提示されたアレルゲンの断片（アミノ酸20残基程度のペプチド）を認識してT細胞が増殖し、B細胞が抗原レセプターを介してアレルゲンと結合するとともにアレルゲンを取り込んで分解し、組織適合抗原とともにその断片（抗原ペプチド）を細胞表面に発現する。そしてT細胞がB細胞表面の抗原ペプチドに反応し、T細胞とB細胞が接触することにより、B細胞が活性化して同じ抗原レセプターを持つIgEを産生する。産生されたIgEは肥満細胞やマスト細胞に結合し、その刺激によってマスト細胞から放出されるケミカルメディエーターが鼻水、くしゃみなどの花粉症の症状を引き起こすのである。これまでにCry j 1のアイソフォームにおける免疫化学的な特性の違いについて明らかにした例はないが、*55b*のアイソフォームのようにJ1B01と結合性が低いアイソフォームはIgEとの結合性が低く、アレルギーの症状を起こしにくい特性を持つ可能性がある。Suzuki et al. (1996)はJ1B01がCry j 1に対する17人のスギ花粉症患者からの血清中のIgEの結合をJ1B07よりも効果的に阻害したことを報告している。また、その他の研究においても、J1B01やJ1B01と共通のエピトープを認識するモノクローナル抗体013, 046, S214が他のモノクローナル抗体と比較して、Cry j 1とIgEの結合をより強く阻害することが明らかにされている (Tanai et al. 1993, Sakaguchi et al. 1997)。これらの事実はJ1B01がスギ花粉症患者のIgEと同じB細胞エピトープに結合することを示唆している。従って、*55b*はこのB細胞エピトープに変異があるためにIgEとの結合性が低下している可能性があり、その場合、花粉症の症状を起こしにくい特性を持つと考えられる。また、Cry j 1の主要T細胞エピトープに関する報告はあるが、B細胞エピトープについてはまだ明らかにされていない。*55b*と他のアイソフォームとの三次構造を比較することによって主要B細胞エピトープのひとつを明らかにできるかも知れない。

*55b*のアイソフォームが他のアイソフォームと比較してアレルゲン性が低い場合、特異的減感作療法に利用できる可能性がある。特異的減感作療法は、アレルゲンを少量から投与し、徐々に増量することによってアレルゲンに対する過敏性を低下させることを目的とした免疫療法のひとつである。特異的減感作療法は現在のところ最も重要な根本療法と言えるが、副作用としてアナフィラキシーショックが起きる場合があるという問題点がある。アナフィラキシーショックは体内における急激なIgE量の上昇により引き起こされる。前述したようにT細胞の刺激はアレルゲンが消化されて生じるペプチドを認識することによって起こり、IgEの産生はアレルゲンの立体構造の一部を認識することによって促進される。従って、T細胞エピトープが保存されているもののB細胞エピトープに変異があるようなアレルゲンがあれば、アナフィラキシーショックの恐れのない特異的減感作療法が可能となる。実際に、カバノキ属花粉のBet v 1においては、そのようなアイソフォームの探索や合成が試みられている (Ferreira et al. 1996, Ferreira et al. 1998, Friedel-Hajek et al. 1999,)。本研究で見い出された*55b*はこれまでに報告されているCry j 1のT細胞エピトープ部分のアミノ酸配列には変異がないため(橋口ら, 1996,

Ishikawa et al. 1997, Sone 1998), B 細胞エピトープだけに変異があるとすれば特異的減感作療法に有用であると考えられる。ただし, 本章の結果だけでは実際に IgE との結合性に変異があるかは明らかではなく, また主要 B 細胞エピトープは複数あると考えられるため, 今後さらに検討する必要がある。

5.5 結論

Cry j 1 含量の定量に使用していた 2 種類のモノクローナル抗体 J1B01 と J1B07 との結合性の異なる 4 種類のアイソフォームを見い出し, その cDNA 塩基配列を決定した。いずれとも結合するアイソフォームを Cry j 1a, J1B01 と結合するが J1B07 との結合性が低いアイソフォームを Cry j 1b および Cry j 1c, J1B07 と結合するが J1B01 との結合性の低いアイソフォームを Cry j 1d とした。それぞれの cDNA 配列を比較したところ, Cry j 1b および Cry j 1c においては 21 残基からなるシグナル配列を除く, 成熟 Cry j 1 の配列における 352 番目のアミノ酸残基がアルギニンからヒスチジンに置換しており, この変異が J1B07 との結合性の低下の原因であると考えられた。また, Cry j 1d においては 55 番目のアミノ酸残基がプロリンからロイシンに置換しているために, J1B01 との結合性が低下していると考えられた。そこでこれらの変異を簡易に検出するために CAPS マーカー, CRYJ1-55 と CRYJ1-352 を開発し, 複数のクローンにおけるアミノ酸変異と生産する Cry j 1 のモノクローナル抗体との結合性を調べた。その結果, これらのアミノ酸変異がモノクローナル抗体との結合性の低下を引き起こしていることが確認できた。

さらにこれらの CAPS マーカーを用いて, 関東育種基本区のスギ精英樹における J1B01 との結合性の低いアイソフォームを表す対立遺伝子 (*55b*) と J1B07 との結合性が低いアイソフォームを表す対立遺伝子 (*352b*) の頻度を調べた結果, *55b* の遺伝子頻度は 1.1% であり *352b* の遺伝子頻度 18.6% よりも著しく低かった。従って, *J1B01-pAb* の方が頻度の高いアイソフォームを定量でき, 広く利用可能であることが示唆された。さらに「アレルゲンの少ないスギ品種」の選定に当たっては, 候補クローンの CRYJ1-55 の遺伝子型を明らかにし, *55b* を保有するクローンについては, *J1B07-pAb* による定量を併用して Cry j 1 含量を推定する必要がある。

また, CRYJ1-352 を用いて Kuramoto et al. (2000) により作成されたイワオスギの連鎖地図上に Cry j 1 をコードする遺伝子の位置を推定した。その結果, RAPD マーカー OPN13a と同じ分離パターンを示し, 遺伝子連鎖地図上の同じ位置に推定された。

6 改良された定量法によるアレルゲン含量のクローン間変異の検討

6.1 緒言

第 5 章において, 第 4 章まで Cry j 1 の定量に利用していた *J1B07-J1B01* では定量できないアイソフォームが存在することが明らかになった。2.3.1 で使用した 163 クローンのうち 94 クローンにおける各アイソフォームの頻度を調べた結果, 27 クローンが *352a/b*, 6 クローンが *55a/b* のヘテロ接合体であり, *J1B07-J1B01* では, これらのクローンの花粉中に含まれる Cry j 1 の約半分に相当する *352b* または *55b* のアイソフォームを定量できていないことが示唆された。また, 最も Cry j 1 含量が少ないと考えられた鰯沢 17 号は *352a/b* かつ *55a/b* の遺伝子型を示し, *J1B01-pAb*, *J1B07-pAb* により推定した実際の Cry j 1 含量は, 2.3.1 で推定した Cry j 1 含量の 10 倍以上であった。従って, 2.3.1 ではこれらのクローンの Cry j 1 含量を過小評価していたと考えられる。そこで本章では, 第 5 章で提案した方法により改めて Cry j 1 含量のクローン間変異について検討した。

これまでの章において、Cry j 1 含量はクローン間で顕著な変異がある遺伝的な特性であることを明らかにし、花粉症対策における「アレルゲン含量の少ないスギ品種」の有用性を示した。従って今後はその実用化に向けて、「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜を進める必要がある。より効果の高い「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜するためには、既に 2.4 で述べたように雄花着花性の低いクローンの中から選抜することが望ましい。そこで本章では第 2 章と同じクローンを用いるのではなく、これまでに蓄積された雄花着花量のデータに基づき、比較的雄花着花性が低いクローンを選び出し、これらのクローンにおける Cry j 1 含量の変異を調べた。

また、Cry j 1 と同様に重要なスギ花粉の主要アレルゲンとして、Cry j 2 がある。Hashimoto et al. (1995) は 145 人の花粉症患者のうち 92% が Cry j 1, Cry j 2 両方に対する IgE 抗体を保有していて、さらに 4.1% が Cry j 1 に対する IgE 抗体, 3.4% が Cry j 2 抗体に対する IgE 抗体のみを保有していたことを報告している。従って Cry j 1 と同様に Cry j 2 も重要なアレルゲンであると言える。また、佐々木ら (1996) は、花粉重量当たりの Cry j 2 含量は Cry j 1 含量より小さく 3 分の 1 程度であるものの、大きなクローン間変異があったことを示している。従って Cry j 1 だけではなく Cry j 2 も少ないクローンを選抜できれば、より高い効果が期待できる。

一方、野原ら (1997) が高圧処理によって花粉を破碎してから溶媒に懸濁することにより、Cry j 2 の抽出量が約 6 倍に増加したことを報告しているほか、安枝 (2000) も予備実験的なものではあるが、抽出溶媒に塩を加えることにより Cry j 2 の抽出量が増加する可能性があることを示している。従って、これまでの方法では花粉中の Cry j 2 含量を正確に評価できていない可能性があり、まず最適な抽出法を検討する必要がある。そこで本章では、特別な機材が不要な安枝の方法 (2000) を参考に Cry j 2 の抽出法を検討し、最も適切と考えられた方法で Cry j 1 および Cry j 2 含量におけるクローン間変異を調査した。

6.2 材料と方法

6.2.1 材料

花粉重量当たりの Cry j 1 および Cry j 2 含量の変異の調査には、関東育種基本区の精英樹のうち、比較的雄花着花性の低い 143 クローンをを用いた。これらのクローンは、関東育種基本区内の各都県（福島県、栃木県、群馬県、茨城県、東京都、埼玉県、千葉県、神奈川県、岐阜県、静岡県、愛知県、長野県）および社団法人林木育種協会、林木育種センターが行った精英樹クローンにおける雄花着花性のデータに基づいて選び出した。また、Cry j 2 の抽出法の検討には秩父県 3 号、那珂 5 号、足柄下 2 号の 3 クローンから採取した花粉を供試した。林木育種センター交配園に植栽されているこれらのクローンに対し、2001 年 7 月にジベレリン水溶液の浸漬処理による着花促進を行い、2002 年 2 月下旬から 3 月上旬にかけて花粉を採取した。花粉の採取および保存は 2.2.1 の方法で行った。

6.2.2 Cry j 1 の定量

5.3.1. に示した J1B01 とポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法 (J1B01-pAb) を一部改変した方法により行った。ビオチン化二次抗体を反応させる過程で、ビオチン化二次抗体 (pAb) をウェルに加えて 37°C で 1 時間インキュベートした後、4°C に一晩静置した。その後、5.3.1 に述べた方法でストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼおよび α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトシドとの反応を行い、Cry j 1 を定量した。

6.2.3 Cry j 2 の定量

Cry j 2 の定量は抗 Cry j 2 モノクローナル抗体 (J2A01, J2A07) を用いたサンドウィッチ ELISA 法により行った。ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp, Nalge Nunc International, Rochester, NY USA) の各ウェルに、0.1M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝溶液 (pH9.6) で 2ng/ μ l に希釈した J2A07 を 100 μ l 加えて 37°C で 1~1 時間 30 分インキュベートした後、4°C で一晩吸着させた。0.2% の Tween 20 を含むリン酸緩衝溶液 (PBS-T, w/v) で 4 回洗浄後、1% のウシ血清アルブミン (BSA, w/v) を含むリン酸緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS) を加え、37°C で 1 時間ブロッキングした。PBS-T で 4 回洗浄後、0.2% の BSA を含む PBS-T (PBS-T-BSA, w/v) で希釈した精製 Cry j 2 標準溶液 (Cosmo Bio Co., Ltd. Japan) およびスギ花粉抽出液を 100 μ l 加えて 37°C で 2 時間反応させた。標準溶液 (スタンダード) の濃度は 160, 80, 40, 20ng/ml とし、花粉抽出液は 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 の 2 倍希釈系列とした。PBS-T で 4 回洗浄後、PBS-T-BSA で 1ng/ μ l に希釈したビオチン化した J2A01 を 100 μ l 加えて 37°C で 1 時間インキュベートした後 4°C に静置した。PBS-T で 4 回洗浄後、1 ウェル当たり 0.03U の β -ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で 4 回洗浄後、0.02M リン酸二水素ナトリウム水溶液で調製した 5mM σ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド 100 μ l を加えて 37°C で約 1 時間酵素反応を行った。1.0M の炭酸ナトリウム溶液 100 μ l を加えて反応停止後、マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA USA) で 415nm での吸光度を測定し、精製 Cry j 2 標準溶液の吸光度から求めた標準曲線に基づき、各スギ花粉抽出液中の Cry j 1 濃度を算出した。Cry j 1 濃度の算出には Microplate manager II (Bio-Rad) を用いた。

6.2.4 Cry j 2 の抽出方法の検討

安枝 (2000) は、Cry j 2 は弱塩基性の抽出溶媒 (0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液) のみでは抽出されにくかったが、50%グリセリンに塩化ナトリウムを加えることによって抽出が促進されたことを報告している。そこで本章では弱塩基性抽出溶媒に塩化ナトリウムを加えることによって抽出効率の向上を試みた。まず、澤谷ら (1993) の報告を参考にして、0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH8.3)、0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液 (pH7.9)、0.05M トリス-塩酸バッファー (pH7.8) の 3 種類の塩基性抽出溶媒により 24 時間、抽出を行い、Cry j 2 の抽出量を比較して最も抽出量が多い溶媒を選び出した。そしてこの溶媒に 0.25~1.5M の塩化ナトリウムを加えて抽出し、最適な塩化ナトリウム濃度を決定した。さらに最適と考えられた抽出溶媒による Cry j 2 の抽出量を経時的に測定し (2 時間~48 時間)、抽出時間を決定した。さらに決定した方法による Cry j 1 抽出量と従来の方法による Cry j 1 抽出量を比較した。いずれの抽出溶媒も、花粉 100mg に対して 5ml 加え (50 倍量, w/w)、2°C で振とう抽出した。抽出量は花粉 1g 当たりの含量に換算して比較した。

6.3 結果

6.3.1 Cry j 2 の抽出方法の検討

0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液, 0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液および 0.05M トリスー塩酸バッファー (pH7.8 および pH9.8) によって抽出した花粉単位重量当たりの Cry j 2 量を図 6-1 に示した。各溶媒による抽出量を比較した結果, いずれのクローンにおいても 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液による抽出量が最も高かった。そこで次に, 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液に 0.25M, 0.5M, 1.0M, 1.5M の塩化ナトリウムを加えて抽出し, その抽出量を比較した。その結果, 1.0M 塩化ナトリウムおよび 1.5M 塩化ナトリウムを加えた場合の抽出量と比較して 0.25M 塩化ナトリウムおよび 0.5M 塩化ナトリウムを加えた場合の抽出量の方が多かった (図 6-2)。また, 0.25M 塩化ナトリウムを加えた場合と 0.5M 塩化ナトリウムを加えた場合の抽出量の差異はクローンによって異なり, 足柄下 2 号, 秩父県 3 号では 0.5M 塩化ナトリウムを加えた場合に最も多く, 那珂 5 号では 0.25M の 0.5M 塩化ナトリウムを加えた場合に最も多かった。そこでさらに 2 クローン (東加茂 10 号, 天竜 4 号) を追加して 0.25M, 0.5M の濃度における抽出量の比較を行うとともに再現性を調べた。抽出是那珂 5 号, 秩父県 3 号, 足柄下 2 号において 4 反復, 東加茂 10 号, 天竜 4 号は 3 反復とし, 図 6-2 に平均値と標準偏差を示した。その結果, 那珂 5 号, 天竜 4 号では 0.25M の塩化ナトリウムを加えた抽出溶媒による抽出量の方が多く, 秩父県 3 号, 足柄下 2 号, 東加茂 10 号では 0.5M の塩化ナトリウムを加えた抽出溶媒による抽出量の方が多いという傾向は見られたが, 誤差の範囲内であり大きな差はないことが明らかになった。また, いずれの抽出溶媒の場合も変動係数は 10~20% であり, 十分な再現性が得られていると判断した。以上の結果から, 本研究では 0.125M 炭酸水素ナトリウム+0.5M 塩化ナトリウムを Cry j 2 の抽出に使用することにし, さらにこの抽出溶媒による抽出時間について検討した。その結果, 秩父県 3 号, 足柄下 2 号では 2 時間でほぼ全量が抽出されていると考えられたが, 那珂 5 号では 24 時間まで抽出量の増加が認められた (図 6-3)。この結果に基づき, 抽出時間は 24 時間とした。

単位花粉重量当たりの Cry j 1 含量および Cry j 2 含量を調査するにあたって, 同時に両方のアレルゲンを抽出できれば効率がよい。そこで, Cry j 1 についても, 従来行ってきた抽出法 (0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 時間) と 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液+0.5M 塩化ナトリウムにより 24 時間抽出した場合の抽出量を比較した (図 6-4)。その結果, いずれのクローンにおいても従来の方法と同程度の Cry j 1 が抽出されることが明らかになった。従ってここで採用した方法により Cry j 1 と Cry j 2 を同時に抽出し, その抽出液からそれぞれの含量を推定することが可能だと考えられた。

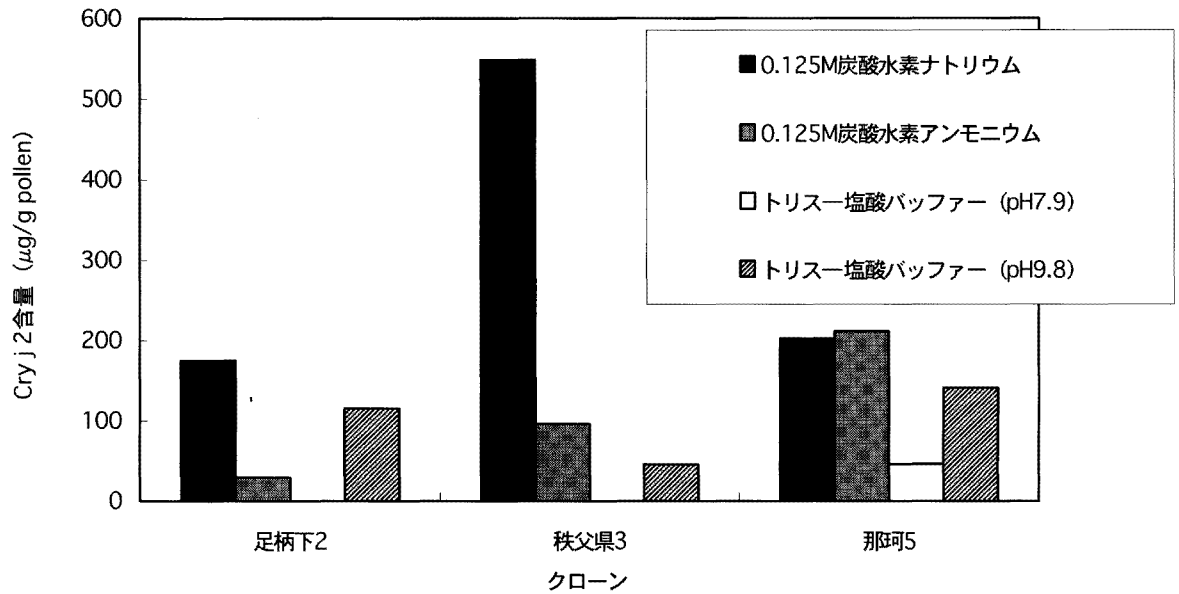


図 6-1 4 種類の弱塩基性抽出溶媒による Cry j 2 の抽出量の比較

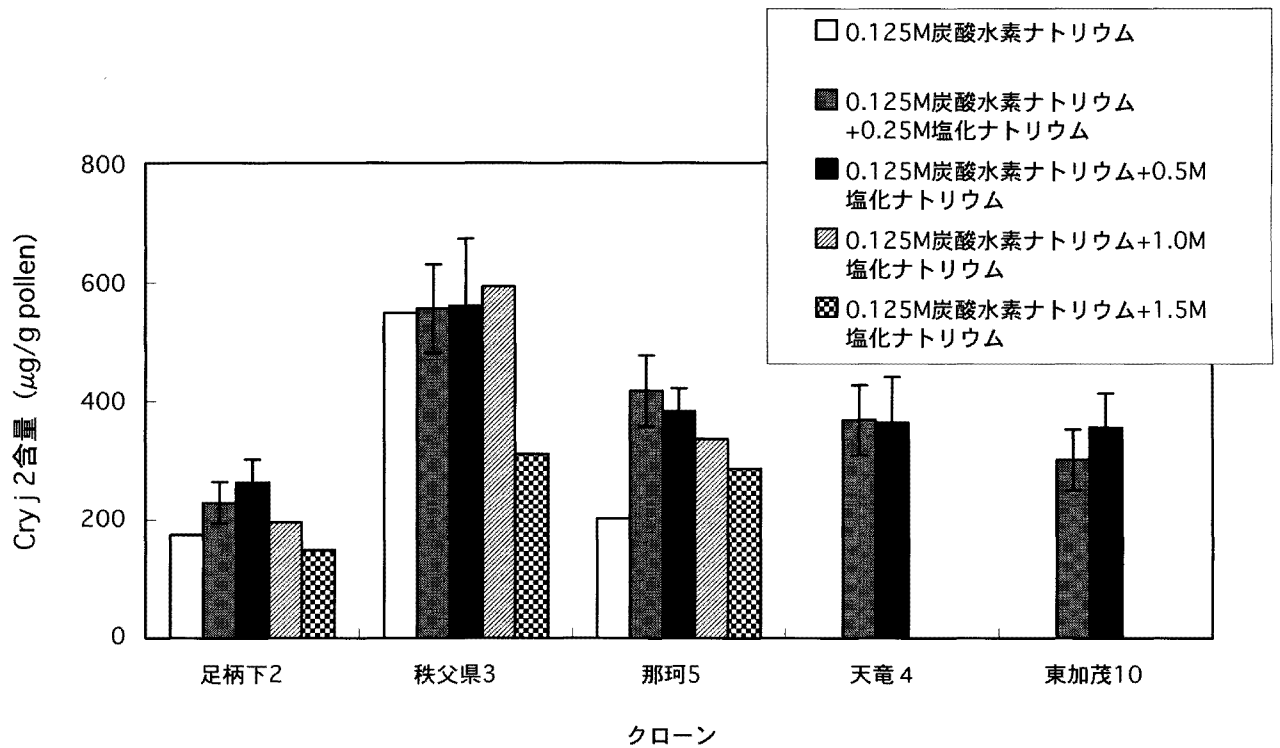


図 6-2 塩化ナトリウムの濃度の違いによる Cry j 2 の抽出量の比較

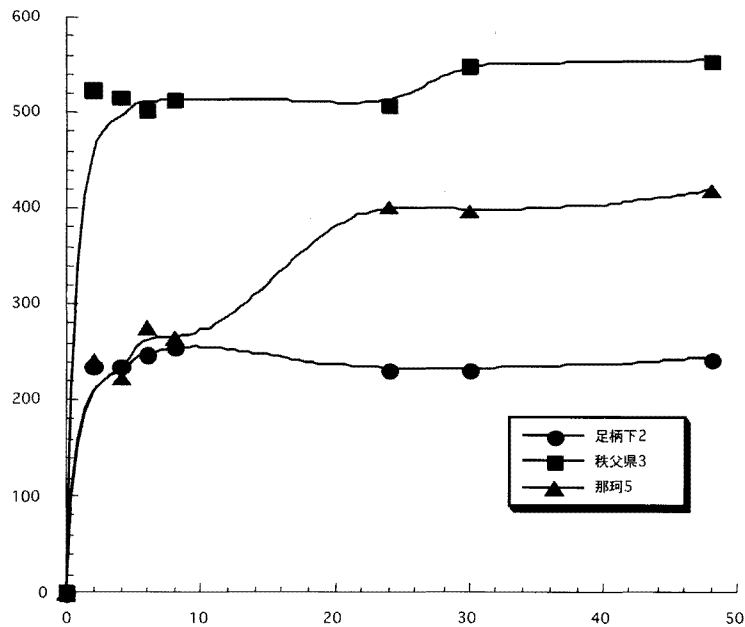


図 6-3 Cry j 2 抽出量の経時変化

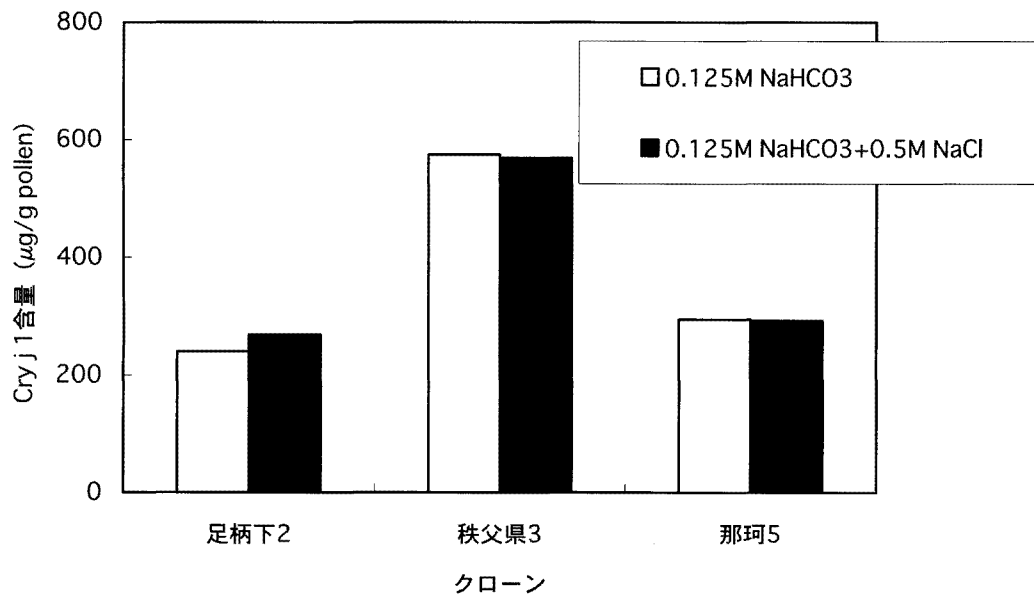


図 6-4 従来の抽出法と本章で採用した抽出法による Cry j 1 抽出量の比較

6.3.2 Cry j 1 および Cry j 2 含量におけるクローン間変異

供試した 143 クローンにおける花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量および Cry j 2 含量の平均値はそれぞれ 406 μ g と 431 μ g であり, Cry j 1 のほうがやや高かった。また, 最大値, 最小値は Cry j 1 では 81 μ g, 1052 μ g であり, Cry j 2 では 92 μ g と 1145 μ g であり, いずれも 12~13 倍のクローン間変異が認められた。図 6-5 に Cry j 1 含量の頻度分布を示した。

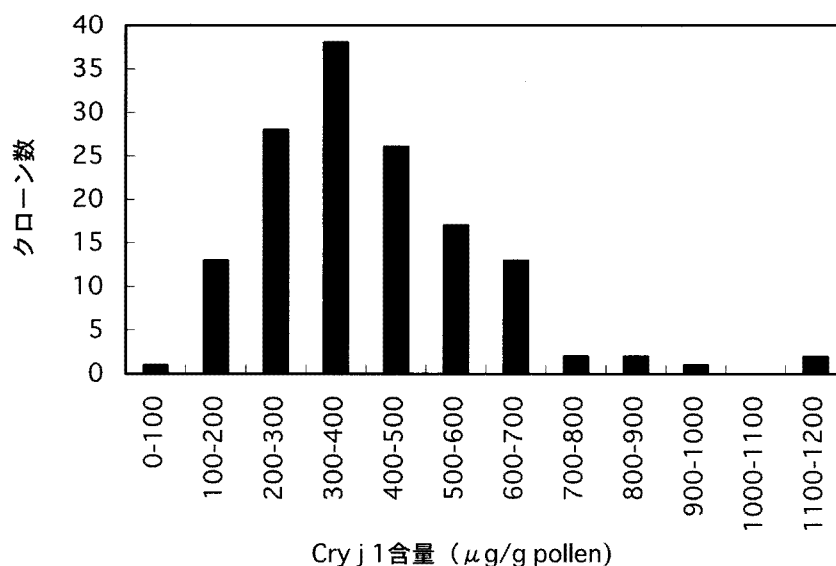


図 6-5 Cry j 1 含量のクローン間変異

6.4 考察

本章では 5 章までの結果を踏まえ、関東育種基本区のスギ精英樹の中で比較的雄花着花性の低いクローンを対象に、花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量におけるクローン間変異を調査した。

また、もうひとつの主要アレルゲンである Cry j 2 の含量については、Cry j 1 含量よりも少なく、個体間および採取地、採取年による変異が大きいことが報告されている一方で(澤谷ら, 1995, 佐々木ら, 1996, 野原ら, 1997), 抽出方法によって大きく変化することが指摘されている(野原ら, 1997, 安枝, 2000)。そこで本章では、特別な機材が不要な安枝の方法(2000)を参考に Cry j 2 の抽出効率の向上を試みた。まず、4 種類の弱塩基性の抽出溶媒、0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液、0.125M 炭酸水素アンモニウム水溶液、トリス-塩酸バッファー(pH7.8 および pH9.8) による Cry j 2 の抽出量を比較した結果、0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液による抽出量が最も高かった。そこで 0.125M 炭酸水素ナトリウムに異なる濃度の塩化ナトリウムを加えて抽出される Cry j 2 の量を比較し、最適な塩化ナトリウム濃度を決定した。さらに抽出量を経時的に測定し、抽出時間を検討した。その結果から、0.125M 炭酸水素ナトリウム+0.5M の塩化ナトリウムで 24 時間抽出する方法を採用した。野原ら(1997)は 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液による花粉 1g 当たりの Cry j 2 の抽出量は 20µg 程度であったものの、高圧処理により花粉を破砕することによって 120µg, すなわち約 6 倍に増加したことを示している。本章で示された 0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液に塩化ナトリウムを加えたことによる抽出量の増加率は 10% から約 2 倍であり、野原らの報告と比較して低いものであった。しかし、花粉 1g 当たりの Cry j 2 の抽出量は 265~561µg とこれまでの報告(澤谷ら, 1993, 佐々木ら, 1996, 野原ら, 1997)と比較して高いものであったことから、この抽出法で花粉中の Cry j 2 の大部分が抽出されているものと考えた。

Cry j 1, Cry j 2 とともに弱塩基性の抽出溶媒に溶出しやすいという特徴があり、そのため弱塩基性に傾いた花粉症患者の鼻粘膜上で溶出しやすく、主要アレルゲンとして作用するのだと考えられている。従って、Cry j 1 および Cry j 2 の抽出においては pH が重要であり、弱塩基性の抽出溶媒であれば同じように Cry j 1 および Cry j 2 が抽出できるとされていた(澤谷ら, 1993)。しかし本章では、4 種類の弱塩基性抽出溶媒を用いて 3 クローン

の花粉から Cry j 2 を抽出し、その抽出量を比較した結果、抽出溶媒間で顕著な差異が認められた。トリス塩酸バッファー (pH9.8) の方がトリスバッファー (pH7.8) よりも抽出効率が高く、0.125M 炭酸水素アンモニウム (pH7.8) と比較して 0.125M 炭酸水素ナトリウム (pH8.3) の方が抽出効率が高かったことから、弱塩基性であっても pH が異なると抽出効率に変化する可能性が示唆された。また、0.125M 塩化ナトリウム水溶液に加える塩化ナトリウムの濃度によっても Cry j 2 の抽出量に変化し、塩濃度が高すぎても抽出効率が低下することが明らかになった。

野原ら (1997) は、大部分が花粉外壁や外壁に付着するオービクルスに存在する Cry j 1 と異なり、Cry j 2 は細胞内部のアミロプラスト内のデンプン粒に局在するため、花粉の細胞質まで破壊が及ばない限り Cry j 2 の溶出は十分に起こり得ないとしているが、本研究の結果から抽出溶媒の組成によっては Cry j 2 は十分に溶出し得ることが示唆された。また、Cry j 2 の多くは 2 時間以内に抽出されていることが明らかになった。Cry j 1 と同様 Cry j 2 にも感作されている花粉症患者は多い (澤谷ら, 1993, Hashimoto et al. 1995)。本章における結果は、花粉症患者の鼻粘膜上で短時間に Cry j 1 と同程度の量の Cry j 2 が溶出される可能性を示唆するものであり、スギ花粉が花粉症患者の目や鼻粘膜に付着したときにどのような変化を起こし、アレルゲンが溶出されるのか、その機構を考察する上で示唆を与えるものであるかも知れない。

本章では改良したアレルゲンの抽出法および定量法により、Cry j 1 のクローン間変異について再検討した。また、「アレルゲンの少ないスギ品種」の実用化を想定し、雄花着花性が比較的低いクローンを調査対象とした。その結果、花粉 1g 当たりの Cry j 1 含量の平均値は 406 μ g、最大値および最小値は 1052 μ g および 81 μ g でありその差は約 13 倍であった。第 2 章では最大値と最小値の差は約 80 倍であったが、最小値を鰯沢 17 号の 16 μ g として過小評価したため、最大値との差が大きくなったと考えられる。しかし、本章で得られた約 13 倍というクローン間変異も、選抜による改良の効果を十分に期待できる大きさである。また、頻度分布は 300~400 μ g をピークとする正規分布を示した。第 2 章の結果と同様、この結果も遺伝的変異を維持しつつ Cry j 1 含量の改良を進められることを示唆するものである。平均値も含め全体的に第 2 章で得られた結果と比較して Cry j 1 含量が少ない傾向が見られたが、それは第 5 章の結果に基づき、新たにスタンダードを調製しなおしたことによるものだと考えられる。J1B07-J1B01 により比較してみた結果、第 2 章で使用していたスタンダードの濃度は本章で用いたスタンダードの濃度の約 75%であったことから、第 2 章で得られた Cry j 1 含量に対して 0.75 を掛けて修正すると本章とほぼ同様の値となった。

さらに、これらのクローンにおける花粉単位重量当たりの Cry j 2 含量についても調査した結果、Cry j 1 含量と同様の傾向が認められた。花粉 1g 当たりの Cry j 2 含量の平均値は 431 μ g、最小値および最大値はそれぞれ 92 μ g および 1145 μ g で約 12 倍の変異があり、いずれも Cry j 1 含量における結果とほぼ同じ値であった。この結果から Cry j 1 含量だけではなく Cry j 2 含量にも着目することによって、より効果の高い品種を選抜できると考えられる。

6.5 結論

0.125M 炭酸水素ナトリウム水溶液に 0.5M の塩化ナトリウムを加えた抽出溶媒を用いることにより、Cry j 2 の抽出効率を大幅に向上できることが明らかになった。また、この抽出溶媒を用いた場合、Cry j 1 の抽出量は従来行っていた 0.125M 炭酸水素ナトリウムを用いる方法による抽出量とほぼ同程度であった。

スギ精英樹 143 クローンから採取した花粉から、0.125M 炭酸水素ナトリウム+0.5M 塩化ナトリウムを用いて Cry j 1 と Cry j 2 を抽出し、Cry j 1 含量および Cry j 2 含量のクローン間変異を調査するとともに Cry j 1 含量と Cry j 2 含量の相関関係を調べた。第 5 章の結果を踏まえ、Cry j 1 の定量は *J1B01-pAb* により行った。その結果、Cry j 1 含量、Cry j 2 含量ともに 80~1200 μ g のクローン間変異が認められた。

7 総合討論

7.1 緒言

スギ花粉症は年々深刻化し、林業においてもその対策が求められている。本研究では、花粉単位重量当たりのアレルゲン含量がスギクローン間で大きく異なることに着目し、アレルゲン含量についての品種改良の有効性について検討した。ある形質の育種における改良効果の大きさを表す遺伝獲得量は選抜差と遺伝率の積によって求められるため、変異が大きく遺伝率が高いほど遺伝獲得量は大きくなる。本研究では、第 2 章、第 3 章、第 4 章においてスギ花粉の 2 種類の主要アレルゲンのうち、すでに定量方法が確立されている Cry j 1 を中心にクローン間変異や遺伝性を調査した。その結果、Cry j 1 含量は遺伝的に支配されている形質であることが明らかになったことから、第 6 章ではさらに Cry j 2 含量の定量法を確立するとともにそのクローン間変異を明らかにした。これまでの研究では、花粉単位重量当たりの Cry j 2 含量は Cry j 1 含量の 5 分の 1 から 2 分の 1 程度であるとされていたが（澤谷ら、1995、佐々木ら、1996、野原ら、1997）、本研究ではスギ花粉には Cry j 1 と同程度の Cry j 2 が含まれていることが明らかになった。従って、今後 Cry j 2 についてもその変異における遺伝的要因の重要性を明らかにし、Cry j 1 と Cry j 2 を総合的に評価した上で「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜し、実用化を進める必要がある。また、第 4 章では 4 ヶ所に共通して植栽されたクローンにおける Cry j 1 含量を比較した結果、クローン×植栽地の交互作用が認められなかった。従って、ある程度環境条件の異なる地域でもアレルゲン含量におけるクローンの順位の変動は小さいと考えられるが、より実用性を高めるためには、さらに広い地域における交互作用を明らかにし、「アレルゲンの少ないスギ品種」の育種区分について検討する必要がある。また、年次変動や広い地域におけるアレルゲン含量の変異を調査することによって、アレルゲン含量に対する気象条件の与える影響も明らかにできるだろう。

第 5 章では、Cry j 1 には量的変異のみならず、分子構造における変異、いわば質的変異も存在することを明らかにした。これまでに 3 種類の Cry j 1 をコードする cDNA 塩基配列が報告されているが（Sone et al. 1994, Namba et al. 1994）、本研究では新たに 3 種類のアイソフォームを見出した。これらのうちのひとつは、IgE 抗体とエピトープを共有するモノクローナル抗体との結合性が低いことから、アレルゲン性が低い可能性がある。アイソフォーム間での特性の違いは、モノクローナル抗体を用いた研究の結果に影響を与えるだけでなく、検査や治療に用いるアレルゲン抽出液の質にも影響を与えるため、医療の場でも注意を払う必要がある。さらに、アレルゲン性の低いアイソフォームを生産するスギクローンを新たに花粉症対策品種として利用できる可能性もあり、今後これらのアイソフォームにおける免疫化学的な性質の差異を明らかにする必要がある。

本章では各章で得られた結果をもとに、「アレルゲンの少ないスギ品種」をどのようにして林業における花粉症対策に生かすべきか、また、アレルゲン含量およびアイソフォームレベルでのクローン間変異が臨床医学的な観点においてどのような意味をもつかを論じるとともに、育種における花粉症対策の今後の展望について述べることにする。

7.2 「アレルゲンの少ないスギ品種」の林業における重要性

これまでに花粉症対策品種として「花粉の少ないスギ品種」が選抜され、現在普及が進められている。不幸にもスギ花粉症は林業において最も社会的に注目度の高い問題になっており、花粉症を起こしにくい（低アレルゲン性の）スギに対する要求はさらに高まると考えられる。スギは木材生産を目的とする林業樹種であり、これまでの育種は成長特性や材質における改良を目標として進められてきた。しかし、今後は低アレルゲン性であるという必要条件を満たした上で、林業的に重要な特性にも優れた品種の育成を目指すことが求められる。林業における花粉症対策の手段として枝打ち、間伐などの施業も考えられるが、強度の間伐を行うと疎開によって樹冠への日当たりがよくなり、林分当たりの雄花生産量は逆に増加してしまうことが指摘されている（清野，2003）。しかしその一方で、清野らは間伐を行っても雄花を着生しない個体や間伐によって雄花の着花量が著しく増加する個体が存在することを観察しており、施業においてもスギ個体ごとの遺伝的特性に考慮することが重要であると述べている。施業のみによる花粉症対策には限界があり、育種の効果も取り入れることによって施業の効果が発揮されることが考えられる。

林業における花粉症対策の高い重要性に対し、現在選抜されている「花粉の少ないスギ品種」のみでは育種母材としても種苗生産の母集団としても不十分である。第2章において雄花着花性とアレルゲン含量は独立した形質であることが明らかになったことから、「花粉の少ないスギ品種」とは別に、新たに「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜することが可能であると考えられた。ただし、雄花着花性におけるクローン間変異はアレルゲン含量におけるそれ以上に顕著なものであり、花粉を生産しないことが花粉症対策において最も重要な形質であると考えられることから、雄花着花性が比較的低いクローンの中から「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜するのが望ましい。そこで第6章では、これまでに都県や社団法人林木育種協会、林木育種センターで行った精英樹の雄花着花性の調査結果に基づき、雄花着花性が比較的低いクローンを選び出し、Cry j 1 含量および Cry j 2 含量を調査した。その結果、いずれも正規分布を示し、12~13 倍程度の顕著なクローン間変異が認められた。また、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量の間には有意な相関関係が認められたことから、雄花着花性が低く、Cry j 1 含量、Cry j 2 含量ともに少ない品種を選抜できることが示唆された。

さらに Cry j 1 含量については 0.796 と高いクローン反復率が得られ、今市市（栃木県）、木更津市（千葉県）、郡山市（福島県）および十王町（茨城県）という環境条件の異なる場所に植栽された場合でもクローンごとに安定した傾向を示し、分散分析においてクローン間の分散成分の寄与率が高かったことから、Cry j 1 含量は遺伝的要因に強く支配されていることが明らかになった。また増殖年次の異なる個体間で Cry j 1 含量の差が認められなかったことから、「アレルゲンの少ないスギ品種」をクローンで利用することにより、確実に空中アレルゲン量を減らすことができると考えられる。斉藤ら（2003）は母親が共通した 11 の F₁ 家系を用いて遺伝率を推定した結果、1 以上の高い値が得られたことを報告していることから、採種園に「アレルゲンの少ないスギ品種」を導入することによっても、アレルゲン含量の少ない種苗を生産することができるだろう。

「アレルゲンの少ないスギ品種」は「花粉の少ないスギ品種」と比較して短期間で選抜が可能であるという利点がある。アレルゲン含量は雄花着花性と異なり、生育環境や樹齢に関わらずジベレリン処理による着花促進によって評価が可能であるため、選抜が容易であるからである。また、ジベレリン処理を利用した苗木段階での早期検定が可能であるため、交配家系を用いた遺伝性の研究も比較的容易に進めることができる。そして「アレル

ゲンの少ないスギ品種」は単に花粉症対策品種の数を増やすというだけではなく、「花粉の少ないスギ品種」の欠点を補う役割も持つ。第 2 章で述べたように、雄花着花性はクローン間変異が大きいものの遺伝率が低く、アレルゲン含量は雄花着花性と比較してクローン間変異が小さいものの遺伝率が高いことから、育種効果を考える上で相補的な関係にあり、双方を考慮することによって、より効果的に花粉症対策を進めることができると考えられる。

さらに採種園での種苗生産を考えた場合、「花粉の少ないスギ品種」とともに「アレルゲンの少ないスギ品種」を併用することは、大変重要な意味を持つ。「花粉の少ないスギ品種」は主に自然着花による雄花着花性に基づいて選抜されているが、より確実を期すためにジベレリン処理による強制着花量の調査も行っている場合には、強制着花量も少ないクローンを優先的に選抜している。従って「花粉の少ないスギ品種」のみで採種園を造成した場合、ジベレリン処理を行っても雄花があまり着生せず、「花粉の少ないスギ品種」同士の交雑が起こりにくくなり、外部花粉と交雑する確率が高くなってしまう可能性がある。森口（2003）は DNA マーカーを用いて複数のスギ採種園における交配の実態を調査し、外部花粉の流入が 30%以上の高い率で起きていたことを報告しているが、「花粉の少ないスギ品種」を導入した採種園においてはさらに外部花粉の流入率が高くなることが懸念される。特に周囲の雄花を大量に着生する個体から飛散する花粉と交雑した場合には、「花粉の少ないスギ品種」の持つ遺伝的特性が相殺され、雄花着花性における改良の効果が減少してしまう。ジベレリンによる着花促進に対する反応性はクローンによって異なることから（戸田ら，1996，西村ら，1994），採種園で低アレルゲン性の種苗を生産するために最も理想的なのは、自然着花では雄花が着かないがジベレリン処理をすると大量に着花するクローンである。実際に九州育種基本区では、8 年間に渡る調査で 1 度も着花しなかった 46 クローンにジベレリン処理をして着花量を調査した結果、13 クローンが雄花を着生しなかった、あるいは 5 段階評価で評価が 1 以下であったが、その一方で評価が 3 以上と高かったクローンも 14 クローン見出されていて（戸田ら，1996），これらの一部は「花粉の少ないスギ品種」として選抜されている。しかし、そのようなクローンを選抜するためには長期間に渡って自然着花量とジベレリン処理による強制着花量を調査する必要がある、花粉症対策の緊急性を考えるとそれは困難である。将来的にはそのようなクローンを選抜するとしても、まず比較的短期間で選抜可能な「アレルゲンの少ないスギ品種」を採種園に導入し、「花粉の少ないスギ品種」を母樹、「アレルゲンの少ないスギ品種」を花粉親とした種子生産を行うことによって、遠からず低アレルゲン性の苗木を生産することが可能になると考えられる。

7.3 臨床医学におけるアレルゲンの量的および質的変異の重要性

一般的に花粉症の診断や特異的減感作療法には、花粉から抽出したアレルゲン抽出液が利用されている。従って、アレルゲン抽出液の調製に使用する花粉によって、その質が変化する可能性がある。Hjelmroose et al. (1995) は、カバノキ属の *Betula pendula* の複数個体の方角の異なる部位から花粉を採取してアレルゲンを抽出して比較したところ、抽出液中のアレルゲンの種類や量が個体間および同一個体内の異なる部位間で異なっていたことを報告している。また、Sanchez et al. (2002) は、オリーブの品種間で含まれているアレルゲンの構成が異なり、最も主要なアレルゲン Ole e 1 の含量とアレルゲン性の間に相関性が認められたことから、花粉症の診断に用いるアレルゲン抽出液の均質化が必要であることを述べている。スギ花粉のアレルゲン抽出液については Cry j 1 濃度を指標とした標準化が基本方針として採用されているが（安枝ら，1996），本研究において Cry j 1 含量に

顕著なクローン間変異が認められたことから、Cry j 1 含量の多いクローンから採取した花粉を用いることによって効率的にアレルゲン抽出液が調製できると考えられる。さらに第 5 章においては Cry j 1 に多数のアイソフォームが存在し、クローンによって生産するアイソフォームが異なることが明らかになったことから、花粉を採取するクローンによってアレルゲン抽出液に含まれるアイソフォームの構成も変化することが示された。

これまでも様々なアレルゲンにおいて複数のアイソフォームが存在し、中にはモノクローナル抗体や T 細胞、B 細胞、IgE との反応性などの免疫化学的な特性が異なるものがあることが明らかにされている (Breiteneder et al. 1993, Smith et al. 2002, Park et al. 2002)。樹木花粉ではカバノキ属花粉の主要アレルゲン Bet v 1 において多数のアイソフォームが検出されており、その cDNA を発現ベクターに導入して大腸菌や酵母によって生産させて精製し、得られたリコンビナントアレルゲンを用いてそれぞれのアイソフォームの免疫化学的な性質が研究されている (Ferreira et al. 1996, Friedel-Hajek et al. 1999)。アイソフォームによって免疫化学的な性質が異なるとすると、使用するアレルゲン抽出液に含まれるアイソフォームの種類によって花粉症の診断の結果が影響を受ける可能性がある。体内で起きるアレルギー反応にはポリクローナルな抗体が関与しており、アレルゲン中のどのエпитープを認識するかには個人差があるため、診断には主要なエпитープを欠くことなく、アレルゲン性が高いアイソフォームが適していると考えられる。

アイソフォーム間での特性の違いは、特異的減感作療法を行う上でも重要な問題である。特異的減感作療法は現在のところ最も重要な根本療法であるが、アナフィラキシーショックを起こす可能性があるという問題点がある。アナフィラキシーショックは体内の IgE 濃度の急激な上昇によって起こるので、T 細胞のみを刺激し IgE の生産を引き起こさないようなアイソフォームを使用すれば、安全に特異的減感作療法を行うことが可能になる。また特異的減感作療法では、主に CD4⁺ T 細胞が産生するサイトカインのプロファイルが変化することによってアレルギー症状が改善されると考えられていることから (Secrist et al. 1993, Jutel et al. 1995, Ebner et al. 1997)、使用するアイソフォームには T 細胞エпитープが保存されていることが重要である。そこで様々なアレルゲンにおいて T 細胞との反応性が高く、IgE との反応性が低いアイソフォームの探索が行われている (Ferreira et al. 1996, González et al. 2002)。Bet v 1 ではさらに、IgE との結合性に関与する部位を推定し、人為的にその部位に相当する配列に塩基置換を起こさせた cDNA を合成し、それをリコンビナントアレルゲンとして発現させることによって、T 細胞との反応性は天然型 Bet v 1 と同程度であるが IgE との反応性の低いアイソフォームを作り出している (Ferreira et al. 1998)。本研究において新たに検出された Cry j 1 アイソフォームのうちのひとつ、Cry j 1d は IgE との反応性が低い可能性があり、今後その特性を明らかにすることによって特異的減感作療法に利用できる可能性がある。

本研究では既知のものを含め、4 種類の Cry j 1 のアイソフォームが検出され、それらの間にはモノクローナル抗体との結合性の差異が見出された。さらに、そのアミノ酸配列とモノクローナル抗体との結合性を統合的に比較すると、いずれのモノクローナル抗体の場合も、1 残基のアミノ酸変異によって結合性が低下していることが示唆された。そこでさらに、それらのアミノ酸変異を引き起こしている DNA 塩基配列の変異を多型として検出する CAPS マーカーを開発し、複数のクローンにおけるアイソフォームのアミノ酸変異とモノクローナル抗体との結合性を調べ、その関係を確認した。ここでは CAPS マーカーを使用することによって、スギのクローンごとに生産する Cry j 1 アイソフォームのタイプを容易に推定することが可能となった。

アイソフォーム間で免疫化学的な特性が異なり、個体によって生産するアイソフォームが異なるとすると、花

粉を採取する個体によってアレルゲン抽出液に含まれるアイソフォームが変化する。しかしこれまでに、1 個体が何種類のアイソフォームを生産するのかという点について検討し、遺伝子型とアレルゲン含量との関係を解明した例はない。本研究においては 4 クローンから花粉を採取し、Cry j 1 をコードする cDNA のクローニングおよび塩基配列の決定を行ったところ、各クローンから 1~2 種類の Cry j 1 アイソフォームが検出された。さらに、交配家系を用いて CAPS マーカーの遺伝分析を行った結果、メンデル遺伝に従う分離比を示したことから、Cry j 1 アイソフォームは 1 遺伝子座に由来する対立遺伝子であると考えられた。従って、1 個体が生産するアイソフォームは 1 種類または 2 種類であり、アレルゲン抽出液中に含まれるアイソフォームは花粉を採取する個体に大きく依存することが明らかになった。アレルゲン抽出液を調製する際には、使用目的に応じて花粉を採取する個体を選択する必要があるかも知れない。また、これまでの研究では単一のアイソフォームの特性を明らかにするためにはリコンビナントアレルゲンの発現系を確立することが必要とされていたが、本研究の結果から、スギのクローンごとに Cry j 1 を抽出することによって単一のアイソフォームを単離し、特性を調べることが可能であることが示された。

本研究ではさらに、CAPS マーカーを使用して関東育種基本区のスギ精英樹における特定のアミノ酸変異の頻度を明らかにした。Ferreira et al. (1996) および Park et al. (2002) はそれぞれ Bet v 1 および Der p 1 において最も頻度が高いと考えられるアイソフォームが最も高い IgE との反応性を示したことを報告しており、この結果は曝露量の多いアイソフォームに感作される可能性が高いことを示唆している。興味深いことに本研究においても IgE 抗体との反応性が低い可能性のある Cry j 1d の頻度が 1.1% と顕著に低かった。また Friedel-Hajek et al. (1999) は、アイソフォームの種類や頻度に地域特異性がある可能性を指摘しており、その場合地域によって花粉症患者が強く感作されているアイソフォームや主要エпитープが異なる可能性も考えられる。しかし Ferreira et al. (1996) や Friedel-Hajek et al. (1999) は、少数の個体から採取した混合花粉や研究用に市販されている花粉から得られた cDNA クローンの頻度からアイソフォームの頻度を推定しており、それらの花粉サンプルが地域または種全体におけるアイソフォームの変異を表現していない可能性がある。本研究で示したように、アミノ酸変異を多型として検出する DNA マーカーを使用することによって、より正確にアイソフォームにおける地域間変異を明らかにできると考えられる。

また、現在減感作療法に代わる花粉症の治療法として、ペプチド療法や DNA ワクチンの実用化に向けた研究が進められている。いずれも T 細胞エпитープをターゲットにしたものであり、ペプチド療法では主要 T 細胞エпитープと推定されている部分配列のペプチド鎖、あるいは複数の主要 T 細胞エпитープを連結させたペプチド鎖を合成して投与する方法、DNA ワクチンは T 細胞エпитープの塩基配列を組み込んだ発現ベクターを投与する方法である。ペプチド療法に関しては、合成されたペプチドを用いた *in vitro* の実験において、T 細胞の増殖は起きるものの末梢血リンパ球の増殖は起きないことや、IgE とほとんど結合しないことが確認されていて、実用化が期待されている (Sone et al. 1998, Hirahara et al. 2001)。DNA ワクチンについても、スギ花粉症のイヌに対して投与した結果、顕著な効果が認められたことが報告されている (Masuda et al. 2001)。これまでの T 細胞エпитープに関する研究は Sone et al. (1994) により報告されたアイソフォームの cDNA 配列およびアミノ酸配列に基づいて進められているが、今後さらにアイソフォームの探索を進めることによって新たな T 細胞エпитープが同定されれば、その情報を基にさらに効果が高く汎用性の高い治療が可能になる。

7.4 さらにスギ花粉症対策品種の創出

本研究において、アレルゲン含量は遺伝的要因によって強く支配される形質であり、顕著なクローン間変異が存在することが明らかになったことから、アレルゲン含量の少ないクローンを選抜して利用することによって花粉症を軽減することが可能であることが示された。また、雄花着花性やアレルゲン含量のような量的な変異を利用した花粉症対策品種の選抜が進められる一方、平らは雄性不稔を示す突然変異個体を発見しており（平ら，1993），今後はこれらについても実用化が進められると考えられる。あるいはダイズやライグラスで成功しているように（Herman et al. 2003, Bhalla et al. 2001）遺伝子組換えによってアレルゲンの生産や雄花着花が抑制された品種が作り出され、利用が進められる可能性もある。これらの品種は花粉を全く飛散させないため、空中アレルゲン量を減少させる効果が非常に高いと考えられるが、その反面これらを母材とした交雑により多様な種苗を生産することは困難である。そのため、これらの品種を重点的に利用するとスギ林における遺伝的多様性が失われる危険性があり、「花粉の少ないスギ品種」や「アレルゲンの少ないスギ品種」と並行して利用する必要がある。また、現在最も緊急性の高い問題のひとつが花粉症である一方で、スギに求められる特性は成長特性、材質、病虫害抵抗性など多様であり、複数の優れた特性を持つ品種を創出するための基本的な手段は交雑育種である。他の特性において優れたクローンと「花粉の少ないスギ品種」や「アレルゲンの少ないスギ品種」を交雑することによって、花粉症対策に有効であると同時に林業的に重要な特性にも優れた品種の創出や種苗の生産を行うことが可能になると考えられる。

スギにおいてはこれまでに RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) に加えて、RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism), STS (Sequence-Tagged-Sites), CAPS など、cDNA ライブラリーを基盤として遺伝子領域に関連する DNA マーカーが開発され、これらを利用してスギの高密度連鎖地図の作成が進められている (Mukai et al. 1995, Tsumura et al. 1997, Yoshimatu et al. 1998, Kuramoto et al. 2000, Nikaido et al. 2000, Ujino-Ihara et al. 2000, Iwata et al. 2001, Moriguchi et al. 2003)。それと同時にこれらの遺伝子連鎖地図上に、初期成長や発根性、着花性、材質などに関連する遺伝子座の位置の推定が推定されつつある (Yoshimaru et al. 1998, Kuramoto et al. 2000)。花芽形成に関与する遺伝子も既にいくつか単離され、塩基配列が明らかになっていることから (Fukui et al. 2001)，今後はこれらの連鎖地図上の位置が推定されると共に、他の特性との連鎖関係が明らかにされると考えられる。本研究において *Cry j 1* をコードする遺伝子領域については明らかになったが、その生産量がどのように制御されているのか、遺伝子地図上のどの位置に生産量を支配する遺伝子座が存在するのかはまだ明らかではない。将来、様々な有用特性に関与する遺伝子座の連鎖関係を解明することによって、効率的に交雑育種を進めることが可能になるだろう。それは *Cry j 2* に関しても同様である。また、アミノ酸変異によってアレルゲン性が低下したアイソフォームが見出された場合、そのアミノ酸変異に関連する DNA マーカーを開発し、アレルゲン性の低いアイソフォームを生産するクローンの選抜に利用することができるだろう。

本研究では、スギの育種における花粉症対策について論じてきた。しかし、スギ花粉症の原因はスギ花粉だけではなく、ヒノキ花粉もまたスギ花粉症の原因となることが明らかにされている (Rohac et al. 1994, Taniai et al. 1993, Suzuki et al. 1996, Yasueda et al. 2000)。ヒノキはスギと並んで日本の林業において最も重要な樹種であり、最近ではスギよりも材価が高いこともあり造林面積はスギを上回っている。従って、今後はスギにおいて示された方向性を参考に、ヒノキにおいても花粉症対策を進める必要がある。

摘 要

現在、日本におけるスギ花粉症の罹患率は 1 割を超え、大きな社会問題となっている。スギ花粉症患者の増加の主な原因はスギ人工林面積の増加に伴うスギ花粉生産量の増加にあるため、林業において花粉症対策は重要な課題のひとつとなっている。その中のひとつとして育種による品種改良が挙げられ、これまでに雄花着花性の低い「花粉の少ないスギ品種」の選抜と利用が進められている。さらに、スギ花粉の主要アレルゲンである Cry j 1 と Cry j 2 の花粉単位重量当たりの含量がスギ個体間で大きく異なることが報告されていることから、「アレルゲン含量の少ないスギ品種」を選抜して花粉対策にさらに効果を上げることが期待されている。そこで育種効果を検討するために不可欠な、アレルゲン含量における遺伝的支配の強さや環境要因の及ぼす影響について明らかにすることを本研究の目的とした。また、スギは林業樹種であるため、花粉症対策品種においても林業上重要とされる成長特性や通直性、材質が優れていることが求められる。従って「アレルゲンの少ないスギ品種」はそれらの特性に優れた精英樹の中から選抜することが望ましい。従って本研究では、精英樹を材料としてアレルゲン含量の遺伝的変異について検討を行った。本研究で得られた成果は以下の通りである。

1. 花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量と Cry j 2 含量には、いずれも 12~13 倍程度の顕著なクローン間変異があることが明らかになった。また、雄花着花性とアレルゲン含量は独立した形質であることが示唆された。
2. ジベレリン処理による着花促進は花粉単位重量当たりの Cry j 1 含量に影響を与えないことが明らかになったことから、ジベレリン処理を利用することによって雄花着花量の年次変動や雄花着花性におけるクローン特性に影響されず、Cry j 1 含量を調査することが可能となった。
3. 異なる環境条件下においても Cry j 1 含量はクローンごとに類似した傾向を示し、一般的には安定した遺伝的形質であることが明らかになったが、例外的に個体間で Cry j 1 含量が安定しないクローンも見出された。また、Cry j 1 含量は花粉の発達期間中の気象条件に影響を受けることが示唆された。
4. Cry j 1 の定量に使用していたモノクローナル抗体、J1B01 および J1B07 との結合性が低いアイソフォームが見い出された。いずれにおいても 1 残基のアミノ酸変異がモノクローナル抗体との結合性の低下を引き起こしていることが明らかになったため、それぞれのアミノ酸変異を多型として検出する CAPS マーカーを開発した。CAPS マーカーの遺伝分析の結果から Cry j 1 のアイソフォームは 1 遺伝子座に由来する対立遺伝子であることが明らかになり、Cry j 1 をコードする遺伝子の位置が既報 (Kuramoto et al. 2000) の遺伝子連鎖地図上に推定された。また、CAPS マーカーによる分析の結果から、スギ精英樹におけるそれぞれのアイソフォームの頻度には顕著な差があることが明らかになった。

以上の結果から「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜、利用によって花粉症の軽減を期待できることが明らかになった。さらに、本研究で得られた知見から、「アレルゲンの少ないスギ品種」の選抜方法における提言を行った。

1. 「花粉の少ないスギ品種」の選抜のために蓄積された雄花着花性に関する調査結果に基づいて比較的雄花着花性が低いクローンを選び出し、それらの中から「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜する。

2. 確実に花粉を採取するために、ジベレリン処理による着花促進を行う。まず、調査対象とするクローンについて1個体または少数個体を用いてアレルゲン含量を調査してスクリーニングを行い、選んだ候補クローンについてはさらに多数の個体間でのアレルゲン含量の安定性を調べる。もしくは複数年に渡って調査を行う。
3. J1B01 との結合性が低いアイソフォームの頻度は 1.1%と推定され、J1B07 との結合性が低いアイソフォームと比較して顕著に低いと考えられたことから、J1B01 とポリクローナル抗体を組み合わせたサンドウィッチ ELISA 法によって信頼性の高い Cry j 1 の定量を行うことができる。しかし「アレルゲンの少ないスギ品種」の最終的な選抜においては、候補クローンに対して CAPS マーカーによるチェックを行い、J1B01 との結合性が低いアイソフォームを生産するクローンについては J1B07 とポリクローナル抗体を用いた ELISA 法による Cry j 1 の定量も行い、総 Cry j 1 含量を調べる必要がある。

以上の方法により「アレルゲン含量の少ないスギ品種」の選抜を進めるのと並行して、アレルゲン含量におけるクローンと植栽地における交互作用を調べ、「アレルゲンの少ないスギ品種」の利用区分について検討する必要があると考えられる。

また、アイソフォームによってアレルゲン性が異なる可能性が考えられ、アレルゲン性が低いアイソフォームが明らかになれば、そのアイソフォームを生産するクローンを新たな「アレルゲンの少ないスギ品種」に利用できるかも知れない。また、1個体が生産するアイソフォームのは1~2種類と考えられることから、花粉症の診断や治療に用いるアレルゲン抽出液の質は花粉を採取する個体によって大きく変化する可能性がある。従って、アイソフォーム間での免疫化学的な特性の差異は臨床医学的にも重要な問題であり、今後検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、技術面および精神面からご支援下さった多くの方々に謝意を表します。本論文を取りまとめるにあたり、丁寧なご校閲と有益なご助言をいただいた北海道大学農学部教授寺澤實博士、同教授高橋邦秀博士、同教授藤川清三博士、同助教授小島康夫博士にお礼申し上げます。本研究に着手する機会を与えていただき、終始懇篤なご指導と励ましをいただいた林木育種センター育種工学課長近藤禎二博士に深く感謝申し上げます。また、相模原病院臨床研究センター安枝浩博士、齋藤明美研究員には、Cry j 1 および Cry j 2 のモノクローナル抗体を恵与していただくとともに、花粉症およびアレルギーに関する豊富な知識に基づき多くの貴重なご助言をいただきました。アイソフォームに関する研究においては、奈良医科大学井手武博士、山本恵三博士、稲岡心研究員、愛媛大学柴田洋博士に技術的なご指導やご助言をいただくとともに、元生研機構研究員シブ・シャンカール・カンダン博士に多くの有益なご助言をいただきました。カルフォルニア州立工科大学林英司博士（当時林木育種センター育種課研究員）、九州育種場倉本哲嗣博士には材料の採取に労をお取りいただくとともに、多くのご助言をいただきました。また、茨城県林業技術センター、千葉県森林研究センター、栃木県林業センターおよび福島県林業研究センターの職員の方々には材料の採取にご協力いただきました。林木育種協会職員伊佐見邦子さん、元生研機構職員吉田孝子さんには実験を補助していただきました。

田島正啓育種部長, 栗延晋育種課長, 高橋誠環境育種研究室長, 板鼻直榮育種課長 (関西育種場), 加藤一隆材質抵抗性研究室長, 岡村政則育種研究室長 (九州育種場), 武津英太郎研究員をはじめとする林木育種センター職員の皆様には, 日頃よりご協力, ご助言いただくとともに, 論文の作成にあたって励ましの言葉をいただきました。以上の方々に心より感謝申し上げます。

尚, 本研究の一部は科学技術庁 (現文部科学省)「スギ花粉症克服に向けた総合研究」により行われたものです。

引用文献

1. Ahlholm J. U., Helander M. L., Savolainen J. 1998. Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hämet-Ahti) pollen. Clin Exp Allergy 28:1384-1388.
2. 阿久沢和夫. 1988. 林木の育種に関する研究 (1) ヒノキ採種園の結実促進試験 (8). 群馬県林業試験場業務報告:8-10.
3. Bhalla P. L. Swoboda I. Singh M B. 2001. Reduction in allergenicity of grass pollen by genetic engineering. Int Arch Allergy Immunol 124:51-54.
4. Blackley C. H. 1873. Experimental researches on the cause and nature of Catarrhus aestivus (hay-fever or hay asthma), London, Bailliere, Tindall and Cox.
5. Bostwick J. 1819. Case of periodical affection of the eyes and chest. Medio-Chirurgical Transactions 10:161-165.
6. Breiteneder H., Ferreira F., Hoffman-Sommergruber K., Ebner C., Breitenbach M., Punpold H., Kraft D., Scheiner O. 1993. Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. Eur J Biochem 212:355-362.
7. Ebner C., Siemann U., Bohle B., Willheim M., Wiedermann U., Schenk S., Klotz F., Ebner H., Kraft D., Schener O. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1. a major grass pollen allergen. Clin Exp Allergy 27:1007-1015.
8. El-Ghazany G., Nakamura S., Takahashi Y., Cresti M., Walles B., Milanesi C. (1996). Localization of the major allergen Bet v 1 in Betula pollen using monoclonal antibody labelling. Grana 35:369-374.
9. Fahy O., Tsicopoulos A., Hammad H., Pestel J., Tonnel A. B., Wallaert B. Effects of diesel organic extracts on chemical production by peripheral blood mononuclear cell. (1999). J Allergy Clin Immunol 103(6):1115-1124.
10. Ferreira F., Hirtenlehner K., Jilek A., Godnik-Cvar J., Breiteneder H., Grimm R., Hoffman-Sommergruber K., Sheiner O., Kraft D., Breitenbach M., Rheinberger H. J., Ebner C. 1996. Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: Potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. J Exp Med 183:599-609.
11. Ferreira F., Ebner C., Kramer B., Casari G., Briza P., Kungl A. J., Grimm R., Jahn-Schmid B.,

- Breiteneder H., Kraft D., Breitenbach M., Rheinberger H. J., Scheiner O. 1998. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J* 12:232-242.
12. Friedel-hajek R., Radauer C., O'riodain G., Hoffmann-Sommergruber K., Leberl K., Scheiner O., Breiteneder H. 1999. New Bet v 1 isoforms inducing a naturally occurring truncated form of the protein derived from Austrian birch pollen. *Mol Immunol* 36:639-645.
13. Fukui M., Futamura N., Mukai Y., Wang Y., Nagano A., Shinohara K. 2001. Ancestral MADS box genes in sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don (Taxodiaceae), homologues to the B function genes in angiosperms. *Plant Cell Physiol* 42(6):566-575.
14. Futamura N., Mukai Y., Sakaguchi M., Yasueda H., Inouye S., Midoro-Horiuti T., Goldblum RM, Shinohara K. 2002. Isolation and characterization of cDNAs that encode homologs of a pathogenesis-related protein allergen from *Cryptomeria japonica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(11):2495-2500.
15. 橋口周平, 杉村和久. 1996. スギ花粉抗原の分子生物学的解析とエピトープの同定. *日本臨床* 54(8):215-224.
16. Hashimoto M., Nigi H., Sakaguchi, M., Inouye S., Imaoka K., Miyazawa H., Taniguchi Y., Kurimoto M., Yasueda H. and Ogawa T. 1995. Sensitivity to two major allergens (*Cry j* I and *Cry j* II) in patients with Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis. *Clin. Exp. Allergy* 25:848-852.
17. 橋詰隼人. 1959. スギの花芽分化におよぼすジベレリンの影響. *日林誌* 41(10):375-381.
18. 橋詰隼人, 1970. 林木の交配に関する基礎的研究 (III) スギの花粉の発育と発芽. *日林誌* 52(4):1970.
19. Herman E. M., Helm R. M., Jung R., Kinner A. J. 2003. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol* 132:36-43.
20. Hino K, Yamamoto S, Sano O, Taniguchi Y, Kohno K, Usui M, Fukuda S, Hanzawa H, Haruyama H, Kurimoto M. 1995. Carbohydrate structure of the glycoprotein allergen Cry j 1 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Biochem* 117:289-295.
21. Hirahara K., Tatsuta T., Takatori T., Ohtsuki M., Kirinaka H., Kawaguchi J., Serizawa N., Taniguchi Y., Saito S., Sakaguchi M., Inouye S., Shiraishi A. 2001. Preclinical evaluation of immunotherapeutic peptide comprising 7 T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 108:94-100.
22. 本間環. 2003. スギの花芽分化・形成機構における植物ホルモンの役割. *林木の育種* 208:21-27.
23. 堀口申作, 斎藤洋三 (1964). 栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese Cedar Pollinosis の発見. *アレルギー* 13:16-18.
24. 井上栄, 阪口雅弘, 森田盛大, 庄司俊雄, 金田誠一, 木村英二, 山本保男, 井上博雄, 小野哲朗, 道家直, 平川浩資 (1988). 一般住民のスギ花粉特異IgE抗体保有率の地域差. *医学のあゆみ* 145:121.
25. Ishikawa T. Ikegawa S. Masuyama K. Matsushita S. Nishimura Y. 1997. Human T cell response to antigen peptides of Japanese cedar pollen (Cry j 1). *Int Arch Allergy Immunol* 113:255-257.
26. Jutel M., Pitcher W. J., Skrbic D., Urwyler A., Dehinden C., Müller U. R. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific

- allergen stimulated T cell cultures. J Immunol 154:4187-4197.
27. 金山央子, 後藤陽子, 近藤禎二. 2002. 関東育種基本区のスギ精英樹のクローン識別におけるRAPD法の有効性. 日林誌84(2):100~103.
28. 加藤善忠, 三宅勇, 石川広隆. 1958. ジベレリンによるスギ花芽分化の促進. 日林誌40(1):35-36.
29. 河原孝行, 村上哲明, 瀬戸口浩彰, 津村義彦. 1994. 野生植物からのDNA抽出と解析への道. 日本植物分類学会報11:13-32.
30. Kawamoto S, Fujimura T, Nishida M, Tanaka T, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Suzuki O, Shigeta S, Ono K. 2002. Molecular cloning and characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant isoflavone reductase family. Clin Exp Allergy 32(7):1064-1070.
31. Knox R. B., Suphioglu C. (1996). Environmental and molecular biology of pollen allergens. Trends Plant Sci Rev 1:156-164.
32. Kawashima T., Taniai M., Taniguchi Y., Usui M., Ando S., Kurimoto M., Matuhasi T. 1992. Antigenic analysis of sugi basic protein by monoclonal antibodies: I. Distribution and characterization of B-cell-tropic epitopes of *Cry j* I molecules. Int Arch Allergy Immunol 98:110-117.
33. 清野嘉之, 奥田史郎, 竹内郁雄, 石田清, 野田巖, 近藤洋史. 2003. 強い間伐はスギ人工林の雄花生産を増加させる. 日林誌 83(3):237-340.
34. 近藤禎二. 1996. 関東育種基本区のなかのスギ精英樹三倍体クローン. 日林論97:439-440.
35. Kondo Y., Ipsen H., Lowenstein H., Karpas, A., Hsieh L-S. 1997. Comparison of concentrations of *Cry j* 1 and *Cry j* 2 in diploid and triploid Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen extracts. Allergy 52:455-459.
36. Kuramoto N., Kondo T., Fujisawa Y., Nakata R., Hayashi E., Goto Y. 2000. Detetion of quantitative trait loci for wood strength in *Cryptomeria japonica*. Can J For Res 30:1525-1533.
37. 増田勝己, 小平哲夫, 明石孝輝. 1993. 千葉県におけるスギ精英樹雄花量の遺伝的変動. 千葉県林試研報 7:1-10.
38. Masuda K., Sakaguchi M., Saito S., Yamashita K., Hasegawa A., Ohno K., Tsujimoto H. 2001. Clinical trial of *Cry J* 1 DNA vaccination to induce hyposensitization in atopic dogs sesitized to Japanese cedar pollinosis. J Allergy Clin Immunol 107(2) S290.
39. Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Kurosky A, Wood TG, Brooks EG. 2000. Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperous ashei*) pollen. J immunol 164:2188-2192.
40. Miki-Hiroshige H., Nakamura S., Yasueda H., Shida T., Takahashi Y. 1994. Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. Sex Plant Reprod 7:95-100.
41. 宮本昭正, 小林節雄, 中島重徳 編 (1998).アレルギー疾患の増加因子(環境因子・食物を含む). Life Science Publishing.
42. 宮浦富保. 1994. 関東育種基本区のスギ地域差検定林10年次データの解析. 林木の育種170:8-12.

43. Moriguchi Y., Iwata H., Ujino-Ihara T., Yoshimura K., Taira H., Tsumura Y. 2003. Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Thor Appl Genet* 106:751-758.
44. 森口喜成, 2003. DNAマーカーによるスギの遺伝・育種に関する研究—DNAマーカーを用いた採種園改良のための基礎的研究—. *林木の育種* 208:9-10.
45. Mukai Y., Suyama Y., Tsumura Y., Kawahara T., Yoshimaru H., Kondo T., Tomaru N., Kuramoto N., Murai M. 1995. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD, and isozyme loci. *Theor Appl Genet* 90:835-840.
46. Murray M. G., Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.
47. 中村昭彦, 吉田博一, 平林秀樹 (1999). スギ花粉症有症率の全国分布, *免疫アレルギー* 17(2):134-135.
48. 長野準, 西間三馨, 岸川禮子, 佐橋紀男, 横山敏孝 (1992). 日本列島の空中花粉II. 北隆館.
49. Namba M., Kurose M., Torigoe K., Hino K., Taniguchi Y., Fukuda S., Usui M., Kurimoto M. 1994. Molecular cloning of the second major allergen, *Cry j* II, from Japanese cedar pollen. *FEBS Lett* 353:124-128.
50. Namba, M., Kurose, M., Torigoe, K., Fukuda, S. and Kurimoto, M. (1994) GenBank accession number D343649 (direct submission).
51. Nikaido A. M., Ujino T., Iwata H., Yoshimaru K., Yoshimura H., Suyama Y., Murai M., Nagasaka K. Tsumura Y. 2000. AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica*. *Theor Appl Genet* 100:825-831.
52. 西村慶二, 藤本吉幸. 1994. スギさし木在来品種等の人工着花量. *九州育種場年報* 21:126-128.
53. 野原修, 今井 透, 遠藤朝彦, 実吉健策, 大盛剛哉, 斉藤三郎, 谷口美文, 藤巻秀和, 森山 寛 (1997). スギ花粉粒子の形態的变化と主要抗原の溶出との関係. *アレルギー* 46(12):1235-1242.
54. Ohtsuki T., Taniguchi Y., Kohno K., Fukuda S., Usui M., Kurimoto M. (1995). *Cry j* 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy* 50:483-488.
55. Okawa T., Konno A., Yamakoshi T., Numata T., terada N., Shima M. (2002). Analysis of natural history of Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 131: 39-45.
56. Ozasa K., Dejima K., Takenaka H. (2002). Prevalence of Japanese cedar polinosis among schoolchildren in Japan. *Int Arch Allergy Immunol* 128:165-167.
57. 岡野光博 (2000). 花粉症の感作および発症メカニズム. *生物工学会誌* 80(4):140-144. 澤谷真奈美, 安枝 浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 臼井美津子, 安藤駿作, 栗本雅司, 松永 直 (1993). スギ花粉アレルゲン *Cry j* IIの免疫学的, 物理化学的性質. *アレルギー* 42(6):738-747.
58. 小田一幸, 古賀信也, 堤壽一 (1988). 材質育種にむけてのスギ品種の年輪構造. *九大演報* 58:109-122.
59. Park J. W., kim K. S., Jin H. S., Kim C. W., kang D. B., Choi S. Y., Yong T.-S., Oh S. H., Hong C.-S. 2002. Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. *Clin Exp Allergy* 32:1042-1047.

60. Rohac M, Birkner T, Reimitzer I, Bohle B, Steiner R, Breitenbach M, Kraft D, Sheiner O, Gabl G, Rumpold H. 1991. The immunological relationships of epitopes on major tree pollen allergens. *Mol Immunol* 28:897-906.
61. Saito M., Teranishi H. 2000. Immunological determination of the major allergen, Cry j 1, in *Cryptomeria japonica* pollen of 117 clones in Toyama Prefecture: Some implications for further forestry research in pollinosis prevention. *Allergol Int* 51(3):191-196.
62. 斎藤真己, 寺西秀豊, 平英彰. 2003. 全国25道県におけるスギ花粉アレルゲン—Cry j 1—量の変異と遺伝率の推定. *日林誌*85(4):312-317.
63. Sakaguchi M, Inouye S, Taniai M, Ando S, Usui M, Matuhasi T. 1990. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45:309-312.
64. Sakaguchi M., Hashimoto M., Nigi H., Yasueda H., Takahashi Y., Watanabe M., Nagoya T. 1997. Epitope specificity of IgE antibodies to a major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar pollen in sera of humans and monkeys with pollinosis. *Immunology* 91:161-166.
65. Sánchez J. C., Iraola V. M., Sastre J., Florido F., Boluda L., Fernández-caldas E. 2002. Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of *Olea europaea*. *Allergy* 57:313-318.
66. 佐々木義則, 谷口美文, 正山征洋. 1996. スギ倍数体花粉のアレルゲン分析. *大分県林試研究時報*22:8~12.
67. Secrist H., Chelen C. J., Wen Y., Marshall J. D., Umetsu D. T. 1993. Allergen Immunotherapy devreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergenic indivisuals. *J Exp Med* 178:2123-2130.
68. 千田雅一, 近藤禎二. 1998, 関東育種基本区のスギ精英樹のクローン集植所における雄花着花性. *林育研報* 15:1~30.
69. Smith A. M., Benjamin D. C., Hozic N., Derewenda U., Smith W.-A., Thomas W. R., Gafvelin G., van Hage-Hamsten M., Chapman M. D. 2001. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107(6):977-984.
70. Sone T., Komiyama N., Shimizu K., Kusakabe T., Morikubo K., Kino K. 1994. Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cadar pollen. *Biochem Biophysic Res Commun* 199(2):619-625.
71. Sone T., Morikubo K., Miyahara M., Komiyama N., Shimizu K., Tsunoo H., Kino K. 1998. T cell epitopes in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens: Choice of major T cell epitopes in Cry j 1 and Cry j 2 toward design of the peptide-based immunotherapeutics for the management of Japanese cedar pollinosis. *J Immunol* 161:448-457.
72. Suzuki M, Ito M, Ito H, Baba S, Takagi I, Yasueda H, Ohta N. 1996. Antigenic analysis of *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* using anti-Cry j 1 monoclonal antibodies. *Acta Otolaryngol (Stockholm) Suppl* 525:85-89.
73. Suzuki M., Komiyama N., Itoh M., Itoh H., Sone T., Kino K., Takagi I., Ohta N. 1996. Purification, characterization and molecular cloning og Cha o 1, a major allergen of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cedar pollen). *Mol Immunol* 33(4/5):451-460.

74. 平英彰, 寺西秀豊, 劔田幸子. (1993). スギの雄性不稔個体について. 日林誌75(4):377-379.
75. 平英彰, 寺西秀豊, 劔田幸子. 1997. 平均気温, 全天日射量および着花指数を用いたスギ空中花粉総飛散数の予測方法に関する比較検討—富山県における事例—. アレルギー46(6):489-495,
76. Taira H., Saito M., Furuta Y. (1999). Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. J For Res 4:271-273.
77. Takahashi Y., Mizoguchi J., Katagiri S., Sakaguchi M., Inouye S., Ishikawa M., Tonosaki A., Iwao F. 1989. Development and distribution of the major pollen allergen (*Cry j I*) in male flower buds of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). Jpn J Allergol 38(12):1354-1358.
78. 高橋裕一, 安部悦子, 三浦直美, 荒木龍平, 安枝 浩, 阪口雅弘. 2002. 42年生スギにおける花粉中のCry j 1量の年較差およびCry j 1定量法の検討. 日本花粉学会会誌48(2):103-107.
79. Takenaka H., Zhang K., Diaz-Sanchez D., Tsien A., Saxon A. (1995). Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: Direct effect on B-cell IgE production. J Allergy Clin Immunol 95(1):103-115.
80. Taniguchi Y., Ono A., Sawatani M., Nanba M., Usui M., Kurimoto M., Matuhasi T. (1995). *Cry j I*, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. Allergy 50:90-93.
81. Taniai M., Ando S., Usui M., Kurimoto M., Sakaguchi M., Inouye S., Matuhasi T. 1988. N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (*Cry j I*). FEBS Lett 239(2):329-332.
82. Taniai M., Kayano T., Takakura R., Yamamoto S., Usui M., Ando S., Kurimoto M., Panzani R., Matuhasi T. 1993. Epitopes on *Cry j I* and *Cry j II* for the human IgE antibodies cross-reactive between *Cupressus sempervirens* and *Cryptomeria japonica* pollen. Mol Immunol 30(2):183-189.
83. Terada N., hamano N., Maesako K. I., Hiruma K., Hohki G., Suzuki K., Ishikawa K., Kono A. (1999). Diesel exhaust particles upregulate histamine receptor mRNA and increase histamine-induced IL-8 and GM-CSF production in nasal cells and endothelial cells. Clin Exp Allergy 29(1):52-59.
84. 戸田忠雄, 竹内寛興, 西村慶二, 藤本吉幸. 1996. 九州におけるスギ精英樹クローンの雄花着花性. 林育研報14:99-113.
85. Tsumura Y., Suyama Y., Yoshimura K., Shirai N., Mukai Y. 1997. Sequence-tagged-sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. Theor Appl Genet 94:764-772.
86. Valenta R., Breiteneder H., Pettenburger K., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D., Scheiner O. 1991. Homology of the major birch-pollen allergen, *Bet v I*, with the major pollen allergens of alder, hazel and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization. J Allergy Clin Immunol 87(3):677-682.
87. Ujino-Ihara T., Yoshimura K., Ugawa Y., Yoshimaru H., Nagasaka K., Tsumura Y. 2000. Expression analysis of ESTs derived from the inner bark of *Cryptomeria japonica*. Plant Mol Biol 43:451-457.
88. 宇佐神篤 (1988). 花粉症—最近の動向と地域特異性について—アレルギーの診療14:541.

89. van Ree, R. 2002. Isoallergens: a clinically relevant phenomenon or just a product of cloning? Clin Exp Allergy 32:975-978.
90. van Ree R. 1997. Analytic aspects of the standardization of allergenic extracts. Allergy 52:795-805.
91. Wang Y., Mukai Y., Fukui M., Futamura N., Nagao A., Shinohara K. 1998. Pollen-specific expression of the gene for an allergen, Cry j 1, in *Cryptomeria japonica*. J For Res 3:131-134.
92. 渡辺雅尚, 田村正宏, 名古屋隆生, 高橋裕一, 片桐進, 岡鐵雄. 1992. スギ花粉抗原 (Cry j I) に対するモノクローナル抗体を用いた Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) による Cry j I の測定.
93. Yamada S, Kajita S, Shiokawa T, Morohoshi N. 2003. Isolation and functional analysis of the promoter sequence of the Cry j 1 gene, which encodes a major allergenic protein in the pollen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). Plant Biotechnol 20(3):241-245.
94. Yasueda H., Yui Y., Shimizu T., Shida T. 1983. Isolation of partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. J. Allergy Clin Immunol 71(1):77-86.
95. 安枝浩, 奥田稔, 吉田彦太郎, 伊藤幸治, 馬場実, 飯倉洋治, 奥平博一, 井上栄, 阪口雅弘, 宮本昭正. 1996. 我が国におけるアレルギー標準化の基本方針とスギアレルギーエキスの標準化—アレルギー 45(4):416-421.
96. 安枝浩. 2000. スギ花粉症とスギ・ヒノキ科花粉のアレルゲン. 日本花粉学会会誌 46(1):29-38.
97. Yasueda H., Saito A., Sakaguchi M., Ide T., Saito S., Taniguchi Y., Akiyama K., Inouye S. 2000. Identification and characterization of a group 2 conifer pollen allergen from *Chamaecyparis obtusa*, a homologue of Cry j 2 from *Cryptomeria japonica*. Clin Exp Allergy 30:546-550.
98. 横山敏孝, 金指達郎. 1993. スギ人工林における雄花生産量と気象条件との関係. 日林論 104:445.
99. Yoshimaru H., Ohba K., Tsurumi K., Tomaru N., Murai M., Mukai Y., Suyama Y., Tsumura Y., Kawahara T., Sakamaki Y. 1998. Detection of quantitative trait loci for juvenile growth, flower bearing and rooting ability based on a linkage map of sugi (*Cryptomeria japonica*). Theor Appl Genet 97:45-50.

参考文献

1. 岩波洋造. 花粉学. 1980. 講談社サイエンティフィク (1980)
2. 佐橋紀男, 高橋裕一, 村山貢司. 1995. スギ花粉のすべて. メディカルジャーナル
3. 信太隆夫, 奥田稔. 1991. 図説スギ花粉症 (第 2 版). 金原出版