

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

学位論文内容の要旨

現在、日本におけるスギ花粉症の罹患率は 1 割を超え、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。

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。したがって「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。精英樹の選抜やそれらの利用は北海道、東北、関東、関西、九州の 5 つの育種基本区を単位として行われているため、北海道を除く各育種基本区の精英樹を対象とし、すでに定量法が確立されている Cry j 1 における個体間変異を調べた。その結果、Cry j 1 含量はいずれの育種基本区のスギ精英樹においても 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、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ことから、アレルゲン含量と雄花着花性双方について検討し、ともに少ないクローンを利用することによって花粉症の軽減における高い効果が期待できると考えられた。

スギの雄花着花量は個体間や年次間で大きく異なり、凶作年にはまったく雄花を着生しない個体もある。そこでアレルゲン含量の調査のために花粉を安定的に採取するには、ジベレリン処理による着花促進が有効である。そこで 8 クローンを対象とし、1 クローン当たり 2~6 個体（ラメット）にジベレリン処理を行い、無処理の個体との間で Cry j 1 含量を比較した結果、ジベレリン処理は Cry j 1 含量に影響を与えないことが明らかになった。また、クローン反復率を推定した結果、0.796 という高い値が得られ、一般的にはクローンごとにきわめて安定していた。しかしながら、8 クローンのうち 1 クローンではラメット間で Cry j 1 含量が大きく異なったことから、ラメット間で Cry j 1 含量が安定しないクローンを除いて「アレルゲンの少ないスギ品種」として選抜する必要があると考えられた。

Cry j 1 含量に対する環境要因の影響を明らかにするために、福島県郡山市、栃木県今市市、茨城県十王町、千葉県木更津市に共通して植栽されているクローンにおける Cry j 1 含量の変異を調べた結果、これらの植栽地間で Cry j 1 含量は変化するものの、Cry j 1 含量におけるクローンの順位はほぼ同じであった。クローン、植栽地、クローン×植栽地の交互作用を要因として分散分析を行った結果、クローン間および植栽地間では有意差が認められたものの、交互作用は有意ではなかった。さらに誤差分散、交互作用分散の分散成分の寄与率がそれぞれ 30.3%、

6.0%であったのに対し、クローン間分散の分散成分の寄与率は54.5%と高かったことから、Cry j 1 含量は強い遺伝的支配下にあることが明らかになった。また、花粉が発達する9月の降水量とCry j 1 含量の間に有意な負の相関が認められた。

本研究では、J1B01、J1B07の2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法でCry j 1を定量しているが、前述の4つの育種基本区のスギ精英樹の中にはCry j 1が検出されない個体が見出された。これらの個体は使用しているモノクローナル抗体との親和性が低いCry j 1のアイソフォーム(同じ機能を持つが分子構造の異なるタンパク質)を生産している可能性があるため、これらの個体の花粉から抽出したCry j 1とそれぞれのモノクローナルとの反応性を調べた。その結果、J1B01との親和性が低いアイソフォームとJ1B07との親和性が低いアイソフォームが検出された。そこでこれらのアイソフォームといずれのモノクローナル抗体とも反応するアイソフォームのcDNA配列を明らかにしてアミノ酸配列を推定し、それらを比較した結果、それぞれ1残基のアミノ酸変異によってモノクローナル抗体との親和性が低下していることが明らかになった。そこでこれらのアミノ酸変異を引き起こしている塩基置換に基づきCAPS(cleaved amplified polymorphic sequences)マーカーを開発し、スギ精英樹におけるそれぞれの頻度を推定した結果、J1B01と親和性の低いアイソフォームの対立遺伝子頻度は0.8%とJ1B07と親和性の低いアイソフォームの対立遺伝子頻度、18.6%と比較して極めて低かった。この結果から、J1B07をポリクローナル抗体に置き換え、J1B01とポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法によってCry j 1を定量するのが一般的に妥当であると考えられた。「アレルゲンの少ないスギ品種」を選抜する際にはさらに、候補となったクローンについてCAPSマーカーによる検査(チェック)を行い、J1B01と親和性の低いアイソフォームを生産している個体についてはJ1B07とポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法による定量も行う必要がある。

以上の結果から、改良した定量法によってCry j 1含量の個体間変異について改めて検討することにした。既にCry j 1含量は強く遺伝的に支配された形質であることが明らかになり、「アレルゲンの少ないスギ品種」が花粉症対策品種として有効であることが示されたことから実用化を視野に入れ、既存のデータから比較的雄花着花性の低いクローンを選抜し、それらにおけるCry j 1含量の変異を調べた。また、Cry j 2についても定量法を確立し、個体間変異を調査した。Cry j 2においてもサンドウィッチ ELISA 法が確立されているものの、抽出方法によって抽出される量が大きく異なることが報告されている。そこで抽出溶媒を再検討した結果、従来使用されていた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ることによって、抽出効率が上昇することが明らかになった。この方法によって推定されたCry j 2含量の平均値は、Cry j 1含量の平均値406 μ gより若干高く431 μ gであり、いずれにおいても12~13倍の個体間変異が見出された。Cry j 1含量における個体間変異は、初めに推定されたほど大きくはなかったが、十分に改良の効果が期待できるものと考えられた。また、Cry j 1含量とCry j 2含量の間には有意な相関が認められたことから、Cry j 1含量とCry j 2含量がともに低いクローンを選抜できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	寺沢	実
副査	教授	高橋	邦秀
副査	教授	矢島	崇
副査	教授	藤川	清三
副査	助教授	小島	康夫

学位論文題名

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

現在日本におけるスギ花粉症の罹患率は1割を超えて大きな社会問題となっており、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、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。したがって「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と考えられる。そこで北海道を除く東北、関東、関西、九州における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 における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スギ精英樹においても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、同一クローンにおいてジベレリン処理を行った個体と無処理の個体の間で Cry j 1 含量を比較した結果、ジベレリン処理による着花促進が 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、ジベレリン処理により安定的に生産した花粉を用いて Cry j 1 含量の計画的な調査を行うことが可能になった。また、クローン反復率を推定した結果、0.796 という高い値が得られたことから Cry j 1 含量はクローンごとに安定していることが示唆された。さらに福島県郡山市、栃木県今上市、茨城県十王町、千葉県木更津市に共通して植栽されているクローンにおける Cry j 1 含量の変異を調査し、クローン、植栽地、クローン×植栽地の交互作用を要因として分散分析を行った結果、クローン間および植栽地間で有意差が認められたものの、交互作用は有意とならなかった。また推定されたクローン間の分散成分の寄与率は54.5%と高く、Cry j 1 含量が強い遺伝的支配下にあることが明らかになった。

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 が検出されない個体が見出され、これらの個体は使用しているモノクローナル抗体との親和性が低い Cry j 1 のアイソフォームを生産している可能性が考えられた。そこでこれらの個体の花粉から抽出した Cry j 1 とそれぞれのモノクローナルとの親和性を調べた結果、J1B01 との親和性が低いアイソフォームと J1B07 との親和性が低いアイソフォームが検出された。これらの cDNA 配列からアミノ酸配列を推定し比較した結果、それぞれ 1 残基のアミノ酸変異によりモノクローナル抗体との親和性が低下していることが明らかになった。そこでこれらのアミノ酸変異に基づき CAPS(cleaved amplified polymorphic sequences)マーカーを開発し、スギ精英樹におけるそれぞれの対立遺伝子頻度を推定した結果、J1B01 と親和性の低いアイソフォームの対立遺伝子頻度は 0.8%と J1B07 と親和性の低いアイソフォームの対立遺伝子頻度、18.6%と比較して極めて低かった。この結果から、正確に Cry j 1 を定量するためには J1B07 をポリクローナル抗体に置き換え、J1B01 とポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法により定量する必要があると考えられたため、この定量法により Cry j 1 含量の個体間変異を改めて検討することにした。さらに Cry j 2 についても定量法を確立し、個体間変異を調査した。Cry j 2 においては抽出方法によって抽出される量が大きく異なることが報告されていたため、使用するバッファーを再検討した結果、従来使用されていた 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ることによって抽出効率が上昇することが明らかになった。推定された花粉 1g あたりの Cry j 1 含量および Cry j 2 含量の平均値は 406 μ g と 431 μ g と同程度であり、いずれにおいても 12~13 倍の個体間変異が見出された。Cry j 1 含量における個体間変異は、初めに推定されたほど大きくはなかったが、十分に改良の効果が期待できるものと考えられる。また、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量の間には有意な相関が認められたことから、Cry j 1 含量と Cry j 2 含量がともに低いクローンを選抜できる可能性を示唆した。

よって、審査員一同は、福田(後藤) 陽子が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。