

(短報)

## 関東地方周辺のスギ精英樹花粉における Cry j 1 含量の変異

後藤 陽子<sup>1)</sup>・近藤 禎二<sup>1)</sup>・安枝 浩<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 林木育種センター 〒319-1301 茨城県多賀郡十王町大字伊師字加幸沢 3809-1<sup>2)</sup> 国立相模原病院 〒228-0815 相模原市桜台 18-1

(1999年6月2日 受付, 1999年8月19日 受理)

The Variation of Cry j 1 Content in Pollen among Japanese Cedar plus Trees Selected in Kanto Breeding Region

Yoko GOTO<sup>1)</sup>, Teiji KONDO<sup>1)</sup> and Hiroshi YASUEDA<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Forest Tree Breeding Center,

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

<sup>2)</sup> Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Sagami Hospital,  
18-1 Sakuradai, Sagami, Kanagawa, 228-0815 Japan

We investigated the variation of Cry j 1 content in pollen among 158 Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) plus trees, including 153 diploid trees and 5 triploid ones, which have been selected in Kanto Breeding Region. The Cry j 1 content was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). It varied from 1.6mg to 132mg per 100g pollen and the mean was 53.5mg. This result suggested the possibility of improving in allergen content. Adding to that, our investigation revealed that the difference between diploid and triploid was not significant in Cry j 1 content.

**Key words :** *Cryptomeria japonica*, Cry j 1, ELISA, intraspecific variation, triploid

スギ花粉症の主要アレルゲンとして、Cry j 1<sup>(1)</sup>、Cry j 2<sup>(2)</sup>の2種類のタンパク質が報告されている。スギ花粉に含まれるCry j 1の量は花粉100g当たり35mg前後であり、Cry j 2に較べて採取地及び採取年による変異が小さいという報告<sup>(3)</sup>がある一方で、個体間では4~40mgと大きな変異があること<sup>(4)</sup>、また二倍体と三倍体とでは三倍体の方がアレルゲン含量が少ないということも報告<sup>(4, 5)</sup>されている。

スギ花粉に含まれるアレルゲンの量に個体間での変異があるとすれば、アレルゲンの少ないスギの育種は、

雄花の少ないスギの育種と共に林業分野での花粉症対策の有効な手段となり得る。そこで本研究では、関東地方周辺で選抜されたスギ精英樹について花粉中のCry j 1含量の変異を調べるとともに、二倍体と三倍体のCry j 1含量の差異について検討した。

## 材料及び実験方法

## 1. 花粉の採取

林木育種センター(茨城県多賀郡十王町)交配園に

植栽されている精英樹に対し1994年、1997年及び1998年7月にジベレリン処理による着花促進を行い、翌1995年、1998年及び1999年3月に計158個体から花粉を採取した。採取した花粉は試験に供するまで、シリカゲルとの共存下、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお、この中には三倍体5個体および平成9年に林野庁が公表した「花粉の少ないスギ品種」15個体のうち12個体が含まれている。

## 2. スギ花粉抽出液の調製

スギ花粉100mgに5mlの0.125M炭酸水素ナトリウム溶液(pH8.4)を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で2時間振とう抽出した後、3000rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行い上澄み液を採取した。

## 3. Cry j 1 含量の定量

スギ花粉抽出液中のCry j 1含量をモノクローナル

抗体を用いたサンドウィッチELISA法により測定した。本ELISA法は先の安枝らの方法<sup>(6)</sup>を一部改変したものである。ELISA用96穴マイクロプレート(ヌンク社製)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 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したモノクローナル抗体(J1B07, 既報<sup>(7)</sup>)の方法により調製)100 $\mu\text{l}$ を加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩吸着させた後、1%のウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝溶液(PBS)を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間ブロッキングした。0.2%のツイーン20を含むリン酸緩衝溶液(PBS-T)で4回洗浄後、0.2%のウシ血清アルブミンを含むPBS-Tで希釈した精製Cry j 1標準溶液およびスギ花粉抽出液を100 $\mu\text{l}$ 加えて $37^{\circ}\text{C}$ で2時間反応させた。PBS-Tで4回洗浄後、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したビオチン化モノクローナル抗体(J1B01, 既

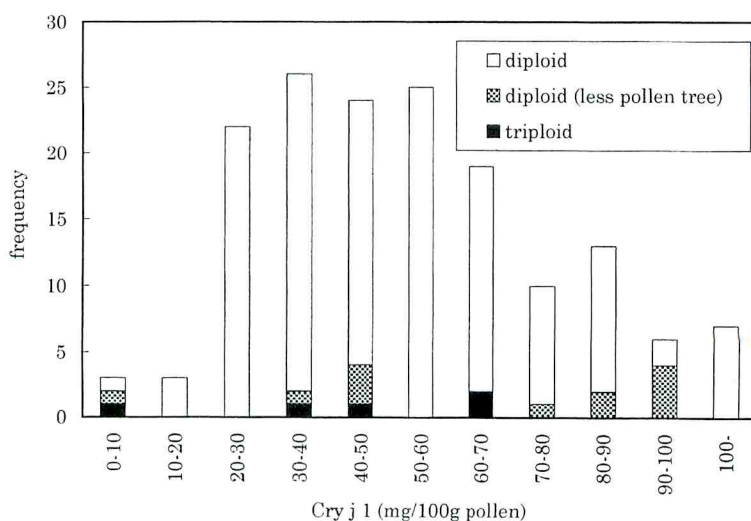


Fig. 1. Content class distribution of Cry j 1 in *Cryptomeria japonica* pollen. *Cryptomeria japonica* pollen was extracted with 0.125M  $\text{NaHCO}_3$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 2 hours. The Cry j 1 contents in the extracts were determined by ELISA.

Table 1. Comparison of Cry j 1 content in diploid and triploid pollen.

ploidy	number of samples	Cry j 1 content (mg / 100g pollen)			
		mean	max.	min.	s.d.
diploid	153	53.9	132.0	1.6	25.3
(less pollen tree)	(12)	(65.2)	(96.5)	(1.6)	(30.9)
triploid	5	40.8	63.2	6.6	23.1
diploid + triploid	158	53.5	132.0	1.6	25.3

All of less pollen trees were diploid. s.d. : standard deviation

報<sup>(7)</sup>の方法により調製)を100 $\mu$ l加えて37°Cで2時間、反応させた。PBS-Tで4回洗浄後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン(ペーリンガー・マンハイム社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。PBS-Tで4回洗浄後、5mM *o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(メルク社製)を加えて37°Cで1時間酵素反応を行った。1.0Mの炭酸ナトリウム溶液100 $\mu$ lを加えて反応停止後、マイクロプレートリーダー(パイオラッド社製, Model 550)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。

## 結果と考察

本研究に供試したスギ精英樹158個体の花粉100gあたりのCry j 1含量の平均値は53.5mgであり、澤谷らによる報告<sup>(3)</sup>と比較して高かったが、Fig. 1に示したように頻度分布を見ると30~40mgの個体が最も多いことから、大きく異なる結果ではないと言える。また個体間でのCry j 1含量の変異は大きく、最大132.0mg、最小1.6mgと個体により80倍以上の差があった。多くの個体のCry j 1含量は20~70mgの範囲にあり、その範囲内ではほぼ均等な分布をしていた。従ってCry j 1含量が少ない個体を利用するとともに、Cry j 1含量の多い個体を除くことで、Cry j 1の減量が可能であることが示唆された。また、花粉症対策上最も望ましいのは、花粉が少なくかつアレルゲンの少ないスギである。「花粉の少ないスギ品種」の12個体のCry j 1含量の平均値は65.2mgと全体の平均値よりも高く、80mg以上の個体が6個体と、Cry j 1含量の多いものが多かった。しかし中にはCry j 1含量が少ない個体もあり、特にそのうちの1個体は全個体の中で最小値を示した。

Cry j 1含量を二倍体と三倍体とで比較してみると、Cry j 1含量の平均値は二倍体が53.9mg、三倍体が40.9mgと三倍体の方が低かったが、両者の平均値の差を比較したところ5%水準で有意ではなかった。これまでに佐々木ら<sup>(4)</sup>、Kondo *et al.*<sup>(5)</sup>が二倍体と三倍体のアレルゲン含量の差異を調べているが、Kondo *et al.*<sup>(5)</sup>は二倍体、三倍体いずれも複数の個体の混合花粉中のアレルゲン含量を調べていて、個体間での差異については検討していない。また佐々木ら<sup>(4)</sup>は二倍体、三倍体ともにアレルゲン含量の個体間差異が大きく、その差異は三倍体よりも二倍体の方

が大きいことを認めるとともに、アレルゲン含量は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。しかしながら本研究では、三倍体のCry j 1含量においても二倍体と同様に大きな個体間変異が示され、全ての三倍体のCry j 1含量が少ないとは言えないと考えられた。また、二倍体には種子の不稔性が高い三倍体と異なり、交雑による改良が可能であるという利点がある。従って交雑によりCry j 1含量が少なくなかつその他の特性においても優れた品種、あるいはCry j 1含量がさらに少ない品種を作成できる可能性がある。

本研究において、Cry j 1含量は個体間での変異が大きいうことが明らかになった。従って雄花の着生量のみならずアレルゲン含量にも着目し、林木育種における花粉症対策を進めてゆくの望ましいと考えられる。西日本の在来品種及び精英樹を中心にアレルゲン含量を定量した佐々木らの報告<sup>(4)</sup>では、Cry j 1含量の平均値は二倍体で18.16mg、三倍体で11.58mgと本研究で得られた値よりも低いことから、雄花着花性に見られるような地域特性<sup>(8)</sup>がアレルゲン含量にも存在する可能性があり、今後は関東地方周辺以外の地域で選抜された精英樹についてもアレルゲン含量を調査したいと考えている。また、もう1つの主要アレルゲンであるCry j 2についても調査し、変異を明らかにする必要がある。

なお、本研究は科学技術庁「スギ花粉症克服に向けた総合研究」の一環として行った。

## 引用文献

- (1) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T., Shida, T.: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86 (1983).
- (2) Sakaguchi, M., Inouye, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Matuhasi, T.: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312 (1990).
- (3) 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, 松橋 直: 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), 738-746 (1993).
- (4) 佐々木義則, 谷口美文, 正山征洋: 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 (1996).
- (5) Kondo, Y., Ipsen, H., Løwenstein H., Karpas, A., Hsieh, L-S.: 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 (1997).
- (6) 安枝 浩, 秋山一男, 前田裕二, 早川哲夫, 金子富志人, 長谷川眞紀, 信太隆夫: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay によるスギ花粉, ヒョウヒダニアレルゲンの定量とアレルゲンエキス標準化への応用. アレルギー 40 (9), 1281-1225 (1991).
- (7) Suzuki, M., Ito, M., Ito, H., Baba, S., Takagi, I., Yasueda, H., Ohta, N.: Antigenic analysis of *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* using anti-Cry j 1 monoclonal antibodies. *Acta Otolaryngol Suppl* 525, 85-89 (1996).
- (8) 橋詰隼人: 日本列島のスギ林における花粉の生産に関する研究 (I) — 各地のスギ林の着花状況, 品種による着花性の差異及び着花に影響する因子について —. 鳥取大演研報 19, 67-113 (1990).
-