

スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)の雄性不稔性と低  
花粉アレルゲン(Cry j 1)性に関する林木育種学的研究  
ースギ花粉症の軽減に向けた育種的な対策ー

2006

斎藤 真己

## 目 次

第1章 序論	1
第1節 研究の背景	1
第2節 既往の研究	3
第3節 本研究の目的	8
第2章 雄性不稔スギの特性調査	10
第1節 はじめに	10
第2節 材料および方法	11
(1) 雄花内部の細胞組織学的観察	11
(2) 走査型電子顕微鏡による花粉の崩壊特性調査	12
(3) 雄花の発育過程における Cry j 1 の発現特性に関する調査	12
(4) エチレン発生量の比較調査	12
第3節 結 果	13
(1) 雄花内部の細胞組織学的観察	13
(2) 電子顕微鏡による花粉の崩壊過程の観察	13
(3) 雄花の発育過程におけるエチレン発生量の比較	13
第4節 考 察	14
図	17
第3章 CAPS マーカーを用いたスギの雄性不稔遺伝子の分布に関する研究	23
第1節 はじめに	23
第2節 材料および方法	23

(1) 調査プロット	23
(2) 自然交配によって得られた雄性不稔苗の出現頻度に関する調査	24
(3) 人工交配による雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した個体の探索	24
(4) CAPS マーカーを用いた雄性不稔苗の親子鑑定に関する調査	24
第3節 結 果	25
(1) 自然交配によって得られた雄性不稔苗の出現頻度	25
(2) 雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した個体	25
(3) CAPS マーカーを用いた雄性不稔苗の親子鑑定	25
第4節 考 察	26
表および図	28
 第4章 雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有したスギ精英樹の探索	 35
第1節 はじめに	35
第2節 材料および方法	35
(1) 雄性不稔スギとの交配	35
(2) 発芽率の調査	35
(3) F <sub>1</sub> 家系の花粉稔性調査	36
第3節 結 果	36
(1) F <sub>1</sub> 家系の発芽率	36
(2) F <sub>1</sub> 家系の花粉稔性	36
第4節 考 察	36
表および図	39
 第5章 採種園産実生個体からの雄性不稔スギの選抜	 42

第1節 はじめに	42
第2節 材料および方法	42
(1)材 料	42
(2)着花の促進および花粉観察	42
(3)デンプン反応による花粉の発育異常調査	43
(4)走査型電子顕微鏡による花粉崩壊特性の調査	43
(5)花粉形成に異常が認められた個体の発芽率の調査	43
(6)花粉形成に異常が認められた個体の発根率の調査	43
(7)花粉形成に異常が認められた個体の染色体数の調査	44
第3節 結 果	44
(1)花粉観察による雄性不稔スギの選抜	44
(2)電子顕微鏡による花粉崩壊過程の観察	45
(3)花粉形成に異常が認められた個体の発芽率	45
(4)花粉形成に異常が認められた個体の発根率	45
(5)花粉形成に異常が認められた個体の染色体数	45
第4節 考 察	46
表および図	48

## 第6章 マイクロプレートリーダーを用いた簡便なスギ花粉アレルゲン-Cry j 1-の

定量法の確立	59
第1節 はじめに	59
第2節 材料および方法	59
(1)材 料	60
(2)タンパク質の抽出	60



(3) サンドイッチ ELISA 法 -----	61
第3節 結 果	
(1) Cry j 1 を定量するサンドイッチ ELISA の条件設定 -----	62
(2) 検量線の作製 -----	62
(3) Cry j 1 の抽出条件 -----	62
(4) モノクローナル抗体の交差反応性 -----	63
第4節 考 察 -----	63
表および図 -----	66
第7章 Cry j 1 の発現に関する基礎的研究 -----	78
第1節 はじめに -----	78
第2節 材料および方法 -----	78
(1) 品種間および同一品種内の花粉1個あたりの重さと Cry j 1 含量の変異 ---	78
(2) クローン間における花粉1個あたりの重さと Cry j 1 量の変異 -----	79
(3) ジベレリン処理による Cry j 1 量への影響 -----	79
(4) 標高の違いによる Cry j 1 量の差異 -----	79
(5) Cry j 1 の構造的変異に関する調査 -----	79
第3節 結 果 -----	80
(1) 品種間および同一品種内の花粉1個あたりの重さと Cry j 1 含量の変異 ---	80
(2) クローン間における花粉1個あたりの重さと Cry j 1 量の変異 -----	80
(3) ジベレリン処理による Cry j 1 量の影響 -----	80
(4) 標高の違いが Cry j 1 量に及ぼす影響 -----	81
(5) Cry j 1 の構造的変異 -----	81
第4節 考 察 -----	81

表および図	85
第8章 全国 25 道県における Cry j 1 量の変異と遺伝率の推移	93
第 1 節 はじめに	93
第 2 節 材料および方法	94
(1) 花粉の収集および保存	94
(2) Cry j 1 量の定量	94
(3) Cry j 1 の狭義の遺伝率の推定	95
(4) 発芽率の調査	95
第3節 結 果	96
(1) Cry j 1 量の変異	96
(2) Cry j 1 量の地域間差	96
(3) Cry j 1 の狭義の遺伝率の推定	97
(4) Cry j 1 量と発芽率の関係	97
第 4 節 考 察	97
表および図	100
第9章 野外に造成したモデルミニチュア採種園における外部花粉混入率の推定	109
第 1 節 はじめに	109
第 2 節 材料および方法	109
(1) 材 料	109
(2) モデルミニチュア採種園の造成	110
(3) 種子の採取	110
(4) 発芽率の調査	110

(5) 雄性不稔苗の選抜	110
第3節 結 果	111
(1) 種子の採種	111
(2) 種子の重量および発芽率	111
(3) 雄性不稔苗の出現頻度	111
第4節 考 察	111
表および図	114
 第10章 ガラス室内スギミニチュア採種園の特徴とその有効性	 117
第1節 はじめに	117
第2節 材料および方法	117
(1) 材 料	117
(2) ガラス室内ミニチュア採種園の造成	117
(3) 着花の誘導および種子の採種	118
(4) 開花試験および着花量調査	118
(5) 野外の空中スギ花粉調査	118
(6) 発芽率の調査	119
(7) 気温の調査	119
第3節 結 果	119
(1) 採種個体の着花および着花量	119
(2) 開花フェノロジー	119
(3) ガラス室外(林業試験場構内)の花粉飛散	120
(4) ガラス室内採種園産種子の発芽率	120
(5) 気温の比較	120

第4節 考 察	121
表および図	125
第11章 総合考察	133
第1節 実用化に向けた雄性不稔スギの遺伝的改良	133
第2節 低花粉アレルゲン(Cry j 1)性実生苗の効率的な生産体制の確立	135
第3節 スギ花粉症の軽減に向けた育種的対策	136
摘 要	138
謝 辞	141
引用文献	142

## 第1章 序 論

### 第1節 研究の背景

スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)は、ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc)と並んで我が国を代表する造林樹種の一つであり、その天然林は青森県鱒ヶ沢町の矢倉山国有林(北緯 40° 42′)から鹿児島県屋久島(北緯 30° 15′)まで断続的に分布している(林 1969)。スギ材は割列性が高く加工が容易であったことに加えて色や香りなども好まれたため、古くから建築材や家具材、機具材など極めて多様な用途があった。例えば、縄文時代(約 6,000 年前)の福井県鳥浜貝塚遺跡からは、丸木船や割板材など多数のスギ材が発見されている(鈴木 2003)。木材需要の増加に伴って、スギの植林が行われるようになり、京都の北山では室町時代からの造林記録が残されている(戸田 1973)。その後、各地でスギの造林が始められるようになり、300~400 年前から吉野、天竜、西川、日田などといった有名造林地が形成された。

スギの造林面積は明治時代以来ほぼ一定であったが、戦後の 1940 年代から急増し、その面積は 1996 年に約 454 万 ha に達した(林野庁 1997)。これは日本の全造林面積の約 45%を占める値であり、現在では北海道の南部から鹿児島県まで全国にスギが造林されている。スギは前述したように木材として多様な用途があったことに加えて、成長が早く環境に対する適応性も高いなど他の樹種にはない優れた特性を保有している。このことから、戦争によって荒廃した国土の緑化や将来の安定した木材供給を目的に、スギを中心とした拡大造林政策を積極的に進めたため現在のような状況に至った。

拡大造林政策によって諸形質に優れたスギ苗の需要が急速に高まったことから、林野庁は 1956 年に林木育種事業指針を定め、その方針に基づき 1957 年から精英樹選抜育種事業を、1970 年から気象害抵抗性育種事業を開始した。この事業は現存の林分の中から表現型において成長や形質が優れ、病虫害や雪害などに対する抵抗性も保有して

いると推測される個体を「精英樹」や「気象害抵抗性候補木」として選抜し、今後の造林の母材料として利用するもので、全国から精英樹が3,659個体、気象害抵抗性候補木が5,202個体選抜された(林木育種センター 2004)。選抜された個体はさし木や接ぎ木によってクローン増殖された後、採種園や採穂園の造成に利用され、これらが整備されたことによって全国規模での苗木の安定供給が可能になった。

スギ人工林の飛躍的な増加に伴って、スギ花粉症という新たな問題が生じてきた。スギ花粉症は、その花粉に含まれる Cry j 1 (Yasueda *et al.* 1983)と Cry j 2 (Sakaguchi *et al.* 1990)の2種類の抗原(アレルゲン)によって引き起こされる I 型アレルギーであり、スギ花粉症患者がその抗原を吸引すると、くしゃみ、鼻水、鼻づまりなどの鼻症状や目の痒み、流涙、充血などの眼症状などが現れる。その患者数は、1963 年に栃木県日光市で斎藤洋三によって初めて発見されて以来、年々増加し、1998 年には国民の 16.2%に達した(中村ら 1999)。このようにスギ花粉症患者が急増した原因として、花粉飛散量の増加、大気汚染物質の増加、食生活の変化(高タンパク質摂取量の増加)、寄生虫病の撲滅などが考えられており(井上 1992)、各々の寄与の程度は明らかにされていないが、その患者数が急激に増えた最大の理由は、やはりアレルゲンであるスギ花粉の飛散量が増加したことによると考えられる(斎藤 1991)、(馬場 2002)。神奈川県相模原市の 1965 年から 1995 年までの空中花粉観測データによるとスギ花粉の飛散数は、1972 年頃から年変動はあるものの増加しており(信太ら 1998)、これは戦後に拡大造林されたスギが安定して花粉を生産する壮齢期に達した時期と一致している(小笠原ら 1998)。拡大造林されたスギ林の林齢構成をみると、2001 年現在で花粉飛散量の少ない 40 年生以下の林分が 60%以上あることや(林野庁 2005)、近年、安価な輸入木材に押されて日本の林業は低迷しており長伐期化が進んでいることなどから、その人工林から生産される花粉の量は当分の間減少する見込みはなく、少なくとも後 20~30 年は増加し続け、それに伴ってスギ花粉症の患者数も増加すると推定されている(平 1990)。

以上のことから、スギ花粉症は今後も大きな社会問題となると予想され、それに対する有効な対策が国民の強い要望となっている。スギ花粉症対策は、①発症の予防・治療、②花粉飛散量の予測・観察、③花粉生産量の抑制の3方向から総合的に推進する必要があるが、アレルゲンであるスギ花粉と接触しないことが最も重要な花粉症対策であることから、スギ林から放出される花粉(アレルゲン)量の軽減が何より求められている。

## 第2節 既往の研究

スギ花粉症は、アレルゲンとなる花粉数と花粉症患者の血液に含まれる IgE 抗体の量との間で正の相関が確認されていることから(Okawa *et al.* 2002)、スギ林における花粉生産量の減少が花粉症の軽減に結びつくと考えられる。スギは長い造林の歴史から育林の施業体系や木材の加工技術がほぼ確立された唯一無二の樹種であるため、簡単に広葉樹などの他樹種に変換できるものではない。このことから、林学サイドではスギ林からの花粉飛散抑制を目的に、(1)枝打ち・間伐などの森林施業による抑制、(2)薬剤散布による抑制、(3)育種による抑制の3方向から研究が進められている。

### (1) 枝打ち・間伐などの森林施業による抑制

スギの雄花は大半が日当たりの良い陽樹冠に着くため、陽樹冠の表面積の削減が花粉生産の抑制につながる。枝打ちは、長幹無節の完満な良材を仕立てることを目的に枝を幹に沿って切る作業が行われるが、花粉生産量を低下させるためには樹冠上部の陽樹冠の枝を切り落とさなければならない。このような強度の枝打ちは、成長を阻害させるばかりでなく多大な費用もかかることから現実的ではないと考えられる(斎藤・平 2004)。また、従来の枝打ちでは樹冠が閉鎖して下枝が被陰され始めてから枯れ枝や生枝の一部を切り落とすものであるため、成長等に影響はないものの雄花生産量の軽減は期待できない(斎藤 1995)。

間伐は、個体密度を調整して成長を促すとともに健全な林分を維持するのに欠かせ

ない作業であるが、この作業を実施すると陽樹冠の表面積を増大させることになり、それに伴って花粉生産量も増加させることになる。これは収量密度効果の法則であり、花粉生産量が最小なのは自然間引きの見られる最多密度の時である(佐藤 1987)。実際に、通常強度の 30%程度の間伐では、雄花生産量を抑制する効果はないことがすでに報告されている(清野ら 2003)。

以上のことから、短期間であれば枝打ちや間伐などの森林施業によって花粉生産量の軽減をはかることは可能であるが、長期間にわたって安定的に花粉生産量を軽減させるのは困難と考えられる。

## (2) 薬剤散布による抑制

薬剤散布による着花抑制については、天然型アブシジン酸の S-ABA やジベレリン生合成阻害作用をもつウニコナゾール P、抗オーキシシン剤のエルノー(マレイン酸ヒドラジットコリン塩)などが知られている(長尾 1993)。橋詰・山本(1990)は、OMH-K(マレイン酸ジドラヒドカリウム)、エルノー(マレイン酸ヒドラジットコリン塩)、NAA( $\alpha$ -ナフタリン酢酸)、2,4-D(2,4ジクロロフェノキシ酢酸ジメチルアミン)、B-ナイン(N-ジメチルアミノスクシンアミド酸)、CCC(塩化2-クロロエチルトリメチルアンモニウム)、エスレル(2-クロロエチルフォスフォニック酸)、石灰硫黄合剤(多硫化カルシウム)、GA(ジベレリン  $A_3$ )の 9 種類の薬剤で着花抑制効果について調査した結果、OMH-K、エルノー、NAA、B-ナインの 4 種に抑制効果があることを明らかにし、中でも、エルノー水溶液はスギの花芽分化時期に散布すると顕著な着花抑制効果があったと報告している(橋詰・山本 1992)。しかし、これらはいずれも成長調節物質であるため他の植物への薬害が危惧される。広域的に散布するためにはヘリコプターなどを利用しなければならない、このような場合、近隣の農作物や公益的機能の大きい下層植物群にも影響を及ぼすことになる。これらのことから、公園や神社など人通りの多い箇所に限り局所的に散布するのであれば、その効果は期待できるものの広い範囲で



適用するのは困難であると考えられる。

### (3) 育種による抑制

遺伝的に花粉(アレルゲン)が無い、もしくはその生産量が少ないスギを利用することによって空中アレルゲン量を抑制する育種的方法は、その効果が現れるまで時間がかかるものの安定性や持続性の面で優れており、将来、その量を確実に減少させる対処法になりうる。育種による抑制では、現在、下記の6つが考えられる。

#### ① 花粉生産量の少ないスギの利用

林木育種センターでは、全国のスギ精英樹の花粉生産量を調査し、それらの中から 112 クローンを「花粉の少ないスギ品種」として公表した(千田・近藤 1998), (大谷ら 2000), (西山ら 2000), (戸田ら 1996)。これらは北海道を除く各育種基本区(東北、関東、関西、九州)から選抜されているため、普及が容易であり、その効果が期待されている。しかし、スギの着花性は樹齢によって異なり、若齢期に着花量が少ない品種でも高齢になると多量に着花するものもあることから(平 2004)、選抜されたクローンについては今後も引き続き調査する必要がある、現時点では恒久的な対策にはなりえないと考えられる。

#### ② 三倍体や異数体の利用

三倍体( $3x$ )や染色体を一本過剰に持つトリソミックス( $2n=2x+1$ )など染色体数の異常によっても低稔性が引き起こされる。これは減数分裂期に3価染色体が見られ不均衡配偶子を形成するためであり、雌雄ともに高不稔性を示すことが多くの植物種で確認されている。スギでは松田・宮島(1977)が、さし木品種のヒノデスギやウラセバルスギが三倍体であることを報告して以来、次々と発見されるようになり、佐々木(1983)は全国の精英樹の中から 25 クローンの 3 倍体を見出した。また、中村ら(1991)は枝変わりによるトリソミックスを発見し、このさし木苗にジベレリンによる強制着花を行ったところ、成熟花粉はほとんど形成されなかったと報告している。三倍体や異数体は前

述したように雄性ばかりでなく雌性も低稔性となるため、種子での増殖や品種改良ができないといった欠点がある。また、3 倍体の中には、奈良県で選抜された宇陀 4 号のように形態的に正常で充実した花粉を形成する個体もあることから(藤下 2002)、注意が必要である。

### ③ 低花粉アレルゲン性を保有したスギの利用

スギ花粉症は花粉そのものによって引き起こされるのではなく、花粉に含まれるアレルゲンが原因となって発症することから、アレルゲン量の軽減は花粉生産量の減少と同じ意味をなし、花粉症対策の一環として効果があると考えられる。メジャーアレルゲンとして同定されている Cry j 1 と Cry j 2 はいずれも分子量が約 40,000 の塩基性タンパク質であるが、抗原性の面からは互いに独立しており交差反応性は認められていない(安枝 2000)。それぞれ cDNA の全塩基配列が決定されており(Sone *et al.* 1994, Namba *et al.* 1994)、Cry j 1 は pectate lyase 活性(Taniguchi *et al.* 1995)、Cry j 2 は polygalacturonase 活性(Ohtsuki *et al.* 1995)を持つことが確認されている。これらはともに細胞壁の主要な成分であるペクチンの分解酵素であることから(Wing *et al.* 1989), (Wu *et al.* 1996)、Cry j 1 と Cry j 2 は花粉の発芽や花粉管の伸長に関与していると推測されている(Namba *et al.* 1994), (Taniguchi *et al.* 1995)。

佐々木ら(1996)は、花粉重量あたりのアレルゲン(Cry j 1 と Cry j 2)含量がクローンによって 10 倍以上も差があることを明らかにした。この結果は、花粉症対策として低花粉アレルゲン性品種の作出の可能性を示唆しており、精英樹の中からこのような性質を保持したクローンを選抜できれば有効な手段となりうる。

### ④ 遺伝的雄性不稔性を保持したスギの利用

遺伝的雄性不稔性は、環境や樹齢に左右されることなく全く花粉を形成しないことから究極の花粉症対策となりうる。Laser and Lersten (1972) の総説によると

140 を越える植物種で発見されており、この性質は雌性が正常であることから効率的に  $F_1$  種子を採取できるため、トウモロコシやタマネギといった主要な農作物すでに実用化されている。スギの雄性不稔個体は、1992 年に富山県で初めて発見された(平ら 1993)。この個体の雌性は正常であり品種改良や種子での増殖が可能であることから、十分実用化は可能であると考えられる。

#### ⑤ 人為的突然変異体の利用

X 線や $\gamma$ 線、中性子の照射もしくは EMS(エチルメタンスルフォネート)など化学物質処理などによって人為的に突然変異を誘発し、雄性不稔や低花粉アレルゲン性個体を作出する手法がすでに確立されている。スギではまだ、報告例はないが、イネでは $\gamma$ 線によって人為的に突然変異体を誘発し、低アレルゲン性の新品種が育成されている(Nishino and Iida 1993)。この手法は目的形質だけでなく他の形質にも変異をきたすことから、他品種と交配するなどして次世代をつくり、再度、優れた個体を選抜するのが一般的となっている。

#### ⑥ 遺伝子組み換え技術による雄性不稔スギの作出

目的形質の遺伝子そのものを直接操作することによって、本来持たない新しい機能や形質を付与する遺伝子組み換え技術は、多くの作物や園芸植物で利用されている。この技術を用いることによって、雄性不稔植物を作出することも可能であり、例えば、Mariani *et al.* (1990) は花粉四分子期に発現するプロモーターと RNA を分解するリボヌクレアーゼ遺伝子を組み合わせてタバコに導入し、雄性不稔のタバコを作出した。この手法はスギでも応用可能と思われるが、針葉樹の場合、ポリフェノール性物質やテルペンなどといった生育阻害物質を多く含んでいることから、効率的な培養系が未だに確立されていないのが現状である。

以上のように、スギ林からの花粉飛散抑制に関して様々な方面から調査研究がなされているが、将来を見据え安定して花粉飛散量の軽減をはかるためには、「育種」による対

策が何より重要であり、花粉症に対する体系的な育種戦略や育種計画が必要とされている。

### 第3節 本研究の目的

スギ花粉症に対する林木育種学的対策としては、既存のスギ林の中から雄性不稔性や低花粉アレルゲン性を保持したスギを選抜した後、それらを育種の母材料として活用し普及へ繋げていくのが最も現実的な方法と考えられる。そこで、本研究では前述した 6 つの育種による花粉飛散抑制対策のうち、雄性不稔性と低花粉アレルゲン性に着目し、木材生産性や森林が持つ公益的機能を損なうことなく空中花粉数やアレルゲン量を減少させる体系的な育種戦略に向けて一連の調査および検討を行った。

本論文は、11 章からなり、第 1 章は序論とし、第 2 章では、富山県で発見された雄性不稔スギの雄花をパラフィン切片法や電子顕微鏡などによって観察し、詳細な発現特性や機構について述べた。

第 3 章では、雄性不稔スギ(母樹)由来の自然交配苗の集団の中から雄性不稔個体が出現する頻度や CAPS マーカーを用いた雄性不稔苗の親子鑑定の結果から、スギの雄性不稔遺伝子の分布について検討した。

第 4 章では、雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した精英樹(*Aa*)を交配試験によって探索し、実用的な雄性不稔スギの育成方法や今後の育種的展望について検討した。

第 5 章では、採種園産実生苗の中から新たな雄性不稔スギを選抜し、それらの特徴や出現頻度について述べた後、雄性不稔スギの効率的な選抜方法について検討した。

第 6 章では、スギ花粉中に含まれるタンパク質の抽出からメジャーアレルゲンの一つである Cry j 1 の定量まで一連の実験系について、できるだけ簡便かつ低コストになるよう検討した。

第 7 章では、Cry j 1 量についてラメート間やクローン間における差異について検討し

た後、Cry j 1 の発現に影響を及ぼす環境要因や Cry j 1 の構造的変異の有無について述べた。

第 8 章では、全国 25 道県のスギ精英樹間における Cry j 1 量の差異や Cry j 1 の狭義遺伝率について述べた後、これらの結果をもとにして精英樹由来の低花粉アレルゲン性(Cry j 1)苗の効率的な生産方法について検討した。また、地域におけるスギ花粉症の有症率と Cry j 1 量との関係についても検討した。

第 9 章では、野外に雄性不稔遺伝子をヘテロ型( $Aa$ )で保有したスギ個体でモデルミニチュア採種園を造成し、雄性不稔苗の出現率( $aa$ )から外部花粉混入率を推定した。

第 10 章では、採種園外からの花粉汚染対策として閉鎖したガラス室内にミニチュア採種園を造成し、開花フェノロジーや種子の発芽率などの結果から、その有効性について検討した。

第 11 章では、第 2 章から第 10 章までの知見をまとめ、スギ花粉症に対する育種的な対策について総合的な考察をした。

## 第2章 スギの雄性不稔性の発現特性

### 第1節 はじめに

遺伝的に全く花粉を生産しない雄性不稔性を保持したスギの利用は、安定性や持続性の面で優れており、将来の空中花粉数を軽減させるうえで極めて有効な手段となる。遺伝的な雄性不稔性はメンデル遺伝をする核遺伝子型雄性不稔と細胞質遺伝をする細胞質雄性不稔、日長や温度といった環境条件によって不稔性を発現する環境反応型雄性不稔の3つに大別される。核遺伝子型雄性不稔は一对の劣勢雄性不稔遺伝子によって支配されている場合が圧倒的に多く(田丸 1994)、雄性不稔性の遺伝子を「*a*」、可稔性の遺伝子を「*A*」とすると、「*aa*」を保有する個体は雄性不稔となり、「*AA*」もしくは「*Aa*」を保有する個体は可稔となる。細胞質雄性不稔はミトコンドリアゲノムに変異がある雄性不稔誘起細胞質と雄性不稔遺伝子、稔性回復遺伝子の関係によって雄性不稔と可稔を制御できるため  $F_1$  種子採取のための最も好ましい育種体系となっており、トウモロコシをはじめとする多くの他殖性作物で実用化されている。環境反応型雄性不稔は、日長や温度によって可稔と不稔を制御できることから、これまで自殖性のため困難とされてきたイネの雑種強勢(ヘテロシス)育種を可能にした。この方法は 2 系法と呼ばれ、中国を中心に新たなイネの育種体系として確立されつつある(丸山・粉川 1991)。

スギの雄性不稔個体は、平ら(1993)によって富山県の社寺林で初めて発見された。このスギは外見上、著しく異なっただころはなく雄花も正常に着生するが、開花期になっても全く花粉を飛散させない特徴を持つ。これに対して、雌花の機能は正常であり、自然交配でも発芽率が 30% 程度の種子が取れ、その後の苗の生育も順調である。Taira *et al.* (1999) は、この自然交配苗から花粉を採取して母樹の雄性不稔個体に戻し交配をすることによって、雄性不稔性が一对の核内劣性遺伝子によって支配されていることを明らかにした。

雄性不稔性は、雄蕊や葯の分化阻害、花粉の発育阻害、葯の未開裂など多様な変異が様々な発育段階で確認されていることから(田丸 1994)、雄性不稔性の発現機構や多面作用を把握しておくことは今後の育種を進めるうえで重要である。

そこで、本章では富山県で発見されたスギの雄性不稔性の発現時期やその機構を明らかにするため、発育段階ごとに雄花を採取し細胞組織学的観察並びに電子顕微鏡による微細な観察を行った。また、スギのメジャーアレルゲンである Cry j 1 は花粉の発育ステージで一核期以降に強く発現することが明らかにされたことから(Takahashi *et al.* 1989)、Cry j 1 をマーカーとして利用し、雄性不稔性の詳細な発現特性について検討した。雄性不稔性の多面発現として、岸谷ら(1993)は、アブラナ科植物の雄性不稔個体では開花前に植物ホルモンの一種であるエチレンが有意に多く発生していることが明らかにしたことから、雄性不稔スギでも同様の調査を行った。

## 第2節 材料および方法

### (1) 雄花内部の細胞組織学的観察

雄花が分化し始める8月下旬から開花期である3月中旬まで5～7日間ごとに雄性不稔個体と正常個体(タテヤマスギ)から雄花を採取し、酢酸アルコール(99%エタノール:氷酢酸=3:1)で固定した。パラフィン切片の作製および染色は、田中・浜(1969)の方法に従い、固定した雄花は、95%エタノール(3時間)→85%エタノール(5時間)→75%エタノール(12時間以上)に浸漬し酢酸を除去した。その後、85%エタノール(1時間)→95%エタノール(1時間)→無水エタノールⅠ(1時間)→無水エタノールⅡ(1時間)浸漬し脱水を行った。パラフィン包埋の前処理としてエタノールとN-ブタノールを混合した溶液(無水エタノール:N-ブタノール=3:1)に1時間、N-ブタノールに2時間浸漬した後、融解したパラフィンの中に雄花を入れ、60℃で約10時間保温した。雄花の入った容器を水道水で急冷させパラフィンが固まったのを確認

した後、ミクロトームを用いて厚さ  $10\mu\text{m}$  の切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオシンの 2 重染色を行い、顕微鏡観察を行った。

#### (2) 走査型電子顕微鏡による花粉の崩壊特性調査

雄性不稔個体の花粉の崩壊特性を把握するため、開花直前(2 月中旬)に雄性不稔個体と正常個体(タテヤマスギ)から雄花一房を採取し、70%エタノールで保存した。充実した雄花をカミソリの刃で半分に切り、試料台にのせて自然乾燥させた後、スパッタリングにより白金粒子を 2 分間蒸着させ、走査型電子顕微鏡による微細な観察を行った。

#### (3) 雄花の発育過程における Cry j 1 の発現特性に関する調査

雄性不稔個体の雄花内における Cry j 1 の発現性について調査するため、花粉母細胞期から成熟期までの各ステージで雄性不稔個体と正常個体(タテヤマスギ)から雄花 0.5g を採取し、液体窒素で凍結させ粉碎した後、Coca 液で抗原エキスを抽出した。その後、蛍光サンドイッチ ELISA 法を用いて Cry j 1 量を測定した。また、雄花内における Cry j 1 の局在部位を把握するため、Tissue Print Immunoblot 法を行った。雄性不稔個体と正常個体から成熟期に雄花を採取し、クリオスタットを用いて切片を作製後、それらを転写用メンブランに押しつけてタンパク質を吸着させた。メンブランは抗 Cry j 1 抗体と反応させた後、抗ウサギ IgG 抗体(A.P.標識)を用いて発色させ、反応する部位について調査した。

#### (4) エチレン発生量の比較調査

雄性不稔個体と正常個体の雄花と針葉から発生するエチレンの量を比較するため、花粉の発育ステージで一核期と成熟期の頃に両者から雄花 0.5g と針葉 1g を採取し、



バイアル瓶に入れて4時間密閉した。その後、容器内の空気を注射針で1ml吸引し、ガスクロマトグラフィー (ShimazuGC-14A)を用いて発生したエチレンの量を測定した。反復は4回行い、保持時間とピークの高さを測定することによって単位時間に発生するエチレンの量(nl / h / g)を定量した。

### 第3節 結 果

#### (1) 雄花内部の細胞組織学的観察

雄性不稔個体と正常個体で雄花内部の顕微鏡観察を行った結果、花粉母細胞期の葯内組織(図 2-1A, G)、減数分裂時の染色体対合(図 2-1B, C)、四分子期までの小孢子成長過程と葯内組織(図 2-1D, H)では両者の間に大きな違いは認められなかったが、一核期になると雄性不稔個体の小孢子が肥大し始め、互いに融合した薄い花粉膜の退化花粉が観察された(図 2-1E)。その後、肥大した花粉粒が増加していき成熟期になる頃には全ての花粉粒が崩壊した(図 2-1F)。

#### (2) 電子顕微鏡による花粉の崩壊過程の観察

開花期における正常個体と雄性不稔個体の雄花内部を電子顕微鏡で観察した結果、正常個体は葯内に球形の花粉が隙間なく詰まっていたのに対して(図 2-2A)、雄性不稔個体ではパラフィン切片の結果と同様に全ての花粉粒が崩壊していた(図 2-2B)。また、花粉粒を電子顕微鏡で観察した結果、正常個体の花粉ではパピラと無数のオービクルスが観察されたのに対して(図 2-2C)、雄性不稔個体の花粉の残骸では両者共に認められなかった(図 2-2D)。

#### (3) 雄花の発育過程における Cry j 1 の発現特性

花粉母細胞期から成熟期までの各ステージの雄花から抽出した抗原エキスの Cry

j 1 量 (FU 値) の推移を図 2-3 に示した。花粉母細胞期から一核期まで正常個体と雄性不稔個体で大差なくほとんど反応しなかったものの、成熟期になると両者ともに反応し、雄性不稔個体でも高い値を示した。また、成熟期の雄花断面における抗 Cry j 1 抗体との反応性を調査したところ、正常個体では葯の内部が全て反応して強く染色されていたのに対して、雄性不稔個体ではタペート組織のみが強く染色された(図 2-4)。

#### (4) エチレン発生量の比較

雄性不稔個体と正常個体の針葉と雄花から発生したエチレンの量を図 2-5 に示した。針葉では両者の間で差がなかったものの、雄花では雄性不稔個体が一核期と成熟期共に有意に多くのエチレンを発生していた。特に、花粉の崩壊が始まる一核期の雄花では正常個体のそれより 10 倍近くのエチレンを発生し、成熟期には大幅に減少していたことから、エチレンは花粉の崩壊が始まる時期の雄花で特異的に発生していることが明らかになった。

### 第4節 考 察

雌雄配偶子形成を考えると、花粉は一般に胚珠よりも発育異常を起こしやすく雌性器官は機能を持っているものかかわらず、花粉だけが不完全な場合がしばしばある。このような不稔性は雑種強勢利用の育種において、はなはだ好都合であるため実用上の利用価値が高く、トウモロコシやテンサイなど多くの他殖性作物で利用されている(松尾 1970)。しかし、スギの場合、これまで述べてきたように花粉症が大きな社会問題になっているため、雑種強勢利用の育種的価値よりも花粉を全く飛散させないという点から花粉症対策にとって極めて有効な遺伝資源であると考えられる。このような背景のもと、本章では富山県で発見されたスギの雄性不稔性の発現特性の解明を試みた。

植物でみられる雄性不稔系統は異常花粉の形態と出現時期により以下のような7群に

類別されている(田丸 1991)。

- ① 花粉母細胞残存型－葯が十分に生育しても葯中に花粉母細胞が見られる。
- ② 四分子・小孢子期異常型－四分子期直後の速やかな花粉膜の肥厚が見られず、小孢子は發育を停止する。
- ③ タペート細胞異常型－タペート細胞に風船状の異常肥大が見られ、開花期には花粉が全く見られない。
- ④ 小孢子中期異常型－タペート組織の顕著な異常は認められない。小孢子は膨らみ、開花期には薄い花粉膜の退化花粉が葯中に見られる。
- ⑤ 空虚花粉型－花粉核をとりまく細胞質が花粉の内膜から遊離するような異常が見られる。
- ⑥ 花粉核残存型－タペート組織は正常であるが、開花期になっても栄養核と生殖核に分離しない。
- ⑦ 充実花粉型－花粉の発生がはやく、早期から充実した花粉粒が多く見られるが受精機能を持たない。

パラフィン切片による結果では、雄性不稔スギのタペート組織に異常は認められず一核期以降に小孢子の肥大が確認された。このことから、この雄性不稔性は小孢子中期異常型であると判断された。

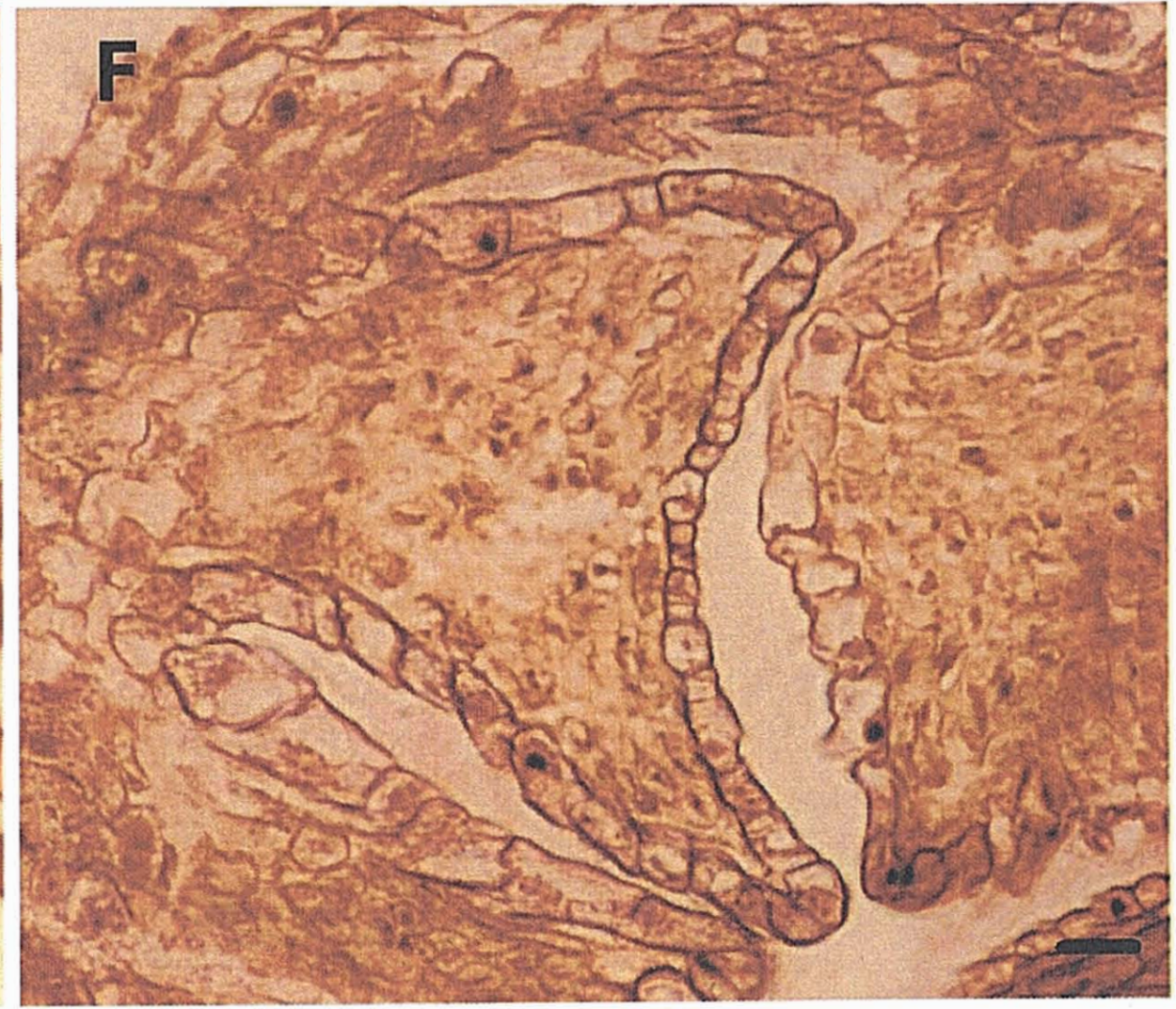
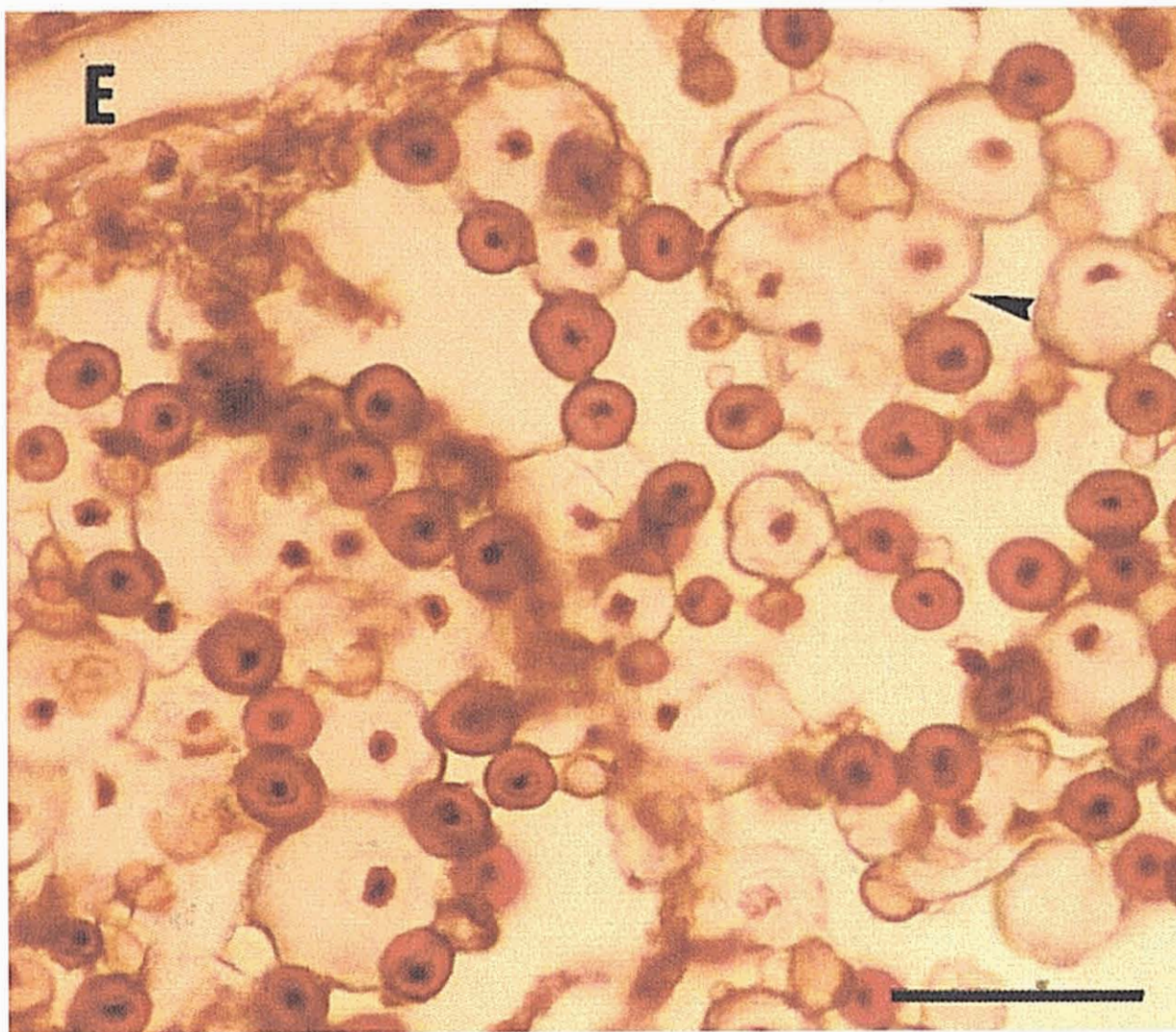
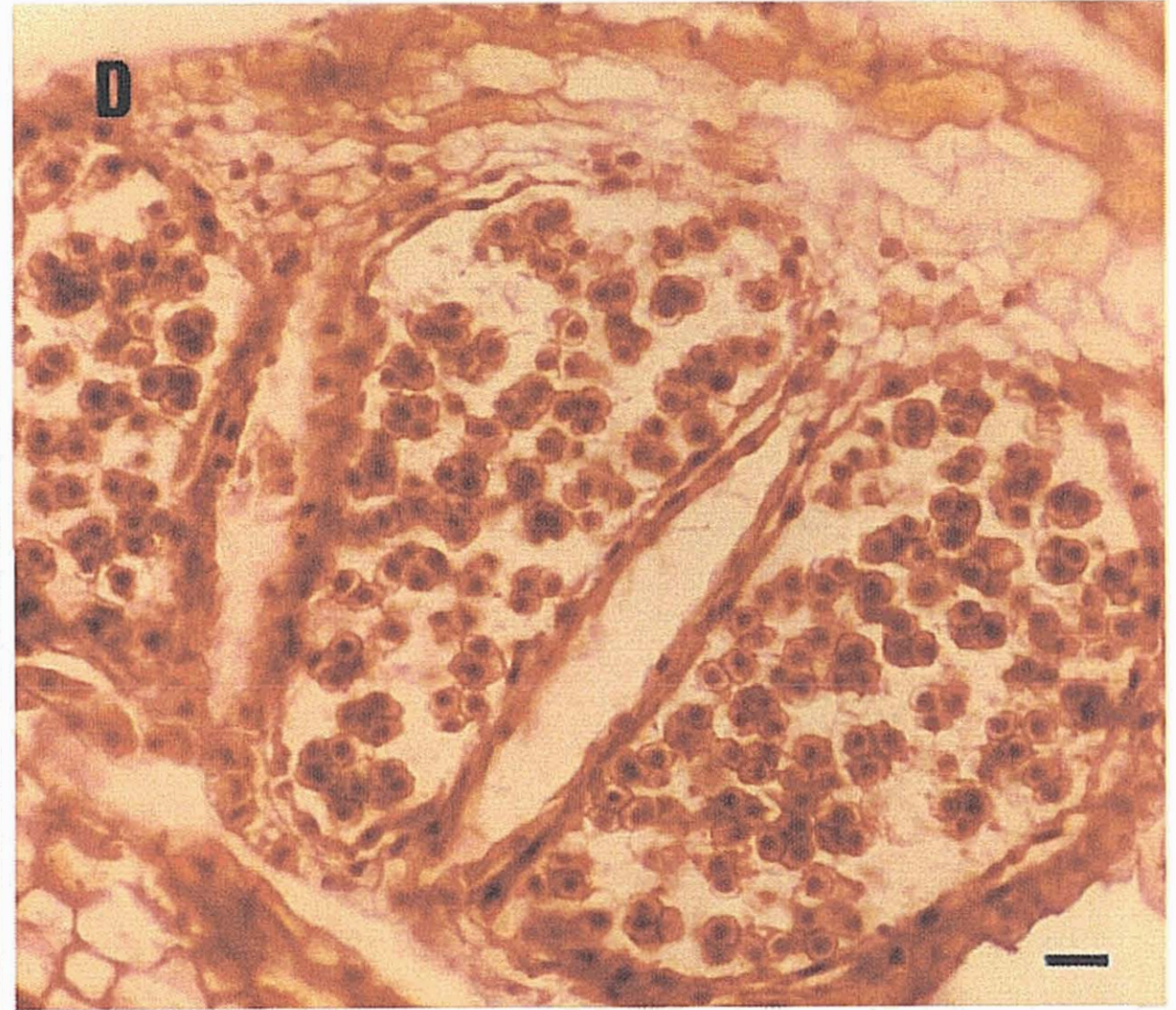
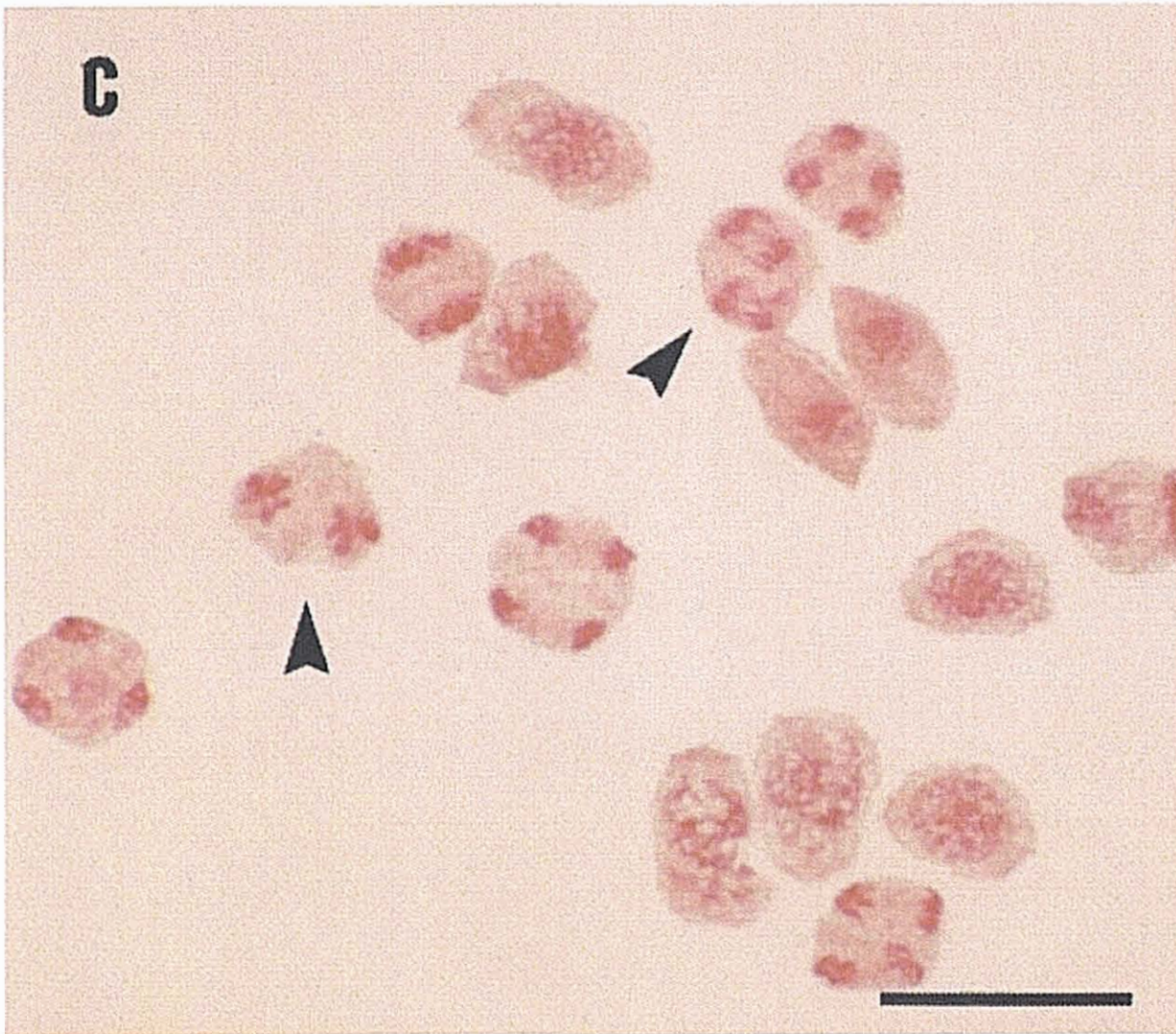
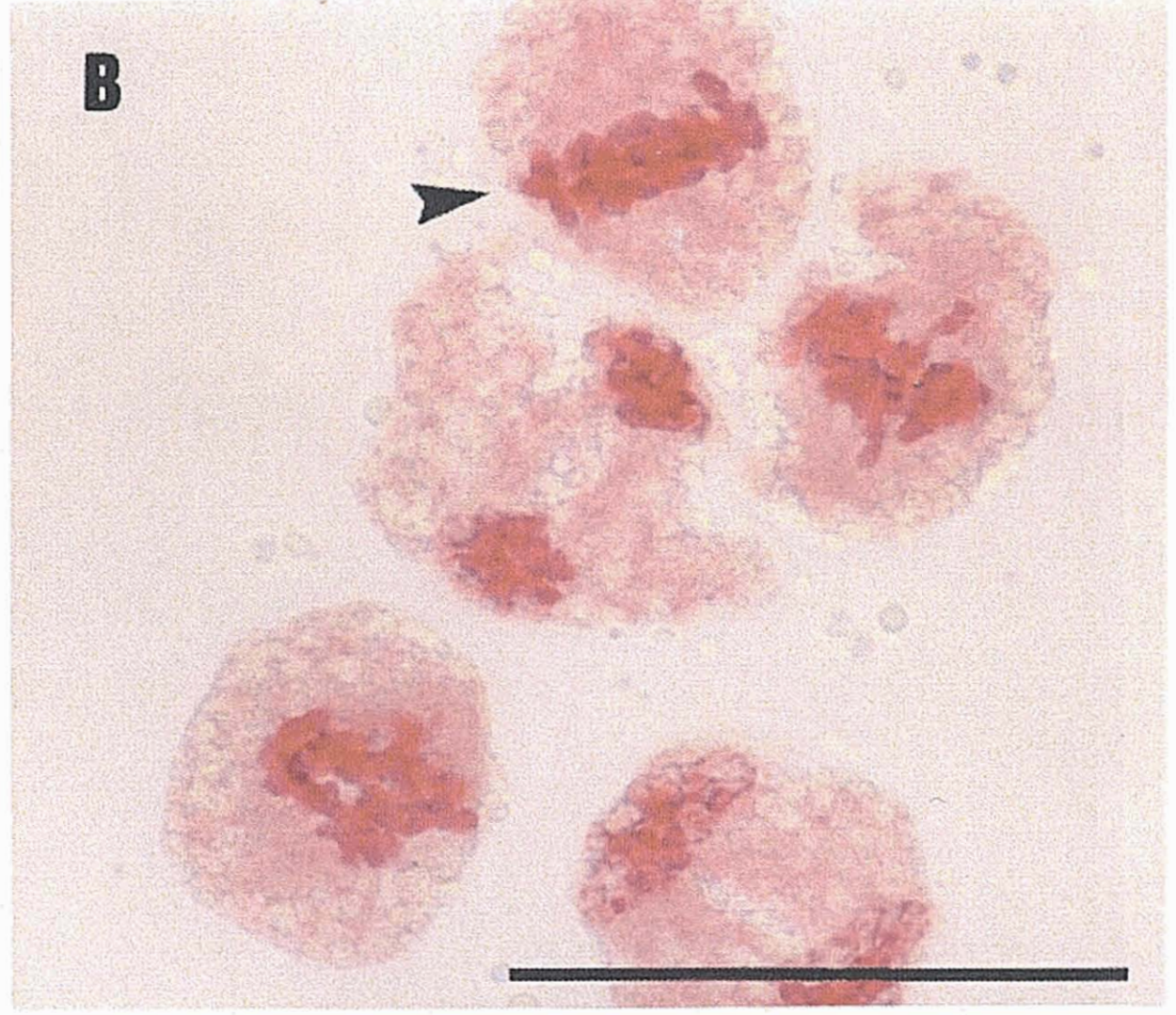
電子顕微鏡による観察結果から、雄性不稔個体ではスギ花粉に特徴的なオービクルスが形成されていないことが明らかになった。オービクルスは花粉外壁の主成分であるスポロポレニンを有する微粒子のことで、四分子期のタペート細胞内に生じたオービクルスやスポロポレニンの前駆体が一核期の頃にタペート細胞の外へ放出されて、花粉外壁となる(岩波 1980)。このことから、オービクルスは花粉外壁を形成するうえで重要な役割を果たしているため、雄性不稔個体の花粉粒が一核期以降に肥大し始めるのは、一核期の頃に起こるタペート組織内でのオービクルスの形成および転送がうまくいかないこと

によって、正常な花粉外壁を形成することができずに引き起こされると推定された。また、Tissue Print Immunoblot 法により成熟期のタペート組織で Cry j 1 が産生されていることが明らかになったが、Cry j 1 は一核期から成熟期かけて雄花内のタペート組織で特異的に発現するタンパク質であることから (Takahashi *et al.* 1989)、この雄性不稔性は Cry j 1 を産生した後 (成熟期の直前) に発現し、電子顕微鏡による観察結果と同様に、Cry j 1 を花粉側へ転送するオービクルスが機能していないためタペート組織内に Cry j 1 が残留していると考えられた。

雄性不稔遺伝子は、花形異常や開花遅延、組成成分の変化など様々な異常を伴って不稔性を引き起こす例が数多く確認されている (田丸 1991)。この現象は雄性不稔遺伝子の多面発現であり、本章で使用した雄性不稔スギの場合も花粉の崩壊が始まる一核期の雄花で特異的にエチレンを発生していることが明らかになった。植物ホルモンの一種であるエチレンは果実の「色づき」や「軟化」といった成熟に関与しており、これはエチレンがセルラーゼやポリガラクトクロナーゼ活性を高めることによって (Horton and Osborne 1967)、細胞膜組織の破壊が誘導されるためと考えられている。雄性不稔スギでも同様のことが起こって、花粉の細胞壁や細胞膜が分解された後、花粉粒が崩壊するメカニズムも考えられる。また、エチレンは様々なストレスによっても発生することから、花粉形成が正常に行われないことがストレスとなって大量のエチレンを発生している可能性も考えられる。この場合は、雄性不稔性の副産物としてエチレンが発生していることになる。いずれにせよ、本材料の雄性不稔性の多面発現の一つとしてエチレンが有意に多く発生していると判断された。

本章の結果は、スギの雄性不稔性の詳細な発現特性や多面発現を明らかにしたことから、今後の雄性不稔性に関する育種学的研究に活用できると考えられた。







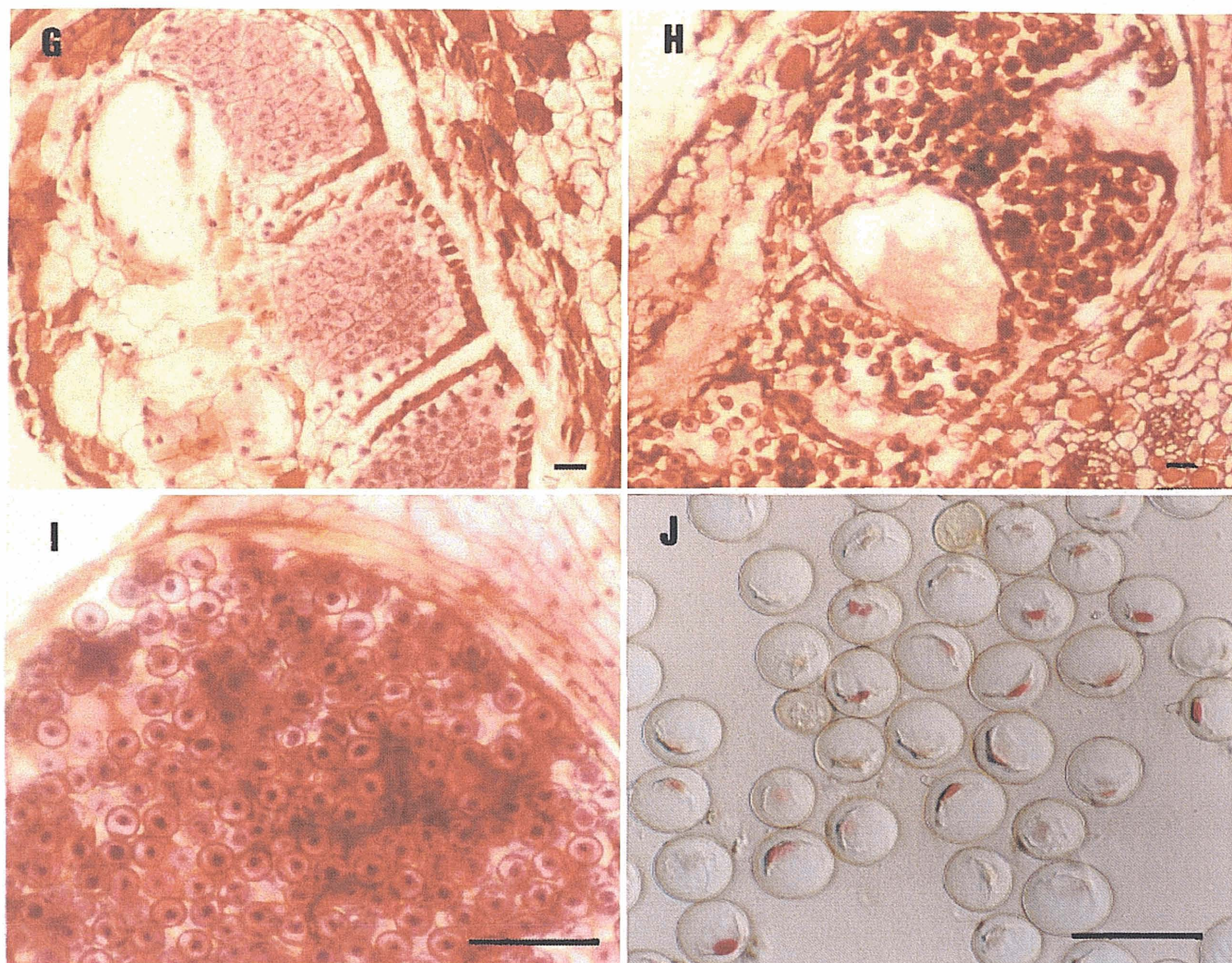


図 2-1 雄性不稔スギとタテヤマスギの花粉の発育過程

(A: 雄性不稔スギの花粉母細胞期 B: 雄性不稔スギの第一減数分裂期 C: 雄性不稔スギの第二減数分裂期 D: 雄性不稔スギの四分子期 E: 雄性不稔スギの一核期 F: 雄性不稔スギの成熟期 G: タテヤマスギの花粉母細胞期 H: タテヤマスギの四分子期 I: タテヤマスギの一核期 J: タテヤマスギの成熟花粉 Bar = 50  $\mu$ m)



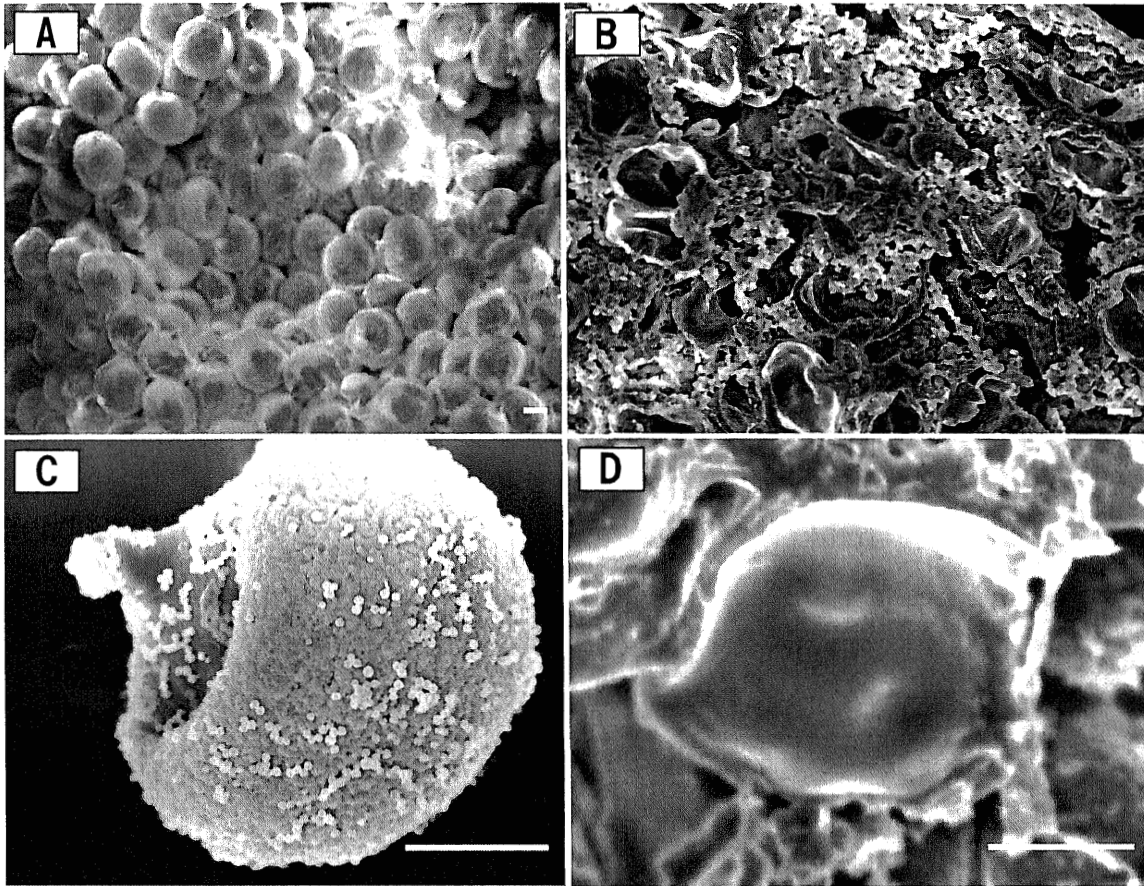


図 2-2 タテヤマスギと雄性不稔スギの開花期における雄花内部と崩壊した花粉の形態

(A,C:タテヤマスギ B,D:雄性不稔スギ Bar = 10  $\mu$ m)

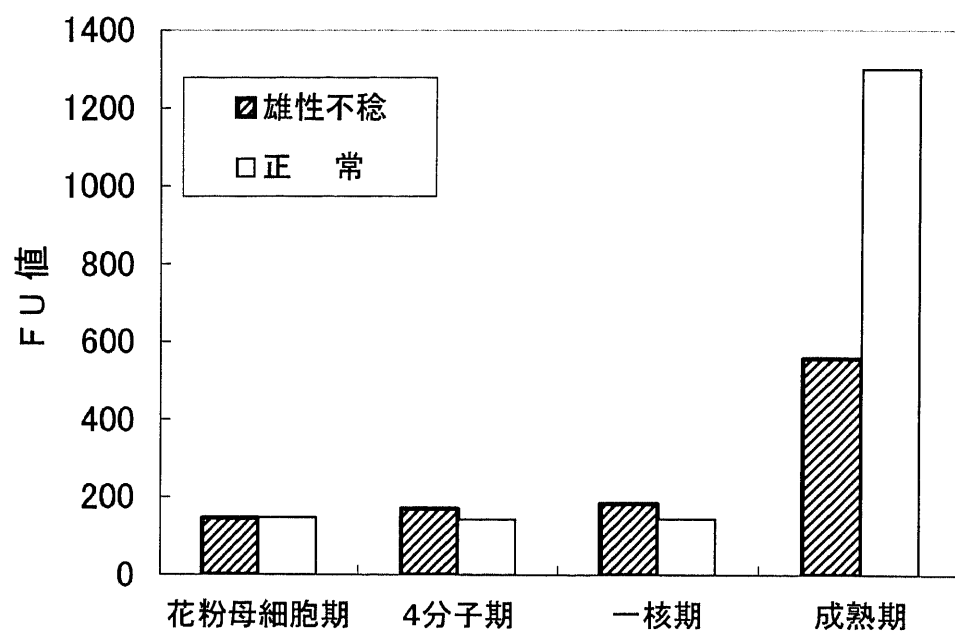


図 2-3 雄性不稔個体と正常個体の雄花から抽出した抗原エキスと  
抗 Cry j 1 個体との反応



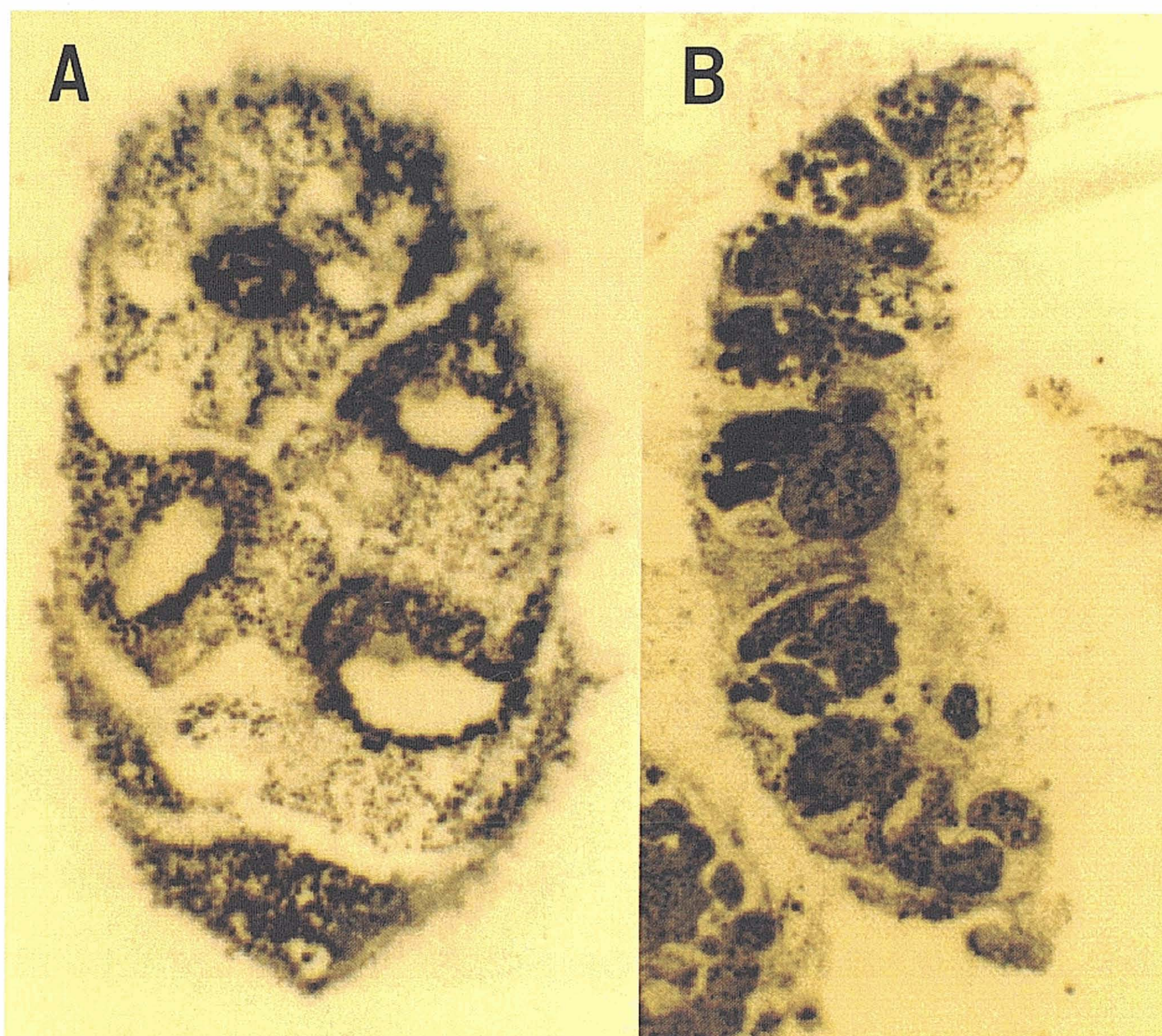


図 2-4 抗 Cry j 1 抗体を用いた成熟期雄花内部の免疫組織染色

(A: 雄性不稔スギ B: タテヤマスギ)



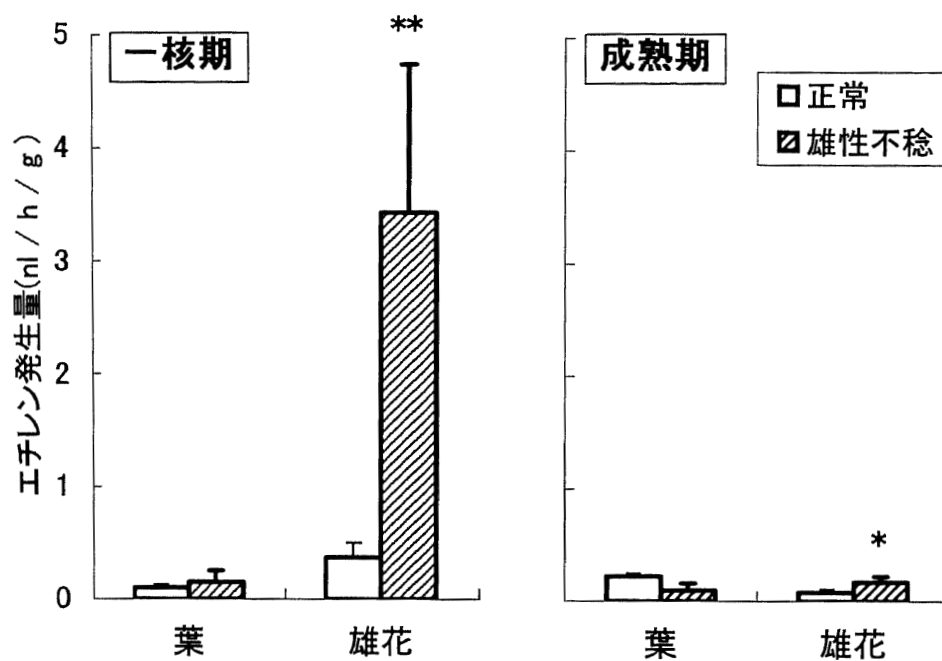


図 2-5 正常個体と雄性不稔個体の針葉と雄花から発生したエチレン量の比較

(\*\* と \* は、1%と5%で有意差があったことを示す。)

### 第3章 CAPS マーカーを用いたスギの雄性不稔遺伝子の分布に関する研究

#### 第1節 はじめに

遺伝的雄性不稔の変異体は農作物を中心に古くから自然突然変異として発見されており(石川 1929)、その頻度は 0.01~0.001%と推定されている(田丸 1991)。例えば、ライマビーンやトマトでは、約 2 万個体の集団中に 1 個体の割合で単一劣性遺伝子支配の雄性不稔変異体が見出されている(志賀 2003)。富山県で発見された雄性不稔スギ(雄性不稔母樹とする)(平ら 1993)も同様に単一劣性遺伝子支配であるが(平ら 1999)、スギのような針葉樹ではその出現頻度は明らかにされていない。同じ雄性不稔遺伝子を保有するスギがある一定の頻度で存在すると仮定すると、雄性不稔母樹由来の自然交配種子から雄性不稔性を保有した個体の出現が期待される。

そこで、本章では雄性不稔母樹から自然交配によってできた種子を育苗し、それらの中から雄性不稔苗がどれくらい頻度で出現するのかについて調査するとともに、雄性不稔母樹の近隣に生育している個体と交配させることによって雄性不稔苗の花粉親を探索した。また、最近、スギで開発された共優性の CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) マーカー(Iwata *et al.* 2001)を用いて、その親子関係についても調査を行った。

#### 第2節 材料および方法

##### (1) 調査プロット

雄性不稔スギが発見された社寺林に 50m×60m の調査プロットを作った(図 3-1)。このプロット内には、雄性不稔母樹、タテヤマスギ(地域性実生品種)24 個体、ボカスギ(さし木品種)3 個体が生育しており、1994 年の時点で全ての個体が 15 年生以上であった。また、それらのほとんどは毎年、着花していた。

## (2) 自然交配によって得られた雄性不稔苗の出現頻度に関する調査

雄性不稔苗の出現頻度について調査するため、1994年に雄性不稔母樹から自然交配種子を採取し、それらの中から765個体を2年間育苗した後、1996年7月上旬に100ppmのジベレリンを噴霧して雄花を人為的に着花させた(図3-2A)。同年12月に各個体から雄花一房を採取して70%で保存した後(図3-2B)、顕微鏡を用いて花粉の有無について調査した(図3-2C, D)。

## (3) 人工交配による雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した個体の探索

雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した個体を探索するため、雄性不稔スギの近隣に生育しているタテヤマスギ11個体(510, 513, 515, 520, 523, 524, 525, 530, 532, 534, 822)とボカスギから花粉を採取し、1995年3月に雄性不稔母樹と交配を行った。交配によって得られたF<sub>1</sub>家系の苗を2年間育苗した後、7月上旬にジベレリン処理をして雄花を着花させ、花粉の有無について調査した(図3-2)。

## (4) CAPS マーカーを用いた雄性不稔苗の親子鑑定に関する調査

雄性不稔母樹とプロット内にある全個体、自然交配によって得られた雄性不稔苗の針葉から改変CTAB法(Tsumura *et al.* 1995)によりDNAを抽出し、CAPSマーカーを用いた親子鑑定を行った。PCRの条件や使用する制限酵素などは、Iwata *et al.*(2001)の方法に従い、8種類のプライマーを用いて調査した(表3-1)。PCR反応液(20  $\mu$ l)の組成は、0.2  $\mu$ Mプライマー、0.2mM各dNTP、20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4U *Taq* polymerase, 4ng 鋳型DNAとし、サーマルサイクラーはPTC-100 programmable thermal controller(MJ Research 社)を使用した。PCR増幅は、94℃で5分間変性処理を行った後、変性94℃-1分、アニーリング50

～65℃－1 分、伸長 72℃－1.5 分で 35～45 サイクルの反応を行い、最後に 72℃－5 分の伸長反応を行うようプログラムをセットした。PCR 後、得られた増幅産物は、表 3-1 に示した各制限酵素で切断し、2.0%アガロースゲルで電気泳動した。その後、エチジウムブロマイドで染色を行い、UVトランスイルミネーター上で多型を検出した。

### 第3節 結 果

#### (1) 自然交配によって得られた雄性不稔苗の出現頻度

765 個体の苗木から雄花を採取して花粉の有無について調査した結果、それらのうち 29 個体(約 3.8%)が雄性不稔性を保持していた。

#### (2) 雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した個体

雄性不稔母樹との交配による花粉稔性の結果を表 3-2 に示した。雄性不稔母樹とタテヤマスギ 9 個体(510, 513, 515, 520, 523, 524, 530, 532, 534)及びボカスギとの交配によって得られた F<sub>1</sub> 集団はすべて可稔であったが、タテヤマスギ 525 と 822 との交配によって得られた F<sub>1</sub> 集団は、雄性不稔個体と可稔個体に分離した。タテヤマスギ 822 の F<sub>1</sub> 家系は  $\chi^2$  検定で 1:1 の分離比に適合しなかったが、タテヤマスギ 525 と 822 は雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有している可能性が極めて高いと判断された。

#### (3) CAPS マーカーを用いた雄性不稔苗の親子鑑定

使用した8種類の CAPS マーカー全てにおいて明瞭な共優性のバンドパターンが検出できた(図 3-3)。これらのマーカーを用いて雄性不稔母樹、雄性不稔苗 29 個体、プロット内 25 個体の遺伝子型を表 3-3 に示した。また、この遺伝子型と交配試験の結果から推定した雄性不稔苗 29 個体の花粉親を表 3-4 にまとめた。雄性不稔苗 29 個体中 17 個体の花粉親は、タテヤマスギ 525 と 822 ではなかった。また、それらのうちの

8 個体の花粉親はプロット内に存在しないことが明らかになった。

#### 第4節 考 察

一般的に、雄性不稔になる突然変異は数万の1程度の割合で自然発生するといわれているが(田丸 1991)、今回の調査結果では自然交配による雄性不稔苗の出現頻度は約 3.8%と非常に高かった。このことから、雄性不稔スギ(母樹)の近くに雄性不稔遺伝子をヘテロ型( $Aa$ )で保有したスギが存在すると予想されたため、雄性不稔母樹を中心に  $50 \times 60\text{m}$  のプロットを作り、プロット内の個体と交配試験を行った結果、2 個体(タテヤマスギ 525 と 822)が雄性不稔遺伝子をヘテロ( $Aa$ )型で保有している可能性が極めて高いことが明らかになった。タテヤマスギ 822 の  $F_1$  家系の分離比が歪んだ原因は不明であるが、戻し交配を行っても雄性不稔個体のみ特異的淘汰されることはなかったため(Taira *et al.* 1999)、少なくとも雄性不稔性が発現したことによって引き起こされた致死現象ではないと考えられる。

タテヤマスギ 525 と 822 は雄性不稔母樹と 20m 程度しか離れていないため、自然交配による雄性不稔苗 29 個体の花粉親の大半がこれら 2 個体のうちのいずれかでないと予想された。このことを明らかにするため、CAPS マーカーを用いて雄性不稔母樹、雄性不稔苗 29 個体、プロット内 25 個体の遺伝子型を決定し親子鑑定を行った。CAPS マーカーはゲノム上の特定部分をPCRによって増殖した後、制限酵素処理によって多型を検出する分析方法であるため、マーカーとして安定しており、遺伝子型のホモとヘテロが識別できる共優性の優れた DNA マーカーである(Iwata *et al.* 2001)。CAPS 分析の結果から、雄性不稔苗の半数以上の花粉親はタテヤマスギ 525 と 822 ではなく、さらにそれらのうちの 8 個体の花粉親はプロット外に存在することが明らかになった。スギ花粉の飛散距離は少なくとも数十kmは飛散すると予測されていることから(長野ら 1992)、雄性不稔遺伝子を保有している個体は他にも広く分布しており、スギの場

合、一般の農作物で言われている頻度よりも高い値でこの遺伝子が存在していると推測された。この理由として、雄性不稔スギは第2章で記したとおり、外見上、正常なスギと変わるところはなく、発芽率や初期成長も劣ることはないため、この遺伝子が人為的にも自然界においても淘汰されないことが考えられる。

表3-4より、タテヤマスギ514や529もその遺伝子をヘテロ型で保有している可能性が高いと考えられるが、これらの個体はすでに伐採されたため、交配による確認はできなかった。いずれにせよ、プロット内に雄性不稔遺伝子が非常に高い頻度で存在することから、ここに植栽されたタテヤマスギは同一母樹から採種した兄弟家系である可能性も考えられる。

本章の結果は、今後の雄性不稔スギの育種を進めるうえで重要な意味を持つ。仮に、雄性不稔遺伝子の頻度が極めて低く、雄性不稔母樹以外に発見できなかったとすると、実用化に向けて雄性不稔スギ(母樹)の遺伝的改良を行うには、戻し交配家系か $F_2$ 家系を利用しなければならないが、この場合は近親交配による遺伝的な劣化(近交弱勢)の問題が出てくる。しかし、本章の結果から雄性不稔遺伝子は比較的高い頻度で存在することが明らかになったため、血縁関係のない雄性不稔遺伝子を保有した個体同士で交配を行えば、近交弱勢のない雄性不稔個体の作出が可能となる。また、精英樹や気象害抵抗性候補木は全国に約9,000クローンあることから、これらの中に雄性不稔遺伝子を保有したクローンが存在する可能性は高く、このようなクローンを育種の母材料に利用できれば近交弱勢のない遺伝的に優良な雄性不稔スギの作出が可能になると考えられる。

表3-1 使用したCAPSマーカーおよび制限酵素の種類

CAPSマーカー	Forward primer	Reverse primer	アニーリング 温度 (°C)	サイクル数	制限酵素
CC0337	ATTTACCCGTTTGCAAAGATT	CAGGATCGCATAGGGTTCTA	50	40	<i>Hae</i> III
CC0342	GGCAGCAGAGCAGAAGGTT	GACAAGCCAACAGGACTCCA	65	40	<i>Hha</i> I
CC0346	GCAGATCGATTGTGGG	AGCAGCAATTAGTAACCAGA	60	40	<i>Dra</i> I
CC0446	GTAATCGCCGCCAACTATCAT	TGAGTGGGCGTGTTCCTC	55	36	<i>Dra</i> I
CC0460	AATCTCACCACGGGCTTCTC	TACATTGAGGTAGCGGGTTCC	55	36	<i>Hae</i> III
CC0482	TGGAACGTCACTCTGCGAAAC	TTGTAATTAGCCGCCATCCT	65	40	<i>Dra</i> I
CC0493	TTATAACATATTGGCAAAGCA	CCCGTCGAACAGAGAAG	55	40	<i>Bgl</i> II
CC0507	GCAGATCGATTGGAAGGAA	GCAGTAATTACATCCGCTGAA	55	40	<i>Hae</i> III



表3-2 雄性不稔スギとの交配によって得られたF<sub>1</sub>集団  
の花粉稔性と $\chi^2$ 検定

花粉親	調査した 苗 数	観測結果	
		正 常	不 稔
510	18	18	0
513	50	50	0
515	50	50	0
520	50	50	0
523	68	68	0
524	70	70	0
525	50	31	19 *
530	78	78	0
532	50	50	0
534	50	50	0
822	82	53	29 **
ボカ	60	60	0

\*  $\chi^2 = 2.28$   $P = 0.09$

\*\*  $\chi^2 = 7.02$   $P = 0.008$

表3-3 CAPSマーカーによる雄性不稔苗29個体とタテヤマスギ24個体、ボカスギ、雄性不稔母樹の遺伝子型

	CC0342	CC0460	CC0482	CC0493	CC0446	CC0507	CC0337	CC0346
128(F1)	BB	AB	BC	AC	AC	BB	AB	AB
164(F1)	BB	AA	BC	AA	AC	AB	AB	AA
167(F1)	BB	AB	CC	AC	AC	BB	BB	AB
179(F1)	BB	AA	CC	AA	AC	BB	BB	AB
184(F1)	BB	AB	BB	AC	AC	BB	BB	AA
185(F1)	BB	AA	BB	AC	AC	AB	AB	AB
270(F1)	BB	BB	CC	AA	BC	BB	AB	AB
269(F1)	BB	AA	BB	AC	AC	AB	BB	AA
258(F1)	BB	AA	BB	AC	BC	BB	AB	AA
237(F1)	BB	AB	BC	AC	AC	AB	BB	AA
223(F1)	BB	AB	BC	AA	AC	BB	BB	AA
219(F1)	BB	AA	CC	AC	BC	AB	BB	AA
271(F1)	BB	AA	BB	AA	AC	BB	BB	AB
272(F1)	AB	AB	BB	AC	BC	BB	AB	AA
273(F1)	BB	AA	BB	AC	AC	AB	BB	AB
275(F1)	BB	AA	CC	AC	AC	AB	AB	AA
277(F1)	BB	AA	BC	AA	BC	BB	AB	AA
278(F1)	AB	AB	CC	AB	BC	AB	AB	AA
305(F1)	BB	AA	BB	AC	AC	BB	BB	AA
297(F1)	BB	AA	CC	AC	BC	AB	AB	AA
291(F1)	BB	AB	BB	AC	AC	AB	AB	AA
284(F1)	BB	AB	BC	AC	BC	AB	BB	AA
282(F1)	BB	AB	BC	AC	AC	BB	BB	AA
279(F1)	BB	AA	BB	AA	BC	BB	AB	AA
306(F1)	BB	AB	BB	AC	AC	BB	BB	AA
307(F1)	BB	AB	CC	AC	AC	BB	AB	AA
308(F1)	BB	AB	BB	AA	AC	AB	BB	AA
311(F1)	BB	AA	BB	AC	AC	BB	BB	AA
313(F1)	BB	AA	BC	AB	AC	BB	AB	AA
510	BB	AA	CC	AC	AC	BB	AB	AA
513	BB	AA	BC	AC	BC	BB	AB	AA
514	BB	AB	BC	CC	AC	BB	BB	AB
515	AB	AB	CC	AC	AC	BB	AB	AB
517	BB	BB	CC	AC	AC	AA	AA	AB
518	BB	AA	CC	AC	AC	BB	AA	AC
519	BB	BB	AC	AB	BC	BB	AB	AA
520	BB	AB	AC	CC	BC	BB	AB	AA
521	AB	AA	CC	AA	AC	AA	BB	AA
522	BB	AB	AA	AC	BC	BB	BB	AB
523	BB	AB	CC	AC	BC	BB	AB	AA
524	AB	AA	BB	AC	BC	AA	BB	AC
525	BB	AA	BB	AB	AC	AA	BB	AA
526	BB	BB	CC	AC	AC	AA	AA	AB
527	BB	AA	AC	AB	AC	BB	BB	AA
528	BB	AB	CC	CC	AC	AA	BB	AA
529	AB	AB	AC	AC	BC	AB	AB	AA
530	BB	AB	CC	AB	AC	BB	BB	AC
532	BB	AB	BC	AC	BC	BB	BB	AB
534	AB	AA	AC	AC	BC	BB	AB	AC
823	BB	AA	BC	AB	AC	BB	AB	AA
826	AB	AA	CC	AC	AC	AA	BB	AA
828	BB	AA	AA	AC	BC	AA	BB	AA
822	BB	AB	CC	AC	AC	AB	BB	AB
boka	AB	AB	BC	AC	AC	AA	AA	AA
MSmother	BB	AB	BC	AC	AC	BB	AB	AA

表3-4 交配試験とCAPS分析の結果から推定した雄性不稔苗29個体の花粉親

128(F <sub>1</sub> )	514	822					
164(F <sub>1</sub> )	521	525	529	822	826		
167(F <sub>1</sub> )	514	822					
179(F <sub>1</sub> )	822						
184(F <sub>1</sub> )	514	823					
185(F <sub>1</sub> )	不	明					
270(F <sub>1</sub> )	不	明					
269(F <sub>1</sub> )	525						
258(F <sub>1</sub> )	不	明					
237(F <sub>1</sub> )	517	521	525	526	528	529	822
223(F <sub>1</sub> )	518	519	527	529	822	823	
219(F <sub>1</sub> )	529						
271(F <sub>1</sub> )	不	明					
272(F <sub>1</sub> )	不	明					
273(F <sub>1</sub> )	不	明					
275(F <sub>1</sub> )	521	528	529	822	826		
277(F <sub>1</sub> )	529						
278(F <sub>1</sub> )	不	明					
305(F <sub>1</sub> )	514	823					
297(F <sub>1</sub> )	529						
291(F <sub>1</sub> )	525						
284(F <sub>1</sub> )	529						
282(F <sub>1</sub> )	514	518	519	527	529	822	823
279(F <sub>1</sub> )	不	明					
306(F <sub>1</sub> )	514	823					
307(F <sub>1</sub> )	514	518	519	527	529	822	823
308(F <sub>1</sub> )	525						
311(F <sub>1</sub> )	514	823					
313(F <sub>1</sub> )	527	823					

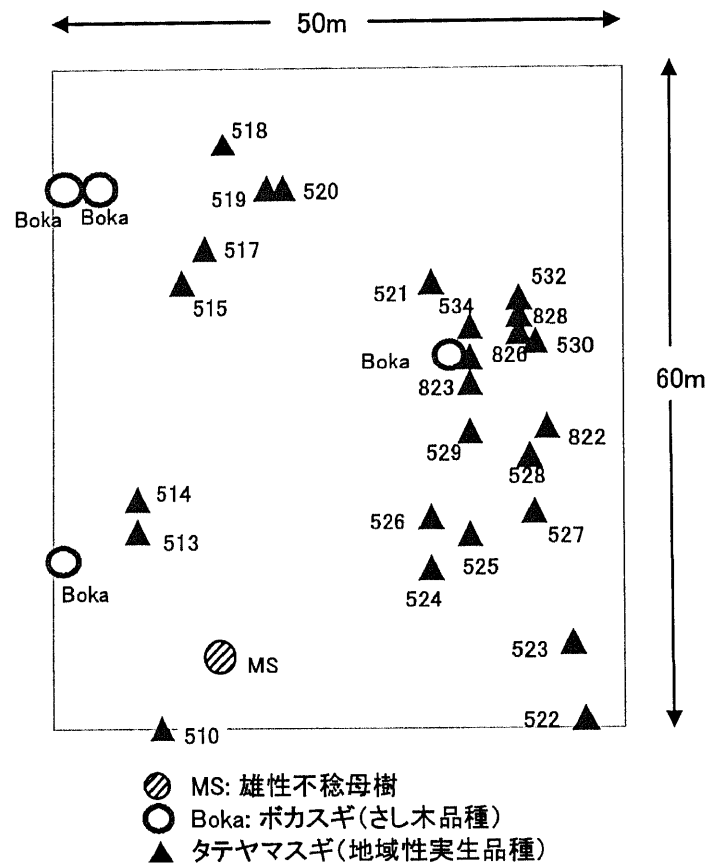


図 3-1 本章で使用了調査プロット



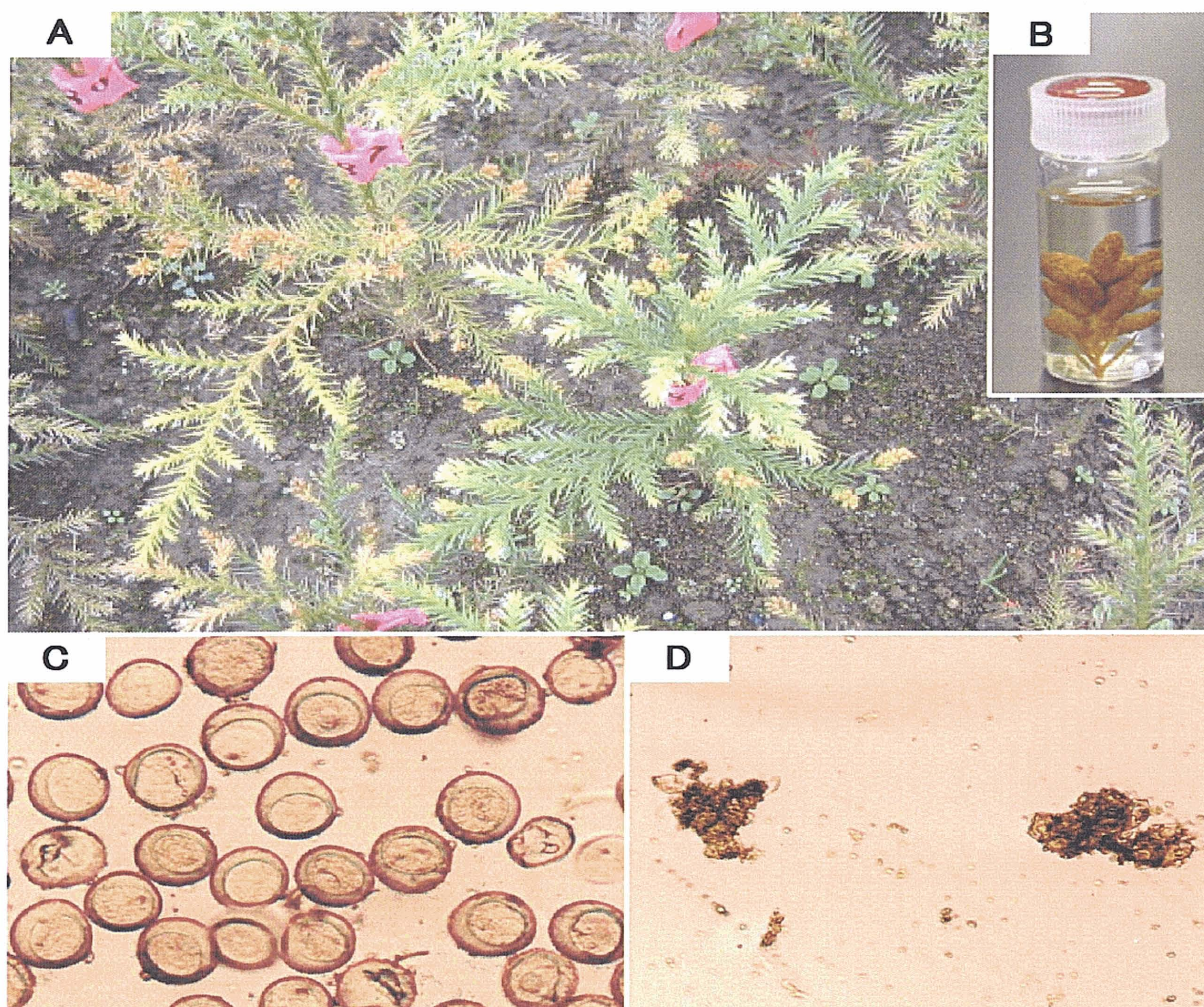


図 3-2 雄性不稔個体の選抜方法

(A: ジベレリン処理によって着花したスギ苗 B: 70%エタノールで保存された雄花  
C: 正常苗の雄花から得られた花粉 D: 雄性不稔苗の雄花から得られた崩壊した花粉)



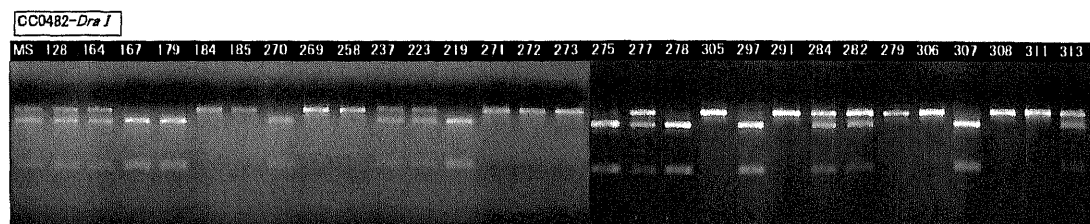


図 3-3 雄性不稔苗 29 個体と雄性不稔母樹の CAPS マーカーによるバンドパターン

## 第4章 雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有したスギ精英樹

### 第1節 はじめに

第3章で記したように、富山県で発見された雄性不稔スギと同一の雄性不稔遺伝子を保有したスギは他の地域にも広く分布しており、その頻度は農作物で言われている値よりも高いと推定されたことから、精英樹や気象害抵抗性候補木の中にも同一の雄性不稔遺伝子を保有したクローンが存在することが期待される。精英樹などのクローンが雄性不稔遺伝子をヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有しているかどうかは、雄性不稔個体と交配した  $F_1$  集団の花粉稔性を調査すると明らかになる。花粉親となるクローンが雄性不稔遺伝子をヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有していれば、劣性ホモ ( $aa$ ) × ヘテロ ( $Aa$ ) の交配になるため、 $F_1$  集団は可稔個体 ( $Aa$ ) と雄性不稔個体 ( $aa$ ) が1対1に分離し、それを保有していなければ、全ての  $F_1$  個体が可稔 ( $Aa$ ) となる。

雄性不稔遺伝子を保有した精英樹は品種改良を行ううえで極めて有望な育種材料となることから、本章では雄性不稔スギ ( $aa$ ) と富山県の精英樹や雪害抵抗性候補木等との交配家系 ( $F_1$ ) を育成し、それらの花粉稔性を調査することによって雄性不稔遺伝子をヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有したクローンを探索した。

### 第2節 材料および方法

#### (1) 雄性不稔スギとの交配

雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有したクローンを探索するため、富山県の精英樹や雪害抵抗性候補木など64クローンから花粉を採取し、1995年から2000年にかけて雄性不稔母樹と交配した(表4-1)。

#### (2) 発芽率の調査

雄性不稔個体との交配によって得られた  $F_1$  種子の発芽特性について把握するため、各  $F_1$  家系の種子を 100 粒ずつシャーレに入れ、人工気象器内で 23℃ に保温した。発芽率の調査は約 50 日間行った。

### (3) $F_1$ 家系の花粉稔性調査

交配によって得られた  $F_1$  集団の花粉稔性について調査するため、富山県林業試験場の苗畑で  $F_1$  種子を 3 年間育苗した後、第 3 章 (図 3-2) と同様の方法で雄花を人為的に着花させ、花粉の有無について調査した。

## 第 3 節 結 果

### (1) $F_1$ 家系の発芽率

雄性不稔個体と交配した 55 家系の発芽率は 10.2～72.0% と家系によって大きくことなり、平均発芽率は 46.0% だった (表 4-1)。

### (2) $F_1$ 家系の花粉稔性

各  $F_1$  家系の花粉稔性について調査した結果を表 4-1 にまとめた。64 家系中 62 家系の  $F_1$  苗は全て花粉をつけたが、精英樹である小原 13 号との  $F_1$  家系は、雄性不稔 64 個体と可稔 52 個体に分離し、雪害抵抗性候補木である了輪 6 号とのそれは、雄性不稔 3 個体と可稔 31 個体に分離した。 $\chi^2$  検定の結果、小原 13 号との  $F_1$  家系は 1:1 の分離比に適合したが、了輪 6 号とのそれは 1:1 の分離比に適合しなかった。

## 第 4 節 考 察

今回の調査で、富山県の精英樹である小原 13 号は雄性不稔遺伝子をヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有していることが明らかになり、了輪 6 号も雄性不稔遺伝子を保有している可能性



が高いと判断された。了輪 6 号との  $F_1$  集団の分離比が大きく歪んだのは調査した集団が小さかったためと考えられたことから、現在、改めて了輪 6 号との  $F_1$  家系を育成中であり、今後、この花粉稔性を確認する予定である。

小原 13 号は、成長が早く、樹幹が通直で芯材が赤色という林業上優れた特性を保持している。また、交配によって得られた  $F_1$  種子の発芽率も 70% と高かった。これらのことから、雄性不稔母樹 ( $aa$ ) と小原 13 号 ( $Aa$ ) を掛け合わせることによって遺伝的に優良であると予想される雄性不稔個体を 50% の頻度で得ることができる。この交配で得られた不稔個体をさし木によって増殖し、そのまま利用することも可能であるが、より優れた雄性不稔スギを作出するためには、雄性不稔遺伝子を保有した精英樹 ( $Aa$ ) 同士で交配を行うのが良いと考えられる。このような交配を行うことによって、25% (図 4-1A) もしくは 50% (図 4-1B) の頻度で遺伝的に優良な雄性不稔個体を得ることができ、これらは戻し交配家系や  $F_2$  家系のような近交弱勢による遺伝的劣化の心配がない。また、これらの交配によって得られた雄性不稔個体は両親ともに優れた特性を持った精英樹であることから、高い木材生産性を維持したまま花粉生産量の大幅な軽減が期待される。2005 年に小原 13 号と了輪 6 号を交配し種子を得たことから、今後はこれらの成長等について定期的に調査を行い、富山県の風土に適した優良な雄性不稔スギの選抜を行う予定である。

平(2004)は、屋久スギの天然林で雄性不稔遺伝子をヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有した個体を発見したことから、他の地域にも雄性不稔遺伝子を保有した精英樹や気象害抵抗性候補木は複数存在すると考えられる。今後は富山県だけではなく全国の精英樹について同様の調査を行い、種苗法の各育種基本区内で選抜されたクローン同士で交配を行うことによって、全国レベルでの実用的な雄性不稔スギの作出が可能となると期待される。

雄性不稔性は劣性遺伝することから、採種園方式 (実生) で全ての個体を雄性不稔にするのは不可能であり、最大でも 50% の頻度でしか雄性不稔性の実生苗を生産することができない。このことから、品種改良された雄性不稔スギの増殖・普及には、さし木などに

よるクローン増殖が適していると考えられた。

表4-1 雄性不稔スギとの交配によって得られたF1家系の発芽率と花粉稔性

花粉親のクローン名	発芽率 (%)	調査した 個体数	観察された個体数	
			正 常	雄性不稔
ビルタニ 1号(S)	49.0	59	59	0
ビルタニ 5号(S)	78.0	122	122	0
ビルタニ 6号(S)	29.0	59	59	0
ボカ (P)	10.8	63	63	0
長水 5号(P)	63.0	54	54	0
長水 6号(P)	61.0	59	59	0
長水 7(P)	51.0	58	58	0
早月 17号(T)	71.0	58	58	0
東西原 2号(S)	26.4	118	118	0
猪谷 2号(S)	-	25	25	0
上市 2号(P)	44.0	57	57	0
上市 3号(P)	65.0	57	57	0
上平打越 (S)	-	30	30	0
片池 1号(T)	53.0	59	59	0
片貝 54号(T)	42.0	60	60	0
片貝 55号(T)	12.4	101	101	0
木根 1号 (S)	67.0	56	56	0
木根 2号 (S)	69.0	59	59	0
木根 7号 (T)	35.0	58	58	0
木根 8号 (T)	18.0	59	59	0
ミオ 1号 (S)	57.0	60	60	0
ミオ 2号 (S)	55.0	59	59	0
ミオ 3号 (S)	40.4	96	96	0
ミオ 4号 (S)	20.6	79	79	0
ミオ 6号 (S)	-	60	60	0
ミオ 9号 (S)	37.0	57	57	0
ミオ 10号 (S)	23.0	60	60	0
ヌカゴジマ 1号 (S)	53.5	80	80	0
小原 1号 (P)	53.0	35	35	0
小原 2号 (T)	40.0	35	35	0
小原 3号 (P)	38.3	203	203	0
小原 5号 (P)	55.0	82	82	0
小原 7号 (P)	62.0	60	60	0
小原 11号 (P)	-	51	51	0
小原 13号 (P)	70.0	116	52	64*
小原 14号 (T)	63.0	59	59	0
小原 16号 (P)	60.0	52	52	0
小原 501号 (P)	-	35	35	0
小原 502号 (P)	32.6	85	85	0
小原 503号 (P)	50.0	58	58	0
了輪6号(s)	-	34	31	3**
三角 3号 (S)	40.0	58	58	0
三角 5号 (T)	44.0	137	137	0
下高井 11号 (P)	72.0	57	57	0
下高井 19号 (P)	50.0	59	59	0
立山 1号 (P)	61.0	59	59	0
砺波 1号 (P)	-	71	71	0
砺波 2号 (P)	38.9	40	40	0
峠島 (S)	35.0	88	88	0

( 続 き )

魚津 1号 (T)	31.0	59	59	0
魚津 9号 (S)	63.0	53	53	0
魚津 11号 (S)	61.0	56	56	0
魚津 12号 (S)	63.0	115	115	0
魚津 14号 (S)	61.0	60	60	0
魚津 15号 (S)	—	24	24	0
魚津 17号 (S)	50.0	56	56	0
魚津 22号 (S)	12.0	57	57	0
魚津 26号 (S)	—	72	72	0
山田 1号 (S)	15.0	56	56	0
山田 2号 (S)	27.0	60	60	0
山田 3号 (T)	45.0	59	59	0
山田 4号 (T)	44.0	59	59	0
山田 10号 (T)	10.2	60	60	0
山崎 109号 (T)	—	57	57	0

(S): 雪害抵抗性候補木

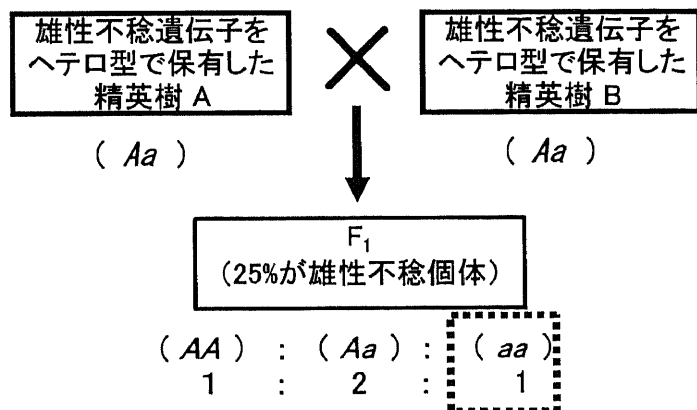
(P): 精英樹

(T): 優れた性質を保有したタテヤマスギ

\*  $\chi^2=1.24$   $P=0.27$

\*\*  $\chi^2=23.05$   $P=1.57 \times 10^{-6}$

A



B

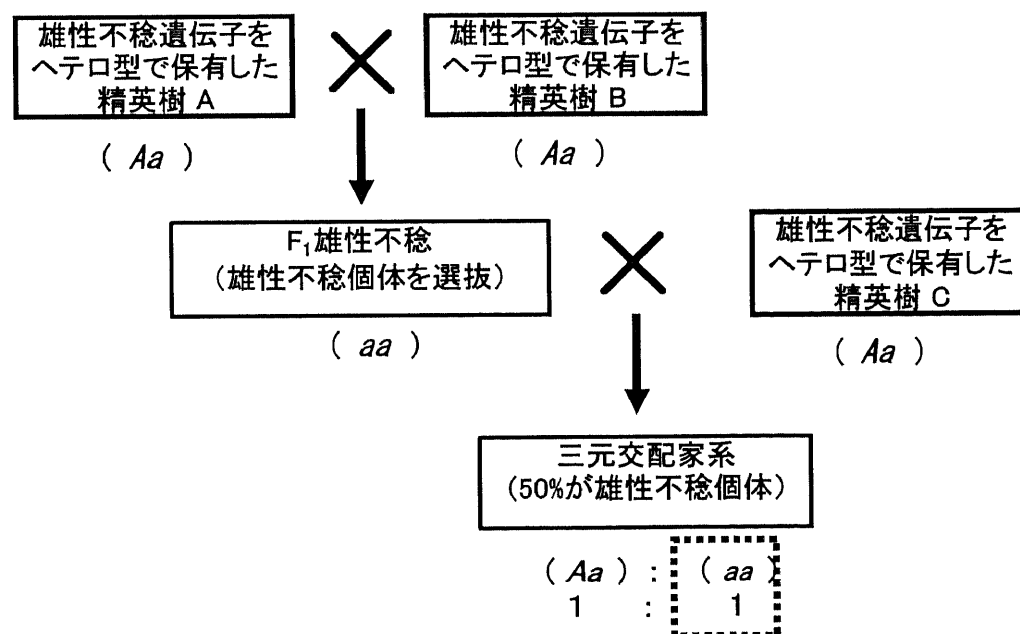


図 4-1 遺伝的に優良な雄性不稔スギの作出方法

## 第5章 採種園産実生個体からの新たな雄性不稔スギの選抜

### 第1節 はじめに

スギ花粉症は全国的な問題であることから、花粉症対策の一環として雄性不稔スギの普及を図るためには病虫害などに対する危険の分散や様々な環境に対する適応性を考慮する必要があり、そのためには、全国各地のスギの集団の中からその地域に適応した雄性不稔スギを選抜し、それを母材料として各地域で品種改良を行うことが望ましい。また、全国レベルでの雄性不稔スギの実用化を考慮すると、今後は雄性不稔遺伝子の多様化を図る必要がある。

以上のことから、本章では新たなタイプの雄性不稔スギの発見を目的に、採種園産の実生苗を材料に用いて効率的な雄性不稔個体の選抜方法について検討を行った。

### 第2節 材料および方法

#### (1) 材 料

富山県魚津採種園由来の3年生実生苗(タテヤマスギ)を供試材料用いた。魚津採種園は表5-1に示したとおり、富山県の精英樹を中心とした66クローンで構成されている。本研究では1994年から2000年にかけて魚津採種園から生産された種子に由来する実生苗、10,902個体について花粉稔性を調査した(表5-2)。

#### (2) 着花の促進および花粉観察

採種園由来のスギ苗の集団から雄性不稔個体が出現する頻度を調査するため、第3章(図3-2)と同様の方法で雄花を人為的に着花させ、よく充実した雄花一個をスライドガラス上でカミソリを用いて二分し、水道水を一滴落とした後、それを虫ピンで碎いて顕微鏡で花粉の有無、形態等の観察を行った。個体毎には500～600粒の花粉に

ついて観察した。このとき花粉の無い個体や形態的に異常のある個体を雄性不稔の候補個体として選抜した。ここで選抜した個体は翌年、再度ジベレリン処理を行い、再現性についても調査した。

### (3) デンプン反応による花粉の発育異常調査

正常なスギの成熟花粉は非デンプン花粉であるが、花粉形成に異常が生じると花粉内部のデンプンが完全に糖化されずヨード・ヨードカリ液に反応する(藤下 2002)。そこで、雄性不稔と思われる個体に対して花粉の発育異常によるデンプン反応を見るため、ヨード・ヨードカリ液を雄花を砕いたプレパラート上に一滴落として、その反応を観察した。

### (4) 走査型電子顕微鏡による花粉崩壊特性の調査

新たに発見された雄性不稔スギと 1992 年に富山県で発見された雄性不稔スギ(富山不稔とする)の花粉の崩壊特性を比較調査するため、70%エタノールで保存した雄花をカミソリの刃で半分に切断し、試料台にのせて自然乾燥させた後、スパッタリングにより白金粒子を 2 分間蒸着させ、走査型電子顕微鏡で観察した。

### (5) 花粉形成に異常が認められた個体の発芽率の調査

選抜された個体の雌花の機能を調査するため、10 月上旬に選抜された個体から自然交配によって得られた球果を採取し種子を得た。4℃で2ヶ月間種子を保存した後、蒸留水を浸したろ紙に種子 100 粒を置床して 23℃で保温し、約 50 日間発芽試験を行った。

### (6) 花粉形成に異常が認められた個体の発根率の調査

選抜された個体のさし木発根性を評価するため、2002 年 4 月上旬に、選抜された個体からさし穂をとり、発根剤(オキシベロン液剤)処理した後、バーミキュライトに挿しつけて発根率を調査した。

#### (7)花粉形成に異常が認められた個体の染色体数の調査

染色体異常により雄性不稔を生じたのかを確認するため、下記の方法で染色体数を調査した。4 月上旬に、さし木で発根した個体からよく伸長した根端(5~10mm)を採取し、0.002M の 8-オキシキノリン水溶液に浸漬し、4℃で約 14~16 時間の前処理を行った。その後、酢酸アルコール(99%エタノール:氷酢酸=3:1)に浸漬し、4℃で 24 時間以上固定した。酢酸カーミンで染色後、押しつぶし法によってプレパラートを作成し顕微鏡で染色体を観察した。1 個体につき約 30 細胞の染色体を観察した。

### 第 3 節 結 果

#### (1)花粉観察による雄性不稔スギの選抜

10,902 本の魚津採種園産種子由来の 3 年生実生苗(タテヤマスギ)の花粉稔性について調査した結果、雄性不稔と思われるスギが 2 個体(M-1、M-2)得られた。正常なスギと比較して、M-1 と M-2 は、外見上、著しく異なった特徴はなく、雄花も正常に形成されるが、開花直前の雄花をカミソリの刃で切断し顕微鏡観察すると、小さく萎縮したような葯が認められた(図 5-1)。これらのスギの花粉粒は一核期で成長が停止したような小さな花粉が 90%以上を占め(表 5-3)、花粉数も少なかった(図 5-2A, B)。この結果は 5 年間同様であった。次に、ヨード・ヨードカリ溶液で染色したところ、正常な花粉では全く反応しなかったのに対して、M-1、M-2 では強く染色された花粉粒が認められた(図 5-2C, D)。このことから、M-1 と M-2 の花粉内のデンプンは完全に糖化されず残留していることが明らかになった。また、1999 年から 2003 年まで M-1 と M-2 か



ら雄花の着いた枝を採取し、15℃の人工気象器内で開花試験を行ったが、M-1、M-2とも雄花の花軸は伸長させるものの花粉は全く飛散させなかった。

## (2) 電子顕微鏡による花粉崩壊過程の観察

電子顕微鏡を用いて、新たに発見された雄性不稔スギ2個体(M-1, M-2)と富山不稔スギの花粉崩壊過程について比較調査した結果、富山不稔の雄花内部は細かく崩壊した残骸が認められたのに対して、M-1とM-2は花粉の表面で互いに融合したような形をしていた(図 5-3)。2,000 倍に拡大して花粉粒を観察すると富山不稔の場合、スギ花粉に特徴的なオービクルスが認められなかったのに対して、M-1とM-2では、それが確認された(図 5-4)。このことから、富山不稔と M-1, M-2 は異なるタイプの雄性不稔である可能性が示唆された。

## (3) 花粉形成に異常が認められた個体の発芽率

M-1 と M-2 から自然交配によって得られた種子の発芽率は、両者共に一般的なスギの発芽率(20～40%)より低かった(表 5-4)。特に、M-1 は3年間の平均で1%以下であることから、雌花の機能にも異常があると判断された。一方、M-2 は2003年に20%の発芽率を示しており、得られた苗も順調に生育していることから(図 5-5)、雌花の機能は正常であると考えられた。

## (4) 花粉形成に異常が認められた個体の発根率

M-1 と M-2 は、ともに95%以上の高い発根率を示した(表 5-5)。このことから、これらのスギをさし木によって増殖・普及することは可能であると判断された。

## (5) 花粉形成に異常が認められた個体の染色体数

M-1 と M-2 の根端を採取し染色体数の調査を行った結果、両者ともにその数は 22 本 ( $2n = 22$ ) と正常であり、三倍体 ( $3n = 33$ ) (佐々木・黒木 1982) や三染色体性 ( $2n = 23$ ) (染郷・菊池 1980) のような異常は確認できなかった (図 5-6)。

#### 第 4 節 考 察

スギの花粉症が大きな社会問題になっていることから、花粉を飛散させない新たなタイプの雄性不稔スギは、花粉症対策としての新しい品種を開発する上で重要な育種母材料となる。今回、富山県魚津採種園産種子由来の実生苗 10,902 個体の中から 2 個体の雄性不稔スギ (M-1, M-2) を選抜することができた。着花年齢に達したスギ林の中から雄性不稔個体を選抜するには、多大な労力と時間が必要になるが、今回の選抜方法では材料に 3 年生の実生苗を用いることから数千本単位であればそれ程大きな栽培面積を必要とせず、しかもジベレリン処理後、数ヶ月で結果が出るため短い生育期間で雄性不稔個体を選抜することができる。また、スギと並んで花粉症が問題になっているヒノキもジベレリン処理により苗木に着花させることができるため、同様の方法でヒノキの雄性不稔個体を選抜できる可能性がある。

今回得られた M-1, M-2 は、染色体数に異常が確認できなかったこと等から考慮すると、この不稔性は染色体異常によるものでなく花粉形成に関与する何らかの遺伝子の突然変異 (雄性不稔遺伝子とする) によるものと推測された。さらに、小孢子の崩壊が一核期以降に発現することが明らかになったが、富山不稔の花粉粒は完全に崩壊してオービクルが確認できなかったのに対して、M-1 と M-2 は花粉の表面で互いに融合したような壊れ方をしているオービクルが存在していたことから、富山不稔と M-1, M-2 は異なる雄性不稔遺伝子によって引き起こされている可能性が示唆された。Kaul *et al.* (1988) によると、雄性不稔植物では減数分裂以前の花粉母細胞期から開花期の花粉にいたるまで様々な時期に種々の異常が出現し、その遺伝子数は、トウモロコシで 60、トマトで 55、オオム

ギで 48 あると報告されている。このこともあって、スギにも多様な雄性不稔遺伝子が存在している可能性が高い。また、M-1 は発芽率が1%以下と低く両性不稔の可能性が高いが、M-2 は発芽率の結果などから育種の母材料として利用することが可能であると考えられる。このスギを実用化するためには、その遺伝様式を明らかにした後、富山不稔と同様に、精英樹を中心とした交配家系を育成しつつ精英樹や気象害抵抗性候補木の中から同一の雄性不稔遺伝子を保有したクローンを探索する必要がある。そうすることによって、木材生産性に優れ、さらに遺伝的に多様な雄性不稔スギの作出に結びつくと期待される。

本研究では 10,902 個体中 2 個体の雄性不稔個体が出現したことから、その頻度は 5,451 分の 1 となる。トマトの同様の値は 2 万分の 1 程度と報告されていることに比べると (Rick 1948)、今回の結果は高い値となった。また、今回は採種園産の種子を混合して使用したため、選抜された2個体の母樹は特定できなかったが、採種園を構成している精英樹等の中に雄性不稔遺伝子を保有したクローンが存在する可能性がある。

雄性不稔スギの普及を図るためには、生態的なリスクを考慮して雄性不稔性の遺伝子プールを拡大しておく必要がある。本手法は少ない栽培面積と短い生育期間で雄性不稔スギを選抜できることから、全国各地で適用可能であり、多くの地域からそれを選抜することによって雄性不稔性の遺伝子プールの拡大に繋がると考えられた。

表5-1 富山県魚津採種園を構成しているクローン

クローン名	クローン名
小原1号	鳥取署106号
小原3号	木根1号
小原4号	木根2号
小原7号	木根3号
小原8号	木根5号
小原9号	木根6号
小原10号	上市1号
小原11号	上市2号
小原12号	上市3号
小原15号	魚津17号
小原16号	魚津26号
小原17号	江沼1号
小原21号	江沼3号
小原501号	江沼4号
小原502号	立山1号
小原503号	石動2号
小原504号	砺波2号
富山署102号	城端1号
富山署104号	輪島6号
富山署105号	日野12号
富山署106号	足羽7号
富山署107号	足羽8号
富山署108号	東伯3号
富山署111号	金沢1号
富山署113号	馬場10号
金沢署101号	原牧
金沢署102号	三尾
金沢署103号	早月18号
鳥取署101号	早月17号
鳥取署102号	早月21号
鳥取署103号	片貝54号
鳥取署104号	片貝55号
鳥取署105号	大山1号

表5-2 調査した年と個体数

年	個体数
1994	2,301
1995	2,348
1996	1,999
1997	1,089
1998	1,943
1999	728
2000	494
計	10,902

表5-3 2001年と2002年における花粉観察の結果

調査年	系統名	計測花粉数	正常	異常	異常花粉の 出現率(%)	ヨード反応 (染色された頻度)
2001	M-1	512	20	492	96.1	—
2001	M-2	528	41	487	92.2	—
2001	タテヤマ(正常)*	504.5	498.4	6.1	1.2	—
2002	M-1	589	17	572	97.1	有(11.1%)
2002	M-2	529	11	518	97.9	有(19.1%)
2002	タテヤマ(正常)*	509.7	500	9.7	1.9	無(0%)

\* 正常なタテヤマスギ10個体の平均

表5-4 花粉稔性に異常を有するスギの発芽率(%)

系統名	2001年	2002年	2003年	平均
M-1	1.0	0.5	1.0	0.8
M-2	9.0	4.7	20.0	11.2
タテヤマ(正常)*	9.8	23.6	36.5	23.3

\* 富山県魚津採種園由来の種子

表5-5 花粉稔性に異常を有する個体の発根率

系統名	さし穂の本数	発根した穂数	発根率(%)
M-1	23	23	100
M-2	30	29	96.7



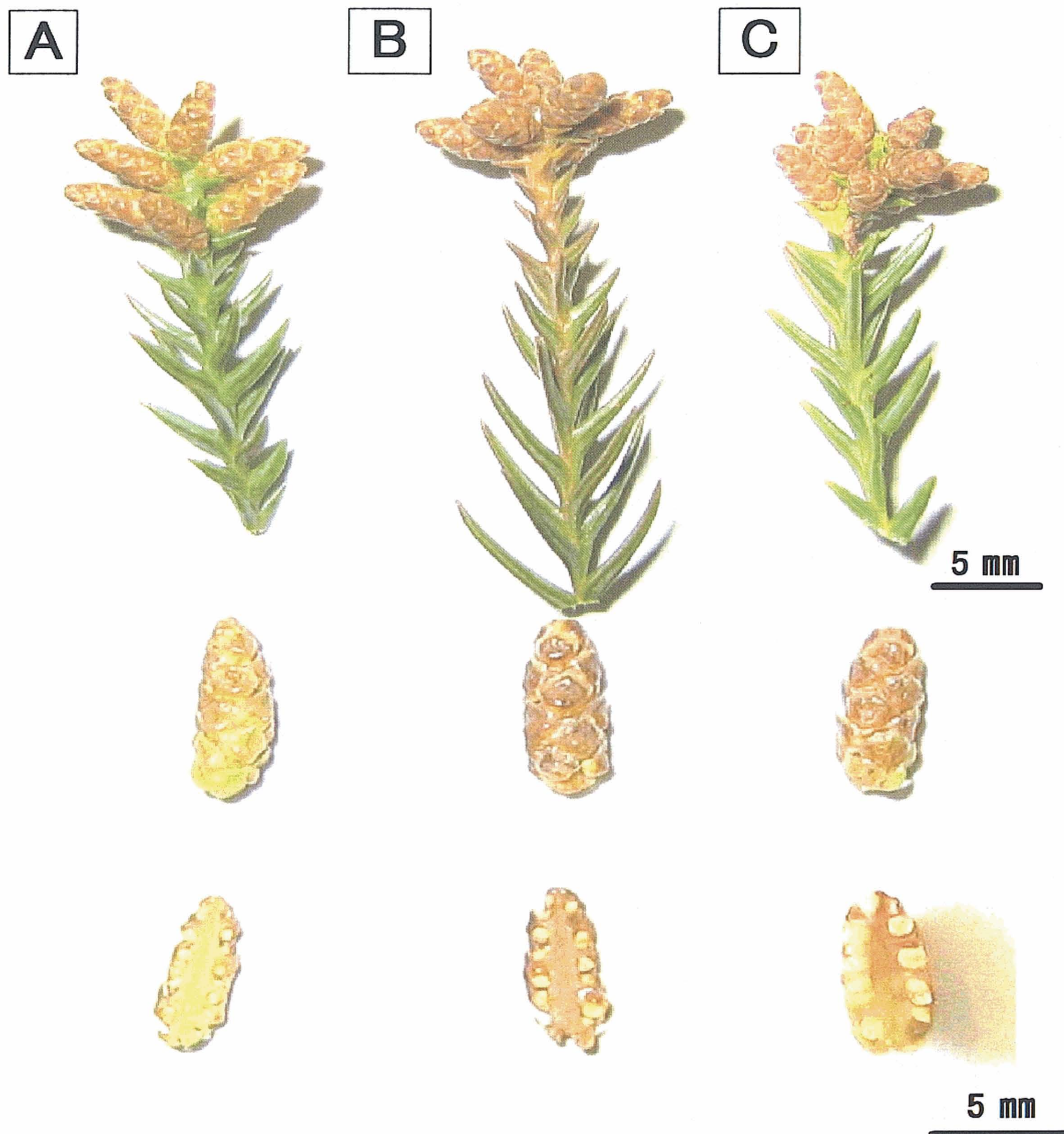


図 5-1 雄性不稔スギ(M-1, M-2)とタテヤマスギの雄花および雄花断面の写真

(A) M-1, (B) M-2, (C) タテヤマスギ(正常)



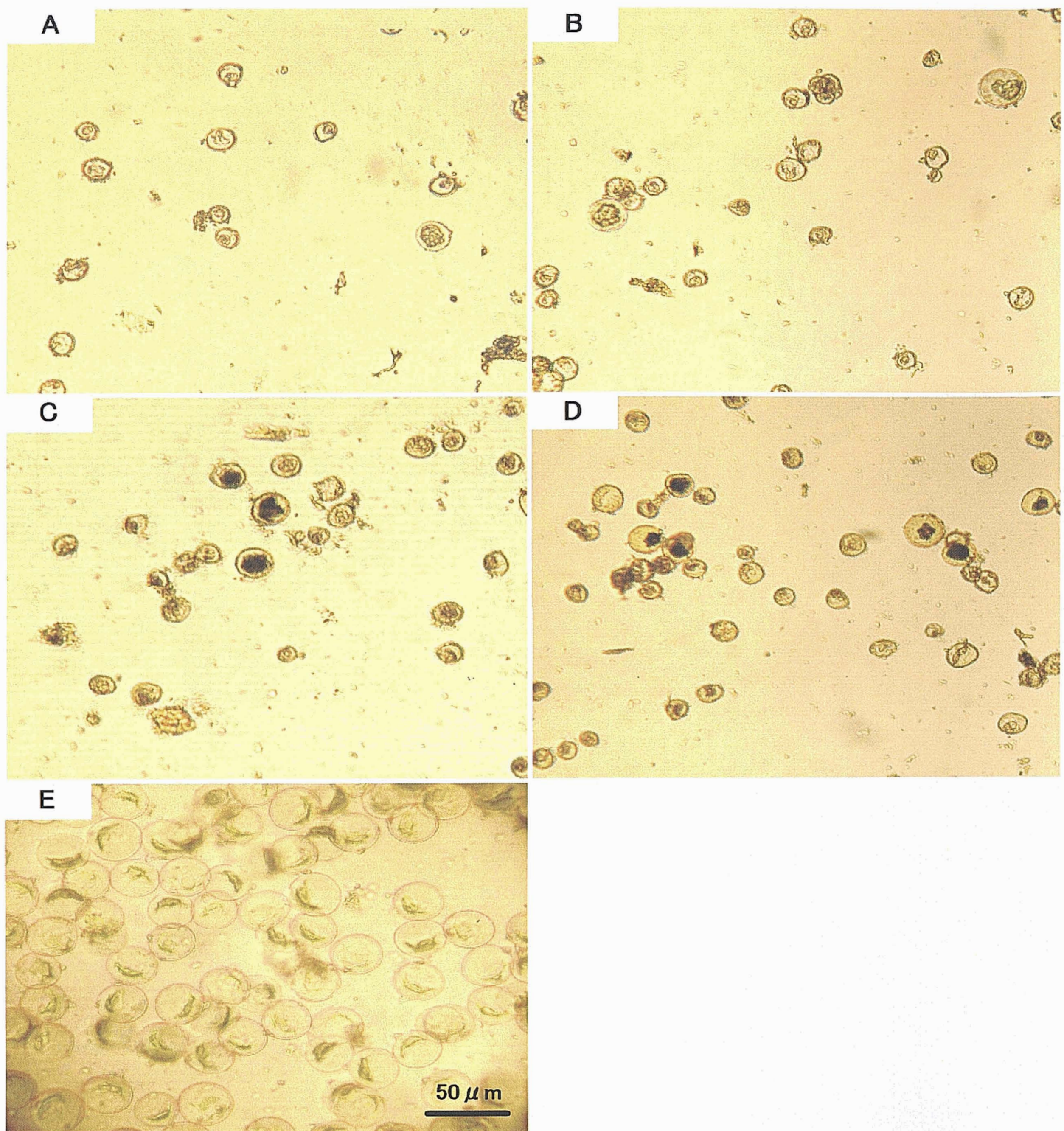


図 5-2 顕微鏡観察による雄性不稔スギ(M-1, M-2)とタテヤマスギの花粉粒

(A) M-1 の花粉粒, (B) M-2 の花粉粒, (C) ヨード反応を示した M-1 の花粉粒

(D) ヨード反応を示した M-2 の花粉粒, (E) タテヤマスギの正常な花粉粒



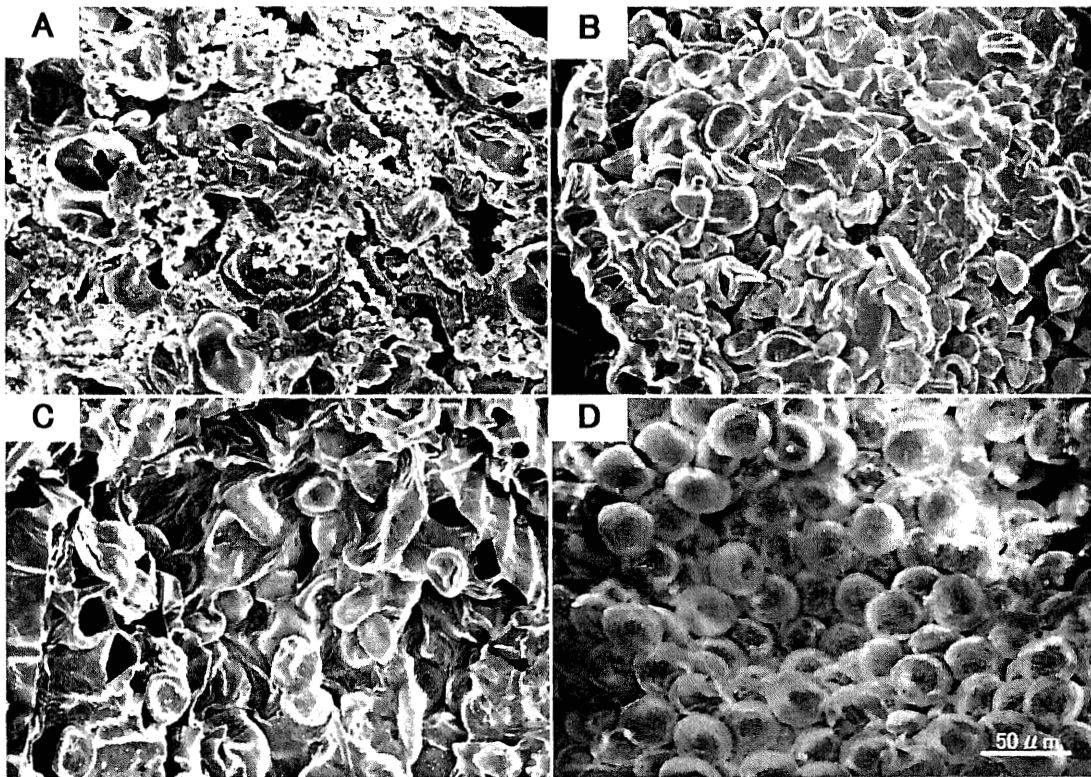


図 5-3 雄性不稔スギ(富山不稔, M-1, M-2)とタテヤマスギの雄花内部

(A) 富山雄性不稔スギ, (B) M-1, (C) M-2, (D) タテヤマスギ(正常)

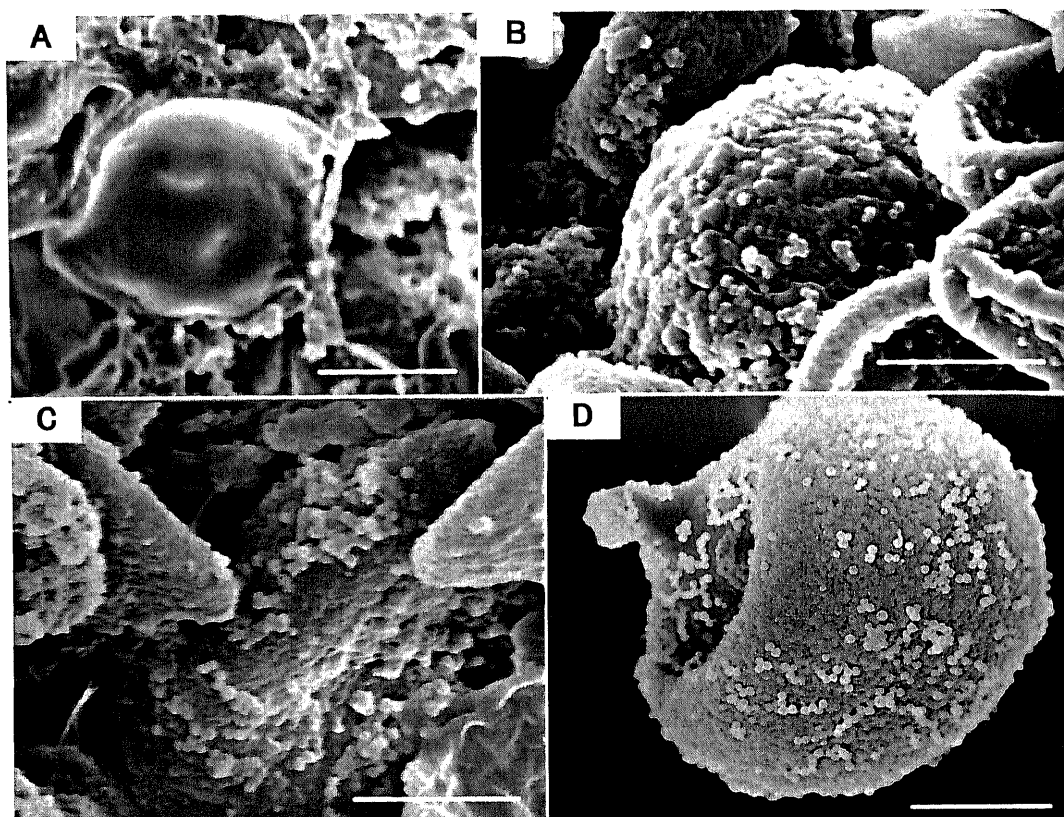


図 5-4 雄性不稔スギ(富山不稔, M-1, M-2)とタテヤマスギの花粉粒の形態

(Bar = 10  $\mu$ l)

(A) 富山雄性不稔スギ, (B) M-1, (C) M-2, (D) タテヤマスギ(正常)





図 5-5 雄性不稔スギ(M-2)から自然交配によって得られた苗

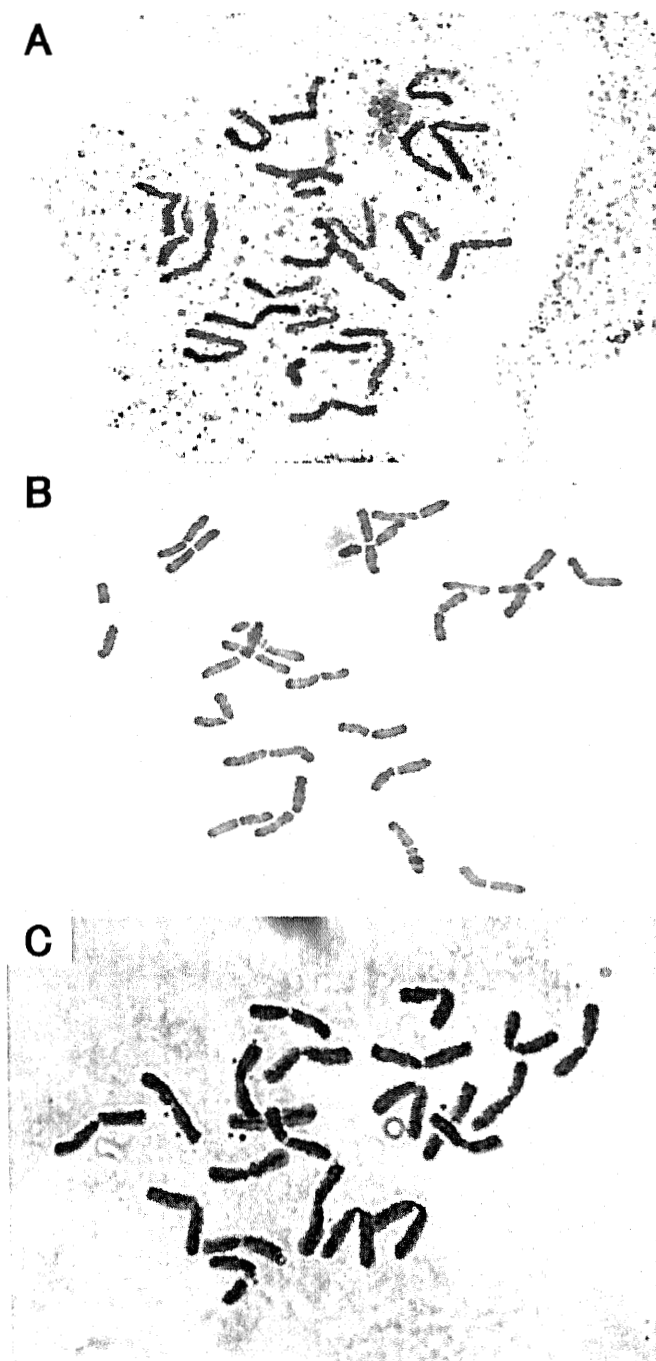


図 5-6 雄性不稔スギ(M-1, M-2)とタテヤマスギの  
根端細胞における分裂中期の染色体  
(A) M-1, (B) M-2, (C) タテヤマスギ(正常)



## 第6章 マイクロプレートリーダーを用いた簡便なスギ花粉アレルゲン—Cry j 1— の定量法の確立

### 第1節 はじめに

序論で記したように、スギ花粉症を引き起こすメジャーアレルゲンとして Cry j 1 と Cry j 2 の2種類のタンパク質が同定されており、スギ花粉症患者の90%以上がこれらのいずれか、または両方に対する特異的 IgE 抗体を保有している (Hashimoto *et al.* 1995)。Cry j 1 と Cry j 2 は、どちらも主要なアレルゲンでありながら抗原性が異なり、Cry j 1 含量が Cry j 2 より数倍多く存在していると報告されている (澤谷ら 1994)。また、アレルギー患者を対象にした Cry j 1 と Cry j 2 による皮内テストでも、Cry j 2 より Cry j 1 の方が高い陽性率を示した (安枝 1994)。これらのことから、スギ花粉症患者にとって Cry j 1 が最も重要なアレルゲンであると言える。

最近、Cry j 1 量がスギのクローン間によって大きく異なることが明らかにされたことから (佐々木ら 1996), (澤崎ら 1997), (後藤ら 1999)、アレルゲン (Cry j 1) フリーの変異体やそれが極めて少ない精英樹などが選抜できれば、雄性不稔と同様に重要な遺伝資源となる。また、これまでに林業サイドでの花粉症対策として、精英樹を中心に雄花の着花量に関する調査が行われてきたが (千田・近藤 1998), (大谷ら 2000), (西山ら 2000), (戸田ら 1996)、今後はスギ花粉に含まれるアレルゲン量についても調査研究する必要があると考えられる。

そこで本章では、サンドイッチ ELISA 法をもとにして感度が高い蛍光色素発色反応を加えた手法を確立し、スギ花粉のタンパク質の抽出から Cry j 1 の定量まで一連の実験系について、できるだけ簡便かつ低コストになるよう検討した。

### 第2節 材料および方法

## (1) 材 料

富山県の主要品種であるカワイダニスギとリョウウスギ、対照としてヒノキの花粉を用いた。花粉は 1998 年 2 月中旬に採取し、4 °C で保存した。

## (2) タンパク質の抽出

タンパク質の抽出法については、抽出バッファーの違い、振とう時間の差、ジエチルエーテルによる脱脂効果について検討した。サンドイッチ ELISA 法の条件設定は下記の抽出法 1 で行った。

### ・抽出法 1

シリカゲルで乾燥させた花粉 0.1 g に 10 ml の抽出液 (Coca 液、表 6-1) を加え 30 秒程 Vortex した後、室温で 10 時間振とう (TAITEC Mild Mixer SI-36) させた。その後 3,000 rpm 15 分 23°C で遠心分離を行い、上清を 4°C で保存した。

### ・抽出法 2 (脱脂あり)

シリカゲルで乾燥させたスギ花粉 0.1 g に 10 ml のジエチルエーテルを加え一時間振とうし、脱脂した。その懸濁液を濾過し、室温で乾燥させ、10 ml の抽出液 (Coca 液または Tris バッファー、表 6-1) を加えた。30 秒程 Vortex した後、室温で 14 時間振とうさせ、その後 10,000rpm 15 分 4°C で遠心分離を行い、上清を 4°C で保存した。

### ・抽出法 3 (脱脂なし)

シリカゲルで乾燥させた花粉 0.1 g に 10 ml の抽出液 (Coca 液または Tris バッファー) を加え 30 秒程 Vortex した後、室温で 14 時間振とうさせた。その後 10,000



rpm 15 分 4℃ で遠心分離を行い、上清を4℃で保存した。

上記の手法による花粉抽出液を  $4^{-1}$  から  $4^{-11}$  まで希釈液(表 6-1)で希釈し、それぞれをサンプルとした。

### (3) サンドイッチ ELISA 法

サンドイッチ ELISA 法は2種の抗体を使用して Cry j 1 に対する抗原抗体反応のはさみうちを行うことにより検出する方法で、発色には ABC 法(抗体標識にビオチンを用い、ビオチンにアビジン酵素複合体を結合させた後、酵素と基質を反応させ発色させる方法)を用いた(図 6-1)。

実験の手順を図 6-2 に、用いた薬品を表 6-2 にまとめた。96 穴マイクロプレートの各穴に炭酸緩衝液で希釈した Cry j 1 ポリクローナル抗体を含むウサギ IgG 分画を 100  $\mu$ l ずつ加え、4℃で一晩静置し、抗体を固相(プレート)に吸着させた。TTBS 液で6回洗浄後、ブロッキング液を 200  $\mu$ l ずつ各ウェルに分注し、4℃で3時間静置させた。その後、TTBS 液で6回洗浄後し、それぞれの濃度に希釈液で希釈したサンプルを 100  $\mu$ l ずつ分注し、4℃で一晩静置した。再び TTBS 液で6回洗浄後、ビオチンラベル化した Cry j 1 に対するモノクローナル抗体(JIB01)を希釈液でそれぞれの濃度に希釈し、50  $\mu$ l ずつ分注した。室温で1時間静置させた後、TTBS 液で6回洗浄し、アビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ用希釈液で 1,000 倍に希釈したアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ溶液を 50  $\mu$ l ずつ分注した。室温で30分静置後、TTBS 液で6回洗浄し、酵素希釈液で希釈した 4-メチルウンベリフェリル反応液を 100  $\mu$ l ずつ分注し、37℃で30分反応させた。停止液を 100  $\mu$ l ずつ加えて反応を停止させ、酵素反応によって生じた 4-メチルウンベリフェロンの蛍光を自動蛍光光度測定器(ラボシステムジャパン社)で測定した。

Cry j 1 ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は Yasueda *et al.* (1983)によって

調整されたものを使用した。

### 第3節 結 果

#### (1) Cry j 1 を定量するサンドイッチ ELISA の条件設定

至適なタンパク質の希釈濃度と Cry j 1 の固相 (ポリクローナル) 抗体及びモノクローナル抗体の量について検討した。その組み合わせを 表 6-3 に示した。すべての組み合わせにおいてタンパク質の希釈率が高くなるほど FU (fluorescence unit) 値は低くなり、 $4^{-5}$  よりも高い希釈率では FU 値に差は認められなかった (図 6-3)。 $4^{-2}$  よりも低い希釈率では FU 値に頭打ちが認められたため、この実験系で使用するタンパク質の希釈率は  $4^{-4}$  または  $4^{-3}$  が適していると考えられた。

固相に吸着させたポリクローナル抗体の量は、500、1,000、2,500 ng の間で FU 値に大きな差が認められなかった。このことから、500ng を適量とした。また、ビオチン化したモノクローナル抗体はすべての組み合わせで 125ng の方が高い FU 値を示したが、品種間もしくはクローン間の Cry j 1 量を比較する際にその差は問題にならないことから、経済性も考慮し 25ng を適量とした。

#### (2) 検量線の作製

この条件下で Cry j 1 を定量する検量線を作成した。 $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度に調整されている Cry j 1 標準液 (安枝ら 1996) を  $4^{-4}$  から  $4^{-10}$  まで希釈した後、FU 値を測定し回帰分析を行った結果、Cry j 1 の量と FU 値の間で  $y = 0.000001x^2 + 0.0025x - 0.0797$  ( $R^2 = 0.999$ ) の関係式が得られ、この式を検量線とした (図 6-4)。

#### (3) Cry j 1 の抽出条件

カワイダニスギの花粉を材料に用い、効率よく Cry j 1 を抽出する条件を検討した。

抽出バッファーの中に花粉を入れ振とうさせる時間の長さを10時間と14時間で比較した結果、14時間の振とうの方が10時間のそれより $4^{-4}$ 希釈の時では約6.8倍、 $4^{-3}$ 希釈の時では約1.9倍量のCry j 1 (ng / ml)が抽出された(図 6-5)。次に、2種類の抽出液(Coca 液と Tris バッファー)で抽出されるCry j 1 量を比較した結果、Coca 液の方がTris バッファーより $4^{-4}$ 希釈の時では約2.4倍、 $4^{-3}$ 希釈の時では約1.4倍多く抽出された(図 6-6)。ジエチルエーテルによる脱脂の効果を2種類の抽出液で調査したが、すべての希釈においてFU 値に差は認められなかった(図 6-7)。

#### (4) モノクローナル抗体の交差反応性

実験で使用したモノクローナル抗体の交差反応性について調査するため、ヒノキの花粉から抽出法 2 でタンパク質を抽出し同じ条件で ELISA を行った結果、低い交差反応が認められた(図 6-8)。

### 第4節 考 察

本章では、スギ花粉のタンパク質の抽出からCry j 1 の定量まで一連の実験系についてできるだけ簡便かつ低コストになるよう検討した。アレルゲンを抽出する場合、一般的に、①磨砕、②脱脂、③抽出、④濾過、⑤透析、⑥濃縮、⑦無菌化の工程がとられる。もちろん全ての物質でこの全工程を必要とするわけではなく、例えば花粉の場合、透析は一般的に必要としない(油井 1979)。本実験では、Cry j 1 の多くが花粉外壁の表面とオービクルスに存在していることから(Miki-Hiroshige *et al.* 1994)、手間をかけて花粉を破壊する必要はないと判断し、磨砕の工程は省略した。しかし、同様の実験系で花粉の内部に存在するCry j 2 を定量する場合は、花粉の細胞壁を壊す工程(磨砕)が必要になると考えられる。脱脂は刺激性成分を除きアレルゲン物質の抽出効果をよくするために行われるが、本実験によりスギ花粉の場合、脱脂の効果はほとんどないことが明らかになった。

このことはアレルギーである Cry j 1 が鼻粘膜上で容易に溶解出すことを示唆しており、スギ花粉症患者急増の原因の一つになっている可能性が考えられた。抽出では Coca 液と 14 時間振とうの組み合わせが最も高い収率であった。安枝 (1994) は、0.125 M の炭酸水素アンモニウムや炭酸水素ナトリウムを用いると花粉 1g あたり 300~500  $\mu$ g の Cry j 1 が短時間のうちに抽出されてくると報告しており、澤谷ら(1993)も 0.125 M 炭酸水素ナトリウムによる Cry j 1, Cry j 2 の抽出はともに 60 分で終了すると報告している。しかし、今回の実験では振とう時間を 10 時間と 14 時間で比較した結果、約 2~7 倍の差がみられた。このことから、今回の実験系では少なくとも 10 時間の振とうでは Cry j 1 を抽出しきれないことが示された。また、10 時間振とうの場合、Cry j 1 量に希釈率を乗じた値に定量性がなかった。この理由は明らかではないが、スギ品種の違いにより抽出効果の悪い場合や抗原抗体反応に対する何らかの阻害物質の存在も考えられる。次に抽出液による比較では澤谷ら(1993)によると、トリス、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素アンモニウムのいずれを用いても弱アルカリであれば同程度の収率であったと報告されているが、本実験では使用した 2 種類の抽出液とも弱アルカリであったにもかかわらず、1.4~2 倍の差がみられた。このことから Cry j 1 の収率は pH の効果だけではないことが示唆された。濃縮や無菌化の工程は手法の簡便化を目的としているため省略した。

タンパク質の抽出から Cry j 1 の定量まで本実験系で適した条件を表 6-4 にまとめた。タンパク質の希釈濃度は 図 6-3 より  $4^{-4}$  または  $4^{-3}$  の希釈が適していると考えられたが、Coca 液-14 時間振とうで抽出した場合、 $4^{-3}$  希釈で頭打ちがみられたため  $4^{-4}$  希釈を適量と判断した。

マイクロプレートリーダーを用いた Cry j 1 の定量には、モノクローナル抗体を使用することが望ましい。澤谷ら(1994)は Cry j 1 のポリクローナル抗体で ELISA 分析をした結果、Cry j 2 や調査した 10 種の花粉すべてに交差反応が認められたと報告している。このことからビオチン化したポリクローナル抗体を同様の実験系で使用した場合、目的以

外のタンパク質も測定する危険性が十分考えられる。Suzuki *et al.* (1996a)は今回使用したモノクローナル抗体(JIB01)を用いてスギ花粉抽出液を材料にウェスタンブロッティングを行った結果、Cry j 1 の分子量である約 40 kDa に一致したバンドしか現れなかったと報告している。このことから、本実験系において Cry j 1 以外のタンパク質を測定している可能性は低いと考えられた。また、今回使用したモノクローナル抗体(JIB01)と結合するエピトープに高い頻度で変異が認められた場合、Cry j 1 との結合性が大幅に低下するため、その定量に適さないと判断されるが、後藤(2005)は全国の精英樹 522 クローンについて調査した結果、約 99%のクローンがこの抗体と反応したと報告している。このことから、本実験系で JIB01 を使用することに大きな問題はないと考えられた。

今回の調査で低い数値ながらもヒノキとの交差反応が認められたが、これは Cry j 1 とヒノキのメジャーアレルゲンである Cha o 1 がアミノ酸配列で約 80%の相同性を持ち(Suzuki *et al.* 1996b)、共通のエピトープを保有しているため(阪口 1998)と考えられた。

作製した検量線をもとにカワイダニスギの花粉から Coca 液-14 時間振とうで抽出された Cry j 1 量を算出すると、1gあたり約 502  $\mu$ g であった。この量は安枝(1994)の報告とよく一致することから、本実験系に大きな問題はなく Cry j 1 も十分抽出されていると思われた。Cry j 1 の含有量について安枝(1994)は、この量は花粉の産地や採集年度にかかわらずほぼ一定であるとしているが、本研究で使用したカワイダニスギとリョウワスギを比較した結果、両クローンとも富山県の主要品種であるにもかかわらずカワイダニスギの方がすべての組み合わせで高い数値を示した。このことは品種間やクローン間で Cry j 1 の含有量が異なることを示唆しており、さらに詳細な研究の必要性をものがたっている。

本章で使用した蛍光サンドイッチ ELISA 法は感度が高いことから品種間やクローン間の差を検出しやすいという利点があり、定量には 96 穴のマイクロプレートを使用しているため効率的な手法である。以上のことから、本手法は Cry j 1 の発現特性やクローン間差などのような育種的研究に効果的に活用できると考えられた。

表 6-1 タンパク質の抽出に使用した緩衝液の組成

Coca 液		
NaCl	85	mM
NaHCO <sub>3</sub>	32.7	mM
Phenol	42.5	mM
Tris バッファー		
Tris ( pH 8.0 )	50	mM
EDTA	5	mM
NaCl	125	mM
2-Mercaptoethanol	2	%
希釈液		
Tris (pH 7.5)	50	mM
NaCl	145	mM
Tween 20	0.05	%
BSA	0.1	%

表 6-2 ELISA法に使用した緩衝液等の組成

炭酸緩衝液		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15	mM
NaHCO <sub>3</sub>	34.8	mM
NaN <sub>3</sub>	0.02	%
TTBS 液		
Tris (pH 7.5)	50	mM
NaCl	145	mM
Tween 20	0.05	%
ブロッキング液		
Tris (pH 7.5)	50	mM
NaCl	145	mM
BSA	1	%
アビジン-β-ガラクトシダーゼ液		
Avidin-β-galactosidase	0.5	mg
TTBS液	1	ml
BSA	0.1	%
アビジン-β-ガラクトシダーゼ用希釈液(pH 7.0)		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	4.5	mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5.5	mM
NaCl	100	mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1	mM
NaN <sub>3</sub>	0.1	%
BSA	0.1	%
酵素希釈液 (pH 7.0)		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	mM
NaCl	100	mM
MgCl <sub>2</sub>	1	mM
NaN <sub>3</sub>	0.1	%
BSA	0.1	%
4-メチルウンベリフェリル反応液		
4-Methyl umbelliferyl β-D-galactoside	0.68	mg
酵素希釈液	20	ml
停止液(pH 10.3)		
Glycine	200	mM
NaOH	0.2	N

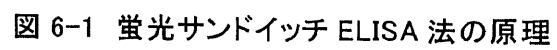
表 6-3 実験に使用したタンパク質と Cry j 1 のポリクローナルおよびモノクローナル抗体の濃度

タンパク質濃度	ポリクローナル抗体量 (ng)	モノクローナル抗体量 (ng)
4 <sup>-1</sup>	50	125
4 <sup>-2</sup>		
4 <sup>-3</sup>		
4 <sup>-4</sup>	500	
4 <sup>-5</sup>		
4 <sup>-6</sup>		
4 <sup>-7</sup>	1,000	25
4 <sup>-8</sup>		
4 <sup>-9</sup>		
4 <sup>-10</sup>	2,500	
4 <sup>-11</sup>		



表 6-4 タンパク質の抽出とELISAの至適条件

タンパク質の抽出	
バッファーの種類	Coca 液
振とう時間	14時間
脱 脂	な し
ELISAの条件	
タンパク質の希釈濃度	$4^{-4}$
固相抗体の量	500 ng
モノクローナル抗体の量	25 ng



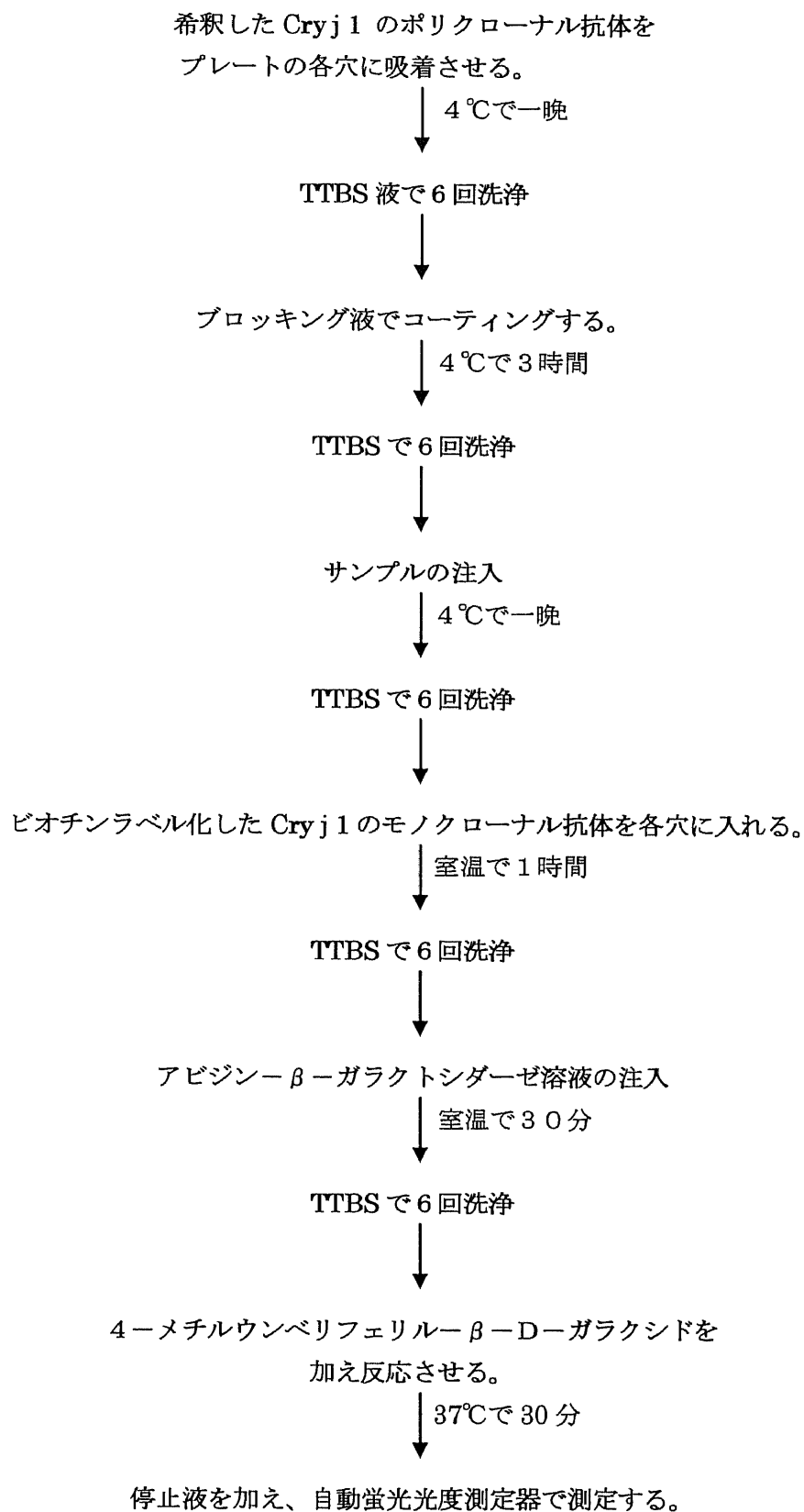


図 6-2 蛍光サンドイッチ ELISA 法の手順

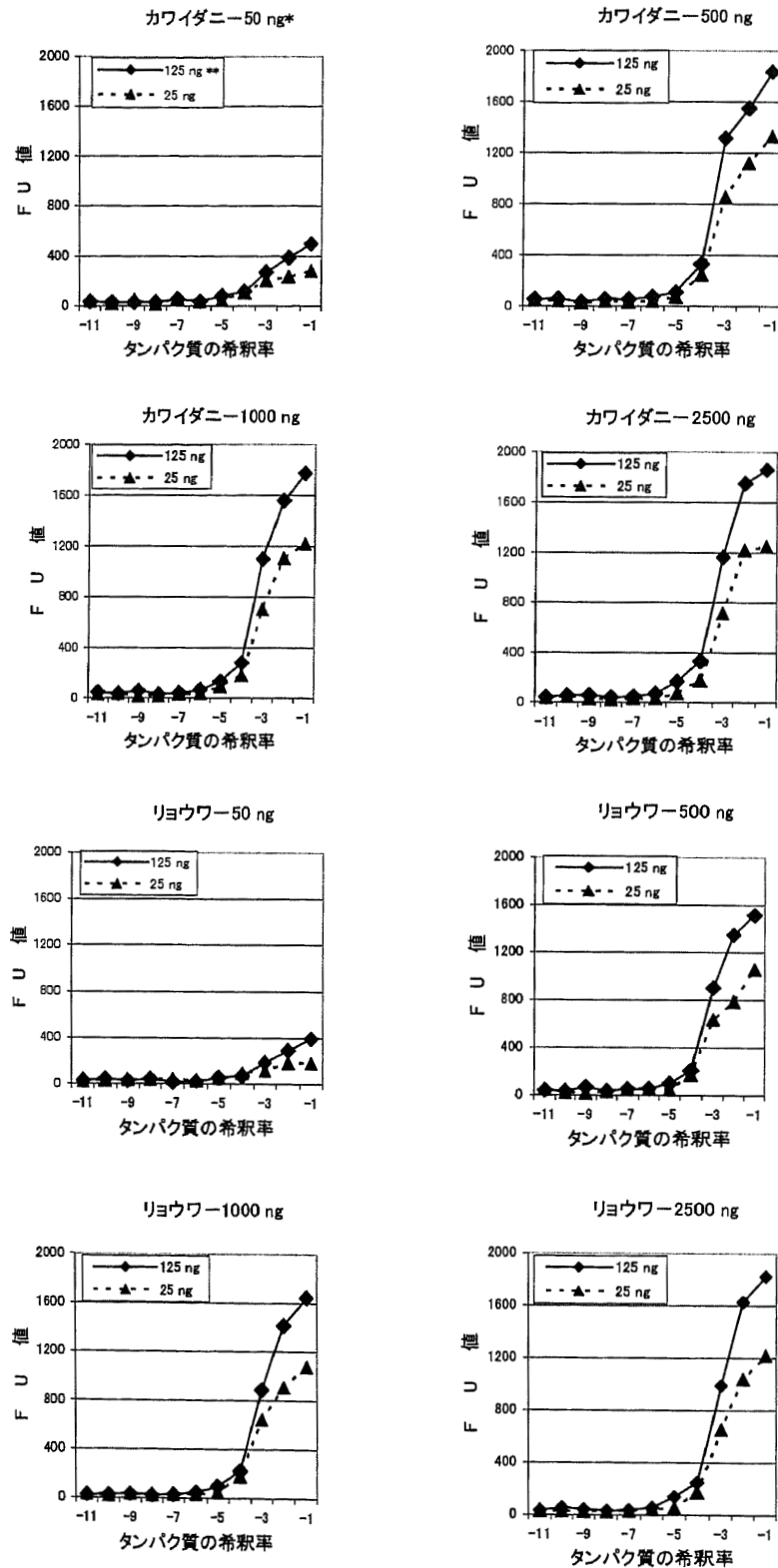


図 6-3 タンパク質の濃度と固相 (ポリクローナル) およびモノクローナル抗体量との

FU 値の関係 (\*固相抗体の量, \*\*ビオチン化抗体の量)

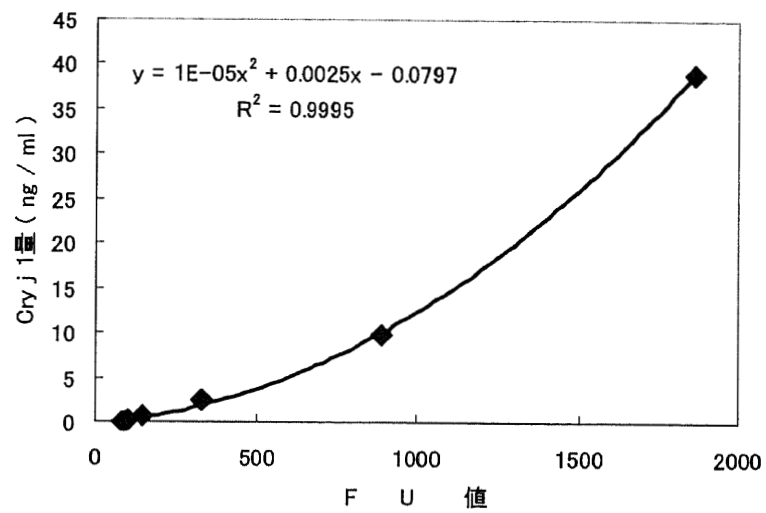


図 6-4 Cry j 1 量と FU 値の関係



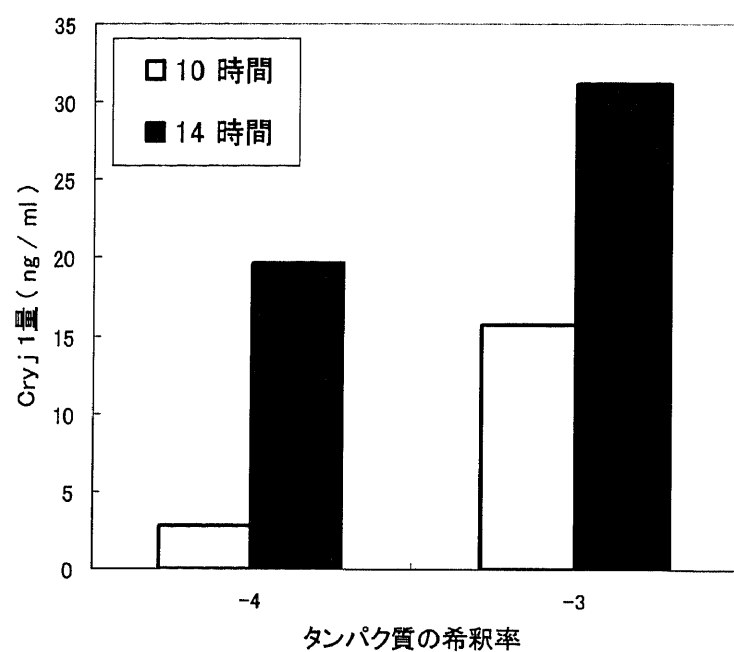


図 6-5 振とう時間の違いによる抽出された Cry j 1 量の差

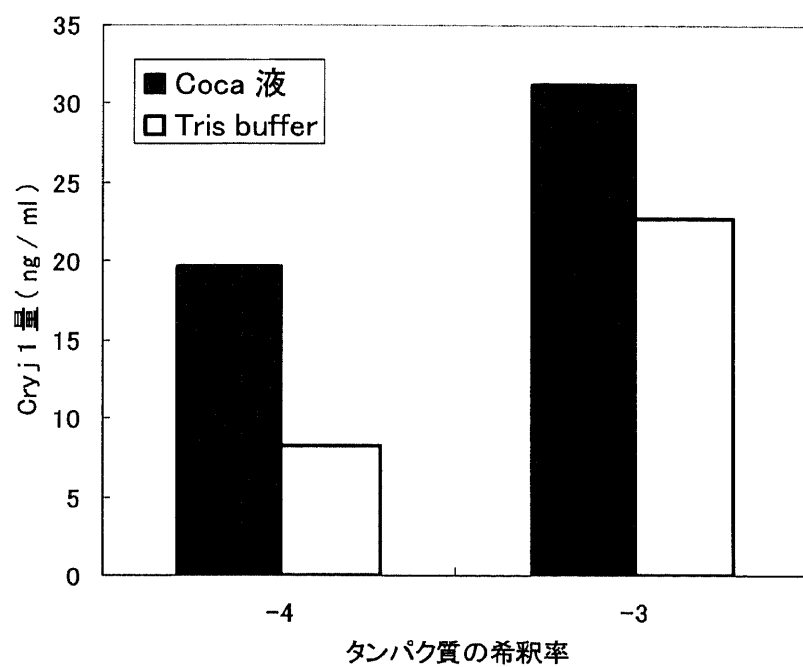


図 6-6 抽出バッファの違いによる Cry j 1 量の差

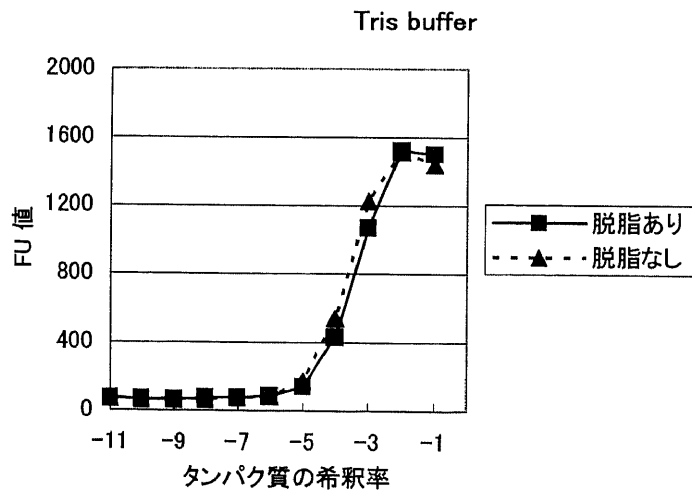
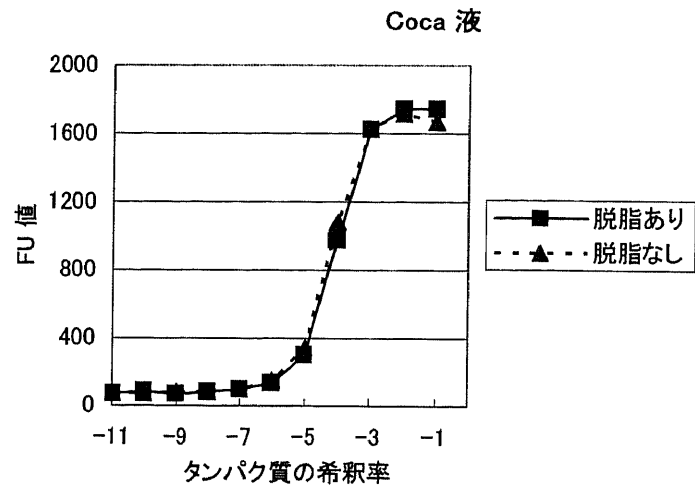


図 6-7 2 種類のバッファーを用いて抽出した花粉タンパク質の脱脂効果

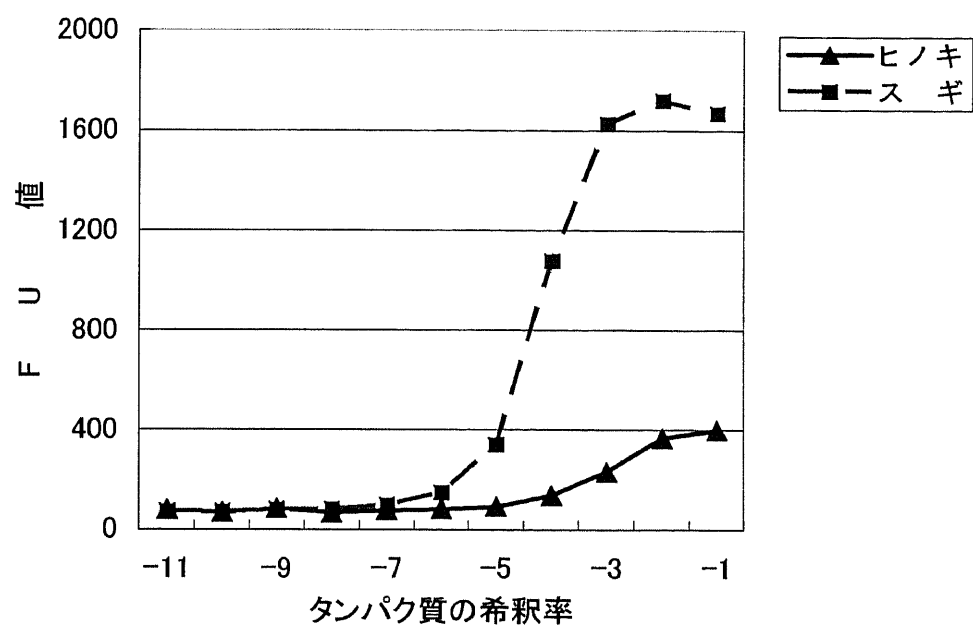


図 6-8 Cry j 1 モノクローナル抗体とヒノキ花粉タンパク質との交差反応性

## 第 7 章 Cry j 1 の発現に関する基礎的研究

### 第1節 はじめに

これまでの免疫化学的な調査から、Cry j 1 の大部分は花粉の最表層を構成する花粉壁外層 (sexine) およびその表面に付着している微粒子のオービクルスに存在し (Miki-Hiroshige *et al.* 1994)、その分子量は 40,000 前後で (Yasueda *et al.* 1983)、ヒノキと交差反応性があること (Panzani *et al.* 1986)、(斎藤・寺西 1999) などが明らかにされているが、実用化に向けて花粉アレルゲンの少ないスギを選抜するためには Cry j 1 の発現特性に関してさらなる基礎的な調査が必要となる。

そこで、林木育種的な面から Cry j 1 量に関する基礎的データを得ることを目的として、ラメート間やクローン間での Cry j 1 量の比較調査を行った。また、スギの着花促進で一般的に利用されるジベレリン (GA<sub>3</sub>) 処理や生育環境の違いが Cry j 1 の発現量に及ぼす影響、Cry j 1 の構造的な変異の有無についても調査を行った。

### 第2節 材料および方法

#### (1) 品種間および同一品種内の花粉1個あたりの重さと Cry j 1 含量の変異

1999 年に富山県林業試験場の構内に植栽されている 2 品種のスギ (ミオスギ、マスマスギ)、それぞれ 8 個体から花粉を採取し、シリカゲルを用いて乾燥させた。これらの花粉 0.1 g を 10ml の水道水の中に入れ vortex をかけた後、そこから 1  $\mu$ l とり、さらに 10 倍に希釈して血球計算盤 (フォックスローゼンタール盤) を用いて、その数を数えた (図 7-1)。この数値から逆算して花粉 1 個あたりの重さを算出した。次に、0.1 g の花粉を 10 ml の抽出 Buffer (Coca 液) の中に入れ、Cry j 1 の抽出および定量を第 6 章で記した蛍光サンドイッチ ELISA 法で行った。ここで得られた結果から、花粉一個あたりの Cry j 1 量を換算し求めた。



## (2) クローン間における花粉1個あたりの重さと Cry j 1 量の変異

1999 年に富山県林業試験場の構内に植栽してある富山県の精英樹や雪害抵抗性候補木、117 クローンから花粉を採取し同様の方法で花粉1個あたりの重さと Cry j 1 含量を求めた。

## (3) ジベレリン処理による Cry j 1 量への影響

富山県林業技術センターの構内に植栽されているボカスギを材料に用い、ジベレリン処理をした個体と無処理の個体から 1999 年に花粉を採取し、同様の方法で花粉1個あたりの Cry j 1 含量を求めた。

## (4) 標高の違いによる Cry j 1 量の差異

1999 年に標高 9m(富山県富山市百塚)と 240m(富山県中新川郡立山町吉峰)に植栽されているボカスギ(さし木品種)、それぞれ 4 個体から花粉を採取し、花粉1個あたりの Cry j 1 含量を求めた。また、標高 9m(富山県富山市百塚)と 240m(富山県中新川郡立山町吉峰)、720m(富山県中新川郡立山町芦峯寺字前谷)に植栽されているタテヤマスギ(実生品種)の集団、それぞれ 19 個体、22 個体、24 個体の花粉1個あたりの Cry j 1 含量を求めた後、標高間で比較調査した。

## (5) Cry j 1 の構造的変異に関する調査

ウェスタンブロッティング法によって Cry j 1 の構造的変異の有無について調査した。1999 年に富山県の精英樹や雪害抵抗性候補木 103 クローンの花粉を材料に用い、同様の方法で抽出したスギ花粉抽出物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写させた。次に、5 %のスキムミルク溶液でニトロセルロース膜をブロッキング

グした後、抗 Cry j 1 IgG(コスモバイオ社)と反応させた。TTBS 溶液で洗浄した後、抗 rabbit IgG AP(Dakopatts 社)と反応させ、再び TTBS 溶液で洗浄した後、アルカリフォスファターゼ基質キット(フナコシ社)でバンドを検出し、位置確認を行った。

### 第3節 結 果

#### (1) 品種間およびラメート間での花粉1個あたりの重さと Cry j 1 含量の変異

ミオスギとマシヤマスギ、それぞれ8個体の花粉1個あたりの重さを調査した結果、同じ品種内(ラメート間)では差がなかったものの、品種間ではミオスギ(平均 10.09ng)とマシヤマスギ(平均 8.59ng)の間に約 1.2 倍の差があり、有意差( $p<0.01$ )が認められた(図 7-2)。この結果をもとに花粉1個あたりの Cry j 1 量を求めた結果、ミオスギとマシヤマスギの間では約 1.8 倍の差があり有意差( $p<0.001$ )が認められたが、ラメート間ではほとんど差が認められなかった(図 7-3)。

#### (2) クローン間における花粉1個あたりの重さと Cry j 1 量の変異

花粉1個あたりの重さについて調査した結果、最も軽いクローンと重いクローンの間では約 1.9 倍の差があったが、117 クローン中 72 クローンが 10~11ng の間にあり全体の約 92% が 8~11ng の間にあったことから、花粉1個あたりの重さの変異は小さいことが明らかになった(図 7-4a)。この結果をもとに花粉1個あたりの Cry j 1 量を算出した結果、最も多いクローン(7.54pg/個)と少ないクローン(0.26pg/個)では 29 倍の差があり、3~5 pg/個を中心に正規分布することが明らかになった(図 7-4b)。

#### (3) ジベレリン処理による Cry j 1 量の影響

ジベレリン処理をしたボカスギの Cry j 1 量は  $1.97 \pm 0.21$ (pg/個)であり、無処理のそれは  $1.95 \pm 0.13$ (pg/個)であった。両者の間で有意な差は認められなかった。

#### (4) 標高の違いが Cry j 1 量に及ぼす影響

標高 240m と標高 9m に植栽されているボカスギの Cry j 1 量を比較した結果、標高 9m では 3.93 (pg/個)、標高 240m では 1.92 (pg/個) となり、同一クローンにもかかわらず標高 9m のボカスギの方が有意 ( $p < 0.01$ ) に多いという結果になった (図 7-5)。また、タテヤマスギの実生集団でも標高 9m で 4.91 (pg/個)、標高 240m で 4.69 (pg/個)、標高 720m で 3.89 (pg/個) となり、標高が高くなるにつれて Cryj1 量は減少する傾向が認められ、5%水準で有意な差が認められた (図 7-6)。

#### (5) Cry j 1 の構造的変異

ウェスタンブロッティング法によって Cry j 1 の構造的変異の有無について調査した結果、103 クローン中 94 クローンが過去の報告 (安枝 2000) 通り、約 40kDa のところに 2 本のバンドが検出されたが、9 クローンでは約 34kDa のところにもバンドが検出された (図 7-7)。次に、この 34kDa のバンドを保有したクローンと保有していないクローンで Cry j 1 量の比較を行ったが、両者 (バンドあり  $-3.68 \pm 1.65$  pg/個、バンド無し  $-3.64 \pm 1.45$  pg/個) の間で有意な差は認められなかった。

### 第4節 考 察

スギ花粉症対策の一環として Cry j 1 量の少ないスギを選抜するためには、クローン間での比較を行わなければならないが、その場合、いくつかの基礎的な調査が必要になる。最初に、比較調査の出発点をどこにするのが重要になる。これまでのクローン間によるアレルゲン量の変異は花粉 1g あたりの Cry j 1 量について報告 (佐々木ら 1996), (Kondo *et al.* 1997), (後藤ら 1999) されているが、この場合はクローン間による花粉 1 個あたりの重さの違いを考慮していない。今回の調査結果で、花粉 1 個あたりの重さの変

異は小さいもののクローン間によって異なることが明らかになり、最も重いクローンと軽いクローンでは約 1.9 倍の差があった。3 倍体や異数体のような染色体数に異常が認められる個体では花粉母細胞の減数分裂時に染色体の不均等な分配が生じるため、花粉の大きさや形態が異常になることが報告されている(染郷・菊池 1980), (二宮ら 1986)。スギの精英樹でも 3 倍体が数多く見つかったことから(染郷 1982), (佐々木・黒木 1982), (近藤 1986), (朱長・岡崎 1989)、クローン間でアレルゲン量の比較を行う場合は花粉1個あたりの重さを本手法によって算出し、それをもとに Cry j 1 の定量を行う方がより精度が高くなると判断された。ただ、調査する全てのクローンについて花粉1個あたりの重さを算出するには多大な労力を必要とするため、最初に重量あたりの Cry j 1 量を測定してスクリーニングした後、本手法によって花粉一個あたりの Cry j 1 量を算出し、低花粉アレルゲン(Cry j 1)性のクローンを選抜した方が効率的であると考えられる。

次に、外部環境が Cry j 1 の発現量に及ぼす影響について調査する必要がある。スギはクローン間によって雄花の着花性が著しく異なり(橋詰 1990), (増田ら 1993), (千田・近藤 1998)、さらに豊作年と凶作年の差も非常に大きいことから(藤崎 1988), (信太ら 1998)、スギの採種園では安定的に種子生産を行うためジベレリン(GA<sub>3</sub>)による着花促進が一般的に行われている。ジベレリンは生育促進や花芽分化に関与する植物ホルモンの一種であり、スギの場合、6 月下旬から 7 月下旬にかけてジベレリン水溶液を葉面散布するかジベレリン顆粒を幹や枝に埋め込むことによって着花促進される。本章の結果から、ジベレリンは Cry j 1 量に影響を与えないことが明らかになり、Goto *et al.* (2003)も同様に報告をしている。このことから、ジベレリンによる着花促進技術を利用することによって自然着花量の少ないクローンや凶作年でも花粉のサンプル採取が可能となり、効率的に Cry j 1 量の少ないクローンの選抜を行うことができると考えられた。

今回の調査でボカスギ、タテヤマスギともに標高が高くなるにつれて Cry j 1 量は減少する傾向が認められ、その量は環境の影響を受けることが明らかになった。スギは 6 月下

旬から 9 月下旬にかけて新芽を成長させながら花芽を分化させ、12 月までにはそのほとんどが成熟花粉になる(橋詰 1962)。Cry j 1 は葯のタペータムと成熟花粉の外壁およびオービクルスに存在するので、タペータム由来であると考えられており(Miki-Hiroshige *et al.* 1994)、その量は花粉が成熟した後の 12 月から 3 月にかけて急増することが報告されている(Takahashi *et al.* 1989)。このことから、12 月から 3 月までの気象条件に着目し国土交通省の気候値メッシュファイルから調査した 3 カ所(標高 9m, 240m, 720m)の月別の平均気温、降水量、日照時間を算出してみると、平均気温のみで顕著な差が認められた(表 7-1)。アレルゲン量と気象条件の関係については、Goto *et al.* (2004)が精英樹 8 クロンの Cry j 1 量を関東圏内 4 カ所で測定し気象条件との関係について調査した結果、Cry j 1 量と 9 月の降水量の間に負の相関があったと報告した。Ahlholm *et al.* (1998)はカバノキ属花粉症のアレルゲンである Bet V 1 は標高の異なる植栽地間で有意な差があることを明らかにし、気温差が Bet V 1 量に影響を及ぼしていると考えた。前述したように、Cry j 1 は主に 12 月から 3 月までの成熟期に発現することを考慮すると、この時期の気象条件の影響を受けると考えるのが妥当であり、今回の結果を見る限りでは Ahlholm *et al.* (1998)の考察と同様に、Cry j 1 の発現量は 12 月以降の気温の影響を受けていると考えられた。ただ、Cry j 1 の発現には土壌条件や局所的な日射量による影響など他の要因が関係していることも十分考えられるため、今後は人工気象器などを用いて詳細な発現特性を把握する必要があるだろう。また、ほぼ同一の生育環境であればラメート間で Cry j 1 量の変異はほとんどなかったことから、クローン間で Cry j 1 量の比較調査を行う場合には、採種園や採穂園などのようなほぼ同一環境のクローン集積所から花粉を採取し調査するのが望ましく、このような場所から選抜された低花粉アレルゲン(Cry j 1)性のクローンは遺伝的にその発現量が少ない特性を保有していると期待される。

富山県で選抜されたスギのクローンについて Cry j 1 の構造を調査した結果、クローン間で変異があり、34kDa のバンドを保有したクローン(変異体)と保有していないクローン



(正常)の2つのタイプに分けられることが明らかになった。Cry j 1 の構造については、Sone *et al.* (1994)によってcDNA のクローニングが行われており、その翻訳領域は1,122bp で成熟タンパク質の総分子量は38,500 であることや N-グリコシル基部位の170番目と333番目のアスパラギンにフルコースとキシロースが結合した糖タンパク質であることが明らかにされている(Hino *et al.* 1995)。これまでに Cry j 1 のcDNA の塩基置換(Wang *et al.* 1998)やアミノ酸レベルでの変異(後藤 2005)は報告されているものの、今回のような大きな構造的変異は報告例がない。34kDa のバンドを保有したクローン(変異体)と保有していないクローン(正常)の間で Cry j 1 量に差は認められなかったことから、本実験で使用した抗体のエピトープには変異が起こっていないと考えられる。Cry j 1 は multi gene であり、ゲノムあたり5~8 コピー存在すると推定されているため(Wang *et al.* 1998)、34kDa のバンドを保有したクローンのゲノムには正常な Cry j 1 遺伝子と変異を起こしたそれが混在していると予想される。富山県の場合、約34 kDaのバンドを保有する変異体のクローン頻度は約9%の割合であったが、全国レベルで地理的な傾向があるのか興味をもたれる。

本章の調査結果から、富山県で選抜された117 クローンの花粉1個あたりの Cry j 1 量の変異は非常に大きく、最も多いクローンと少ないクローンとでは29 倍の差があることが明らかになった。これらのクローンは富山県林業試験場構内の採穂園および採種園内に植栽してあり生育環境がほぼ同一であることから、その差は遺伝的な特性によるものであり、Cry j 1 量の少ないクローンを複数選抜することは可能であることが示唆された。

表7-1 標高別調査地における気象データ

平均気温					
標 高	12月	1月	2月	3月	平 均
9m	5.3	2.4	2.6	5.7	4.0
240m	3.2	0.4	0.4	3.5	1.9
720m	1.1	-1.7	-1.6	1.6	-0.2
降水量					
標 高	12月	1月	2月	3月	平 均
9m	245.5	257.4	175.3	143.2	205.4
240m	225.2	239.4	195.4	174.2	208.6
720m	219.9	210.9	192.4	181.1	201.1
日照時間					
標 高	12月	1月	2月	3月	平 均
9m	75	63.8	80.4	129.6	87.2
240m	75.7	65	80.6	120.3	85.4
720m	74.4	69.4	82.2	118.7	86.2

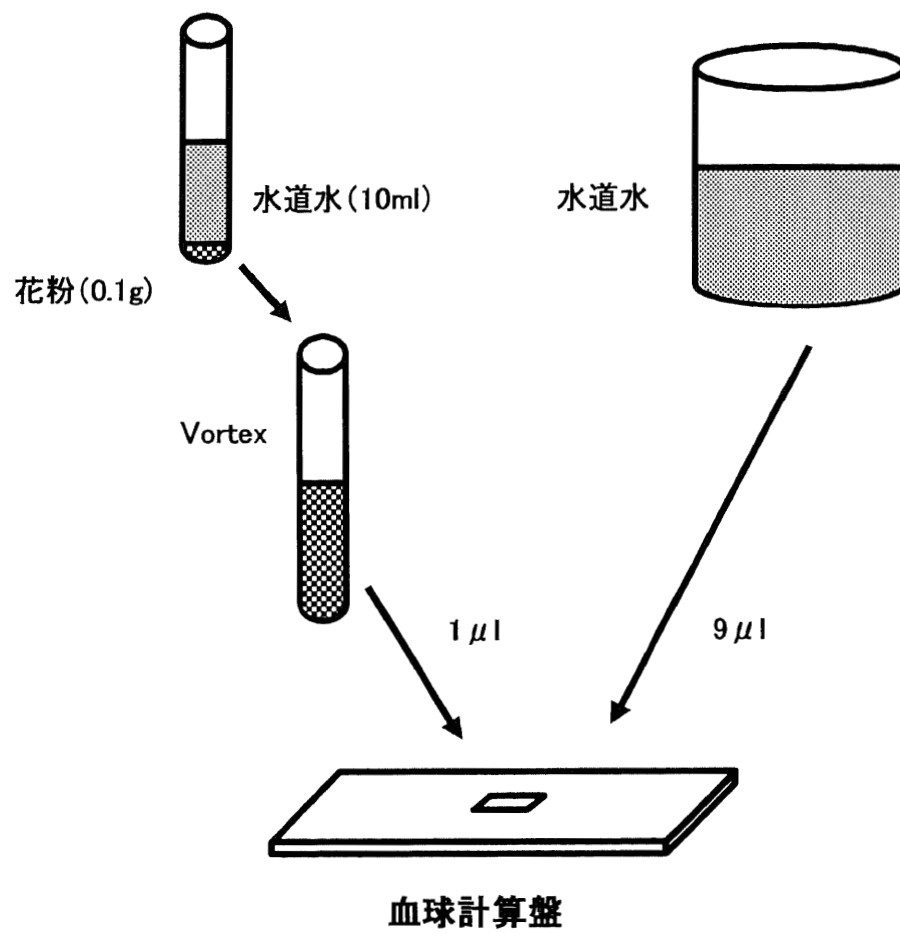


図 7-1 血球計算盤を用いた花粉一個あたりの重さの算出方法

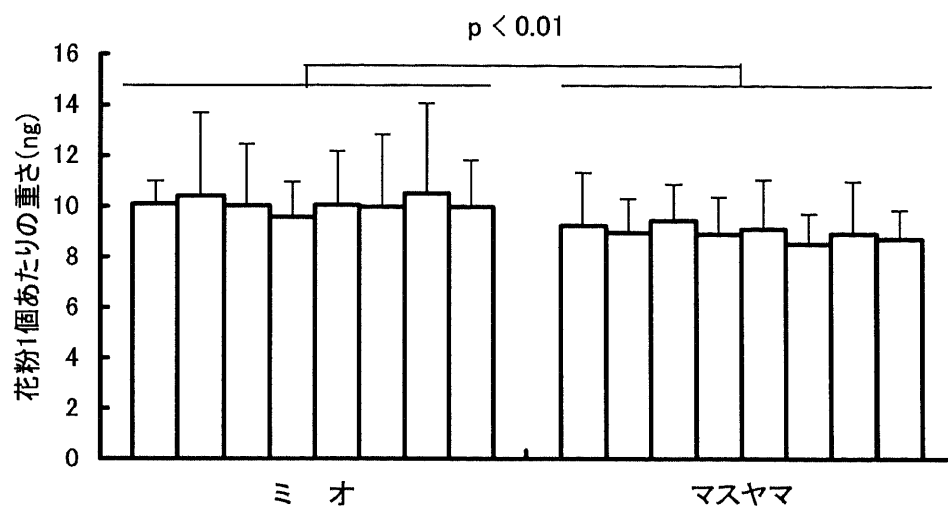


図 7-2 品種間およびラメート間での花粉一個あたりの重さの比較

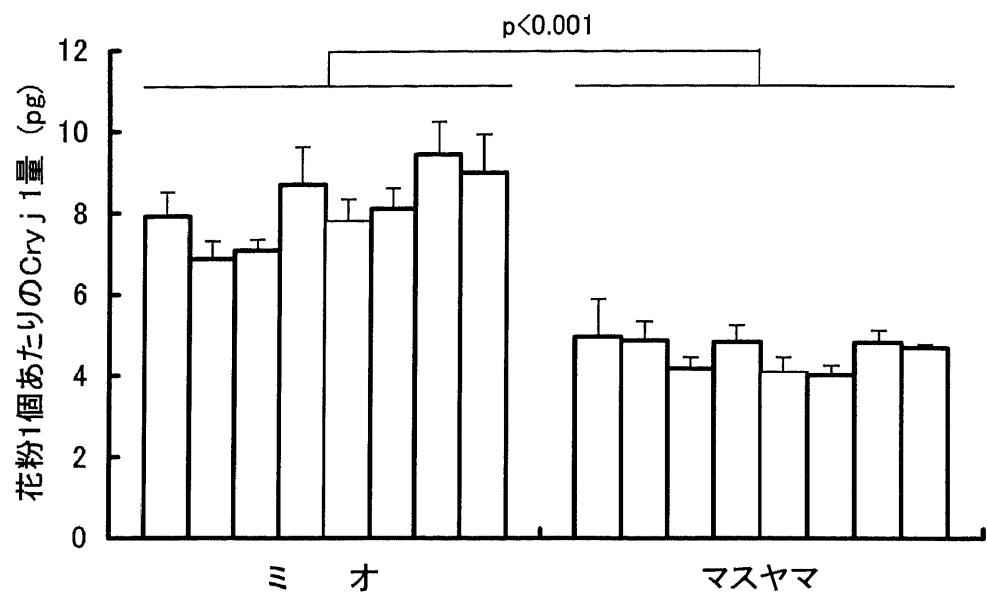


図 7-3 品種間およびラメート間での花粉一個あたりの Cry j 1 量の比較

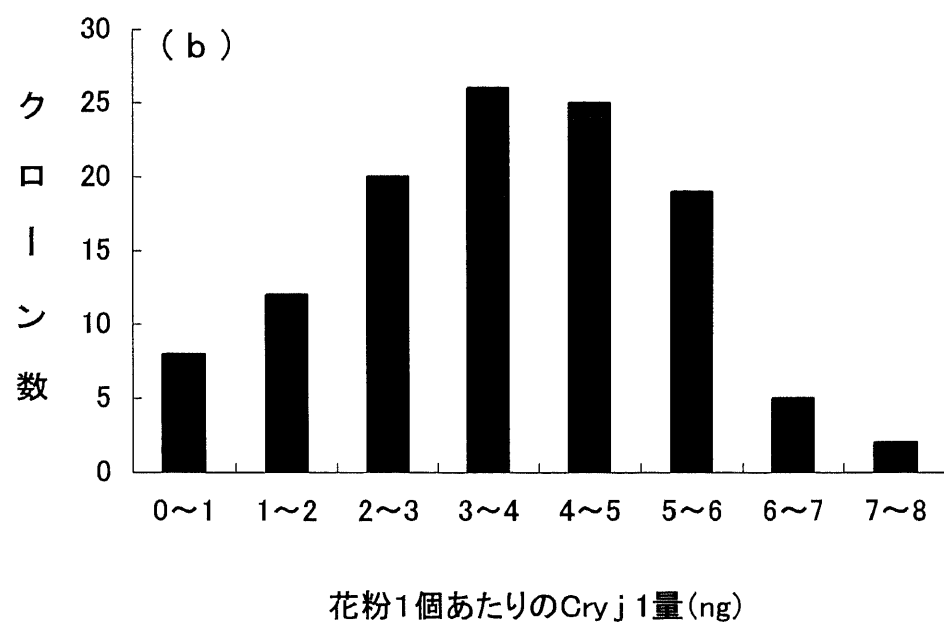
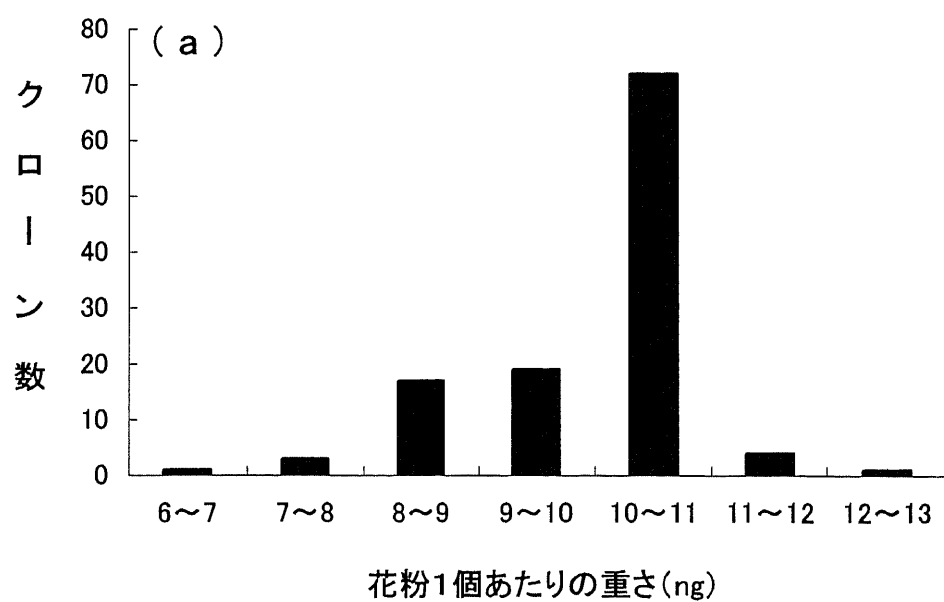


図 7-4 クローン間における花粉一個あたりの重さ(a)と Cry j 1 量(b) の比較



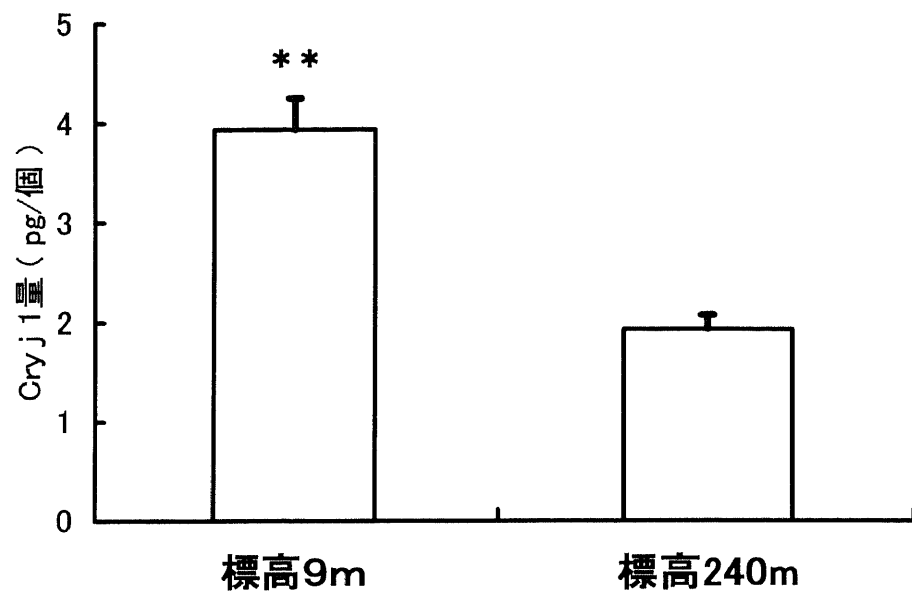


図 7-5 標高の違いによるボカスギの Cry j 1 量の比較

(\*\* は 1%水準で有意)

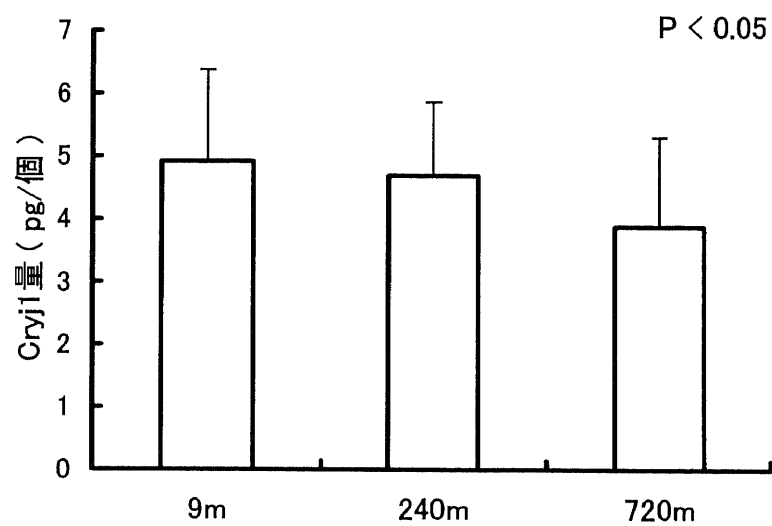


図 7-6 標高の違いによるタテヤマスギの Cryj 1 量の比較

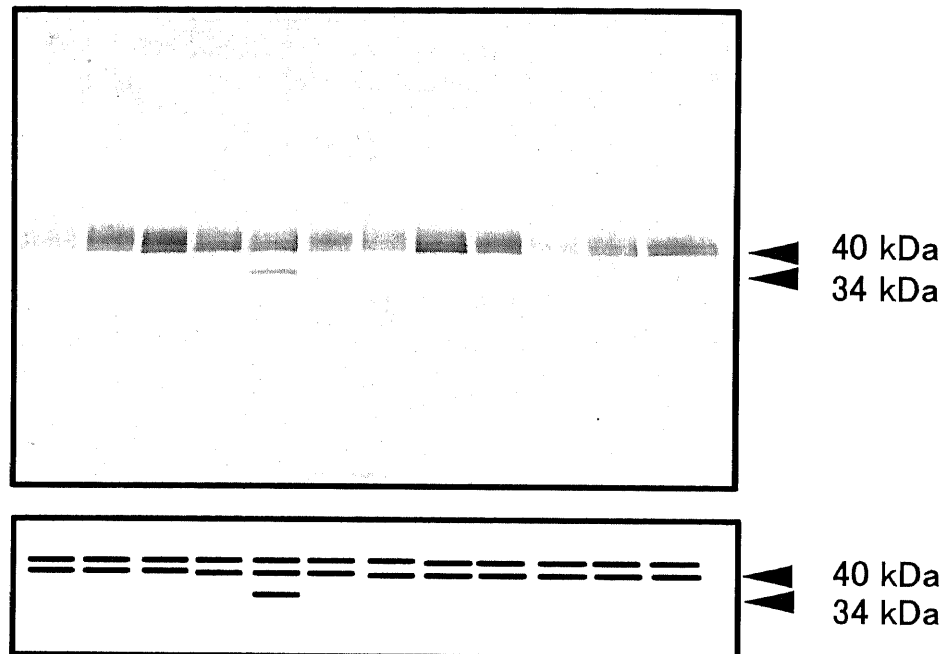


図 7-7 遺伝的変異を保有した Cry j 1 のバンドパターン

## 第8章 全国25道県におけるCry j 1量の変異と遺伝率の推定

### 第1節 はじめに

第6章と第7章で示したように、Cry j 1量が品種間やクローン間で大きく異なるということは、その量の軽減に向けた選抜育種が可能であることを示唆している。林木育種的な面からの花粉症対策としてCry j 1量の少ないスギ苗の安定生産や新しい品種を開発するためには、スギ全体でCry j 1量がどの程度の変異を持っているか把握し、さらにその遺伝率等の情報が必要になる。遺伝率は表現型によって選抜した効果がどれくらい後代に反映されるかを示す指標になり、選抜効果(遺伝獲得量)は遺伝率と選抜差の積で示されることから、高い選抜効果を得るためには遺伝率も高い値でなければならない。遺伝率の推定には、植栽地の異なる複数のクローン間の変異から分散分析によって求める広義の遺伝率と血縁関係の明らかな交配家系から親子回帰によって求める狭義の遺伝率の二つ方法が用いられており、選抜育種において重要なのは狭義の遺伝率である。そこで、本章では北海道から九州までの全国25道県のスギ精英樹から花粉を収集し、Cry j 1量が全体でどの程度の変異を持っているのかについて調査した後、母親を共通とする交配家系を利用してCry j 1の狭義遺伝率を推定した。また、Cry j 1は花粉の細胞壁にあるペクチン質を分解するペクテートリアーゼ活性を持ち(Taniguchi *et al.* 1995)、花粉の発芽や花粉管の伸長に関係していることが示唆されたため(Wang *et al.* 1998)、Cry j 1量が花粉の発芽能力や種子の発芽率に影響を及ぼすことも考えられる。このことから、母親を共通とする交配家系を用いてCry j 1量が種子の発芽率に及ぼす影響についても調査した。

スギ花粉症の有症率は、関東・東海地域では高く、東北・北陸地域では低い傾向が認められ、地域間で差があることが報告されている(井上 1991), (中村ら 1999)。これまでにそれぞれの地域で飛散している花粉数と花粉症有症率との関係については、いくつ

か報告があるものの(岸川 1997), (岸川 1998)、花粉に含まれるアレルゲン量まで考慮した報告はみあたらない。植栽されているスギ品種は地域によって異なることから、飛散している花粉中の Cry j 1 量はそれぞれの地域によって異なることも考えられる。そこで、スギ花粉症有症率の高さの違いをもとに全国を①北海道・東北, ②関東・東海, ③北陸, ④関西以南 の4つのブロックに分け、そのブロック間で Cry j 1 量の比較、検討も行った。

## 第2節 材料および方法

### (1) 花粉の収集および保存

1999 年から 2002 年にかけて全国 24 道県の研究機関から 278 クローンの精英樹の花粉を富山県林業試験場に郵送してもらい、4℃で保存した(表 8-1)。富山県の精英樹及び雪害抵抗性候補木の花粉は、1998 年と 1999 年に富山県林業試験場の構内にある採種園と採穂園から 142 クローン採取して、4℃で保存した。また、2002 年に富山県内の3カ所のタテヤマスギ(地域性実生品種)の林分から約 20 個体ずつ計 65 個体の花粉を採取し、4℃で保存した。保存中は、花粉を乾燥させるためパラフィン紙で包んだシリカゲルを花粉の入っている容器の中に入れ、その色が変わらなくなるまで1週間おきにシリカゲルを交換した。

### (2) Cry j 1 量の定量

Cry j 1 の抽出および定量は、第 6 章の蛍光サンドイッチ ELISA 法に従った。スギ花粉抽出液は、10 ml の抽出液 (Coca 液)の中に 0.1g の花粉を入れ6時間振とうさせた後、3000 rpm 20 分で遠心分離を行い、上澄み液を採取した。この抽出液を、256 倍まで希釈した後、Cry j 1 のポリクローナル抗体の入っている ELISA 用 96 穴マイクロプレート(ヌンク社製)の各ウェルにそれぞれ分注した。洗浄後、ビオチンでラベルしたモノ

クローナル抗体と反応させ、さらにアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼと反応させた。その後、アビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼとの酵素反応によって生じた 4-メチルウンベリフェロンの蛍光(fluorescence unit)を自動蛍光光度測定器(ラボシステムジャパン社)で測定した。検量線は、 $12.5 \mu\text{g/ml}$  の濃度に調整されている Cry j 1 標準液(日本アレルギー学会)を  $2^{-5}$  から  $2^{-16}$  まで希釈した後、FU(fluorescence unit)値を測定し、回帰分析により求めた。この検量線をもとに、スギ花粉抽出液中の Cry j 1 濃度を算出した後、花粉1個あたりに含まれる Cry j 1 量に換算した。第7章より花粉1個あたりの重量はクローン間で大きな差がないことが明らかにされたため、その重量を  $10.7\text{ng}$ (安枝 1991)として作業の効率化を図った。また、定量は3回の平均値とした。

### (3) Cry j 1 の狭義の遺伝率の推定

Cry j 1 の狭義の遺伝率を推定するため、雄性不稔スギ(1個体)と富山県の精英樹及び雪害抵抗性候補木 11 クローンを交配し、 $F_1$  家系を作出した(表 8-2)。それぞれの  $F_1$  家系を6年間、富山県林業試験場の構内で育成させた後、各個体にジベレリン処理をして人為的に着花させ花粉を採取した。その後、同様の処理および方法によって Cry j 1 量を定量した。今回の調査で得られたそれぞれの  $F_1$  家系の平均値と花粉親の値から、 $h^2 = 2b$  ( $h^2$ : 遺伝率 b: 回帰係数)の親子回帰によって狭義の遺伝率を推定した。また、母樹に雄性不稔スギ(平ら 1993)を用いていることから、使用した  $F_1$  家系の Cry j 1 が正常であるか確認するため、ウェスタンブロッティング法(Saito and Teranishi 2002)でその分子量についても調査した。

### (4) 発芽率の調査

Cry j 1 量が花粉の発芽能力や種子の発芽率に及ぼす影響について調査するため、2001年2月下旬から3月上旬にかけて送られてきた13道県81クローンの花粉を雄



性不稔スギに交配した。同年の 10 月上旬に球果を採取して種子を精選した後、シャーレに 100 粒ずつ播種し、23℃に設定した人工気象器内で発芽率の調査を行った。その後、これら 81 クローンの Cry j 1 量と発芽率の関係について調査した。

### 第3節 結 果

#### (1) Cry j 1 量の変異

北海道から大分県までの 25 道県 420 クローンについて花粉1個あたりの Cry j 1 量を定量した結果、最小で 0.38 pg、最大で 10.23 pg と大きな変異を示し、4～5pg を中心に正規分布することが明らかになった(図 8-1)。アレルゲンフリーのクローンはなかったが、1(pg/個)以下のクローンは 420 クローン中 7 クローン発見された。

#### (2) Cry j 1 量の地域間差

中村ら(1999)の報告を基にして、スギ花粉症有症率の高さの違いから、全国を①北海道・東北(北海道・青森・秋田・岩手・山形・福島ー有症率の平均 11.6 %)、②関東・東海(茨城・栃木・千葉・埼玉・群馬・神奈川・静岡・愛知・三重ー有症率の平均 21.3 %)、③北陸(新潟・富山・石川ー有症率の平均 9.7 %)、④関西以南(滋賀・兵庫・奈良・和歌山・鳥取・徳島・大分ー有症率の平均 13.5 %)の4つの地域に分け Cry j 1 量の比較を行った結果、北海道・東北地域では、0～2 (pg/個)のクローンはなく、5～6 (pg/個)を中心に偏った分布になったが、他の地域は全て 4～5 (pg/個)を中心とした正規分布を示した(図 8-1)。これらの地域間では、北海道・東北地域が最も高く北陸地域が低いという結果になり、平均値で比較すると両者の間で約 1.2 倍の差があった(表 8-3)。また、地域間で分散分析を行ったところ、5%水準で有意な差が認められた(表 8-4)。次に、調査したスギ精英樹等の Cry j 1 量が、その地域で飛散している花粉の Cry j 1 量を反映しているのかについて調査するため、北陸地域の精英樹および雪

害抵抗性候補木 190 クローンと富山県内 3 林分から採取したタテヤマスギ 65 個体の間で Cry j 1 量を比較した結果、北陸地域の精英樹等の平均が  $4.02 \pm 1.64$ (pg/個)で、タテヤマスギの平均が  $4.46 \pm 1.41$ (pg/個)となり、両者の間で有意な差は認められなかった。このことから、調査した各地域の精英樹と人工林の間に花粉に含まれる Cryj1 量には大きな差はないと判断された。

### (3) Cry j 1 の狭義の遺伝率の推定

雄性不稔スギとの交配によって作出された  $F_1$  家系の花粉は、受精能力があって正常であり(Taira *et al.* 1999)、Cry j 1 の構造(分子量)も正常なスギと同様に約 40kDa のバンドしか見られなかったことから(図 8-2)、これらの $F_1$ 家系を Cry j 1 の遺伝率の調査に用いた。それぞれの $F_1$ 家系の平均値と花粉親の関係(親子回帰)を(図 8-3)に示した。相関係数は $r=0.83$ 、回帰係数は $b=0.55$ となり、1%水準の高い相関が認められた。この回帰係数から Cry j 1 の狭義の遺伝率を推定すると、 $h^2 = 1.0$  以上となり高い値が算出された。

### (4) Cry j 1 量と発芽率の関係

雄性不稔スギは雌花の機能が正常であることが明らかにされており(Saito *et al.* 1998)、除雄の手間も省けることから交配による発芽試験の母樹に利用した。81 クローンの Cry j 1 量とそれらの $F_1$ 種子の発芽率の間に回帰分析を行ったが、有意な相関は得られなかった。このことから、花粉に含まれる Cry j 1 量は種子の発芽に影響を及ぼしていないと判断された。

## 第4節 考 察

今回の調査で、全国の精英樹の花粉に含まれる Cry j 1 量の変異は非常に大きく、花

粉一個あたりの Cry j 1 量が 1pg に満たないクローンが全体の約 1.9% と比較的高い頻度で存在することが明らかになった。このような低アレルゲン性のスギは、花粉症対策の新たな遺伝資源として期待される。集団選抜によって目的とする形質の遺伝的な改良を行う場合、その効果が上がるかどうかは主に遺伝子の数と遺伝率によって決まる(松尾 1974)。つまり、関与している遺伝子の数が少なくて遺伝率の高い形質ではより効果的に選抜効果が現れる。今回の調査で Cry j 1 の遺伝率は計算上、100%と推定された。このことに加えて、Cry j 1 は 5~8 コピーの少数の遺伝子によって支配されていることがすでに報告されている(Wang *et al.* 1998)。これらのことから考えると、Cry j 1 量の場合、次世代における選抜効果が顕著に現れると予想される。そこで、今後のスギ花粉症に対する育種的な戦略としては、精英樹や雪害抵抗性候補木の中から Cry j 1 量の少ないクローンを選抜した後、それらを用いて新たにミニチュア採種園(Itoo and Katsuta 1986)を造成するのが有効だと考えられる。この方法を用いると年数がそれほどかからず、効率的に Cry j 1 量が少ないスギの実生苗を作出することが可能となる。ここで作られた実生集団は、花粉中のアレルゲン(Cry j 1)量が少ないことから花粉生産量の少ないスギの集団と同じ意味をなし、さらに、成長や木材生産を基盤とした特性も親木に精英樹等を利用していることから、従来の採種園産のスギと大きく変わることはないと予想される。現在、第 7 章で示した結果を基に、富山県の精英樹と雪害抵抗性候補木の中から Cry j 1 量の少ない 18 クローンを選抜し、さし木によってクローン増殖中である(表 8-5)。今後は、これらを用いてミニチュア採種園を造成し、Cry j 1 に対する選抜効果を確認する予定である。

今回の一連の調査で、Cry j 1 量の年次変動の問題が考えられる。榎本ら(2000)は、5年間にわたって同一木から花粉を採取し Cryj1量の年次変動について調べたが、最大でも 1.2 倍程度の差しかなかったことを報告しており、高橋ら(2002)も 3 年間にわたる調査で同様の報告をしている。今回の調査でもミオスギと東西原 2 号は 1999 年と 2001 年で、出羽の雪 1 号と那賀 20 号は 2000 年と 2001 年でほとんど差が認められなかった(表 8-6)。

これらのことから、本来なら同一年に採集した花粉で比較調査する方が望ましく、より正確な結果になると思われるが、今回は Cry j 1 量に大きな年次変動はないと判断されたため考慮しなかった。

スギ花粉症の有症率を都道府県別に比較すると、全体的な傾向として東北・北陸地域で低く、関東・東海地域で高いことが明らかにされている(中村ら 1999)。本章ではその有症率の高さの違いをもとに全国を4つの地域に分け、その地域間で Cry j 1 量の比較を行ったが、最も多い地域と少ない地域の間で 1.2 倍程度の差しかなく、有症率の高い関東・東海地域よりも有症率の低い北海道・東北地域の方が Cry j 1 量は多いという結果になった。このことは、それぞれの地域で植栽されているスギの品種は異なるが、飛散している花粉中の Cry j 1 量は地域間で大差はなく、花粉症の有症率に影響を及ぼすほどではないことを示唆している。次に、花粉の飛散量について比較してみると、花粉の発生源となるスギ人工林の面積は、関東・東海地域よりも東北・北陸地域の方が多いが(林野庁 2003)、実際に飛散している花粉の量は、東北・北陸地方より関東・東海地方の方が多い(佐橋 2002, 岸川 1997)。この主な理由として、次の2つが考えられる。日本海側ではスギ花粉の飛散シーズンとなる春先は雪や雨が多く花粉の飛散には悪条件になる。これに対して、太平洋側はその期間に乾燥していることが多いため花粉が飛散しやすく、さらに一度地表に落ちた花粉が風によって再び舞い上がる頻度も高い。また、体内の IgE 抗体の生産を助長するといわれている大気汚染(定永ら 1994)も都市部の多い太平洋側の方が進んでいると予想される。これらのことから総合的に考えると、地域におけるスギ花粉症有症率の差は、各地域で植栽されているスギ品種のアレルゲン(Cry j 1)量の違いよりも飛散している花粉数や住環境に大きく左右され、その飛散数はスギ人工林の面積や飛散源からの距離などよりも飛散地域における春先の気候要因に強く影響を受けていると予想された。

表8-1 調査した道県名とクローン数

道県名	クローン数
北海道	7
青森	11
秋田	4
岩手	5
山形	8
福島	28
茨城	18
栃木	17
千葉	4
埼玉	4
群馬	11
神奈川	12
静岡	18
愛知	15
三重	5
新潟	27
富山	142
石川	21
滋賀	4
兵庫	3
奈良	6
和歌山	13
鳥取	15
徳島	13
大分	9
合計	420

表8-2 交配に使用した花粉親とF<sub>1</sub>家系の個体数

花粉親のクローン名	F <sub>1</sub> 家系の個体数
小 原 1 号	30
小 原 2 号	27
小原502号	24
ミ      才	24
峠      島	22
石 動 1 号	19
山 田 1 号	18
片貝 55 号	23
キノネ 2 号	22
東西原 2 号	22
サルクラ5号	24



表8-3 各地域における花粉1個あたりのCry j 1量

道 県 名	Cry j 1量 (pg /個)の平均
北海道・東北	
北海道	4.13
青 森	5.70
秋 田	4.45
岩 手	4.06
山 形	3.83
福 島	4.89
平 均	4.71
北 陸	
新 潟	3.99
富 山	3.96
石 川	4.45
平 均	4.02
関東・東海	
茨 城	4.53
栃 木	4.56
千 葉	4.14
埼 玉	3.16
群 馬	3.11
神奈川	4.95
静 岡	4.71
愛 知	4.69
三 重	4.86
平 均	4.43
関西以南	
滋 賀	2.36
兵 庫	4.28
奈 良	4.96
和歌山	3.90
鳥 取	3.78
徳 島	4.45
大 分	4.99
平 均	4.17

表8-4 Cry j 1量の地域間差に関する分散分析表

変動要因	平方和	自由度	平均平方	F値
地域間	27.594	3	9.198	3.709*
誤差	1031.796	416	2.480	
合計	1059.3905	419		

\* 5%水準で有意

表8-5 富山県で選抜された低アレルゲン  
(Cry j 1)性のクローン

クローン名	Cry j 1量 (pg/個)
ビル谷2号	0.26
木根3号	0.43
小原15号	0.52
小原4号	0.53
ビル谷1号	0.59
木根8号	0.91
三角8号	0.99
高峯2号	1.02
東西原1号	1.47
イトシロ110号	1.52
黒部2号	1.54
小原504号	1.58
原牧6号	1.59
ビル谷6号	1.65
桐谷6号	1.72
早月21号	1.92
三角7号	1.94
ボカ	2.00
平均	1.23

表8-6 Cry j 1量の年次変動

クローン名	花粉1個あたりのCryj1量 (pg)		
	1999年	2000年	2001年
ミ オ	7.54	—	7.18
東西原2号	3.56	—	3.70
出羽の雪1号	—	4.10	4.34
那賀20号	—	4.43	4.27

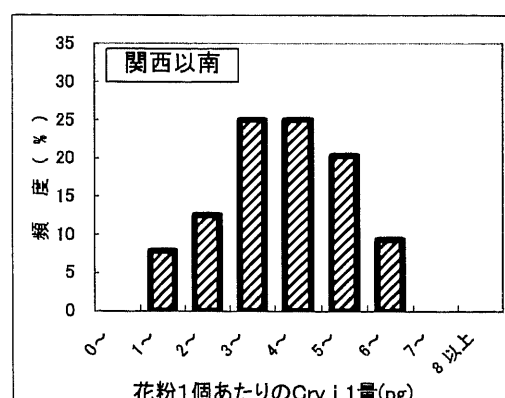
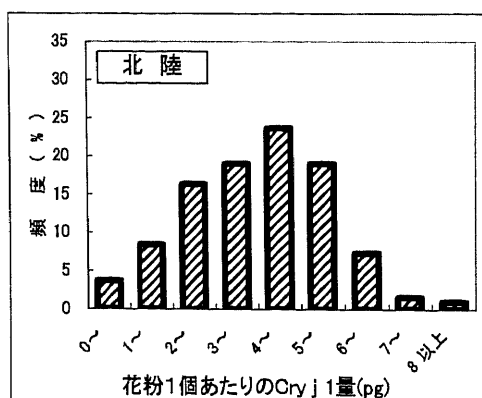
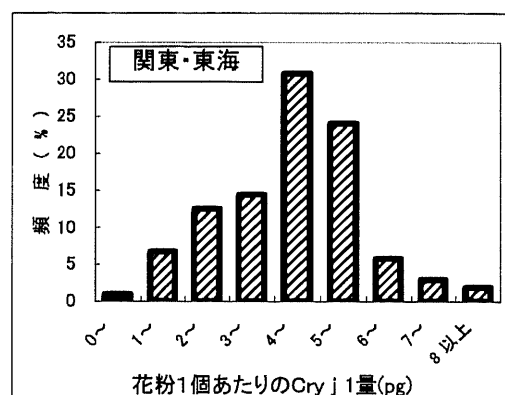
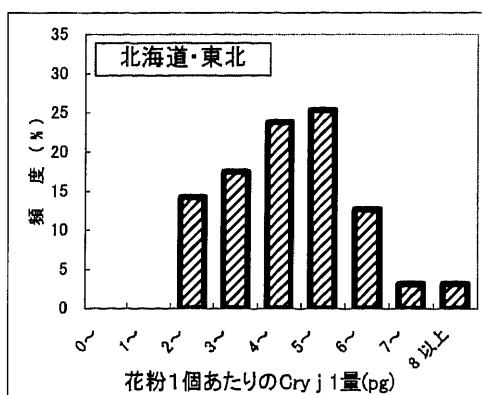
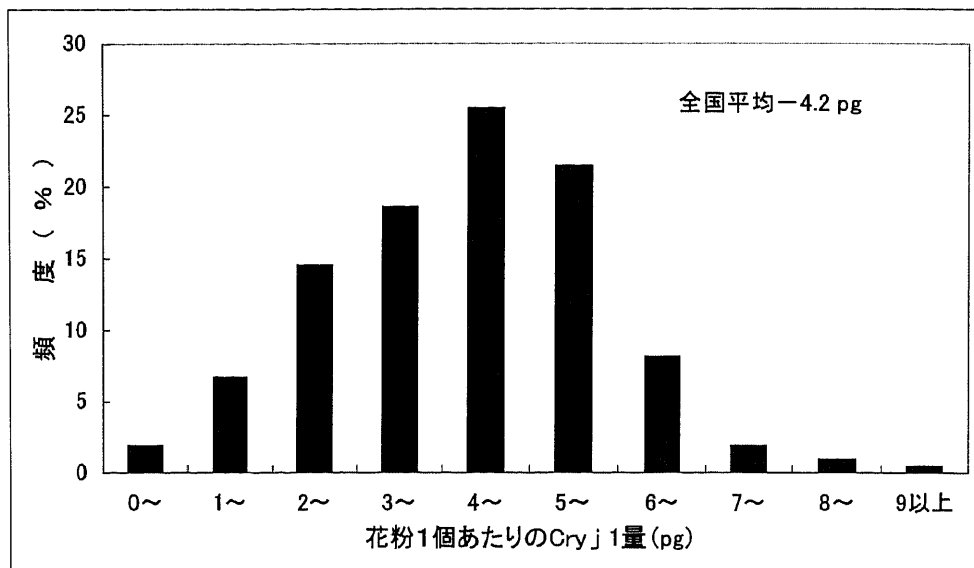


図 8-1 Cry j 1 量のクローン間変異と4つの地域(①北海道・東北、②関東・東海、③北陸、④関西以南)における Cry j 1 量 (pg / 個) の頻度分布

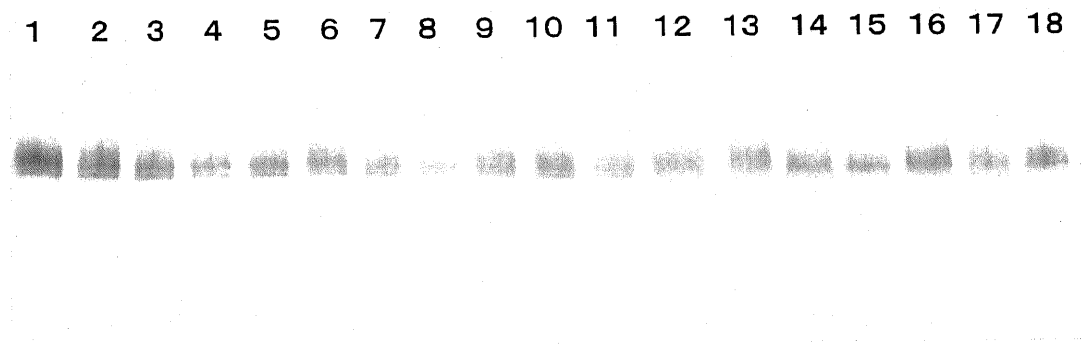


図 8-2 ウェスタンブロッティング法による Cry j 1 のバンドパターン

1. ミオ, 2-6.  $F_1$ (雄性不稔×ミオ), 7-11.  $F_1$ (雄性不稔×東西原2号),  
12. 東西原2号, 13-17.  $F_1$ (雄性不稔×石動1号), 18. 石動1号

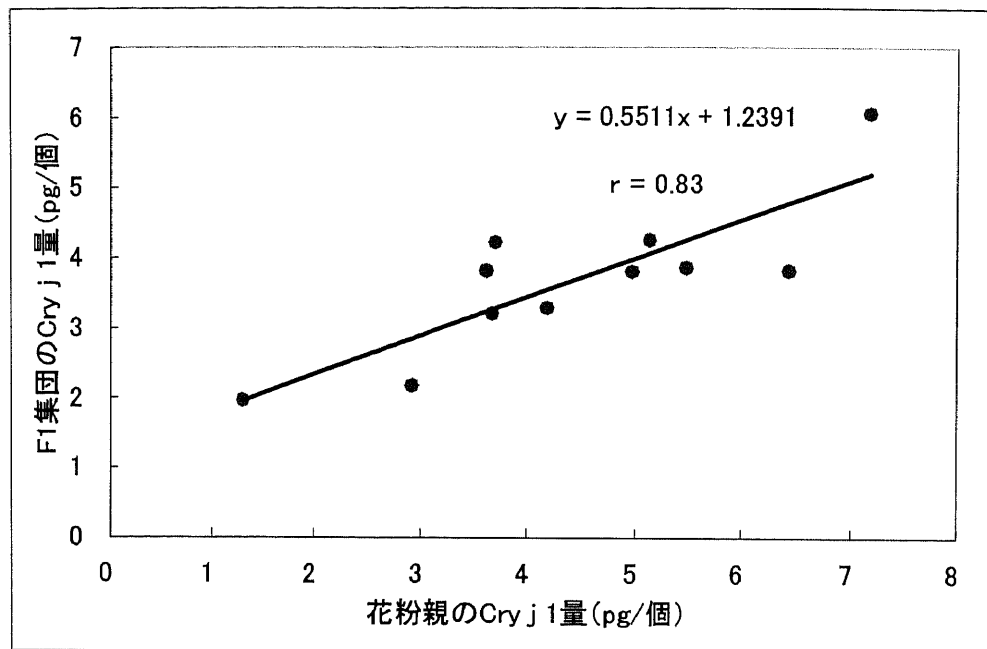


図 8-3 Cry j 1 量における花粉親と F<sub>1</sub> 家系の関係



## 第9章 野外に造成したモデルミニチュア採種園における外部花粉混入率の推定

### 第1節 はじめに

スギの苗は、現在でも全国で年間 2,400 万本程度生産されており(林野庁 2003)、この大半は精英樹クローン等で構成された採種園から生産されている。ここでは園内の個体間で任意交配が行われることによって遺伝的に優れた種子の大量生産が期待されているが、近年、スギ花粉症が大きな社会問題になっていることから、できるだけ花粉(アレルゲン)を放出しないスギ苗の生産が強く求められるようになった。第8章で記したように、今後、低花粉アレルゲン(Cry j 1)性の実生苗を効率的に生産する場合、その性質を保有した精英樹等を採種木として利用し、新たにミニチュア採種園を造成するのが有効と考えられる。ミニチュア採種園は、従来の採種園と比較して①採種木の樹高が 120cm 程度に小さく保たれており、植栽間隔も狭いことから小面積で効率的に作業を実施できる。②更新が容易であることから、最新の育種素材を採種木にすることで新品種の種子を早期に生産できる、などの利点を持っている(林木育種推進東北地区協議会技術部会 2001)。しかしながら、このような採種園を野外に造成した場合、大きな問題点として園外からの花粉混入が考えられ、目的とする形質を保持した苗の生産効率の低下が危惧される。

そこで、本章では野外に造成したミニチュア採取園の外部花粉混入率を推定するため、雄性不稔遺伝子をヘテロ型( $Aa$ )で保有したスギでモデルミニチュア採種園を造成し、雄性不稔苗の出現率( $aa$ )から外部花粉混入率を推定した。

### 第2節 材料および方法

#### (1)材 料

1993年に雄性不稔スギと3クローンの精英樹(小原101号、小原103号、砺波2号)

及び 2 クローンの雪害抵抗性候補木(小原 102 号、キノネ 1 号)を交配して  $F_1$  家系を作出した。

## (2) モデルミニチュア採種園の造成

1995 年に富山県林業試験場の構内で、5 種類の  $F_1$  家系を 2m 間隔で家系ごとに列状に植栽し(6 本植/家系)(図 9-1)、ミニチュア採種園を試験的に造成した(以下、モデルミニチュア採種園と呼ぶ)。また、1999 年 10 月に 2m の高さで断幹した(図 9-2)。

## (3) 種子の採取

2000 年 7 月にモデルミニチュア採種園内の個体に、100ppm のジベレリン水溶液を葉面散布して人工的に着花させ、2001 年の春に自然交配させた。同年の 10 月上旬にすべての個体から成熟した球果を採取した後、自然乾燥させて種子を得た。

## (4) 発芽率の調査

得られた種子を混合して 4℃ で 2 ヶ月間程保存した後、100 粒重を測定した。発芽率の調査はシャーレの中にろ紙を敷き、蒸留水で浸して種子 100 粒を置床した後、23℃ で保温して約 50 日間発芽の調査を行った。また、対照として富山県魚津採種園(以下、魚津採種園とする)産の種子を用い、反復はそれぞれ 3 回とした。

## (5) 雄性不稔苗の選抜

モデルミニチュア採種園産の自然交配苗の集団から雄性不稔個体を選抜するため、2 年生の苗 883 個体に 2003 年 7 月上旬頃、100ppm のジベレリン水溶液を葉面散布して人工的に着花させ、雄性不稔個体の選抜は第 3 章(図 3-2)と同様の方法で行った。

### 第3節 結 果

#### (1) 種子の採取

モデルミニチュア採種園内の全ての個体から球果を採取した結果、1本あたり 32.9g (全体で 987.9g) の種子を採取することができたが、これは一般的なミニチュア採種園の採種量(約 20g/本)(林木育種推進東北地区協議会技術部会 2001)よりも多かった。

#### (2) 種子の重量および発芽率

モデルミニチュア採種園産と魚津採種園産の種子で 100 粒重と発芽率について比較した結果、100 粒重は両者の間で差がなかったものの、発芽率はモデルミニチュア採種園産で  $21.2 \pm 9.2\%$ 、魚津採種園産で  $9.9 \pm 3.5\%$  となり、モデルミニチュア採種園産の方が高かった(表 9-1)。

#### (3) 雄性不稔苗の出現頻度

モデルミニチュア採種園産の苗 883 個体を育苗しジベレリン処理をした結果、866 個体が雄花を着けた。これらの苗のうち 83 個体が雄性不稔苗だった。

### 第4節 考 察

採種園は、遺伝的に優れた種子の安定生産を目的に各都道府県で設定されているが、今後の森林造成を考えると、小面積で多様なニーズに対応できるミニチュア採種園 (Ito and Katsuta 1986) が有効であると思われる。特に、近年スギ花粉症が社会問題になっていることから、低花粉アレルゲン (Cry j 1) 性を保有したスギのミニチュア採種園は重要になると予想される。しかし、野外にそれを造成した場合、園外からの花粉混入により選抜

効果が低下するおそれがある。今回、造成したモデルミニチュア採種園の採種木は雄性不稔遺伝子をヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有しているため、園外からの花粉流入の影響がなければ、ヘテロ型個体相互の交配 ( $Aa \times Aa$ ) となり、得られた苗木集団のうち約 25% の個体が雄性不稔ということとなる。つまり、今回調査した集団が二項分布に従う変量であることを考慮すると、866 個体中 217 ( $216.5 \pm 12.7$ ) 相当数の個体が雄性不稔となることが期待される (秋元 1989)。しかし、雄性不稔苗は 83 個体しか得られなかった。戻し交配を行っても雄性不稔個体のみが特異的に淘汰されることはなかったことから (Taira *et al.* 1999)、近親交配の影響は低いと予想される。以上のことから判断すると、ミニチュア採種園の外部花粉混入率は約 62% となり非常に高いことが明らかになった。今回の結果と同様に、海外の針葉樹採種園でも外部花粉混入率は深刻な値になっており、アイソザイムや DNA 分析による調査結果から、ヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris*) で 51~55% (Wang *et al.* 1991)、データマツ (*Pinus taeda*) で 36% (Friedman and Adams 1985)、アメリカトガサワラ (*Pseudotsuga menziesii*) で 42~61% (Adams *et al.* 1997)、ドイツトウヒ (*Picea abies*) で 69~71% (Pakkanen *et al.* 2000) と報告されている。また、森口 (2003) は DNA マーカーを用いて 5 カ所のスギ採種園の外部花粉混入率について調査した結果、35~66% と高い値となり、これらの混入率と採種園周辺のスギ林の面積の間には有意な関係があったことを報告している。今回造成したモデルミニチュア採種園の周りには 50 年生以上の成熟したスギが多数存在していたことに加えて、そのサイズも小さかったため、外部花粉混入率が高くなったと予想される。ただ、スギの場合、花粉の飛散距離は気象条件によっては数百 km に及ぶことから (平ら 1991)、野外に造成した採種園から目的形質を保持した優良苗を効率的に生産するのは困難だと思われる。そのため、今後はガラス室やビニールハウス内に小型化した採種木を入れ、その中で任意交配を行わせるハウス内ミニチュア採種園 (大谷・大庭 1984) が有効であると考えられる。これは室内が高温多湿になるなどの問題点が指摘されているものの、この方法によれば園外からの花粉混入を確実に防ぐこ

とができるため、花粉症対策として低花粉アレルゲン性を保有したスギ苗の大量生産は可能であると考えられた。

表9-1 ミニチュア採種園と富山県魚津採種園由来の  
種子の100粒重と発芽率の比較

	100粒重(g)	発芽率(%)
ミニチュア採種園	0.20	21.2
魚津採種園	0.21	9.9



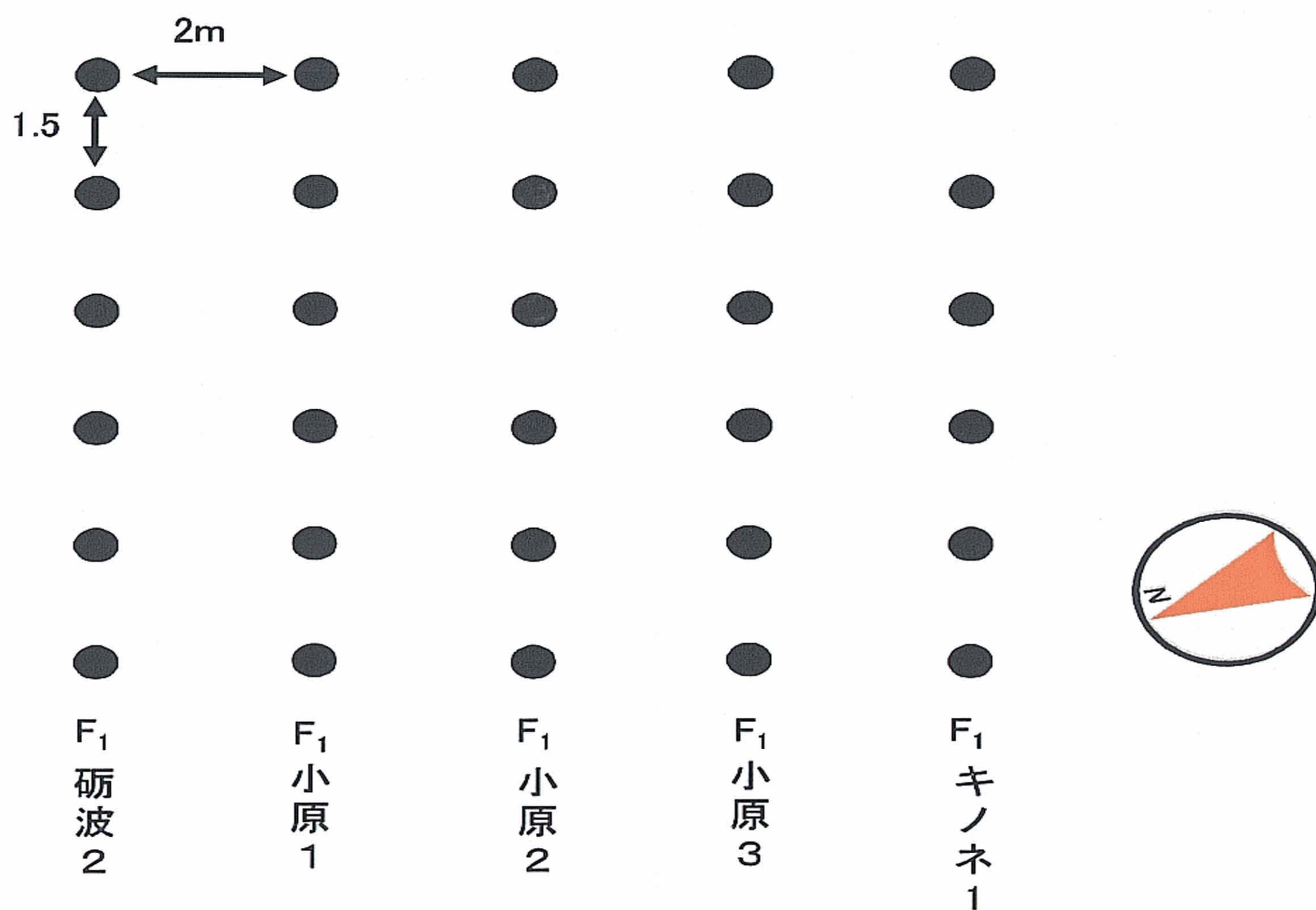


図 9-1 モデルミニチュア採種園の配置図

(注一 $F_1$  砺波 2 とは、雄性不稔スギ×砺波 2 号の  $F_1$  家系のことで他も同じ)





図 9-2 雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有した個体によって  
造成されたモデルミニチュア採種園



## 第10章 ガラス室内スギミニチュア採種園の特徴とその有効性

### 第1節 はじめに

第8章で記したような精英樹由来の低花粉アレルゲン(Cry j 1)性の実生苗を効率的に生産する場合、選抜された個体で新たにミニチュア採種園を造成するのが有効であると考えられるが、第9章で記したように野外にこのような採種園を造成した場合、大きな問題点として採種園外からの花粉混入が危惧される。高い頻度で採種園外からの花粉混入が起こると選抜効果が薄れ、生産される種子の遺伝的素質の低下に繋がる。この対策としてビニールハウスを用いたハウス内採種園が試験的に作られたが(大谷・大庭1984)、北海道や東北、北陸などのような多雪地域では雪の重さによってビニールハウスが倒壊してしまうため、この方法は利用することができない。

そこで、本章ではこれらの対策として閉鎖したガラス室内にミニチュア採種園を造成して、開花フェノロジーや種子の発芽率などについて調査した後、その有効性について検討した。

### 第2節 材料および方法

#### (1)材 料

1996年に雄性不稔スギと16クローンの精英樹および雪害抵抗性候補木を交配して作出したF<sub>1</sub>家系を用いた(表10-1)。

#### (2)ガラス室内ミニチュア採種園の造成

2000年4月に富山県林業試験場のガラス室内(図10-1)に、鉢植えにしたF<sub>1</sub>家系16家系延べ52個体(1家系あたり3~4個体)を、図10-2に示したように80cm間隔で配置し室内ミニチュア採種園を造成した。このガラス室には自動灌水の設備がある

ので一日一回自動灌水するように設定したが、2002 年1月中旬から4月中旬までは灌水をやめ、週に2回程度、鉢に水を与えるようにした。また、同年1月上旬から3月上旬までは雪の重さによるガラス室の倒壊を防ぐため、降雪日のみ手動で温水循環型の暖房を入れた。

### (3) 着花の誘導および種子の採種

2001 年7月中旬にガラス室内ミニチュア採種園内の全ての個体に 100ppm の濃度でジベレリンを噴霧して着花を誘導した。その後、花粉飛散が始まる前の1月下旬からガラス室内に扇風機2台を向かい合わせに設置することによって空気を循環させ、自然交配させた。2002 年10月上旬に着花したすべての個体から球果を採取した後、自然乾燥させて種子を得た。

### (4) 開花試験および着花量調査

ガラス室内ミニチュア採種園の開花特性を把握するため、2002 年1月20日から3月31日まで、ほぼ毎日、雄花と雌花の観察を行った。雄花は、短い棒で軽くたたき、肉眼で花粉の飛散が確認された日を開花とした。雌花は、肉眼で珠孔液が確認された日を開花とした。また、着生している雄花の量を把握するため、目視によって以下のように4段階で評価し系統間で比較を行った。(0)なしー雄花が観察されない、(1)少ー疎らに着花、(2)中ー個体の上部に多くの雄花が着生、(3)多ーほぼ全面に多くの雄花が着生。

### (5) 野外の空中スギ花粉調査

野外のスギ花粉飛散状況について把握するため、富山県林業試験場の構内に Durham の標準花粉検索器を設置した。ワセリンを塗布したスライドガラスは、2002 年1

月 30 日から 4 月 27 日まで原則として毎朝 9 時に交換した。花粉の染色はグリセリンゼリー(菅谷 1973)で行い、1cm<sup>2</sup>あたりの花粉数を顕微鏡下でカウントした。

#### (6) 発芽率の調査

ガラス室内ミニチュア採種園由来の種子の発芽特性について把握するため、得られた種子を 4℃で 2 ヶ月間程保存した後、シャーレの中にろ紙を敷き、蒸留水で浸して種子 100 粒を置床した。その後、23℃に設定した人工気象器内で、約 50 日間発芽を調査した。また、対照として富山県魚津採種園産の自然交配種子を用い、同様の調査を行った。

#### (7) 気温の調査

ガラス室内ミニチュア採種園内と外の気温差について調査するため、2003 年 1 月 7 日から 4 月 20 日までデータロガー (HOBO 社)を用いて 1 時間間隔でそれぞれの気温を測定した。

### 第3節 結果

#### (1) 採種個体の着花および着花量

ジベレリン処理をした結果、52 個体中 47 個体に雄花が着生し、雌花は 46 個体に着生した。系統間での雄花の着花量には偏りがあり、最も多い家系と少ない家系の着花指数は 9 倍の差があった(表 10-2)。また、F<sub>1</sub>ミオ4号の系統は、全ての個体(4 個体)で雌花を着生しなかった。

#### (2) 開花フェノロジー

ガラス室内では、2002 年 2 月 4 日から雄花の開花が認められ、2 月 17 日には 80%

の個体が開花した(図 10-3A)。その後、約 1 ヶ月間(3 月 13 日まで)は 80%以上の個体が開花していた。開花した個体数は 3 月 15 日から徐々に減り始め、3 月 27 日に花粉の飛散は終了した。雌花は 2 月 5 日から珠孔液が観察され始め、2 月 15 日には 80%の個体が開花した(図 10-3B)。その後、3 月 3 日まで 80%以上の個体が開花していた。開花した個体数は、3 月 4 日から徐々に減り始め、3 月 22 日に全ての雌花から珠孔液が観察されなくなった。

### (3) ガラス室外(林業試験場構内)の花粉飛散

ガラス室と同じ敷地の野外のスギ空中花粉は 2 月 21 日から連続的に観測され始め、3 月 9～17 日にかけて飛散のピークとなった。その後、飛散数は徐々に減少し、4 月 6 日には概ね終了した(図 10-4)。

### (4) ガラス室内採種園産種子の発芽率

ガラス室内採種園の全個体の発芽率の結果を表 10-2 に示した。全個体の平均値は 21.4%であり、過去 20 年間の富山県魚津採種園の平均発芽率(18.2%)と大差なかった。系統間で平均発芽率の比較を行った結果、7.0～36.0%と大きな違いが認められた。次に、図 10-2 に示したように採種園の外側から内側へ 4 つのブロックに分け、発芽率に及ぼす位置効果について調べた結果、外側のブロックから中心へいくにつれて発芽率は高くなる傾向が認められた(表 10-3)。

### (5) 気温の比較

2003 年 1 月 7 日から 4 月 20 日の期間でガラス室内と外の気温について調査した結果、ガラス室の外では一日の平均気温が $-3.9\sim 21.1^{\circ}\text{C}$ であったの対して、ガラス室内では $4.1\sim 25.6^{\circ}\text{C}$ と常にガラス室内の方が気温は高く、室内で一日の平均気温が $4^{\circ}\text{C}$

を下回る日はなかった(図 10-5)。また、月ごとの平均気温を比較すると、ガラス室内は、1 月 9.1℃、2 月 7.7℃、3 月 10.6℃、4 月 16.1℃だったのに対して、室外は 1 月 1.1℃、2 月 1.4℃、3 月 3.7℃、4 月 11.3℃であり、両者の差は、1 月で 8.0℃、2 月で 6.3℃、3 月で 6.9℃、4 月で 4.8℃あった。

#### 第4節 考 察

今後のスギ林造成を考慮すると、これまでのような集団選抜育種を基本とした遺伝的多様性の高い種子の大量生産(大面積の採種園)から、低花粉アレルゲン性や病虫害に対する抵抗性など特定形質の利用を目的とした種子生産へ方向転換を検討すべき時期に来ており、これには多様なニーズに対応し易い小面積のミニチュア採種園が有効であると考えられる。採種園を管理する上での問題点として、以前から①園外からの花粉汚染、②開花フェノロジーの違いによる花粉親としての貢献度の偏り、③自殖による種子生産、④着花能力の違いによる交配機会の不均一の 4 つが挙げられていた(古越 1978)。中でも、高い頻度での園外からの花粉混入は選抜効果や遺伝的素質の低下に繋がることから重大な問題となっており、海外でもテーダマツ(*Pinus teada*)やドイツトウヒ(*Picea abies*)のような天然分布が広くかつ造林樹種として広く植栽されている樹種では、それが問題になっている(津村 2004)。本研究では、園外からの花粉汚染対策として図 10-1に示した閉鎖したガラス室内にミニチュア採種園を造成し、その得失について調査した。ガラス室の中は温室効果に加えて降雪日に限って暖房も入れたことから常に外より気温が高く、開花に影響を及ぼす1月と2月の平均気温は外より平均で約 7.1℃も高かった。スギの開花は個体によって差があるものの休眠覚醒後、有効積算温度で 200 日度前後で開花することが明らかにされている(金指・横山 2002)。本実験では休眠覚醒時期は明らかではないものの、ガラス室内の個体の開花は早まり、雄花は野外の花粉飛散が始まる 17 日前の 2 月 4 日から、雌花は 2 月 5 日から開花が始まり、2 月 17 日には雌雄



ともに開花のピークに達した。これにはガラス室内の気温が高かったことが影響したと考えられた。これに対して、野外では2月21日まで連続的な飛散は認められず、飛散数のピークは3月9日から17日であり、ガラス室内と野外では開花期が3週間程度のずれがあった。以上のことから、本研究で使用したガラス室は閉鎖されていることに加えて野外の花粉飛散がピークになる3月11日から20日頃にはガラス室内の雌花は終息期になっていたため、ガラス室内のスギの雌花が外部花粉と交配した可能性は極めて低く、「①園外からの花粉汚染」を防ぐことができると期待される。このことについてはマイクロサテライトマーカー(Moriguchi *et al.* 2003) などを用いたDNA分析によって、正確な外部花粉混入率を把握しておく必要がある。また、この方法は室内の高い気温の影響を受けて開花の有効積算温度に達する期間が短くなることから、開花の個体間差が小さくなり交配の均等化を図ることも期待できる。今回の調査でも、室内の開花のピークは雄花が2月17日から3月13日まで、雌花が2月15日から3月3日までであり、その期間はほぼ完全に重複していたことから、確実な交配が行われたと考えられる。以上のことから、採種園管理の問題点の一つになっている「②開花フェノロジーの違いによる花粉親としての貢献度の偏り」も野外よりは軽減できると期待される。

一方、スギの自殖は発芽率の低下や成長阻害など様々な悪影響を引き起こすことから、採種園では自殖による遺伝的な低下をできるだけ防ぐ必要がある。今回使用したガラス室は完全に閉鎖されており、そのままでは風も無く自殖率が高まると予想されたため、扇風機2台によって人工的に風を作り、任意交配させるための配慮を行った。全個体の平均発芽率は21.4%であり、平均的なスギの発芽率(20~40%)と変わらなかったことや、ガラス室内採種園の外側(縁)の個体でも平均で19.4%の発芽率があったことから、ガラス室内の花粉は扇風機によって効果的に循環していると推測された。また、ガラス室内の中心へ向って発芽率が高くなっていたことから、中心部ほど花粉濃度が高くなる傾向にあると推測される。横山(1977)によると自殖した171クローンの精英樹の平均発芽率は

4.8%と低くなることが報告されている。このことから、今回の発芽率を見る限り、本採種園の「③自殖による種子生産」の量はそれ程多くないと考えられる。また、従来の採種園でも、DNA分析の結果から25クローン程度のクローン数を保持していれば自殖は問題ないと報告されており(清藤 2000)、本採種園では遺伝的に同一な個体はなかったことから、自殖による遺伝的素質の低下は特に問題視する程ではないと推測された。この点についても花粉汚染と同様、DNA分析等によって正確な自殖率を把握しておく必要がある。

スギやヒノキの採種園では着花促進のためジベレリン処理が行われているが、機械的にそれを散布した場合、ジベレリンに対する感受性の違いから個体間で着花量に大きな差が出てしまい、花粉親としての寄与率に偏りが生じて問題になっている(清藤 2000)。本採種園でも表10-2に示した通り、系統間で着花量に大きな差があり「④着花能力の違いによる交配機会の不均一」に繋がっていると思われる。この対策としては採種園を造成する前に各クローンの着花量を把握し、同程度の着花量のクローンで採取園を構成する方法が考えられる。極端に着花量の多い個体は採種園産種子に遺伝的偏りを引き起こす原因となるので、構成クローンからはずすか構成本数を減らすべきであろう。また、ジベレリンに対する感受性は加齢とともに変化してくることから、着花量に合わせてジベレリンの散布回数や濃度を調節する等の対策も考える必要がある。

園外からの花粉汚染が無く、採種園構成クローン間でランダムな交配が行われ、全クローンが等しく花粉親として寄与していることが採種園の理想である。本研究のガラス室を用いたミニチュア採種園は、①園外からの花粉汚染を防ぐことができる、②開花フェノロジーの違いによる花粉親としての寄与率の偏りを野外よりは軽減できる、③雪による被害を防ぐことができる、など様々な利点を持っている。得られた種子の発芽率も従来の採種園と変わらなかったことから、Cry j 1量の少ない精英樹を採種木に用いたガラス室内ミニチュア採種園を造成することによって、低花粉アレルゲン(Cry j 1)性を保持した実生苗の安定生産が期待できる。ここで作られた実生集団は第8章で記したとおり、親木に精

英樹等を利用していることから、成長や木材生産性も従来の採種園産のスギと大きく変わることはないと予想されるため、年数がそれほどかからずに低花粉アレルゲン性実生苗の実用化は可能であると考えられた。

表10-1 採種園の造成に用いたF<sub>1</sub>家系

家系番号	家系名	個体番号
①	F <sub>1</sub> 片貝55号	1, 17, 33, 49
②	F <sub>1</sub> キノネ	2, 18, 34, 50
③	F <sub>1</sub> 砺波2号	3, 19, 35
④	F <sub>1</sub> 小原12号	4, 20, 36, 51
⑤	F <sub>1</sub> ミオ4号	5, 21, 37, 52
⑥	F <sub>1</sub> カワイダニ	6, 22, 38
⑦	F <sub>1</sub> 小原3号	7, 23, 39
⑧	F <sub>1</sub> 小原1号	8, 24, 40
⑨	F <sub>1</sub> ボカ	9, 25, 41
⑩	F <sub>1</sub> 小原2号	10, 26, 42
⑪	F <sub>1</sub> 小原501号	11, 27, 43
⑫	F <sub>1</sub> 八尾2号	12, 28, 44
⑬	F <sub>1</sub> 平打越	13, 29, 45
⑭	F <sub>1</sub> 早月1号	14, 30, 46
⑮	F <sub>1</sub> 小原5号	15, 31, 47
⑯	F <sub>1</sub> 三角6号	16, 32, 48

表10-2 家系間の着花指数および発芽率の比較

系 統 名	個 体 番 号	着 花 指 数	発 芽 率
F <sub>1</sub> 片貝55号	1	3	40
	17	1	10
	33	2	14
	49	3	39
平 均		2.3	25.8
F <sub>1</sub> キノネ	2	1	25
	18	3	18
	34	2	13
	50	1	6
平 均		1.8	15.5
F <sub>1</sub> 砺波2号	3	2	13
	19	1	14
	35	2	29
平 均		1.7	18.7
F <sub>1</sub> 小原12号	4	1	8
	20	1	32
	36	3	38
	51	2	3
平 均		1.8	20.3
F <sub>1</sub> ミオ4号	5	1	—
	21	1	—
	37	1	—
	52	1	—
平 均		1.0	—
F <sub>1</sub> カワイダニ	6	1	22
	22	2	27
	38	2	16
平 均		1.7	21.7
F <sub>1</sub> 小原3号	7	0	10
	23	2	44
	39	1	13
平 均		1.0	22.3
F <sub>1</sub> 小原1号	8	3	19
	24	1	16
	40	0	—
平 均		1.3	17.5
F <sub>1</sub> ボカ	9	1	12
	25	0	2
	41	0	—
平 均		0.3	7.0
F <sub>1</sub> 小原2号	10	1	16
	26	2	23
	42	1	16
平 均		1.3	18.3
F <sub>1</sub> 小原501号	11	3	30
	27	3	17
	43	2	31
平 均		2.7	26.0
F <sub>1</sub> 八尾2号	12	3	22
	28	2	29
	44	2	19
平 均		2.3	23.3
F <sub>1</sub> 平打越	13	2	30
	29	3	21
	45	3	55
平 均		2.7	35.3
F <sub>1</sub> 早月1号	14	0	59
	30	3	40
	46	3	9
平 均		2.0	36.0
F <sub>1</sub> 小原5号	15	2	12
	31	1	21
	47	1	19
平 均		1.3	17.3
F <sub>1</sub> 三角6号	16	2	5
	32	3	21
	48	1	8
平 均		2.0	11.3

— ; 雌花が着生しなかった個体

表10-3 室内採種園の発芽率と位置効果

外 側		内側-3		内側-2		内側-1	
個体番号	発芽率 (%)	個体番号	発芽率 (%)	個体番号	発芽率 (%)	個体番号	発芽率 (%)
1	40	6	22	13	30	22	27
2	25	7	10	14	59	23	44
3	13	8	19	15	12	30	40
4	8	9	12	16	5	31	21
10	16	12	22	24	16		
11	30	17	10	29	21		
18	18	20	32	32	21		
19	14	25	2	38	16		
26	23	28	29	39	13		
27	17	33	14				
34	13	36	38				
35	29	44	19				
42	16	45	55				
43	31	46	9				
48	8	47	19				
49	39						
50	6						
51	3						
平均	19.4		20.8		21.4		33.0





図 10-1 ガラス室の外観

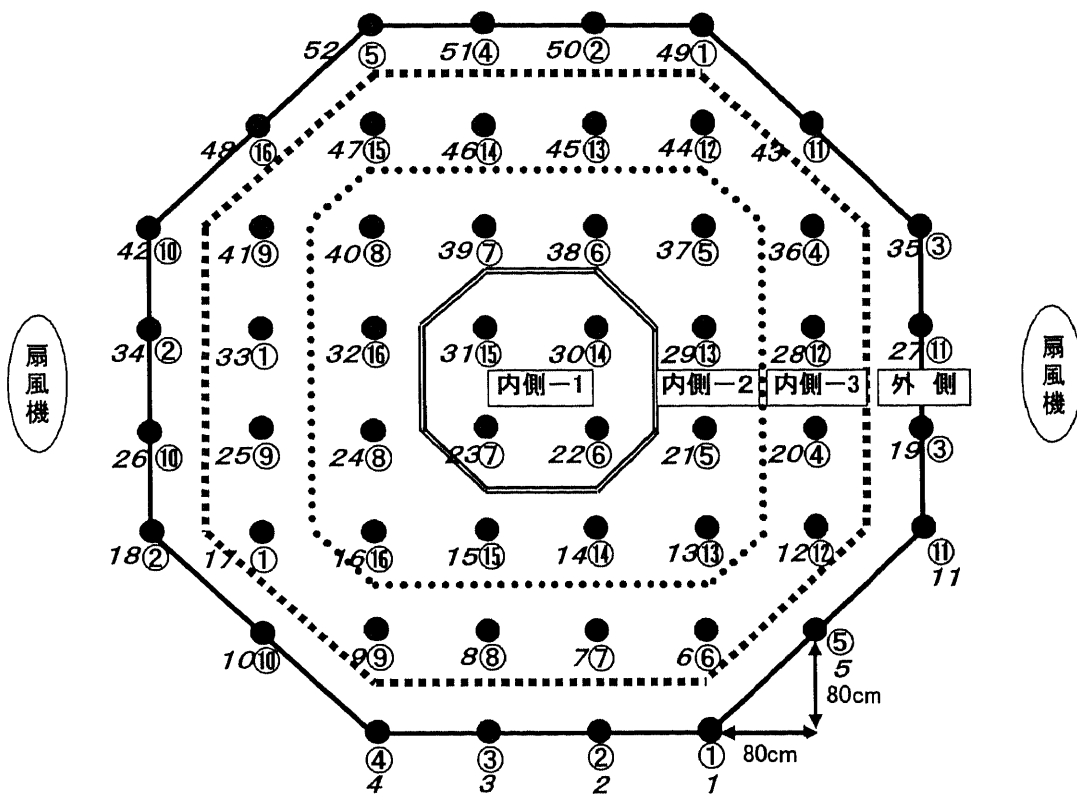


図 10-2 ガラス室内ミニチュア採種園の採種木位置図

( ①～⑯ は家系番号、1～52 は個体番号を指す。)

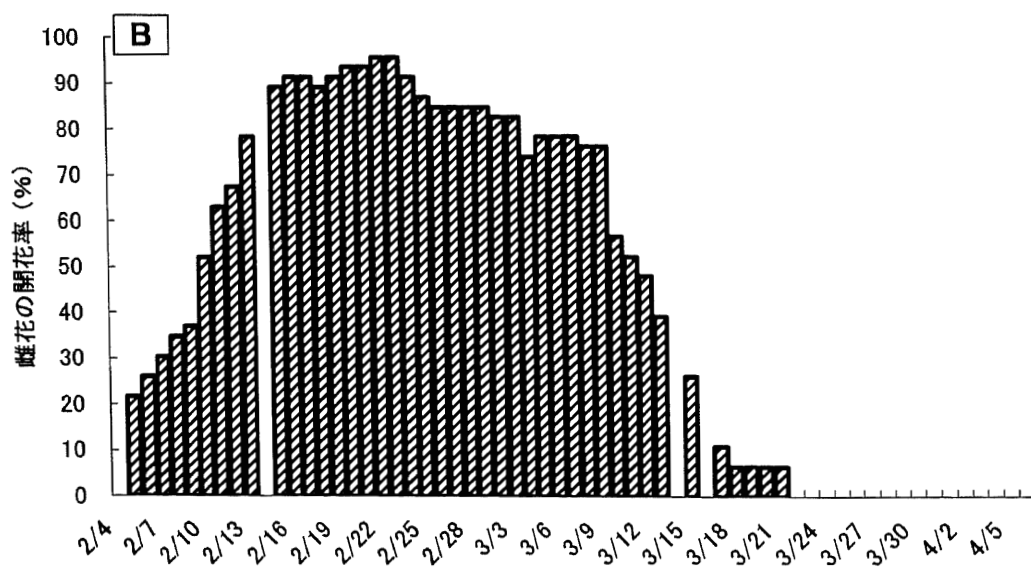
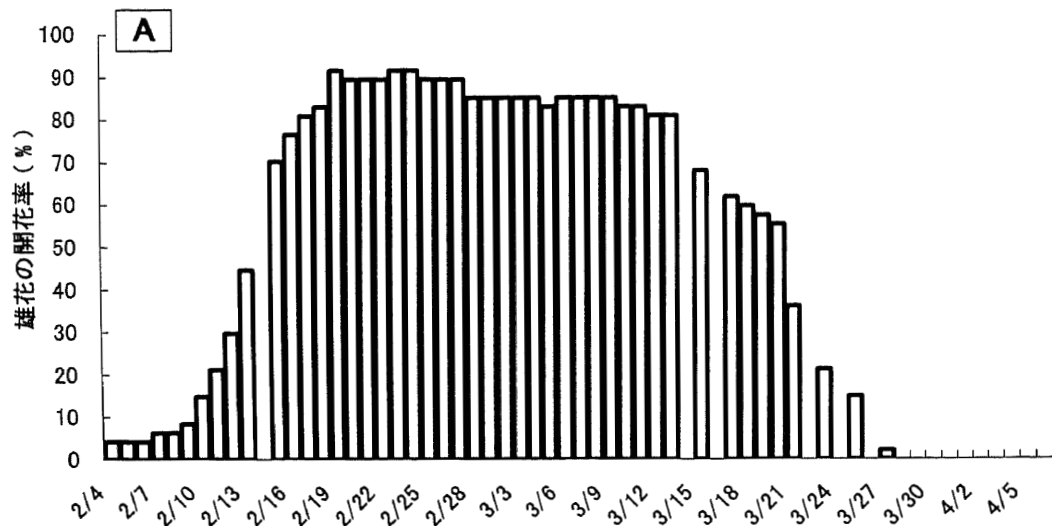


図 10-3 ガラス室内ミニチュア採種園における雄花(A)と雌花(B)の開花率

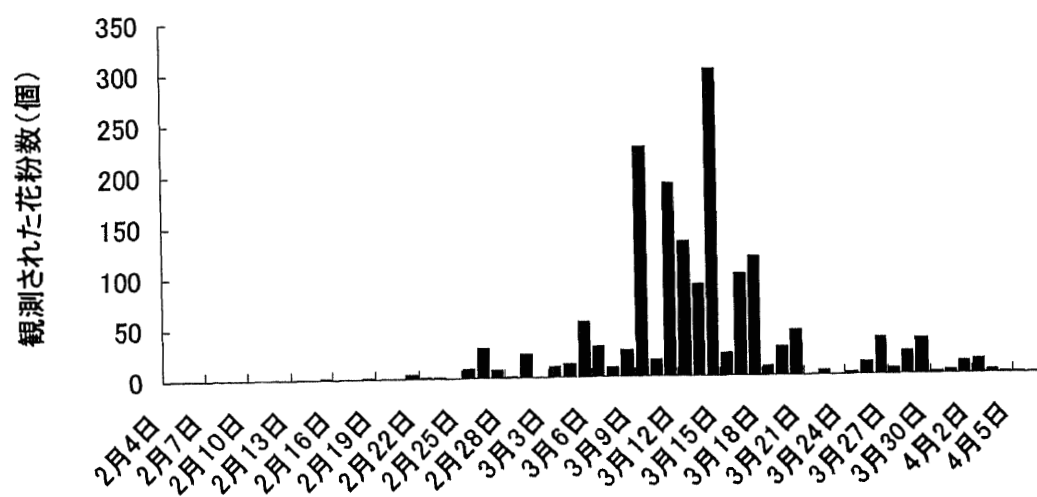


図 10-4 野外(ガラス室外)のスギ花粉飛散数の日推移

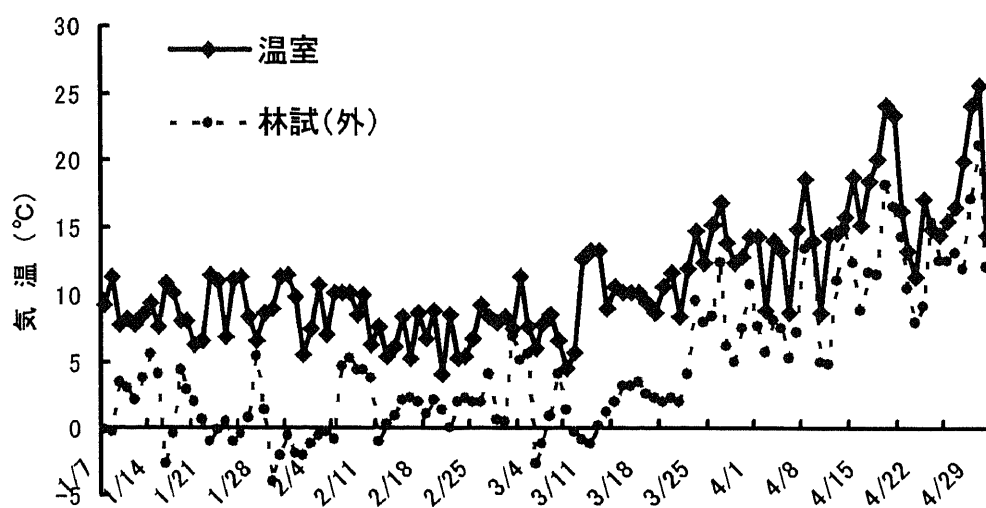


図 10-5 ガラス室内と野外の気温の日推移

## 第 11 章 総合考察

### 第1節 実用化に向けた雄性不稔スギの遺伝的改良

近年、スギ花粉症が大きな社会問題になっているため、遺伝的に全く花粉を飛散させないスギの雄性不稔性は極めて重要な遺伝資源となる。現在までに雄性不稔個体は富山県 3 個体(平ら 1993, 斎藤ら 2005)、新潟県 10 個体(平ら 2005)、福島県 3 個体(五十嵐ら 2004)、神奈川県 1 個体(平ら 2005)、茨城県 1 個体(高橋ら 2005)で選抜されていることから、それらの実用化を図るためには花粉の崩壊特性や発芽率、遺伝様式など様々な特性を明らかにする必要がある。富山県で最初に発見された雄性不稔スギは、第 2 章より、花粉母細胞から四分子期までは正常に発育するものの一核期になると小孢子が肥大し始め、最終的には核のない崩れた花粉粒になるという特性を持ち、この雄性不稔性は戻し交配より一对の核内劣性遺伝子( $aa$ )によって支配されていることが明らかにされた(Taira *et al.* 1999)。仮に、この雄性不稔遺伝子の頻度が極めて低く一個体しか発見できなかったとすると、この個体の遺伝的改良を行うには戻し交配家系か  $F_2$  家系を利用しなければならないため近交弱勢の問題が出てくる。しかし、第 3 章の結果から、雄性不稔遺伝子は比較的高い頻度で存在すると推定され、さらに第 4 章より、精英樹の中にも雄性不稔遺伝子をヘテロ型( $Aa$ )で保有したクローンが存在することが明らかになった。このことは、近交弱勢のない遺伝的に優良な雄性不稔スギの作出が可能であることを示唆している。精英樹や気象害抵抗性候補木、各地の主要なさし木品種を合わせると全国で約 9,000 クローンになることから雄性不稔遺伝子を保有した精英樹等は他にも複数存在する可能性が高いため、今後は第 4 章と同様の方法で新たに雄性不稔遺伝子を保有した精英樹等を選抜した後、これらの精英樹同士で交配家系を育成する予定である。また、雄性不稔性は劣性遺伝することから、採種圃方式(実生)で全ての個体を雄性不稔にするのは不可能であるため、品種改良された雄性不稔スギ

の増殖・普及には、さし木などによるクローン増殖が適していると考えられた。

スギ花粉症は全国的な問題であることから、雄性不稔スギの普及を図るためには病虫害などに対する危険分散や様々な環境に対する適応性を考慮する必要がある、そのためには雄性不稔遺伝子の多様化を図ることが重要な課題となる。第 5 章より、10,902 個体の実生苗の中から新たなタイプの雄性不稔スギを 2 個体選抜することができた。これらは富山県で最初に発見された雄性不稔スギとは花粉の崩壊過程が異なることから、別の雄性不稔遺伝子によって引き起こされていると推定される。また、富山県以外で発見された雄性不稔個体も顕微鏡による観察結果で、減数分裂期から成熟期まで様々なタイプの花粉崩壊ステージが確認されていることから、今後、検定交配などによって多様な雄性不稔遺伝子座が明らかになると予想される。遺伝様式の決定後は、富山県で最初に発見された不稔個体と同様に精英樹等から同じ雄性不稔遺伝子を保有したクローンを探索し、これらの材料を上手く利用することによって遺伝的多様性を損なうことなく、それぞれの地域に適した優良な雄性不稔スギの実用化が可能になると期待される。また、これから数多く雄性不稔遺伝子座が決定されるにつれて混乱が予想されることから、今後はそれを避けるために下記のようなルールを作り、その命名法の標準化を提案する。遺伝子座名に加えて花粉の崩壊ステージやその他の特性を明記して一覧表を作成し、これを公開することによって雄性不稔スギの研究の進展に大いに役立つと期待される。

#### スギの雄性不稔遺伝子の標準化

- 1) スギの雄性不稔個体の名称は、発見された都道府県名に不稔をつけ、発見された順に番号をつける。
- 2) 雄性不稔遺伝子座名は、原則として「遺伝子命名国際規約」(1958 年日本学術会議承認)に従い、遺伝様式が決定された順に「*ms-1*」, 「*ms-2*」, と番号をつける。
- 3) 遺伝子座が決定された雄性不稔個体には、個体名の後に括弧付きで遺伝子記号



を付記する。

## 第2節 低花粉アレルゲン(Cry j 1)性実生苗の効率的な生産体制の確立

本研究で使用した雄性不稔性は劣性遺伝することから、その後代で全ての個体を雄性不稔にすることは不可能であり、最大でも雄性不稔個体は50%の頻度でしか得られない。このことから、実生苗による造林で雄性不稔性よりもその効果が期待できる低花粉アレルゲン(Cry j 1)性に着目した。雄性不稔と同様に精英樹の中からアレルゲンフリーやそれが極めて少ないクローンが選抜できれば、花粉症対策として重要な遺伝資源となる。第6章で記した蛍光サンドイッチ ELISA 法を用いて第7章で Cry j 1 の発現特性について調査した結果、ほぼ同一条件で生育しているラメート間ではほとんど差はなかったが、標高で 200m 以上異なると同一クローンでもその量に有意な差がでることが明らかになった。このことから、精英樹をはじめとするクローン間で Cry j 1 量の比較調査を行う場合には、採種園や採穂園などのような生育環境がほぼ同一条件のクローン集積所から花粉を採取し調査する必要があると判断された。そこで、富山県林業試験場の構内に植栽してある富山県の精英樹や雪害抵抗性候補木 117 クローンについて Cry j 1 量の調査を行った結果、0.26~7.54 (pg/個)とその量の変異は非常に大きいことが明らかになった。また、次世代の選抜効果をはかるうえで重要な指標となる Cry j 1 の狭義の遺伝率を母親を共通とする 11 の  $F_1$  家系を用いて算出した結果、 $h^2 = 1.0$  と高い値になった。これらの結果は Cry j 1 量の軽減に向けた選抜育種は有効であることを示唆しており、精英樹の中から Cry j 1 の少ないクローンを選抜した後、それらでミニチュア採種園を造成することによって遺伝的に優良な低花粉アレルゲン(Cry j 1)性実生苗の大量生産が比較的短期間で可能になることを示唆している。ここで作られた実生集団は花粉中のアレルゲン(Cry j 1)量が少ないことから花粉生産量の少ないスギの集団と同じ意味をなし、さらに成長や木材生産を基盤とした特性も親木に精英樹等を利用していることから、従来の採種

園産のスギと大きく変わることはないと予想される。現在、表 8-5 に示した低花粉アレルゲン性の 18 クローンをさし木によって増殖中であり、今後はこれらを用いて新たにミニチュア採種園を造成し、Cry j 1 に対する選抜効果を確認する予定である。しかし、第 9 章で記したとおり、野外にそれを造成した場合、園外からの外部花粉混入率は 60%以上で非常に高いことが明らかになった。採種園の外部花粉混入率については森口ら(2003)も同様の値を示していることから、野外に造成したミニチュア採種園から低花粉アレルゲン(Cry j 1)性を保有した実生苗を効率的に生産するのは困難であると思われた。この対策として、第 10 章ではガラス室内に同様の採種園を造成し、その中で任意交配を行わせた結果、平均発芽率は 21.4%で従来型の採種園と同程度であり、その後の苗の生育も順調であった。ガラス室内ミニチュア採種園は外部からの花粉混入を確実に防ぎ、開花フェノロジーも野外よりは揃うといった利点がある。以上のことから、ガラス室内ミニチュア採種園を利用することによって、精英樹由来の低花粉アレルゲン(Cry j 1)性実生苗の大量生産および実用化が可能になると考えられた。

### 第 3 節 スギ花粉症の軽減に向けた育種的対策

これまで、スギやヒノキを中心とした林木の育種は、「成長量の増大」、「材質の向上」、「気象害や病害虫に対する抵抗性の向上」を中心に進められてきたが(田島 2001)、近年、森林に対するニーズの多様化と環境問題などが加わり、「特定形質」に関する育種も重要な位置を占めるようになってきた。その中でも、花粉症対策として花粉飛散量の軽減に向けた育種は社会的な関心も高く重要な課題として取り組むべき状況になっている。本論文ではスギ花粉症の軽減に向けた育種的な対策として、雄性不稔性と低花粉アレルゲン性に着目した。これらは、既存のスギ林の中から目的形質を保有した個体を選抜した後、品種改良して増殖し普及へつなげるといった従来の育種方法がそのまま適応でき、最も現実的な育種戦略になると判断されたためである。本研究により、雄性不稔性と

低花粉アレルゲン性ともに精英樹由来の優れた特性を持った個体の作出および生産が可能であることを明らかにした。スギの造林には、さし木苗と実生苗の 2 種類が利用されており、植栽する地域の条件や目的に応じて使い分けされている。このことから、さし木による造林を行う場合は品種改良された雄性不稔のさし木苗を、実生による造林を行う場合は精英樹由来の低花粉アレルゲン(Cry j 1)性の実生苗を利用することによって、従来の木材生産性や遺伝多様性を損なうことなく、将来の空中スギ花粉(アレルゲン)量を確実に減少させる対処法になると考えられる。ただ、現在の主な花粉飛散源となっているスギの人工林は海外から安価な木材が大量に輸入されるなど産業や社会的な変化に伴い、粗放化もしくは放棄が進んでいる。このことから、スギ花粉の飛散量を軽減させるためには、まず人工林の適切な管理と伐採(収穫)を実施することである。その後、スギ造林の適地には雄性不稔性や低花粉アレルゲン性のスギを利用し、不成績造林地(長谷川 1991)では広葉樹などへの樹種転換か自然力に任せて天然林へ誘導してやることによって、緩やかであるが森林環境に対して負担の少ない確実な花粉飛散の抑制方法になると考えられる。

木材生産をはじめとする森林の生物資源管理は、生物多様性保全を原則としたうえでの持続的な収穫を目標とすること、そして、生態系保全を重要視した資源・土地管理政策を実行することが世界的な課題になっている(Seymour and Hunter 1999), (長池 2000)。このことから、今後の人工林管理は従来のような大面積で木材の収穫量を最大限発揮させるための集約的な施業ではなく、花粉症も問題も含めて、生物多様性や水源かん養、CO<sub>2</sub> 吸収などのような公益的機能を総合的に評価し、これまでの実績から経済林と環境林を明確に区別して取り扱うなど整合的な管理へ方向転換すべきであると考えられる。

## 摘 要

近年、大きな社会問題になっているスギ花粉症に対する育種的な対策として、本研究では最も現実的と思われる雄性不稔性と低花粉アレルゲン(Cry j 1)性に着目し、将来の空中スギ花粉量や空中アレルゲン量の軽減に向けた育種戦略について検討した。

スギ花粉症に対する育種的な対策として、遺伝的雄性不稔性を保持したスギの利用は環境や樹齢に左右されることなく安定して花粉を生産しないことから極めて有効な手段となる。スギの雄性不稔個体は、富山県で初めて発見され、その遺伝様式は一对の核内劣性遺伝子(*aa*)によって支配されていることが明らかにされたが、そのスギを育種の母材料として利用するためには詳細な発現特性を把握する必要がある。そこで、花粉の各発育ステージから雄花を採取しパラフィン切片法により雄花内部の観察を行った結果、この性質は一核期以降に発現し、成熟期には完全に花粉を崩壊させることが明らかになった。また、電子顕微鏡で崩壊した花粉の残骸を観察した結果、花粉外壁を形成するうえで重要な役割を果たしているオービクルスが認められなかった。このことから、この雄性不稔性は一核期から成熟花粉になる課程で正常な花粉外壁の形成を妨げ花粉を崩壊させると推測された。次に、この雄性不稔遺伝子の分布について調査するため、雄性不稔の母樹から自然交配によって得られた雄性不稔苗 29 個体の花粉親について CAPS マーカーを用いて調査した結果、花粉親は複数存在し、雄性不稔遺伝子をヘテロ(*Aa*)で保有したスギは広く分布していると推定された。このことから、精英樹の中にも雄性不稔遺伝子を保有したクローンが存在すると期待されたため、富山県の精英樹や気象害抵抗性候補木 64 クローンと雄性不稔スギとの交配家系( $F_1$ )を育成し、それらの花粉稔性について調査した結果、精英樹の小原 13 号との交配によって得られた  $F_1$  集団は、雄性不稔 64 個体と可稔 52 個体に分離した。 $\chi^2$  検定で 1:1 の分離比に適合したことから、小原 13 号は雄性不稔遺伝子をヘテロ型(*Aa*)で保有していることが明らかになった。このような精英樹は他にも存在すると予想されることから、これらの精英樹同士で交配( $Aa \times Aa$ )することによ

って遺伝的に優良な雄性不稔スギ(*aa*)が約 25%の頻度で出現すると期待される。今後、交配によって品種改良された雄性不稔スギはさし木によって増殖し普及するのが有効であると考えられた。

雄性不稔スギの全国的な普及を図るためには病虫害に対する危険分散や様々な環境に対する適応性を考慮する必要がある、そのためには雄性不稔遺伝子の多様化が重要な課題となる。そこで、3年生の10,902個体の実生苗から新たなタイプの雄性不稔スギを探索した結果、雄性不稔と思われるスギを2個体選抜することができた。これらの雄花を電子顕微鏡で調べてみると花粉同士が崩れた形で融合しており、正常な花粉はほとんど認められなかった。富山県で最初に発見された雄性不稔スギとは花粉の崩壊過程が異なることから、別の雄性不稔遺伝子によって引き起こされていると推定された。これらの個体の遺伝様式を決定するため、現在、交配家系を育成中である。また、この方法は3年生の実生苗を材料に用いるので少ない栽培面積と短い生育期間ですむことから、多様な雄性不稔スギを選抜するのに有効な手法であると考えられた。

アレルゲン(*Cry j 1*)フリーや低花粉アレルゲン性を保有したスギを選抜するため、簡便な *Cry j 1* の定量法について検討したところ、*Cry j 1* に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体で抗原を挟み込むサンドイッチ ELISA 法を用いることによって、*Cry j 1* 標準液と測定値の間で  $R^2=0.99$  以上の相関を得ることができた。この方法を用いて、*Cry j 1* の発現量について調査した結果、同一クローン内のラメート間ではほとんど差がなかったが、全国 25 道県における精英樹のクローン間の変異は非常に大きく、最大で約 29 倍も差があることが明らかになった。また、次世代の選抜効果をはかるうえで重要な指標となる *Cry j 1* の狭義の遺伝率を母親を共通とする交配家系から算出した結果、 $h^2 = 1.0$  と高い値になった。これらのことから、*Cry j 1* 量の軽減に向けた選抜育種は有効であり、精英樹の中から *Cry j 1* の少ないクローンを選抜した後、それらを採種木とするミニチュア採種園を造成することによって遺伝的に優良な低花粉アレルゲン性実生苗の大量生産が可能になると考えられた。

野外に造成したミニチュア採取園の外部花粉混入率を推定するため、雄性不稔遺伝子をマーカーとして利用し、それをヘテロ型 ( $Aa$ ) で保有したスギでモデルミニチュア採種園を造成した。雄性不稔苗 ( $aa$ ) の出現率から外部花粉混入率を推定した結果、約 62% となり非常に高いことが明らかになった。この対策として、ガラス室内に同様の採種園を造成し、その中で任意交配を行わせた結果、発芽率は 21.4% で従来型の採種園と同程度であり、その後の苗の生育も順調であった。ガラス室内ミニチュア採種園は外部からの花粉汚染を確実に防ぐことができるため、低花粉アレルゲン ( $Cry\ j\ 1$ ) を保有した実生苗を生産するうえで本採種園は有効な手法であると判断された。

スギの造林には、さし木苗と実生苗の 2 種類が利用されており、植栽する地域の条件や目的に応じて使い分けされている。このことから、さし木による造林を行う場合は品種改良された雄性不稔のさし木苗を、実生による造林を行う場合は精英樹由来の低花粉アレルゲン ( $Cry\ j\ 1$ ) 性の実生苗を利用することによって、従来の木材生産性や遺伝多様性を損なうことなく空中スギ花粉量や空中アレルゲン量を確実に減少させる対処法になると考えられた。

## 謝 辞

本博士論文を遂行するにあたり、新潟大学大学院自然科学研究科環境共生科学専攻の平 英彰 教授には、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜った。富山医科薬科大学医学部公衆衛生学教室の寺西秀豊 助教授には、本研究に対して常に適切なご助言ご指導を賜った。あらためてここに深甚なる感謝の意を表する。

また、本論文をとりまとめるにあたり、本論文のご校閲の労を賜った新潟大学農学部生産環境科学科の竹内公男 教授、紙谷智彦 教授、箕口秀夫 助教授、新潟大学大学院自然科学研究科環境共生科学専攻の中田 誠 助教授、関島恒夫 助教授に心から感謝の意を表する。

本研究を行うにあたっては、多くの方々にご指導、有益なご助言、ご協力を頂いた。森林総合研究所ゲノム解析研究室の津村義彦博士には実験およびデータ処理に関する多くの適切なご助言を頂き、本研究に対して数多くの貴重なご意見を頂いた。また、森林総合研究所の篠原健司博士、二村典宏博士、森口喜成博士、新潟大学自然科学研究科の中野 優博士、新潟県森林研究所の伊藤信治氏、金子岳夫氏、岐阜大学応用生物科学部の古田喜彦教授には本研究に対して多くの貴重なご意見を頂いた。

国立相模原病院臨床研究センターの安枝 浩博士には貴重な抗 Cry j 1 抗体を恵与して頂いた。また、富山県林業技術センター林業試験場の各位には、日頃から数多くのご助言、ご厚情を賜っている。

以上の方々に、特に記して厚く御礼申し上げます。



## 引用文献

- Adams, W. T., Hipkins, V.D., and Randall, W. K.(1997) Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. Can. J. For. Res. 27: 131-134.
- Ahlholm J. U., Helander M. L., and Savolainen J.(1988) Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch ( *Betula pubescens ssp. Czerepanovii* ) pollen. Clin. Exp. Allergy 28: 1384-1388.
- 朱長 進・岡崎 且(1989) スギ三倍体精英樹宇陀 4 号について. 林木の育種 特別号: 22-26.
- 秋元浩一(1989) 農学・生物学の統計分析大要. 215pp, 養賢堂, 東京.
- 馬場廣太朗(2002) 日本の花粉症. JOHNS 18(1): 5-7.
- 榎本雅夫・大西成雄・安枝 浩・嶽 良博・裕田猛真・齋藤優子・十河英世・藤村 聡・藤木嘉明・瀬野悟史・井手 武(2000) 高感度 Cryj1 測定法について. 花粉誌 46(1): 9-16.
- Friedman, S.T. and Adams, W. T.(1985) Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Theor. Appl. Genet.69: 609-615.
- 藤崎洋子(1988) 新潟市における過去 15 年間の空中花粉調査結果と花粉症患者の実態. 花粉誌 34: 19-30.
- 藤下典之(2002) 異常花粉—懐古録と最新の研究成果(IV)—. 花粉誌 48(1): 41-54.
- 古越隆信(1978) スギ採種園の花粉管理に関する基礎的研究. 林試研報 300: 41-120.
- 後藤陽子(2005) 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. 林育研報: 1-66.
- 後藤陽子・近藤禎二・安枝 浩(1999) 関東地方周辺のスギ精英樹花粉における Cry j 1 量の変異. 花粉誌 45(1): 149-152.
- Goto, Y., Kondo, T. and Yasueda, H.(2003) Inducing male flowering by applying gibberellic

- acid has no effect on the *Cry j 1* content in *Cryptomeria japonica* pollen. *Silvae Genetica* 52: 139-143.
- Goto, Y., Kondo, T., Hayasi, E., Kuramoto, N., Takahashi, M. and Yasueda, H.(2004) Influences of genetic and environmental factors on the concentration of the allergen *Cry j 1* in sugi (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Tree Physiol.* 24: 409-414.
- 長谷川幹生(1991) スギ不成熟造林地での下刈り, 除伐が広葉樹の定着に与える影響. *日林誌* 73: 375-379.
- 橋詰隼人(1962) スギの花芽分化期および花芽の発育経過について. *日林誌* 44: 312-319.
- 橋詰隼人(1990) 日本列島のスギ林における花粉の生産に関する研究(I)ー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ー 鳥大演研報 19: 67-122.
- 橋詰隼人・山本福壽(1990) 薬剤によるスギ雄花の着花抑制. *日林論* 101: 317-318.
- 橋詰隼人・山本福壽(1992) マレイン酸ヒドラジットコリン塩(エルノー)によるスギ雄花の着花抑制. 鳥取大演研報 21: 51-61
- Hashimoto, M., Nigi, H., Sakaguchi, M., Inoue, 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.
- 林 弥栄(1969) スギ天然林の環境. (スギのすべて. 坂口勝美 編, 449pp, 全国林業普及協会, 東京). 2-13.
- Hino, K., Yamamoto, S., Sano, O., Taniguchi, Y., Kohno, K., Usui, M., Fukuda, S., Hanzawa, H., Haruyama, H. and Kurimoto, M. (1995) Carbohydrate structures of the glycoprotein allergen *Cry j I* from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J.*

Biochem. 117: 289-295.

Horton R. F. and Osborne D. J.(1967) Senescence, abscission and cellulose activity in *Phaseolus vulgaris*. Nature 214: 1086-1088.

五十嵐正徳・渡邊次郎・小澤 創・斎藤 寛・平 英彰(2004) 福島県でスギ雄性不稔個体を発見 ( I )－探索地の選定と雄性不稔個体の確認－. 東北森林科学会誌 9(2): 86-89.

井上 栄(1991) 抗体保有率の地域差. (図説スギ花粉症 改訂第2版. 信太隆夫編, 245pp, 金原出版, 東京). 68.

井上 栄(1992) 文明とアレルギー病－スギ花粉症と日本人－. 204pp, 講談社, 東京.

石川潤一(1929) 稲に於ける male-sterility の遺伝に就いて. 遺雑 4(3): 156-157.

Ito, S. and Katsuta, M. (1986) Seed productivity in the miniature seed orchard of *Cryptomeria japonica* D. Don. J. Jpn. For. Soc. 68: 284-288.

岩波洋造(1980) 花粉学. 212pp, 講談社, 東京.

Iwata, H., Ujino-Ihara, K., Yoshimura, K., Mukai, Y., and Tsumura, Y. (2001) Cleaved amplified polymorphic sequence markers in sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don, and their locations on a linkage map. Theor. Appl. Genet. 103: 881-895.

金指達郎・横山敏孝(2002) スギ雄花の休眠打破と開花に要する温度条件. 花粉誌 48(2): 95-102.

Kaul, M. L. H. (1988) Male sterility in higher plants. Springer-Verlag 1-1005.

岸川禮子(1997) スギ及びヒノキ科花粉症の地域特性. アレルギー科 3: 224-232.

岸川禮子(1998) 日本列島の空中花粉分布と秋のスギ花粉飛散. アレルギー科 5: 212-219.

岸谷幸枝・佐藤 茂・江刺洋司(1993) アブラナ科植物の細胞質雄性不稔の発現と植物ホルモンの関与 I－蒴からのエチレンの発生－ 育種学雑誌 43(別冊): 310.

- 近藤 禎二(1986) 関東育種基本区の中のスギ精英樹三倍体クローン. 日林論 97: 439-440.
- Kondo, Y., Ipsen, H., Løwenstein, H., Karpas, A and 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.
- Laser, K. D. and Lersten, N. R. (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev. 38: 425-454.
- Mariani, C. (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature 347: 737-741.
- 丸山清明・粉川 聡(1991) 中国における二系法ハイブリッドライス開発の現状. 農業技術 46(4): 160-165.
- 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.
- 松田 清・宮島 寛(1977) スギさし木品種の染色体数. 日林誌 59: 148-150.
- 松尾孝嶺(1970) 不稔性と不和合性.(育種学. 松尾孝嶺著, 361pp, 養賢堂, 東京). 77-85.
- 松尾孝嶺(1974) 育種の技術.(育種ハンドブック. 角田重三郎・山口彦之編, 1110pp, 養賢堂, 東京). 531-532.
- Miki-Hiroshige, H., Nakamura, S., Yasueda, H., Shida, T., and Takahashi, H.(1994) Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. Sex Plant Report 7: 95-100.
- 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.
- Moriguchi, Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Taira, H., and Tsumura, Y.(2003)

Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica*

D. Don. Theor. Appl. Genet. 106: 751-758.

長池卓男(2000) 人工林生態系における植物種多様性. 日林志 82: 407-416.

長野 準・西間三馨・岸川禮子・佐橋紀雄・横山敏孝(1992) 日本列島の空中花粉Ⅱ.  
103pp, 北隆館, 東京.

中村昭彦・吉田博一・平林秀樹・谷垣内由之・馬場廣太郎・中江公祐(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.

中村末樹・長野克也・戸田義宏(1991) スギの異数体について. 日本林学会九州支部研究  
論文集 44: 55-56.

長尾精文(1993) スギ・ヒノキ等の着花抑制技術. (平成 4 年度 森林総合研究所成果選  
集). 50.

Namba, M., Kurose, M., Torigoe, K., Hino, K., Taniguchi, Y., Fukada, S., Usui, M. and  
Kurimoto, M.(1994) Molecular cloning of the second major allergen, *Cry j II*, from  
Japanese cedar pollen. FEBS. Lett. 353: 124-128.

二宮茂子・染郷正孝・石井幸夫(1986) ヤマザクラ亜属の種および品種の花粉(2)ーオオシ  
マザクラ系ほか 2 系統および 3 倍体品種ー 林木の育種 特別号: 46-48.

Nishino, T. and Iida, S. (1993) Mutants having a low content of 16-kDa allergenic protein in  
rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 86: 317-321.

西山和美・那須仁弥・西村慶二(2000) 近畿・瀬戸内海育種区におけるスギ精英樹クローン  
の雄花着花性ー自然着性で雄花着花量が少ない精英樹ー. 林木育種センター関西  
育種場年報 35: 55-63.

小笠原 寛・吉村史郎・後藤 操・栗花落昌和・藤谷哲造・中原聰(1998) スギ壮齡林面積  
増加による花粉飛散数の増加. 花粉誌 44(2): 97-105.

Ohtsuki, T., Taniguchi, Y., Kohno, K., Fukuda, S., Usui, M. and Kurimoto, M. (1995) *Cry j*

- 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. Allergy 50: 483-488.
- Okawa, T., Konno, A., Yamakoshi, T., Numata, T., Terada, N. and Shima, M. (2002) Analysis of natural history of Japanese cedar pollinosis. Int. Arch. Allergy. Immunol. 131: 39-45.
- 大谷賢二・大庭喜八郎(1984) 簡易なビニールフレームを用いたスギの人工交配 日林論 95: 289-290.
- 大谷賢二・織田春紀・宮浦富保(2000) 東北育種基本区における雄花の少ないスギ品種の創出ー10年度の実施状況ー. 林木育種センター東北育種場年報 30: 161-164.
- Pakkanen, A., Nikkanen, T. and Pulkkinen, P. (2000) Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. Scand. J. For. Res. 15: 399-404.
- Panzani, R., Yasueda, H., Shimizu, T. and Shida, T.(1986) Cross-reactivity between the pollens of *Cupressus sempervirens* (common cypress) and of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar). Ann. Allergy 57: 26-30.
- Rick, C. M. (1948) Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. Hilgardia 18(17): 599-633.
- 林木育種推進東北地区協議会技術部会 (2001) 東北育種基本区スギミニチュア採種園技術マニュアル. 48pp, 林木育種センター東北育種場, 岩手.
- 林木育種センター(2004) 林木育種のプロジェク. 129pp, 林木育種協会, 東京.
- 林野庁(1997) 林業統計要覧 1997 年版. 252pp, 林野弘済会, 東京.
- 林野庁 (2003) 森林・林業統計要覧 2003 年版. 189 pp, 林野弘済会, 東京.
- 林野庁 (2005) 平成 16 年度 森林・林業白書. 300pp, 日本林業協会, 東京.
- 定永恭明・宇野正志・鮫島靖浩・増山敬祐・石川浩哮(1994) スギ花粉症の発症における疫

学的因子の検討. 耳鼻と臨床 40: 34-44.

佐橋紀男(2002) 2002 年のスギ花粉前線. 花粉誌 48(1): 33-40.

齋藤秀樹(1995) 林学からみたスギ花粉症. 耳鼻臨床 補 76: 6-19.

斎藤真己・寺西秀豊(1999) マイクロプレートリーダーを用いた簡便なスギ花粉アレルゲン-  
Cry j 1-の定量法の確立. 日林誌 81: 318-324.

Saito, M. and Teranishi, H. (2002) Immunologic 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. Allergology  
International 51: 191-195.

斎藤真己・平 英彰(2004) 森林施業とスギ花粉生産量の関係. 花粉症研究会会報 16:  
8-12.

Saito, M., Taira, H., and Furuta, Y. (1998) Cytological and genetical studies on male  
sterility in *Cryptomeria japonica* D. Don. J. For. Res. 3: 167-173.

斎藤真己・古賀由美子・古田喜彦・平 英彰(2005) 採種園産実生個体からの雄性不稔スギ  
の選抜 日本森林学会誌 87: 1-7.

斎藤洋三(1991) 花粉症の現状と予防・治療対策. 科学 61: 83-87.

阪口雅弘(1998) スギ花粉アレルゲンエキスの標準化: 主要アレルゲンの分析の意義 アレ  
ルギー 47 (12): 1233-1236.

Sakaguchi, M., Inoue, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M., and Matuhashi, T.(1990)  
Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. Allergy 45:  
309-312.

佐々木義則(1983) 有用樹種の細胞遺伝学的研究[IX]—低稔性等を示すスギおよびヒノキ  
精英樹の細胞学的観察—. 大分林試研究時報 6: 1-20.

佐々木義則・黒木嘉久(1982) 有用樹種の細胞遺伝学的研究[VII]—スギ精英樹にみられ



- る三倍体—日林九支研論 35: 71-72.
- 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.
- 佐藤 庚(1987) 管理. (作物学. 後藤寛治・川原治之助・玖村敦彦・丹下宗俊・佐藤 庚共著, 220pp, 朝倉書店, 東京). 172-210.
- 澤崎 健・板谷英貴・森元和男・山木光男(1997) スギ 51 品種の抗原性の比較. 日立化成テクニカルレポート 28: 41-44.
- 澤谷真奈美・小野昭子・河野恵三・河島トモ子・谷口美文・池上伯郎・臼井美津子・栗本雅司(1994) Enzyme-linked immunosorbent assay による *Cry j* I, *Cry j* II 定量法の開発. アレルギー43(3): 467-473.
- 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・安藤俊作・栗本雅司・松橋直 (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.
- 清藤城宏 (2000) ヒノキ採種園の花粉管理. 林木の育種 197: 1-5.
- 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 85: 237-240.
- 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積所における雄花着花性. 林育研報 15: 1-30.
- Seymour, R. S. and Hunter, M. L. Jr.(1999) Principles of ecological forestry. *In* Maintaining biodiversity in forest ecosystems. Hunter, M. L. Jr. (ed.), 698pp, Cambridge University Press, Cambridge, 22-61.
- 志賀敏夫(2003) 雄性不稔.(細胞質雄性不稔と育種技術. 山口彦之編. 236pp, シーエムシー出版, 東京.) 43-53.
- 信太隆夫・降矢和夫・轡田和子・森美由紀・安枝 浩・石井豊太・秋山一男(1998) 相模原

地区における空中飛散花粉の 1965 年から 1995 年まで 31 年間の推移. 花粉誌  
44(1): 47-76.

染郷正孝・菊池秀夫(1980) スギの人為三倍体および異数体. 林試研報 310: 171-177.

染郷正孝(1982) スギ精英樹にみられる三倍体植物. 林木の育種 123: 11-14.

Sone, T., Komiyama, N., Shimizu, K., Kusakabe, T., Morikubo, K. and Kino, K. (1994)  
Cloning and sequencing of cDNA coding for *Cry j I*, a major allergen of Japanese  
cedar pollen. Biochem. Biophys. Res. Comm. 199: 619-625.

菅谷愛子(1973) 東京都港区における空中花粉分析,特にイチョウ花粉の飛散状況につい  
て. アレルギー 22: 321-325.

Suzuki, M., Ito, M., Ito, H., Baba, S., Takagi, I., Yasueda, H. and Ohta, N. (1996a)  
Antigenic analysis of *Cryptomaria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* using anti-Cry  
j I monoclonal antibodies. Acta Otolaryngol. Suppl. 525: 85-89.

Suzuki, M., Komiyama, N., Ito, M., Ito, H., Sone, T., Kino, K., Takagi, I., Ohta, N. (1996b)  
Purification, characterization and molecular cloning of Chao 1, a major allergen of  
*Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. Mol. Immunol. 33(4/5): 451-460.

鈴木三男(2003) スギと日本人、つきあいの歴史(日本の原点シリーズ 木の文化1 杉 大  
澤一登 編, 139pp, 新建新聞社, 長野). 30-33.

平 英彰(1990) 林業の立場からみたスギ花粉症をとりまく問題点. 花粉症研究会会報 1:  
5-11.

平 英彰(2004) スギ雄性不稔(無花粉スギ)の利用と展望. 林木の育種 213: 8-11.

平 英彰・寺西秀豊・劔田幸子(1991) スギ林の着花状況と空中花粉飛散パターンの関連性  
について. アレルギー 40: 1200-1209.

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. 日本林学会誌 75:  
377-379.

- Taira, H., Saito, M. and Furuta, Y. (1999) Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. J. For. Res. 4: 271-273.
- 平 英彰・斎藤真己・五十嵐正徳・齋藤央嗣(2005) スギ雄性不稔個体の選抜. 林木の育種 216: 17-18.
- 田島正啓(2001) 林木育種研究と最近の成果－林木育種センターを中心として－. 育種学研究3: 103-108.
- 高橋 誠・星 比呂志・岩泉正和・久保田正裕・福田陽子・武津英太郎・栗延 普(2005) 無花粉スギ「爽春」の特性と雄性不稔を取り入れた今後の育種の展開. 林木の育種 216: 55-58.
- 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. 花粉誌 48(2): 103-107.
- Takahashi, Y., Mizoguchi, J., Katagiri, S., Sakaguchi, M, Inoue, S., Ishikawa, M., Tonosaki, A. and Iwao, F.(1989) Development and distribution of the major allergen (Cry j1) in male flower buds of Japanese cedar (*Cryptmeria japonica*). Jpn. J. Allergol. 38(12): 1354-1358.
- 田丸典彦(1991) イネ雄性不稔遺伝子の遺伝子分析と形質発現. 植物細胞工学 3(1): 13-23.
- 田丸典彦(1994) イネの遺伝的雄性不稔性と雑種不稔性に関する育種学的研究. 北大農邦文紀要 19(2): 203-256.
- 田中克己・浜 清(1969) 顕微鏡標本の作り方. 282pp, 裳華房, 東京.
- Taniguchi, Y., Ono, A., Sawani, M. Nanba, M., Kohno, K., Usui, M., Kurimoto, M., and Matuhashi, T. (1995) Cry j 1, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. Allergy 50: 90-93.

- 戸田良吉(1973) 育種. (林業技術誌 第3巻. 日本林業技術協会 編, 833pp, 日本林業技術協会, 東京).1-45.
- 戸田忠夫・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. 育林研報 14: 99-113.
- 津村義彦 (2004) マイクロサテライトマーカーの樹木の遺伝育種研究への利用. 日林誌 86: 184-190.
- Tsumura, Y., Yoshimura, K., Tomaru, N., and Ohba, K. (1995) Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. Theor. Appl. Genet. 91: 1222-1236.
- Wang, X. R., Lindgren, D., Szmidt, A. E., and Yazdani, R. (1991) Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. Scand. J. For. Res. 6: 379-385.
- Wang, Y., Mukai, Y., Fukui, M., Futamura, N., Nagao, A., and Shinohara, K. (1998) Pollen-specific expression of the gene for an allergen, Cry j 1, in *Cryptomeria japonica*. J. For. Res. 3: 131-134.
- Wing, R. A., Yamaguchi, J., Larabell, S. K., Ursin, V. M. and McCormick, S. (1989) Molecular and genetic characterization of two pollen - expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. Plant Mol. Biol. 14: 17-28.
- Wu, Y., Qiu, X., Du, S. and Erickson, L. (1996) PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa. Plant Mol. Biol. 32: 1037-1042.
- 安枝 浩(1991) 花粉アレルギーースギ花粉を中心に. 第31回日本花粉学会シンポジウム抄録集 12-15.
- 安枝 浩(1994) 花粉アレルギーの分析. Pharma Medica 12 (3): 39-43.

安枝 浩(2000) スギ花粉症とスギ・ヒノキ科花粉のアレルゲン. 花粉誌 46(1): 29-38.

Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T., and Shida, T. (1983) Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77-86.

安枝 浩・奥田 稔・吉田彦太郎・伊藤孝治・馬場 実, 他(1996) 我が国におけるアレルゲン標準化の基本方針とスギ花粉アレルゲンエキスの標準化 アレルギー45 ( 4 ): 416-421.

横山敏孝(1977) スギの自殖不稔の主因. 日林誌 59: 389-390.

油井康雄(1979) 抗原1. 主要抗原作製法. (アレルギークリニック. 光井庄太郎 他編, 686 pp, 金原出版, 東京). 35-43.