

# スギ花粉症対策 花粉アレルギーを作らない組換えスギの開発

話題提供者

篠原 健司

(独)森林総合研究所 生物工学研究領域長



我々が進めているスギの遺伝子組換えの話を中心に紹介させていただきます。私どもは新しい樹木を開発するという目的だけでなく、遺伝子組換え技術を使って樹木の遺伝子の機能を解析することにより、樹木の生理現象を解明しようと10年間取り組んできました。その結果、ポプラなど様々な広葉樹の遺伝子組換え技術を確立してきましたが、スギやヒノキ等針葉樹ではほとんど確立されていません。

## 花粉症と治療法

スギの開花・結実通常20～30年生で開始されます。しかし、植物ホルモンの一種であるジベレリンで葉面散布や樹幹注入処理をすると、2、3年生でも花をつけます。雌花はだいたい枝の先端、大きな木であれば表面のほうにつきます。雄花は房状になって少し内側につく傾向があります。スギ花粉は直径が約32 $\mu$ m、円形で小さな突起を持ちます。開花後のスギ花粉の表面には直径が0.5 $\mu$ mのオービクルと呼ぶ大量の微粒子が付着しています。これは通常のガーゼを簡単に貫通します。この微粒子の表面にアレルギーが存在します。したがって、この微粒子を吸うと花粉症が発症します。この微粒子は、空中を飛散している間にだんだん殻を脱ぐような形で取れてくるのですが、オービクルが取れた花粉の中にもアレルギーが大量に存在しますので、花粉症を引き起こるわけです。

スギ花粉の主要アレルギーとして2種類のタンパク質(Cry j 1、Cry j 2)が知られています。これらは多糖類を分解する酵素で、花粉の発芽や花粉管の伸長に機能していると推定できます。人間にとって厄介なものでも、スギにとっては子孫を残すための生殖に重要な役割を果たしています。最近、我々が単離したCry j 3も新規アレルギーと考えられます。詳細は説明しませんが、これらのタンパク質が体内に入ると、最終的にはヒスタミン等の遊離がおこってアレルギーが発症します。

我々が花粉症の薬として飲んでいるのはヒスタミンの遊離を阻害する抗ヒスタミン剤です。それ以外に、アレルギータンパク質や花粉のエキスを飲む減感作療法と呼ばれるもの、比較的副作用の少ないペプチド療法が開発されています。将来の治療法として、単離したアレルギーの遺伝子を利用したDNAワクチンの開発が進められており、体内でアレルギータンパク質を作らせて免疫力を高める手法です。この技術も減感作療法の一つですが、長期間その効果が維持できません。動物実験では成功していますが、未だ認可されていませんので、すぐに使えるわけではありません。

## 林業的方法による花粉抑制

林業分野では花粉の発生を抑制する決定的な手法はあまりありません。ジベレリンの生合成阻害剤を散布することで、スギやヒノキの雄花形成は抑えられます。しかし、環境や動植物に対する影響を考えると、薬剤の大量散布は現実的ではありません。

雄花の大量についた枝を枝打ちしたり、雄花を大量につけた個体を間伐すれば、翌年の花粉の飛散を抑えることができます。しかし、枝打ちや間伐により、光環境がよくなると別の個体の雄花生産が増えるという現象があります。空いたスペースに広葉樹を植える試みもありますが、実験的な検証は未だ済んでいません。枝打ちや間伐を毎年全国のスギ林に施すには膨大な予算がかかります。

雄花が少ないスギに植え替えるという試みも各地でなされています。最近注目しているのは、富山県で開発された雄性不稔個体です。雄性不稔個体の小孢子は大きさが不均一で、成熟花粉は発達せず、花粉を飛散することはありません。この個体を育種素材として使うことにより、花粉を全く飛散しないスギが育種できます。この個体は「はるよこい」という名前がつけられています。

### 遺伝子組換え技術

我々は10年前からスギの遺伝子組換えを始めました。遺伝子組換えには三つの条件が必要です。第一に改良したい形質を支配する遺伝子です。第二に細胞や植物組織に遺伝子を導入する技術です。第三番目は遺伝子を導入した後の個体再生技術です。

形質を改良するための遺伝子の候補として、ジベレリン生合成系酵素遺伝子、花芽形成を制御する遺伝子、雄花の形態形成を支配する遺伝子及びアレルゲン遺伝子が考えられます。例えば、アレルゲン(Cry j 1、Cry j 2)遺伝子は花粉で大量に発現します。Cry j 3遺伝子は発現する場が様々です。6種類のCry j 3遺伝子のうち、Cry j 3.5遺伝子だけが花粉で比較的大量に発現します。シロイヌナズナやイネでは情報のないCjimp1と名付けた花粉で大量に発現する新規遺伝子も単離しました。また、雄花でしか発現しない雄花の形態形成を支配する遺伝子を単離しました。その他、スギのゲノム研究の進展により、スギの遺伝子組換えに十分な遺伝子情報を保持することができました。

次は遺伝子を導入するシステムの開発です。米国コーネル大学のグループが開発した装置を改良したパーティクルガンと呼ばれる装置を使用しています。金属粒子の表面に導入遺伝子を付着させ、細胞や組織に打ち込むと、細胞の中に入った金属粒子から導入遺伝子が遊離し、ゲノムの中に組み込まれます。この技術を用い、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子をスギの培養細胞や植物組織へ導入し、安定に発現させることに成功しました。

しかし、個体再生系ができないと遺伝子組換えはできません。そこで、不定胚を介した個体再生技術の開発を進めました。通常の子実にある胚(種子中で植物体になる部分)に対して、培養細胞から人為的に発生させた胚を不定胚といい、これを作り出す技術が不定胚誘導技術です。これまで、スギの不定胚誘導は大変困難で、ここ数年やっと低頻度で成功するようになってきました。我々はファイトスルフォカイン(PSK)を用いることにより、効率的で有用な技術を確立しました。PSKは、名古屋大学で発見された植物ホルモン様の作用をする細胞増殖因子です。5つのアミノ酸からなるペプチドで、PSK前駆体タンパク質から切り出されて生成します。通常、植物の培養細胞は一定の細胞密度以下では分裂・増殖しませんが、このPSKを添加することで低い細胞密度

でも増殖するようになりました。このPSK前駆体タンパク質の遺伝子の存在はイネなどの被子植物で報告されていますが、この遺伝子をスギから単離し、原始的な裸子植物にもPSKが存在することを世界で初めて証明しました。

### 組換えスギの個体再生

個体再生は次のように行います。スギを夏にジベレリン処理します。翌年の6月下旬に採った球果を割り、未成熟種子を単離します。未成熟胚を単離し、embryogenicカルスを誘導します。PSKを添加し、このカルスから培養細胞を誘導します。スギの培養細胞を増殖させ、一定の細胞密度で不定胚を誘導させる培地上に散布し培養すると、培地上に不定胚が形成します。このとき、培地にPSKを添加することで、不定胚誘導効率を従来の約10倍以上に高めることができました。この不定胚を発芽させると、正常なスギ幼植物体が再生します。このシステムでは、不定胚から培養細胞を誘導し、再度不定胚形成を繰り返すこともできます。PSKはスギ培養細胞の分化能力(幼若性)の維持にも顕著な効果を示します。こうしてやっと個体再生技術を確立しました。

実際にはいくつかの系統のセルラインを維持しています。フラスコに増殖させた培養細胞をろ紙上に集め、そのままシャーレ上に移します。パーティクルガン法で組換え遺伝子を打ち込んで、薬剤選抜により組換え遺伝子が導入した培養細胞だけを選抜します。選抜薬剤としてはハイグロマイシンを使用します。組換え遺伝子にはアレルゲン(Cry j 1、Cry j 2)遺伝子をアンチセンス方向につないだバイナリーベクター使用しています。アンチセンス法は、細胞内で転写される特定のmRNAに対し相補的なアンチセンス鎖mRNAが大量に転写されるように遺伝子組換えを行う方法で、タンパク質合成に利用される特定のmRNAの有効量を減少させるものです。現在、積極的に組換えスギの開発を進めています。近い将来、アレルゲン生産量を抑制した、あるいは雄花の形成を抑制した組換えスギが作出できる段階にまで来ております。

(2004年2月13日)

SAT