

令和元年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07261

研究課題名(和文) パンコムギにおけるアレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質特異的抑制因子の同定

研究課題名(英文) Molecular characterization of gliadins in aneuploid lines of Chinese Spring wheat

研究代表者

川浦 香奈子 (Kawaura, Kanako)

横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号：60381935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コムギにおいて、多重遺伝子にコードされるグリアジン分子種の特徴づけを目的とした。コムギの種子貯蔵タンパク質の中で、グリアジンは特にコードする遺伝子のコピー数が多く、一部がヒトのアレルギーやセリアック病の原因となる。パンコムギの染色体異数体系統の種子からグリアジンを抽出し、二次元電気泳動により比較した。グリアジンは70個に分離でき、それぞれをコードする遺伝子座を同定した。その中で、セリアック病の原因となるグリアジンの遺伝子座が欠失している系統を見出した。また、このグリアジンに特異的な抗体を作製した。これらの系統や抗体を用いることで、低アレルゲン小麦作出へ応用できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多重遺伝子にコードされるためコピー数が非常に多く、小麦アレルギーの原因ともなるコムギ種子貯蔵タンパク質の特徴づけを行った。その中で、アレルギーの原因となる特定の種子貯蔵タンパク質が欠失しているコムギ系統を見出した。これらから、低アレルゲン小麦作出に向けた基盤となる情報を示した。

研究成果の概要(英文)：Seed storage proteins are encoded by multigenes in bread wheat. Gliadins are encoded by extremely large multigene family and some kinds of them cause allergy symptoms or celiac disease (CD) in human. To characterize distinct gliadins, two-dimensional electrophoresis was conducted using gliadins extracted from aneuploid lines of Chinese Spring wheat. Gliadins were separated into 90 spots and these spots were assigned to the chromosomal loci. Among lines, we found lines in which specific gliadins harboring CD epitopes were absent. Genomic PCR showed that these lines carry deletion of the chromosome segment containing the gliadin locus on the 6D chromosome. In addition, an antibody, which reacts the specific gliadins harboring CD epitopes, were designed and constructed. These lines and the antibody could be useful resource in breeding programs for reduction of CD immunotoxicity.

研究分野：植物ゲノム科学

キーワード：パンコムギ 種子貯蔵タンパク質 小麦アレルギー グリアジン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パンコムギの種子貯蔵タンパク質はグルテンを形成し、小麦粉の加工適性を決定する主要な成分である。一方で、一部の種子貯蔵タンパク質は小麦アレルギーや小腸の炎症を引き起こすセリアック病の原因となる。近年、小麦アレルギー患者の増加は深刻化しており、患者用に小麦粉を化学処理によりアレルゲンを減じる試みがされているが、小麦粉としての物性が変化してしまうため十分に活用されていない。そのため、小麦粉のタンパク質の全体の含有組成を変えずにアレルギーに対するエピトープをもつタンパク質のみ減らしたコムギを育種・栽培することができれば、有用であると考えられる。

パンコムギの種子貯蔵タンパク質は主にグルテニンとグリアジンからなり、グルテニンは高分子サブユニット(HMW-GS)と低分子サブユニット(LMW-GS)、グリアジンは / ()、 、 に分類される。それぞれをコードする遺伝子は多重遺伝子族を構成し、特に グリアジン遺伝子は系統によって異なるがゲノム中に数10から100以上の多くのコピーが存在すると推定されている。我々はパンコムギ実験標準系統 Chinese Spring (CS) および CS の染色体異数体系統の種子からグリアジンを抽出し、二次元電気泳動を行うことによりグリアジンの網羅的解析を行った。その結果、グリアジンタンパク質を70分子に分離することができ、それぞれの分子が由来する染色体を同定することができた。さらに興味深いことに、2A染色体が正常系統より2倍多いテトラソミック系統において6D染色体に由来するグリアジンの一部が抑制されていることを見出した。さらに、染色体置換系統を調査したところ、CSのグリアジンを抑制する同様の効果を2D染色体にもつ系統が見つかった。また、我々はESTs(Expressed Sequence Tags)によるトランスクリプトーム解析およびゲノム解析を行い、高度に重複した グリアジン遺伝子を個別に区別した解析を進めてきた。

トウモロコシやイネにおいて、種子貯蔵タンパク質を誘導するbZIPやDOF転写因子が報告されており、パンコムギにおいても相同性の高い遺伝子が報告されている。これらイネ科作物において種子貯蔵タンパク質遺伝子が共通して持ち、それぞれの転写因子が結合するシス配列プロラミンボックスが報告されている。これにより、イネ科作物では種子貯蔵タンパク質が種子登熟期特異的に斉一的に発現誘導されていると推察されている。しかしながら、我々のトランスクリプトーム解析からは、パンコムギの種子登熟期における グリアジン遺伝子の個別の発現パターンは画一的ではないことが示されている。

パンコムギ染色体置換系統において2D染色体に、CSの2A染色体と同様に、6D染色体に由来するアレルギーのエピトープを持つグリアジンを抑制する効果があることを見出したことから、この系統とCSを交配した分離集団を作成し、連鎖解析を行うことができると考えられた。また、CSの染色体腕毎のゲノム概要配列が公開されたため(IWGSC, 2014)、特定の染色体の遺伝子を効率よく同定できるようになった。これらのことから、 グリアジン多重遺伝子の中で特定の遺伝子のみを抑制する因子の同定が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

パンコムギにおいて小麦粉のグルテンの構成成分である種子貯蔵タンパク質の中で、小腸の炎症を起こすセリアック病のエピトープをもつタンパク質のみを抑制する因子の同定を目的とした。パンコムギの種子貯蔵タンパク質は多重遺伝子にコードされており、中でも グリアジンは特に遺伝子のコピーが多い。また、異質倍数体であるため同祖遺伝子が存在する多コピーの遺伝子にコードされる。これまでに、6D染色体に由来しアレルギーのエピトープをもつグリアジンタンパク質を選択的に抑制する効果が2A染色体にあることを見出した。この因子を同定し、多数の分子種がある中で抑制されるグリアジンの特性を明らかにすることで、ゲノム間または染色体間の遺伝子調節機構を明らかにするとともに、低アレルゲン小麦作出への応用を図ることを目指した。

3. 研究の方法

特定のグリアジンを抑制する因子のマッピングスクローニングに向け、パンコムギの正常系統(Chinese Spring; CS)とバックグラウンドはCSでグリアジン遺伝子を抑制する効果を持つ2D染色体のみ置換した系統(KT723)を相互に交配し、2D染色体に関するF₂分離集団を作製した。F₂系統の種子を半切し、胚乳側はタンパク質を抽出後、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット解析を行い、特定のグリアジンタンパク質の蓄積量の推定に用いた。種子の胚側は催芽し、実生よりゲノムDNAを抽出して遺伝子型の判定に用いた。CSと特定のグリアジンが抑制されているKT723において、種子登熟期におけるRNA-Seqを行い、参照ゲノム配列(IWGSC, 2014)にマップし、2D染色体に座乗して発現量の異なる遺伝子を探索した。また、RNA-Seqによる配列情報から、KT723とCSにおいて多型のあるSNPマーカーを作出した。

特定のグリアジンやその他のグリアジンの発現を定量するため、CS、KT723およびCSの6群染色体異数体系統の登熟期の種子を、開花後9日後から3日おきに21日後まで経時的にサンプリングした。遺伝子発現量は、グリアジン遺伝子のアレル特異的なプライマーを用いた定量的RT-PCRにより調査した。さらに、定量的RT-PCRと同じプライマーを用いてゲノムPCRを行い、遺伝子座の有無を確認した。

多数の分子種があるグリアジンをタンパク質レベルで区別するため、抗体を作製した。グリアジン遺伝子の網羅的な配列の取得(Noma et al. 2016)から得られた完全ORFを含む50遺伝

子の塩基配列からアミノ酸を推定した。それらから、サブゲノム特異的な9残基を選出し、ウサギ抗ペプチド抗体を作製した。

4. 研究成果

パンコムギの正常系統(CS)とグリアジン遺伝子を抑制する効果を持つ2D染色体のみ置換した系統(KT723)を交配し、2D染色体に関するF₂分離集団を作製した。正逆の交配で、F₂系統62個体ずつ種子を半切し、胚乳側はタンパク質を抽出した。セリアック病のエピトープ配列をもとに作出した抗ペプチド抗体Gli-9を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、CS×KT723では45個体で正常型、17個体で特定のグリアジン抑制型を示し、KT723×CSでは49個体で正常型、13個体で抑制型を示した。どちらもカイ二乗検定で3:1の分離比に適合したことから、特定のグリアジンの抑制は劣性1遺伝子座によることが推察された。また、KT723とCSにおいて、種子登熟期におけるRNA-Seqを行い、2D染色体に座乗して発現量の異なる遺伝子を探索した。さらに、RNA-Seqによる配列情報から、KT723とCSにおいて多型のあるSNPマーカーを作出した。タンパク質の評価を行った同じ種子の胚側は発芽させ、実生よりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAに対して、作出したSNPマーカーや既知のSSRマーカーを用いて遺伝子型を判定した。しかしながら、表現型との連鎖のあるDNAマーカーは得られなかった。

特定のグリアジンの抑制が転写レベルで起こっているのかを明らかにするため、CS、KT723およびCSの6群染色体異数体系統を用いて定量的RT-PCRにより遺伝子発現量を調査した。また、特定のグリアジンの転写が抑制された場合、他のグリアジン遺伝子の転写レベルが変化するのかも検証した。KT723では、調査した登熟期のステージすべてで、6D染色体をもたないナリソミック6D(N6D)系統と同様に、6D染色体上の遺伝子座にコードされるグリアジン遺伝子の発現は見られなかった。一方で、ナリソミック6Dテトラソミック6A(N6DT6A)系統では6A染色体を2対もつため6A染色体上の遺伝子座にコードされるグリアジン遺伝子の発現量が増加していた。さらに、6A染色体を正常系統と同様に1対しか持たないKT723においても、6A染色体に由来するグリアジンの発現量が増加している傾向が見られた。これらのことから、グリアジン遺伝子の発現量はサブゲノム間で補完する可能性が考えられた。

ゲノム中のグリアジン遺伝子座の存在を確認するため、定量的RT-PCRに用いたプライマーと同じプライマーを用いて、CS、KT723、6群染色体異数体系統、特定のグリアジンの抑制が見られたT2A系統のゲノムPCRを行った。その結果、KT723はCSの2D染色体が品種Timsteinに置換された系統であり、N2BT2A系統およびN2DT2AはCSの2A染色体が2対ある系統であるが、どちらでも6D染色体上のグリアジンの遺伝子座が欠失していることが示された。従って、2群染色体に6D染色体に由来するグリアジン遺伝子を特異的に抑制する因子が存在するのではなく、異なった系統であるにも関わらず6D染色体上に同様の欠失が生じていることが明らかになった。

定量的RT-PCRにより、多重遺伝子にコードされるグリアジンが、サブゲノム間で遺伝子発現量を補完しあう可能性が示された。そのため、タンパク質の蓄積レベルでどうなっているのかを調査するため、サブゲノムごとのグリアジンを区別する抗体を作出した。CSにおけるグリアジン遺伝子のORFの配列からアミノ酸配列を推定し、サブゲノム特異的な9アミノ酸残基を選出し、6A染色体に由来する2種、6B染色体に由来する4種のウサギ抗ペプチド抗体を作出した。既知のセリアック病のエピトープ配列をもとに同様に4種のウサギ抗ペプチド抗体を作出した。二次元電気泳動を行い、作製した抗体でウエスタンブロット解析を行い、特異性を調査した。その結果、1種(A#5)で6A染色体に由来するグリアジンスポットに特異的に反応し、2種(B#3、B#10)で6B染色体に由来するグリアジンスポットに特異的に反応することが示された。セリアック病のエピトープ配列をもとに作製された抗体では1種(Gli-9)が6D染色体のグリアジンスポットに特異的に反応することが確認できた。これらの抗体を用いて、遺伝子発現量を調べた系統の種子から抽出したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、ウエスタンブロット解析を行った。6D染色体のグリアジン遺伝子座が欠失しているKT723において、遺伝子発現量と同様にタンパク質蓄積量においても6A染色体に由来するグリアジン量が多くなる傾向が見られた。

本研究において、当初、同定する計画であった特定のグリアジン遺伝子を抑制する因子は存在しないことが明らかになった。しかしながら、KT723やテトラソミック2A系統では、特定のグリアジンをコードする遺伝子座が欠失していることが明らかになった。さらに、特定のグリアジンは、セリアック病のエピトープをもつことから、これらの系統がヒトのセリアック病の誘発を低減させる小麦粉を産生する系統の母本になりうると考えられる。一方で、セリアック病や小麦アレルギーの患者に対して反応性の高いエピトープとして知られるアミノ酸配列は、さまざまなグリアジン分子種に存在する。本研究では、多重遺伝子にコードされるグリアジンタンパク質は、サブゲノム間で遺伝子発現量を補完し、タンパク質の蓄積量も補完される可能性が示されたことから、一部のグリアジンを減らすことだけでは低アレルゲン小麦を作出することは困難であることが示された。

<引用文献>

The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2014) A

chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome, *Science* 345(6194)

Noma S, Kawaura K, Hayakawa K, Abe C, Tsuge N, Ogihara Y. (2016) Comprehensive molecular characterization of the / -gliadin multigene family in hexaploid wheat, *Molecular Genetics and Genomics* 291(1): 65-77

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Noma S, Hayakawa K, Abe C, Suzuki S, Kawaura K*. (2019) Contribution of -gliadin alleles to the extensibility of flour dough in Japanese wheat cultivars. *Journal of Cereal Science* 86: 15-21

DOI: 10.1016/j.jcs.2018.12.017

Kawaura K*, Miura M, Kamei Y, Ikeda TM, Ogihara Y. (2018) Molecular characterization of gliadins of Chinese Spring wheat in relation to celiac disease elicitors. *Genes & Genetic Systems* 93(1): 9-20

DOI: 10.1266/ggs.17-00034

Noma S, Kawaura K* (co-first author), Hayakawa K, Abe C, Tsuge N, Ogihara Y. (2016) Comprehensive molecular characterization of the / -gliadin multigene family in hexaploid wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 291(1): 65-77

DOI: 10.1007/s00438-015-1086-7

[学会発表] (計 3 件)

Kawaura K, Miura M, Kamei Y, Ikeda TM, Ogihara Y. Characterization of gliadins using aneuploids of Chinese Spring wheat reveals genome-specific gliadin regulation. 13th International Wheat Genetics Symposium. 2017 年 4 月

鈴木彩夏、亀井葉子、三浦麻友子、荻原保成、川浦香奈子 パンコムギ Chinese Spring の特定の -グリアジンを抑制する因子の解析 日本育種学会第 131 回講演会 2017 年 3 月 名古屋大学

Kawaura K, Miura M, Ikeda TM, Ogihara Y. Characterization of gliadins using aneuploid lines in Chinese Spring wheat. *Plant and Animal Genome XXIV*. 2016 年 1 月

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。