

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02530

研究課題名(和文) アレルゲン欠失・低減化ソバ育成を目指した食品化学・臨床医学・育種学融合研究

研究課題名(英文) Integrated research on food chemistry, clinical medicine, and breeding for allergen-free and allergen reduced buckwheat

研究代表者

大澤 良 (Ohsawa, Ryo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80211788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ソバの種子中アレルゲンタンパク質、特に重篤な症状を招くFag e 2タンパク質の低減・消失が目的である。

その結果、そば遺伝資源においてFag e 2遺伝子領域内に多様な変異を見出した。抗Fag e 2抗体との反応性は自殖性系統ごとに異なっていること、さらにその反応性の変異は遺伝的であることを明らかにした。自殖性個体中における、抗Fag e 2抗体との反応性強個体と極弱個体を用いて、抗Fag e 2抗体反応性における遺伝解析を実施するための分離集団を作製し、単項分布の遺伝的分離を確認した。これはアレルゲンタンパク質量の多少が複数の量的遺伝子によって制御されていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、他殖性作物のソバにおいて、自家和合性系統群の作製に成功したことである。他殖性ソバ集団内の多様な変異を顕在化させ、選抜・固定し、ゲノムレベルでのプロファイリングおよびアレルゲン性評価を実施できたためアレルゲン低減化品種育成を可能にした。また、アレルゲン反応性の強弱は単一の遺伝子効果ではなく、量的な形質として把握するべきであることを明らかにしたのは本研究が世界でも初めてである。本研究によってノンアレルゲンソバ品種の育成が可能となり、国内外需要が上昇し、6次産業化が生じること、消費者が安心して食せるようになること、並びに混入・誤食被害が緩和されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reduce or eliminate allergenic proteins in buckwheat seeds, especially the Fag e 2 protein that causes anaphylactic shock.

As a result, we found diverse mutations within the Fag e 2 gene region in buckwheat genetic resources. It became clearly that the reactivity to anti-Fag e 2 antibody was different among self-lines which were bred ourselves and that the reactivity variation was also hereditary. We generated segregating populations for genetic analysis of anti-Fag e 2 antibody reactivity using strong and weak reactivity individuals among self-lines, and confirmed the genetic segregation of a monomial distribution. This suggests that the abundance of allergenic proteins is regulated by QTL genes.

研究分野：植物育種学

キーワード：ソバ アレルゲン 自殖化 QTL

## 1. 研究開始当初の背景

ソバアレルギー患者は、特定の抗原(ソバアレルゲン)に対し過剰な免疫反応を起こし、微量の摂取であっても時に死に至る重篤な症状(アナフィラキシー)を惹起することが知られており、食品業界や学校給食現場などからソバのアレルゲン欠失・低減化が強く求められていた。

臨床医学界では、治療におけるアナフィラキシーのリスクを低くした経口免疫療法用のソバ抗原に関心がもたれているため、完全欠失型ではなくとも、ソバ抗原が低減化した系統の育成が期待されていた。

これまでに、ソバアレルゲンについては *Fag e 1*, *Fag e 2*, *Fag e 3*, 10Kd のアレルゲンが特定され、*Fag e 1* については国内で報告 (Sano, 2014, Khan et al 2012) されていたが、ソバアレルゲンの遺伝解析には至っておらず、世界的にも研究が進んでいなかった。

本研究の共同研究者である食総研(現農研機構 食品研究部門)グループは、アレルゲンの中でもアナフィラキシーの原因アレルゲンであるタンパク質 *Fag e 2* に注目し、その完全長 cDNA を単離し (Koyano et al., 2006)、消化液に対する耐性能 (Satoh et al., 2008) や抗原抗体反応の認識配列である IgE (B 細胞) エピトープ配列 (Satoh et al., 2010) を明らかにしてきた。また、質量分析などのプロテオミクス手法と患者血清を用いたイムノブロットとを組み合わせたアレルゲン群の迅速・網羅的検出により、複数の新規ソバアレルゲン候補タンパク質の検出に成功していた (佐藤ら, 2011)。

ラッカセイで系統間のアレルゲンタンパク質の質的および量的差異は遺伝的であると推定されたことから (Guo et al., 2008) ソバにおける遺伝的変異を探索するために、種子貯蔵タンパク質群の解析および抗 *Fag e 2* 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、ソバ品種間での *Fag e 2* の質的・量的変異の検出を試みた。しかし、*Fag e 2* 解析において品種間差異は認められず、アレルゲン変異個体の探索は極めて困難であった。

筑波大学グループは、その原因を他殖性のソバにおいて同一品種内の多数個体由来の種子を混合して、タンパク質を抽出する一般的な調査法をとったことによってソバ集団内に存在するかもしれない個体変異を把握できていない可能性があると考えた。

そこでソバ品種の 1 粒の種子ごとにタンパク質を抽出し、その電気泳動パターンの比較および *Fag e 2* の検出を行う予備実験を実施した。その結果、ウサギ由来抗 *Fag e 2* 抗体との結合活性が低減している変異を見出した。この結果は、*Fag e 2* アレルゲンが欠失した、あるいは低減した個体が集団内に存在する可能性を示唆していた。

しかし、ソバでは、ダイズ種子成分解析における半粒法のように分析対象とした種子から生育個体を得ることができず、種子において見出した変異個体を選抜し遺伝解析することができない。しかし、ソバにおいても遺伝的に固定した多数の自殖系統を育成することで個体単位の多様性解析が可能となる。筑波大では、早くより DNA マーカーを駆使したソバの解析および育種選抜法の研究を行い (Iwata et al., 2005, Hara and Ohsawa 2013, Yabe et al., 2014) ゲノム全体をカバーする高カバー率連鎖地図の作製を行うと共に、自殖性近縁種から自家和合性を導入した自殖性系統を作製し、遺伝解析に供試可能な実験リソースの整備を開始していた。また、アレルゲン欠失・低減化個体育成では、遺伝子領域内の変異の把握とイムノブロットなど生化学的変異把握が必要となるが、我々は *Fag e 2* 遺伝子内のエピトープ配列内に人為的に変異を生じさせると抗体結合活性が減少することを明らかにしていた (Satoh et al., 2010)。エピトープ配列内に変異が生じてても抗体結合活性が完全に欠失せず、量的な変異を示す原因としては、1 アミノ酸の変異だけでは抗体結合活性の欠失には不十分である可能性、他のエピトープ配列が存在する可能性、*Fag e 2* 遺伝子の発現調節に関わる遺伝子のようなアレルゲン関連 QTL が存在し制御している可能性などが挙げられた。

アレルゲンタンパク質の生化学的定量による量的変異はアレルギー反応性と結びつくが、これらの血清を用いた生化学的解析結果がブリック反応など臨床検査の結果と一致しないことも知られていた。アレルゲンの遺伝解析をするにはそれらの関連も明らかにしながら量的解析を行う必要があった。

本研究では、アレルゲン欠失・低減化のために、*Fag e 2* を中心として、生化学的および臨床検査によるアレルゲン定量値との関連解析を行うとともに、全ゲノム領域を対象として生体検査におけるアレルゲン反応性と関連付けながらアレルゲンの QTL 解析を行いアレルゲンタンパク質の質的・量的変異の遺伝的機構解明を行うこととした。

## 2. 研究の目的

アレルギー食品として知られているソバの種子中アレルゲンタンパク質の消失・低減を目

指す研究である。本研究は、他殖性であるソバを自殖化した集団を用い、アレルゲンタンパク質の遺伝子解析による集団内アレルゲン関連遺伝子変異個体の選抜、選抜個体の食品化学によるアレルゲンの定性・定量解析、および臨床医学による生体検査を用いた正確なアレルゲン反応の把握を同時進行し、ソバアレルゲンタンパク質の定量的・定性的遺伝解析を行う。これまで個別科学分野では対応出来なかった遺伝子・タンパク質・生体反応を一貫して把握することでアレルゲン欠失・低減ソバ品種育成の実現を目指した国内外で初の異分野融合育種学研究である。

### 3. 研究の方法

#### 1) 自殖固定系統の作出

今後のアレルゲンタンパク質の遺伝解析に供するために、日本国内各地で栽培されている在来種が保有する遺伝的変異を固定させた自殖固定系統を多数育成する。ソバは主に日長反応性に基づく生態型に分化していることが知られており、生態型内にも多様性が保有されている。そこで各生態型を考慮し、可能な限り多様な自殖固定系統の育成を試みた。

そのために、九州地域在来種由来自殖固定系統、関東地域在来種由来自殖固定系統、北海道在来種由来自殖固定系統の作出および栽培特性評価を行った。

九州地域在来種由来系統の育成には、これまでに、栽培特性が優れる自家和合性系統 KSC7 を自家和合性品種「中間母本農 1 号 (九州 PL4 号)」を用いて作出した。これを花粉親として、九州を中心とした西日本地域の在来種と交配することで、在来種に存在する対立遺伝子の遺伝的効果の顕在化を図る。関東地域在来種由来自殖固定系統の作出および栽培特性評価には、北農研で作出された自家和合性系統を花粉親として、関東を中心とした東日本地域の在来種と交配することで、在来種に存在する対立遺伝子の遺伝的効果の顕在化を図った。北海道地域在来種由来自殖固定系統の作出および栽培特性評価には、北農研で開発した自家和合性系統を花粉親として、北海道を中心とした北日本地域の在来種と交配することで、在来種に存在する対立遺伝子の遺伝的効果の顕在化を図った。

#### 2) 各系統の遺伝的プロファイリング

既知のアレルゲン関連遺伝子領域を含むゲノムワイドマーカーを用いた各系統の遺伝的プロファイリングを実施し、アレルゲン性に変異を有する固定系統を選定するとともに、自殖固定系統の遺伝的関係を明らかにした。

##### アレルゲン遺伝子領域内変異解析

自殖固定系統作出過程の系統を用いて、これまでに調査されたアレルゲン遺伝子領域 (*Fag e 2*) に加え、3つの既知アレルゲン遺伝子領域 (*Fag e 1*, *Fag e 3*, *10kDa*) において塩基配列情報を取得し、ソバ集団内に含まれる塩基多様性程度を調査する。この情報と自殖固定各系統の塩基配列情報を用いて、アレルゲン遺伝子領域における各系統の遺伝的プロファイリングを実施した。

##### ゲノムワイド解析

ゲノムワイドに座乗する既存の DNA マーカーの大部分は一塩基多型に基づくため、系統間の遺伝的関連性解析において解像度が低くなる可能性がある。そこで、解析に適した既存の SSR マーカーに加え、大規模ソバゲノム情報を利用してゲノムワイドに座乗する SSR マーカーの作製を実施した。既存および追加した DNA マーカーを用いて、自殖固定各系統の遺伝的プロファイリングを実施し系統間の遺伝的関係性を解析した。

### 3) 各系統のアレルゲンタンパク質検出・定量およびアレルゲン性の評価

これまでの行ってきたアレルゲン検出および定量法をさらに発展させた、あるいは新たな手法により、複数のソバアレルゲンを対象に検出できる手法の確立を目指し、複数のソバアレルゲンを対象に、各系統のアレルゲンの検出およびその定量を試みた。

#### アレルゲンタンパク質検出・定量およびアレルゲン性の評価法の改良

一般に、各系統のソバに含まれるアレルゲンの検出は、1種類のアレルゲンを対象とした手法により行ってきた。また、発現量の精密比較などの定量解析に対応することが出来ていなかった。本課題では、複数のアレルゲンを同時に検出できる手法の開発を実施し、これに解析ソフトウェアを導入した定量解析を実施することで、複数のソバアレルゲンをより迅速かつ簡便に検出・定量できる手法の確立を目指した。

#### 新規ソバアレルゲン特異的抗体の作製およびその評価

ソバ主要アレルゲンとしてすでに *Fag e 1*、*Fag e 2*、*Fag e 3*、および 10kDa アレルゲンが同定されており遺伝子塩基配列も明らかにされている。特異的抗体として保有しているものは *Fag e 2* 特異的抗体のみであるため、本課題では、既存の遺伝子塩基配列情報を活用することで、*Fag e 1*、*Fag e 3* および 10kDa アレルゲン特異的抗体を作製し、その有用性を既存法による評価を試みた。得られた手法によって、自殖固定系統の評価を実施した。

## 4. 研究成果

### 1) 自殖固定系統の作出について

日本国内各地で栽培されている在来種が保有する遺伝的変異を固定させた自殖固定系統を作出するために、鹿児島から北海道の在来種・品種・系統集団内(52 集団)の他殖性個体と自家和合性系統とを交配し自殖化を行った。各  $F_1$  自殖性系統に対して、自殖弱勢や生育異常を示した個体を淘汰し等長柱花(自家和合性)を選抜することで世代を進め固定化を行った  $F_5$  種子を計 1,312 系統(西日本由来: 486 系統, 東日本由来: 280 系統, 北日本由来: 546 系統) 作出できた。

育成した自殖固定系統は、日長反応性(開花まで日数)において夏型から秋型までの日本国内各地で栽培されている在来種が保有する遺伝的変異を広く含んでいた。また、平均採種量の約 5.3 倍を示す多収性自殖系統も確認されたこれらの作出した自殖固定系統における変異の固定は進んでおり、アレルゲン性の遺伝解析に限らず今後のソバ遺伝解析の際の供試材料として有用な系統群である。

### 2) 各系統の遺伝的プロファイリング

アレルゲン関連遺伝子領域における遺伝的プロファイリングに関しては、重篤なアレルギーを惹起すると考えられ、重要度の高い *Fag e 2* 遺伝子および *Fag e 2* 遺伝子と配列相同性の高い 10kDa 遺伝子において塩基配列変異解析を実施した。その結果 *Fag e 2* 遺伝子領域において、25 個のハプロタイプからなる 21 通りのアミノ酸配列パターン、10kDa 遺伝子領域において 4 個のハプロタイプからなる 3 個のアミノ酸配列を明らかにした。これらのアミノ酸配列の中にはアレルゲン性に影響を与えると考えられるエピトープ配列部位に変異が生じているアミノ酸配列や、タンパク質の疎水性や立体構造の変化をもたらすと推察されるアミノ酸配列が含まれていた。*Fag e 3* 遺伝子に関しては、これまでの塩基配列解

析結果や Fag e 3 特異的抗体におけるウェスタンブロット像において、非特異的応答が確認されていることから、配列相同性の高い遺伝子領域が複数存在することが示唆された。

アレルギー性変異固定系統選定においては、作出した自殖固定系統に対するアレルギー関連遺伝子領域における変異情報、アレルギー性の検定・定量結果に基づいて、アレルギー性に変異を有する固定系統を選定するとともに、今後の低アレルギー性品種育成における有望系統となる Fag e 2 における 2 つのタイプの低アレルギー性自殖固定系統を獲得した ( 図 1 )。

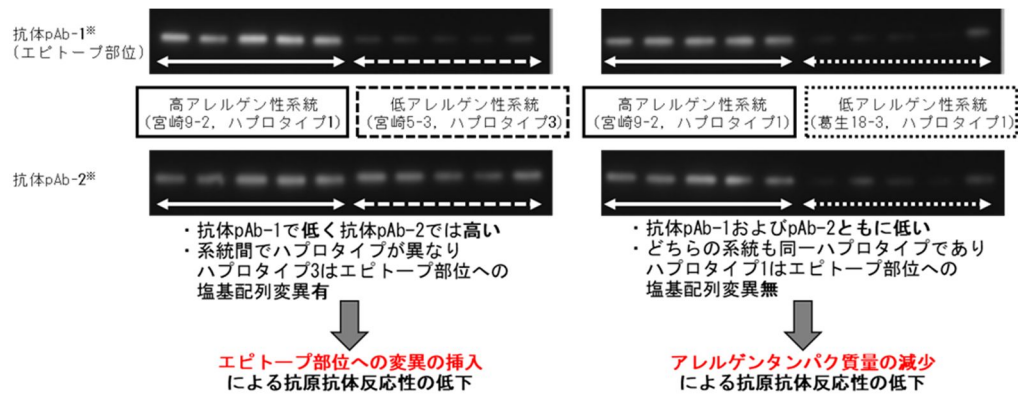


図 1 獲得した 2 つのタイプの Fag e 2 低アレルギー性自殖系統

### 3) 新規ソバアレルギー特異的抗体の作製およびその評価

作製された 4 つの主要ソバアレルギー ( Fag e1, Fag e 2, Fag e 3, 10kDa ) のそれぞれにおいてアレルギー性を特異的に検出可能な新規抗体が作製できた。そこでアレルギータンパク質検出・定量およびアレルギー性の評価法の改良においては、作製された抗体を用いて、各アレルギータンパク質の検出をウェスタンブロット法および ELISA 法による検出・定量を試み、迅速・簡易に検出・定量することに成功した。続いて 4 つのアレルギーを同時に検出する手法の構築を試みたが、同時検出にはソバタンパク質の分離条件および抗体使用濃度のさらなる最適化が必要であるということが明らかとなった。このことから、抗体を用いることなく複数のアレルギーを検出・定量する手法である 2D DIGE 法を試み、4 つのアレルギーを検出・定量する手法を確立できた。

この方法によって、本課題で作出された自殖系統に対するアレルギー性の評価を行い。アレルギー性において系統間で差異があることを確認した ( 図 2 )。

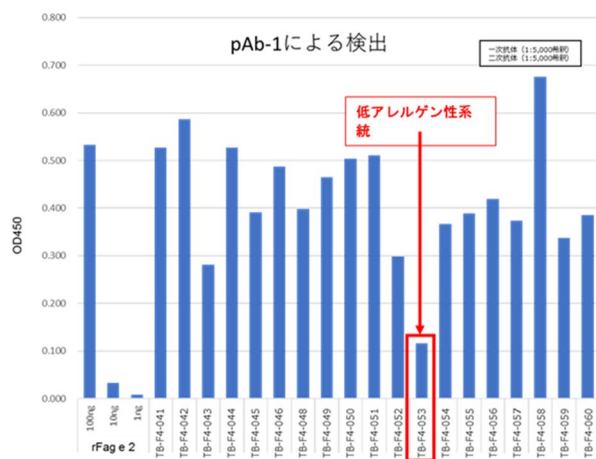


図 2 ELISA 法による自殖固定系統の Fag e 2 アレルギー性検出・定量

rFag e 2 は濃度既知の標準品、TB-F4-041 等は各自殖固定系統を示す。OD450 は 450nm における吸光度を示し値が高いほど Fag e 2 量が多いことを示す

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐藤 里絵、大澤良、手島玲子	4. 巻 39
2. 論文標題 アレルギー低減やアレルギー診断に資するソバアレルギーの研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 20-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohsawa Ryo	4. 巻 70
2. 論文標題 Current status and prospects of common buckwheat breeding in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 3-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.19108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara Takashi, Shima Taeko, Nagai Hiroya, Ohsawa Ryo	4. 巻 70
2. 論文標題 Genetic analysis of photoperiod sensitivity associated with difference in ecotype in common buckwheat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 101-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.19118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yabe Shiori, Hara Takashi, Ueno Mariko, Enoki Hiroyuki, Kimura Tatsuro, Nishimura Satoru, Yasui Yasuo, Ohsawa Ryo, Iwata Hiroyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Potential of Genomic Selection in Mass Selection Breeding of an Allogamous Crop: An Empirical Study to Increase Yield of Common Buckwheat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2018.00276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Rie, Jensen-Jarolim Erika, Teshima Reiko	4. 巻 70
2. 論文標題 Understanding buckwheat allergies for the management of allergic reactions in humans and animals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 85-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morishita Toshikazu, Hara Takahiro, Hara Takashi	4. 巻 70
2. 論文標題 Important agronomic characteristics of yielding ability in common buckwheat; ecotype and ecological differentiation, preharvest sprouting resistance, shattering resistance, and lodging resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 39-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤康人	4. 巻 2
2. 論文標題 食物アレルギーコンポーネント	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 栄養	6. 最初と最後の頁 215-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koizumi D, Shirota K, Oda H, Adachi R, Sakai S, Akiyama H, Nishimaki-Mogami T, Teshima R.	4. 巻 101
2. 論文標題 Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Nonpoisonous Extraction System for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J AOAC Int.	6. 最初と最後の頁 798-804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5740/jaoacint.17-0324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 里絵、鈴木 彌生子、手島玲子
2. 発表標題 調理操作がソバアレルギーに及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品化学学会第25回総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤里絵、原尚資、山内実月、手島玲子、大澤良
2. 発表標題 そばにおけるタンパク質群の多様性
3. 学会等名 日本食品化学学会第23回総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato R., Hara T., Teshima R., Ohsawa R.
2. 発表標題 Diversity of seed proteins, including allergens, in common buckwheat.
3. 学会等名 Recent Advanced in Food Analysis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内美月、原 尚資、佐藤里絵、向井仁美、大澤 良
2. 発表標題 ソバ主要アレルギーFag e 2 の遺伝子領域内変異と抗原抗体反応性変異の探索
3. 学会等名 日本育種学会第130回講演会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 佐藤里絵、原 尚資、山内美月、手島玲子、大澤 良
2. 発表標題 ソバにおけるタンパク質群の多様性
3. 学会等名 日本食品化学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 里絵、鈴木 彌生子、手島玲子
2. 発表標題 調理操作がソバアレルギーに及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品化学学会第25回総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Satoh R. and Teshima R.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 538
3. 書名 Proteomics in Food Science. From Farm to Fork 1st Edition, Chapter 28. Proteomic approaches for allergen analysis in crop plants.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	佐藤 里絵  (SATO H Rie)  (10399371)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員   (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 尚資 (HARA Takashi)  (20721426)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道 農業研究センター・研究員  (82111)	
研究分担者	近藤 康人 (KONDO Yasuto)  (30301641)	藤田医科大学・医学部・教授  (33916)	
研究分担者	手島 玲子 (TESHIMA Reiko)  (50132882)	岡山理科大学・獣医学部・教授  (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関