

平成 21 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19780005  
 研究課題名 (和文) グルテン特性の改変に向けたパンコムギ種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現機構の解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of seed storage protein genes for improvement of gluten quality in bread 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・助教  
 研究者番号：60381935

研究成果の概要：小麦粉のグルテンを構成する種子貯蔵タンパク質は多重遺伝子族にコードされており、コムギのゲノム中に多コピー存在する。中でもコピー数の多い $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子は、個別の遺伝子発現パターンが異なる。遺伝子の座乗する染色体領域のゲノム構造を解析し、 $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子は反復配列を介した不等交叉によりコピー数が増加し、発現調節も分化したことが示唆された。そのため、品種間で発現する $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子が異なることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：パンコムギ・種子貯蔵タンパク質・グルテン・遺伝子発現・ゲノム・多重遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

パンコムギの EST (Expressed Sequence Tags) を用いたトランスクリプトーム解析により、同祖遺伝子や多重遺伝子をそれぞれ区別して発現解析を行うことに成功した。この中から、パンコムギの種子貯蔵タンパク質遺伝子を検索し、実験系統 Chinese Spring (CS) では $\alpha/\beta$ グリアジンが 36 遺伝子、低分子グルテニンサブユニット (LMW-GS) では 15 遺伝子が発現していることを明らかにした (Kawaura et al. 2005)。これらの遺伝子のサブグループを区別する PCR プライマーセットを設計し、それぞれ個別の遺伝子の座乗染色体領域を同定した。さらに、それぞれ

の遺伝子に相当する EST の頻度により、種子登熟期における遺伝子発現パターンを解析した。その結果、LMW-GS では画一的な遺伝子発現パターンを示す一方で、 $\alpha/\beta$ グリアジンでは LMW-GS と同様なパターンに加えて、発現のピークが異なる遺伝子が存在することを見出した。このことから、既知の種子貯蔵タンパク質に共通するプロモーター以外の発現調節機構が存在することが示唆された。

コムギの胚乳に含まれる種子貯蔵タンパク質は小麦粉の加工適性に重要なグルテンを構成する。グルテンは、グリアジンおよびグルテニンからなり、グリアジンは $\alpha/\beta$ 、 $\gamma$ 、

ωに、グルテニンは高分子 (HMW-GS) および低分子 (LMW-GS) に分類される。これらのタンパク質の電気泳動等の解析から、製パン性や製麺性の加工適性に優れるタンパク質サブユニットが同定されている。しかし、コムギ種子のタンパク質含有量は、施肥条件や登熟期の環境条件に影響されることが指摘されている。個別のタンパク質サブユニットと環境条件の関連が明らかになれば、小麦粉の品質を制御できると考えられる。

## 2. 研究の目的

特徴的な発現パターンを示す遺伝子近傍のゲノム解析を行い、遺伝子上流の転写調節領域を比較解析する。また、遺伝子のゲノム中の存在様式と遺伝子発現を調査する。これらから、既知のプロラミンボックスといったプロモーターとは異なる種子貯蔵タンパク質遺伝子に特徴的な発現調節因子を探索する。

また、日本の実用品種について遺伝子特異的プライマーによる qRT-PCR を行い、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現パターンを経時的に測定する。実験系統 CS の EST 解析による発現パターンを対照として、遺伝子発現パターンの多様性と品種間多型を調査する。

以上より、タンパク質型とプロモーターの遺伝子型の最適な組み合わせをもつコムギのスクリーニングシステムを確立する。特定の種子貯蔵タンパク質含有量を調節するような新しい育種法および栽培法の開発への基盤を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子特異的プライマーセットの作製

EST 解析により種子貯蔵タンパク質遺伝子の遺伝子配列を網羅的に得る。それらの配列を整列化し、SNPs (1 塩基多型) を検索する。特異的な SNPs サイトを利用して個別遺伝子に特異的なプライマーを作製する。

### (2) ゲノミックライブラリーのスクリーニング

遺伝子特異的なプライマーセットを用いてゲノミックライブラリーのスクリーニングを行い、目的の遺伝子近傍の染色体領域を含む BAC クローンを取得する。クローンに対するサザンブロット解析を行い、遺伝子コード領域の存在様式を調査する。特徴的な遺伝子存在様式を示すクローンについては、インサート全長の解読を試みる。塩基配列から、遺伝子上流の転写調節領域の構造を比較解析する。遺伝子の発現パターンと遺伝子上流配列との関連を明らかにする。

### (3) 遺伝子発現パターンの解析

遺伝子特異的プライマーを用いて、個別の遺伝子発現パターンを詳細に解析する。コムギ種子登熟過程における施肥条件や温度条

件が種子貯蔵タンパク質の蓄積に影響することが示唆されているので、遺伝子発現レベルで明らかにする。CS を対照とし、本州の実用品種で比較的グルテンが強い農林 61 号を材料として用いる。複数年のサンプルを用い、年次変動や品種間差を調査し、環境に影響される個別遺伝子を探索する。ゲノム塩基配列の解読により明らかになった遺伝子発現調節領域との関連性を解析する。

## 4. 研究成果

パンコムギにおける大量 EST 解析により、 $\alpha/\beta$  グリアジンは発現パターンが他の種子貯蔵タンパク質遺伝子とは異なる遺伝子が存在することが示唆された。この  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子のゲノム構造を解析するため、CS の染色体 DNA 断片を含む BAC クローンを選出した。

$\alpha/\beta$  グリアジンは A、B、D 各ゲノムの 6 群染色体短腕の *Gli-2* 座に座乗し、EST 解析では *Gli-A2* から 11、*Gli-B2* から 13、*Gli-D2* から 12 遺伝子が登熟期に発現していた。 $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子の SNPs を区別する特異的プライマーを用いた PCR により BAC クローンをスクリーニングした。得られたクローンに対するサザンブロット解析により、それぞれの BAC クローンに含まれる  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子のコピー数を推定した (図 1)。

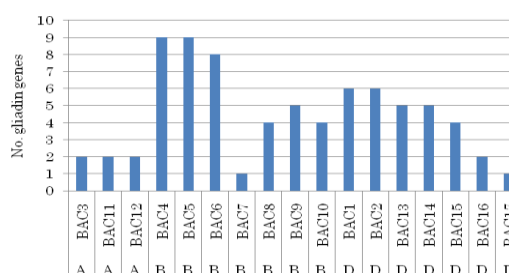


図 1 各 BAC クローンに含まれる  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子の数

1 次スクリーニングではカバーできた  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子の数が少なかったため、A ゲノムの遺伝子特異的プライマーについてさらなる BAC クローンのスクリーニングを行った。その結果、A ゲノムでは 28 クローンで 10 遺伝子、B ゲノムでは 7 クローンで 32 遺伝子、D ゲノムでは 8 クローンで 16 遺伝子のカバーした。このことから、*Gli-A2* 座は *Gli-B2* 座および *Gli-D2* 座より疎らに遺伝子が存在していることが推測された。

これらの BAC クローンの中から、A ゲノム由来の 2 クローン、B ゲノム由来の 2 クローンおよび D ゲノム由来の 1 クローンのインサート DNA 全長のシーケンスを行い、各ゲノムそれぞれ約 200kb の塩基配列を得た。得ら

れた塩基配列をウェブ上の RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation System) によって解析を行い、配列に含まれる遺伝子を予測した。また、遺伝子配列上の反復配列やレトロエレメントを TREP (the Triticeae Repeat Database) に対して Blast 検索を行うことで同定した (図 2)。その結果、それぞれの BAC クローンは 1 から 8 の  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子が含まれており、各遺伝子の間隔は数 kb から 100kb 以上と不均等であった。遺伝子と遺伝子の間には  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子以外の機能的遺伝子は見られず、レトロトランスポゾンおよび DNA トランスポゾンが多く存在していた。

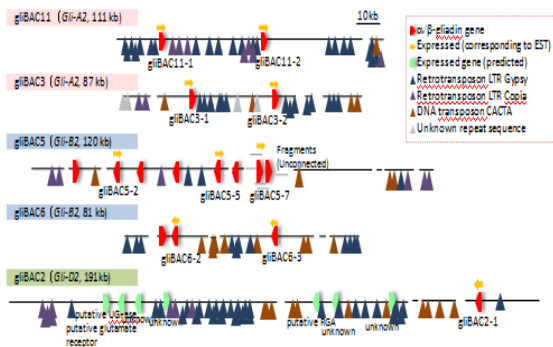


図 2 *Gli-2* 座のゲノム構造

ゲノム配列の重複の様子を調査するため、得られた配列をもとにドットプロット解析を行った。Aゲノム由来のBAC11においては、 $\alpha/\beta$  グリアジンは 2 遺伝子存在すると推察されたが、それらは重複が早い段階で生じたと考えられ、明確なゲノム重複の痕跡は見られなかった (図 3a)。一方で、Aゲノム由来のBAC3においては、2 遺伝子が約 30kb の重複によって分化したことが推察された (図 3b)。また、密に  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子が存在している Bゲノム由来のBAC5においては、5kb から 15kb の細かい重複が複数生じていることが示され、配列の相同性から比較的新しい重複であると考えられた (図 3c)。

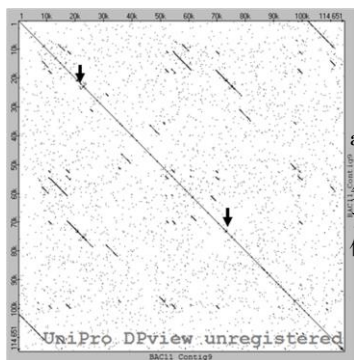
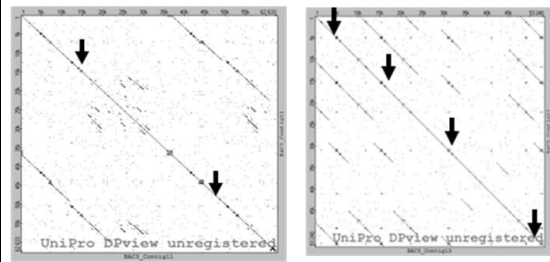


図 3 *Gli-2* 座ゲノム領域のドットプロット



b: BAC3 (Aゲノム) c: BAC5 (Bゲノム)  
図 3 (続き)

塩基配列を決定した遺伝子のプロモーター領域において、報告されている種子貯蔵タンパク質遺伝子のシス配列である RY repeat、Prolamin box、AACATAモチーフ、GCN4-likeモチーフ、および TATA box が存在するかを確かめた。遺伝子の翻訳開始点上流 1kb の配列を検索した (表 1)。EST に対応する発現している遺伝子については、TATA box、AACATAモチーフ、GCN4-likeモチーフは全てにおいて存在していた。一方で、発現している遺伝子において、Bゲノムの 1 遺伝子で Prolamin box が存在せず、Bゲノムの 2 遺伝子および Dゲノムの 1 遺伝子において RY-repeat が検出されなかった。また、GCN4-likeモチーフおよび AACATAモチーフの数は遺伝子によって異なっていた。さらに、EST 解析において特徴的な発現パターンを示した遺伝子とゲノム上で 50kb 離れており、ドットプロット解析からは比較的最近分化したと考えられる BAC3 上の遺伝子では、発現パターンが全く異なるにも関わらず既知のシス配列は同一であった。

表 1 遺伝子上流 1kb に存在する転写調節モチーフの数

Predicted gene	Genome	EST like	GCN4- AACATA		Prolamin box	RY repeat	TATA box
			motif	motif			
BAC11-1	A	+	1	5	1	1	+
BAC11-2	A	+	2	7	1	1	+
BAC3-1	A	+	3	5	1	1	+
BAC3-2	A	+	3	5	1	1	+
BAC5-1	B	-	3	5	1	1	+
BAC5-2	B	+	3	5	-	1	+
BAC5-3	B	-	3	5	1	1	+
BAC5-4	B	-	3	4	1	1	+
BAC5-5	B	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+
BAC5-6	B	-	3	6	1	1	+
BAC5-7	B	-	3	5	1	1	+
BAC5-8	B	+	3	5	1	1	+
BAC6-1	B	+	3	7	1	-	+
BAC6-2	B	+	3	6	1	-	+
BAC2-1	D	+	2	6	1	-	+

各遺伝子の翻訳領域の多様性からも重複が生じた状況を確認した。翻訳領域の塩基配

列から、MEGA4 ソフトウェアを用いて NJ 法により樹形図を作成した (図 4)。それぞれ、A ゲノム、B ゲノム、D ゲノムに分化した年代を 1 千万年前と仮定すると、 $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子は、100 万年以内の短い期間にゲノム中で頻繁に重複していることが確かめられた。また、遺伝子の中に CAA (グルタミン) をコードする 3 塩基の反復配列を 2 カ所含むため、遺伝子間の多型が生じやすいことが推察された。

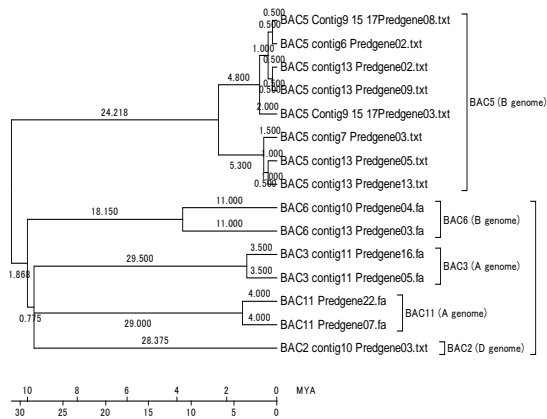
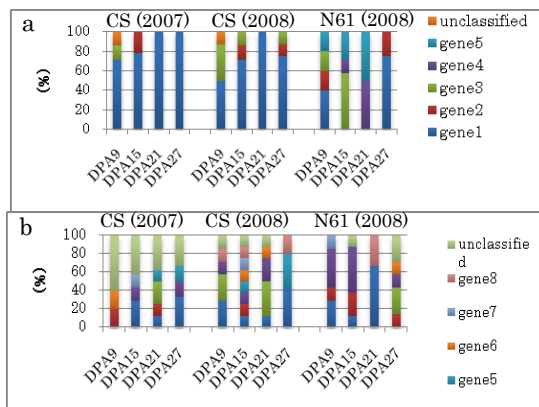


図 4  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子の進化関係

さらに、発現している  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子が品種間または年次間で異なっているかを調査した。登熟種子を開花後 9、15、21、27 日後にサンプリングし、RNA を抽出した。CS は 2007 年、2008 年の 2 年次、農林 61 号は 2008 年のサンプルを供試した。A ゲノムの  $\alpha/\beta$  グリアジンを特異的に増幅する 2 種のプライマーセットを用いて、RT-PCR を行った。RT-PCR 産物をクローニングし、それぞれランダムにシーケンスを行い発現している遺伝子の頻度を求めた。発現している遺伝子の頻度は年次によっても異なり、さらに品種間



では異なる遺伝子が発現していることが示された (図 5)。

図 5 発現している  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子の頻度  
a: 特異的プライマーセット AS-2 による PCR 産物  
b: 特異的プライマーセット AS-7 による PCR 産物

本研究により、多重遺伝子族を構成するコムギ種子貯蔵タンパク質遺伝子の中でも、極端にコピー数が多い  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子のゲノム中の存在様式が解析された。反復配列を介して比較的最近も重複を繰り返しており、遺伝子中に含まれる反復配列によって遺伝子の塩基配列も分化していた。この重複により、遺伝子発現制御も複雑に分化していることが推察された。品種間でも発現している遺伝子が異なることから、ごく最近でも遺伝子の変異が生じていることが示唆される。また年次で発現する遺伝子が異なっていることから、環境に影響される遺伝子発現調節因子が存在することが示された。今後、極端なゲノム重複によって新たに生じた遺伝子発現調節因子を明らかにし、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現制御に応用することにより、小麦粉のグルテン組成が改変できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 川浦香奈子 (他 5 名)、パンコムギにおける  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子多重遺伝子族の発現と存在様式、日本育種学会第 115 回講演会、平成 21 年 3 月 28 日、つくば国際会議場
2. 齋藤美沙・一色正之・川浦香奈子・荻原保成、RNAi による  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子抑制形質転換体の作出、日本育種学会第 115 回講演会、平成 21 年 3 月 28 日、つくば国際会議場
3. 川浦香奈子 (他 5 名)、6 倍性パンコムギにおける  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子のゲノム構造、日本育種学会第 114 回講演会、平成 20 年 10 月 12 日、滋賀県立大学

〔図書〕(計 1 件)

川浦香奈子・荻原保成、学会出版センター、コムギ種子貯蔵タンパク質遺伝子のトランスクリプトーム解析、種子の科学とバイオテクノロジー (原田久也監修) 2009 年 pp191-194

## 6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号：60381935

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし