

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780006

研究課題名（和文） 小麦アレルギーの原因となるグリアジンをコードする遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of wheat gliadin genes related to allergy

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（和文）：パンコムギの種子貯蔵タンパク質において小麦アレルギーの原因となるタンパク質の抗体反応を定量するシステムを確立し、実際に抗体反応量の異なるコムギ系統を選抜した。一方で、種子貯蔵タンパク質の中でアレルギーの原因ともなる α/β -グリアジンをコードする多重遺伝子が座乗する領域のゲノム解析を行い、ゲノム中で高度に重複する様式を推定し、重複した遺伝子が個別に発現調節されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to measure the level of antigen-antibody reaction against wheat storage protein related to wheat allergy, three kinds of peptide polyclonal antibody were produced. Using the antibody, about 170 lines of wheat were screened by the western-blot analysis. Furthermore, to understand genome structure and the expression of allergen α/β -gliadin multigenes, genome analysis was conducted. Duplication of genome segments containing of α/β -gliadin genes brought about through unequal crossing-over or saltatory replication, and α/β -gliadin genes for their own were duplicated without any recombination events. They have similar *cis*-elements and promoter structures, the mechanisms underlying their distinct gene expression and possible applications were suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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・グリアジン・小麦アレルギー・多重遺伝子・発現遺伝子・ゲノム

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、グルテンを構成するため小麦粉の加工適性を決定する要因であるとともに、小麦粉によるア

レルギーの原因となる。小麦粉に化学的処理をしてアレルゲンを低め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。小麦粉に含ま

れるタンパク質の含有組成を変えずにアレルギーに対するエピトープの数を減らしたコムギを育種・栽培できれば、非常に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、それぞれをコードする遺伝子は多重遺伝子族で高度に重複している。以前、我々はパンコムギの EST (Expressed Sequence Tags) の大量収集を進め、配列情報を *in silico* で整理化したところ、同祖遺伝子や多重遺伝子を区別することに成功した。パンコムギ実験系統 Chinese Spring (CS) では 36 の α/β グリアジンおよび 15 の低分子グルテニン (LMW-GS) をコードする遺伝子が発現していることを示した (Kawaura et al. 2005)。さらに、個別の遺伝子を特異的に増幅する PCR プライマーセットを開発し、それぞれの座乗染色体領域を特定した。EST 解析と組み合わせることにより、LMW-GS 遺伝子では登熟期の発現パターンが単一である一方で、 α/β -グリアジン遺伝子では LMW-GS 遺伝子と同様の発現パターンを示す遺伝子に加え、登熟期の異なる時期に発現量が極端に高くなる遺伝子が存在することを初めて見出した (Kawaura et al. 2005)。このことは、同じ遺伝子座に座乗する多重遺伝子でも発現の強さやパターンが異なることを意味すると考えられた。

パンコムギは倍数体であり、ゲノムサイズが 16Gb とイネの約 40 倍大きいため、現在利用できるゲノム情報は不十分である。このような状況の中、多重遺伝子族を構成する α/β -グリアジンの個別の遺伝子発現が異なる原因を探ることを目的に、 α/β -グリアジン遺伝子が座乗している染色体部分を含む BAC クローンを選抜した。これを用いることで、多重遺伝子 α/β -グリアジンをコードする染色体領域がどのように遺伝子の重複および多様性が明らかになると考えられる。

アレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質のアミノ酸配列が複数同定されている。遺伝子の塩基配列から推定されたアミノ酸配列からグリアジンによってエピトープの有無が異なると推測され、ゲノムや品種別に異なることが示唆されている (Salentijn et al. 2009)。また、コムギ種子のタンパク質とアレルギー患者の血清との抗原抗体反応から、B ゲノムに由来する ω -グリアジンの反応性が高いことが報告されている (Lauriere et al. 2007)。しかし、これらについて、遺伝子と抗原抗体反応を結びつけた報告はみられない。我々がこれまでに行った特異的プ

ライマーセットによる α/β -グリアジン遺伝子の座乗染色体の同定および遺伝子の個別の発現が異なることを明らかにした業績をもとに、抗原抗体反応性を解析するシステムを合わせれば遺伝子とアレルゲンによる抗原抗体反応の関連が見出せると考えられた。

2. 研究の目的

(1) アレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質の同定

種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子について、既知のエピトープを推定アミノ酸配列から同定する。一方で、小麦アレルギーのエピトープのアミノ酸配列をもとに抗体を作製し、抗原抗体反応性を定量する方法を確立する。これらをもとに、さまざまなコムギの品種の種子貯蔵タンパク質についてアレルゲンとの抗原抗体反応性を明らかにすることを目的とする。

(2) α/β -グリアジン遺伝子領域のゲノム解析

特に高度に重複している多重遺伝子 α/β -グリアジンについて、ゲノム上の存在様式を明らかにする。遺伝子の重複機構や重複した遺伝子の発現調節について調査し、個別の遺伝子の調節機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) 小麦アレルギーの原因とされるコムギ種子貯蔵タンパク質の既知のエピトープとなるアミノ酸配列をもとに、それぞれペプチド抗体を作製する。この抗体に対して、世界中のさまざまな地域から採取された多様性に富むコムギ 170 系統 (ナショナルバイオリソース・コムギから分譲) から抽出した種子貯蔵タンパク質を用いて免疫プロットを行い、抗体反応量を定量する。さらに詳細に抗体と反応するタンパク質を調査するため、二次元電気泳動を行い、免疫プロット解析を行う。

(2) α/β -グリアジン遺伝子をゲノム特異的に増幅するプライマーセットを用いて、CS のゲノミック BAC ライブラリーから BAC クローンを選出する。BAC クローンの制限酵素断片のパターンや α/β -グリアジン遺伝子をプローブとしたサザンプロットから特徴的な 5 クローンを選出し、インサートのコムギゲノム DNA 全長配列を解読する。解読した配列から、 α/β -グリアジン遺伝子が座乗する領域についてゲノムの特徴を調査する。また、どのような過程で α/β -グリアジン遺伝子が重複を繰り返したかを明らかにする。さらに EST 解析の結果と合わせ、発現している遺伝子の特徴を解析する。

4. 研究成果

(1) 既知の小麦アレルギーのエピトープとされるコムギ種子貯蔵タンパク質 α/β -グリアジン、 ω -グリアジンおよび LMW-GS のアミノ酸配列をもとにそれぞれペプチド抗体を作製した。抗体の特異性を調査するため、 α/β -グリアジン遺伝子が座乗する 6 群染色体および ω -グリアジンおよび LMW-GS をコードする遺伝子が座乗する 1 群染色体の CS の異数体系統の種子から貯蔵タンパク質を抽出した。SDS-PAGE で分離した後、免疫ブロット解析を行った。3 種の抗体は、一部のゲノムに由来するタンパク質を区別して認識することが示された。

(2) 世界中のさまざまな地域から採取された 170 系統のコムギについて、同様に種子貯蔵タンパク質を抽出した。SDS-PAGE による分離を行った後、免疫ブロット解析を行い、それぞれの抗体反応量を定量した。3 種の抗体それぞれについて抗体反応量が異なる系統が同定できた (図 1)。

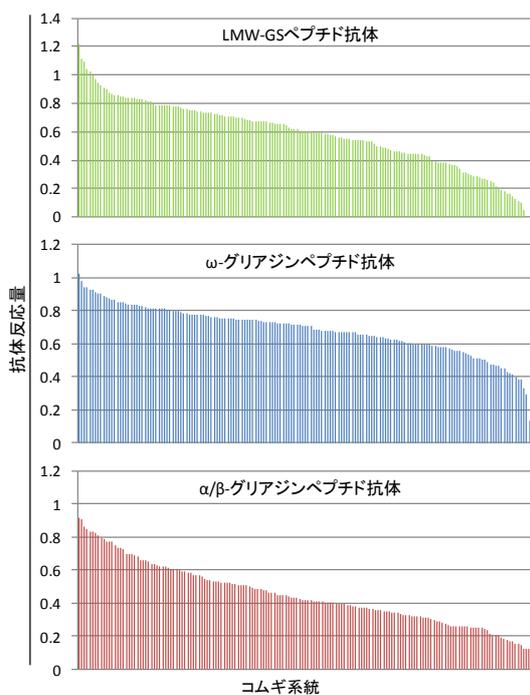


図 1 コムギ 170 系統の種子貯蔵タンパク質と本研究で作製した抗体との反応量

(3) 実験系統 CS およびその他の系統を用いてグリアジンのみを抽出後、二次元電気泳動によって分離した。これに対して免疫ブロット解析を行い、抗体に反応するタンパク質を同定した (図 2)。

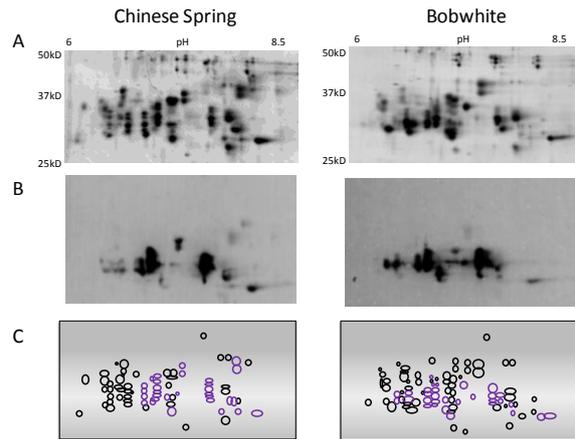


図 2 グリアジンの二次元電気泳動によるプロファイルおよび抗体と反応するタンパク質スポットの同定

A: 二次元電気泳動のプロファイル、B: 免疫ブロット、C: 反応したタンパク質スポットの模式図

(4) パンコムギ CS の BAC ライブラリーから、アレルギーの原因となる α/β -グリアジン遺伝子を含む平均 111.3kb のゲノム DNA 断片を含む BAC クローンを選出した。6A 染色体に由来する 2 クローン、6B 染色体に由来する 2 クローン、6D 染色体に由来する 1 クローンを選出し、インサート全長の塩基配列を決定した。それぞれのクローンは、1~8 個の α/β グリアジン遺伝子を含んでおり、ドットプロット解析から不均一な単位でのゲノム断片の重複により遺伝子の数が増加していることが示された。レトロトランスポゾンなどの転移因子も多く挿入されていた。 α/β グリアジン遺伝子そのものが増幅しているのではなく、ゲノム断片の不等交叉または跳躍複製によって重複が生じていることが明らかになった。

(5) 本研究で用いた BAC クローンのゲノム配列から予測された α/β -グリアジン遺伝子は 15 個あった。これらの塩基配列から系統樹解析を行った (図 3)。同じ BAC クローンに由来する遺伝子は同じグループに属した。また、EST の頻度からそれらの遺伝子発現量を推測したところ、同じ BAC クローンから推測された遺伝子であっても発現パターンが異なることが示された。一方で、これらの遺伝子の既知のシス配列を比較したところ、既知のシス配列が同じであっても遺伝子発現量が異なることが示された。このことから、重複した個々の遺伝子は未知のシス配列またはエピジェネティックな制御によって発現調節が行われていることが示唆された。

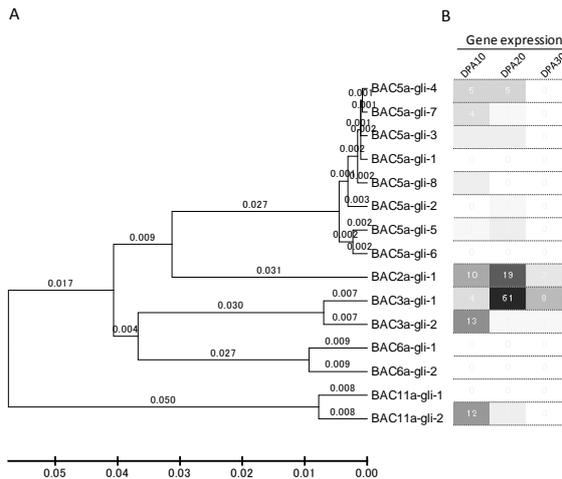


図3 ゲノム配列から予測された α/β -グリアジン遺伝子の phylogenetic tree

A: 塩基配列の系統関係、B: EST 頻度によって推定された開花後 10 日 (DPA10)、DPA20、DPA30 における遺伝子発現量

(6) 解読した α/β -グリアジン遺伝子領域の塩基配列から、分子時計を用いて遺伝子重複が生じた時期およびレトロトランスポゾンが挿入された時期を推定した。 α/β -グリアジン遺伝子はコムギ祖先 2 倍性種が分化する前に 1 群から 6 群染色体に転移し、既に重複していたことが示された。また異質倍数化の過程でレトロトランスポゾンの挿入およびゲノム断片の重複による α/β -グリアジン遺伝子の重複が頻繁に生じていることが示された。6 倍性コムギが生じた後も頻繁に重複が生じているため、品種間や系統間で多型が大きくなると考えられた。

これらの結果から、アレルギーに関連する多重遺伝子を個別に区別して抗体反応性との関連の解析が進められるようになり、ゲノム解析によって明らかになった多重遺伝子によるゲノムの変化の知見とともに、低アレルギーコムギ作出のための基盤が得られた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kawaura K, Wu J, Matsumoto T, Kanamori H, Katagiri S, Ogihara Y. Genome change in wheat observed through the structure and expression of α/β -gliadin genes. *Functional & Integrative Genomics*. 12(2): 341-355 (2012) 査読有
DOI: 10.1007/s10142-012-0269-0

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中村真子・齋藤美沙・川浦香奈子・荻原保成 パンコムギにおける α/β -グリアジンを抑制した形質転換体の作出およびその評価 日本育種学会第121回講演会 2012年3月30日 宇都宮大学
- ② Kanako Kawaura, Jianzong Wu, Takashi Matsumoto, Hiroyuki Kanamori, Satoshi Katagiri, Yasunari Ogihara, Genome Analysis of Expressed alpha-gliadin Genes in Common Wheat. 2012年1月14日～18日 Plant and Animal Genome XX, San Diego
- ③ Kanako Kawaura, Genome organization of highly duplicated a/b-gliadin genes and their expression in common wheat 2011年9月30日 PSC-BMEP-KIHARA joint retreat 横浜市立大学
- ④ 川浦香奈子・呉健忠・松本隆・金森裕之・片桐敏・荻原保成 パンコムギにおける α/β -グリアジン多重遺伝子の機能ゲノム解析 日本遺伝学会第83回大会 2011年9月20日、京都大学
- ⑤ 中村真子・齋藤美沙・川浦香奈子・荻原保成 二次元電気泳動による詳細なパンコムギのグリアジンプロファイリング 日本育種学会第118回講演会 2010年9月 秋田県立大学
- ⑥ 川浦香奈子・呉健忠・松本隆・金森裕之・片桐敏・荻原保成 パンコムギにおける高度に重複した種子貯蔵タンパク質遺伝子のゲノム解析 日本遺伝学会第82回大会 2010年9月 北海道大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

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