

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580011

研究課題名(和文) 低アレルゲン小麦作出を目指したコムギ種子貯蔵タンパク質遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of wheat seed storage proteins associated with wheat 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・准教授

研究者番号：60381935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：小麦アレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質について、アレルゲンのエピトープ特異的抗体による抗原抗体反応量を265系統の六倍体コムギ系統間で比較し、反応性の異なる系統を明らかにした。また、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タンパク質を抽出し二次元電気泳動を行った。分離した70タンパク質スポットうち、52スポットのコードする遺伝子の座乗する染色体を特定した。さらに、アレルギーの原因となるグリアジンタンパク質を同定し、そのタンパク質を特異的に抑制する因子がCSに存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to screen for hypoallergenic wheat, seed storage proteins extracted from 265 lines of various hexaploid wheat were evaluated by Western blot using three kinds of anti-peptide antibodies for epitope of wheat allergy. Gliadins were selectively extracted from Chinese Spring wheat and its aneuploid lines. Two-dimensional electrophoresis profiles were compared among lines. Out of 70 gliadin spots, 52 spots could be determined their chromosome loci. Furthermore, gliadins which have the epitope of wheat allergy and are transcribed from chromosome 6D were specifically suppressed in the tetrasomic 2A lines, suggesting Chinese Spring wheat has a specific gliadin suppressor on chromosome 2A.

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

## 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や小腸の炎症を引き起こすセリアック病の原因となる。小麦粉を加水分解など化学処理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・栽培することができれば、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、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で高度に重複しており、ゲノム中に数 10 から 100 以上のコピーが存在する。これまでに我々はパンコムギの発現遺伝子の配列情報の収集を進め、コムギ実験系統 Chinese Spring (CS) においては 36 の / グリアジンおよび 15 の LMW-GS をコードする遺伝子が発現していることを示し、LMW-GS 遺伝子は登熟期の発現パターンが単一である一方で、 / グリアジン遺伝子では異なった発現パターンを示す遺伝子が存在することを見出した。

パンコムギは六倍体であり、ゲノムサイズが 17Gb とイネの 40 倍大きいと、データベース上の利用できるゲノム情報は十分ではなかった。このような状況の中、品種 CS において / グリアジン遺伝子座が座乗している染色体部分のゲノム塩基配列を約 600kb に渡り解析し、 / グリアジン遺伝子を含むゲノム断片の重複単位は決まっておらず / グリアジン遺伝子はゲノム中に不均等に存在していることを示した。また、比較的新しく重複した / グリアジン遺伝子で既知のシスエレメントが全く同一であっても発現パターンが異なる遺伝子があることが示された。タンパク質レベルにおいても、A-PAGE による比較から品種間多型が大きいことが示されている。これらのことから、 / グリアジンをコードする多重遺伝子が座乗する染色体領域は頻りにゲノム断片の重複が生じているため品種間で違いが生じやすいことが示唆された。

これらの背景から、パンコムギの種子貯蔵タンパク質の中で特にコピー数の多いグリアジンに着目し、アレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質と遺伝子の関連を明らか

にすることを旨とした。 / -グリアジンは 6 群染色体短腕の *Gli-A2*、*Gli-B2*、*Gli-D2*、-および -グリアジンは 1 群染色体短腕の *Gli-A1*、*Gli-B1*、*Gli-D1* 遺伝子座に座乗することが報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) コムギの在来系統や実験系統において、アレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質の含量を比較解析し、アレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質の品種・系統間差を明らかにする。

(2) パンコムギ標準実験系統 Chinese Spring において個別のグリアジンタンパク質をコードする遺伝子の座乗染色体を同定する。また、分離したグリアジン分子種の中でアレルギーの原因となるタンパク質との関連を調査する。

## 3. 研究の方法

(1) コムギ系統間でアレルギーの原因となる種子貯蔵タンパク質の含量を比較解析するため、ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)・コムギより分譲された世界各地の在来種やパンコムギ以外の六倍性コムギを含むコアコレクション 169 系統および農業生物資源研究所(NIAS)のジーンバンクより日本在来のコムギコアコレクション 96 系統の完熟種子を供試した。種子から全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離した。これらに対して、ウエスタンブロット解析により、抗原抗体反応量を定量した。ウエスタンブロットの抗体として、セリアック病や小麦アレルギーのエピトープとして報告されているアミノ酸配列をもとに抗ペプチド抗体を 3 種作製して用いた。

(2) 多重遺伝子にコードされるグリアジンタンパク質が由来する遺伝子座の座乗染色体を特定するため、パンコムギ Chinese Spring (CS) および CS のナリテトラソミックおよびダイテロソミック染色体異数体系統の完熟種子を用いた。ヨウ化ナトリウムを含むバッファーでグリアジンタンパク質を分画して抽出し、二次元電気泳動により分離した。CS と染色体異数体系統の二次元電気泳動のプロファイルをそれぞれ比較し、各タンパク質スポットが由来する染色体を決定した。また、一部のタンパク質スポットについて N 末端のアミノ酸シーケンスを行い、タンパク質を同定した。CS については、種子より抽出したグリアジンタンパク質の二次元電気泳動後に PVDF 膜に転写し、セリアック病のエピトープとして知られるアミノ酸配列をもとに作製した抗ペプチド抗体を用いてウエスタンブロットを行い、反応するタンパク質スポットを検出した。抗原抗体反応量に影響がある CS の染色体異数体系統の

種子より抽出した全タンパク質に対して SDS-PAGE により分離し、同じ抗体でウエスタンブロット解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) NBRP・コムギによる 169 系統および NIAS の 96 系統の合わせて 265 系統において、種子から抽出した全タンパク質に対してウエスタンブロット解析を行った。抗体として、主に グリアジンに存在し、セリアック病のエピトープとなるアミノ酸配列 (Gli-a9) 主に グリアジンに存在し、コムギ運動誘発性アナフィラキシー (WDEIA) のエピトープとなるアミノ酸配列、小麦アレルギー全般のエピトープとなる LMW-GS 上のアミノ酸配列をもとに作製した抗ペプチド抗体を用いた。それぞれの抗体反応量は、CS の反応量からの相対値で求め、NBRP 系統および NIAS 系統それぞれ昇順で示した (図 1)。

3 種の抗体はどれも NBRP 系統および NIAS 系統それぞれで抗原抗体反応量に連続的な違いがみられた (図 1)。3 種の抗体ともすべてで反応性が低い系統はなかったが、2 種の抗体で低い系統があった。これらの系統の交配を行っているため、今後、分離集団を作製してこれらの多重遺伝子の遺伝様式を調査し、低アレルゲン小麦育成への応用を検討していく。

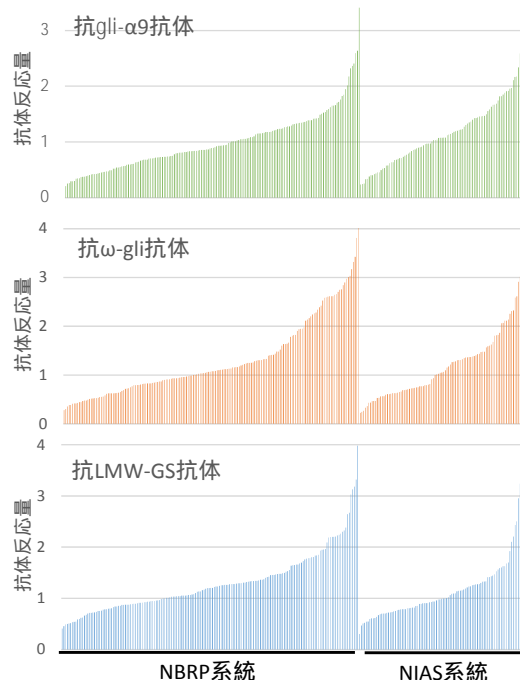


図 1. 種子タンパク質の抗体反応量

(2) CS の種子から抽出したグリアジンタンパク質の二次元電気泳動を行ったところ、分子量 25 kDa から 50 kDa の間に 70 のスポット分離された (図 2)。CS の染色体異数体系統の二次元電気泳動図と比較したところ、

6A、6B、6D 染色体短腕に由来するスポットがそれぞれ 10、10、16 個あり、 $\alpha/\beta$ -グリアジンであることが示唆された (図 2)。また、1A、1B、1D 染色体短腕に由来するスポットはそれぞれ 3、3、7 個あり、分子量から  $\gamma$ -グリアジンであると考えられた (図 2)。座乗染色体が不明であった 19 スポットについて N 末端のアミノ酸配列を決定したところ、12 スポットが  $\beta$ -グリアジン、7 スポットが  $\gamma$ -グリアジンであることが示された。これらのスポットは、異なる遺伝子座に由来するタンパク質が重なっていると考えられる。同定できたグリアジンタンパク質の数は、これまでトランスクリプトーム解析で示された数より多かった (表 1)。グリアジンを特化して抽出したことで、量の多いグルテニンと被ることなく網羅的に  $\beta$  および  $\gamma$ -グリアジンを同定できたと考えられる。

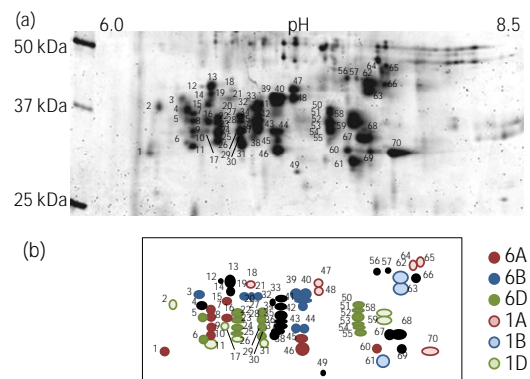


図 2. Chinese Spring におけるグリアジンタンパク質の二次元電気泳動プロファイル

(a) グリアジンタンパク質の二次元電気泳動図  
(b) 各スポットの由来する遺伝子座の座乗する染色体の同定

表 1. パンコムギ Chinese Spring におけるグリアジンタンパク質の数

Gliadin	Chromosome	No. protein spots	No. expressed genes
$\alpha/\beta$ -gliadin	6AS	10	11*
	6BS	10	13*
	6DS	16	12*
	unknown	12	
$\gamma$ -gliadin	1AS	6	2**
	1BS	3	
	1DS	7	4**
	unknown	6	5**
Total	$\alpha/\beta$ -gliadin	48	36
	$\gamma$ -gliadin	22	11

\* Kawaura et al. (2005) \*\*Anderson et al. (2013)

(3) CS の 1 群から 7 群の染色体異数体系統のグリアジンタンパク質の二次元電気泳動図を比較したところ、2A 染色体が 2 対あるテトラソミック 2A 系統 (Nulli2B-Tetra2A、Nulli2D-Tetra2A) において 6D 染色体がないナリソミック 6D 系統 (Nulli6D-Tetra6A、Nulli6D-Tetra6B) と二次元電気泳動図が類似していることが示された (図 3)。抗 Gli-a9 抗体を用い、種子の全タンパク質に

対してウエスタンブロット解析を行ったところ、ナリソミック 6D 系統において反応量が少なかったことから、セリアック病のエピトープとして報告されている GliA- $\alpha$ 9 は 6D 染色体に由来するグリアジンに多いことが示唆された。CS の二次元電気泳動により分離したグリアジンタンパク質に対するウエスタンブロット解析でも、6D 染色体に由来するスポットが抗 GliA- $\alpha$ 9 抗体に反応することが示された。さらに、種子の全タンパク質に対するウエスタンブロット解析でテトラソミック 2A 系統においても抗 GliA- $\alpha$ 9 抗体の抗原抗体反応がナリソミック 6D 系統と同様に低かった。これらの結果から、6D 染色体に由来しセリアック病のエピトープをもつ  $\alpha/\beta$ -グリアジンを特異的に抑制する因子が CS の 2A 染色体上に存在することが示唆された。

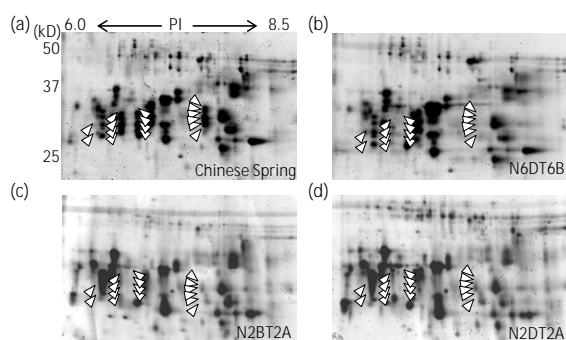


図3 .パンコムギ染色体異数体系統のグリアジンタンパク質の二次元電気泳動による比較  
(a) Chinese Spring (b) 染色体異数体系統 Nulli6D-Tetra6A (c) Nulli2D-Tetra2A (d) Nulli2B-Tetra2A  
矢頭は Chinese Spring において 6D 染色体に由来するタンパク質スポットの位置を示す。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kawaura K., Wu J, Matsumoto T, Kanamori H, Katagiri S, Ogihara Y, Genome change in wheat observed through the structure and expression of  $\alpha/\beta$ -gliadin genes, Functional & Integrative Genomics, 査読有, (2012) 12: 341-355

### 〔学会発表〕(計 9 件)

神山春風、佐久間俊、荻原保成、川浦香奈子 形質転換体を用いたコムギ種子貯蔵タンパク質を制御する転写因子の機能解析 日本育種学会第 127 回講演会 平成 27 年 3 月 22 日 玉川大学(東京都町田市)

Kanako Kawaura. Genome organization and expression of  $\alpha/\beta$ -gliadin multigenes in common wheat, Joint symposium of Yokohama City University and Korea University, 平成 26 年 9 月 3 日,ソウル(大韓民国)

三浦麻友子、川浦香奈子、中村真子、池田達哉、荻原保成 パンコムギ染色体異数体系統を用いたグリアジンタンパク質の同定 日本育種学会第 125 回講演会 平成 26 年 3 月 22 日 東北大学(宮城県仙台市)

Kanako Kawaura. Jianzhong Wu, Takashi Matsumoto, Hiroyuki Kanamori, Satoshi Katagiri, Yasunari Ogihara, Genomic structure and expression of  $\alpha/\beta$ -gliadin genes in hexaploid wheat, The 12th International Wheat Genetics Symposium, 平成 25 年 9 月 8 日~14 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Mayuko Miura, Kanako Kawaura. Makiko Nakamura, Haruka Kouyama, Yasunari Ogihara, Comparative analysis of wheat seed storage proteins in hexaploid wheat, 平成 25 年 9 月 8 日~14 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Satoshi Noma, Katsuyuki Hayakawa, Kanako Kawaura. Yasunari Ogihara, Molecular characterization of the  $\alpha/\beta$ -gliadin multigene family in hexaploid wheat, 平成 25 年 9 月 8 日~14 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

三浦麻友子、川浦香奈子、神山春風、中村真子、荻原保成、二次元電気泳動を用いたパンコムギのグリアジンの比較解析、日本育種学会第 122 回講演会、平成 24 年 9 月 15 日、京都産業大学(京都府京都市)

K. Kawaura. J. Wu, T. Matsumoto, H. Kanamori, S. Katagiri, Y. Ogihara, Genomic analysis of the expressed  $\alpha/\beta$ -gliadin gene region in hexaploid wheat, 11th International Gluten Workshop, 平成 24 年 8 月 12 日~15 日、北京市(中国)

M. Miura, K. Kawaura. M. Nakamura, H. Kouyama, Y. Ogihara, Profiling of gliadins from common wheat by using two-dimensional gel electrophoresis, 平成 24 年 8 月 12 日~15 日、北京市(中国)

## 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・准教授  
研究者番号：60381935