

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580020

研究課題名(和文)ソバアレルゲンとなる13Sグロブリンサブユニットの解析

研究課題名(英文)Analysis on allergenic 13S globulin subunits of buckwheat

研究代表者

田中 朋之(勝部朋之)(Tanaka, Tomoyuki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50224473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ソバ13Sグロブリンの多様性を明らかにするために、約14万種のクローンからなるゲノムライブラリーをスクリーニングして26種のBACクローンを単離した。その中から17種の13Sグロブリン遺伝子を同定して、塩基配列を日本DNAデータバンクに登録した。13Sグロブリンの鎖に挿入された反復配列の多くは45bpを基本単位としていたのに対し、一部の反復配列はCGGまたはAGAの3bpを余分に有しており、それらが二次構造の変化に与える影響を明らかにした。一方、自殖性の近縁種タタンソバを用いて、13Sグロブリンのサブユニット組成が環境条件にどのように応答するのかを解析する実験系構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：Buckwheat genomic DNA library, consisting of 142,005 clones, was screened to elucidate the diversity of 13S globulin genes. Twenty-six BAC clones were isolated and 17 genes of 13S globulin were identified, the sequences of which were deposited into DNA Data Bank of Japan. The unit length of nucleotides for most tandem repeat sequences, which are specifically inserted into alpha polypeptides of 13S globulin, was 45 bp while that of some repeats had extra three nucleotides like CGG or AGA, resulting in different secondary structure formation. On the other hand, preliminary experimental system was developed to analyze the effect of environmental factors on 13S globulin composition using autogamous tartary buckwheat.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 作物学・雑草学

キーワード：ソバ 13Sグロブリン 反復配列

1. 研究開始当初の背景

ソバは、虫媒による他殖性、無限伸育性、脱粒・倒伏しやすい性質や湿害を受けやすい性質をもつために、主要穀類に比べ生産性(収量)が極めて低く、日本での生産量は漸増しているものの低い水準にとどまる。しかしながら、栽培生育期間が短く、中山間地域の傾斜地・やせ地・乾燥地などの不良環境下でも育ち、病害虫・雑草の害を受けにくい。一方、ソバは血圧上昇を抑える作用のあるルチンを多く含み、種子タンパク質はバランスの取れたアミノ酸組成を有することから、健康を維持増進させる食材として認められ、その生産が改めて見直されている。

ソバには健康を維持増進する作用がある一方で、深刻なアレルギーを引き起こす場合があり、その原因物質(アレルゲン)を同定し取り除く研究が求められている。これまでに、13Sグロブリンの鎖(24kDa)および2Sアルブミン(16kDa)が主要アレルゲンとして同定されている。

ソバ13Sグロブリンは、ダイズやイネ種子に最も多く含まれる主要貯蔵タンパク質グリシニン、グルテリンと同じ11Sグロブリンスーパーファミリーに属している。また、グリシニンやグルテリンと同様に多重遺伝子族を形成し、性質の異なる複数のサブユニットから構成されている。グリシニンとグルテリンについては、タンパク質レベル・DNAレベルでサブユニットごとの解析が進んでいるにも関わらず、ソバ13Sグロブリンについての情報は国内外を問わず極めて少ない。

研究代表者らはこれまでに、イネグルテリンのサブユニットを詳細に分析し、栄養性の異なる主要なサブユニット(GluA1, A2, A3, B1, B2, B4)をタンパク質レベルで分類するとともに、特異的抗体、キャピラリー電気泳動法やゲノム情報を利用して、組成変化量を正確に定量・評価できる系を構築した。そして、サブユニット組成を、突然変異を組み合わせることで、または窒素・硫黄代謝を制御することで改変し、イネ科作物に共通する課題であった低い栄養性(必須アミノ酸の一つリジンの含有率が低いこと)を改善できることを示した。すなわち、多重遺伝子族を構成するタンパク質のサブユニット組成を変えることで、他の優れた特性に影響を与えずに品質改善が可能であることを明らかにした(Katsube-Tanaka et al 2011)。

一方、藤野ら(2000)は、ソバ13Sグロブリンのサブユニットの一つを大腸菌で発現させ、アレルギー患者IgE抗体との結合能を調べたところ、ソバ種子抽出タンパク質に比べ結合能が低いことを報告した。そして、IgE抗体との反応性がサブユニットの種類によって異なることを示唆している。また2種のサブユニットに関し異なるエピトープ配列の存在が報告されている。これらのことは、ソバにおいてもサブユニット組成を変える

ことで、品質(アレルゲン性)を改善できる可能性を強く示している。

研究代表者らは、これまでにソバ13Sグロブリンと同族のイネグルテリンとダイズグリシニンに対する抗体を用いることで、ソバ13Sグロブリン鎖を4タイプに分類できることを明らかにした。さらにメチオニン含有率の低い(Met-poor)サブユニットと高い(Met-rich)サブユニットを識別でき、そのサブユニット組成が窒素・硫黄代謝により変化する可能性を示した(Khan et al 2012)。一方、Met-poorサブユニットに特徴的な反復挿入配列の存在を見出し、その配列の前後に設計したPCRプライマーを用いることで、既知のサブユニット(1回、3回、5回反復サブユニット)の他に少なくとも4種類の新規サブユニット(0回、2回、4回、6回反復サブユニット)が存在することを明らかにした(Khan et al 2012)。また、13Sグロブリンの鎖に挿入された反復配列は親水性でアルギニン残基を多く有することから、反復配列の有無により、アレルゲン性との関連が指摘されているトリプシン消化性が異なることを明らかにした(Khan et al 2012)。しかしながら、ソバ13Sグロブリンにはどれだけの遺伝子があるのか、またその組成がどのように変動するのか、十分な知見はない。そこで本研究では、13Sグロブリンの構造・組成変動を詳細に解析することにより、ソバ種子の優れた特性を損なうことなくアレルゲン性を低下させるための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

ダイズグリシニンやイネグルテリンと異なり、ソバ13Sグロブリンサブユニットに関する知見は限られる。そこで、研究の方法に示す通り、研究代表者らが開発した抗体・PCRプライマーを利用して、そのサブユニット組成(種類、蓄積量)と構造(アミノ酸配列、サイズ、その他物理化学的性質)を詳細に明らかにすることを目的とした。その際、まずはYasui et al (2008)により調製されたゲノムライブラリーをスクリーニングすることで網羅的な解析を行うこととした。また世界各地の在来系統を分析することで、13Sグロブリンサブユニットの多様性を明らかにし、低アレルゲン性を示す系統の探索を試みることにした。一方、ソバ13Sグロブリンサブユニット組成の施肥条件による変化を調べる実験系を構築することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゲノムライブラリーのスクリーニング

Yasui et al (2008)により調製された約14万種のクローンからなるソバゲノムライブラリーをスクリーニングして、13Sグロブリン遺伝子を有するBACクローンを同定した。反復挿入配列の前後に設計したPCRプライマ

ーを用い、まず全部で384枚ある284穴プレートに48グループに分けたスーパープールを1次スクリーニングした。次に、8枚分のプレートから成るスーパープールの中からプレートナンバーを特定する2次スクリーニングをし、さらに特定されたプレートの縦横方向にそれぞれ混合したPCR(3次スクリーニング)により13Sグロブリン遺伝子を有するBACクローンを単離した。得られたBACクローンはコピー数が少なかったため、アラビノースでコピー数を増やせる大腸菌宿主に変えてDNAを大量調製し、塩基配列を解読した。

(2) 13Sグロブリン遺伝子の同定と解析

Met-poorサブユニット遺伝子を有するBACクローンが22クローン、Met-richサブユニット遺伝子を有するBACクローンが4クローン同定された。そこで、これらのクローンについて、必要に応じ遺伝子部分をショットガン法等によってサブクローニングし、13Sグロブリン遺伝子の全塩基配列を解読した。塩基配列(アミノ酸配列)をもとにMEGAにより系統樹を作製するとともに、反復配列部分の一本鎖DNAの二次構造をCentroidFoldによって予測した。また、エキソヌクレアーゼを用いてセンス鎖・アンチセンス鎖の一本鎖DNAを調製し、40または25のポリアクリルアミド電気泳動により、二次構造の変化を解析した。

(3) 多様性に関する品種間比較

在来/育成/外国産の普通ソバ品種から無作為に選んだ5種類の普通ソバ(みやざきおおつづ、出雲在来、MANKAN、牡丹そば、鹿屋在来)の種子各30粒を用い、DNA解析を行った。また一部の種子については同時にタンパク質も抽出して分析を行った。

(4) 環境条件による組成変動

自殖性である近縁種ダツタンソバを用いて様々な窒素・硫黄レベルの施肥条件でポット栽培した。代表的な葉身についてSPADを測定することで葉色を比較した。また登熟中の種子よりRNAを、成熟種子よりタンパク質を抽出し、定量的PCRまたはSDS-PAGEにより、Met-poorサブユニットとMet-richサブユニットの割合を比較することを試みた。

4. 研究成果

(1) 約14万種のクローンからなる平均インサート長76kbpのソバゲノムライブラリーをスクリーニングすることで、Met-poorサブユニット、Met-richサブユニットをコードする13Sグロブリン遺伝子を有するBACクローンをそれぞれ22クローン、4クローン単離した(表1)。Met-poorサブユニットのうち1回反復遺伝子を有するBACクローンは多数あり(22クローンのうち13種)、これらの遺伝子がゲノム上に多く散在していると考えられた。また、2-4回の複数回反復遺伝子は異

なる組合せで同一BACクローン内に複数存在していたことから、それらの遺伝子が互いに隣接して存在している可能性が示唆された。

表1 単離されたBACクローンと13Sグロブリン遺伝子

BACクローンID	遺伝子名	反復回数
Met-poor		
269I19	<i>GlbNA</i>	なし
336B7	<i>GlbNB</i>	なし
102A7	<i>Glb1A</i>	1
160L5	<i>Glb1A</i>	1
187N20	<i>Glb1A</i>	1
260C13	<i>Glb1A</i>	1
298D13	<i>Glb1A</i>	1
299D13	<i>Glb1A</i>	1
304B9	<i>Glb1A</i>	1
159F22	<i>Glb1B</i>	1
20L18	<i>Glb1C</i>	1
69E14	<i>Glb1C</i>	1
237N15	<i>Glb1C</i>	1
161E24	<i>Glb1D</i>	1
261F24	<i>Glb1D</i>	1
7J5	<i>Glb3A, Glb2B</i>	3, 2
70M10	<i>Glb3A, Glb3D, Glb2B, GlbXA(pseudo)</i>	3, 2, 偽遺伝子
75L24	<i>Glb4A, Glb3A, Glb3B, Glb3C</i>	4, 3
83J12	<i>Glb4A, Glb3A, Glb3C</i>	4, 3
15P2	<i>Glb4A, Glb3B, Glb2A</i>	4, 3, 2
148G9	<i>Glb4A, Glb3A, Glb3B, Glb3C, Glb2A</i>	4, 3, 2
342C11	<i>Glb4A, Glb3A, Glb2A</i>	4, 3, 2
Met-rich		
250F5	<i>GlbRA</i>	なし
350A6	<i>GlbRB</i>	なし
38P20	<i>GlbRC</i>	なし
365H11	<i>GlbRC</i>	なし

(2) 0回反復、1回反復、Met-richサブユニット遺伝子については、BACクローンDNAを鋳型とし、複数回反復遺伝子を含むBACクローンについてはショットガンクローンを作製して、13Sグロブリン遺伝子の塩基配列を解読した。その結果、合計17種の遺伝子を同定した(表1)。0回反復遺伝子は2種類、1回反復遺伝子は4種類、2回反復遺伝子は2種類、3回反復遺伝子は4種類、4回反復遺伝子は1種類、偽遺伝子は1種類、Met-rich遺伝子は3種類あり、それらの塩基配列は日本DNAデータベースに登録した。

MEGAというソフトウェアにより、アミノ酸配列全長に対する分子系統樹をNeighbor-joining法(近隣結合法)で作製したところ、0回反復遺伝子、1回反復遺伝子、2-5回反復遺伝子、Met-rich遺伝子の4グループに分類できた。2-4回反復遺伝子はゲノム上で互いに近接して存在すると推察されていたが、系統樹を用いた解析からも、これらがごく近年に分化したことが示唆された。

多くの反復配列は45塩基を反復単位としていたが、2回反復遺伝子の*Glb2B*と全ての1回反復遺伝子では3塩基の挿入が見られた。そこで、この3塩基を除去した変異体を二種類作成し(*Glb2B-3*, *Glb1A-3*)、二次構造の解析を行った。新たに作製した変異体も含め、反復配列のセンス鎖、アンチセンス鎖が取りうる二次構造を、CentroidFoldというソフトウェアで予測した。その結果、二次構造の形状やその安定性は、個々の反復配列で異なると予測された。特に*Glb2A*のセンス鎖は他と比べてヘアピン構造を形成しやすいこと、*Glb2B*のセンス鎖も余分な3塩基を取り除くこと(*Glb2B-3*)でより安定したヘアピン構

造を形成することが予測された。このことは、調製した一本鎖 DNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析した際に、*G1b2A* と *G1b2B-3* のセンス鎖の泳動が抑制されたことから支持された。ヒトや酵母の実験系ではヘアピン構造などの DNA 二次構造が複製エラーを誘発する可能性が指摘されている。ソバ 13S グロブリンの場合も、挿入された反復配列の二次構造形成が反復回数の多様性を生じた原因の一つであることが推察された。

(3) 5 種類の普通ソバの種子各 30 粒について 1 粒ずつ別々に DNA を抽出し、反復挿入配列の前後に設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、いずれの品種も種子ごとに複雑なバンドパターンを示した。特に、どの品種においても挿入配列の反復回数が多いバンドで、多型性が高いことが判明した。また、品種「出雲在来」において、7 回反復という新規サブユニット遺伝子の存在を示唆する種子が認められ、品種「牡丹そば」では 0 回反復遺伝子を欠失した可能性のある種子が確認された。反復挿入配列を持たないサブユニット (0 回反復サブユニット) の鎖はトリプシン難消化性でありアレルゲンになりやすい可能性があることから、これを欠失した種子は低アレルゲンソバ育成にむけ有用である可能性があると考えられた。

(4) 普通ソバは一般に他殖性であり、種子ごとに 13S グロブリンのサブユニット組成が異なる。従って、普通ソバにおいて窒素・硫黄施肥などの環境条件がサブユニット組成の変動に及ぼす影響を調べることは困難であった。そこで、自殖性の近縁種ダツタンソバを様々な窒素・硫黄施肥条件で栽培し、窒素栄養状態を反映する葉色の変化を観察したところ、対照区 (無施肥区) ならびにカリウム処理区で早期に SPAD 値が低下することが認められた。現在、タンパク質組成ならびに RNA 量の比較を進めており、これにより、遺伝的な組成改変のみならず、栽培環境条件に基づく組成改変も可能となるかが明らかになると期待される。

以上のように、本研究では、13S グロブリンの構造・組成変動を解析するにあたり、最も基礎的かつ有益な情報である遺伝子塩基配列の網羅的解析 (品種内多型の解析) を進めることができた。今後は、品種間多型の解析を更に進める一方で、栽培環境による組成変動も精密に評価していく必要がある。これらの知見を踏まえて、特定のサブユニットの蓄積量を制御することでソバの低アレルゲン化を達成できると考えられる。一方、本研究で得られた塩基配列情報は、重篤なアレルギー反応を起こす「特定原材料」を識別する技術の改善にも有用である。これにより、アレルギー事故を未然に防ぎ、安全安心なソバ製品の流通を保証し、消費・生産の拡大につながることを期待したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

田中朋之・中川真梨子・佐野まどか・安井康夫 (2014) “反復配列を持たない 13S グロブリン” を低減化したソバ個体の育成 - 0 回反復サブユニットの遺伝子識別技術の開発 - .作物研究 59:印刷中、査読有

http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA12344964_ja.html

Sano, M., Nakagawa, M., Oishi, A., Yasui, Y., Katsube-Tanaka, T. (2014) Diversification of 13S globulins, allergenic seed storage proteins, of common buckwheat. Food Chemistry, 155, 192-198, 査読有

Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.047.

Khan, N., Takahashi, Y., Katsube-Tanaka, T. (2012) Tandem repeat inserts in 13S globulin subunits, the major allergenic storage protein of common. Food Chemistry 133: 29-37, 査読有

Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.056

[学会発表] (計 6 件)

T. Katsube-Tanaka, Allergenic protein, 13S globulin, of common buckwheat diversified by the insertion of tandem repeat. The 2013 meeting of Korean Society of Crop Science (Pyeongchang, Korea), 2013, 16-19 Oct.

佐野まどか・中川真梨子・安井康夫・田中朋之, ソバ 13S グロブリン遺伝子の多様性評価. 日本作物学会 (鹿児島大学, 鹿児島), 2013 年 9 月 10-12 日

T. Katsube-Tanaka, M. Sano, M. Nakagawa, Y. Yasui, Diversity of 13S globulin genes identified in a genomic DNA library of common buckwheat. The 12th International Symposium on Buckwheat (Laško, Slovenia), 2013, 21-26 Aug.

田中朋之・中川真梨子・佐野まどか・安井康夫, “反復配列を持たない 13S グロブリン遺伝子” を欠失したソバ個体の探索. 近畿作物・育種研究会第 175 回例会 (近畿大学, 和歌山), 2013 年 7 月 13 日

佐野まどか・中川真梨子・安井康夫・田中朋之, ゲノムライブラリーを用いたソ

バ13S グロブリンにおける反復挿入配列の解析．日本作物学会（東北大学，仙台），2012年9月10-11日

T. Katsube-Tanaka, N. Khan, Y. Takahashi, M. Nakagawa, Analysis of the major seed storage protein, 13S globulin, in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). The 7th Asian Crop Science Conference (Bogor, Indonesia), 2011, 27-30 Sep.

〔図書〕(計 1 件)

Katsube-Tanaka T. (2013) Capillary electrophoresis of seed storage proteins: the separation and identification of microheterogeneous rice glutelin subunits. *In* N. Volpi and F. Maccari (*Eds.*) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 984: Capillary Electrophoresis of Biomolecules (pp.1-358). Humana Press (Springer), New York, pp.253-261.
Doi: 10.1007/978-1-62703-296-4_18.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kais.kyoto-u.ac.jp/japanese/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 朋之 (TANAKA TOMOYUKI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：50224473

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし