

機関番号 : 14301

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580013

研究課題名 (和文) ソバアレルゲン低減化のための種子貯蔵タンパク質組成の変動解析

研究課題名 (英文) Analysis on the storage protein composition of common buckwheat

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

研究成果の概要 (和文) : ソバ種子タンパク質の組成変動を詳細に解析することにより、ソバ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。特にソバの主要な貯蔵タンパク質である13S グロブリンに着目し、2D-PAGE 法やイネグレルリン抗体とダイズグリシニン抗体を組み合わせたタンパク質解析、ならびに13S グロブリン $\alpha$ 鎖に見出された反復挿入配列部位を増幅するPCR 法により、(i)13S グロブリンの多くはメチオニン含有率の低いサブユニットから構成されること、(ii) 13S グロブリン $\alpha$ 鎖の変異の大部分は反復挿入配列の長さの違いで説明できることを見出した。さらに、(iii) 反復挿入配列を有しない $\alpha$ 鎖はトリプシンに対する消化性が低く、アレルゲン性が他の $\alpha$ 鎖と異なる可能性が示唆された。一方、窒素・硫黄施肥条件を変えて栽培した自殖性ソバ種子のサブユニット組成に、本研究の条件下では変動は見出されなかった。

研究成果の概要 (英文) : The prevalent allergen of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), Fage 1, is  $\beta$  polypeptide of the most abundant storage protein, 13S globulin. Because the 13S globulin is composed of multiple diversified subunits, the subunits of 13S globulin were characterized. The 13S globulin  $\alpha$  polypeptides were categorized into four types and were further grouped into methionine-poor and methionine-rich subunits as major and minor types, respectively. The large variation in size among the  $\alpha$  polypeptides was explained by the different lengths of the tandem repeats. Beside the three known methionine-poor subunits of 13S globulin, four new methionine-poor subunits with 0, 2, 4, and 6 tandem repeats seemed to exist. Because the tandem repeat region was hydrophilic with many arginine residues, digestibilities against trypsin were different between the subunits with and without the tandem repeat. The tandem repeat insertion in the methionine-poor subunits of the 13S globulin may reduce common buckwheat allergenicity.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食糧生産学

科研費の分科・細目：農学 作物学・雑草学

キーワード：ソバ、アレルゲン、貯蔵タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

ソバは、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。しかしながら、現在栽培されている普通ソバは、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、日本での栽培面積は微増しているものの低い水準にとどまる。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、種子に含まれる13S グロブリンのβ鎖（24kDa）および2S アルブミン（16kDa, 14kDa）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、ダイズやイネの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かかわらず、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, GluA2, GluA3, GluB1, GluB2, GluB4）をタンパク質レベルで分類することに成功し、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、その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、品質改善が可能であることを明らかにした。

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

（*Allergology Int.*, 49:117）。このことは、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。

以上の経緯より、ソバ13S グロブリンのサブユニット組成を詳細に分析し栄養性やアレルゲン性を評価した上で、そのサブユニット組成が品種や栽培環境条件によってどう変動するかを明らかにする必要があると考えられた。

## 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 グロブリンについては、タンパク質レベルでの解析例は極めて限られて

いた。そこで、研究代表者らがこれまで培ってきた独自の技術や材料を利用して、タンパク質レベルでソバ13S グロブリンサブユニットの組成、サイズ、種類、蓄積量、その他物理化学的性質を明らかにすることを目的とした。一方、タンパク質レベルでの解析を補完するために、DNA レベルでの解析（遺伝子クローニング、塩基配列決定）も行うこととした。

また研究代表者らは、イネグルテリンの解析において、窒素・硫黄代謝が貯蔵タンパク質サブユニット組成に大きく影響することを明らかにしてきた。同様のことは、マメ科植物の貯蔵タンパク質組成についても観察されており、限られた硫黄条件下でも窒素同化量を最大にしようとする種子植物に広く共通して存在するメカニズムであると推察される。そこで、ソバにおいても、外部から施肥として与える無機態の窒素化合物・硫黄化合物によってソバ13S グロブリンのサブユニット組成が変化するののかについても明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試材料

ソバ粉の解析には、農事組合法人C から購入した玄ソバ粉（品種「信濃1号」）と、S社、M社、S(TM)社からそれぞれ購入したソバ粉の計4種を使用した。また、種子ごとの解析には滋賀県の種苗会社から購入した品種「信濃1号」の種子を用いた。

#### (2) タンパク質の解析

試料よりグロブリン画分を調製し、分析に用いた。14%アクリルアミド濃度分離ゲルによるSDS-PAGE、pI3-10 またはpI4-7 の等電点二次元電気泳動（2D-PAGE）、イネグルテリンのサブユニットGluB1 に特異的に反応する抗体（以下、グルテリン抗体）とダイズグリ

シニンのサブユニットA1aB1b に特異的に反応する抗体（以下、グリシニン抗体）を用いたウェスタンブロッティングを行った。

#### (3) ゲノムDNA の調製とPCR

Ampdirect® Plus (Shimadzu 社) というキットを用いて、「信濃1号」の種子から1粒ずつ別々にゲノムDNA を粗抽出した。GenBank に登録のある13S グロブリンサブユニット遺伝子 (D87980) の5' 末端側から433-663 bp 付近に存在する反復挿入配列の塩基配列を参考に、反復挿入配列部分の前後に以下に示す2組のプライマーセット (left1/right1, left1/right2) を設計した。

Met-poor サブユニット用プライマー

5' forward:(left1) AGGATGYCCGGAGACRTWCCA

3' reverse:(right1) CTAACGTCYCATCGAGCTG

Met-rich サブユニット用プライマー

5' forward:(left1) AGGATGYCCGGAGACRTWCCA

3' reverse:(right2) CGGTGTTGAGGTTGTGGAC

left1 プライマーはMet-poor サブユニット

とMet-rich サブユニットに共通に使用した。

PCR 反応は、サーマルサイクラー (Takara 社 Standard PCR) と200  $\mu$ l チューブを用い、サンプル0.2  $\mu$ l を含む反応系の全量を10  $\mu$ l とし、以下の条件で行った。

I : 95°C, 10 分間 (酵素活性化)

II : 94°C, 30 秒 (変性)

III: 60°C 1 分間 (アニーリング)

IV : 72°C 1 分間 (伸長)

V : II~IV を45 サイクル繰返し

VI : 72°C 7 分間 (最終伸長反応)

#### (4) アガロース電気泳動とDNA 断片のクローニング

2%アガロースゲル(1×TAE を含む)を用いて、PCR 増幅産物を定電圧100V で30 分間泳動した。なお、泳動バッファーには1×TAE

を用いた。泳動後、UV トランスイルミネーターを用いてアガロースゲルに紫外線を照射してバンドを検出した。電気泳動後のアガロースゲルからPCR 増幅バンドを切り出し、定法によりクローニングを行った。クローニングしたDNA はDTCS Quick Start kit を用いてシーケンス反応を行い、シーケンサー (BECKMAN COULTER 社)を用いて、その塩基配列を確認した。

#### (5)トリプシン消化試験によるアレルゲン性の評価

食品タンパク質のアレルゲンに共通する4つの特徴のうちの一つは、消化器系の中で消化されにくいことである。そこで、十二指腸で働く消化酵素トリプシンを用いて、13S グロブリンサブユニット間の消化性の違いを明らかにし、潜在的なアレルゲン性の評価を試みた。供試材料には、玄そば粉から抽出したグロブリン溶液を用い、重量比1/100 (w/w)となるトリプシンと50mM 炭酸水素アンモニウムpH7.8 を加え、37°Cで5, 15, 30, 60, 120分間の湯浴処理を行った。湯浴処理後、ただちに5分間の煮沸処理を行い反応を停止した。等量の2 × SDS buffer, 5% ME(v/v), 4% BPB(w/v)を加えて、(2) タンパク質の解析で記した手法と同様の方法にて解析した。

#### (6)施肥条件に対するサブユニット組成の変化

九州沖縄農業研究センターで育成された自殖性系統「09AL37-1」を供試品種として用い、素焼き10号鉢(φ=30cm)を圃場に埋設してポット栽培を行った。2010年8月20日に播種し、9月10日に移植した。実験区として、施肥処理を行わない対照C区の外に、塩化アンモニウムを与えたN区(N:4.00 g/m<sup>2</sup>)、硫酸アンモニウムを与えたN+S区(N:4.00

g/m<sup>2</sup>, S:4.58 g/m<sup>2</sup>)、硫酸カリウムを与えたS区(S:4.58 g/m<sup>2</sup>, K:11.17 g/m<sup>2</sup>)、塩化カリウムを与えたK区(K:11.17 g/m<sup>2</sup>)を設け、各区6反復の計30ポットを用いた。開花後18日目と27日目に施肥処理を行った。処理開始時に開花していたものに関しては、ラベルをして区別した。開花後56日目までに複数回(27, 30, 35, 42, 51, 56日目)に分けて種子を採取した。なお、各ポットを代表する葉についても採取した。種子からグロブリン画分を抽出し、SDS-PAGEによりサブユニット組成を調べた。また、処理区ごとに代表的な葉を選び葉色を画像解析法により比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 13S グロブリンサブユニットの構造解析  
文献や塩基配列データベースを検索し既報の13S グロブリンサブユニットに関する情報を整理したところ、13S グロブリンのサブユニットには、メチオニン含有率の低い3つのサブユニット(Met-poor)と、メチオニン含有率の高いサブユニット(Met-rich)があった。3つのMet-poor サブユニットの主たる違いはα鎖の途中に挿入された反復配列の長さの違いで説明できた(図1)。反復配列は図1に示すような15残基の繰り返しにより構成されていた。

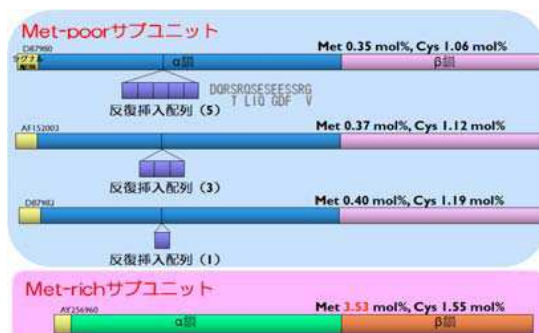


図1 既報の13S グロブリンサブユニット(βロ型)の一次構造模式図

国内で流通する4種類のソバ粉をSDS-PAGEに供試し、グリシニン抗体とグルテリン抗体

を用いてウェスタンブロッティングにより分析したところ、少なくともa1-a10の13Sグロブリンα鎖が検出された。4種類のソバ粉間にはサブユニット組成の変動は小さく、サブユニットごとにグリシニン抗体とグルテリン抗体に対する反応性が異なった(図2)

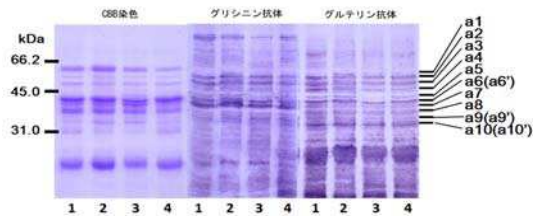


図2 グルテリン抗体とグリシニン抗体を用いた13Sグロブリンα鎖の分類

品種「信濃1号」のソバ粉を2D-PAGEにより分析したところ、13Sグロブリンα鎖の分子量の変異は等電点の変異に比べ著しく大きく、逆にβ鎖の分子量の変異は著しく小さかった。さらに詳細な2D-PAGEとウェスタンブロッティングにより、13Sグロブリンα鎖は同族であるダイズグリシニンとイネグルテリンの抗体に対する反応性の違いにより4タイプに分類できた(図3)。このうち、どちらの抗体にも反応しない低分子量のスポットは、その分子量と等電点からMet-richサブユニットであり、全サブユニットに占めるその割合は高くないと推察された。

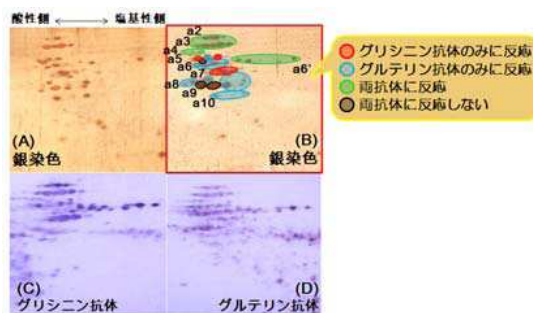


図3 二次元電気泳動による13Sグロブリンα鎖の分類

反復挿入配列前後に設計したMet-poorサブユニット用プライマーを用いたPCRとSDS-PAGEにより、他殖性である品種「信濃1号」の種子30粒を種子ごとに調べたところ、種子間で著しい多型が確認された(図4)

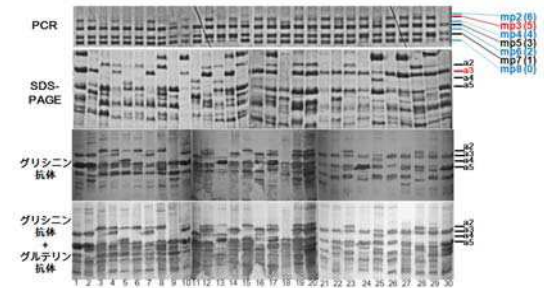


図4 種子間にみられる多型の比較

PCR増幅バンドmp2-mp8の塩基配列を解読した結果、それぞれ6~0回の反復配列を有しており、新規サブユニットの存在が示唆された。一方、タンパク質バンドa3とPCR増幅バンドmp3の出現パターンに高い関係性が認められたことと、a1-a8、mp2-mp8のバンドがほぼ等間隔に観察されることから、13Sグロブリンα鎖の変異の多くは反復配列の長さの違いで説明できると推察された。

Met-poorサブユニットの反復挿入配列にはアルギニンが多く親水性が高かった(図5)。

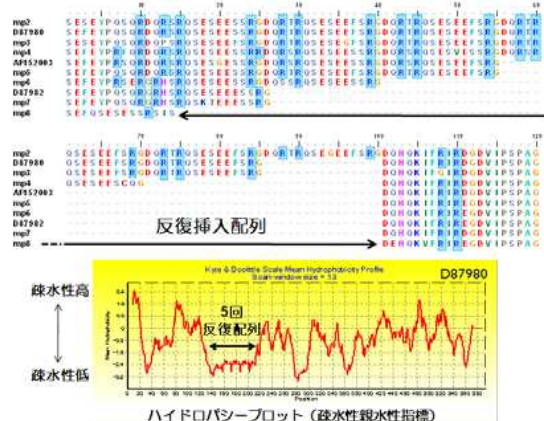


図5 反復挿入配列の一次構造の比較

そこで、グロブリン画分をトリプシンと反応させたところ、α鎖については反復配列を

有すると推察されるバンドが速やかに分解され、β鎖の一部も分解を受けた。消化の悪いタンパク質がアレルゲンになりやすいとされることから、サブユニットによりアレルゲン性が異なることが推察された (図6)。

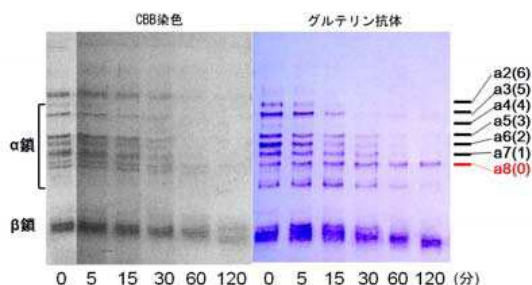


図6 トリプシンによる消化性の比較

(2) 窒素・硫黄代謝に対するサブユニット組成の変化

イネグルテリンのサブユニット組成は、窒素・硫黄代謝に影響を受けて変化することが明らかにされている。そこで、13S グロブリンのサブユニット組成もまた、窒素・硫黄代謝により変化するか調べた。九州沖縄農業研究センターで育成された自殖性系統

「09AL37-1」を窒素・硫黄の施肥条件を変えて栽培した。その結果、栄養生長器官である葉色には施肥条件により変化が見られたが、種子中の13S グロブリンのサブユニット組成に顕著な変化は見られなかった。

以上のことから、(i) 13S グロブリンのサブユニット組成は環境条件の影響を受けにくいこと、(ii) 低アレルゲン性のソバを作出するためには、反復挿入配列の有無に着目して育種的にサブユニット組成を変えることが有効であると示唆された。

## 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 Tomoyuki Katsube-Tanaka, Hiromichi Nakashima, Nadar Khan, Takeshi Yamaguchi, Jyunichi Nakano.

Changes in the Subunit Composition of Seed Storage Proteins by Controlling Nitrogen and Sulfur Metabolism

I. Rice plants in sandy soil and hydroponic cultures.

Journal of Crop Research, 56, 2011, in Press 査読あり

[学会発表] (計2件)

① カーン ナダル・高橋悠介・田中朋之.

普通ソバ種子貯蔵タンパク質のサブユニット組成の変化

第二報 13S グロブリンMet-poor サブユニットの構造的特徴.

日本作物学会第231 回講演会

2011 年3 月31 日 東京農業大学農学部.

② 高橋悠介・カーン ナダル・松井勝弘・田中朋之.

普通ソバ種子貯蔵タンパク質のサブユニット組成の変化.

日本作物学会第230 回講演会

2010 年9 月5 日北海道大学農学部.

(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