

ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) の 種子形成過程に発現する蛋白質の研究

学位論文内容の要旨

ソバは穀類に属し、アミノ酸バランスのすぐれた世界的にも重要な子実作物である。またソバは日本人の食文化にはなくてはならないものであり、特に北海道は生産量日本一位を誇るソバの一大産地である。しかしながらソバの経口摂取により激しいアレルギー反応（全身性アナフィラキシー）を引き起こすことが知られているが、種子形成に関する分子生物学的な研究はほとんどなされていなかった。本研究ではソバの発達中の種子よりcDNAライブラリーを作成し、未熟種子中で発現量の多い遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、ソバの主要なアレルゲン蛋白質の遺伝子を解明した。これらの概要は次のようである。

1. ソバ未熟種子からの遺伝子のクローニング

特異的発現遺伝子のクローニング

受粉後14日目のcDNAライブラリーを作成し、ディファレンシャルディスプレイを行ない、ソバ未熟種子に特異的な遺伝子をクローニングした。そのうち4つの遺伝子の解析を行った。

ソバの全種子蛋白質のうち50%近くを占める13Sグロブリン蛋白質を構成していると考えられる遺伝子FA02 (1905bp) とFA18 (1691bp) をクローニングした。このうちFA02はソバの主要なアレルゲン蛋白質BW24KDのN末端と相同性を示した。FA02とFA18はともに、相同性比較、ウエスタンブロットティングの結果からN末端にシグナルペプチドを持ち、ジスルフィド結合を介して2つのサブユニットを形成するレグミン様蛋白質であることが判明した。これらの遺伝子は多重遺伝子族を形成していた。

Fe2SA1 (628bp) の予想されるアミノ酸配列は全長133アミノ酸残基からなり、他の植物の2Sアルブミン蛋白質と相同性を示した。2Sアルブミンの特徴であるメチオニンを18.7%含み、システインの位置は他の2Sアルブミン蛋白質同様高く保存されていた。

FA02、FA18ならびにFe2SA1とも発現は、受粉初期には見られず、その後種子の発達にしたがって急激に発現が増加し成熟に近づいて徐々に減少する典型的な貯蔵蛋白質の発現様式であった。

EL2017 (1014bp) の予想されるアミノ酸配列は全長252アミノ酸残基からなり、グリシンを21%含み、ヒマワリのデハイドリンと21%の相同性を示した。LEA蛋白質の特徴

であるYセグメント (DEYGNP) 様の配列ならびにC末端には、塩基性アミノ酸であるリジンに富んだKセグメント (KIKEKLPG) が存在した。また種子発達中のEL2017遺伝子は成熟が進行するにつれて高くなった。

EL0847 (714bp) の予想されるアミノ酸配列は全長174アミノ酸残基からなり、キウイ(pKIWI501)と33%、ゴム(Hev b 5)と31%、バレイショ(TUB 8)と38%、ブドウと42%の相同性を示した。EL0847の予想されるアミノ酸配列には酸性アミノ酸のグルタミン酸が31%含まれており、予想される蛋白質の構造は、ほとんどのペプチド鎖が α ヘリックス構造をとると考えられる。

2. ソバアレルゲン蛋白質に関する研究

FA02の β サブユニット (BW24KD) を大腸菌蛋白発現ベクターに組込、ソバアレルゲン蛋白質BW24KDを作成し、これに対する抗体を作成した(抗BW24KD抗体)。抗BW24KD抗体を用いたソバ種子蛋白質のイムノプロット像は、ソバアレルギー患者の血清を用いた抗IgE抗体を用いて検出したイムノプロット像と類似していた。

また患者血清は、大腸菌より精製したBW24KD蛋白質と反応した。しかしながら反応は弱く、また2重抗体サンドイッチ間接法を行なった場合も反応が見られなかった。

EL0847はゴムのアナフィラキシスを起こす蛋白質としてクローニングされたHevb5と相同性を示した。キウイやバレイショにおいてもラテックスのアレルギー患者が果物のアレルギー・バレイショのアレルギーを示すことからアレルゲンの可能性が考えられる。

Fe2SA1はソバの16kDa、14kDaのアレルゲンと一部、相同性を示した。2Sアルブミンは多くの植物で多重遺伝子族を形成していることから、16kDa、14kDa蛋白質がFe2SA1のホモログである可能性が示唆される。また2Sアルブミンは、クルミやピーナッツの主要なアレルゲンであり、Fe2SA1もソバのアレルゲンである可能性が示唆され、他の食品との交叉反応の原因蛋白質のひとつと考えられる。

3. ペルオキシレドキシンのソバ種子局在性

ソバ種子発達過程においてLEA蛋白質と同様な発現様式を示したペルオキシレドキシンの種子内局在性について検討した。イネから精製したペルオキシレドキシンの抗体を用い、ソバ種子における組織局在化について検討した。その結果、子葉にペルオキシレドキシンの特異的に存在していることが判明した。細胞内部では細胞全体が染色され、細胞内顆粒が濃く染まっていたが明らかな局在化は観察されなかった。

ペルオキシレドキシンの蛋白質は種子で特異的に発現する蛋白質であり、新しい抗酸化蛋白質である。この蛋白質の細胞局在性も未解明な点が多く、休眠との関連性も指摘されている。単子葉植物であるイネと双子葉植物であるソバを使ってこれらの細胞内局在の違いについて検討する必要があると考える。

本研究でクローニングを行なったFA02、FA18はソバの主要な種子蛋白質13Sグロブリンを構成する蛋白質であり、またこれらの遺伝子はソバの主要なアレルゲン蛋白質BW24KDをコードしていた。BW24KDに対する抗体は、アレルゲンのELISA検定を行うことにより、低アレルゲンソバ育種の有効な方法と考えられ、実際にこの抗体を使用した育種が行われている。またBW24KDの大腸菌発現蛋白質は、ソバアレルギー患者の診断に有効なだけでなくエピトープの解明をもたらすこととなる。他の植物アレルゲンと相同

性を示すEL0847・Fe2SA1は、即時型過敏症を示さないアレルギー患者のアレルゲン解明や交叉反応を示すアレルゲンの解明に役立つと考えられる。

作物の種子形成過程に発現する蛋白質は、各種ストレスに対する防御機能、発芽の制御さらに食品としての価値を決定する重要な因子である。今後これらの研究を進めることにより育種のみならず、食品、医療の面において大いに貢献するものとする。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜久田	嘉郎
副査	教授	三上	哲夫
副査	教授	岩間	和人
副査	助教授	増田	清

学位論文題名

ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) の 種子形成過程に発現する蛋白質の研究

本論文は図 40、表 10 を含み、6章からなる総頁数 133 頁の和文で構成され、別に参考論文6編が添えられている。

ソバは穀類に属し、アミノ酸バランスのすぐれた世界的にも重要な子実作物である。またソバは日本人の食文化にはなくてはならないものであり、特に北海道は生産量日本一位を誇るソバの一大産地である。しかしながらソバの経口摂取により激しいアレルギー反応(全身性アナフィラキシー)を引き起こすことが知られているが、種子形成に関する分子生物学的な研究はほとんどなされていなかった。本研究ではソバの発達中の種子よりcDNAライブラリーを作成し、未熟種子中で発現量の多い遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、ソバの主要なアレルゲン蛋白質の遺伝子を解明した。これらの概要は次のようである。

1. ソバ未熟種子からの遺伝子のクローニング

受粉後 14 日目の cDNA ライブラリーを作成し、ソバ未熟種子に特異的に発現する遺伝子をクローニングした。そのうち 4 つの遺伝子の解析を行った。

ソバの全種子蛋白質のうち 50% 近くを占める 13S グロブリン蛋白質を構成している遺伝子 *FA02*(1905bp) と *FA18*(1691bp) をクローニングした。このうち *FA02* 蛋白質はソバの主要なアレルゲン蛋白質 *BW24KD* の N 末端と相同性を示した。*FA02* と *FA18* 蛋白質はともに、N 末端にシグナルペプチドを持ち、ジスルフィド結合を介して 2 つのサブユニットを形成するレグミン様蛋白質であることが判明した。これらの遺伝子は多重遺伝子族を形成していた。

Fe2SA1(628bp) 遺伝子は、2S アルブミンの特徴であるメチオニンを 18.7% 含み、システインの位置は他の 2S アルブミン蛋白質同様高く保存されていた。

FA02、*FA18* ならびに *Fe2SA1* 遺伝子には、受粉初期にそれらの発現が見られず、その後種子の発達にしたがって急激に発現が増加し成熟に近づいて徐々に減少する典型的な貯蔵蛋白質の発現様式であった。

EL2017(1014bp) 遺伝子は、グリシンを 21% 含み、ヒマワリのデハイドリンと 21% の相

同性を示した。LEA 蛋白質の特徴であるYセグメント(DEYGNP)様の配列ならびに C 末端には、塩基性アミノ酸であるリジンに富んだKセグメント(KIKEKLPG)が存在した。また種子発達中のこの遺伝子は成熟が進行するにつれて高くなった。

EL0847(714bp) 遺伝子は酸性アミノ酸のグルタミン酸が 31%含まれており、予想される蛋白質の構造は、ほとんどのペプチド鎖が α ヘリックス構造をとると考えられる。

2. ソバアレルゲン蛋白質に関する研究

FA02 の β サブユニット(BW24KD)を大腸菌の蛋白質発現ベクターに組み込み、ソバアレルゲン蛋白質 BW24KD を作成し、これに対する抗体を作成した(抗 BW24KD 抗体)。抗 BW24KD 抗体を用いたソバ種子蛋白質のイムノブロットング像は、ソバアレルギー患者の血清を用い抗 IgE 抗体を用いて検出したイムノブロットング像と類似していた。

また患者血清は、大腸菌より精製した BW24KD 蛋白質と反応したが、反応は弱く、また2重抗体サンドイッチ間接法を行った場合も反応が弱かった。EL0847 蛋白質はゴムのアナフィラキシスを起こす蛋白質としてクローニングされた Hevb5 と同同性を示した。キウイやバレイショにおいてもラテックスのアレルギー患者が果物のアレルギーや、バレイショのアレルギーを示すことからアレルゲンの可能性が考えられる。

Fe2SA1 蛋白質はソバの 16kDa、14kDa のアレルゲンと一部、同同性を示した。2S アルブミンは多くの植物で多重遺伝子族を形成していることから、16kDa、14kDa 蛋白質が Fe2SA1 のホモログである可能性が示唆される。また 2S アルブミンは、クルミやピーナッツの主要なアレルゲンであり、Fe2SA1 蛋白質もソバのアレルゲンである可能性が示唆され、他の食品との交叉反応の原因蛋白質のひとつと考えられる。

3. ペルオキシレドキン蛋白質のソバ種子局在性

ペルオキシレドキンは種子で特異的に発現する蛋白質であり、新しい抗酸化蛋白質である。ソバ種子発達過程において LEA 蛋白質と同様な発現様式を示したペルオキシレドキシンの種子内局在性について検討した。その結果、子葉にペルオキシレドキシンが特異的に存在していることが判明した。

本研究でクローニングを行なった FA02、FA18 はソバの主要な種子蛋白質 13S グロブリンを構成する蛋白質であり、またこれらの遺伝子はソバの主要なアレルゲン蛋白質 BW24KD をコードしていた。この蛋白質に対する抗体は、アレルゲンの ELISA 検定を行うことにより、低アレルゲンソバ育種の有効な方法と考えられ、実際にこの抗体を使用した育種が行われている。また遺伝子組換えによる大腸菌発現蛋白質は、ソバアレルギー患者の診断に有効だけでなくエピトープの解明をもたらすこととなる。他の植物アレルゲンと同同性を示す EL0847・Fe2SA1 遺伝子は、即時型過敏症を示さないアレルギー患者のアレルゲン解明や交叉反応を示すアレルゲンの解明に役立つと考えられる。

作物の種子形成過程に発現する蛋白質は、各種ストレスに対する防御機能、発芽の制御さらに食品としての価値を決定する重要な因子である。今後これらの研究を進めることによりソバの育種のみならず、食品、医療の面において大いに貢献するものと考ええる。よって審査委員一同は、藤野介延が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。