

## 平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年6月30日

公立大学法人横浜市立大学  
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20003) で行った研究成果等は下記のとおりです。

記

<b>1 研究者情報</b>	研究代表者氏名 (所属・職位)	川浦 香奈子 (木原生物学研究所・助教)			
<b>2 事業情報</b>	新規・継続の分け				
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	小麦粉の特性に関わるパンコムギ種子貯蔵タンパク質遺伝子のゲノム解析			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 <small>※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようにご注意ください。</small>	所属名・企業名等	役職名	氏名	役割
	木原生物学研究所	助教	川浦 香奈子	研究代表者	
<b>3 研究概要</b>	<p>ゲノム解析により、パンコムギ種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現調節機構の解明を目指す。パンコムギの種子貯蔵タンパク質は、小麦粉の加工特性に関わるグルテンを形成するため重要である。それらをコードする遺伝子は多重遺伝子族を構成し従来法では解析が困難であったが、最近、個別遺伝子の発現パターンを解析することに成功した。種子貯蔵タンパク質遺伝子の中に、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。本研究では、ゲノム解析から種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現機構を解明することを目的とした。種子貯蔵タンパク質の中で特にゲノム中にコピー数が多い<math>\alpha/\beta</math>グリアジン遺伝子の特異的プライマーを用いたPCRにより、ゲノミックライブラリーをスクリーニングした。遺伝子近傍のゲノム塩基配列を解読し、種子貯蔵タンパク質遺伝子のゲノム中の存在様式および遺伝子の発現調節に関わるプロモーター領域を解析した。ゲノム中に<math>\alpha/\beta</math>グリアジンは不均一に存在し、反復配列を介して重複を繰り返していることが示唆された。重複を繰り返す中で、発現調節機構が分化したと考えられた。</p>				

## 4 研究成果

※研究成果については、2,000 字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可)

※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)

種子貯蔵タンパク質の中で $\alpha/\beta$ グリアジンをコードする遺伝子特異的プライマーセットを用いた PCR によりパンコムギゲノム DNA 断片を含む BAC クローンをスクリーニングした。その中から、A ゲノムに由来する 2 クローン、B ゲノムに由来する 2 クローン、および D ゲノムに由来する 1 クローンのインサート全長の塩基配列を決定した。それぞれのゲノムで約 200kb の塩基配列が判明した。得られた塩基配列を用いてウェブ上の RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation System) ソフトウェアによる解析を行い、配列に含まれる機能遺伝子を予測した。また、反復配列やレトロエレメントを TREP (the Triticeae Repeat Database) に対する blast 検索により同定した。その結果、それぞれの BAC クローンには、1 から 8 の $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子が含まれており、各遺伝子の間隔は数 kb から 100kb 以上と不均等であることが示された。各 $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子の間には機能的な遺伝子は見られず、レトロトランスポゾンや DNA トランスポゾンが多く存在していた。

ゲノムの重複の様子をドットプロット解析により調査した。A ゲノム由来の BAC11 においては、 $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子は約 55kb の間隔で 2 遺伝子存在していたが、明確なゲノム重複の痕跡は見られなかったため、それらの重複は古い時期に生じたと考えられた(図 1a)。

一方で、A ゲノム由来の BAC3 においては、約 30kb の間隔で 2 遺伝子存在しており、30kb のおそらく不等交叉による重複が生じていることが示唆された(図 1b)。また、密に 4 遺伝子が存在している B ゲノム由来の BAC5

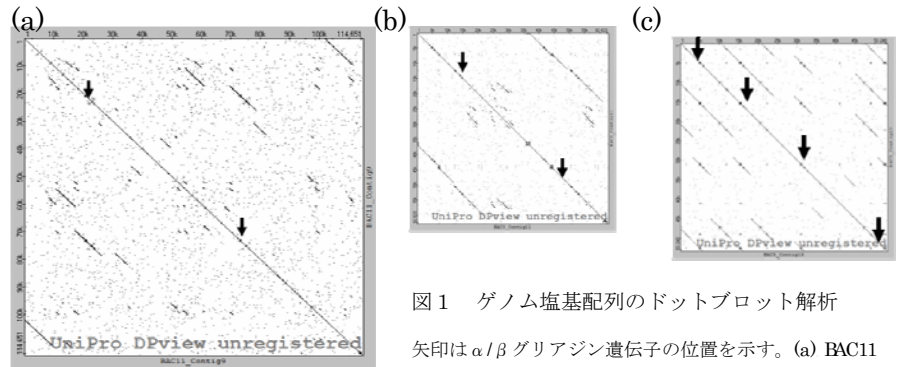


図1 ゲノム塩基配列のドットプロット解析

矢印は $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子の位置を示す。(a) BAC11

(A ゲノム) (b) BAC3 (A ゲノム) (c) BAC5 (B ゲノム)

においては、5kb から 15kb の細かい重複が複数生じていることが示され、配列の相同性から比較的新しい重複であると考えられた(図 1c)。

BAC クローンに含まれる $\alpha/\beta$ グリアジン遺伝子のプロモーター領域において、報告されている種子貯蔵タンパク質遺伝子のシス配列である RY リピート、プロラミンボックス、AACA/TA モチーフ、GCN4-like モチーフ、および TATA ボックスの存在を、遺伝子の転写開始点上流 1kb に渡って検索した。また、遺伝子が発現しているかを調べるため、KOMUGI データベース (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>) の 556,545 EST に対して blastn 検索を行った。完全に塩基配列が一致する EST が存在したとき、ゲノム上の遺伝子は発現していると判断した。EST の頻度から、遺伝子の発現パターンを推定した。EST に対応する発現している遺伝子については、TATA ボックス、AACA/TA モチーフ、GCN4-like モチーフは全てにおいて存在していた。一方で、発現している遺伝子の中で、B ゲノムの 1 遺伝子でプロラミンボックスが存在せず、B ゲノムの 2 遺伝子および D ゲノムの 1 遺伝子において RY リピートが検出されなかった。また、GCN4-like モチーフおよび AACA/TA モチーフは遺伝子により数が異なっていた。さらに、受粉後 20 日の登熟種子で発現が極端に高い BAC3 上の遺伝子は、同じ BAC3 上の受粉後 10 日でやや発現が高くなる発現パターンが全く異なる遺伝子と比較的最近分化したと見られ(図 1b)、既知のシス配列は全く同一であった。

BAC クローンに含まれる  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子のタンパク質コード領域の多型から多重遺伝子の進化関係を解析した(図2)。それぞれ遺伝子の塩基配列を MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ソフトウェアを用いて NJ (Neighbor Joining) 法により樹形図を作成した。A ゲノム、B ゲノム、D ゲノムがそれぞれ分化した年代を 1 千万年前と仮定すると、 $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子は 400 万年から 100 万年以内の短い期間にゲノム中で頻繁に重複していることが確かめられた。特に B ゲノムの BAC5 ではごく最近も細かい重複により遺伝子のコピー数が増加している様子が確認された。また、遺伝子の中にグルタミンをコードする 3 塩基 CAA の SSR

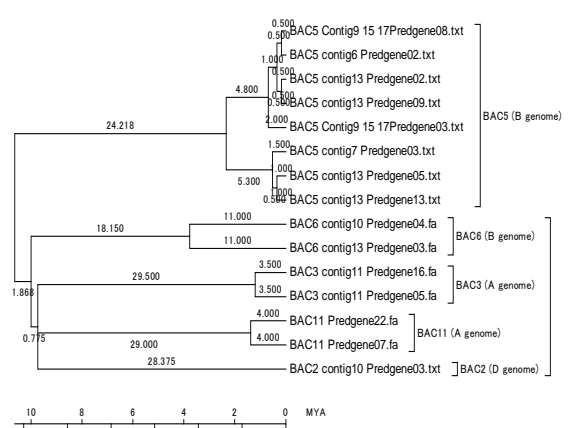


図2  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子の進化関係

(Simple Sequence Repeat) 領域を 2 カ所含むため、遺伝子間の多型が生じやすいことが推察された。

さらに、多型が生じやすいことを確認するため、発現している  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子が品種間で異なっているかを調査した。パンコムギ品種 Chinese Spring および農林 61 号において開花後 9、15、21、27 日後の登熟種子をそれぞれサンプリングし、RNA を抽出した。A ゲノムの  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子を特異的に増幅する 2 種のプライマーセットを用いて、RT-PCR を行った。PCR 産物をクローニングし、それぞれランダムにシーケンス解析を行い、発現している遺伝子の頻度を求めた。その結果、発現している遺伝子は品種間で異なっており、品種が確立されて数 100 年の間にも変異が生じていることが示唆された。

本研究により、多重遺伝子族を構成するコムギ種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の中でも、極端にコピー数が多い  $\alpha/\beta$  グリアジン遺伝子のゲノム中の存在様式が解析された。反復配列を介した不等交叉による重複を比較的最近も繰り返していることが示された。遺伝子の中に含まれる反復配列によっても遺伝子間の塩基配列の変異が生じやすいことも考えられた。品種間で発現する遺伝子が異なっていたことから、発現する遺伝子自体の変異や発現制御因子の変異が高頻度に生じていることが示唆された。高度なゲノム重複によって新たに生じた遺伝子発現機構と制御されている遺伝子を明らかにし、個別の種子貯蔵タンパク質の発現制御に応用することで、小麦粉の加工適性を決めるグルテン組成の改変に寄与すると考えられる。

## 5 研究成果の活用 (予定)

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金 (基盤 S) に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

平成 21 年度科学研究費補助金 (若手 B) に申請した。

平成 22 年度科学研究費補助金 (種目未定) に申請予定。

国際雑誌 (投稿先未定) に論文発表予定。

※ページ数は増えても構いません。

以上