



京都大学
大学院農学研究科
准教授
田中朋之

1990年 京都大学農学部農学科卒業
1990年 島根女子短期大学家政科助手
1992年 京都大学食糧科学研究所研修員
1999年 鳥取大学農学部助手
2003年 ワシントン州立大学在外研究員
2005年 鳥取大学農学部助教授
2006年 京都大学大学院農学研究科助教授
(のち准教授)

安全・安心なソバの生産と流通のためのアレルギー 評価法の検証

1. 目的

ソバは、栽培期間が短く、中山間地域の傾斜地・やせ地・高冷地などでも育ち、病害虫・雑草の害を受けにくい。そのため、省力的・環境保全的な栽培が可能であり、増え続ける耕作放棄地や休耕地での栽培を普及させることで耕地の保全を図ることが期待されている。一方、食味が優れ、蕎麦打ちなどの愛好家も多い上に、血圧上昇を抑えるルチンやバランスの良いアミノ酸組成を有することから、生活の質や健康を維持増進させる食材としても着目されている。特に高齢化と地方の過疎化が進むわが国においては、注目すべき重要な作物である(田中, 2014)。しかしながら、ソバは時に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(アレルギー)を同定し取り除くことが強く求められている。近年、ソバの消費量・作付面積は共に急速に増加しているため、確実なアレルギー対策の必要性が増していると考えられる。

これまでに、ソバ種子全タンパク質の43%を占める貯蔵タンパク質13Sグロブリンが、主要なアレルギーの一つとして同定されている(Nair and Adachi, 1999)。ソバは他殖性のため、同じ品種であっても種子ごとにタンパク質組成が異なり、これまで13Sグロブリンのサブユニットについては不明な点が多かった。我々は、13Sグロブリンのサブユニット組成をタンパク質レベルで詳細に解析するとともに(Khan et al 2012)、ゲノムDNAライブラリーを網羅的にスクリーニングして遺伝子の全塩基配列を解読した(Sano et al,

2014)。その結果、13S グロブリンには、複数のアルギニンを含む 15 アミノ酸残基から成る挿入配列を 0-6 回タンデムに持つサブユニットがあり、分子量に著しい変異があること、反復配列を持たないサブユニット(0 回反復サブユニット)はトリプシン難消化性で、アレルゲン性が高い可能性のあること、13S グロブリン遺伝子は少なくとも 17 種類あり、うち 0 回反復サブユニット遺伝子は 2 種類あることを明らかにした (Khan et al, 2012; Sano et al, 2014; 田中ら, 2014)。今後は、これらの基礎的な情報を基に、ソバのアレルギ-事故を未然に防ぐための対策を確立していくことが必要であり、長期的には低アレルゲンソバの育成を、短期的にはソバアレルゲンの確実な検出技術の構築を図ることが重要であると考えた。

わが国では、厚生労働省の省令によりソバを含む食品の「原材料表示」が義務付けられている。そして、ソバアレルゲンの検出技術に関しては「特定原材料」を含む食品の確認検査法として 13S グロブリン遺伝子を標的とした PCR 分析法が厚生労働省より通知されている。一方、我々は、ゲノム DNA ライブラリーを用いた 13S グロブリン遺伝子の網羅的解析により、上述の PCR 分析法で用いられるプライマー配列とは異なる塩基配列をもつ遺伝子が多数存在することを明らかにした (図 1)。すなわち、従来の PCR 分析法ではアレルゲン含有の有無が正しく評価できない可能性が考えられた。そこで本研究では、(1) 13S グロブリン遺伝子をもれなく検出できる PCR 分析法を開発するとともに、(2) 種子または系統ごとにサブユニットの多様性の程度を明らかにし、従来の PCR 分析法において検出を免れるリスクを評価することを目的とした。

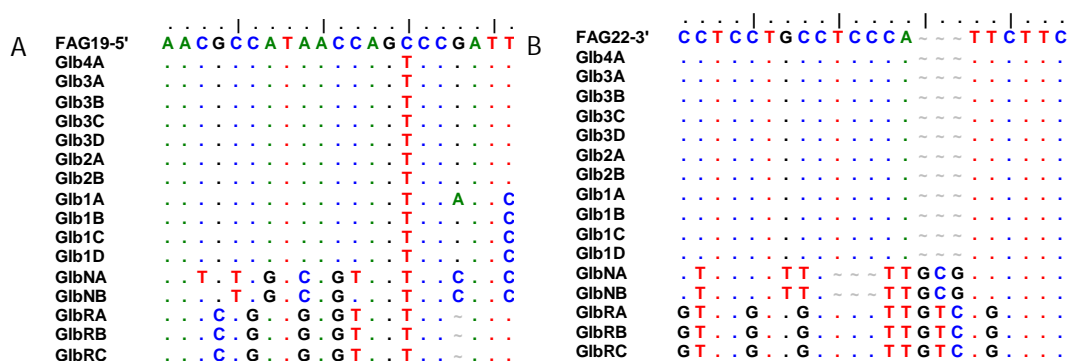


図 1. 厚生労働省の通知による PCR プライマー配列とソバ 13S グロブリン遺伝子の塩基配列の比較 (A: forward; B: reverse)。ドットおよび波線はそれぞれ同一の塩基および欠失した塩基を示す。偽遺伝子 *GlbXA* は含まず。

2. 材料と方法

(1) 全 13S グロブリン遺伝子を同時に検出する技術の開発

厚生労働省の通知によるプライマー (FAG19-5', FAG22-3') と、17 種類の 13S グロブリン遺伝子の保存領域に設計したプライマー (Left-1, Right-1, Right-2) を用いた (表 1)。

表 1 本研究で用いた PCR 用プライマー

プライマー名	配列(5'-3')
FAG19-5'	AACGCCATAACCAGCCCGATT
FAG22-3'	CCTCCTGCCTCCCATTCCTC
Left-1	AGGATGYCCGGAGACRTWCCA
Right-1	CTAACGTTTCYCATCGAGCTG
Right-2	CGGTGTTGAGGTTGTGGAC

4 グループに分類される 13S グロブリンサブユニット (Met-poor の複数回反復サブユニット、1 回反復サブユニット、0 回反復サブユニット、および Met-rich サブユニット) のうち、それぞれ代表的なサブユニット (Glb3A, Glb1A, GlbNB, GlbRA) の cDNA を有するプラスミド (2 ng) を鋳型として、遺伝子のタイプごとに増幅効率が変化しない PCR 条件を検討した。さらに、市販の 5 種類のソバ製品 (蕎麦粉 2 種類、乾麺、カップ麺、ゆで麺) から DNA 抽出緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 0.2 mg/ml Proteinase K) を用いて DNA を粗抽出した。Ampdirect (Shimadzu) と Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) または KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて PCR 法を行い、13S グロブリン遺伝子の検出感度を比較した。その際、PCR 反応液組成、反応温度条件、鋳型 DNA 濃度等を変化させて、最適な PCR 条件を見出した。

(2) ソバ系統間・個体間の遺伝子組成の変動解析

パキスタン国立農業研究センター植物遺伝資源研究所より入手した、パキスタン在来の普通ソバ 15 系統 (パキスタン北部ギルギット・バルチスタン州で収集) の各 20 粒、合計 300 粒の種子を用いた。果皮 (殻) を除去した後、ミキサーミル (キアゲン) で粉砕した。タンパク質を抽出除去した残渣より、DNA すいすい S (リーゾ) および RNase を用いて全 DNA を抽出した。プライマー (Left-1, Right-1) と KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて PCR 法を行い、13S グロブリン Met-poor サブユニットの反復挿入回数が、種子 (個体) 間および系統間でどのように変動しているのかを調べた。

3. 結果

(1) 全 13S グロブリン遺伝子を同時に検出する技術の開発

17 種類の 13S グロブリン遺伝子のアミノ酸配列全長に対して、ソフトウェア MEGA6 で分子系統樹を作製したところ、Met-poor の複数回反復サブユニット、1 回反復サブユニ

ット、0 回反復サブユニット、および Met-rich サブユニットの 4 グループに大きく分類された。そこで、それぞれ代表的なサブユニット (Glb3A, Glb1A, GlbNB, GlbRA) の cDNA を有するプラスミドを鋳型として、厚生労働省の通知によるプライマー (FAG19-5', FAG22-3') で PCR を行ったところ、Glb3A からは、期待される 127bp のバンドが強く増幅されたものの、Glb1A からは弱くしか増幅されず、GlbNB, GlbRA からはほとんど増幅されなかった。すなわち、サブユニットの種類によって、その遺伝子の増幅効率が異なっていた。このことは、プライマー (FAG19-5') のアニリング部位のミスマッチ数の違い (Glb3A/1 個, Glb1A/3 個, GlbNB/7 個, GlbRA/6 個+1 塩基欠失)、および GlbNB, GlbRA ではプライマー (FAG22-3') のアニリング部位において多くのミスマッチと欠失挿入があることで説明できた (図 1)。

一方、13S グロブリン Met-poor サブユニットの反復挿入配列の前後にある保存領域において設計したプライマー (Left-1, Right-1) および Met-rich サブユニットの当該部位のプライマー (Right-2) を用いて PCR を行ったところ、4 種のプラスミドのいずれからも同程度の増幅産物を得ることが出来た。これより、プライマー (Left-1, Right-1, Right-2) では、全 13S グロブリン遺伝子を同時に検出することが可能であると示唆された。

次に、市販の 5 種類のソバ製品から DNA を粗抽出して上記 2 組のプライマーで PCR を行ったところ、PCR 条件によって、また DNA サンプル間で増幅産物の量、サイズ、および均一性が異なるものの、いずれの DNA サンプル、プライマー組でも増幅産物が認められ、13S グロブリン遺伝子を検出できた。

(2) ソバ系統間・個体間の遺伝子組成の変動解析

パキスタン在来の普通ソバ 15 系統の各 20 粒、合計 300 粒の種子を用いて、プライマー (Left-1, Right-1) により、Met-poor サブユニットの反復挿入回数の変異を調べたところ、0 回反復遺伝子は全ての種子で検出され、3 回反復遺伝子も 1 例を除きほぼ全ての種子で検出された。1 回反復遺伝子、5 回反復遺伝子は平均でそれぞれ約 9 割、約 6 割の種子で検出された。2 回反復遺伝子、4 回反復遺伝子、6 回反復遺伝子の検出頻度は平均 3 割以下と低かった。しかしながら、2 回反復遺伝子、4 回反復遺伝子、6 回反復遺伝子の検出頻度は系統間で 0-6 割と変異があり、このことは系統の違いを特徴付ける形質の一つである可能性が示唆された。

4 . 考察

ソバのアレルゲンに関する研究は、主要な貯蔵タンパク質である 13S グロブリンの鎖 (Fag e 1) と 2S アルブミン (Fag e 2) を中心に取り組みられている。このうち、厚生労働省が「特定原材料」を含む食品の確認検査法として通知した PCR 分析法の標的遺伝子は、

13S グロブリン遺伝子である。厚生労働省の通知による PCR 分析法は、既に生産者、加工・流通業者、検査業者など現場では広く利用されており、分析法に問題があるとの指摘は今のところ無いようである。これは、ソバが他殖性のヘテロな作物であるため遺伝子組成が流動的であり、上記 PCR の標的遺伝子を持たない検体を実質的には生じ得なかったためであると推察された。本研究により、厚生労働省の通知によるプライマー（FAG19-5', FAG22-3'）では、13S グロブリンのサブユニットの種類によって、その遺伝子の増幅効率が異なるものの、プライマー（Left-1, Right-1, Right-2）では、全 13S グロブリン遺伝子を同時に検出することが可能であると示唆された。一方、市販の 5 種類のソバ製品を調べた限りでは、いずれのソバ製品、プライマー組でも、13S グロブリン遺伝子を検出できたことから、現状では厚生労働省の確認検査法に問題があるとは言えない。このことは、パキスタン在来の普通ソバ 15 系統の各 20 粒、合計 300 粒の種子を用いた解析により、プライマー（FAG19-5', FAG22-3'）で強く増幅しうる 3 回反復遺伝子が、1 例を除くほぼ全ての種子で検出されたことから支持されるであろう。上記の 3 回反復遺伝子が検出されなかった種子由来のタンパク質をウエスタンブロットにより予備的に解析したところ、3 回反復サブユニットが検出された。このことから、上記の 1 例で 3 回反復遺伝子が検出されなかった理由は、例えば抽出した DNA サンプルの純度の低さなど技術的な問題に由来する可能性が推察された。なお、3 回反復遺伝子の検出頻度が高い点は、国内および海外産普通ソバ 5 系統各 30 粒を用いた先行研究（中川, 2012）のデータにおいても確認された。

一方、自殖性のソバ中間母本が育成されるとともに（松井ら, 2008）、ソバの自家不和合性を支配する遺伝子が単離されたことにより（Yasui et al, 2012）、今後は自殖性ソバの育成が急速に進むものと考えられる。その場合、特定の遺伝子組成で固定されたホモ系統が育成され、それに由来するソバ製品が広く流通することも予想される。例えば、厚生労働省の通知による PCR 分析法では検出されないタイプの遺伝子のみに有するソバが育成・普及する可能性も考えられ、その際は分析法の見直しも必要であろう。

Yasui et al (2016)は、ソバ全ゲノム配列を解読し、データベースを公表した。しかしながら、13S グロブリン遺伝子の複雑な構造・構成のため、データベースにおいて構築された 13S グロブリン遺伝子の数は極めて少なかった（田中ら, 未発表）。従って、13S グロブリン遺伝子の数や種類、ゲノム上の配置や対立遺伝子の種類など、詳細な情報を得るため、更なる研究が必要と考えられる。

5 . 要約

厚生労働省の通知によるプライマー（FAG19-5', FAG22-3'）では、13S グロブリンのサブユニットの種類によって、その遺伝子の増幅効率が異なった。一方、プライマー（Left-1, Right-1, Right-2）では、全 13S グロブリン遺伝子を同時に検出することが可能であると示

唆された。市販の 5 種類のソバ製品を調べたところ、いずれのソバ製品、プライマー組でも、13S グロブリン遺伝子を検出できた。パキスタン在来の普通ソバ 15 系統の各 20 粒、合計 300 粒の種子を用いた解析により、プライマー (FAG19-5', FAG22-3') で強く増幅しうる 3 回反復遺伝子が、1 例を除くほぼ全ての種子で検出されたことから、現状では厚生労働省の確認検査法に問題があるとは言えないと考えられた。

6 . 謝辞

本研究の実施、取りまとめ、および関連する情報の収集において、公益財団法人サッポロ生物科学振興財団による支援を賜りましたことを深く感謝いたします。パキスタン在来ソバ 15 系統の種子は、パキスタン国立農業研究センターより分譲して頂きました。また、本研究の遂行にあたり協力を頂いた、パキスタン国立農業研究センターのカーン・ナダル博士、京都大学農学部の中本悠佳氏、鈴木晴大氏に感謝申し上げます。

7 . その他

引用文献

- 1) Khan, N., Takahashi, Y., Katsube-Tanaka T. (2012) Tandem repeat inserts in 13S globulin subunits, the major allergenic storage protein of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Chemistry* 133: 2937.
- 2) 松井勝弘, 手塚隆久, 原貴洋, 森下敏和 (2008) 自殖性の普通ソバ「そば中間母本農 1 号」の育成とその特性. 九州沖縄農業研究センター報告 第 49 号, 11-17.
- 3) Nair, A., Adachi, T. (1999) Immunodetection and characterization of allergenic proteins in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Plant Biotechnology*, 16, 219-224.
- 4) 中川真梨子 (2012) ソバ 13 S グロブリン遺伝子の多様性に関する研究 . 京都大学大学院農学研究科修士論文
- 5) Sano, M., Nakagawa, M., Oishi, A., Yasui, Y., KatsubeTanaka, T. (2014) Diversification of 13S globulins, allergenic seed storage proteins, of common buckwheat. *Food Chemistry* 155: 192-198.
- 6) 田中朋之 (2014) ソバの栽培と特性について . 京大農場報告 23:1-6.
- 7) 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: 31-35.
- 8) Yasui, Y., Mori, M., Aii, J., Abe, T., Matsumoto, D., Sato, S., Hyashi, Y., Ohnishi, O., Ota, T. (2012) *S-LOCUS EARLY FLOWERING 3*Is Exclusively Present in the

Genomes of Short-Styled Buckwheat Plants that Exhibit Heteromorphic Self-Incompatibility. PLoS ONE 7(2), e31264. doi:10.1371/journal.pone.0031264

- 9) Yasui, Y., Hirakawa, H., Ueno, M., Matsui, K., KatsubeTanaka, T., Yang, S.J., Aii, J., Sato, S., Mori, M. (2016) Assembly of the draft genome of buckwheat and its applications in identifying agronomically useful genes. DNA Research, 2016, 1-14.

本研究に関連した公表論文・学会発表

- 1) Katsube-Tanaka, T. (2016) Buckwheat Production, Consumption, and Genetic Resources in Japan. In M. Zhou et al. (Eds.) Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. Elsevier. in press
- 2) Katsube-Tanaka, T., Khan, N. (2016) Diversity and identification of 13S globulin genes, major allergen of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) seeds. Proceedings of the 7th International Crop Science Congress (Beijing, China). submitted