

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34316

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06740

研究課題名(和文)セリアック病緩和パンコムギの育成

研究課題名(英文)Breeding of low-allergen

研究代表者

遠藤 隆(Endo, Takashi)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：60068830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：セリアック病はグルテンの摂取により小腸に重篤な症状を呈する病気である。本研究の目的は、セリアック病緩和パンコムギの育成を目指して、本免疫疾患の主要抗原であるグリアジンの遺伝子座を欠失した1D染色体とグリアジンの遺伝子座を欠失した6D染色体を持つパンコムギの二重欠失系統を育成することである。1D染色体欠失5系統と6D染色体欠失4系統の中からもっとも有望な1DS-5と6DS-4のF1を自家受精してF2を得、染色体観察とPCRによって、1DS-5と6DS-4が共にホモ接合の1個体を得た。この個体から種子を増殖し、二重欠失系統を育成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Celiac disease is a serious disorder where the ingestion of gluten leads to damage in the small intestine. The major antigens of celiac disease are gamma gliadin on chromosome 1D and alpha gliadin on chromosome 6D. The purpose of this study was to create bread wheat lines that lack both parts of chromosomes 1D and 6D where the genes for gamma and alpha gliadins are located, respectively. In this study two chromosome partial deletion lines, 1DS-5 and 6DS-4 were selected to make F1 between them, and then F2 progeny was obtained. By chromosome observation and PCR analysis, one plant was confirmed to be homozygous for both 1DS-5 and 6DS-4. This plant was propagated to establish double deletion lines lacking both gamma and alpha gliadins.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：セリアック病 パンコムギ 染色体欠失 グリアジン 免疫抗原

1. 研究開始当初の背景

(1) セリアック病 (celiac disease) はコムギのグルテンが原因となる自己免疫疾患で、小腸の上皮組織が炎症を起こして慢性の下痢や栄養障害など重篤な症状を引き起こす。レストランのメニューに必ずグルテン・フリーのものがあるほどセリアック病は欧米では問題になっており近年その患者が増加している。セリアック病の症状はグルテンを摂取して直ぐに現れるのではなく、消化不良のような慢性の体調不良を引起す。このため、セリアック病であるにも拘らず気づいていない人は多く、実際の患者の数はもっと多いものと考えられている。日本でも人口の約0.7%の患者がいるとされている。パン食が主流の欧米では、セリアック病の抗原になるグルテンの主要な抗原を除去したパンコムギ品種の育成は喫緊の課題になっている。

(2) セリアック病の原因となる主要な抗原はグルテンの成分である グリアジンと グリアジンで、 グリアジンをコードする遺伝子はコムギの第1同祖群の染色体 (1A, 1B, 1D) に、 グリアジンをコードする遺伝子は第6同祖群の染色体 (6A, 6B, 6D) に座乗しており、特に1Dと6D染色体に座乗している遺伝子の効果が強い。

(3) 申請者はパンコムギ染色体の切断を遺伝的に誘発するシステムを開発して、それを利用してパンコムギの染色体欠失系統を育成した(文献)。申請者が育成した染色体欠失系統を用いたセリアック病に関する先行研究では、セリアック病の主要な抗原である グリアジン遺伝子は1D染色体の短腕に、 グリアジン遺伝子は6D染色体の短腕に座乗していること、また、これらのグリアジン遺伝子座を欠損した染色体欠失系統の小麦粉は、製パン性があまり低下することなく、しかもT-細胞に対する抗原性がかなり減少することが明らか

かになっている(文献、)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、先行研究(文献、)と予備実験で グリアジン及び グリアジンの遺伝子座が欠損していることが明らかになっている 1D 染色体欠失系統 (4 系統) と 6D 染色体欠失系統 (3 系統) を用いた。2年の研究期間で、欠失系統のすべての 12 組合せの雑種を作り、その雑種の自家受精子孫から両方の欠失をホモ接合で持つ二重欠失個体を選抜・増殖して 12 系統の二重欠失系統を育成することを目指す。二重欠失系統の選抜は Fluorescence in situ hybridization (FISH) による 染色体観察と PCR によるマーカー選抜を併用し、二重欠失系統が グリアジン及び グリアジンを欠損していることは、SDS-PAGE 法で行う。

(2) 以上のように選抜した二重欠失系統を温室と野外圃場で栽培して形質の調査を行い、農業形質が最も優れた欠失染色体の組合せを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 平成 27 年度には、1D (4 系統) と 6D (3 系統) の染色体欠失系統間の交配を行い、得られた 12 系統の F1 雑種は、染色体構成を FISH で確認して、温室で栽培して F₂ 子孫を得る。また、用いた欠失染色体を PCR で同定できるように、PCR マーカーを選抜する。また、欠失染色体をパンコムギ実用品種へ導入するための交配を開始する。

(2) 平成 28 年度には、F₂ 個体から 1D と 6D の欠失染色体が二重にホモ接合になっている個体を FISH 及び PCR で選抜する。二重染色体欠失個体は温室で栽培して種子を増殖する。増殖した種子を用いて SDS-PAGE を行い、二重染色体欠失系統では グリアジン及

び グリアジンが共に欠損していることを確認する。そして、これらの系統を温室と野外の圃場で栽培して農業形質を調査し、最適な 1D と 6D の欠失染色体の組合せを決定する。

具体的には、

1D 染色体の 4 欠失系統 (1DS-1, 1DS-2, 1DS-3, 1DS-4) と 6D 染色体の 3 欠失系統 (6DS-4, 6DS-5, 6DS-7) のすべての組合せの交配を行い、12 系統の F1 雑種を得る。

F1 雑種の染色体構成は、GAA マイクロサテライトと Afa 反復配列をプローブとした FISH で欠失領域を正確に決める。この FISH は、申請者が最初に欠失染色体を選抜したときに用いた C-バンド分染法よりも感度よく染色体構造変異を検出できる。

染色体構成を確認した F1 雑種個体を加温温室で栽培する。

F1 雑種を加温温室で自家受粉させて F₂ 子孫を得る。

グリアジン (Gli-D1, Gli-D2) 遺伝子のマーカー情報をコムギのデータベース、NBRP コムギ (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>) 等から得て、本研究で用いる 1D と 6D の欠失染色体の同定に最適な PCR マーカーを選抜する。この研究は海外共同研究者 Dr. Valárik に依頼する。年度内に 1D と 6D 染色体欠失系統合計 7 系統にチェコと日本の実用 6 品種との交配と戻し交配を人工気象器と加温温室で行う。

4. 研究成果

(1) 有望な欠失系統の選抜: 平成 27 年度に、1D (4 系統) と 6D (3 系統) の欠失系統間の 12 組合せの交配をすべて行い、すべての交配から F1 雑種を得た。しかし、親の欠失系統

間で明らかな生育の差が認められたので、生育良好な 1D の 2 欠失系統 (1D-4, 1D-5) と 6D の 2 欠失系統 (6D-4, 6D-7) 間の 4 組合せの F1 系統を染色体の調査を行って温室で栽培し、F₂ 種子を得た。

(2) 二重欠失ホモ系統の育成: F₂ 子孫の染色体構成を染色体観察により調査した。FISH 法よりも簡便な C-バンド分染法を改良した結果、選抜に十分な解像度が得られるようになったので、この調査は C-バンド分染法で行った。最も有望な 1DS-5 と 6DS-4 の組合せの F₂ 子孫から二重欠失ホモ接合の 1 個体を選抜することができた (20 個体調査)。この個体は、欠失の他に 6B 染色体が 4 本ある (2n = 44) ことも明らかになった (図 1)。この個体から自家受精子孫を約 100 粒得て、50 粒をチェコ国の海外共同研究者 Dr. Valárik に手渡し、種子増殖と免疫学的調査を依頼した。その他の組合せの F₂ の調査は時間が無く行うことができなかった。

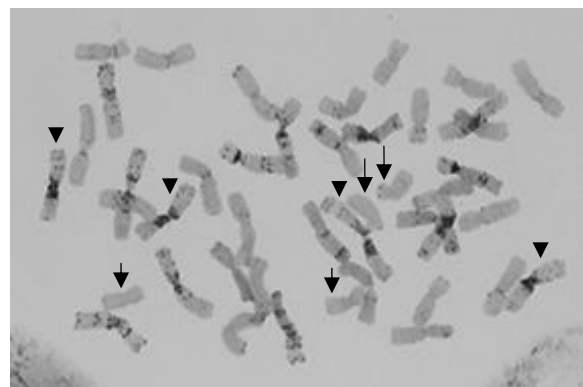


図 1 . 二重欠失ホモ個体の中期染色体の C-バンド分染像。長い矢印: 1D-5 染色体、短い矢印: 6D-4 染色体、矢頭: 6B 染色体

(3) 1DS-5 と 6DS-4 の実用品種への導入: チェコの実用 5 品種 (cv ALDNDRA, cv ASTRID, cv DAFNE, cv SEANCE, cv TERCIE) を 1D (4 系統) と 6D (3 系統) の欠失系統と交配して 35 組合せの F₁ を得たが、最も有望な 1DS-5 と 6DS-4 の組合せだけに限定して戻し交配を

行い、得られた B1 子孫から欠失を持つ個体を選抜して圃場に移植した。これらの個体間の交配により、二重欠失ヘテロ個体を選抜し、そこから二重欠失ホモ個体を選抜する予定である。日本品種（ハルキラリ）を 1DS-5 と 6DS-4 の二重欠失ホモ系統と交配する準備をしたが、穂出が遅く未だ、生育中である。

(4) PCR マーカーの選抜：1D と 6D の欠失を同定できることが期待される PCR マーカーをデータベースで検索し、PCR 解析した。その結果、1DS-5 については barc 149 (Forward: ATTCACCTTGCCCTTTTAACTCT 、 Reverse: GAGCCGTAGGAAGGACATCTAGTG)、6DS-4 については (barc 183 (Forward: CCCGGGACCACAGTAAGT、Reverse: GGATGGGGAATTGGAGATACAGAG)) という 1 つのバンドの有無で欠失を同定できるマーカーを得ることができた。確かに、この 2 つのマーカーは上述の二重欠失ホモ個体では消失していた (図 2)。

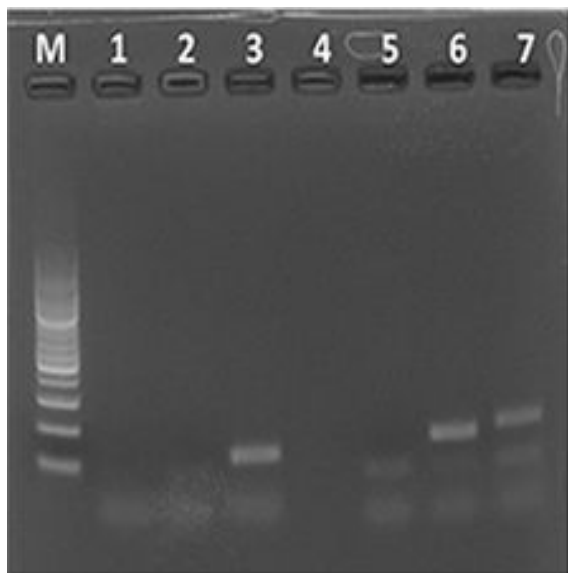


図 2 . 二重欠失ホモ個体と 1DS-5 だけがホモ接合個体の PCR 解析。プライマー：barc149(1~3), barc183(5~7)、Annealing:60 。

1: 二重欠失ホモ個体、 2: 1DS-5ホモ個体、
3: 純系、4: ブランク、5: 二重欠失ホモ個体、
6: 1DS-5ホモ個体、 7: 純系

(5) 今後の展望：本研究で、1D、6D 染色体とも欠失の最も小さな系統 (1DS-5、6DS-4) が、当然ながら最も生育がよいことが確認された。今後は、この 2 つ欠失染色体に絞ってセリアック病の抗原遺伝子座を欠損した実用品種の育成を進める。実験系統ではあるが、1DS-5 と 6DS-4 の生育良好な二重欠失ホモ系統が確立されたことは、実用品種での二重欠失ホモ系統の育成が可能であることを示した。海外共同研究者 Dr. Valárik からの免疫学的調査の最近の予報的結果によると、二重欠失ホモ系統のセリアック病に対する抗原性は、純系の抗原性の 10 倍%程度になっているとのことであった。今後育成される実用品種での二重欠失ホモ系統がどの程度の抗原性を示すかが注目される。

< 引用文献 >

Endo TR and Gill BS (1996) The deletion stocks of common wheat. J Heredity 87:295-307

Hetty et al. (2009) Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. BMC Plant Biology 9:41

Hetty et al. (2011) Dough quality of bread wheat lacking a-gliadins with celiac disease epitopes and addition of celiac-safe avenins to improve dough quality. J Cereal Sci 53:206-216

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]

無し

〔学会発表〕

無し

〔図書〕

無し

〔産業財産権〕

無し

〔その他〕

無し

6．研究組織

(1)研究代表者

遠藤 隆 (ENDO Takashi)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：60068830

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

Valárik, Miro