

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660002

研究課題名(和文)腸粘膜バリアを強化するイネ品種のスクリーニング法の開発

研究課題名(英文)High throughput screening of the rice cultivars for the improvement of intestinal barrier

研究代表者

加藤 清明(KATO, KIYOAKI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：60271748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「ゆきひかり」とイネ4品種のそれぞれを65%含む飼料を4日間給餌したラットを解剖し、大腸での遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法で比較解析した。他の4品種群と比較して、ゆきひかり群で4倍以上の発現レベルとなった184遺伝子と1/2以下の発現レベルとなった109遺伝子を選定した。ゆきひかりで発現減少していた遺伝子群には、受容体をコードするものが多く、発現が増加していた遺伝子群には、物質輸送に関わるものが多かった。続いて、上記トータルRNAを用いたリアルタイムRT-PCR法によって、ゆきひかり群で発現が減少している2種の遺伝子を特定し、ハイスループットスクリーニング法の基盤を整えた。

研究成果の概要(英文)：We identified the two rat genes which were down-regulated in rat after feeding rice cultivar Yukihikari. The present results will facilitate the development of the high throughput screening of the rice cultivars for the improvement of intestinal barrier.

研究分野：植物育種学

キーワード：米アレルギー 腸管バリア

1. 研究開始当初の背景

日常的に摂取される食物は、(1)タンパク質分解酵素によるアレルゲンの分解、(2)消化管内腔に分泌される IgA 抗体、さらに(3)消化管上皮細胞のバリア機能の3段階でアレルゲンの取り込みと好ましくない免疫応答を起こさないようになっている (Brandzaeg et al. 1997)。それにも関わらず、免疫学的に活性が保持されたままのアレルゲンが体内に取り込まれて免疫系を刺激して食物アレルギーを引き起している。植物性食品も例外ではなく、米、小麦、大豆等に対するアレルギー症状が増加している。これまでは、主にアレルゲンの特定とその除去法に関する研究が蓄積されているものの、未だ課題が残されている (山田ら 2006 総説)。さらに最近では、腸内微生物叢とアレルギーの関連も注目されているが、未解明な点が多く残されている (上野川ら 2011)。

本申請課題で着目する「ゆきひかり」は、臨床試験で米アレルギー患者の症状を改善することが実証された北海道の30年前の品種である (柳原ら 2001)。「ゆきひかり」のアレルゲンタンパクの量や患者抗体との結合活性は他の品種と同等で、アレルギー症状の改善にはアレルゲンの有無は関わっていない (柳原ら 2003)。また、腸内微生物叢に影響することで知られている難消化性デンプン量やアミロース量も他の粳米品種と同等で、腸内微生物叢に直接的に影響する機能性成分の寄与も考え難い (柳原ら 2003)。しかし、最近になって実験動物に「ゆきひかり」を摂食させると腸内環境が改善されることが示された (Sonoyama et al. 2010; 園山と加藤 2012)。すなわち、「ゆきひかり」の未知の機能性成分が、腸内環境を変化させてアレルゲンの吸収を抑制すると考えられる。これまでに当該機能性をもつ作物品種あるいは遺伝資源は無く (Sonoyama et al. 2010; 園山と加藤 2012)、世界的にも研究例が無い。

2. 研究の目的

近年、食物アレルギー患者が増加しており、中でも米、大豆、小麦等の植物性食品に対するアレルギー症が増加している。米アレルギー患者の症状を改善することで知られるイネ品種「ゆきひかり」を実験動物に摂食させると腸内環境を改善することでアレルゲンの体内への吸収を抑える機能性が予測されている。当該機能性をもつイネ品種は他に報告例が無く、貴重な遺伝資源である。本申請課題では、当該機能性を付与した新たな品種開発や遺伝資源の有効な発掘、さらには機能性の作用機序の解明を可能とする動物実験に依存しない培養細胞を用いたハイスクリーン法を開発する。

3. 研究の方法

実験動物にイネ品種の米粉を摂食させ、腸で

発現する遺伝子への影響を網羅的に定量する。「ゆきひかり」特異的に発現誘導される遺伝子群から機能アノテーションを参考にムチンの合成・蓄積・分泌の促進因子として機能することの予想される遺伝子をマーカーとして選抜し、当該遺伝子のヒトのオルソログを特定する。ヒトのオルソログがヒト培養細胞でも「ゆきひかり」特異的に発現誘導されることを確認する。

4. 研究成果

【実験1】Slc:Wister 雄ラット(n=5)に米アレルギー症状を緩和する「ゆきひかり」または親3品種と姉妹品種1品種をそれぞれ65%混ぜた飼料を4日間給餌した。4日目にラットを解剖し、大腸を摘出してトータルRNAを抽出し、各群のRNAをプールし、DNAマイクロアレイ法により遺伝子発現を比較解析した。他の4品種群と比較して、ゆきひかり群で4倍以上の発現レベルとなった184遺伝子と1/2以下の発現レベルとなった109遺伝子を特異的変動遺伝子として選定した。これらゆきひかりで特異的に発現変動する遺伝子群の生物学的機能についてDAVIDを用いて解析したところ、ゆきひかりで発現減少していた遺伝子群には、様々な受容体をコードするものが多かった。一方、ゆきひかりで発現が増加していた遺伝子群には、物質輸送に関わるものが多かった。これらのうち、機能的にも重要と思われる10遺伝子について、ラット各個体の大腸から抽出したトータルRNAを用いたリアルタイムRT-PCR法を行い、ゆきひかり群で発現が減少している2種の遺伝子を特定した。

【実験2】培地中にイネ各品種の米粉を5%添加し、腸管モデル細胞としてヒトCaco-2培養細胞を培養した。培養細胞からトータルRNAを抽出し、実験1で特定したラット遺伝子のヒトホモログの発現解析をする準備を整えた。

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8件)

1. Yamauchi T*, A Tanaka, H Mori, I Takamure, K Kato, M Nakazono* Ethylene-dependent aerenchyma formation in adventitious roots is regulated differently in rice and maize. Plant, Cell & Environment (in press) DOI: 10.1111/pce.12766【査読有り】

2. Matsuda S*, S Takano, H Nagasawa, S Yoshikawa, Y Tokuji, K Yazaki, M Nakazono, I Takamure, K Kato* Rice stomatal closure requires guard cell plasma membrane ATP-binding cassette transporter

RCN1/OsABCG5. *Molecular Plant* 9:417-427 (2016) 【査読有り】 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.007>

3. Yamauchi T, K Shiono, M Nagano, A Fukazawa, I Takamure, H Mori, NK Nishizawa, M Kawai-Yamada, N Tsutsumi, K Kato, M Nakazono* Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots. *Plant Physiology* 169:180-193 (2015) 【査読有り】doi:<http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.00106>

4. Horiuchi Y, H Yamamoto, R Ogura, N Shimoda, H Sato, K Kato* Genetic analysis and molecular mapping of genes controlling seed coat color in azuki bean (*Vigna angularis*). *Euphytica* 206:609-617 (2015) 【査読有り】DOI 10.1007/s10681-015-1461-9

5. Takano S, S Matsuda, A Funabiki, J Furukawa, T Yamauchi, Y Tokuji, M Nakazono, Y Shinohara, I Takamure, K Kato* The rice RCN11/OsXylT, 1,2-xylosyltransferase, is involved in plant development and growth in response to multiple abiotic stresses and ABA sensitivity during seed germination. *Plant Science* 236:75-88 (2015) 【査読有り】 doi: 10.1016/j.plantsci.2015.03.022.

6. Shiono K*, M Ando, S Nishiuchi, H Takahashi, K Watanabe, M Nakamura, Y Matsuo, N Yasuno, U Yamanouchi, M Fujimoto, H Takanashi, K Ranathunge, RB Franke, N Shitan, NK Nishizawa, I Takamure, M Yano, N Tsutsumi, L Schreiber, K Yazaki, M Nakazono*, K Kato* RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *Plant Journal* 80:40-51 (2014) 【査読有り】 DOI: 10.1111/tpj.12614

7. Takano S, S Matsuda, N Kinoshita, N Shimoda, T Sato, K Kato* Genome-wide single nucleotide polymorphism and Insertion-Deletion of japonica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars in the northern limit region. *Molecular Breeding* 34:1007-1021 (2014) 【査読有り】 DOI 10.1007/s11032-014-0093-4

8. Matsuda S, H Nagasawa, N Yamashiro, N Yasuno, T Watanabe, H Kitazawa, S Takano, Y Tokuji, M Tani, I Takamure, K Kato* Rice RCN1/OsABCG5 mutation alters accumulation of essential and nonessential minerals and causes high Na/K ratio resulting in a salt-sensitive phenotype. *Plant Science* 224:103-111 (2014) 【査読有り】 doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.011.

〔学会発表〕(計 10件)

1. Rice stomatal closure requires guard cell plasma membrane ATP-binding cassette transporter RCN1/OsABCG5 松田 修一, 高野 翔, 佐藤 萌子, 長澤 秀高, 吉川 晶子, 得字 圭彦, 矢崎 一史, 中園 幹生, 高牟禮 逸郎, 加藤 清明 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18日~20日 岩手大学(岩手・盛岡市)

2. 「ゆきひかり」が関わるアレルギー低減化に向けた最近の取り組み. 加藤清明 第5回北海道イネ研究会 2015年12月12日 北海道大学(北海道・札幌市)

3. イネの少分げつ変異体 *rcn11* の解析と原因遺伝子の単離 高野 翔, 松田 修一, 船引 厚志, 古川 潤一, 山内 卓樹, 得字 圭彦, 中園 幹生, 篠原 康郎, 高牟禮 逸朗, 加藤 清明 日本育種学会 第128回講演会 2015年9月11日~12日 新潟大学(新潟・新潟市)

4. イネのABCトランスポーターRCN1の機能について 松田 修一, 長澤 秀高, 吉川 晶子, 高牟禮 逸朗, 加藤 清明 平成26年度日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会 2014年12月6日 酪農学園大(北海道・江別市)

5. イネのABCトランスポーターOsABCG13の組織局在 石川 奏恵, 松田 修一, 長澤 秀高, 吉川 晶子, 加藤 清明 平成26年度日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会 2014年12月6日 酪農学園大(北海道・江別市)

6. イネのABCトランスポーターOsABCG27とOsABCG3の組織局在 長澤 秀高, 松田 修一, 吉川 晶子, 加藤 清明 平成26年度日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会 2014年12月6日 酪農学園大(北海道・江別市)

7. イネの1,2-キシロシルトランスフェラーゼ遺伝子は非生物的ストレス下での生育に関わる 高野 翔, 船引 厚志, 古川 潤一, 松田 修一, 篠原 康郎, 高牟禮 逸朗, 加藤 清明 平成26年度日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会 2014年12月6日 酪農学園大学(北海道・江別市)

8. イネのABCトランスポーターRCN1を介したABA輸送機構 松田 修一, 長澤 秀高, 佐藤 裕, 得字 圭彦, 高牟禮 逸朗, 加藤 清明 日本育種学会 第125回講演会 2014年3月21日~22日 東北大学(宮城・仙台市)

9. イネのABCトランスポーターGサブファミリーのABA応答性と組織局在 長澤 秀高, 東 祐月, 松田 修一, 加藤 清明 日本育種学会 第125回講演会 2014年3月21日~22日 東北大学(宮城・仙台市)

10. イネの根の誘導的通气組織形成過程における極長鎖脂肪酸を介したエチレン生合成の促進 山内 卓樹, 塩野 克宏, 高牟禮 逸朗, 森 仁志, 堤 伸浩, 加藤 清明, 中園 幹生 日本育種学会 第125回講演会 2014年3月21日~22日 東北大学(宮城・仙台市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/focus/focus8.html>

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

加藤 清明 (KIYOAKI KATO)

帯広畜産大学・地域環境学研究部門・教授
研究者番号：60271748

(2)研究分担者

得字 圭彦 (YOSHIHIKO TOKUJI)

帯広畜産大学・食品科学研究部門・准教授
研究者番号：90322883