

令和元年6月24日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14825

研究課題名(和文)米アレルギー症状を緩和するイネの新たな機能性の遺伝的解明

研究課題名(英文)Genetic study of the anti-rice allergy factor in rice cultivar Yukihihikari

研究代表者

加藤 清明(Kiyoaki, Kato)

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗食物アレルギー能を有する「ゆきひかり」の染色体部分を置換した2種類の染色体部分置換系統シリーズを作成し「ゆきひかり」の染色体部分の効果を検出できる異なる遺伝背景の実験材料を準備できた。  
in vitro評価系を確立するために、「ゆきひかり」と「きらら397」の精白米および炊飯米を人工消化液でin vitro消化した産物をCaco-2に添加して24時間培養し、RNAを抽出してDNAマイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った。これまでに、マーカー候補遺伝子として、変動倍率とp値をもとに37遺伝子を選定した。これらの成果により、in vitro評価系の基盤が構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

米アレルギー患者に消費されているイネ品種「ゆきひかり」の抗アレルギー能に関わるイネの遺伝学的解析に欠かせない植物材料を準備することができた。また、ヒトの培養細胞を使って、「ゆきひかり」の有効性を間接的に推し量る技術の基礎となるヒト発現遺伝子も選定した。今後、イネの遺伝子と米中の成分、そしてヒト培養細胞での発現遺伝子を統合解析することで、「ゆきひかり」の持つ機能性の遺伝的解析とその機能性の発現のモデルを仮説できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：1)We developed a total of 45 chromosome segment substitution lines that covers the entire genome of Yukihihikari as contiguous, overlapping segments in the genomic background of a superior eating quality line Joiku462 and good eating quality cv. Kirara397. 2)We performed a microarray analysis of the human intestinal cell line Caco-2 in order to decide the candidate genes to evaluate the effect of rice powder of Yukihihikari.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 米アレルギー 染色体部分置換系統

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

日常的に摂取される食物は、タンパク質分解酵素によるアレルゲンの分解、消化管内腔に分泌される IgA 抗体、さらに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、活性が保持された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こす。アレルギー患者の増加している米、小麦、大豆等に対して、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)。さらに最近では、腸内細菌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緩和することの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」によるアレルギー症状の緩和には、低アレルゲンあるいは腸内細菌叢に影響する既知の難消化性デンプン等の機能性成分は関与していない(柳原ら 2003)。最近になって実験動物に「ゆきひかり」を摂食させると腸管バリア機能を担うムチン量が増加し、腸管透過性が低下することが示された (Sonoyama et al. 2010; 園山と加藤 2013)。しかし、「ゆきひかり」の抗アレルギー能の発現に関わる成分とその機序、ならびにそのイネの遺伝様式は全く未解明なままである。

## 2. 研究の目的

米アレルギー症状を緩和するイネ品種「ゆきひかり」の作用機序について、最近、申請者は、動物実験によって、「ゆきひかり」を食べると一般品種の米食でみられる腸管内の炎症反応が抑制され(H26~27年度 挑戦的萌芽研究)、腸管バリア機能が強化され(Sonoyama et al. 2010)、アレルゲンの侵襲を抑制して米アレルギー症状を緩和する”という仮説を立てた。この仮説に基づいて、多検体の評価が困難な動物実験に代替して機能性を評価できるハイスループットスクリーニング法を開発した(H26~27年度 挑戦的萌芽研究)。本申請課題では、当該方法を用いて米アレルギー症状を緩和するイネの新たな機能性の遺伝的解剖に取り組む。イネ品種「ゆきひかり」の抗食物アレルギー能の遺伝様式を解明することを目的としている。本課題では、イネの実験系統群の作出と動物実験に代替できる *in vitro* 評価系の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### 実験1 イネ実験系統群の作出

「ゆきひかり」<sub>JK</sub>、「上育462号」<sub>JK</sub>、「コシヒカリ」<sub>JK</sub>、「きらら397」の各品種の全ゲノムリシーケンス解析(Takanoe et al., 2014)に基づいて、InDel マーカーとCAPS あるいは dCAPS マーカーを作出した(一部を Kinoshita et al., 2015)。当該マーカーを用いて、「ゆきひかり」を一回親として、「きらら397」と「上育462号」をそれぞれ1回から3回、反復親とした連続戻し交配後代についてDNA マーカー選抜を繰り返した。

### 実験2 ハイスループットスクリーニング法の開発

*in vitro* 評価系におけるマーカー遺伝子を選定するために、「ゆきひかり」とその親品種「キタヒカリ」<sub>JK</sub>、「巴まさり」<sub>JK</sub>、「空育99号」<sub>JK</sub>ならびに姉妹品種「ともひかり」の米を経口投与して4日目のラット(各群5匹)の大腸を摘出し、total RNA を抽出して供試して、マイクロアレイにより網羅的発現解析を実施した。続いて、マイクロアレイで選定した遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により定量した。さらに、上記の実験で抽出した大腸から抽出したtotal RNAのうち、「ゆきひかり」と親品種「キタヒカリ」と「空育99号」の米の給餌群について、RNA-seq 解析を実施した。

上記のマウスの実験により選定したマーカー遺伝子候補について、ヒトCaco-2細胞でのヒトオースログの遺伝子発現量を特徴付けた。「ゆきひかり」<sub>JK</sub>、「きらら397」<sub>JK</sub>、「ともひかり」<sub>JK</sub>、「空育99号」<sub>JK</sub>、「巴まさり」の精白米を腸管上皮様に分化させたヒトCaco-2細胞に処理した。処理後24時間でトータルRNAを抽出し、RT-qPCR法で遺伝子発現量を解析した。

## 4. 研究成果

### 実験1 イネ実験系統群の作出

「ゆきひかり」の染色体部分を置換した極良食味系統「上育462号」を遺伝的背景とする19系統から構成される染色体部分置換系統を作出した。また、良食味品種「きらら397」を遺伝的背景とする「ゆきひかり」の染色体部分置換系統26系統を作出した。これにより、「ゆきひかり」の抗アレルギー能の遺伝的解剖に欠かせない独自の植物材料の準備が整った。

### 実験2 ハイスループットスクリーニング法の開発

ラットの大腸の発現遺伝子を対象としたDNAマイクロアレイ解析で5種をマーカー遺伝子として選定した。これら5遺伝子について、「ゆきひかり」<sub>JK</sub>、「きらら397」<sub>JK</sub>、「ともひかり」<sub>JK</sub>、「空育99号」<sub>JK</sub>、「巴まさり」の精白米を腸管上皮様に分化させたヒトCaco-2細胞に処理したときに、炎症応答に関与する1遺伝子が、「きらら397」処理区と比較して、「ともひかり」処理区で21%相当に低くなり( $p < 0.05$ )、「ゆきひかり」処理区では37%相当となった(ns)。残りの4遺伝子については、ラットの大腸で得られた結果の再現性が得られなかった。

RNA seq 解析により、給餌したイネの品種間で発現量に差異のある遺伝子を F 検定 ( $p < 0.05$ ) により 395 遺伝子を見出した。供試した 9 匹のラットの各遺伝子の発現量に基づく階層的クラスタ解析によって、給餌した米の品種ごとにクラスタを形成した。このことは、給餌した米の品種ごとに大腸における遺伝子発現に影響したことを示し、大腸まで到達する何らかの成分の違いを反映しているものと考察した。これら給餌した品種間で発現量の異なった遺伝子のうち、「ゆきひかり」群で発現の高い 9 遺伝子、逆に低い 105 遺伝子を見出した。以上の成果は、ヒト大腸培養細胞での *in vitro* 評価系の発現遺伝子マーカーの選定の基礎となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

島貫 涉、吉川晶子、木下乃梨子、高橋奈那、川島拓也、高野 翔、西村 努、平山裕治、高牟禮逸朗、佐藤 毅、加藤 清明「北海道のイネ系統「上育 462 号」を遺伝的背景とする「ゆきひかり」の染色体部分置換系統シリーズの作成と農業関連形質の評価」日本育種学会第 132 回講演会 2017 年 10 月 6~7 日、岩手大学

島貫 涉、高橋奈那、川原千佳、高牟禮逸朗、西村 努、佐藤 毅、平山裕治、加藤清明「極良食味系統「上育 462 号」を遺伝的背景とする「ゆきひかり」の染色体部分置換系統の作出と農業特性」日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 2018 年 12 月 8 日、酪農学園大学

島貫 涉、平山裕治、高橋奈那、川原千佳、高牟禮 逸朗、佐藤 毅、加藤清明「北海道のイネ品種系統の極早生性に関与する新たな遺伝子型の特定」日本育種学会第 135 回講演会 2019 年 3 月 16 日~17 日、千葉大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。