

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05977

研究課題名（和文）ゲノム編集によりグルテンを改変した低アレルゲン小麦の作出

研究課題名（英文）Genome editing in bread wheat toward reducing allergenic gluten

研究代表者

川浦 香奈子（Kawaura, Kanako）

横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号：60381935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：パンコムギにおいて、グリアジンは種子貯蔵タンパク質の一つであり、小麦粉のグルテンの構成成分である。グリアジンをコードする遺伝子のコピー数は特に多く、一部がアレルギーの原因となる。本研究では、パンコムギにおける種子貯蔵タンパク質遺伝子それぞれの発現を制御する転写因子を特定すること、また、グリアジンを制御する転写因子の改変により、低アレルゲン化した小麦粉を産生できる系統を作出することを目的にゲノム編集を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コムギは重要作物であるが、アレルギーや自己免疫疾患の原因として問題となる。コムギでもゲノム編集技術が使えるようになったが、アレルギーの原因となるグルテンタンパク質をコードする遺伝子はゲノム中で高度に重複して存在するため、個別にゲノム編集することは現実的でない。本研究では、転写因子のゲノム編集により包括的に多重遺伝子の発現制御を行うことで、低アレルゲン小麦系統作出に向けた方略を提案できると考える。

研究成果の概要（英文）：In wheat, gliadins are seed storage proteins and major components of gluten in flour. The copy number of genes encoding gliadins is particularly high, and some of these proteins are allergenic. We previously reported that the expression of the multiple genes is independently regulated in seed developmental stage. In this study, CRISPR/Cas9 genome editing technique was applied to identify transcription factors that regulate the expression of each gliadin gene. In addition, genome editing of candidate transcription factors, namely SPA and SHP, was performed to establish hypoallergenic wheat lines. Since we could not obtain mutant lines by introducing Cas9 and gRNA RNPs, we conducted the experiment by introducing plasmid vectors into immature embryos using the particle delivery system. As a result, lines with mutations in three homoeologous genes were obtained in SPA, however no mutant line was obtained in SHP. Conditions for increasing genome editing efficiency need to be determined.

研究分野：植物ゲノム科学

キーワード：パンコムギ ゲノム編集 グルテン 転写因子 小麦アレルギー

1. 研究開始当初の背景

パンコムギの種子貯蔵タンパク質はグルテンを形成するため、小麦粉の加工適性を決定する要因であるが、一部の種子貯蔵タンパク質は小麦アレルギーやセリアック病などの自己免疫疾患の原因となる。そのため、小麦粉を使わないグルテンフリー食品が注目されている。また、化学処理により小麦粉のアレルギーの原因物質を減らす試みがされているが、食品としての加工適性が変化するため、十分に活用されていない。そこで、小麦粉のタンパク質の含有組成をできるだけ変えずに、アレルギーの原因となる分子種のみを減らしたコムギ系統を確立できれば、有用であると考えられる。

パンコムギの種子貯蔵タンパク質は主にグルテニンとグリアジンからなり、グルテニンは高分子と低分子サブユニット、グリアジンは、*gli-1*、*gli-2*、*gli-3* に分類され、さらにそれぞれをコードする遺伝子は多重遺伝子を構成する。パンコムギ標準実験系統の高精度な概要ゲノム配列が解読され (IWGSC 2018)、種子貯蔵タンパク質を含むアレルギーに関連する染色体領域のマッピングが報告されたが (Juhász et al. 2018)、特にコピー数の多いグリアジンは依然としてコードする遺伝子の正確な数やゲノム中の存在様式は明らかにされていなかった。我々は、このグリアジンに着目し、トランスクリプトーム解析や BAC ライブラリーを用いたゲノム解析、二次元電気泳動によるタンパク質の解析を行ってきた。その結果、重複しているグリアジンをコードする遺伝子の発現パターンが斉一的ではなく、個別に環境に影響されることを明らかにしてきた (Kawaura et al. 2005, Kawaura et al. 2012)。また、グリアジンの中でセリアック病のエピトープをもつ分子種を明らかにした (Kawaura et al. 2018)。

トウモロコシにおいて、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現を誘導する転写因子 Opaque2 や PBF が知られており、パンコムギではそれぞれ配列の相同性が高いホモログが報告され、発現パターンと結合するシス配列から種子貯蔵タンパク質遺伝子を発現誘導することが推測されている (Albani et al. 1997)。パンコムギにおいては、異質六倍体に起因する 3 種の同祖遺伝子が存在することから、1 つの遺伝子の変異しても他の同祖遺伝子により補完されるため、これらの転写因子の機能欠失変異体は得られておらず、実験的に機能が明らかにされていない。そのため、どの転写因子が多重遺伝子族を構成しているどの遺伝子を制御するか不明であった。

パンコムギのゲノム編集は、モデル植物のイネなどに比べて難しく、ゲノム編集された系統の作出は数例しか報告されていなかった。その中で、我々はパンコムギにおいて CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により 3 種の同祖遺伝子に変異の入った系統の作出に成功した (Abe et al. 2019)。変異導入効率の高いゲノム編集の標的配列の評価系も確立できたことから、自然変異で得られていないパンコムギの変異系統を作出できると考えられた。

2. 研究の目的

パンコムギにおいて、種子貯蔵タンパク質をコードする多重遺伝子の発現を制御する転写因子を明らかにし、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によりアレルギーの原因となるグリアジンタンパク質の蓄積を抑制した系統を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

パンコムギ (*Triticum aestivum* L.) 品種 Fielder を供試した。トウモロコシ Opaque2 のホモログである転写因子の候補 SPA および SHP について、Fielder における 3 種の同祖遺伝子の配列をデータベースよりそれぞれ取得した。転写因子の bZIP ドメイン上流で PAM 配列に隣接し、3 種の同祖遺伝子に共通することを条件に、CRISPR/Cas9 の標的配列を複数選定した。標的配列を認識する sgRNA を作製し、in vitro の評価系で sgRNA の有効性を確認し、DNA 切断活性のある標的を選抜した。

人工気象機内で栽培した植物体から、開花後 17 から 20 日の未熟胚を摘出し、パーティクルボンバードメントにより Cas9 タンパク質と sgRNA の RNP 複合体またはそれらの発現プラスミドを導入した。導入後、約 1 週間培養したカルスからゲノム DNA を抽出し、PCR および制限酵素処理により変異導入効率を検討した。ゲノム編集により変異導入ができることがカルスで確認できた標的配列について、同様に未熟胚に発現プラスミドを導入後に培養した。カルス誘導の後、再分化させ、植物体を得た。植物体の葉からゲノム DNA を抽出し、PCR および制限酵素処理、シーケンシングにより変異導入の確認を行った。

4. 研究成果

種子貯蔵タンパク質の発現を制御する候補の転写因子として SPA および SHP に着目し、パンコムギ Fielder の遺伝子配列を得た。データベースの検索から、SPA と SHP のどちらも Fielder では A、B、D ゲノムに 1 コピーずつ同祖遺伝子が存在することが示唆された。3 種の同祖遺伝子に共通する gRNA の標的を設定し、in vitro で評価した。SPA では 6 種類、SHP では 3 種類の標的の sgRNA を評価し、DNA 切断効率の良い標的をそれぞれ 1 つずつ選抜した。

SPA では、選抜した配列を標的とした gRNA の発現プラスミドと Cas9 発現プラスミドをパンコ

ムギ Fielder の未熟胚に共導入した。210 個のカルスからゲノム DNA を抽出し、変異導入を調査したところ、1 個体で変異が導入されていた。シークエンスにより DNA 配列を調べたところ、SPA-A で 1 塩基挿入または 4 塩基挿入、SPA-D で 1 塩基挿入が見られ、いずれもフレームシフトによるナンセンス変異であったため、この標的配列でノックアウト変異体作出が可能であることが示された。この標的配列を用いてゲノム編集による変異体を得るため、11 回のパーティクルボンバードメントを行い総計 840 個の未熟胚に発現プラスミドを導入した。再生した 193 個体の葉からゲノム DNA を抽出して調査したところ、4 個体で変異が見られた。その中で 1 個体は、SPA-A で 1 塩基挿入または 115 塩基挿入のバイアレリック変異、SPA-B で 1 塩基挿入が見られ野生型とのヘテロ型、SPA-D では異なる塩基の 1 塩基挿入のバイアレリック変異があり、キメラ性は見られなかったことから、遺伝子型が *aaBbdd* である変異体であることが示された。推定アミノ酸配列から、いずれの変異もナンセンス変異であることが確認された。野生型 Fielder において、種子登熟期は SPA-A や SPA-D に比べて SPA-B の発現が低いことが示されているため (unpublished) この変異体は機能欠失型を示すことが期待される。また、この変異体を自殖することで、すべての同祖遺伝子の変異型となった個体が得られるため、種子貯蔵タンパク質への影響が評価できると考えられる。

SHP では、SPA と同様に、gRNA の発現プラスミドと Cas9 の発現プラスミドを未熟胚に導入した。プラスミドを導入した未熟胚から誘導した総計 924 個のカルスから抽出したゲノム DNA を用いて変異を調査したが、変異は見られなかった。ゲノム編集を高効率化するため、プラスミド導入後の培養温度を通常の 25 から 34 にすることや、培養期間を通常の 1 週間から 2 週間へする条件検討を行ったが、いずれも変異個体を得ることができなかった。このことから、標的とする遺伝子によりゲノム編集効率が異なることが示唆された。

CRISPR/Cas9 によるパンコムギのゲノム編集として、DNA ベクターではなく、Cas9 タンパク質と gRNA の RNP 複合体を未熟胚に導入する条件を検討した。報告されているプロトコール (Liang et al. 2018) を参照し、*Lox2* 遺伝子を標的として総計 751 個の未熟胚に RNP を導入したが、変異は得られなかった。そのため、パーティクルボンバードメントで導入する RNP の量、圧力、ボンバードメントの回数の条件を検討した。RNP の量を 2 倍にした際、導入した 1166 個未熟胚の中で 4 個体に変異があり、RNP の量を 2 倍にしてボンバードメントの回数を 2 回にした際、341 個の未熟胚の中で 1 個体に変異が検出された。しかしながら、他の遺伝子を標的として RNP を導入したが、変異系統は得られなかった。

本研究では、異質六倍体のパンコムギにおいて、ゲノム編集により、種子貯蔵タンパク質を制御する転写因子の候補である SPA をコードする 3 種類の同祖遺伝子すべてがノックアウト型の変異となった系統が得られた。今後、この系統を評価することで、SPA の機能解析が進むと考えられる。一方で、CRISPR/Cas9 の発現プラスミドを導入する手法で SPA では変異系統が得られたもののゲノム編集効率は高くはなく、さらに SHP では変異系統が得られなかったこと、RNP を導入する手法でも変異導入効率は低かったことから、パンコムギにおけるゲノム編集の高効率化に向けてさらなる条件検討が必要であると考えられる。

<引用文献>

- Abe et al. Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. *Cell reports*. 2019, 28(5):1362-9.
- Albani et al. The wheat transcriptional activator SPA: a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *The Plant Cell*. 1997,9(2):171-84.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*. 2018, 361(6403)
- Juhász et al. Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Science advances*. 2018, 4(8)
- Kawaura et al. Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiology*. 2005, 139(4):1870-80.
- Kawaura et al. Molecular characterization of gliadins of Chinese Spring wheat in relation to celiac disease elicitors. *Genes & Genetic Systems*. 2018;93(1):9-20.
- Kawaura et al. Genome change in wheat observed through the structure and expression of / -gliadin genes. *Functional & integrative genomics*. 2012, 12:341-55.
- Liang et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nature protocols*. 2018, 13(3):413-30.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 著者名 Halstead-Nussloch Gwyneth, Tanaka Tsuyoshi, Copetti Dario, Paape Timothy, Kobayashi Fuminori, Hatakeyama Masaomi, Kanamori Hiroyuki, Wu Jianzhong, Mascher Martin, Kawaura Kanako, Shimizu Kentaro K., Handa Hirokazu | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Multiple Wheat Genomes Reveal Novel Gli-2 Sublocus Location and Variation of Celiac Disease Epitopes in Duplicated -Gliadin Genes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 715985 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.715985 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kamiya Yoko, Abe Fumitaka, Mikami Masafumi, Endo Masaki, Kawaura Kanako | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 A rapid method for detection of mutations induced by CRISPR/Cas9-based genome editing in common wheat | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Plant Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 247 ~ 251 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0404b | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Liu Yuelin, Luo Weifeng, Linghu Qianyan, Abe Fumitaka, Hisano Hiroshi, Sato Kazuhiro, Kamiya Yoko, Kawaura Kanako, Onishi Kazumitsu, Endo Masaki, Toki Seiichi, Hamada Haruyasu, Nagira Yozo, Taoka Naoaki, Imai Ryoza | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 In planta Genome Editing in Commercial Wheat Varieties | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 648841 ~ 648841 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.648841 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Abe Fumitaka, Haque Emdadul, Hisano Hiroshi, Tanaka Tsuyoshi, Kamiya Yoko, Mikami Masafumi, Kawaura Kanako, Endo Masaki, Onishi Kazumitsu, Hayashi Takeshi, Sato Kazuhiro | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Genome-Edited Triple-Recessive Mutation Alters Seed Dormancy in Wheat | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1369. e4 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.090 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 著者名 Noma Satoshi, Yamagishi Miki, Ogihara Yasunari, Kawaura Kanako | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Characterization of -gliadin alleles of Japanese wheat cultivars in relation to flour dough extensibility and celiac disease epitopes | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cereal Science | 6. 最初と最後の頁 103591 ~ 103591 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcs.2022.103591 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 川浦香奈子 |
| 2. 発表標題 コムギの種子貯蔵タンパク質グリアジンの包括的な解析 |
| 3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 野間聡、早川克幸、阿部千香子、鈴木彩夏、川浦香奈子 |
| 2. 発表標題 国内産パンコムギを用いた小麦粉生地進展性に寄与する -グリアジン遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 三ツ村葵, 神谷容子, 土岐精一, 遠藤真咲, 加藤悦子, 川浦香奈子 |
| 2. 発表標題 CRISPR/Cas9リボ核タンパク質複合体の直接導入によるパンコムギのゲノム編集法の確立 |
| 3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|