

第8回研究助成

## 食物アレルギーを幅広く軽減する米の研究

研究代表者

**加藤 清明** 帯広畜産大学



共同研究者

川本 恵子 帯広畜産大学

得字 圭彦 帯広畜産大学

茅野 光範 帯広畜産大学

福間 直希 帯広畜産大学

宗形 信也 北海道総合研究機構農業研究本部上川農業試験場

渡部 敏裕 北海道大学



**得字圭彦氏**  
*in vitro*評価系の開発を担当



**茅野光範氏**  
データ分析を担当



**福間直希氏**  
腸内細菌叢の解析を担当



**渡部敏裕氏**  
米中の元素分析を担当



**宗形信也氏**  
米中のアミロース含量とタンパク質含量の分析を担当

## 1. 研究の背景と達成目標

決定的な治療・対策が確立されていないために、様々なアレルギー疾患が急増している。中でも食物アレルギーは、患者の食生活の質を著しく低下させる。北海道で1986年に誕生したイネ品種「ゆきひかり」は、米アレルゲンを他の品種と同様に含むが、米アレルギーを引き起こしにくい品種として知られ、米アレルギー患者に購入され続けている。しかし、「ゆきひかり」の問題点として、「有効性の科学的エビデンスが不足していること、現在の優良品種と比較して食味が不十分なこと」が挙げられている。そこで、食味とアレルギー軽減化を両立する品種を開発できれば、食物アレルギーリスクが日常的に食する米で低減されて、健康で豊かな食生活につながるものと考えて本課題に取り組んだ。

本研究では、以下の3点を目標とした。

- ① アレルギー軽減化の *in vitro* 評価系の開発
- ② アレルギーの軽減化に関わるイネの染色体部分の特定
- ③ アレルギーの軽減化に関わるイネ遺伝子と米成分の選定

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

① アレルギー軽減化の *in vitro* 評価系の開発：マウスを解剖して採取した脾臓（免疫）細胞に米粉を処理して発現遺伝子を比較解析することで、「ゆきひかり」のアレルギー抑制効果が検出できることがわかった。アレルギー軽減化能を持たないが食味の優れた「きらら397」の米粉処理と比較すると、「ゆきひかり」処理では、炎症性サイトカイン遺伝子の発現量が低下し、一方で、サイトカイン受容体遺伝子の発現が亢進した。これによって、免疫に関わる遺伝子の発現パターンをマーカーとしたアレルギー軽減化能の評価系を開発した。

② アレルギーの軽減化に関わるイネの染色体部分の特定：アレルギー軽減化能に関与する「ゆきひかり」の責任遺伝子の含まれる染色体部分を高精度に検出し、且つ速やかな社会実装を可能とする食味の優れた2品種系統を遺伝的背景として、「ゆきひかり」の染色体部分を置換した染色体部分置換系統シリーズ212系統を開発した。染色体部分置換系統の米粉を上記①の手法により評価し、遺伝子発現パターンが「ゆきひかり」と酷似する1系統を見出した。これによって、アレルギー軽減化能に関与する「ゆきひかり」の染色体部分を全ゲノム（39,000万塩基対）の2%に相当する1箇所特定した。

③ アレルギーの軽減化に関わるイネ遺伝子と米成分の選定：アレルギー軽減化能に関与する染色体部分に、「ゆきひかり」特異的な塩基配列の変異を高頻度を持つ2遺伝子を見出し、関与遺伝子の候補として選定した。また、米中のアミロース含量やタンパク質含量ならびに元素とイオン性化合物について、「ゆきひかり」と上記②で開発した染色体置換系統シリーズを特徴付け、各種成分量に関与する69遺伝子（染色体部分）を特定した。その結果、少なくとも食味とアレルギー軽減化能は異なる染色体部分に関わることが示され、両者を集積したイネの育種素材が開発できた。なお、これら分析可能な既知の成分ではアレルギー軽減化能を説明できないことがわかった。

## 3. 研究成果

### 1) 食物アレルギー軽減化の *in vitro* 評価系の開発

#### 1.1) マウス脾臓（免疫）細胞を用いた評価系

マウスの脾臓を摘出し、調整した免疫細胞に「ゆきひかり」あるいは米アレルギーリスクの高い人に症状が出やすいとされている「きらら397号」の米粉を48時間処理した。脾臓細胞からトータルRNAを抽出し、Agilent SurePrint Mouse GE Microarrayで網羅的発現解析を行った。処理した品種間で、発現レベ

ルに2倍以上の差のある遺伝子は、609 遺伝子となった。これら遺伝子のうち 29 遺伝子がウイルス応答、11 遺伝子がインターフェロンベータへの応答、24 遺伝子がサイトカインシグナル伝達経路、8 遺伝子がインターフェロン誘導性抗ウイルス遺伝子、16 遺伝子が NOD 様受容体シグナリング経路にそれぞれ類別された。続いて、細菌やウイルスに対する免疫応答のシグナル伝達にかかわる NOD 様受容体シグナル伝達系の経路に遺伝子発現をマップしたところ、この経路で誘導される2種の炎症性サイトカイン、3種のケモカインの発現が低下しており、アレルギー症状の緩和がこの経路の抑制に起因する可能性が示された。

さらに、マウスの脾臓から調整した免疫細胞に「ゆきひかり」、「きらら 397」、「上育 462 号」の米粉を 48 時間処理して、トータル RNA を抽出し、RNA-seq 解析により網羅的発現解析を行った。これにより、「きらら 397」処理と「上育 462 号」処理の全遺伝子発現パターンはよく一致し（相関係数 0.89）、両者と比較して「ゆきひかり」処理では、免疫賦活化が抑制されていることを支持する結果となった。

これらの結果から、米粉を脾臓細胞に処理することで変動するサイトカイン等の遺伝子をマーカーとしてアレルギー軽減化能を評価する系を開発した。

## 1.2) ヒト Caco-2 細胞を用いた評価系

Caco-2 細胞を単層培養して腸管上皮様細胞に分化させて、米粉を処理し、Caco-2 細胞から mRNA を抽出して、発現遺伝子をマーカーとして評価する系の確立に取り組んだ。「ゆきひかり」と「きらら 397 号」のそれぞれの米粉を処理した Caco-2 細胞間で 1.5 倍以上発現レベルに差があり  $P < 0.05$  となった 349 遺伝子について、機能アノテーションのエンリッチメント解析を行った。その結果、アポトーシスの抑制（12 遺伝子）、RNA ポリメラーゼ I による転写の抑制（5 遺伝子）、ストア作動性カルシウムチャネルの活性化（5 遺伝子）、上皮の発達（20 遺伝子）に関わる遺伝子が含まれていた。

## 2) 食物アレルギーの軽減化に関わるイネの染色体部分の特定

### 2.1) イネの染色体部分置換系統の開発

イネ品種系統間の形質（特性）の違いに関わる遺伝子が高精度にマッピングでき、かつ、優良な品種系統を遺伝的背景とすることで、迅速な社会実装につなげられる染色体部分置換系統の作出をめざして、2011 年から、交雑と DNA マーカー選抜を進めてきた。本課題によって、以下の2種類の染色体部分置換系統を完成させた。

1つ目は、「きらら 397」を反復親として用いた「ゆきひかり」の染色体部分置換系統 26 系統である。「きらら 397」を3回戻し交配し、その自殖後代について、ゲノムを網羅的にカバーする 99 種の DNA マーカーの遺伝子型解析を繰り返して開発した。

2つ目は、国産米でトップクラスの食味でかつ、その食味の環境変動の小さい次世代の極良食味系統「上育 462 号」を反復親とした染色体部分置換系統 178 系統である。「上育 462 号」を4回戻し交配し、その自殖後代について、ゲノムを網羅的にカバーする 188 種の DNA マーカーを解析することで、遺伝的背景を「上育 462 号」に完全に斉一化し、1つ目の染色体部分置換系統より「ゆきひかり」に由来する置換染色体部分を微細化した系統群を開発した。

### 2.2) イネの染色体部分置換系統のアレルギー軽減化能の評価

1つ目の染色体部分置換系統のうち7系統を上記1.1)で開発した評価系でアレルギー軽減化能を評価した。なお、その結果、マーカーとして選定した炎症性サイトカインならびにサイトカインの受容体の遺伝子発現量が、「ゆきひかり」様となる1系統を得た。これにより、アレルギーの軽減化に関わる1箇所のイネの染色体部分を特定できた。

### 3) 食物アレルギーの軽減化に関わるイネ遺伝子と米成分の選定

#### 3.1) アレルギー軽減化に関わるイネ遺伝子の選定

上記2.2)においてアレルギー軽減化能を有する可能性の示された染色体部分置換系統は、「ゆきひかり」から、染色体部分を全ゲノム(39,000万塩基対)の2%相当(796万塩基対)を引き継いでいる。当該染色体部分について、「ゆきひかり」と「きらら397」ならびに「上育462号」のゲノム配列を解析したところ(Takano et al., 2014)、「ゆきひかり」に特徴的な塩基配列の変異として非翻訳領域あるいはイントロン内の19箇所と15箇所にSNPsをそれぞれ生じた2遺伝子を見出し、関与遺伝子の候補とした。

#### 3.2) 米成分量を司る染色体部分の特定

上記2.1)の染色体部分置換系統を3年にわたり栽培し、精米中の80%相当を占めるデンプンを構成するアミロース含量と10%前後とされるタンパク質含量、さらに微量に含まれるミネラルやイオン性化合物を網羅的に定量解析した。その結果、各種成分含量を制御する染色体部分をゲノム地図上に計69遺伝子マッピングすることができた。このうち、食味に大きく関与するアミロース含量とタンパク質含量に影響する遺伝子のポジションと3.1)で特定したアレルギー軽減化に関わる遺伝子のポジションは重ならなかった。このことは、食味とアレルギーの軽減化を合わせ持つ品種の開発が可能であることを示している。また、特定の成分遺伝子も、アレルギー軽減化に関わる遺伝子のポジションと重ならず、少なくとも今回分析できた成分単独では、アレルギー軽減化を説明でき無いたことが示された。

## 4. 今後の展開

以下の5課題の解決を推し進めたい。

4.1) アレルギー軽減化に関与するイネの遺伝子の特定と遺伝子産物のイネ種子中の機能解明

4.2) アレルギー軽減化に関与する「ゆきひかり」の染色体部分をもつ「上育462号」の遺伝的背景の染色体部分置換系統の評価など、遺伝的背景の違いが及ぼす影響の有無

4.3) アレルギー軽減化能が「ゆきひかり」なみとして選定された染色体部分置換系統の米によるアレルギー軽減化に至る動物モデルを用いた分子メカニズムの解明

4.4) 上記4.3)に続いて、ヒトでの有効性の検証

4.5) 腸内細菌叢への影響を介したアレルギー軽減化に至る可能性の検討

## 5. 発表実績

### 【講演】

1.寒地のイネ品種「ゆきひかり」の機能性とこれを育種素材とした良食味系統の育種について、greenテクノバンク 北方系機能性植物研究会 北の機能性作物活用シンポジウム、2019年10月29日、北農ビル(札幌市)

### 【学会発表】

1.上育462号を遺伝的背景としたゆきひかりの染色体部分置換系統を用いた精白米のイオン化合物の特徴付け 細川優介, 及川 彰, 平山裕治, 佐藤 毅, 宗形信也, 加藤清明 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 口頭発表 2019年12月7日 北海道大学(札幌市)

2.イネ品種「ゆきひかり」と「きらら397」間の交雑組合せで生じる低温感受性雑種崩壊の遺伝子マッピング 米谷侑樹, 加藤清明 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 口頭発表 2019年12月7日 北海道大学(札幌市) 優秀発表賞

3.イネの染色体部分置換系統を用いたメタボローム解析とイオノーム解析 細川優介, 及川彰, 渡部敏裕, 平山裕治, 佐藤 毅, 高牟禮逸朗, 宗形信也, 加藤清明 一般社団法人日本育種学会第136回講演会ポスター発表 2019年9月7日 近畿大学(奈良市)

4.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 島貫 渉, 平山裕治, 高橋奈那, 川原千佳, 高牟禮逸朗, 佐藤 毅, 加藤清明 一般社団法人日本育種学会 第135回講演会 ポスター発表 2019年3月17日 千葉大学(千葉市)