

平成 11 年度厚生科学研究費補助金
厚生科学特別研究事業

研究課題名

遺伝子組換え食品の腸内分解性・アレルギー性の評価に関する研究
(H 1 1 - 特別 - 0 4 3)

主任研究者	豊田正武	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	澤田純一	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	手島玲子	国立医薬品食品衛生研究所

平成 11 年度厚生科学研究費補助金
厚生科学特別研究事業

研究課題名

遺伝子組換え食品の腸内分解性・アレルギー性の評価に関する研究

主任研究者	豊田正武	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	澤田純一	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	手島玲子	国立医薬品食品衛生研究所

総括研究報告書

遺伝子組換え食品の腸内分解性・アレルギー性の評価に関する研究

主任研究者 豊田正武

遺伝子組換え食品の腸内分解性・アレルギー性の評価に関する研究

主任研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部部长

研究要旨 世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいるが、導入された組換え蛋白質が、動物体内で、容易に分解されるか否かの検討をすることは、導入蛋白質が、アレルギー誘起性を持つか否かを検討するうえでの重要な判断基準となる。今回の実験では、すでに大豆に組み込まれている除草剤耐性 EPSPS 蛋白質(5-enolpyruvyl-shikimate -3-phosphate synthase 蛋白質)の免疫化学的測定法の確立並びに、人工胃液及び人工腸液を用いる分解性の検討を行い、EPSPS の動物体内での分解性の予測をするための実験条件を検討したところ、EPSPS は、人工胃液により 30 秒以内、人工腸液で 60 分以内にほぼ完全に分解されることが判明した。次いで、実験動物での腸内分解性を評価する第一歩として、CP4-EPSPS の組み込まれた遺伝子組換え(GM)大豆混餌飼料のマウス及びラットでの長期にわたる摂取により、抗体産生を含めた免疫系に影響が及ぼされるかの検討を行った。対照として同等の栄養成分を持つ近親の非組換え(non-GM)大豆を対照として用いたが、15 週投与後の各種主要免疫組織像において、両群とも異常は認められず、また大豆抽出物に対する IgE,IgG 抗体価とも両群において差は認められなかった。胃腸での分解を免れた EPSPS が、IgE 抗体を産生する可能性を解析する目的で、EPSPS を腹腔内に Alum と共に免疫し、IgE 抗体産生が引き起こされるかどうかについて検討を行ったところ、EPSPS は、IgE 抗体産生を最も強く引き起こし得る条件下で免疫した場合でも弱い抗体産生しか引き起こされないこと、及び抗体との反応性は、加熱処理及び酵素処理に感受性であることが判明し、EPSPS の経口摂取による IgE 抗体産生の可能性は皆無に等しいことが確認された

分担研究者

澤田純一 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部部长

手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部主任研究官

協力研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所食品部

穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部

佐久嶋順一郎 国立医薬品食品衛生研究所食品部

奥貫晴代 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部

評価する第一歩として、より長期に（亜急性毒性試験の期間）CP4-EPSPS の組み込まれた遺伝子組換え(GM)大豆混餌飼料を動物に摂取させた場合の免疫系への影響について検討を行うために、アレルギー高感受性B10Aマウス及びBNラットに、CP4-EPSPS が導入された遺伝子組換え(GM)大豆（ラウンドアップレディー大豆）を30%を含む混餌飼料を15週間摂取させ、主要免疫系組織への影響、抗体産生への影響について調べ、同等の栄養成分を有する近親の非組換え(NGM)大豆を摂取した動物との比較を行うこと、(3)胃腸での分解を免れたEPSPS が、IgE抗体を産生する可能性を解析する目的で、IgE抗体産生を最も強く引き起こし得るアジュバントを用い、CP4-EPSPS をBALB/cマウスに腹腔感作し、IgE抗体の産生の有無を調べること、及び加熱処理及び酵素処理に対する感受性を調べることを目的に検討を行った。

B 研究方法

1)大腸菌によるCP4-EPSPSの発現並びにN末側[^]プロチド[^]配列解析

GM-soybean genomic DNA の配列をもとに、CP4-EPSPS 配列を PR01-5' プライマー (5'-TCCTTCGCAAGACCCCTC

A 実験目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいるが、導入された組換え蛋白質が、動物体内で、容易に分解されるか否かの検討をすることは、導入蛋白質が、アレルギー誘起性を持つか否かを検討するうえでの重要な判断基準となる。今回の実験では、(1)すでに大豆に組み込まれている除草剤耐性EPSPS蛋白質(5-enolpyruvyl-shikimate -3-phosphate synthase蛋白質)の免疫化学的測定法の確立並びに、人工胃液及び人工腸液を用いる分解性の検討を行い、EPSPSの動物体内での分解性の予測をするための実験条件を検討すること、(2) 実験動物での腸内分解性を

CTCTAT-3') 及び *Eco* RI, *Sac* I site を含む R1-EPSPS プライマー (5'-GCTGCC TGATGA-GCTCGAATTCGA-3') を用いて PCR により増幅した。PCR 反応は、94 °C 4 分の後、94 °C 30 秒、62 °C 60 秒、74 °C 2.5 分を1 サイクルとして40 サイクル繰り返し、最後の伸長反応として 74 °C で 10 分反応させた。PCR 産物を 15% アガロースゲル電気泳動した後ゲルから切り出し、この精製物を 2nd PCR の鋳型として *Nde* I site を付加した F1-EP 及び R1-EPSPS プライマーで増幅させた。PCR 反応は、94 °C 4 分の後、94 °C 30 秒、65 °C 60 秒、74 °C 2 分を1 サイクルとして40 サイクル繰り返し、最後の伸長反応として 74 °C で 10 分反応させた。得られた 2nd PCR 産物は、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後、制限酵素 *Nde* I、*Sac* I で消化し、pET23b(+) 発現ベクターに組み込んだ。ダイデオキシ法により配列を確認した後、CP4-EPSPS cDNA 発現 pET23b(+) ベクターをヒートショック法を用いて大腸菌 BL21 株に形質導入した。PET23b(+) が組み込まれた大腸菌 BL21 を大量培養し、NZCYM 培養液中で 0.1 mM IPTG により刺激し、CP4-EPSPS タンパク質を発現させた。この大腸菌を破碎液 (5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH7.0), 0.37% (w/v) KCl) を加えて溶解し、得られた溶液を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分子量を確認した。また、得られた CP4-EPSPS の N 末側ペプチドの解析は、CP4-EPSPS を発現させた大腸菌抽出物を、SDS-PAGE による分離後、PVDF 膜に転写し、CP4-EPSPS 蛋白質に相当する部分を切り取り、ベックマンペプチドシーケンサ (LF-3600) を用いて、気相法によるエドマン分解 (PITC/TEA ケミストリ) により解析を行った。

2) CP4-EPSPS 精製並びにウサギ抗 CP4-EPSPS ポリクローナル抗体作製

CP4-EPSPS 発現大腸菌破碎液 500 µl を Mono-Q (5/5) イオン交換カラムを用いて、FPLC (ファルマシア製) にて精製した。測定条件は流速 0.5 ml/min で、溶媒 A: 20 mM Tris-HCl (pH8.0)、溶媒 B: 20 mM Tris-HCl (pH8.0)-0.3 M NaCl、それぞれ 20 ml ずつを用いてグラジエント溶出を行った。2 分毎に分取し、得られた画分の吸光度 (280 nm) を確認

後、microcon 10 (アミコン社製) で約 10 倍に濃縮した。濃縮液 (5 µL) を 8-16% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE し、分子量から CP4-EPSPS を確認した。精製した CP4-EPSPS (300 µg/mL) を等量 (1 mL) の FCA と混合し、ウサギ 3 匹 (9 週令、メス) に 500 µL ずつ 16 日おきに 4 回投与した。免疫の進行は、ウサギ耳より部分採血して検討し、最終投与から 7 日後、全採血を行った。CP4-EPSPS 特異的抗体の測定は 96 穴プレートを用いて間接 ELISA (固相酵素標識免疫測定) 法により行い、固相抗原として精製した CP4-EPSPS (15 µg/well) を用いた。ウサギより採取した血清に第 2 抗体として β -galactosidase 標識ロバ抗ウサギ IgG 血清を反応させ、基質として加えた 4-methylumbelliferyl- β -galactoside (4-MUG) から遊離される 4-methyl-umbelliferone の蛍光強度の測定を行った。

3) BALB/c マウスへの EPSPS の免疫

1) で得られた大腸菌に発現させた CP4-EPSPS を、7 週令メス BALB/c マウスに、10 日おきに 5 回、5 µg または、50 µg/マウスの用量で 1mg の Alum と共に免疫した。免疫の進行は、3, 4 回投与後、部分採血した血液を用いて行い、最終投与後 7 日目に全採血を行った。

4) 人工腸液による CP4-EPSPS の分解

(1) 人工腸液の調製

USP の定義に基づき、以下の通り人工腸液を調製した。リン酸二水素カリウム 3.4 g を精製水 125 mL に溶解後、95 mL の 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液を加え、さらに精製水 200 mL で希釈した。これに 50 g のパンクレアチン (USP grade, Sigma) を加えた後、0.2 N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.5 に調製し、全量を 500 mL とした。

(2) in vitro における分解性の確認

あらかじめ 37 °C に加温しておいた人工腸液 (Simulated Intestinal Fluid, SIF) 3 mL 及び精製 CP4-EPSPS 溶液を 50 mg/L となるように混和し、37 °C で反応させた。混和後、0、2、5、10、15、20、25、30、40、50、60、90、120 分後の反応液を 50 µL ずつ回収し、100 °C で 5 分間煮沸して酵素による分解反応を止めた。これに等量の SDS-PAGE 用緩衝液 (Laemmli) を加え、さらに 100 °C で 5 分間煮沸した後、8-16% のポリアク

リルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質をゲルからニトロセルロース膜に 37 mA、24 時間の条件で転写した。転写後、ニトロセルロース膜を 0.5% casein-PBS で 2 時間ブロッキングし、0.05% Tween 20-PBS で洗浄した。一次抗体として抗 CP4-EPSPS ウサギ血清を 0.2% casein-PBS で 2000 倍希釈して加え、15 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として HRP 標識ロバ抗ウサギ Ig 抗体を加えて室温で 1 時間反応させ、次いでニトロセルロース膜を HRP 基質溶液 (コニカイムノステイン HRP-1000) に浸し、発色するまで室温で 5 分間反応させた。

(3)人工胃液による CP4-EPSPS の分解

USP の定義に基づき、以下の通り人工胃液を調製した。十分な量の精製水に塩化ナトリウム 1g、ペプシン 16g、塩酸 3.5 mL を加え、精製水で全量を 500 mL とした。

(4) in vitro における分解性の確認

あらかじめ 37 °C に加温しておいた人工胃液 (Simulated Gastric Fluid, SGF) 3 mL 及び 精製 CP4-EPSPS 溶液を 50 mg/L となるように混和し、37 °C で反応させた。混和後、0、5、10、15、20、25、30、40、50、60、90、120、180、240、300、360、420、480、600、900、1200、1800 秒後の反応液を 100 µL ずつ回収し、各画分に 0.2 M Na₂CO₃ を 30 µL 加えて酵素による分解反応を止めた。この溶液 20 µL に等量の SDS-PAGE 用緩衝液 (Laemmli) を加え、100 °C で 5 分間煮沸した後、8-16% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質をゲルからニトロセルロース膜に 37 mA、24 時間の条件で転写した。転写後、ニトロセルロース膜を 0.5% casein-PBS で 2 時間ブロッキングし、0.05% Tween 20-PBS で洗浄した。一次抗体として抗 CP4-EPSPS ウサギ血清を 0.2% casein-PBS で 2000 倍希釈して加え、15 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として HRP 標識ロバ抗ウサギ Ig 抗体を加えて室温で 1 時間反応させ、次いでニトロセルロース膜を HRP 基質溶液 (コニカイムノステイン HRP-1000) に浸し、発色するまで室温で 5 分間反応させた。

5) GM,NGM 大豆のマウス、ラットへの混餌投与実験

除草剤耐性遺伝子 (CP4-EPSPS) が組み込まれた GM 大豆及び NGM 大豆は、米国オハイオ州産のものを用い、100 °C、30 分の加熱処理後、30% 粉末飼料を作成した (Table 1)。それぞれ 7 週令のアレルギー高感受性動物である B10A マウス雌及び BN ラット雌に自由摂取させた。飼料摂取量、体重測定は、1 週間ごとに行った。15 週目に解剖し、血液採取後、血清を分取し、大豆抽出物に対する血清中 IgE, IgG 抗体価を、間接 ELISA 法で測定すると共に、肝臓、脾臓重量の測定並びに、主な免疫組織である肝臓、脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節、パイエル板、並びに小腸について、病理組織学的解析を行った。マウス、ラットそれぞれ 1 群 5 匹で、3 群 15 匹を用いて実験を行った。GM, NGM 大豆投与群に加え、大豆粉末飼料の control として、通常の固形飼料を摂取する群を 1 群設けた。動物の環境は、SPF (special pathogen free) の準無菌のクリーンな条件で、飼育を行った。

C. 研究結果及び考察

1) EPSPS の人工胃液及び人工腸液による分解

CP4-EPSPS は、人工胃液中で、30 秒以内に、人工腸液中で、30 分以内にほぼ完全に分解されることが確認され、特に、人工胃液中での分解が非常に早いことから、食物アレルゲンとして働く可能性が極めて低いことが示された。

2) GM, NGM 大豆混餌投与によるマウス、ラットへの免疫系への影響

GM, NGM 混餌飼料を摂取させたマウス、ラットとも両群の体重及び餌の摂取量に有意差はみられなかった。15 週投与後の肝臓、脾臓重量において、両群に差は見られず、肝臓、脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節、パイエル板、各臓器の病理組織像において、構成される細胞成分や構造における異常は認められず、また、小腸粘膜上皮のクリプトやゴプレット細胞の出現の頻度に異常は認められなかったこのことにより、今回の実験では、GM 大豆摂取による免疫系組織への影響は観察されなかった。また、大豆中の、いくつかの主要蛋白質は、アレルゲン性を有することが報告されているが、それら主要蛋白質に対する抗体の産生が、遺伝子組換え大豆を投与した動物の血液中において上昇するかどうかを調べることを目的として測定した大豆抽出物に対する

IgE, IgG抗体価ともGM, NGM大豆摂取群で差がみられなかった。これら動物において、遺伝子組み換え、非組み換え大豆投与群どちらも、大豆抽出物に対するIgE抗体産生は大豆を含まない飼料（正常飼料）で飼育している動物との間で、有意差はみられず、また、大豆抽出物に対するIgG抗体価は、正常飼料で飼育している動物より、遺伝子組み換え、非組み換え大豆投与群どちらも、上昇する傾向にあったが、両者に差はみられなかった。従って、遺伝子組み換え大豆投与群の方が、アレルギー増強活性を持つという現象は、観察されなかった。また、遺伝子組換えポテトを投与したラットの免疫系に影響がみられるというEwen S W R.らの報告(The Lancet 354, 1353, 1999)にみられるような免疫系への影響も観察されなかった。現在、CP4-EPSPS蛋白質を動物に投与した後の腸内分解性についても検討し、アレルギー性を予測するための研究を行うことを検討している。

3) EPSPSに対するIgE抗体作製
EPSPSをAlumと共に腹腔内投与し、EPSPSに対するIgE抗体の産生を調べたところ、5 μ g及び50 μ g CP4-EPSPSをi.p.投与した群で、弱いIgE抗体の産生がみられ、5 μ g投与群の方が幾分抗体価は高かった。一方、IgG1抗体については5 μ g EPSPS投与で10,000以上、50 μ g EPSPS投与で5,600と比較的高い抗体価が得られた。同じ条件下で、BALB/cマウスに食物アレルギーであるオポアルブミンを投与した場合、IgE抗体価としては、500-1000の値が得られるので、EPSPS蛋白質のIgE産生能としては、極めて低い部類に属するものと思われる。ウェスタンブロット法で、マウス血清とCP4-EPSPS蛋白質(47kDa蛋白質)との反応性を確認した実験においても、IgG1抗体との反応性は、血清1000倍希釈でも明瞭に確認されたが、IgE抗体との反応性は、10倍希釈血清を用いた場合でもかすかにみられる程度であった。なお、ELISA法で、抗原特異的IgE抗体と固相抗原(CP4-EPSPS)との反応は、反応溶液に3 μ gのCP4-EPSPSを共存させた場合に、50%阻害されたが、100 $^{\circ}$ C, 5分加熱処理したCP4-EPSPSでは、20%程度の阻害活性しか有さず、加熱処理による抗原性の低下が観察された。この加熱処理による抗原性の低下は、抗原特異的IgG1抗体と固相抗原(CP4-EPSPS)

との反応においても同様に観察された。人工胃腸液で処理したEPSPSでも阻害活性の低下がみられた。

CP4-EPSPSの抗原性が、熱感受性であり、蛋白分解酵素処理に感受性であることから、食物アレルギーとなり得る一般条件を備えておらず、EPSPSそのもののIgE抗体産生能も低いことから、経口摂取されたEPSPSがアレルギーとして働くことは、皆無に等しいと考えられる。

D 研究発表

1 論文発表

1) Teshima, R, Akiyama, H, Okunuki, H., Sakushima J, Goda, Y., Onodera, H, Sawada, J and Toyoda M (2000) Effect of GM and non-GM-soybean on the immune system of BN rat and B10A mice J. Food Hyg Soc Japan (in press)

2) Akiyama, H., Okunuki, H, Tsuzuki, S., Arami, S, Miura, H., Sakushima, J, Teshima, R, Goda, Y, Sawada, J and Toyoda, M (1999) Construction of an Expression System of Shikimate Kinase II and Preparation of Shikimic Acid 3-Phosphate J Food Hyg Soc Japan, 40, 438-443

3) Okunuki, H, Teshima, R, Akiyama, H, Goda, Y, Toyoda, M and Sawada, J (submitted) Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvyl Shikimate-3-phosphate Synthase by Radio-HPLC

2 学会発表

1) 遺伝子組換え、非組換え大豆のマウス、ラットへの混餌投与による免疫系への影響(2000 3第120回日本薬学会発表) 手島玲子、穂山浩、奥貫晴代、佐久嶋順一郎、合田幸広、小野寺博志、澤田純一、豊田正武

2) HPLCを用いた CP4-EPSPS の酵素活性測定法の検討 (1999 10 日本生化学会発表) 奥貫晴代、穂山 浩、都筑智子、荒見真一郎、三浦裕仁、佐久嶋順一郎、手島玲子、合田幸広、日野明寛、澤田純一、豊田正武

分担研究報告書

人工胃腸液を用いる分解性評価、大腸菌を用いた産生蛋白質の調製
及び総合評価

主任研究者 豊田正武

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

人工胃腸液を用いる分解性評価、大腸菌を用いた産生蛋白質の調製及び総合評価

主任研究者 豊田 正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部部长

研究要旨 世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいるが、導入された組換え蛋白質が、動物体内で、容易に分解されるか否かを検討することは、導入蛋白質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討をするうえでの重要な判断基準となる。今回の実験では、すでに大豆に組み込まれている除草剤耐性 EPSPS タンパク質 (5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate syntase タンパク質)の免疫化学的、及び酵素学的測定法の確立並びに、人工胃液及び人工腸液を用いる分解性の検討を行い、EPSPS の動物体内での分解性の予測をするための実験条件を検討した。

研究協力者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所食品部
穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部
佐久嶋順一郎 国立医薬品食品衛生研究所食品部
手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部
奥貫晴代 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部

A 研究目的

近年、食糧需要増加に伴い、世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいる。消費者が購入の際に選択出来るように、遺伝子組換え食品に対してその表示が義務づけられつつある。そのため、ヒトが食する部分、及びその加工食品からの組換え遺伝子、またはそれに由来するタンパク質を高感度に検出する技術の開発は急務である。現在すでに遺伝子組換え食品に組み込まれている除草剤耐性 EPSPS タンパク質 (5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate syntase タンパク質) はシキミ酸経路において、S-3-P (shikimate 3-phosphate) 及び PEP (phosphoenolpyruvate) 存在下で EPSP (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) を合成する酵素である。植物や微生物中に含まれるシキミ酸経路は、動物には存在しない経路であることから除草剤のターゲットになる。除草剤グリホサートは EPSPS を特異的に阻害するが、除草剤耐性遺伝子の組み込まれた農作物は、グリホサー

ト存在下でも生存することが出来る。しかし、農作物中に含まれるこの組換えタンパク質を高感度に検出する方法はなかった。そこで我々は、除草剤耐性 CP4-EPSPS タンパク質を高感度に検出することを目的に、組換えタンパク質の遺伝子は大腸菌に導入し、除草剤耐性 EPSPS タンパク質の発現、並びに大量調製を行った。さらに、本タンパク質のウサギポリクローナル抗体 (IgG 抗体) を作製し、EPSPS の免疫学的検出、及び HPLC (high performance liquid chromatography) による酵素活性測定法を用いた酵素学的検出の検討を行った。次いで、EPSPS の *in vitro* での人工腸液及び人工胃液による分解を検討した。

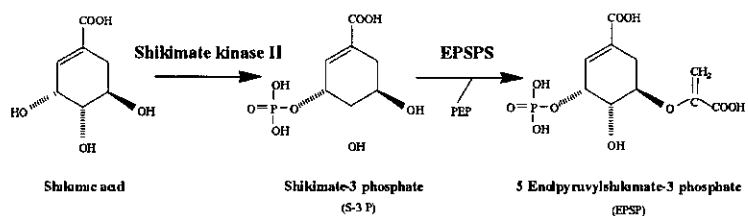


Fig 1 シキミ酸経路関連酵素の酵素作用

シキミ酸は、シキミ酸リン酸化酵素 II (shikimate kinase II) の働きでシキミ酸 3-リン酸 (S-3-P) を生成する。次いで、EPSPS の作用により、S-3-P はもう一つの基質である PEP と反応し EPSP を生成する。

B. 研究方法

1 大腸菌によるシキミ酸リン酸化酵素 II (shikimate kinase II) の発現

EPSPS の基質である S-3-P (Fig 1) は現在市販されていないため、生物学的酵素反応を用いて S-3-P を生合成することを目的に、大腸菌を用いシキミ酸リン酸化酵素 II の発現系の構築を行った。シキミ酸リン酸化酵素 II をコードする遺伝子 (*aroL*) cDNA の部分塩基配列をもとに、オリゴヌクレオチドプライマー (sense primer 5'-GGGCATATGACACAACCTCTTTTTCTGATC-3', anti-sense primer 5'-CCCGGATCCTCGGCAATTGATCGTCTGTGC) を起案し、鋳型として *E. coli* W3110 genomic DNA (1.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を用いて *aroL* cDNA を PCR により増幅した。PCR 反応は、96 °C で 4 分間熱変性させ、94 °C 30 秒、50 °C 60 秒、74 °C 60 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル繰り返し、74 °C で 7 分間反応させた後、終了させた。PCR 産物は、15% アガロースゲル電気泳動して確認後、制限酵素 *Nde* I、*Bam* HI で消化し、pET22b(+) 発現ベクターとライゲーションさせた。ダイデオキシ法により *aroL* の塩基配列を確認した後、*aroL* cDNA 発現 pET22b(+) ベクターを、エレクトロポレーション法 (25 kV, 25 mF, 200 Ω) を用いて大腸菌 BL21 株に形質導入した。pET23b(+) ベクターが組み込まれた大腸菌 BL21 をアンピシリン含有 NZCYM 液体培地中で大量培養し、0.5 mM IPTG により刺激してシキミ酸リン酸化酵素 II タンパク質を発現させた。この大腸菌を破碎用緩衝液 (5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl (pH7.0), 0.37% (w/v) KCl) を加えて溶解し、得られた溶液を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分子量を確認後、大腸菌由来のシキミ酸リン酸化酵素 II として用いた。

2 大腸菌による CP4-EPSPS の発現

GM-soybean genomic DNA の配列をもとに、CP4-EPSPS 配列を PR01-5' プライマー (5'-TCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTAT-3') 及び *Eco* RI, *Sac* I site を含む R1-EPSPS プライマー (5'-

GCTGCCTGATGAGCTCGAATTCGA-3') を用いて PCR により増幅した。PCR 反応は、94 °C 4 分の後、94 °C 30 秒、62 °C 60 秒、74 °C 2.5 分を 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返し、最後の伸長反応として 74 °C で 10 分反応させた。PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動した後ゲルから切り出し、この精製物を 2nd PCR の鋳型として *Nde* I site を付加した F1-EP 及び R1-EPSPS プライマーで増幅させた。PCR 反応は、94 °C 4 分の後、94 °C 30 秒、65 °C 60 秒、74 °C 2 分を 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返し、最後の伸長反応として 74 °C で 10 分反応させた。得られた 2nd PCR 産物は、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後、制限酵素 *Nde* I、*Sac* I で消化し、pET23b(+) 発現ベクターに組み込んだ。ダイデオキシ法により配列を確認した後、CP4-EPSPS cDNA 発現 pET23b(+) ベクターをヒートショック法を用いて大腸菌 BL21 株に形質導入した。pET23b(+) が組み込まれた大腸菌 BL21 を大量培養し、NZCYM 培養液中で 0.5 mM IPTG により刺激し、CP4-EPSPS タンパク質を発現させた。この大腸菌を破碎液 (5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl (pH7.0), 0.37% (w/v) KCl) を加えて溶解し、得られた溶液を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分子量を確認後、大腸菌由来の CP4-EPSPS として用いた。

3 radio-HPLC を用いた CP4-EPSPS 酵素活性測定法

Fig. 2 に示す方法で、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用い、シキミ酸からシキミ酸リン酸化酵素 II による $^{32}\text{P}\text{S-3-P}$ の生合成を行った。次いで CP4-EPSPS とその基質である PEP を加えて $^{32}\text{P}\text{EPSP}$ の合成を行った。

4 CP4-EPSPS 精製並びにウサギ抗 CP4-EPSPS ポリクローナル抗体作製

CP4-EPSPS 発現大腸菌破碎液 500 μL を Mono-Q (5/5) イオン交換カラムを用いて、FPLC にて精製した。測定条件は以下の通り。(流速 0.5 mL/min、溶媒 A 20 mM Tris-HCl (pH8.0)、溶媒 B: 20 mM Tris-HCl (pH8.0)-0.3 M NaCl、20 mL x 20 mL

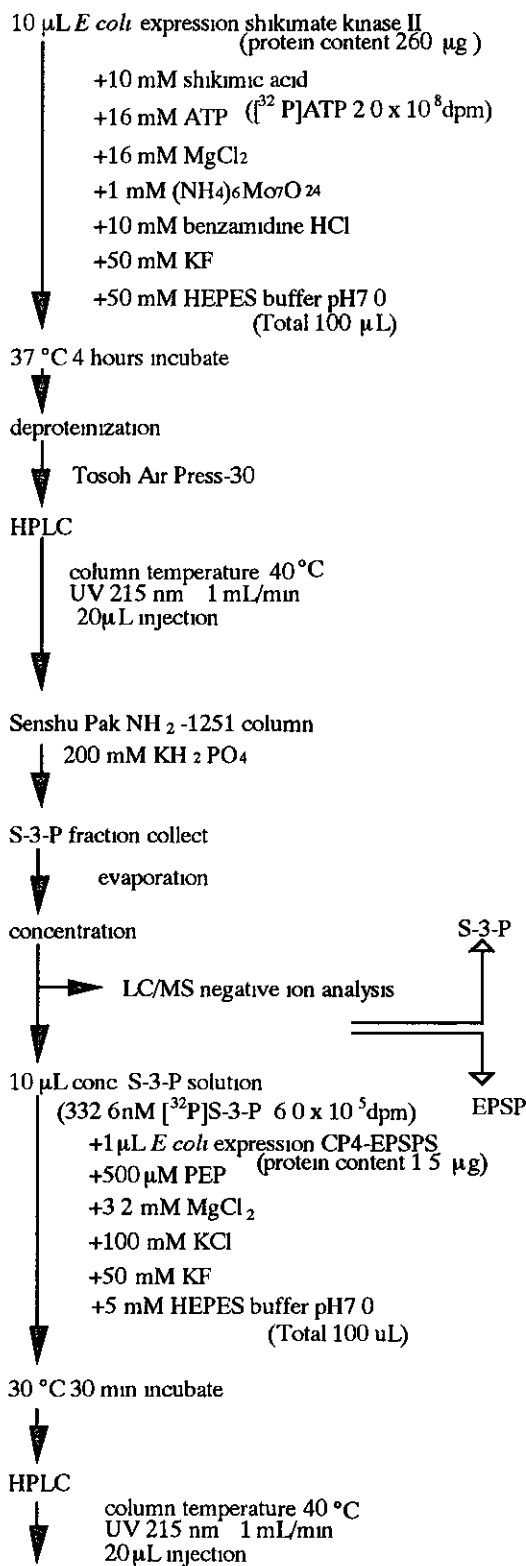


Fig 2 radio-HPLC を用いた CP4-EPSPS 酵素活性測定法

gradient) 2 分毎に分取し、得られた画分の吸光度 (280 nm) を確認後、microcon 10 で約 10 倍に濃縮

した。濃縮液 (5 μL) を 8-16% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE し、分子量から CP4-EPSPS を確認した。精製した CP4-EPSPS (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を等量 (1 mL) の FCA と混合し、ウサギ 3 匹 (9 週令、メス) に 500 μL ずつ 16 日おきに 4 回投与した。免疫の進行は、ウサギ耳より部分採血して検討し、最終投与から 7 日後、全採血を行った。CP4-EPSPS 特異的抗体の測定は 96 穴プレートを用いて間接 ELISA (固相酵素標識免疫測定) 法により行い、固相抗原として精製した CP4-EPSPS (1.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) を用いた。ウサギより採取した血清に第 2 抗体として β -galactosidase 標識ロバ抗ウサギ IgG 血清を反応させ、基質として加えた 4-methylumbelliferyl- β -galactoside (4-MUG) から遊離される 4-methyl-umbelliferone の蛍光強度の測定を行った。

5 人工腸液による CP4-EPSPS の分解

(1) 人工腸液の調製

USP の定義に基づき、以下の通り人工腸液を調製した。リン酸二水素カリウム 3.4 g を精製水 125 mL に溶解後、95 mL の 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液を加え、さらに精製水 200 mL で希釈した。これに 5.0 g のパンクレアチン (USP grade, Sigma) を加えた後、0.2 N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.5 に調製し、全量を 500 mL とした。

(2) in vitro における分解性の確認

あらかじめ 37 $^\circ\text{C}$ に加温しておいた人工腸液 (Simulated Intestinal Fluid, SIF) 3 mL 及び 精製 CP4-EPSPS 溶液を 50 mg/L となるように混和し、37 $^\circ\text{C}$ で反応させた。混和後、0、2、5、10、15、20、25、30、40、50、60、90、120 分後の反応液を 50 μL ずつ回収し、100 $^\circ\text{C}$ で 5 分間煮沸して酵素による分解反応を止めた。これに等量の SDS-PAGE 用緩衝液 (Laemmli) を加え、さらに 100 $^\circ\text{C}$ で 5 分間煮沸した後、8-16% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質をゲルからニトロセルロース膜に 37 mA、24 時間の条件で転写した。転写後、ニトロセルロース膜を 0.5% casein-PBS で 2 時間ブロッキングし、0.05% Tween 20-PBS で洗浄した。一次抗体として抗

CP4-EPSPS ウサギ血清を 0.2% casein-PBS で 2000 倍希釈して加え、15 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として HRP 標識ロバ抗ウサギ Ig 抗体を加えて室温で 1 時間反応させ、次いでニトロセルロース膜を HRP 基質溶液 (コニカイムノステイン HRP-1000) に浸し、発色するまで室温で 5 分間反応させた。

6 人工胃液による CP4-EPSPS の分解

(1) 人工胃液の調製

USP の定義に基づき、以下の通り人工胃液を調製した。十分な量の精製水に塩化ナトリウム 1 g、ペプシン 16 g、塩酸 35 mL を加え、精製水で全量を 500 mL とした。

(2) *in vitro* における分解性の確認

あらかじめ 37 °C に加温しておいた人工胃液 (Simulated Gastric Fluid, SGF) 3 mL 及び 精製 CP4-EPSPS 溶液を 50 mg/L となるように混和し、37 °C で反応させた。混和後、0、5、10、15、20、25、30、40、50、60、90、120、180、240、300、360、420、480、600、900、1200、1800 秒後の反応液を 100 μ L ずつ回収し、各画分に 0.2 M Na_2CO_3 を 30 μ L 加えて酵素による分解反応を止めた。この溶液 20 μ L に等量の SDS-PAGE 用緩衝液 (Laemmli) を加え、100 °C で 5 分間煮沸した後、8-16% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質をゲルからニトロセルロース膜に 37 mA、24 時間の条件で転写した。転写後、ニトロセルロース膜を 0.5% casein-PBS で 2 時間ブロッキングし、0.05% Tween 20-PBS で洗浄した。一次抗体として抗 CP4-EPSPS ウサギ血清を 0.2% casein-PBS で 2000 倍希釈して加え、15 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として HRP 標識ロバ抗ウサギ Ig 抗体を加えて室温で 1 時間反応させ、次いでニトロセルロース膜を HRP 基質溶液 (コニカイムノステイン HRP-1000) に浸し、発色するまで室温で 5 分間反応させた。

C 研究結果

1 生物学的酵素反応を用いた S-3-P の生合成

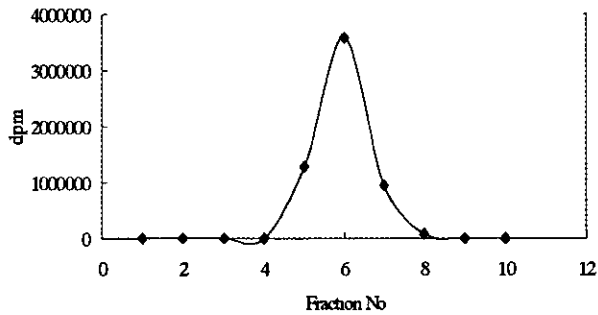
E. coli W3110 genomic DNA を鋳型として得られた *aroL* を pET Expression System 22b に組み込み、大腸菌 BL21 に形質導入した結果、*aroL* タンパク質 (シキミ酸リン酸化酵素 II) 調製液 200 mL あたり約 75 mg のシキミ酸リン酸化酵素 II を得た。SDS-PAGE で分析したところ、シキミ酸リン酸化酵素 II の分子量 18937 に対応するバンドが約 19 kDa の位置に観察された。次に、得られたシキミ酸リン酸化酵素 II を用いて酵素反応より S-3-P を生合成し、HPLC により S-3-P に対応するピーク画分を分取した。さらに、カーボンカラムを用いた LC/MS を行ったところ、negative ion 分析で、ベースピークとして m/z 253 に S-3-P に対応する疑似分子イオンピーク [M-H] が観察され、本化合物が間違いなくシキミ酸のモノリン酸化体であることが確認された。

2. 大腸菌に発現させた CP4-EPSPS の radio-HPLC による酵素活性の測定

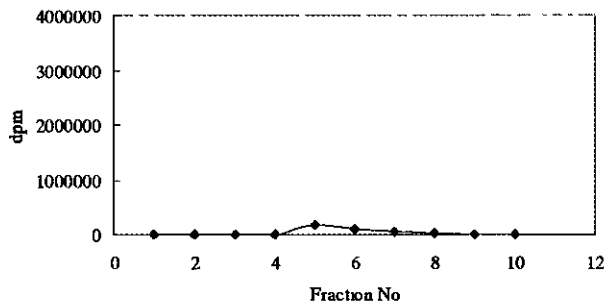
HPLC による EPSPS 検知法を検討することを目的に、まず、大腸菌に CP4-EPSPS を大量発現させた。さらに上記に示すとおり、CP4-EPSPS 活性を測定するための基質である S-3-P は現在市販されていないことから、同じく大腸菌にシキミ酸リン酸化酵素 II を発現させ、生物学的酵素反応を用いてシキミ酸から S-3-P を生合成した (Fig 1)。アミノカラムを用いた radio-HPLC での分析を Fig 3 に示すが、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (2.0×10^8 dpm/64 nmol) を S-3-P 生成のための酵素反応に用いたところ、保持時間 6 分の S-3-P に対応するピーク画分に ^{32}P の放射活性が認められ (Fig. 3a)、シキミ酸リン酸化酵素 II を加えないものにはほとんど活性が見られなかった (Fig 3b)。37 °C で一晩反応させた結果、 ^{32}P の回収率は約 95% だった。このことより、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の γ 位のリン酸基がシキミ酸リン酸化酵素 II の酵素活性によりシキミ酸に導入されることが確認された。さらに ^{32}P -S-3-P のピーク画分を分取し、PEP と大腸菌に発現させた CP4-EPSPS を加えて 30 °C 30 分の酵素反応をさせたところ、EPSP に対応するピーク画分 (保持時間 10 分) に放射活性が見られた (Fig

3c)。CP4-EPSPS を加えないものにはこの放射活性が得られなかった (Fig 3d)。この $[^{32}\text{P}]\text{EPSP}$ の生成量は、加える EPSPS の酵素量に応じて増減することから、CP4-EPSPS の酵素活性が測定可能となった。

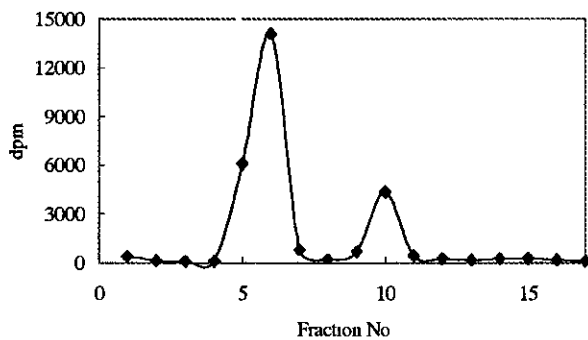
(a)



(b)



(c)



(d)

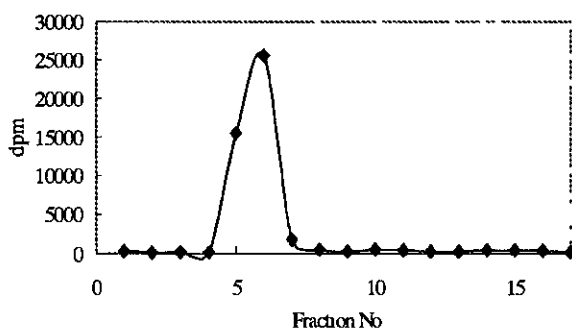


Fig 3 $[^{32}\text{P}]\text{S-3-P}$ 及び $[^{32}\text{P}]\text{EPSP}$ の検出

3 大腸菌破碎液中の CP4-EPSPS 精製並びに CP4-EPSPS ポリクローナル抗体作製

CP4-EPSPS 発現大腸菌破碎液を FPLC を用いて精製したところ、0.16-0.18 M NaCl 溶出画分に単一のピークが見られた。このピーク画分を microcon 10 で約 10 倍に濃縮し、SDS-PAGE により分子量を測定したところ、分子量約 47 kDa に CP4-EPSPS の単一バンドを確認した。さらに、精製した CP4-EPSPS を 4 回ウサギに免疫し、間接 ELISA 法により CP4-EPSPS 特異的抗体の測定をしたところ、 2.0×10^5 - 1.3×10^6 の高い抗体価を持つポリクローナルのウサギ抗血清が得られた。この抗体は、ウェスタンブロット法で 5000 倍希釈でも十分に EPSPS の検出が可能であった。

4 人工胃腸液における CP4-EPSPS の分解

精製した CP4-EPSPS を人工腸液及び人工胃液に加えて反応させ、その経時変化をウサギ抗 CP4-EPSPS ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法により解析したところ、人工腸液においては反応開始から 30 分後に EPSPS のバンドが半量になり、240 分後には完全に検出限界以下になった (Table 1)。人工胃液においては、腸液と比べさらに分解が早く、反応開始から 10 秒後に半量になり、30 秒後には完全に EPSPS のバンドが検出出来なくなった (Table 2)。

Table 1. 人工腸液における CP4-EPSPS の分解

Incubation time (min)	Digestive ratio
0	1.000
2	0.921
5	0.888
10	0.965
15	0.819
30	0.478
60	0.300
120	0.183
240	N D

Optical density of 47 kDa band in each incubation time was determined

Digestive ratio of each incubation time to before digestion was calculated

Table 2 人工胃液における CP4-EPSPS の分解

incubation time (sec)	Digestive ratio
0	1
10	0.212
20	0.122
30	N D

Optical density of 47 kDa band in each incubation time was determined

Digestive ratio of each incubation time to before digestion was calculated

上記報告は、Harrison, L A 等の報告¹⁾による CP4-EPSPS の SGF 及び SIF における分解時間に、ほぼ匹敵するデータであった。

D 考察

我々が検討した免疫学的、及び酵素学的検出法により、除草剤耐性 CP4-EPSPS タンパク質を高感度に検出出来ることが明らかになった。さらに、我々が検討した系により、生体内における CP4-EPSPS の分解性を予測する一環として、人工腸液および人工胃液を用い、その分解性を調べたところ、胃液に関してはほぼ 30 秒で全て分解されることが判明した。人工胃液による分解のされやすさが、食物アレルギーとして機能するか否かの指標となるという Ashwood, J D らの報告²⁾があり、EPSPS が一般の植物タンパク質と同様、SGF により非常に分解されやすいことから、CP4-EPSPS が生体内でアレルギーとして働く可能性はほとんどないことが示唆された。一方、遺伝子組換え食品が増加の一途をたどる今日において、食品に含まれる外来遺伝子産生タンパク質の有無、及びその量を評価することは、組換え食品に対する消費者の不安を考える上で重要である。今後、新たな遺伝子組換え食品に CP4-EPSPS が混入される可能性も否めない。それら食品の安全性を考える上で、今回の我々の研究成果は、生体外で簡易的に除草剤耐性タンパク質を検出出来る系として、重要かつ有効な検出法であると考えられる。

E 参考文献

- 1) Harrison, L A, Bailey, M R, Naylor, M W, Ream, J E, Hammond, B G, Nida, D L, Burnette, B L, Nickson, T E, Mitsky, T A, Taylor, M L, Fuchs, R L and Padgett, S R (1996) The Expressed Protein in Glyphosate-Tolerant Soybean, 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Agrobacterium* sp Strain CP4, Is Rapidly Digested In Vitro and Is Not Toxic to Acutely Gavigated Mice *J.Nutr*, **126**, 728-741
- 2) Astwood, J D, Leach, J N and Fuchs, R L (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro *Nature Biotech*, **14**, 1269-1272

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Akiyama, H, Okunuki, H, Tsuzuki, S, Arami, S, Miura, H., Sakushima, J, Teshima, R, Goda, Y, Sawada, J and Toyoda, M (1999) Construction of an Expression System of Shikimate Kinase II and Preparation of Shikimic Acid 3-Phosphate *J Food Hyg Soc Japan*, **40**, 438-443
- 2) Okunuki, H, Teshima, R, Akiyama, H, Goda, Y, Toyoda, M and Sawada, J (submitted) Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvyl Shikimate-3-phosphate Synthase by Radio-HPLC

2 学会発表

- 1) HPLC を用いた CP4-EPSPS の酵素活性測定法の検討 (1999 10 日本生化学会発表) 奥貫晴代、穂山 浩、都筑智子、荒見真一郎、三浦裕仁、佐久嶋順一郎、手島玲子、合田幸広、日野明寛、澤田純一、豊田正武

分担研究報告書

動物を用いる腸内分解性評価

分担研究者 澤田純一

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

動物を用いる腸内分解性評価

分担研究者 澤田純一 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部長

研究要旨 世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいるが、実際の商品は組換え作物の後代交配種由来であることが多く、そのような作物における動物の免疫系への影響、特にアレルギーとの関連について調べられた報告はない。著者らは、今回、アレルギー高感受性の B10A マウス及び BN ラットを使った実験において、除草剤耐性遺伝子(CP4-EPSPS)が導入された遺伝子組換え(GM)大豆摂取が、動物の免疫系に影響を及ぼすか否かの検討を行った。同等の栄養成分を有する近親の非組換え(non-GM)大豆を対照として用いた。GM, non-GM 混餌飼料を摂取させたマウス、ラットとも両群の体重及び餌の摂取量に有意差はみられず、15 週投与後の各種主要免疫臓器の病理組織像においても、両群とも異常は認められず、また大豆抽出物に対する IgE, IgG 抗体価とも両群において差はみられなかった。

研究協力者

手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所
奥貫晴代 国立医薬品食品衛生研究所
合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所
穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所
佐久嶋順一郎 国立医薬品食品衛生研究所

A 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいるが、実際の商品は組換え作物の後代交配種由来であることが多く、そのような作物における動物の免疫系への影響、特にアレルギーとの関連について調べられた報告はない。すでに、遺伝子組み換え大豆の原種を用いた研究において、導入 EPSPS 蛋白質の人工胃腸液による易分解性、マウスでの急性毒性のないことの検討がなされており、導入蛋白質そのもののアレルギー性、並びに遺伝子導入に伴う未知の毒素、抗栄養素、アレルギー物質の産生される可能性はほとんどないことが報告されており、原種での所見からみても危惧事項は特にな

が、より長期に（亜急性毒性試験の期間）動物に摂取させた場合の影響についての検討がなされていないことから、実際商品として供給可能な後代交配種を用いて安全性をより確かなものとするため、特に免疫系への影響を中心に検討を行った。一般毒性に加え、免疫系への影響を調べた理由は、長期投与でもアレルギー誘発性がないことの確認を行うこと、食物の吸収される場に位置する腸管粘膜系への影響がないことの確認を行うためである。今回、アレルギー高感受性 B10A マウス及び BN ラットを使った実験において、除草剤耐性遺伝子(CP4-EPSPS)が導入された遺伝子組換え(GM)大豆（ラウンドアップレディー大豆）を 30%を含む混餌飼料の、亜急性毒性試験に相当する期間(15 週間)の摂取が、動物の免疫系に影響を及ぼすか否かの検討を行った。同等の栄養成分を有する近親の非組換え(NGM)大豆を対照として用いた。

B. 研究方法

除草剤耐性遺伝子(CP4-EPSPS)が組み込まれた GM 大豆及び NGM 大豆は、米国オハイオ

州産のものを用い、100 °C、30 分の加熱処理後、30%粉末飼料を作成した (Table 1)。それぞれ 7 週令のアレルギー高感受性動物である B10A マウス雌及び BN ラット雌に自由摂取させた。

Table 1 Composition of diets

Ingredients	g/100g dry matter
Soybean meal	30.0
Corn oil	7.0
Casein	8.0
Cellulose	5.0
Minerals	3.5
Vitamins	1.0
Choline	0.25
TBHQ	0.0014
Corn starch	33.2486
Sucrose	10.0
CaCO ₃	0.9
CaHPO ₄	1.1
Analyzed	
Ca	0.67
Mg	0.064
P	0.42
protein	17-18

飼料摂取量、体重測定は、1 週間ごとに行った。15 週目に解剖し、血液採取後、血清を分取し、大豆抽出物に対する血清中 IgE, IgG 抗体価を、間接 ELISA 法で測定すると共に、肝臓、脾臓重量の測定並びに、主な免疫組織である肝臓、脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節、パイエル板、並びに小腸について、病理組織学的解析を行った。マウス、ラットそれぞれ 1 群 5 匹で、3 群 15 匹を用いて実験を行った。GM, NGM 大豆投与群に加え、大豆粉末飼料の control として、通常の固形飼料を摂取する群を 1 群設けた。動物の環境は、SPF (special pathogen free) の準無菌のクリーンな条件で、飼育を行った。

C 結果および考察

GM, NGM の間に、アミノ酸組成、脂肪酸組成に殆ど差はみられず、両者は、同等の栄養成分を有するものと考えられた (Table 2, 3)。

Table 2 Summary of fatty acids contents

Fatty acid	(g/100g) in soybean seeds	
	seed line	
	non-GM	GM
C16:0	1.77	2.09
C18:0	0.69	0.76
C18:1	3.74	3.92
C18:2	8.70	10.1
C18:3	1.53	1.54

Table 3 Summary of amino acid contents

Amino acid	(g/100g) in soybean seeds	
	Seed line	
	non-GM	GM
Aspartic acid	4.31	4.14
Threonine	1.47	1.44
Serine	1.91	1.86
Glutamic acid	6.47	6.42
Proline	1.81	1.79
Glycine	1.56	1.55
Alanine	1.56	1.53
Valine	1.70	1.69
Isoleucine	1.64	1.60
Leucine	2.81	2.75
Tyrosine	1.21	1.21
Phenylalanine	1.86	1.81
Histidine	1.04	0.98
Lysine	2.30	2.29
Arginine	2.65	2.53
Cysteine	0.59	0.56
Methionine	0.53	0.55
Tryptophan	0.40	0.46

GM, NGM 混餌飼料を摂取させたマウス、ラ

ットとも両群の体重及び餌の摂取量に有意差はみられなかった。15 週投与後の肝臓、脾臓重量において、両群に差は見られず、肝臓、脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節、パイエル板、各臓器の病理組織像において、構成される細胞成分や構造における異常は認められず、また、小腸粘膜上皮のクリプトやゴブレット細胞の出現の頻度に異常は認められなかった

このことにより、今回の実験では、GM 大豆摂取による免疫系組織への影響は観察されなかった。また、大豆中の、いくつかの主要蛋白質は、アレルゲン性を有することが報告されているが、それら主要蛋白質に対する抗体の産生が、遺伝子組換え大豆を投与した動物の血液中において上昇するかどうかを調べることを目的として測定した大豆抽出物に対する IgE, IgG 抗体価とも GM, NGM 大豆摂取群で差がみられなかった (Table 4)。

Table 4 Soybean-specific-IgE and IgG production in BN rats and B10A mice fed with ground GM-soybeans or non-GM-soybeans

1) BNrats

Group	ELISA-titer (n=5)	
	Soybean-IgE	Soybean-IgG
GM-soybean	143 ± 100	1576 ± 1207
non-GM-soybean	152 ± 149	1950 ± 348*
Diet control	66 ± 37	643 ± 511

Values are means ± S D

* difference from control, p<0.05.

2) B10A mice

Group	ELISA-titer (n=5)	
	Soybean-IgE	Soybean-IgG
GM-soybean	61 ± 12	100 ± 112
non-GM-soybean	88 ± 71	57 ± 16
diet control	51 ± 09	173 ± 226

Values are means ± S D

これら動物において、遺伝子組み換え、非組み換え大豆投与群どちらも、大豆抽出物に対する IgE 抗体産生は大豆を含まない飼料 (正常飼料) で飼育している動物との間で、有意差はみられず、また、大豆抽出物に対する IgG 抗体価は、正常飼料で飼育している動物より、遺伝子組み換え、非組み換え大豆投与群どちらも、上昇する傾向にはありましたが、両者に差はみられませんでした。従って、遺伝子組み換え大豆投与群の方が、アレルギー増強活性を持つという現象は、観察されなかった。

また、遺伝子組換えポテトを投与したラットの免疫系に影響がみられるという Ewen S W R らの報告 (The Lancet 354, 1353, 1999) にみられるような免疫系への影響も観察されなかった。現在、CP4-EPSPS 蛋白質を動物に投与した後の腸内分解性についても検討し、アレルゲン性を予測するための研究を行うことを予定している。

D 研究発表

1 論文発表

1) Teshima, R, Akiyama, H., Okunuki, H, Sakushima J, Goda, Y, Onodera, H, Sawada, J and Toyoda M (2000) Effect of GM and non-GM-soybean on the immune system of BN rat and B10A mice J Food Hyg Soc Japan (in press)

2 学会発表

1) 遺伝子組換え、非組換え大豆のマウス、ラットへの混餌投与による免疫系への影響 (2000 3 第 120 回日本薬学会発表) 手島玲子、穰山浩、奥貫晴代、佐久嶋順一郎、合田幸広、小野寺博志、澤田純一、豊田正武

分担研究報告書

IgE 抗体の作製及びアレルゲン性の評価

分担研究者 手島玲子

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

IgE抗体 の作成及びアレルギー性の評価

分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部主任研究官

研究要旨 新規組換え食品の安全性研究の一環として、現在すでに遺伝子組換え食品に組み込まれている除草剤耐性遺伝子CP4-EPSPS(5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate)蛋白質の抗原性並びにアレルギー性について検討することを目的に、BALB/cマウスにEPSPSをAlumと共に腹腔内投与し、IgE,IgG1抗体産生の有無について検討を行ったところ、IgG1抗体産生については、10000近い高い抗体価を有していたが、IgE抗体産生に関しては、50程度の弱い抗体価しか得られなかった。物理化学的処理に関しては、加熱処理、及び酵素処理による抗原性の減弱が観察された。従って、EPSPSは、IgE抗体産生を最も強く引き起こし得る条件下で免疫した場合でも弱い抗体産生しか引き起こされないこと、及び抗体との反応性は、加熱処理及び酵素処理に感受性であることが判明し、EPSPSの経口摂取によるIgE抗体産生の可能性、及び抗体との反応性は皆無に等しいことが確認された。

研究協力者

奥貫晴代 国立医薬品食品衛生研究所
合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所
佐久嶋順一郎 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

新規組換え食品の安全性研究の一環として、現在すでに遺伝子組換え食品に組み込まれている除草剤耐性遺伝子CP4-EPSPS(5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate)蛋白質の抗原性並びにアレルギー性について検討することを目的に、CP4-EPSPS遺伝子を導入した大腸菌からのCP4-EPSPS蛋白質の大量調製を行い、マウスに抗原を投与し、抗体の産生についてELISA法並びにウェスタンブロット法にて検討を行った。次いで、抗原の物理化学的処理、並びに酵素処理による抗原性の変化についての検討を行った。

B. 研究方法

1)大腸菌によるCP4-EPSPSの発現並びにN末側ペプチド配列解析

GM-soybean genomic DNA の配列をもとに、CP4-EPSPS 配列を PR01-5' プライマー (5'-TCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTAT-3') 及び

Eco RI, *Sac* I site を含む R1-EPSPS プライマー (5'-GCTGCCTGATGA-GCTCGAATTCGA-3') を用いて PCR により増幅した。PCR 反応は、94 °C 4 分の後、94 °C 30 秒、62 °C 60 秒、74 °C 25 分を1 サイクルとして40 サイクル繰り返し、最後の伸長反応として 74 °C で 10 分反応させた。PCR 産物を 15% アガロースゲル電気泳動した後ゲルから切り出し、この精製物を 2nd PCR の鋳型として *Nde* I site を付加した F1-EP 及び R1-EPSPS プライマーで増幅させた。PCR 反応は、94 °C 4 分の後、94 °C 30 秒、65 °C 60 秒、74 °C 2 分を1 サイクルとして40 サイクル繰り返し、最後の伸長反応として 74 °C で 10 分反応させた。得られた 2nd PCR 産物は、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後、制限酵素 *Nde* I, *Sac* I で消化し、pET23b(+) 発現ベクターに組み込んだ。ダイデオキシ法により配列を確認した後、CP4-EPSPS cDNA 発現 pET23b(+) ベクターをヒートショック法を用いて大腸菌 BL21 株に形質導入した。pET23b(+) が組み込まれた大腸菌BL21を大量培養し、NZCYM 培養液中で 0.1 mM IPTG により刺激し、CP4-EPSPS タンパク質を発現さ