

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) 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 μ gまたは、50 μ g/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。

3) CP4-EPSPSの精製

CP4-EPSPS 発現大腸菌破碎液 500 μ l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。

4) 抗体の産生の確認

(1) ELISA (固相酵素標識免疫測定)法

固相抗原として精製した CP4-EPSPS (1.5 μ g/well)を用いた。マウスより採取した血清に第 2 抗体としてウサギ抗マウス IgEまたは IgG1抗体を反応させ、次いで第3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。

(2) ウェスタンブロットによる解析

精製した CP4-EPSPS (1.5 μ g/well)を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

ローズ膜に 37 mA、24 時間の条件で転写した。転写後、ニトロセルローズ膜を 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マウス血清を 0.2% casein-PBS で 10 倍希釈 (IgE抗体測定用)または、1000倍希釈 (IgG1抗体測定用)して加え、1.5 時間反応させた。洗浄後、二次抗体としてウサギ抗マウス Ig 抗体を1時間反応させ、洗浄後、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ズ膜を 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。47kDaのバンドの青色の強さを Diana Bio-imaging system (M&S)を用いて CCDカメラでとりこんだ後、デンストメトリック解析にて定量し、CP4-EPSPSの分解並びに抗原性の変化をモニターした。

5) EPSPSの物理化学的処理並びに酵素処理

EPSPSの物理化学的処理としては、100 $^{\circ}$ C、5分の加熱処理及び人工胃腸液による分解を行った。次いで、ELISA法または、ウェスタンブロット法で、抗体との反応性を検討した。

C 研究結果

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

発現用pET23b(+)-ベクターに、遺伝子組換え大豆からPCR法にて増幅したCP4-EPSPSの全長をコードするDNAを組み込み、大腸菌 BL21に導入することにより、CP4-EPSPSの大腸菌での発現に成功した。次いで、大腸菌を緩衝液中で、超音波にて破碎し、破碎液中に回収されてくるEPSPSの割合を調べたところ、約50%のEPSPSが界面活性剤非存在下でも抽出されてくることが確認され、大腸菌中で、プラスミドがインクルージョンボディの状態で存在している訳ではないものと思われた。抽出されてきた大腸菌蛋白質の80%以上が、分子量47kDaの蛋白質であった。この蛋白質がCP4-EPSPS蛋白質であることを確認するため行った、N末側から8個のアミノ酸配列は M L H G A S S R と判明し、Harrison L A (1996, J Nutr 126

728-740)の報告しているC4-EPSPSの配列と一致し、CP4-EPSPSと同定した。

2) ELISA法によるEPSPS蛋白質に対する抗体の作成の確認

Table 1 CP4-EPSPS 投与マウス IgE 及び IgG1 抗体産生

	Antibody titer	
	Anti-CP4-EPSPS-IgE	Anti-CP4-EPSPS-IgG1
CP4-EPSPS (5 µg i.p)	52.3 ± 29.1	>10000
CP4-EPSPS (50 µg i.p)	33.9 ± 26.3	5600 ± 4613
control	<10	<100

Table 1に示すように、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、5µg 及び 50µg CP4-EPSPSをi.p.投与した群で、弱いIgE抗体の産生がみられ、5µg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5µg EPSPS投与で10,000以上、50µg 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ボ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3µgのCP4-EPSPSを共存させた場合に、50%阻害されたが、100°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。ウェスタンブロット法で、SIF(Simulated intestinal fluid)と反応させた CP4-EPSPSとマウスIgE,IgG1抗体との反応性を確認したが、IgE抗体の場合は、20分で全くバンドがみられず、IgG1抗体の場合は、30分処理で、0分の時の20%にまで、反応が低下しており、ウサギ抗EPSPS抗体を用いてウェスタンブロットを行った時にみられたSIF反応後のCP4-EPSPSとの反応性の低下とほぼ同様であった。ウサギ抗EPSPS抗体の結果から考えて、SGF処理したCP4-EPSPSとの反応性の低下は、はるかに早い時間に起きることが予想された。

D. 考察

大腸菌で発現させたCP4-EPSPSは、その分子量及びN末側からのペプチドシーケンスの結果から、遺伝子組み換え大豆に組み込まれているCP4-EPSPSと同一の蛋白であり、その3次構造も同一であることが予想された。この蛋白質を、最もIgE抗体産生を起こしうる条件下でBALB/cマウス腹腔内に投与した場合でも、弱いIgE抗体産生しか引き起こさなかった。これは、CP4-EPSPSの、IgE抗体産生方向への抗原提示能が弱いことが予想される。さらに、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的条件¹⁻²⁾を備えておらず、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。

参考文献

- 1)Astwood J.D., Leach J.N., Fuchs R.L. (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotech.* 14, 1269-1272
- 2)Taylor S.L., Lemanske R.F., Bush R.K., Busse W.W. (1987) Food allergens: structure and immunologic properties *Ann.Allergy* 59, 93-99