

- 3) Nakayama, T., Kurosawa, Y., Furui, S., Kerman, K., Kobayashi, M., Rao, SR., Yonezawa, Y., Nakano, K., Hino, A., Yamanura, S., Takamura, Y. and Tamiya, E., Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow PCR applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1327-33 (2006).
- 4) Corbisier, PH., Broothaerts, W., Gioria, S., Schimmel, H., Burns, M., Baoutina, A., Emslie, KR., Furui, S., Kurosawa, Y., Holden, M., Kim, H-H., Lee, Y-M., Kawasaki, M., Sin, D. and Wang, J., Towards metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. Part A- the effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR. *J. Agrc. Food Chem.* in press(2007).
- 5) Akiyama, H, Watanabe, T, Kikuchi, H., Sakata, S., Tokishita, S., Hayashi, H., Hino, A., Teshima, R., Sawada, J. and Maitani, T. A Detection Method of CryI<sub>Ac</sub> Protein for Identifying Genetically Modified Rice using the Lateral Flow Test Assay. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 47, 111-114 (2006)
- 6) Yamaguchi, A., Shimizu, K., Mishima, T., Aoki, N., Hattori, H., Sato, H., Ueda N., Watanabe, T., Hino, A., Akiyama, H. and Maitani, T. Detection Method of Genetically Modified Papaya using duplex PCR. *J. Food Hyg. Soc. Japa.* 47, 146-150 (2006).
- 明寛、松田りえ子、穂山浩、米谷民雄 (2006.10)
- 4) 日本生物工学会 58 回大会「GM 定量測定のためのマイクロフルイディスク PCR デバイスの開発」中山剛、黒澤康紀、古井聡、日野明寛、武尾正弘、高村禪、民谷栄一(2006.9)
- 5) 120<sup>th</sup> AOAC International Annual Meeting and Exposition 「Collaborative studies of quantitative methods for genetically modified maize (MON863, NK603, TC1507 and T25) by real-time PCR」Kodama, T., Matsuoka, T., Kuribara, H., Kasahara, M., Futo, S., Menegishi, Y., Aoki, N., Sawada, C., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Furui, S. and Hino, A.
- 6) 第 92 回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換えトウモロコシ (Bt10 系統) の定量検知法の開発と評価」古井聡、浅木仁志、橋本仁康、峯岸恭孝、児玉貴志、笠原正輝、渡井正俊、飯塚太由、渡邊敬浩、穂山浩、米谷民雄、橘田和美、日野明寛
- 7) 日本農芸化学会 2007 年度大会「リガーゼ連鎖反応による遺伝子組換え農作物の定性検知」真野潤一、小口太一、穂山浩、米谷民雄、日野明寛、古井聡、橘田和美
- 8) 日本食品衛生学会第 92 回学術講演会「トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出精製法の検討」大森清美、土屋久世、山田利治、渡邊敬浩、穂山浩、米谷民雄

#### 学会発表等

- 1) 第92回日本食品衛生学会学術講演会「キャピラリー型定量PCR装置による遺伝子組換えトウモロコシの定量条件の検討」豊田安基江、穂山浩、杉村光永、渡邊敬浩、坂田こずえ、白政優子、橘田和美、髙池千恵子、日野明寛、江坂宗春、米谷民雄(2006.10)
- 2) The 120th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting Symposium on biochemical method 「DNA and Protein Based Methods for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products」Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Akihiro Hino, Tamio Maitani (2006.9)
- 3) 第 92 回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)を対象とした新検知技術の開発と評価」渡邊敬浩、時下祥子、古井聡、橘田和美、日野

図表

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ (LLRice601系統) を対象とした検知技術の開発

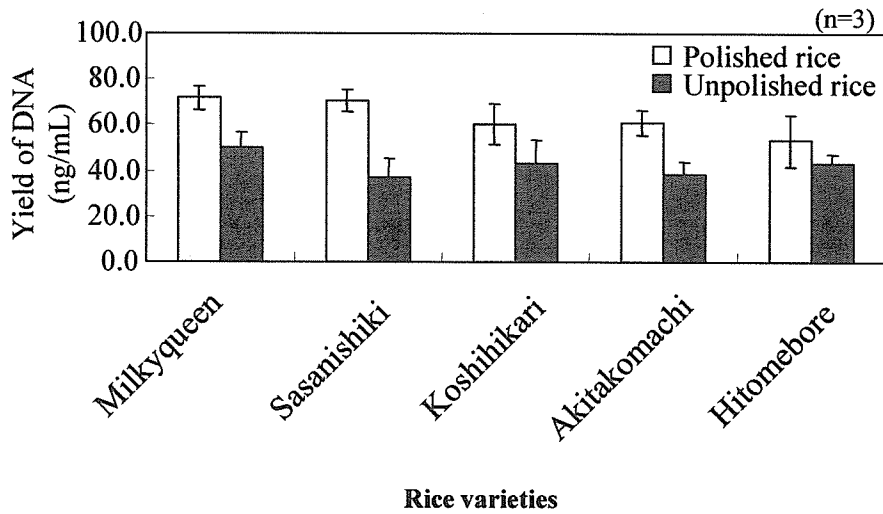


Fig. 1-1 品種及び精米率の異なる5種の米試料を対象としたDNA抽出

Yield of DNA (ng/ $\mu$ L)				
	n=6			n=18
	1st day	2nd day	3rd day	3 days
average	77.89	79.01	74.12	77.01
SD	6.74	5.77	10.63	7.81
RSD(%)	8.65	7.30	14.34	10.14

Table 1-1 抽出DNA量の日差変動

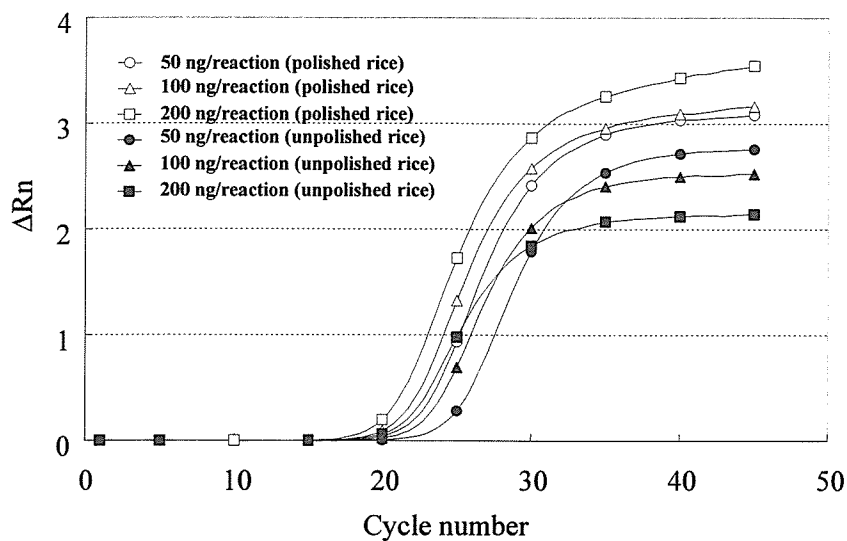


Fig. 1-2 精米率及びDNAの濃度が蛍光値に与える影響

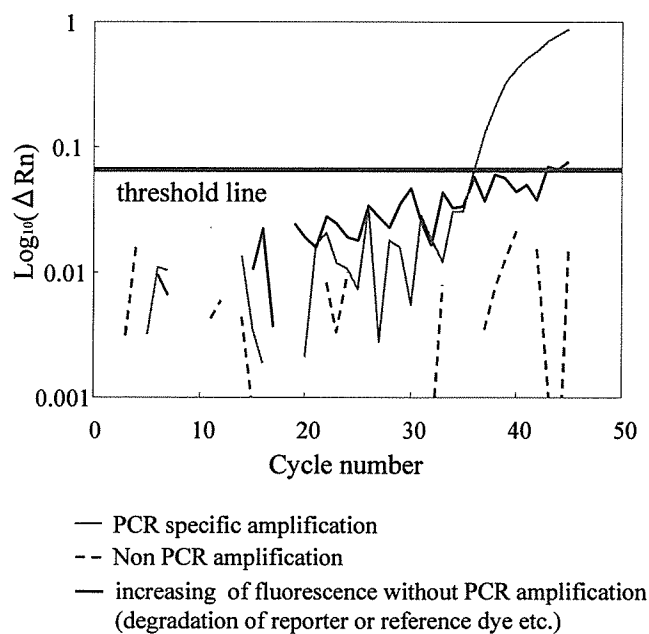


Fig. 1-3 PCR増幅に依存せず得られるCt値

n=10							
Detection method	Contents of LLRICE 601(DNA%)	Laboratory A		Laboratory B			
		Ct value		Positivity rate(%)	Ct value		Positivity rate(%)
PLD	0	20.70	± 0.08	100	20.81	± 0.14	100
	0.001	20.78	± 0.08	100	20.82	± 0.19	100
	0.002	20.70	± 0.10	100	20.84	± 0.14	100
	0.1	20.70	± 0.13	100	20.79	± 0.10	100
35S-bar	0	-	-	0	-	-	0
	0.001	37.52	± 1.26	50	38.04	± 0.54	50
	0.002	37.32	± 0.90	70	37.06	± 1.33	50
	0.1	32.37	± 0.44	100	32.28	± 0.41	100

Table 1-2-1 共同試験結果 (集計)

Contents of LLRice 601 (DNA %)	Laboratory code							
	A				B			
	0	0.001	0.002	0.1	0	0.001	0.002	0.1
	-	-	38.41	33.01	-	38.41	35.93	32.30
	-	42.05	37.67	32.49	-	-	35.70	32.32
	-	36.93	36.78	33.01	-	-	-	32.85
	-	-	-	32.48	-	-	-	32.94
Ct value	-	37.32	36.14	32.16	-	-	38.12	32.23
	-	-	38.23	32.31	-	37.99	38.74	32.16
	41.93	37.07	-	32.00	-	37.13	36.82	32.28
	-	-	37.65	31.75	-	38.27	-	32.27
	-	39.72	36.37	31.86	-	38.41	-	31.99
	-	36.55	-	32.60	-	-	-	31.47

Table 1-2-2 共同試験結果 (個別)

n=10							
Detection method	Contents of LLRICE 601(DNA%)	ABI PRISM 7500		ABI PRISM 7700			
		Ct value		Positivity rate(%)	Ct value		Positivity rate(%)
PLD	0	20.72	± 0.08	100	20.49	± 0.09	100
	0.001	20.74	± 0.09	100	20.54	± 0.11	100
	0.002	20.76	± 0.07	100	20.47	± 0.08	100
	0.1	20.77	± 0.08	100	20.48	± 0.11	100
35S-bar	0	-	-	0	-	-	0
	0.001	38.75	± 0.79	90	38.12	± 0.43	50
	0.002	37.91	± 1.02	100	37.34	± 0.84	90
	0.1	32.62	± 0.33	100	32.55	± 0.35	100

Table 1-3 他のreal-time PCR機種を用いた結果

Contents of LLRice 601 (DNA %)	Laboratory code							
	A				B			
	0	0.001	0.002	0.1	0	0.001	0.002	0.1
	1.07	1.05	1.15	2.06	0.99	1.12	1.38	1.93
	1.06	1.12	1.20	2.09	0.99	0.99	1.39	1.94
	1.06	1.38	1.38	1.94	0.99	0.99	1.00	1.81
Ratio of FAM fluorescence intensity (45 /10 cycles)	1.06	1.04	1.07	2.06	0.99	0.98	0.98	1.88
	1.07	1.22	1.36	2.10	0.98	0.98	1.11	1.87
	1.07	1.04	1.20	2.05	0.98	1.13	1.07	1.88
	1.12	1.17	1.07	2.05	0.98	1.14	1.16	1.88
	1.09	1.07	1.20	2.09	0.99	1.10	1.01	1.91
	1.07	1.15	1.34	2.07	0.99	1.10	1.00	1.94
	1.08	1.27	1.08	2.03	0.99	0.98	0.98	1.90

Table 1-4 multicomponent 解析の結果

2. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの検知技術の検討

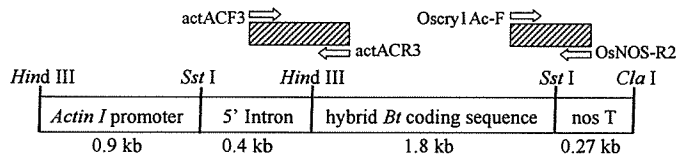


Fig. 2-1-a

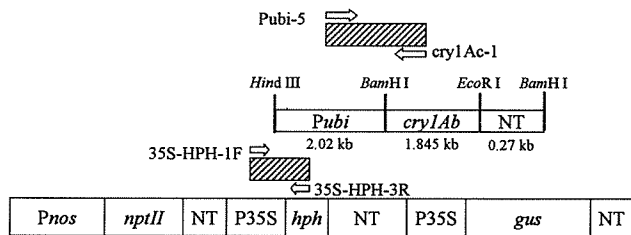


Fig. 2-1-b

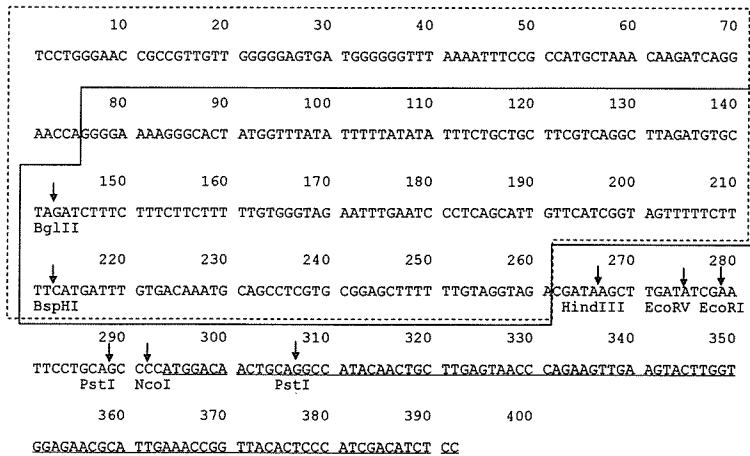


Fig. 2-2

```

          10      20      30      40      50
Newly detected Bt rice line A : GCAGGAGTGA TTATCGACAG ATTCCAGTTC ATTCCAGTTA CTGCAACACT : 50
GM Shanyou 63 line          B : GCAGGAGTGA TTATCGACAG ATTCCAGTTC ATTCCAGTTA CTGCAACACT : 50
                                   XhoI
                                   ↑
                                   XhoI

          60      70      80      90      100
Newly detected Bt rice line A : CGAGGCTGAA TGAG---AA TTCGGTACCC CGACCTGCA- GATCGTTCAA : 95
GM Shanyou 63 line          B : CGAGGCTGAA TAAGTCGAGG TACCGAGCTC GAATTTCCCC GATCGTTCAA : 100
                                   ↑      ↑
                                   KpnI  SstI

          110     120     130     140
Newly detected Bt rice line A : ACATTTGGCA ATAAAGTTTC TTAAGATTGA ATCCTGTTGC CGGTCTT : 142
GM Shanyou 63 line          B : ACATTTGGCA ATAAAGTTTC TTAAGATTGA ATCCTGTTGC CGGTCTT : 147
                                   ↑
                                   AflIII

```

Fig. 2-3

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
ACAAAAATGC TTTTGTTCG CTGGTTGTG ATGATGTGGT GTGGTTGGGC GGTGCTTCAT TC GTTCTAGA TCGGAGTAGA
                                   ↓
                                   XbaI
          90      100     110     120     130     140     150     160
ATACTGTTTC AAATACCTG GTGTATTAT TAATTTGGA ACTGTATGTG TGTGTCATAC ATCTTCATAG TTACGAGTTT
          170     180     190     200     210     220     230     240
AAGATGGATG GAAATATCGA TCTAGGATAG GTATACATGT TGATGTGGGT TTTACTGATG CATATACATG ATGGCATATG
                                   ↓
                                   AccI
          250     260     270     280     290     300     310     320
CAGCATCTAT TCATATGCTC TAACCTTGAG TACCTATCTA TTATAATAAA CAAGIATGTT TTATAAATTAT TTTGATCTTG
                                   ↓
                                   NdeI
          330     340     350     360     370     380     390     400
ATATACTTGG ATGATGGCAT ATGCAGCAGC TATATGTGGA TTTTTTAGC CCTGCCTTCA TACGCTATTT ATTTGCTTGG
                                   ↓
                                   NdeI
          410     420     430     440     450     460     470     480
TACTGTTTCT TTTGTCGATG CTCACCTGTG TTTTGGTGT TACTTCTGCA GGTGACTCT AGAGGATCCA TGGACAACAA
                                   ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
                                   PstI AccI XbaI BamHI NcoI
          490     500     510     520     530     540     550     560
CCCAACATC AACGAATGCA TTCCATACAA CTGCTTGAGT AACCCAGAAG TTGAAGTACT TGGTGGAGAA CGCATTGAAA
          570     580     590     600     610     620     630     640
CCGGTTACAC TCCCATCGAC ATCTCCTTGT CCTTGACACA GTTCTGCTC AGCGAGTTCG TGCCAGGTGC TGGGTTCTGT
          650     660     670     680     690     700     710     720
CTGGGACTAG TTGACATCAT CTGGGATATC TTTGGTCCAT CTC AATGGGA TGCATTCCTG GTGCAAAATG AGCAGTTGAT
                                   ↓
                                   SpeI
          730     740     750     760     770     780     790     800
CAACCAGAGG ATCGAAGAGT TCGCCAGGAA CCATGCCATC TCTAGTTGG AAGGATTGAG CAATCTCTAC CAAATCTATG
          810     820     830     840     850     860
CAGAGAGCTT CAGAGAGTGG AAGCCGATCC TACTAACCCC CAGCTCCTCC CCCGA

```

Fig. 2-4

### 3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良

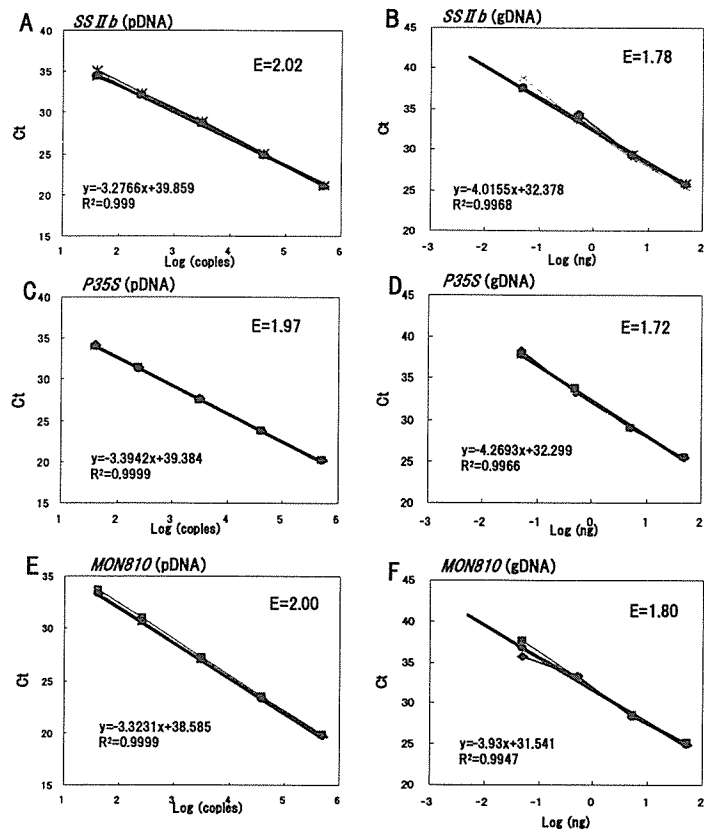


Fig3-1 標準pDNAとMON810 gDNA(未処理)により作製した検量線  
 SSIIb検量線;pDNA(A)およびgDNA(B)  
 P35S検量線;pDNA(C)およびgDNA(D)  
 MON810検量線;pDNA(E)およびgDNA(F)  
 ◆;1回目, ▲;2回目, ■;3回目, ●;4回目,  
 ×;5回目, \*;6回目(C,D,E,Fは3回測定)

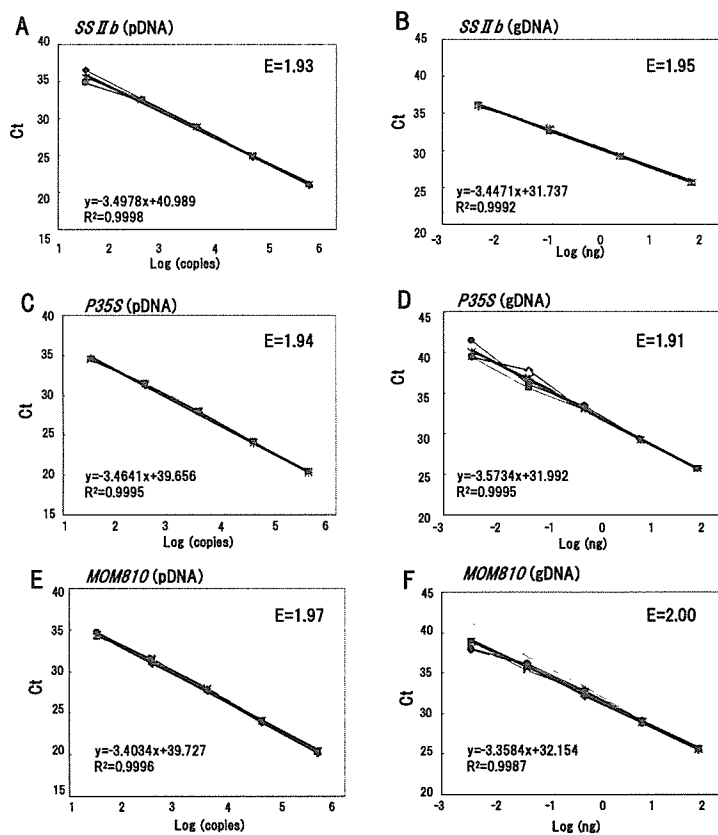


Fig3-2 標準pDNAとMON810 gDNA(処理済み)により作製した検量線  
*SS IIb*検量線: pDNA(A)およびgDNA(B)  
*P35S*検量線: pDNA(C)およびgDNA(D)  
*MON810*検量線: pDNA(E)およびgDNA(F)  
 ◆;1回目, ▲;2回目, ■;3回目, ●;4回目,  
 ×;5回目, \*;6回目

Table3-1 pDNAとgDNAの検量線の比較(改良前条件)

Target	Criterion	Type of calibrator	Mean of data set	Variance of data set	n	T statistical data	P (T < t) two-sided
<i>SS IIb</i>	slope	pDNA	-3.277	$6.84 \times 10^{-3}$	6	8.268	$4.00 \times 10^{-4}$
		gDNA	-4.016	$3.73 \times 10^{-2}$	6		
	E	pDNA	2.020	$1.25 \times 10^{-3}$	6	9.731	$1.95 \times 10^{-4}$
		gDNA	1.777	$2.25 \times 10^{-3}$	6		
<i>P35S</i>	slope	pDNA	-3.394	$2.38 \times 10^{-3}$	3	11.273	$7.78 \times 10^{-3}$
		gDNA	-4.269	$1.83 \times 10^{-2}$	3		
	E	pDNA	1.971	$3.65 \times 10^{-4}$	3	14.297	$4.86 \times 10^{-3}$
		gDNA	1.716	$8.48 \times 10^{-4}$	3		
<i>MON 810</i>	slope	pDNA	-3.323	$3.04 \times 10^{-3}$	3	3.784	$6.30 \times 10^{-2}$
		gDNA	-3.930	$8.22 \times 10^{-2}$	3		
	E	pDNA	2.000	$5.32 \times 10^{-4}$	3	4.371	$4.90 \times 10^{-2}$
		gDNA	1.802	$6.37 \times 10^{-3}$	3		



Table3-2 標準pDNA および前処理を行ったgDNAの検量線の比較

Target	Criterion	Type of calibrator	Mean of data set	Variance of data set	n	T Statistical data	P (T < t) two-sided
SSI <b>b</b>	slope	pDNA	-3.498	2.42x10 <sup>-2</sup>	5	-0.718 (-2.553)	0.512 (0.063)
		gDNA	-3.447	1.16x10 <sup>-3</sup>	5		
			(-3.284)	(5.14x10 <sup>-3</sup> )	(5)		
	E	pDNA	1.934	3.03x10 <sup>-3</sup>	5	-0.536 (-2.616)	0.621 (0.059)
		gDNA	1.954	4.36x10 <sup>-3</sup>	5		
			(2.017)	(9.67x10 <sup>-4</sup> )	(5)		
P35S	slope	pDNA	-3.464	3.75x10 <sup>-4</sup>	5	1.078 (-6.264)	0.342 (0.003)
		gDNA	-3.573	4.75x10 <sup>-2</sup>	5		
			(-3.251)	(6.58x10 <sup>-3</sup> )	(5)		
	E	pDNA	1.944	5.22x10 <sup>-5</sup>	5	0.967 (-5.853)	0.388 (0.004)
		gDNA	1.910	5.75x10 <sup>-3</sup>	5		
			(2.031)	(1.25x10 <sup>-3</sup> )	(5)		
MON810	slope	pDNA	-3.403	1.97x10 <sup>-3</sup>	5	-0.275 (-1.388)	0.797 (0.237)
		gDNA	-3.358	1.16x10 <sup>-1</sup>	5		
			(-3.344)	(5.42x10 <sup>-3</sup> )	(5)		
	E	pDNA	1.967	2.98x10 <sup>-4</sup>	5	-0.529 (-1.415)	0.624 (0.230)
		gDNA	1.998	1.41x10 <sup>-2</sup>	5		
			(1.991)	(8.95x10 <sup>-4</sup> )	(5)		

( )内の数値はgDNAの前処理として超音波処理のみを行った場合のもの

Table3-3 1% および 5% MON 810 擬似混入試料の定量結果

Target			Same day (n = 5)			Three days
			1	2	3	(n = 15)
P35S	1% Mixing Sample	Calculated (%)	0.98	1.05	0.92	0.98
		RSD (%)	3.57	10.70	3.71	8.71
	5% Mixing Sample	Calculated (%)	4.26	4.83	5.11	4.73
		RSD (%)	2.94	6.24	5.52	9.09
MON810	1% Mixing Sample	Calculated (%)	0.89	1.11	1.14	1.05
		RSD (%)	1.66	8.53	9.60	13.22
	5% Mixing Sample	Calculated (%)	4.79	5.12	4.88	4.93
		RSD (%)	7.25	3.17	4.86	5.69

Table3-4 MON810定量条件による擬似混入試料および標準試料の定量結果

Target	Sample	n	GMO Amount (%)		RSD (%)
			Actual	Calculated	
P35S	MON0	3	0	0.00	
	ERM1	15	1	1.38	6.66
	ERM5	15	5	5.56	4.25
	MON1*	6	1	1.66	9.78
	MON5*	6	5	8.18	9.20
MON810	MON0	3	0	0.00	
	ERM1	15	1	1.31	5.21
	ERM5	15	5	5.29	6.32
	MON1*	6	1	1.51	10.33
	MON5*	6	5	9.89	14.52

\* gDNA未処理群 (超音波処理およびEcoRI処理)

#### 4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

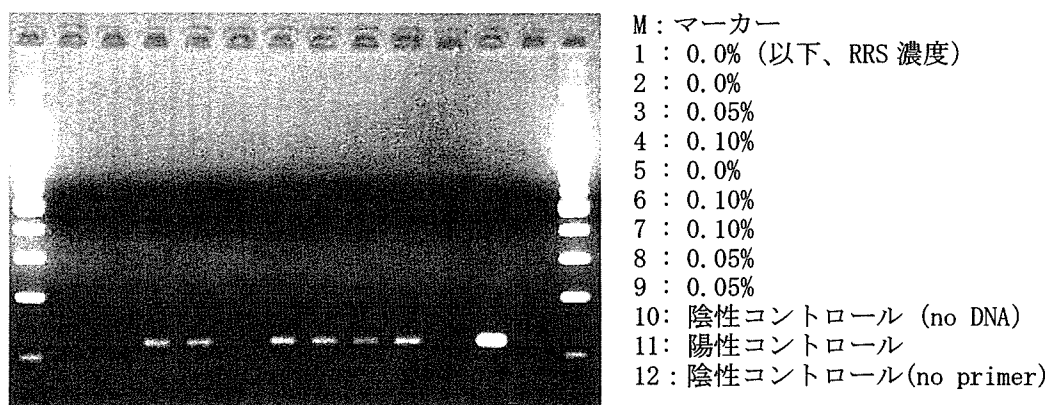


Fig. 4-1 RRS 定性分析結果の一例

#### 5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

作物種	line数
アルファルファ	2
セイヨウナタネ	14
カーネーション	4
チコリー	3
ワタ	22
芝	1
亜麻	1
トウモロコシ	26
パパイヤ	2
ジャガイモ	20
コメ	3
ダイズ	11
カボチャ	2
テンサイ	3
タバコ	2
トマト	8
コムギ	1
合計	125

Table 5-1 遺伝子組換えに使用された作物の種類と数

形質	延べline数	総line数に対する割合(%)
除草剤耐性(グリホサート;EPSPS系)	18	14.4
除草剤耐性(グルホシネート:PAT系)	38	30.4
害虫抵抗性(Cry系)	44	35.2
含有成分変化(脂肪酸, アミノ酸等の増減)	7	5.6
花の色変化	10	8
長持ち(切り花や果肉)	8	6.4
ウィルス抵抗性	10	8
その他薬剤耐性	18	14.4
生殖性変化(barnase,barstar,dam)	14	11.2

Table 5-2 付与された形質の種類と数

方法	line数	総lineに対する割合(%)
agrobacterium法	86	68.8
biolistic(microbombardment)	32	25.6
electroporation	2	1.6
chemical transfer	5	4

Table 5-3 組換え作物の作出方法

promoter	延べline数	総line数に対する割合(%)	
CaMV 35S	76	60.8	CaMV 35S:カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーター
FMV	17	13.6	FMV:ゴマノハモザイクウイルス由来のプロモーター
pTA29	11	8.8	pTA29:タバコTA29プロモーター
mac-1	10	8	mac-1:カリフラワーモザイクウイルス及びアグロバクテリウム由来の合成プロモーター
Rice actin	7	5.6	Rice actin:コメアクチンプロモーター
UbiZM1	5	4	UbiZM1:トウモロコシユビキチンプロモーター

Table 5-4-1 シスエレメントの種類と数(プロモーター)

terminator	延べline数	総line数に対する割合(%)	
nos3'	48	38.4	nos 3':アグロバクテリウム由来のnosターミネーター
CaMV35S	24	19.2	CaMV35S:カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター
RubiscoE9 3'	30	24	RubiscoE9 3':エンドウマメルビスコターミネーター
3'g7	9	7.2	3'g7:改変型nosターミネーター
7S 3'	4	3.2	7S3':ダイズコングルシニンターミネーター
ORF25poly	4	3.2	ORF25 poly:アグロバクテリウム由来の双方向ターミネーター
pinII	6	4.8	PinII:ジャガイモプロテアーゼインヒビターターミネーター

Table 5-4-2 シスエレメントの種類と数(ターミネーター)

## 6. トウモロコシ加工食品からのDNA抽出精製法の検討

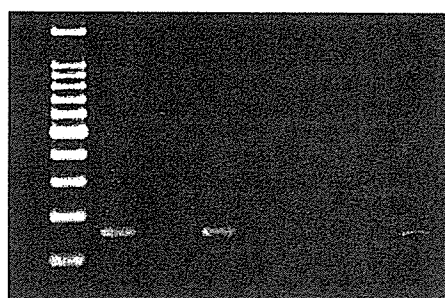
検体 No.	トウモロコシ加工食品	DNA抽出精製法	加水量 (検体重量比)	調製検体 採取量	抽出 DNA容 量 (μL)	吸光度比 (260nm/230nm)	吸光度比 (260nm/280nm)	O.D.260nm測定に よる抽出DNA濃 度 (ng/μL)	検体1gあたりの 抽出DNA量 (mg)
1-1	ジャンボコーン	JAS-Gtip	x3	2	50	0.541 ± 0.024	1.209 ± 0.060	2.0 ± 0.9	3.9 ± 1.8
		ALG-Gtip	-	2	100	0.507 ± 0.097	1.331 ± 0.101	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1
		ALG-Gtip	-	4	100	0.326 ± 0.024	1.295 ± 0.032	8.2 ± 2.6	2.1 ± 0.7
		Kanagawa-Gtip	-	2	100	0.602 ± 0.061	1.139 ± 0.018	15.3 ± 3.9	7.7 ± 1.9
		Kanagawa-Gtip	-	3	100	0.628 ± 0.079	1.151 ± 0.036	14.2 ± 1.8	4.7 ± 0.6
		Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.596 ± 0.023	1.171 ± 0.035	17.5 ± 3.0	4.4 ± 0.8
1-2	ジャンボコーン	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.439 ± 0.019	1.430 ± 0.026	12.6 ± 1.7	3.1 ± 0.4
1-3	ジャンボコーン	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.316 ± 0.046	1.333 ± 0.068	4.8 ± 2.2	1.2 ± 0.5
1-4	ジャンボコーン	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.456 ± 0.027	1.430 ± 0.007	15.4 ± 0.9	3.9 ± 0.2
2-1	コーンフレーク	MHLW-Gtip	-	1	100	0.364 ± 0.042	1.595 ± 0.351	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.7
		ALG-Gtip	-	2	100	0.162 ± 0.007	0.939 ± 0.053	5.8 ± 0.6	2.9 ± 0.3
		ALG-Gtip	-	4	100	0.217 ± 0.016	1.189 ± 0.138	4.4 ± 0.7	1.1 ± 0.2
		Kanagawa-Gtip	-	2	100	0.474 ± 0.056	1.518 ± 0.203	1.6 ± 0.8	0.8 ± 0.4
		Kanagawa-Gtip	-	3	100	0.491 ± 0.015	1.520 ± 0.018	2.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1
		Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.447 ± 0.031	1.477 ± 0.020	4.2 ± 0.7	1.1 ± 0.2
2-2	コーンフレーク	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.578 ± 0.009	1.188 ± 0.031	2.9 ± 2.1	0.7 ± 0.5
2-3	コーンフレーク	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.408 ± 0.018	1.286 ± 0.371	4.5 ± 2.6	1.1 ± 0.6
2-4	コーンフレーク	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.621 ± 0.012	1.182 ± 0.016	3.9 ± 1.6	1.0 ± 0.4
2-5	コーンフレーク	Kanagawa-Gtip	-	4	100	0.662 ± 0.008	1.214 ± 0.018	4.0 ± 2.1	1.0 ± 0.5
3	ジャイアントコーン	MHLW-Gtip	-	1	100	2.253 ± 0.024	1.752 ± 0.017	503.7 ± 42.3	503.7 ± 42.3
		ALG-Gtip	-	2	100	2.297 ± 0.010	1.581 ± 0.014	435.3 ± 29.1	217.7 ± 14.6
		JAS-Gtip	x3	2	50	2.285 ± 0.050	1.686 ± 0.047	119.7 ± 15.0	239.3 ± 29.9
4	ポップコーン	MHLW-Gtip	-	1	100	2.232 ± 0.009	1.695 ± 0.021	1182.8 ± 17.1	1182.8 ± 17.1
		ALG-Gtip	-	2	100	2.238 ± 0.005	1.639 ± 0.009	1112.7 ± 17.1	556.3 ± 8.5
		JAS-Gtip	x3	2	50	2.333 ± 0.022	1.706 ± 0.006	523.3 ± 16.1	1046.7 ± 32.1
5	タコススナック	MHLW-Gtip	-	1	100	2.284 ± 0.043	1.688 ± 0.051	431.2 ± 3.6	431.2 ± 3.6
		ALG-Gtip	-	2	100	2.188 ± 0.017	1.644 ± 0.019	833.0 ± 7.1	416.5 ± 3.5
		JAS-Gtip	x2	2	50	2.335 ± 0.009	1.628 ± 0.105	425.7 ± 4.3	638.5 ± 6.4
6-1	コーンパフ(しお味)	MHLW-Gtip	-	1	100	2.222 ± 0.006	1.746 ± 0.041	469.5 ± 44.7	469.5 ± 44.7
		ALG-Gtip	-	2	100	2.243 ± 0.036	1.759 ± 0.020	673.8 ± 4.3	336.9 ± 2.2
		JAS-Gtip	x2	2	50	2.209 ± 0.031	1.784 ± 0.008	262.8 ± 20.0	394.3 ± 30.0
6-2	コーンパフ(たまねぎ味)	MHLW-Gtip	-	1	100	2.316 ± 0.022	1.738 ± 0.036	577.5 ± 19.7	577.5 ± 19.7
		ALG-Gtip	-	2	100	2.331 ± 0.026	1.780 ± 0.029	522.0 ± 16.1	261.0 ± 8.1
		JAS-Gtip	x2	2	50	2.344 ± 0.020	1.732 ± 0.014	340.0 ± 15.7	510.0 ± 23.6
6-3	コーンパフ(チリ味)	MHLW-Gtip	-	1	100	2.411 ± 0.074	1.695 ± 0.034	553.2 ± 18.3	553.2 ± 18.3
		ALG-Gtip	-	2	100	2.355 ± 0.032	1.771 ± 0.035	570.7 ± 15.3	285.3 ± 7.7
		JAS-Gtip	x2	2	50	2.357 ± 0.030	1.735 ± 0.037	282.2 ± 21.8	423.3 ± 32.6
7	冷凍トウモロコシ	MHLW-Gtip	x1	1	100	2.244 ± 0.082	1.675 ± 0.086	224.0 ± 41.7	58.3 ± 1.9
8-1	缶詰トウモロコシ(ホールタイプ)	MHLW-Gtip	x1	1	100	2.399 ± 0.015	1.661 ± 0.014	270.7 ± 4.9	541.3 ± 9.9
8-2	缶詰トウモロコシ(クリームタイプ)	MHLW-Gtip	-	1	100	2.312 ± 0.005	1.651 ± 0.006	394.7 ± 8.1	394.7 ± 8.1
9-1	コーンスープ(乾燥粉末)	MHLW-Gtip	-	1	100	2.340 ± 0.013	1.757 ± 0.011	947.0 ± 15.8	947.0 ± 15.8
9-2	コーンスープ(液体)	MHLW-Gtip	-	1	100	2.416 ± 0.019	1.645 ± 0.027	130.8 ± 5.1	130.8 ± 5.1

Table 6-1 Gtip 法によるトウモロコシ加工食品の抽出 DNA



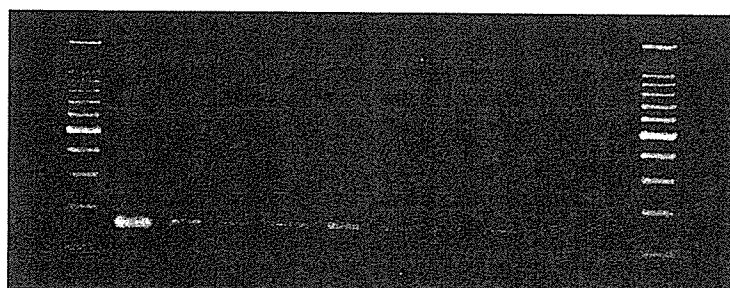
L	P	JAS			KNG2g			KNG3g			KNG4g			L
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	

L: 100 bp ladder; P: control plasmid;  
 JAS lane 1-3: JAS G-tip, sample 2g (with water);  
 KNG2g lane 4-6: Kanagawa G-tip, sample 2g;  
 KNG3g lane 7-8: Kanagawa G-tip, sample 3g;  
 KNG4g lane 10-12: Kanagawa G-tip, sample 4g;



L	P	ALG2g			ALG4g		
		1	2	3	4	5	6
		-	+	-	+	-	+

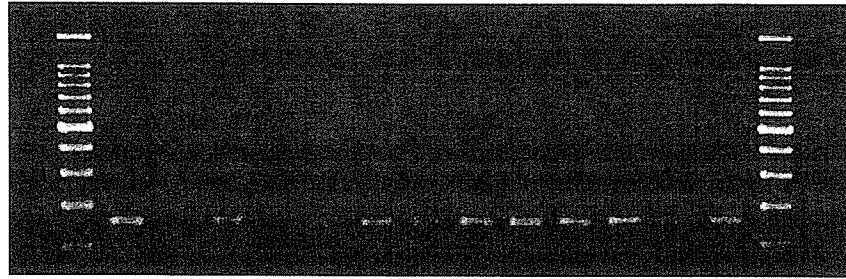
ALG2g lane 1-3: ALG G-tip, sample 2g;  
 ALG4g lane 4-6: ALG G-tip sample 4g



L	P	1-2			1-3			1-4			L
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	

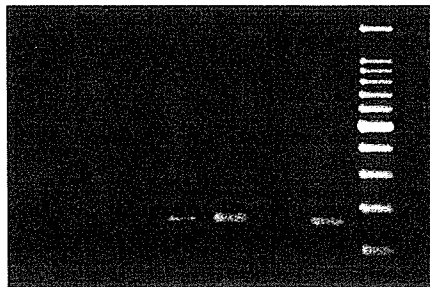
1-2 lane 1-3: Ganbo corn, sample No.2, sample 4g;  
 1-3 lane 4-6: Ganbo corn sample No.3, sample 4g;  
 1-4 lane 7-9: Ganbo corn sample No.4, sample 4g

Fig. 6-1 ジャンボコーン抽出 DNA の Zein 増幅 DNA



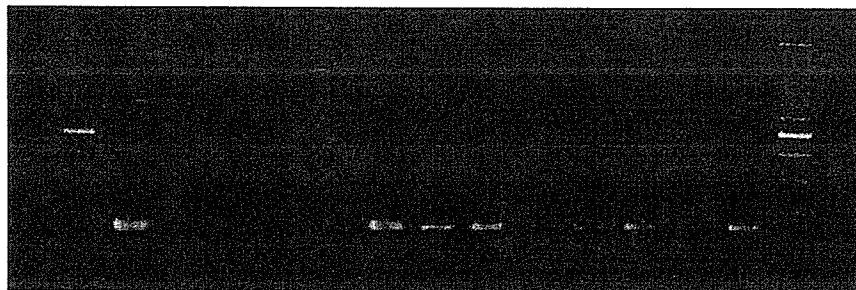
L	P	<u>MHLW</u>			<u>KNG2g</u>			<u>KNG3g</u>			<u>KNG4g</u>			L
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

L: 100 bp ladder; P: control plasmid;  
MHLW lane 1-3: MHLW G-tip, sample 1g;  
KNG2g lane 4-6: Kanagawa G-tip, sample 2g;  
KNG3g lane 7-8: Kanagawa G-tip, sample 3g;  
KNG4g lane 10-12: Kanagawa G-tip, sample 4g;



	<u>ALG2g</u>			<u>ALG4g</u>			P	L
	1	2	3	4	5	6		
	-	-	-	+	+	+		

ALG2g lane 1-3: ALG G-tip, sample 2g;  
ALG4g lane 4-6: ALG G-tip sample 4g



L	P	<u>2-2</u>			<u>2-3</u>			<u>2-4</u>			<u>2-5</u>			L
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	

2-2 lane 1-3: Ganbo corn, sample No.2, sample 4g;  
2-3 lane 4-6: Ganbo corn sample No.3, sample 4g;  
2-4 lane 7-9: Ganbo corn sample No.4, sample 4g  
2-5 lane 10-12: Ganbo corn sample No.5, sample 4g

Fig. 6-2 コーンフレーク抽出 DNA の Zein 増幅 DNA

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書

遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する調査研究  
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室長

研究要旨 平成18年度は、モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関するアレルギー性評価に関する調査研究として、(1)成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごを用いたアレルギー性試験、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた評価、(3) エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルギー性を予測するためのデータ解析手法の検討、並びにアレルギーデータベース(ADFS)の更新を行った。具体的には、(1) 成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごと非組換えあまごを用いて、アレルギー蛋白質の量的、質的変動をアレルギー特異的抗体並びに魚アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。主要アレルギーであるparvalbumin (12kD), collagen(140kD)に組換えに伴う量的、質的変動はみられず、GAPDHと思われる41kDタンパクにもアレルギー性に変化はみられなかった。(2)食物アレルギー動物モデルの開発では、マウスを用いる経口感作の方法についてアレルギー(卵白アルブミン)、非アレルギー物質(ペプシン)を用いて、BALB/cマウスに投与時の溶媒の差違について検討を行い、アレルギーの溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。また、遺伝子組換えおよび非組換えあまごの感作実験から、抗原特異的IgG1抗体の検出頻度は同等であり、両者のアレルギー性は同等であると考えられた。(3)アレルギー予測の解析法では、(i) 既知のアレルギーとの同源性の比較方法 – 既知のアレルギーに特徴的なアレルギーユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルギーエピトープ予測法の検討を開始した。(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルギーデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新を行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めアレルギー数1366, エピトープ既知のアレルギー82種を搭載した。また、タンパク質のアレルギー予測機能である、FAO/WHO法(Hilemanらの方法)とmotif-based法(Stadlerらの方法)の更新を行った。

協力研究者

澤田純一、中島治、中村亮介、中村里香、佐藤里絵(国立医薬品食品衛生研究所)  
美宅成樹、朝川直行(名古屋大学工学部)  
宇理須厚雄(藤田学園大学坂文種報徳会病院)  
金澤由基子、新藤智子(食品薬品安全センター 泰野研究所)

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おり、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評

価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス(Codex)食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、バイオ食品特別部会が設置され、バイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2002年3月に横浜で開催された第3回特別部会で採択された「組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン案」<sup>1)</sup>はステップ8に、進められ、この中で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付され議論されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性(特にペプシン抵抗性)並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対するIgE抗体の存在の有無のスクリーニングがあげられ、検討項目として、動物モデルの使用の推奨等が述べられている。このガイドライン案は、平成15年7月にローマで開催されたCodex総会で、遺伝子組換え食品の安全性評価のガイドライン([ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03\\_34e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03_34e.pdf))として採択されている。組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準が平成16年1月に作定された。

さらに、2004年第27回Codex総会において、CTFBTの再設置が採択され、わが国が議長国を引き受けることになり、2005年9月に第五回タスクフォース会合が行なわれた。ここで、「組換えDNA動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」の策定を行なうこと、「栄養または健康に資する組換えDNA植物由来食品の安全性評価」の策定作業を行なうことで、合意がなされた。生産者のメリットを考慮した第一世代バイオテクノロジー応用食品に加え、第二世代の消費者のメリットも考慮したモダンバイオテクノロジー応用食品についても実用化が現実のものとなりつつある現状に対応するため、第二世代のバイオテクノロジー応用食品の安全性評価にも対応できる安全性評価法の検討を行うことが急務となっている。

本分担研究では、遺伝子組換え体のアレル

ギー性評価に関する研究として、(1)栄養改変型遺伝子組換え植物由来食品、遺伝子組換え動物由来食品のアレルゲン性評価のため、アレルゲンの網羅的解析手法であるアレルゲノーム解析手法を含めアレルゲンの質的、量的変動を調べる手法の導入を図る、(2)動物モデルの検討を行うこと、(3)エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討を行い、アレルゲンデータベース(ADFS)の充実を図ること、を目的に研究を行う。

平成18年度は、(1)遺伝子組換えあまごを用いてアレルゲンの量的、質的変動の解析手法の検討、(2)動物を用いるアレルゲン性の検討、(3)アレルゲン予測の解析法の検討並びにADFSのデータの更新をとりあげ、研究を進めた。

(1)成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごと非組換えあまごを用いて、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動をアレルゲン特異的抗体並びに魚アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。

(2)の動物を用いるアレルゲン性の検討では、マウスを用いる経口感作、経口惹起の方法について更なる検討を加えるとともに、遺伝子組換えと非組換えあまごの感作を行い、両者のアレルゲン性について比較検討を行った。

(3)アレルゲン予測の解析法の検討では、(i)新規導入タンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルゲン予測法の検討を行い、(ii)新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)のアレルゲン、エピトープ情報、並びに相同性検索方法の更新を行った。

## B. 研究方法

(1)成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごを用いたアレルゲン性試験

(i)魚アレルギー患者血清とnon-GMおよびGMアマゴ抽出物との反応性の比較

実験には、独立行政法人 養殖研究所より入手した、成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴ(GM, 1year)および、遺伝子非組換えアマゴ(non-GM, 1 or 2year)を用い



た。アマゴ可食部（筋肉および表皮）は実験に用いるまで - 80℃にて保存した。 - 80℃凍結保存状態のアマゴ可食部1.5gあたり、PBS 15mL（含プロテアーゼ阻害剤）を添加し、ホモジネート後、遠心して不溶物を除去した上清をアマゴ粗抽出物とし、-80℃で凍結保存した。抽出したタンパク質濃度は、BCA assay Kit (GE Healthcare)で定量した。

-80℃保存した抽出物（タンパク質150μg量）をLaemmli法に従い、4-20%, 2-D gradient gel (TEFCO)中で分離した。ニトロセルロース膜 (0.22μ, S&S)に転写後、3mmの短冊状に切断した膜と国内・国外の26名の魚アレルギー患者血清(1:4)との反応をコニカイムノステインによる化学発色により検出した。

(ii) 2次元電気泳動によるアレルゲノーム解析

-80℃保存した抽出物を、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare)にて脱塩・脱脂した後、Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) 125μl に再溶解し2次元サンプルとした。1次元目には2次元サンプルを終夜膨潤させた Immobiline Drystrip pH3-10NL, 7cm (GE Healthcare) を用い、IPG Phor (GE Healthcare) により等電点電気泳動を行った。泳動は300Vで30分、1000Vで30分、5000Vで3-4時間、最終的に12000VHrs以上となるよう、20℃下で行った。1次元目電気泳動終了後のDrystripを平衡化バッファー [50mM Tris-HCl (pH8.8), 6M Urea, 30%(v/v) glycerol, 2%(w/v) SDS, 1%(w/v) DTT, adq BPB]中で10分間平衡化した後、10-20%, 2-D gradient gel (DRC)を用いて2次元目のSDS-PAGEを行った。

2次元展開したアマゴ抽出サンプルをPVDF膜 (0.22μ, BIO-RAD)に転写後、Cy5溶液中で全タンパク質を蛍光染色した。同じ膜を魚アレルギー患者血清 (1:10)と反応させ、ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)を用いて患者のもつ特異的IgE抗体と反応するスポットをTyphoon9400 (Amersham) により検出した。

アマゴ抽出サンプル (100μg protein)を2次元展開したゲルをCBB染色し、魚アレルギー患者血清と反応するスポットを切り出した。ゲルの脱色・乾燥後、還元・アルキル化によりカルボキシメチル化を行った。乾燥させたゲル片をTrypsin Gold-Mass Spec Grade (Promega)溶液 (20μg/ml Trypsin, 25mM重炭酸アンモニウム, 0.1% N-Octyl-glucoside)で膨潤し、37℃で終夜インキュベートしてゲル内消

化を行った。ゲルからペプチドを回収し乾燥後、0.1%ギ酸に溶解してマスマスペクトメトリー解析に用いた。

(iii) nanoLC/ESI-ITMS, MS/MSおよびデータベース検索

液体クロマトグラフィーはnanoFrontier nLC (日立ハイテクノロジーズ、東京)を使用し、カラムはモノリスカラム (MonoCap Fast-Flow, 3μ, 0.075×150mm)を用いた。溶離液は、2%アセトニトリルを含む0.1%ギ酸溶液 (A溶媒) および90%アセトニトリルを含む0.1%ギ酸溶液 (B溶媒) を使用した。ゲルから抽出したタンパク質のトリプシン消化物 (0.1%ギ酸溶液) を流速200nl、2-60%B緩衝液 (60分) のグラジュエント条件で溶出した。

質量分析はナノエレクトロスプレー (nanoESI)イオン源 (AMR, 東京) を接続したイオントラップ型質量分析装置 (LTQ, ThermoElectron, CA, USA)で行った。測定はポジティブイオンモード (測定範囲:  $m/z$  400-2000) で行い、検出されたイオンに対してタンデムMS (MS/MS) を行った。キャピラリー温度は300℃、スプレー電圧は2ekVに設定した。MS/MSの衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) は35%に設定した。

タンパク同定は、NCBIデータベースおよび TurboSEQUENT 検索エンジン (ThermoElectron) を用いたデータベース検索により行った。

(iv) non-GMおよびGMアマゴ中のアレルゲンの質的量的変化の比較

魚の主要アレルゲンとして広く研究されているparvalbumin、同じく魚種を問わずアレルゲンとなり得るコラーゲン、本研究のアレルゲノーム解析によりアレルゲンとして同定されたglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のアマゴ中の発現量をnon-GMアマゴ、GMアマゴ間で比較した。発現量の比較にはウェスタンブロッティング法を用い、アマゴ抽出物をSDS-PAGEで分離後、転写した膜と各アレルゲンの特異的抗体を反応させ、WESTERN LIGHTING CHEMILUMINESCENCE REAGENT PLUS (Perkin Elmer)で化学発光反応を行った。特異的抗体には、Mouse anti-frog parvalbumin (Sigma), Rabbit anti-fish type1 collagen (NOVOTEC), Rabbit anti-human GAPDH (LabFrontier)をそれぞれ使用した。検出にはDianaIII (raytest)を用

い、検出されたバンドの濃度をScion Image (NIH) により定量した。

## (2) 食物アレルギー動物モデルの開発

(実験1) 実験には7週齢の雌性BALB/cマウスを用い、媒体対照(LL)、非遺伝子組換えアマゴ(AM)、遺伝子組換えアマゴ(GAM)、陰性対照としてペプシン(PEP)および陽性対照としてオブアルブミン(OVA)投与群を6匹/群で設定した。いずれの群もそれぞれの蛋白質1mg/匹をリノール酸/大豆レシチン混合液4:1(LL)を媒体として2回/週の頻度で経口投与し、同時にサリチル酸ナトリウム(SA)0.3mg/匹を経口投与して3週間感作した。感作3週間後に水系溶媒(0.05N NaOH加PBS)を用いて蛋白質4mg/匹の割合で経口投与して1回目の惹起、その2週間後にリノール酸/卵レシチン混合液を媒体として各蛋白質を6mg/匹の割合で経口投与して2回目の経口惹起を行った。惹起時にはアナフィラキシー症状の有無を観察してアレルギーの成立を確認した。2回目の経口惹起の1週間後に採血し、血清中の抗原特異的IgG1抗体をイムノブロッティングで確認した。

(実験2) 7週齢の雌性BALB/cマウスを用い、生理食塩液を媒体としたOVA群(OVA/S)、リノール酸/レシチン混合液(LL)を媒体としたOVA群(OVA/LL)、SAを併用したOVA/S群(SA/OVA/S)およびOVA/LL群

(SA/OVA/LL)を6匹/群で設定した。加えてSA併用PEP投与群(SA/PEP/LL)を設定した。いずれの群も蛋白質は1mg/匹、SA併用群には加えてSA0.3mg/匹を経口投与した。投与16時間後にパイエル板を採取して免疫系細胞のポピュレーションをフローサイトメーターで調べた。また、ウェルあたり $2 \times 10^5$ 個の細胞を抗原の非存在下および存在下で7日間培養し、培養後の細胞増殖活性をBrdUの取り込みで、上清中のIFN- $\gamma$ 、IL-4濃度をELISAでそれぞれ測定した。脾臓細胞の反応を全身性免疫の指標として腸管免疫の対照に置き、各群のパイエル板細胞のポピュレーションや反応性を比較した。さらに、無処置マウスにおけるパイエル板細胞の反応性を確認した。

## (3) アレルゲン予測の解析法

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討-アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討

遺伝子組み換え技術により導入された新規

導入タンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクス的手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、以下、アレルゲンであるということがはっきりしているタンパク質とアレルゲンではないことがはっきりしているタンパク質のデータを比較し、ユニークなアミノ酸セグメントのセットを抽出し、それを用いてアレルゲンの予測のアルゴリズムを開発するための方法を検討した。

バイオインフォマティクス的手法では、大量かつ質の高いデータセットを用意し、それに基づいて分類・予測のアルゴリズムを開発するのが普通である。しかし、アレルゲンの予測法を開発しようとする、いくつかの非常に難しい問題に直面する。第1に、エピトープ配列が分かっているアレルゲンのデータは非常に少なく、立体構造がわかっているものはさらに少ない。第2に、アレルゲンタンパク質と非アレルゲンタンパク質については、かなりの数知られているので、そこからアレルゲンに特異的な配列を探索することはできそうに見える。しかし、普通の文字の検索では単純なモチーフがなかなか見つからないのが現状である。第3に、アレルゲンと結合する抗体が物性的に同じような性質を持っていれば予測の方針も考えやすいが、現実には疎水性セグメントと結合するものから、親水的なセグメントに結合するものまで、大きなバラエティがあるということが問題をさらに難しくしている。これらの問題を解決するために、本研究ではデータの準備の段階から工夫することを考えた。

エピトープは分かっているアレルゲンであることが分かっているタンパク質を663個、アレルゲンでないことが分かっているタンパク質539個を用意して、ユニークな断片を見つける。アレルゲンの場合は、タンパク質の表面にある構造を認識していると考えられていて、必ずしも一つながりのアミノ酸断片がエピトープとなっているとは限らない。つまり、2つ以上の断片の組み合わせとしてユニークな断片を考えることも必要がある。ここでは、3~6残基のユニークな断片(アレルゲンデータにしか見られない配列)とやはり3~6残基の共通断片(アレルゲンと非アレルゲンのタンパク質に共通に見られる断片)についてデータセットを用意する。そして、1つのタンパク質の中にそれらのペアが

同時に5回以上見られるものをすべて列挙し、それをユニークな断片ペアとした(ただし、共通断片同士のペアは許さない)。

(ii) 新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の構築について

データは原則としてすべて2006年7月の時点で収集・解析した。なお、エピトープ情報については、2005年9月現在のデータを入力した。ADFSではアレルゲンに関するデータはSDAP<sup>2)</sup> (Structural Database of Allergenic Proteins)、List of Allergens in Swiss-Prot<sup>3)</sup>、IUIS<sup>4)</sup> (Allergen Nomenclature)、BIFS<sup>5)</sup> (The Biotechnology Information for Food Safety Database)等既存データベースより収集している。これらについてはweb公開後、個々の既存データベースがアップデートされたのに伴って、本データベースも新しい情報を取り込む作業を行った。ADFSの特徴であるIgEエピトープ配列情報は既存データベースのうちSDAPにのみ掲載されているが、既知エピトープ配列との相同性検索ツールを充実したものとするためにはさらにエピトープ情報を拡充する必要があった。情報源は1次資料(論文)を集めて抽出する方法しかないためEntrez PubMedによる論文の検索、収集、査読を行った。

ADFS公開当初のデータはSDAPのエピトープデータ(2002年アップデート分まで)を利用し、それ以後2004年3月までに発表された論文のみCTC-LSで収集・査読し、エピトープ配列情報を拾い出す作業を行なった結果得られたものである。論文収集は、下記に示す11のキーワードによりEntrez PubMed内を検索し、エピトープ情報を含む文献を抽出するという方法を用い、22報分のデータをADFSに収録した。

(IgE-Binding, Epitope, Identification, Immunoglobulin E, Epitope Mapping, Sequence, Analysis, Peptide, Recognition, IgE-epitopes, Linear)

その後、2度にわたり(2005年3月、2005年7月)、同様の方法で論文を検索し、合わせて15報分のデータを追加した。

さらに、2005年9月、立体的エピトープのマッピングデータの発表されているアレルゲンについてはADFSからそれらの論文へリンクできるようにする作業をおこなった。その過程で、配列型エピトープについてもかなり

記載漏れが見つかり、立体的エピトープの論文と合わせて2002年以前の配列型エピトープデータについても収集・査読作業を行なった。立体的エピトープについては上記11のキーワードのうち1次配列を示す単語の替わりに conformational or structural or discontinuous or three-dimensionalを用いた。ヒットした論文のPubMed IDを取り出し、重複および記載済みの情報を差し引くと、138報の論文が抽出され、それらの要旨、本文等を査読した。その結果、立体的エピトープの情報を取り込む論文17報、未収録の配列型エピトープ情報を追加する論文27報分のデータをADFSに収録することとし、アップデート作業を行った。今年度、2006年6月のエピトープ検索においては、新たにmimotopeを用いたエピトープ解析によるエピトープ情報を記載している論文も抽出するため、以下に示す語を検索に用いるキーワードに追加することとした。

[mimotope, bacteriophages, phage, display]  
前回更新時(2005年9月)以降に発表された論文を検索した。2006年6月時点で、新たなエピトープの情報を報告する論文7報分のデータをADFSに追加収録した。現在、ADFSに収録されているアレルゲン数は1366であり、その内、配列型エピトープ情報の付加されているアレルゲン数は82である。

各アレルゲンのアノテーション情報(動物種・一般名・注釈等)はSDAP - Structural Database of Allergenic Proteins<sup>21)</sup>から収集し、同サイトが提供する「Source」属性を、8種のカテゴリ(花粉・ダニ・動物・カビ・昆虫・食物・ラテックス・その他)に再編成した。

データベースの作成には、Solaris9プラットフォームにおいてMySQL(Ver. 4.0)を用いた。アミノ酸配列に基づくアレルゲンタンパク質の検索(Protein Search)にはprotein-protein BLAST(blatp; Ver. 2.2.10)を、エピトープ配列内の検索(Epitope Search)にはBLAST Search for short, nearly exact matchesを用いた。FAO/WHOが提唱<sup>6)</sup>するタンパク質のアレルゲン性予測法は、Hilemanらの方法<sup>7)</sup>を一部改変したものをを用いた。すなわち、FASTAアラインメントプログラム(Ver. 33t08d4)によりクエリ(問い合わせ)タンパク質の全長を既知アレルゲンと比較し、結果アラインメント中のoverlapアミノ酸長(およびその一致率)と連続一致アミノ酸長

をそれぞれ異なる閾値で判定するというものである。Stadler らの motif-based 法<sup>8)</sup>では、既知のアレルゲン配列から MEME を用いてモチーフを抽出し、プロファイルを作成する。抽出されたプロファイルに適合しないアレルゲンについてはシーケンスとして別に抽出する。そのプロファイルとシーケンスをもとに、未知アミノ酸配列に関してアレルゲン性を予測する方法である。Stadler らの発表当時(2003年)には、52のモチーフと135のシーケンスが抽出されており、精度95.5%でクエリ蛋白質がアレルゲンであることを予測できるとされた。既知アレルゲンが追加されているため、この数は変動し、本研究では2006年9月で、71のモチーフと250のシーケンスが得られている。

### C. 研究結果および考察

(1) 成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごを用いたアレルゲン性試験

(i) 魚アレルギー患者血清と non-GM および GM アマゴ抽出物との反応性の比較

遺伝子組換え、非組換えのアマゴ可食部1.5gあたり約90mgのタンパク質が得られた。この抽出タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBBで染色したパターンを図1に示す。遺伝子組換え、非組換え魚間でタンパク質のパターンに顕著な差は見られなかったものの、組換え魚(GM)では非組換え魚(non-GM)に比べ、27kD、60kD付近のタンパク質の割合がやや増加し、18kD付近のタンパク質の割合はやや減少していた。

non-GM および GM アマゴ(サケ科)の粗抽出タンパク質をSDS-PAGEで分離し、魚アレルギー患者血清との反応性をイムノブロットにより評価した結果、non-GM と GM について、患者血清との反応性に大きな違いは見られなかった(図2)。実験に使用した魚アレルギー患者血清の情報は、表1にまとめた。アマゴ抽出タンパク質のうち、魚アレルギー患者血清と強く反応したものは、41kD (Serum4,20)、60-90kD (Serum19,23)、140kD 以上 (Serum3,14,19,23,24)と、一般的な魚アレルゲン parvalbumin よりも高分子量側にみられた。

(ii) 2次元電気泳動によるアレルゲノーム解析

実験1でアマゴ抽出物と強い反応を示した患者血清4をアレルゲノーム解析に用いた。non-GM および GM アマゴ抽出サンプルを2次元展開し、転写した膜をCy5 (総タンパク質)

およびECL (血清中特異的IgE)により2重染色を行い、アマゴ抽出物中アレルゲンのスポットを検出した(図3a)。実験1で強い反応を示した41kDタンパク質は、スポットではなくスメア状のパターンを示した。このようにスメア状のパターンを示す要因として、タンパク質が何らかの翻訳後修飾を受けていることが考えられる。その他、1次元では確認できなかった12kDおよび26kDのスポットも、患者血清中のIgEと反応することが確認された。GMアマゴの抽出物についても同様に12kD、26kD、41kDのスポットが得られた(図3b)。

そこで、この3つのスポットをゲルから切り出し、トリプシン処理によりゲル内消化したペプチド断片をマスマスペクトロメトリーにより解析し、タンパク質を同定した。12kD、26kD および 41kD タンパク質はそれぞれ、parvalbumin、triose-phosphate isomerase (TPI)、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)であると決定された。このうちTPIとGAPDHについては、現在のところアレルゲンとしての報告が少なく、エピトープの決定などさらなるアレルゲンとしての研究が望まれる。現在、スメア状のパターンを示す41kDタンパク質の塩基性側についても、MS解析および同定を行い、翻訳後修飾の1つである糖鎖修飾がGAPDHのアレルゲン性に与える影響について研究を進めている。

(iii). non-GM および GM アマゴ中のアレルゲンの質的量的変化の比較

アマゴのアレルゲンとして同定された parvalbumin、GAPDH、さらに高分子量の魚アレルゲンとして報告されているコラーゲンについて、non-GM、GMアマゴ抽出物中の発現量変化を検討した。

それぞれのアレルゲン特異的抗体を用いたウェスタンブロットの結果、parvalbumin (12kD)については、GMではnon-GM (1year)に比べ、発現量が減少しており、non-GM (2year)と比較すると、ほぼ同程度の発現がみられた(図4a)。

コラーゲンに関しては、non-GM、GM共に個体差があるものの、群全体の平均でみると発現量に有意差はなかった(図4b)。

ウサギ抗ヒトGAPDH抗体を用いた結果、35kD付近に強いバンドがみられ、45kD付近にもやや弱いバンドが見られた(図4c)。35kD付近のバンドを定量した結果、GM (1year)はnon-GM (1year)に比べGAPDH発現量が増加し