

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Toyota, A., Akiyama, H., Sugimura, M., Watanabe, T., Sakata, K., Shiramasa, Y., Kitta, K., Hino, A., Esaka, M., Maitani, T.: Quantification of Genetically Modified Soybeans Using a Combination of a Capillary-Type Real-Time PCR System and a Plasmid Reference Standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**: 821-827 (2006)
- 2) Watanabe, T., Tokishita, S., Spiegelhalter, F., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Rieko Matsuda, Akiyama, H., Maitani, T.: Development and Evaluation of Event-specific Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Bt10 Maize. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(4): 1274-1279 (2007)
- 3) Nakayama, T., Kurosawa, Y., Furui, S., Kerman, K., Kobayashi, M., Rao, S.R., Yonezawa, Y., Nakano, K., Hino, A., Yamanura, S., Takamura, Y., Tamiya, E.: Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow PCR applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**: 1327-33 (2006)
- 4) Corbisier, P.H., Broothaerts, W., Gioria, S., Schimmel, H., Burns, M., Baoutina, A., Emslie, K.R., Furui, S., Kurosawa, Y., Holden, M., Kim, H.-H., Lee, Y.-M., Kawasaki, M., Sin, D., 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. Agric. Food Chem.*, **55**(9): 3249-57 (2007)
- 5) Akiyama, H., Watanabe, T., Kikuchi, H., Sakata, K., Tokishita, S., Hayashi, H., Hino, A., Teshima, R., Sawada, J., Maitani, T.: A Detection Method of CryIAc 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., Maitani, T.: Detection Method of Genetically Modified Papaya using duplex PCR. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**: 146-150 (2006)
- 7) Toyota, A., Akiyama, H., Sugimura, M., Watanabe, T., Sakata, K., Shiramasa, Y., Kitta, K., Hino, A., Esaka, M., Maitani, T.: Rapid Quantification Methods for Genetically Modified Maize Contents Using Genomic DNAs Pretreated by Sonication and Restriction Endonuclease Digestion for a Capillary-Type Real-Time PCR System with a Plasmid Reference Standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**: 2965-2973 (2007)
- 8) Akiyama, H., Sasaki, N., Sakata, K., Ohmori, K., Toyota, A., Kikuchi, Y., Watanabe, T., Furui, S., Kitta, K., Maitani, T.: Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 5942-5947 (2007)
- 9) Ohmori, K., Tsuchiya, H., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Yamada, T., Hirayama, K., Satoh, S.A.: DNA Extraction Method using Silica-base Resin Type Kit for the Detection of Genetically Modified Papaya. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **49**(2): 63-9 (2008)
- 10) Oguchi, T., Onishi, M., Chikagawa, Y., Minegishi, Y., Kodama, T., Akiyama, H., Ohno, Y., Futo, S., Hino, A., Furui, S., Kitta, K.: Development of the event-specific quantitation method for GA21 maize which is a GM event without CaMV35S. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **49**(1): 16-22 (2008)
- 11) 渡邊敬浩, 白雅優子, 古井聡, 橋田和美, 岸恭孝, 穠山浩, 米谷民雄: 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LL rice)を対象とした検知, 技術の開発と評価. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **48**: 170-178 (2007)
- 12) Shimizu, E., Kato, H., Nakagawa, Y., Kodama, T., Futo, S., Minegishi, Y., Watanabe, T., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Hino, A., Kitta, K.: Development of Screening Method for Genetically Modified Soybean by Plasmid Based Quantitative-Competitive PCR. *J. Agric. Food Chem.*, **56**(14): 5521-7 (2008)
- 13) 大森清美, 土屋久世, 渡邊敬浩, 穠山浩, 米谷民雄, 山田利治, 伊藤伸一, 佐藤修二: トウモロコシ加工食品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いた DNA 抽出精製法の検討. *食品衛生学雑誌*, **49**(1): 45-50 (2008)
- 14) 渡邊敬浩, 笠間菊子, 菊地博之, 鈴木達也, 時下祥子, 坂田こずえ, 松木容彦, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換えトウモロコ

シ(Mon810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験. 食品衛生学雑誌, 47: 15-27 (2006)

- 15) Mano, J., Shigemitsu, N., Futo, S., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., Furui, S., Kitta, K.: Real-time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying unapproved genetically modified crops in Japan. *J. Agric. Food Chem.*, 57(1): 26-37 (2009)
  - 16) Harikai, N., Saito, S., Abe, M., Kondo, K., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Kinoshita, K.: A Real-Time PCR Method Using Capture Oligo-Immobilized PCR Tubes to Determine the Specific Gene for Soybean and Genetically Modified Soybean in Food Matrices. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72: 2953-2958 (2008)
  - 17) 穠山浩, 遺伝子組換え食品の検知法について ぶんせき(3) 140-143 (2009)
2. 学会発表
- 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, 穠山浩, 杉村光永, 渡邊敬浩, 坂田こずえ, 白政優子, 橋田和美, 菊池千恵子, 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」Watanabe, T., Akiyama, H., Hino, A., Maitani, T. (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, 橋田和美, 日野明寛, 松田りえ子, 穠山浩, 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) 120th 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., Hino, A. (2006.9)
  - 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, 穠山浩, 米谷民雄, 橋田和美, 日野明寛 (2006.10)
  - 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, 穠山浩, 米谷民雄, 日野明寛, 古井聡, 橋田和美 (2007.)
  - 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, 穠山浩, 米谷民雄 (2007.)
  - 9) 121st AOAC International Annual Meeting and Exposition 「A qualitative detection method for genetically modified alfalfa events J101 and J163」Furui, S., Nohda, M., Ishino, E., Mano, J., Kitta, K., Chikagawa, Y., Futo, S., Kodama, T., Minegishi, Y., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T. (2007.9)
  - 10) 日本農芸化学会 2008 年大会「多重リアルタイム PCR 法による遺伝子組換え(GM)トウモロコシ定量スクリーニング分析法の開発」小口太一, 大西真理, 峯岸恭孝, 笠原正輝, 児玉貴志, 穠山浩, 手島玲子, 布藤聡, 古井聡, 橋田和美 (2008.3)
  - 11) 日本農芸化学会 2008 年大会「多重化リガーゼ連鎖反応を利用した広範な遺伝子組換え農作物の検出技術開発」真野潤一, 小口太一, 穠山浩, 手島玲子, 日野明寛, 古井聡, 橋田和美 (2008.3)
  - 12) 日本農芸化学会中四国支部第 18 回講演会「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, 穠山浩, 杉村光永, 坂田こずえ, 古井聡, 橋田和美, 江坂宗春, 米谷民雄 (2007.5)
  - 13) 第 127 年会日本薬学会「ビーフンから安全性未審査の遺伝子組換え米の同定と検出」穠山浩, 佐々木伸大, 坂田こずえ, 大森清美, 豊田安基江, 菊池裕, 渡邊敬浩, 古井聡, 橋田和美, 米谷民雄 (2007.3)

- 14) 第 127 年会日本薬学会「三成分同時発光酵素イムノアッセイによる未承認遺伝子組換えババイヤ検知の検討」田中陽子, 伊藤克敏, 前田昌子, 五味恵子, 井上敏, 穠山浩, 荒川秀俊 (2007.3)
- 15) 第 127 年会日本薬学会「リアルタイム PCR データ解析用アプリケーション(GiMlet)の開発と遺伝子組換え食品定量分析への応用」渡邊敬浩, 松田りえ子, 橘田和美, 古井聡, 児玉貴史, 峯岸泰孝, 布藤聡, 穠山浩, 米谷民雄 (2007.3)
- 16) 第 13 回日本食品化学学会学術大会「加工食品における中国産の安全性未審査遺伝子組換え米の同定と検出法」穠山浩, 佐々木伸大, 坂田こずえ, 渡邊敬浩, 大森清美, 豊田安基江, 菊池裕, 古井聡, 橘田和美, 小関良宏, 米谷民雄 (2007.5)
- 17) 第 45 回全国衛生化学技術協議会年会「未承認 DAS59132 系統トウモロコシの定性検査法の多機関バリデーション」穠山浩, 坂田こずえ, 中村文美, 中島治, 近藤一成, 古井聡, 橘田和美, 手島玲子 (2008.11)
- 18) 1st global conference on GMO analysis 「Broad-range detection of genetically modified crops with using ligase chain reaction」Mano, J., Oguchi, T., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., Furui, S., Kitta, K. (2008.6)
- 19) 日本食品衛生学会第 96 回学術大会「中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象とした外部精度管理調査における試料作製の検討」井上雪乃, 笠間菊子, 鈴木達也, 大島赴夫, 穠山浩, 中島治, 手島玲子 (2008. 9)
- 20) 第 6 回食品安全フォーラム「遺伝子組換え食品の表示の現状と検査法」穠山浩 (2008.11)
- 21) 2009 年度日本農芸化学会「遺伝子組換え農作物網羅的検知手法リアルタイム PCR アレイの開発」真野潤一, 重光なつき, 布藤聡, 穠山浩, 手島玲子, 日野明寛, 古井聡, 橘田和美 (2009. 3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する調査研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

### 研究要旨

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) 栄養改変型遺伝子組換えコメ、また、遺伝子組換えアマゴおよび遺伝子組換えニワトリを用いてアレルゲンの抗体結合性を指標にしたアレルゲン性試験、(2) 食物アレルギー動物モデルを用いた組換え生物のアレルゲン性試験、(3) エピトープ情報を加味したパ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、(4) アレルゲンデータベース(ADFS)の更新の4項目について検討を行った。具体的には、(1) 組換えによるアレルゲンタンパク質の量的、質的変動をアレルゲン特異的抗体並びに食物アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。遺伝子組換えアマゴ、遺伝子組換えニワトリの筋肉及び栄養改変コメ抽出物のアレルゲン解析の結果、遺伝子組換え体と非組換え体において抗体との結合性に顕著な差は認められず、遺伝子組換えによってアレルゲン性が大きく異なる可能性は低いことが示された。

(2) 食物アレルギー動物モデル(BALB/cマウス)を用いた組換え生物の経口感作並びに経口惹起の研究においても、組換え体と非組換え体でアレルギー反応に關与する抗原特異的IgG1抗体産生及びアナフィラキシー症状に差がみられなかったことより、組換えによってアレルゲン性が大きく異なる可能性は低いことが示された。(3) エピトープ情報を加味したパ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では、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)のインデックスに加えタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)を考慮することが、エピトープ部位の予測に有用であることが示唆された。(4) 平成17年より衛研ホームページ上へ立ち上げを行ったエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新を3年続けて行った。3年間で文献検索より得られたエピトープ既知のアレルゲン33種を新たにADFSに搭載し、平成21年3月時点で、搭載されているアレルゲン数1339本、エピトープ既知のアレルゲン数76種となった。平成18年度は、コンフォメーションエピトープの追加、平成19年度は糖鎖情報の追加、平成20年度は、ADFSのアレルゲンデータをピュアレビューを経たAOLのデータに原則統合する作業並びにタンパク質の相同性検索ツールのMotif-based法の信頼性の調査研究を行った。

### 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)  
近藤康人(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(TFFBT)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、2003年7月にコーデックス総会で採択された「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」<sup>1)</sup>

[ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03\\_34e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03_34e.pdf)

で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付されている。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同一性の比較、(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の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。また、国内においては、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)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、TFFBT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。なお、2007年9月の第7回タスクフォース会合において、上記ガイドラインは、step5/8に進められ、タスクフォースでの合意が得られ、2008年の第31回コーデックス総会で、最終的な合意が得られた。また、米国FDAでは、2009年1月遺伝子組換え(GE)動物の規制に関するガイドラインを作成し公表した。このような状況を踏まえ、今後とも、栄養改変した遺伝子組換え作物、遺伝子組換え動物の開発は更に進んでゆくことが予想される。

本分担研究では、いわゆる第二世代に属する栄養改変した組換え生物のアレルギーの評価方法を検討するため、遺伝子組換えモデル生物を

用いてデータの蓄積を行うと共に、評価法の整備・開発を行うことを目的として、

(1)アレルゲンの抗体結合性を指標にした量的、質的変動の解析予測の解析法の検討、(2)動物を用いる遺伝子組換え体のアレルゲン性の検討、(3)アレルゲン性予測の解析法の検討、(4)新規統合型アレルゲンデータベース(ADFS)の更新の4点をとりあげ、研究を進めた。

## B. 研究方法

### (1) 遺伝子組換え生物中アレルゲンの抗体結合性を指標にした量的・質的変動の解析<試料>

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所稲遺伝子技術研究チームより供与された遺伝子組換えイネの種子と比較対照用原種として日本晴の種子、農水省水産総合研究センターより供与された遺伝子組換えアマゴと1齢と2齢の非遺伝子組換えアマゴ、および広島大学大学院生物圏科学研究科堀内浩幸助教より供与された遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリより摘出された筋肉を材料として用いた。

#### <方法>

(i)アマゴからのタンパク抽出と抗体を用いたアレルゲン解析

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150ug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(0.22μm, 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。

2次元電気泳動でタンパク質を分離する場合は、以下の方法で行った。-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(0.22 $\mu$ m, 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(100 $\mu$ g 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(20 $\mu$ g/ml Trypsin, 25mM 重炭酸アンモニウム, 0.1% N-Octyl-glucoside)で膨潤し、37 $^{\circ}$ C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ペクトロメトリー解析に用いた。

LC-MSによるタンパクの同定は、以下の方法で行った。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, 3 $\mu$ m, 0.075 $\times$ 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 $^{\circ}$ C、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。

(ii)イネからのタンパク抽出と抗体を用いたアレルギー解析

Non-GM及びGM riceの玄米10粒をMulti-Beads Shocker用破砕チューブ(Cat. No. ST-0350F-0, 安井器械株式会社)に破砕用マグネット1個と共に入れ、Multi-Beads Shocker(安井器械株式会社)を用い、室温にて2,500rpm, 1分

間振動することにより粉末状に破砕した。破砕後の粉末はProtease Inhibitor Cocktail(SIGMA)を含む3mL 1M NaClに懸濁後、Micro Tube Mixer(MT-360, TOMY)で4 $^{\circ}$ Cにて一晩攪拌した。攪拌後のサンプルは10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30分間遠心し、上清を得た。この上清を再度10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30分間遠心し、上清を得た。こうして得た塩可溶性タンパク質抽出物は、BCA Assay Kit(GE Healthcare)によりタンパク質量を定量し、SDS-PAGEにて泳動パターンを比較後、使用するまで-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。

1D-PAGEによる患者血清中IgE抗体との結合は、以下の方法で確認した。-80 $^{\circ}$ Cにて保存したnon-GM及びGM rice抽出物150 $\mu$ gをLaemmli法に従って5-20%、2-D gradient gel(DRC)中で200V, 20分間分離した。分離したゲルはニトロセルロース膜(0.22 $\mu$ m, S&S)に38mA, 16時間の条件で転写した。転写後の膜は0.5% casein-PBSでブロッキング後、3.5mm幅の短冊状に切断し、国内外の27名の米特異的IgE抗体価陽性を示す患者血清(1:4)と反応させ、HRP標識二次抗体と反応後、Konica Immunostain HRP-1000(Konica)による化学発色により検出した。また、既知のアレルゲンであるRAG2及びGlyoxalase Iの定量は、それぞれに対する特異的抗体(独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所より提供、共にポリクローナル抗体)を用い、non-GM及びGM riceにおけるこれらアレルゲンの発現量を確認した。-80 $^{\circ}$ Cにて保存したnon-GM及びGM rice抽出物10 $\mu$ gをLaemmli法に従って15% gel(DRC)中で200V, 20分間分離後、ポリビニリリデンジフルオライド(PVDF)膜(BIO-RAD)に転写し、Rabbit抗RAG2抗体(1:10,000)またはRabbit抗Glyoxalase I抗体(1:2,500)と反応させ、Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus(Perkin Elmer)で化学発光反応を行った。検出にはDianaIII(Raytest)を用い、検出されたバンドの強度をScion Image(NIH)により定量した。

2D-PAGEによるアレルゲンと抗体との反応は、以下の実験方法にて行った。-80 $^{\circ}$ Cにて保存したnon-GM及びGM rice抽出物10 $\mu$ gを、2-D Clean-Up Kit(GE Healthcare)にて脱塩・精製した後、IPG Buffer(GE Healthcare)を含むDeStreak Rehydration Solution(GE Healthcare)に再溶解し二次元電気泳動用サンプルとした。一次元目には二次元電気泳動用サンプルを一晩20 $^{\circ}$ Cにて膨潤させたImmobiline Drystrip pH3-10, 7cm(GE Healthcare)を用い、IPGphor(GE Healthcare)により等電点電気泳動を行った。泳動条件は、300Vで30分(電圧変化パターンはStep-n-hold), 1000Vで30分(電圧変化パターンはGradient), 5000V

で1時間20分(電圧変化パターンはGradient), 5000Vで約4時間(電圧変化パターンはStep-n-hold)で、最終的に11,000~12,000Vhrsとなるよう、20°Cで行った。一次元目電気泳動終了後のDrystripを平衡化バッファ-A[50mM Tris-HCl (pH8.8), 6M Urea, 30%(v/v) glycerol, 2%(w/v) SDS, 1%(w/v) DTT, 少量のBPBを含む]中で室温にて15分間平衡化した後、平衡化バッファ-B[50mM Tris-HCl (pH8.8), 6M Urea, 30%(v/v) glycerol, 2%(w/v) SDS, 0.25%(w/v) Iodoacetamide, 少量のBPBを含む]中で室温にて15分間平衡化した。続いて二次元目として5-20% 2-D gradient gel (DRC)を用いたSDS-PAGEを行った。この二次元展開した米タンパク質サンプルをPVDF膜に転写後、Cy5で全タンパク質を蛍光標識した。さらに同じ膜をRabbit抗RAG2抗体(1:20,000)またはRabbit抗Glyoxalase I抗体(1:2,500)と反応させ、HRP標識二次抗体と反応後、ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)を用いた発光法により、Typhoon 9400 (GE Healthcare)を用いて検出した。

(iii)ニワトリ肉からのタンパク抽出と抗体を用いたアレルゲン解析

遺伝子組換え(GM)ニワトリには、EGFP遺伝子を組み込んだpCAGIpuroベクターをエレクトロポレーション法により導入したニワトリES細胞を受精卵胚に移植することにより作成した個体を用い、主には孵卵前後の雛の筋肉を解析に用いた。また、アレルゲン含量の比較用には、成体に成長したNon-GM, GMニワトリの筋肉も用いた。これらのニワトリはすべて、広島大学大学院生物圏科学研究科にて作製された。鶏肉1gに対し20mLのPBSを加え、Polytron (Kinematica)を用いて30秒破砕後、氷上で30秒静置を3回繰り返し、鶏肉中のタンパク質を抽出した。10000rpm, 10minの遠心で沈殿を取り除いた後、Dismic-45 (Advantec)にてフィルター濾過し、溶液中のタンパク質濃度をBCA assay Kit (Pierce, IL, USA)にて測定し、試料とした。試料は使用時まで-80°Cで保存した。

1D-PAGEによるアレルゲンと抗体との反応性は、以下の方法で確認した。鶏肉タンパク質(5.6ug/lane)を12.5%アクリルアミドゲル(DRC, Tokyo)中でSDS-PAGEにより分離した後、ニトロセルロース膜(BA83, S&S, Dassel, Germany)に電氣的に転写した(37mA, overnight)。転写膜を0.5% casein/PBS中に浸し、室温2時間ブロッキングを行った後、0.1% casein/PBSで1000倍希釈したRabbit anti-chicken serum albumin抗体(Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Netherlands)溶液中で室温1時間インキュベート

した。0.05% Tween 20/PBS溶液で室温10分の洗浄を3回行った後、2000倍希釈したHRP-conjugated anti-rabbit Ig抗体(GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK)溶液中で室温1時間インキュベートした。洗浄後の膜はWestern Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, USA)を用いてHRP化学発光反応を行った。検出されたバンドのdensityの測定は、Scion Image (NIH, Maryland)ソフトを用いて行った。

1D-PAGEによる患者血清と鶏肉タンパクの反応性は、以下の方法で行った。鶏肉特異的IgEに対するImmuno-CAPスコア3以上の患者5名の血清を用いた。Subject 1の血清は藤田保健衛生大学・宇理須博士より供与いただいた。Subject 2-5の血清はPlasma Lab. International (Washington, USA)より購入した。鶏肉タンパク質(3.75ug/lane)を10-20%アクリルアミドゲル(DRC, Tokyo)中でSDS-PAGEにより分離した後、ニトロセルロース膜(BA83, S&S, Dassel, Germany)に電氣的に転写した(37mA, overnight)。室温で2時間ブロッキングを行った転写膜を、0.1% casein/PBSで5倍希釈した患者血清溶液中で室温1時間インキュベートした後、4°Cで終夜インキュベートした。0.05% Tween 20/PBS溶液で室温10分の洗浄を3回行った後、1000倍希釈したHRP-conjugated anti-human IgE抗体(Nordic Immunological Laboratories)溶液中で室温1.5時間インキュベートした。洗浄後の膜はKonica Immunostain (Konica Minolta, Tokyo)を用いてHRP化学発色反応を行った。

2D-PAGEによるアレルゲンの分離と血清との結合性並びにIgE結合タンパクのMSによる同定は以下の方法で行った。鶏肉タンパク質(10ug)は2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK)を用いて脱塩・脱脂した後、Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) 125 μlに溶解し、Immobiline Drystrip (pH3-10 NL, 7 cm long, GE Healthcare)に終夜膨潤させた。1次元目の等電点電気泳動は、膨潤後のImmobiline DrystripをIPGphor isoelectric focusing system III (GE Healthcare)の説明書に従い20°C下で10kVhr以上となるよう行った。等電点電気泳動終了後のDrystripを1%(w/v) DTTを含む平衡化バッファ-A(50mM Tris-HCl [pH8.8], 6M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS, and a small amount of BPB)中で室温10分振とうして還元後、2.5%(w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファ-A中で室温10分振とうしてSH基の保護を行った。平衡化後のDrystripを10-20%アクリルアミドゲル(DRC, Tokyo)中でSDS-PAGEにより分離した後

(2 次元目)、PVDF 膜 (Immune-blot, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) に電氣的に転写した (37mA, overnight)。転写膜を Cy5 mono-reactive dye (GE Healthcare)/PBS 溶液中で室温 1 時間インキュベートし、全タンパク質を蛍光標識した。メタノールおよび 0.05% PBS-T でそれぞれ 3 回洗浄後、室温で 2 時間ブロッキングを行い、上述と同様に Rabbit anti-chicken serum albumin 抗体あるいは 10 倍希釈した患者血清とインキュベートした後、HRP 標識抗体と反応させた。HRP 化学反応は ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて行い、Typhoon9400 (Amersham Biosciences) を用いて Cy5 (633nm/670BP30) および ECL plus (457nm/520BP40) の蛍光を検出した。

IgE 結合タンパク質の同定のため、鶏肉タンパク質 (100 $\mu$ g) を上述と同様に 2 次元分離した後、アクリルアミドゲルを CBB 染色し、IgE 結合タンパク質に相当するスポットを切り出した。切り出したゲルは 30%アセトニトリル・25mM 重炭酸アンモニウム溶液中で脱色した後、50%アセトニトリル・25mM 重炭酸アンモニウム溶液で脱水し遠心濃縮機で乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (25 $\mu$ g/ml Trypsin Gold-Mass Spec Grade [Promega, Madison, Wisc., USA], 25mM bicarbonate ammonium, 0.1% [w/v] N-Octyl-glucoside) を加え、37 $^{\circ}$ C で 16 時間ゲル内消化を行った。50%アセトニトリル・1%トリフルオロ酢酸溶液を加えてゲルからトリプシン消化ペプチドを抽出し、遠心濃縮機で濃縮後、Zip-Tip C18 (Millipore cooperation, Billerica, MA) を用いて脱塩処理を行った。ペプチドは  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA, Sigma-Aldrich) と混合し、4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems, CA) により MS スペクトルおよび MS/MS フラグメントイオン質量を取得した。タンパク質同定のサーチエンジンには Mascot MS/MS ion search (Matrix Science Inc., MA) を用い、NCBI 内 タンパク質データベース内の相同性検索を行った。

## (2) 食物アレルギー動物モデル (BALB/c マウスを用いた組換え生物の経口感作並びに経口惹起試験)

### (i) アマゴ抽出物の経口感作試験

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卵アルブミン (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 1 mg/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) 0.3 mg/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 4 mg/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 6 mg/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 抗体をイムノプロットングで確認した。

### (ii) イネ抽出物の経口感作試験

実験には 7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (LL)、非組換え米 (NGR)、組換え米 (GMR)、陰性対照としてペプシン (PEP) および陽性対照として卵白アルブミン (OVA) 投与群を 6 匹/群で設定した。NGR および GMR 群は、1M 塩化ナトリウムと 0.1M 水酸化ナトリウムでの米抽出液を混合し、その液に等量のリノール酸/大豆レシチン混合液 4:1 (LL) を加え、乳化して用いた。LL、PEP および OVA 群の媒体は、0.09 M NaOH、0.1 M NaCl 水溶液 (米抽出液と同じ比率) を LL と等量混合、乳化して用いた。いずれの群も 2 回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質 0.5 mg/匹を 5 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に卵レシチンを用いた LL を溶媒とした各蛋白質 3 mg/匹の割合で経口投与して 1 回目の惹起、その 2 週間後に 4 mg/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 5 日後に採血し、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で測定し、感作の成立を確認した。

### (iii) ニワトリ肉抽出物の経口感作試験

実験には 7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (Vehicle)、非組換えとり肉 (NG)、組換えとり肉 (GM)、陰性対照としてペプシン (PEP) および陽性対照として卵白アルブミン (OVA) 投与群を 6~7 匹/群で設定した。非組換えあるいは組換えとり肉 1 g に対して 10 mL のリン酸緩衝生理食塩液を加えてホモジネートした後、4 $^{\circ}$ C 下 8400 g で 30 分間遠心分離した。上清をさらに 19000 g で 30 分間遠心分離した上清を限外ろ過膜で濃縮して得た抽出液に、等量のリノール酸/大豆レシチン混合液 4:1 (LL) を加えて乳化し、NG 群あるいは GM 群に用いた。Vehicle、PEP および OVA 群の媒体は、生理食塩液と LL の乳化液とした。いずれの群も 2 回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に各蛋白質 10 mg/0.4 mL LL/匹の割合で経口投与して惹起 (1 回目) した。さらに、2 週間後、卵レシチンを用いた LL を媒体として 10 mg/0.4



mL/匹の割合で経口投与して惹起(2回目)した。惹起後30分間に観察されるアナフィラキシー症状の強さにスコアをつけ、1匹のマウスが示した症状の最大スコアをその個体のスコアとした。各投与群間の差はMann-Whitneyの方法で検定した。また、2回目の経口惹起の6日後に採血し、血清中の抗原特異的IgG1抗体をELISAで測定した。

### (3) 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

新規に導入した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は非常に重要な課題である。アレルゲンであるタンパク質とアレルゲンでないタンパク質をアミノ酸配列から高精度に判別するには、3つの段階が必要である。第1に、判別システムを作るための質のよいデータセットを用意すること。第2に、アレルゲンのエピトープとなる配列の特徴をつかまえること。第3に、特徴を用いて予測のシステムを開発することである。

第1のデータセットの準備の手順について以下に記す。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。しかし、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とした。そこで3つのことを仮定して、データセットを準備した。

(1) アレルゲンとIgEとの結合部位は、複数の断片からなっている。(2)断片のうち少なくとも一つはアレルゲンに特有の断片である。(3)結合に関与する断片は、何回も出現する。

以上のことを満足する断片(3~8残基)をアレルゲンの蛋白質から抽出した結果、8696個の断片を得た。

第2に、アレルゲンのエピトープとなる配列の特徴をつかまえるために、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た。

第3のアレルゲンに特異的な配列(エピトープとは限らない)から、タンパク質の外側で結合に関与しそうな配列の特徴を抽出し、さらに高次の情報解析を行った。

### (4) アレルゲンデータベース(ADFS)の更新について

エピトープ情報に関しては、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った。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に収載した。

(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代わりに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、未収載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に収載することとし、アップデート作業を行った。平成18年の作業としては、平成18年6月のエピトープ検索において、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に追加収載した。

平成19年度の作業においては、平成19年9月現在のデータを入力した。平成20年度の作業においては、平成19年9月から平成20年8月までに新たに論文に発表されたアレルゲンおよびエピトープについて、NCBI PubMedを検索し、アレルゲン12種、エピトープ31種について情報を追加した。エピトープについては、タンパク質の糖鎖部分それぞれが生物活性のあるエピトープとして働く例がいくつか知られているため、平成20年度よりこの場合を他と区別し、「S」という記号を振つ

て分類した。

エビトープ以外の更新作業として、平成 19 年度には、タンパク質の相同性検索ツールに、position-specific iterated BLAST (PSI-BLAST) ツールを追加した。これは、通常の BLAST の検索結果をもとにモチーフを作成し、そのモチーフを元にさらに類似配列を検索するというモチーフ検索機能である。

さらに、平成 20 年度には、ADFS のアレルゲンデータセットをネブラスカ大学 AllergenOnline (AOL) のそれと比較し、ADFS のアレルゲンデータをピアレビューを経た AOL のデータに原則統合することとした。ADFS は UniProt データベースに基づく運用システムを採用しているが、今回データを参照する AOL は、アレルゲンシークエンスをすべて NCBI の gene identifier (gi) 番号により管理している。よって、AOL と ADFS のデータの比較・統合を行なうため、AOL の gi 番号を対応する UniProt ID へと変換した。UniProt に対応するエントリが存在しない場合は、RefSeq、GenPept、PDB 等のデータベースよりシークエンス情報を取得した。

アレルゲン情報はアレルゲン名とそのアミノ酸配列 (UniProt のアクセッション番号) によって整理され、同一名で同一シークエンスを持つものは基本的に一つのエントリにまとめられる。なお、この条件の中でも、エビトープ情報や立体構造情報等の有無に違いがある場合は、エントリを分けて表示している。IUIS が発行する正式なアレルゲン名 (イソアレルゲン名) が存在しない場合は、由来する生物の属と種の頭文字をそれぞれ 3 文字と 1 (または 2) 文字で表し、末尾に「?」を付した。

さらに、タンパク質の相同性検索ツールの Motif-based 法の有用性に関するバリデーションを行った。まず、新規に登録されたアレルゲンのアミノ酸配列を加味し、アレルゲンのモチーフ検索に用いるためのモチーフセットの再抽出を行なった。モチーフ抽出ツールは MEME を用いた。その際、アミノ酸残基数は 50、E-value は 0.01、モードは zoops を使用した。

また平成 20 年度は、ADFS が独自に提供しているアレルゲン性予測ツールである Motif-based 法による解析手法の信頼性について、下記の 3 通りの手法により評価を行なった。

①人工生成非アレルゲンデータセットを用いた評価: ADFS 収載アレルゲンのうち、アミノ酸残基数が 26 残基以上の 902 種を true allergen とし、この配列を、(A) 逆順に並べたもの、(B) window size 20 でシャッフルしたもの、(C) window size なしでシャッフルしたものの、の 3 つを true

non-allergen と定義した。これらのアレルゲンデータセットを対象に、BLAST E-value カットオフ値を様々に変えながら Motif-based 法によるアレルゲン性予測を行なった結果について、真陽性 (TP)、真陰性 (TN)、偽陽性 (FP) および偽陰性 (FN) を元に、次の式で定義される精度 (precision)、感度 (recall; 再現性)、および確度 (specificity) を算出した。

$$\text{Precision} = TP / (TP + FP)$$

$$\text{Recall} = TP / (TP + FN)$$

$$\text{Specificity} = TN / (TN + FP)$$

②10 分割交差試験法: 902 種のアレルゲンデータをランダムに 10 分割し、一つ一つのデータセットについて、残りの 9 個のデータセットを用いて抽出したモチーフとシークエンスにより試験を行なった。

③とうもろこしタンパク質のアレルゲン性: とうもろこしが発現するタンパク質をランダムに 50 種選び、FAO/WHO 法および Motif-based 法により解析を行った。

## C. 研究結果および D. 考察

### (1) 遺伝子組換え生物中アレルゲンの抗体結合性を指標にした量的・質的変動の解析

(i) アマゴからのタンパク抽出と抗体を用いたアレルゲン解析

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。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。

次いで、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プ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。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 (Serum 4, 20)、60-90kD (Serum 19, 23)、140kD 以上 (Serum 3, 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。

上記実験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 (2次元電気泳動後に患者血清と反応させることによるアレルゲンの網羅的解析) 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。1次元電気泳動後、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。

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)であると同定された。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た。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。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。

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。35kD付近のバンドを定量した結果、GM (1year)はnon-GM (1year)に比べGAPDH発現量が増加していたが、non-GM (2year)と同程度の発現量であった。したがって、成長ホルモン遺伝子導入に伴い、これらのアレルゲン発現量は増加しないか、増加量は自然に起こりうる範囲内であると考えられる。

以上より、成長ホルモン遺伝子導入によりアレルゲンは量的に顕著な増加を示さなかった。遺伝子組換えにより、アレルゲンが翻訳後修飾などの変化を受けると、アレルゲン性に影響を与える可能性がある。そこで次に、遺伝子組換えによるparvalbuminの質的变化を確認した。2次元展開したアマゴ抽出サンプルをCy5 (総タンパク質) およびECL (mouse anti-frog parvalbumin抗体) で2重染色した結果、non-GM、GMアマゴ共に分子量約12kD、pI4.5-5.1付近に、2つのスポットが検出された。non-GM (2year)およびGM (1year)では同様に、

non-GM (1year)に比べparvalbuminの発現量が減少していた。遺伝子組換え、非組換え魚間でparvalbuminのpIに大きな変化が見られなかったことから、成長ホルモン遺伝子導入によるparvalbuminの質的变化はほとんど無いものと考えられた

(ii) イネからのタンパク抽出と抗体を用いたアレルゲン解析

Non-GM 及び GM の玄米 10 粒から、それぞれ 3.2mg 及び 3.7mg のタンパク質抽出物が得られた。得られたタンパク質のパターンを、1 次元 SDS-PAGE により分離後、CBB 染色し確認したところ、Non-GM 及び GM 間で顕著な差は見られなかった。また、Non-GM 及び GM rice 抽出物と米特異的 IgE 抗体陽性を示す患者血清との反応性をウエスタンブロット法により調べたところ、両タンパク質抽出物間で、患者血清との反応パターンに大きな違いは見られなかった。さらにこの反応により、コメ主要アレルゲンとして知られている 14-16kDa タンパク質の他、24, 33 (Glyoxalase I)、50-60kDa などのコメアレルゲン候補を検出することができた。

次いで、Non-GM 及び GM rice 中における、既知アレルゲン RAG2 及び Glyoxalase I の発現量を、それぞれの特異的抗体を用いて検討した。その結果、Non-GM 及び GM rice 抽出物の 1 次元電気泳動において RAG2 及び Glyoxalase I の発現量に差は見られなかった。

さらに、遺伝子組換えによる RAG2 の質的变化を確認するため、2 次元電気泳動による Non-GM 及び GM rice 抽出物の泳動パターンの比較及び抗 RAG2 抗体との反応性を調べた。その結果、Non-GM 及び GM rice 抽出物間で、タンパク質の泳動パターンに顕著な差はみられなかった。また、RAG2 は Non-GM 及び GM 共に分子量 18kDa 付近、pI8 付近のスポットとして検出された。ことから、遺伝子組換えによる RAG2 の質的变化はほとんどないものと考えられた。Glyoxalase I についても同様の結果が得られた。

(iii) ニワトリ肉のタンパク抽出と抗体を用いたアレルゲン解析

Non-GM 及び GM ニワトリ筋肉 1g あたり約 15mg のタンパク質が得られた。この抽出タンパク質を 1 次元 SDS-PAGE で分離後、CBB で染色した。遺伝子組換え、非組換えニワトリ間でタンパク質のパターンはほぼ同様のパターンを示したものの、分子量 26kDa、30kDa、43kDa などのタンパク質に個体差が大きく現れた。

鶏肉の既知アレルゲン Chicken serum albumin (CSA) について、特異的抗体を用いた 1 次元電気泳動後の Western Blotting による Non-GM、

GM 鶏肉抽出物中の発現量変化の検討を行った。CSA の分子量 70kDa のバンドを定量したところ、GM では Non-GM に比べ、発現量の平均値は小さいものの、有意差はみられなかった。次に鶏肉抽出サンプルを 2 次元分離し、Cy5 (総タンパク質) および ECL (Rabbit anti-chicken serum albumin 抗体) で 2 重染色して既知アレルゲン CSA を検出した結果、Non-GM、GM 鶏肉共に分子量 70kDa、pI5-6 付近にスポットが検出された。Non-GM、GM 鶏肉間で CSA の pI に大きな変化が見られなかったことから、EGFP 遺伝子導入による CSA の質的变化はみられないものと考えられた。

CSA の他にも、未同定の鶏肉 IgE 結合タンパク質が報告されていることから、Non-GM および GM 鶏肉の抽出タンパク質を 1 次元 SDS-PAGE で分離し、5 名の鶏肉アレルギーをもつ患者血清との反応性をイムノブロットにより評価した。その結果、Non-GM・GM 共に個体差により反応性が大きく異なるものの、Non-GM と GM 群間では患者血清 IgE と結合するタンパク質の分子量に大きな違いは見られなかった。すべての鶏肉アレルギー患者血清中の IgE は、既知アレルゲン Chicken serum albumin (CSA) と分子量の等しい 70kDa タンパク質との結合が認められた。その他、鶏肉抽出タンパク質のうち鶏肉アレルギー患者血清 IgE と結合したタンパク質には、27kDa、34kDa (Subject 4)、36kDa (Subject 1, 3)、38kDa (Subject 1, 2, 3)、45kDa (Subject 1, 3)、80kDa (Subject 1, 2, 3)、250kDa (Subject 4) の分子量のものがあり、患者による個人差がみられた。

さらに CSA と同様に、Non-GM および GM 鶏肉抽出タンパク質を 2 次元電気泳動にて分離し、転写した膜の Cy5 (総タンパク質) および ECL (血清中特異的 IgE) による 2 重染色を行い、遺伝子組換えによる IgE 結合タンパク質の質的変動を検出した。Non-GM と GM 間では同様の IgE 結合タンパク質スポットパターンが検出され、顕著な量的あるいは pI の変化などの質的変動はみられなかった。

上記患者血清を用いた実験では、既知アレルゲン CSA の他に幾つかの分子量の異なる IgE 結合タンパク質が検出された。そこで、まだ同定されていない IgE 結合タンパク質スポットの同定を試みた。

2 次元電気泳動後、Cy5 および ECL による 2 重染色で抗体結合タンパクの位置を確認した。Subject 1 および 3 は 1 次元イムノブロットでほぼ同様のパターンを示したため、Subject 3 の血清を用いた。その結果、34kDa タンパク質はスミア状のパターンを示したが、その他のタンパク質はスポットとして検出された。

No. 1-8 のスポットをゲルから切り出し、ゲル

内トリプシン消化したペプチド断片の MS/MS 解析を行い、IgE 結合タンパク質を同定したところ、7 つのタンパク質が同定された。Ovomucoid は理論分子量 24kDa のタンパク質であるが、SDS-PAGE では糖鎖修飾のために高分子量側へシフトすることが知られている。Ovomucoid (Gal d 1) と Ovalbumin (Gal d 2)、Ovotransferrin (Gal d 3) は、鶏卵のアレルゲンとしてよく知られており、今回のニワトリの筋肉サンプル採取の過程で混入した可能性が考えられる。したがって、apolipoprotein A-I precursor (27kDa) が新規の鶏肉 IgE 結合タンパク質であることが示唆された。

## (2) 食物アレルギー動物モデル(BALB/cマウスを用いた組換え生物の経口感作並びに経口惹起試験)

### (i) アマゴ抽出物の経口感作試験

1 回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は陽性対照とした OVA 群でも 0.67 と低く、十分に感作が成立していなかった。2 回目の惹起時には OVA 群のスコア平均は 2.67 と上昇し、モデル系自体の感作が成立していることを認めた。AM (non-GM) 群のスコア平均 3.17 に対して GAM(GM)群のスコア平均は 0.83 であり、GAM 群のアナフィラキシー症状は AM 群より低かった。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体をイムノブロットで調べたところ、AM 群も GAM 群も各群 6 匹全てのマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出された。

以上、平成18年度は、動物モデルを用いて、遺伝子組換えおよび非組換えアマゴのアレルギー性を比較した。PBS抽出液中のアマゴ蛋白質は凍結および解凍によって沈殿したため、水酸化ナトリウム溶液を添加して懸濁した後、LLと混合した。溶媒対照、陰性対照PEPおよび陽性対照OVA群にも同量の水酸化ナトリウム溶液を加えることによって、各群の条件を統一した。2回目の惹起時には、PEPおよび溶媒対照群に対してOVA群のアナフィラキシー症状のスコア平均の上昇が認められ、この動物モデルで食物アレルギーが成立していることを確認した。GAM群のスコア平均はAM群より低く、PEPおよび溶媒対照群と同等であったが、これは蛋白質自体の溶解性が影響したものと考えられた。GAM試料はAM試料に比べて解凍時の不溶物が多く、水酸化ナトリウム溶液の添加時の懸濁度も強かった。惹起は大量の抗原を投与した後30分間の症状を観察するため、速やかに抗原が吸収される必要がある。GAM試料は不溶性部分が多かったため、動物への吸収が不十分であったと考えられた。動物モデルにおいてアレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体は、GAM群の全例に

検出されていたことから、GAM群も感作は成立していたと考えられた。血清中の抗原特異的IgG1抗体は、検出の頻度および抗体濃度にGAMとAM群の間に差は認められなかったことから、遺伝子組換えおよび非組換えアマゴのアレルギー性は同等であるとと考えられた。

#### (ii) イネ抽出物の経口感作試験

感作2週以降から各群に死亡する個体が観察された。1回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、陽性対照としたOVA群でも1.25と低く、十分にアレルギーが成立していなかった。2回目の惹起時にはLLおよびPEP群において吐き気や下痢が発症し、アレルギー反応を反映しない現象が観察された。血清中の抗原特異的IgG1抗体をイムノブロットングで調べたところ、NGR群は3/4例、GMR群は1/4例のマウスに抗原特異的IgG1抗体が検出された。今回、米からより多くの蛋白質を得るために、1M塩化ナトリウムおよび0.1M水酸化ナトリウムの抽出液を混合して用いた。米から抽出された蛋白質のアレルギー性は低く、週に2回の経口投与では感作が得られなかった。しかし、週に5回の投与では、媒体中に含まれる水酸化ナトリウムに起因すると考えられる作用によって、アレルギー反応が検出できなくなった。さらに、実験期間中にLL群1/6例、PEP群0/6例、NGR、GMRおよびOVA群でそれぞれ2/6例の動物が死亡した。なお、実験終了時に生存していたマウスを解剖し、病理学的検索を行ったが、死因に結びつく所見は得られなかった。抽出蛋白質の収量と抽出液の組成については、今後の検討課題であると考えられる。また、本モデルにおいてアレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体は、OVA群の全例およびNGR群の3/4例に検出されたことから、本実験においてマウスの感作は成立していたと考えられた。GMR群の抗原特異的IgG1抗体は、検出の頻度および抗体濃度がNGR群と同等以下であったことから、遺伝子組換え高トリプトファン米のアレルギー性は非組換え米と同等以下であると予想された。

#### (iii) ニワトリ抽出物の経口感作試験

2回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、Vehicle群0.14、陰性対照としたPEP群0.57に対して、陽性対照としたOVA群は2.86であり、OVA群のスコアは有意( $p < 0.01$ )に高く、本モデル系が成立していることを確認した。NG群とGM群のスコアはVehicle群に対して有意( $p < 0.01$ )に高く、いずれも感作が成立した。しかし、NG群とGM群のスコア平均はいずれも2.43であり、両群のスコアに統計学的に差を認めなかった(Fig.1)。血清中の抗原特異的IgG1抗体をELISAで調べたところ、NG群は5/7例、

GM群は4/7例のマウスに抗原特異的IgG1抗体が検出された。

以上、平成20年度は、動物モデルを用いて、遺伝子組換えとり肉および非組換えとり肉の食物アレルギー性を比較した。とり肉からは蛋白質濃度4.5~8.5 mg/mLの抽出液が得られ、抽出された蛋白質は週に2回の経口投与で十分な感作が得られる程度に食物アレルギー性が高かった。惹起によって引き起こされたアナフィラキシー症状の程度に差が認められないこと、抗原特異的IgG1抗体価検出の頻度および抗体価は同レベルであったことから、遺伝子組換えとり肉および非組換えとり肉の食物アレルギー性は同等であるとと考えられた。

### (3) 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

#### (a) アレルゲンに特有な断片周辺の配列

方法の項目で示した各断片の中心の周り前後10残基のアミノ酸分布を見たところ、いくつかのアミノ酸について特徴的な分布が見られた。各アミノ酸の強度を示したヒストグラムから、正の値を持ったアミノ酸は山形、負の値を持ったアミノ酸は上下反転した分布を持っており、ゼロのアミノ酸はこのような分布を持たないものである。実際はこの分布が一定の分布が重なっているが、特徴的な部分だけを抽出すると、山形の分布を示すアミノ酸は、A、G、D、E、Kであった。また、それと反転した分布のアミノ酸は、F、C、M、W、Y、P、Hであり、このような特徴を持たないアミノ酸は、I、V、L、T、Sであった。それぞれアミノ酸としても特徴的であるが、特に反転した分布で芳香族の大きな側鎖のすべてがここに分類されているのが注目すべきである。これらのアミノ酸の分布についての意味はまだ不明であるが、一種のインデックス(アレルゲンユニーク断片インデックス:AUFインデックス)として、各アミノ酸配列のプロットを作ることができた(ここではユニーク断片プロットと呼ぶことにする)。

AUFインデックスが高い領域では、アラニンやグリシンなどの高分子に柔軟性を与えるアミノ酸と、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどの電荷を持った非常に親水性の高い残基が中心に分布し、周辺には芳香族のアミノ酸などバルキーで主鎖の自由度を制限するようなアミノ酸が分布しているということである。アレルゲンに特有な断片は、土台の上にふらふらした親水性のセグメントをつけたような形のところとなっているらしく思われる。

#### (b) 立体構造の揺らぎとの相関

アレルゲンにユニークな断片インデックス

(AUF インデックス)をアミノ酸配列に対してプロットし、それとタンパク質立体構造の揺らぎを表現しているB因子のプロットと比較したものである。AはAUFインデックスのプロットにおけるピークである。また、Bは立体構造解析から得られるB因子のプロットで、単独の場合と抗体と結合した場合を比較して示している。CとDは、その立体構造である。結合部位の揺らぎが、複合体形成によって大きく抑えられていることが分かる。そして、揺らぎと関わるB因子のピークとAUFプロットのピークが良く相関していることも明らかである。このことから直接アレルゲン予測ができるわけではないが、アレルゲンになりえるアミノ酸配列の候補を列挙することができるのではないかと考えられる。またエピトープ部分の配列の特徴としては、アレルゲン単独で構造揺らぎの大きな部分がエピトープになっているのではないかと示唆する結果が得られた。

アレルゲンユニーク断片インデックス(AUFインデックス)のプロットのピークがどのような特徴を持っているかということについては、単に二次構造の端に近いところというだけではなく、立体構造の揺らぎが大きいところであるということが示唆された。このことは他のタンパク質との結合をしやすい配列として配列の動的構造が大事だという最近の考え方と合致している。また、抗体との結合部位がどのような性質を持っているかを、AUFプロット、疎水性プロットを組み合わせて解析してみると、AUFピークでも比較的親水的な部分がエピトープと一致していることが分かった。AUFピークの位置を二次構造の分布と比較してみると、AUFピークはおおむね二次構造の端に位置していることが分かる。つまり、タンパク質の外側に向いている部位でエピトープに相当する部分がAUFプロットを利用することによって予測できる可能性が示唆された。また、アレルゲンユニーク断片インデックス(AUFインデックス)のプロットのピークが、より一般的なタンパク質-タンパク質相互作用の問題でも、立体構造の揺らぎが大きいところであり、結合部の確率も高いということが分かってきた。更に詳細に検討をすることで、アレルゲン予測にもつなげてゆける可能性が示唆された。

#### (4) アレルゲンデータベース(ADFS)の更新について

平成18年度のADFS (<http://allergen.nih.gov.jp/ADFS/>)の更新としては以下の通りである。(1)平成17年度の32種に加え8種のアレルゲンに対してエピトープ情報を付加した。エピトープ情報はアレルゲンの交差反応性を予測する

上で極めて重要であるため、バイオテクノロジー応用食品に含まれる新規タンパク質等のアレルゲン性を評価する上で、ADFSは非常に重要な役割を果たすことができると思われる。(2)アレルゲン性予測に関しては、HilemanらのFAO/WHO法を改変し、高いパフォーマンスの予測を可能とした。FAO/WHOの方法と本法ではアミノ酸のウインドウに関する取扱いが異なるため、まれに結果が相違する場合がある。多くのタンパク質は分子内に機能的・構造的にまとまったドメイン構造を持つが、ドメインの大きさは様々であり、一概には決められない。FASTAアラインメントにより類似性の高い領域を自動的に抽出する本法は、ウインドウサイズを初めから80残基等に固定してアラインメントを行なうFAO/WHOの方法に比べ、より自然にドメイン構造等の類似性を調べられることが期待された。また、今回、6残基以上の連続一致を示す配列を検索するword matchの機能も新たに追加した。(3)より高いパフォーマンスのアレルゲン性予測手法として2003年に発表されたStadlerらによる方法に基づいて構築したMotif-based法に用いるデータのアップデートも行った。

平成19年度の更新作業は以下の通りである。(i)エピトープ情報は9種のアレルゲンについて線形及びコンフォメーションエピトープ情報を加えた。なお、このエピトープ情報には、ファージディスプレイ法を用いた仮想エピトープ配列(ミモトープ)の情報も含めることとした。(ii)各アレルゲンが糖鎖修飾を受けているかどうかについての情報を視覚的に容易に判別できるよう、メインウインドウに「Sugar」カラムを新たに追加した。これにより、ユーザは該当アレルゲンに糖鎖修飾があるのかどうかを容易に見分けることができるようになった。個々のアレルゲンの情報を記したEntry Viewウインドウでは、「Carbohydrate Information」の欄を設け、ここに修飾を受けるアミノ酸残基と糖鎖の種類を記した。また、今回キーワード検索機能を一部改訂し、検索対象を糖鎖修飾アレルゲンだけに絞り込むことが可能になった。これにより、たとえばタンパク質のあるドメイン情報(Pfam, InterPro)を持つアレルゲンを検索する際に、その中でも糖鎖があるもののみを表示する、などの作業が可能となった。(iii)キーワード検索の機能変更の一つとして、今回新たに複数の単語を引用符で囲むことにより一つのフレーズとして検索する機能を追加した。また、キーワードの語尾に冗長性を持たせるワイルドカード機能も追加した。これらにより、たとえば「cat」という単語で検索すると「cat」「cat flea」などがヒットする通常の検索機能の他、ワイルドカード機能を用いて「cat」と入力すると、

「cat」などの他に「cattle」「cathepsin」などの語がヒットするようになる。また、引用符で「"cat flea"」などと複数の単語を囲むと、「cat flea」のみをヒットさせることができる。これらの改善により、ADFS のアレルゲン検索機能は大幅に柔軟性を増したと考えられる。(iv)

PSI-BLAST の検索システムを新たに導入した。PSI-BLAST は、通常のアミノ酸配列のペアワイズ検索結果を基にモチーフを自動的に抽出し、2 サイクル目以降はそのモチーフによりデータベース内を検索し、分子進化の過程でよく保存された領域を検索、さらにモチーフを抽出し直して次のサイクルを繰り返すアルゴリズムである。ADFS の PSI-BLAST では最大 5 回までの繰り返し処理を実行させることができるが、途中で結果が収束してしまった場合は「CONVERGED!」という警告とともに何回目のサイクルで収束したかを示し、その時点での検索結果を表示させることにした。たとえば、ブラジルナッツのアレルゲン Ber e 2 のアミノ酸配列 (UniProt Q84ND2) をまず通常の BLAST (パラメータは初期値のまま) により検索すると 47 種のアレルゲンがヒットするが、同じ配列を PSI-BLAST により検索すると、4 サイクル目で結果が収束し、60 個のアレルゲンがヒットすることが分かる。この中には、ペアワイズ検索ではヒットしなかったピーナッツのメジャーアレルゲン Ara h 1 などが含まれている。Ara h 1 は vicillin とも呼ばれる 7S globulin で、11S globulin である Ber e 2 との間には一次配列上の相同性は全くない。しかし、両者はともに cupin スーパーファミリーと呼ばれる集団に属しており、種子貯蔵タンパク質として機能している。Cupin スーパーファミリー分子は特徴的な homo-hexamer 構造を取っており、分子進化の上では共通の祖先を持つ可能性が考えられる。すなわち、PSI-BLAST は、一次配列の相同性のみによっては知ることのできない、構造上・分子進化上の類似性を基に任意のクエリ配列に関連するアレルゲンを検索することができると思われる。

続いて、平成 20 年度の充進作業は、(i)エпитープ情報として、6 種のアレルゲンについて線形及びコンフォメーションエピトープ情報を加え、さらに 6 種の糖鎖自体がエピトープ活性を持つアレルゲンについても情報を加え、エピトープ既知のアレルゲンの数は 76 種となった。昨年同様、エピトープ情報を集積したアレルゲンデータベースとしては、現時点で世界最大の規模である。(ii)平成 19 年度の作業により、ADFS では、アレルゲンが糖鎖修飾を受けていることが UniProt の情報から判別できる場合はその修飾部位と糖鎖の種類に関する「Carbohydrate Information」を提

供するようになった。平成 20 年度はさらに、糖鎖自体が IgE と結合し、好塩基球からのヒスタミン遊離を起こす場合 (Ole e 1) や IL-4 産生を誘導する場合 (Phl p 1) などについて情報を追加した。多くの IgE 結合性糖鎖は生物活性を持たず、*in vitro* の臨床試験におけるバックグラウンドの上昇に寄与していることが知られている。しかし少なくとも一部のアレルゲンにおける糖鎖は上記のようにアレルギーの発症に関与すると考えられており、アレルゲンデータベースが糖鎖エピトープの情報を収載することは望ましいと考える。このようなアレルゲンデータベースは今のところ ADFS 以外に存在しない。(iii)Stadler らの理論に従って ADFS が独自に作成したアレルゲン性予測ツールである Motif-based 法の有効性を 3 種の方法により評価した。(a)人工生成非アレルゲンデータセットを用いた評価においては、902 本の真のアレルゲンアミノ酸配列と、その 3 倍量に当たる真の非アレルゲンアミノ酸配列とを用い、本ツールがどれだけ正しくアレルゲン性を予測できるかについて調べた。Motif-based 法では第一段階にクエリ配列とモチーフとの比較を行ない、第二段階では BLAST によるペアワイズ検索を行なう。そこで、BLAST のマトリクスやギャップペナルティなどの各種パラメータ、および E-value カットオフ値を様々に変化させ、最もパフォーマンスの優れた条件を探索したところ、マトリクスとして Blosum80、開始および伸張ギャップペナルティをそれぞれ 13 および 2、フィルタを True に設定した場合であった。パフォーマンスの優れていた条件のうち、Precision (%), Recall (%), Specificity (%) の合計が最大になる BLAST E-value カットオフ値は  $10^{-13}$  で、このときのそれぞれの値は 100.0%、99.4%、100.0%と、極めて良好であった。この結果を受け、本年度より ADFS の Motif-based アレルゲン性予測ツールにおける BLAST のパラメータ設定は上記の組み合わせを使用することとした。E-value カットオフ値のみはユーザが任意に変更できるが、これは後に述べる理由により  $10^{-3}$  を初期値とした。(b)上記の試験は、リファレンスとなるデータベース中にクエリアレルゲン配列自身が含まれていることになる。そこで、実際にアレルゲン性が未知のタンパク質を本法で解析した場合を再現するため、次に 10 分割交差試験を行なった。これは、合計 902 種のアレルゲン配列をアルファベット順に 10 分割し、一つ一つのデータセットについて、自分自身を含まない他の 9 つのデータセットを用いて生成したモチーフにより解析を行なう手法である。本試験においても最大のパフォーマンスを示す BLAST のパラメータ設定を使用した。各データセットに

より Precision (%), Recall (%), Specificity (%) の合計が最大になる BLAST E-value カットオフ値は  $10^{-15}$  から  $10^{-3}$  までの間で変化した。これは、シーケンスを 10 分割した際のデータセットのばらつきによるものと推測される。実際にユーザが解析するクエリ配列は多様であることから、最適な E-value カットオフ値を一つ設定することは困難であり、適切な値をユーザ自身が設定すべきであると考えられる。ADFS では、最大値である  $10^{-3}$  をもってカットオフ値の初期値とすることとした。分割交差試験の解析結果を平均すると、Precision 96.5%、Recall 85.5%、Specificity 98.9% となった。Stadler らが 2003 年に報告した時点では、同法の Precision および Recall はそれぞれ 94.8% および 86.2% であり、いわゆる FAO/WHO の方法ではそれぞれ 37.6~68.0% および 92.2~97.0% であった (Specificity は不明)。これらの数値から、ADFS の Motif-based 法によるアレルゲン性予測ツールの信頼性は Stadler の報告における結果とほぼ同程度で、FAO/WHO 法よりも精度の面で大きく上回っていることが分かる。(c) 実際の作物由来タンパク質のアレルゲン性を本法により調べるため、Hileman らが報告の中でランダムに抽出した 50 種類のとうもろこしタンパク質について、FAO/WHO 法と本法とを比較した。FAO/WHO 法においては、連続する 6 アミノ酸残基の完全一致をもって判定すると、50 種のタンパク質中 47 種がアレルゲンであると判断され、偽陽性が極めて多いということが分かる。これに対し Motif-based 法では、アレルゲンであることが既知であるタンパク質はすべて陽性判定を出していると同時に、クエリタンパク質自体のアレルゲン性は知られていないが他の生物種におけるアナログがアレルゲンであるような場合 (7S-globulin like GLB1-S) を正しく検出できていることが分かる。FAO/WHO 法は、遺伝子組み換え作物に新規に導入するタンパク質のアレルゲン性を予測する上では現在でも標準的な手法とされているが、その偽陽性の多さゆえに、批判も根強い。Stadler らが開発した Motif-based 法は FAO/WHO 法の欠点を大きく改善した有望な手法であり、それをウェブツールとして公開しているのは現在のところ ADFS のみである。しかし、ADFS の Motif-based 法のパフォーマンスを定量的に評価することはこれまで困難であった。今回、様々な角度から同法の評価を行ない、不十分であったパラメータ設定を改めるなどの作業を通じて、ADFS の Motif-based 法が Stadler らが報告したものと同程度かそれ以上のパフォーマンスを有していることが分かった。

## D. 結論

### (1) 抗体結合性を指標にしたアレルゲンの量的、質的変動の解析予測の解析法の検討

栄養改変型遺伝子組換えコメ、また、遺伝子組換えアマゴおよび遺伝子組換えニワトリを用いてアレルゲンの抗体結合性を指標にしたアレルゲン性試験を行ったが、遺伝子組換え体と非組換え体との間に抗体との結合性に顕著な差は認められず、遺伝子組換えによってアレルゲン性が大きく異なる可能性は低いことが示された。

### (2) 動物を用いる遺伝子組換え体のアレルゲン性の検討

食物アレルギー動物モデル(BALB/cマウス)を用いた組換え生物の経口感作並びに経口惹起の研究においても、組換え体と非組換え体でアレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体産生及びアナフィラキシー症状に差がみられなかったことより、組換えによってアレルゲン性が大きく異なる可能性は低いことが示された。

### (3) アレルゲン性予測の解析法の検討

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)のインデックスに加えタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)を考慮することが、エピトープ部位の予測に有用であることが示唆された。

### (4) 新規統合型アレルゲンデータベース(ADFS)の更新

平成17年より衛研ホームページ上へ立ち上げを行ったエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新を3年続けて行った。3年間で文献検索より得られたエピトープ既知のアレルゲン33種を新たにADFSに搭載し、平成21年3月時点で、搭載されているアレルゲン数1339本、エピトープ既知のアレルゲン数76種となった。平成18年度は、コンフォメーションエピトープの追加、平成19年度は糖鎖情報の追加、平成20年度は、ADFSのアレルゲンデータをピアレビューを経たAOLのデータに原則統合する作業並びにタンパク質の同源性検索ツールのMotif-based法の信頼性の調査研究を行い、良好な結果が得られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1). Takagi K., Teshima R., Nakajima O., Okunuki H., Sawada J., Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods: Regul. Toxicol. Pharmacol.44, 182-188 (2006)



- 2) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H., Maitani T. and Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W<sup>M</sup> Mice. *Allergol. International* 55: 43-48 (2006)
- 3) Nakajima O., Teshima R., Takagi K., Okunuki H., Sawada J., ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47, 90-95 (2007)
- 4) Koyano S., Takagi K., Teshima R., Sawada J., Molecular cloning of cDNA, recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16-kDa major allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 140, 73-81 (2006)
- 5) 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面善之、小島幸一、手島玲子：経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル、*秦野研究所年譜* 30, 9-16 (2007)
- 6) 手島玲子：遺伝子組換え農作物の食品としての安全性評価技術、*農林水産技術研究ジャーナル* 30(9), 22-27 (2007)
- 7) Satoh R., Koyano S., Takagi K., Nakamura R, Teshima R., Sawada J., Immunological Characterization and mutational analysis of the recombinant protein BwP16, a major allergen buckwheat. *Biol.Pharm. Bull.* 31, 1079-1085 (2008)
- 8) 手島玲子：遺伝子組換え食品、*食品衛生学雑誌* 49(4), J-269-J274 (2008)
- 9) 手島玲子, 西島正弘：遺伝子組換え食品の安全性評価, *食品衛生研究* 58(8), 51-56 (2008)
- 10) Nakamura R., Satoh R, Nakajima Y., Kawasaki N., Yamaguchi T., Sawada J., Nagoya H., Teshima R. Comparative Study of GH-Transgenic and Non-Transgenic Amago Salmon Allergenicity and Proteomic Analysis of Amago Salmon Allergens. (submitted)
- 11) Asakawa N, Sakiyama N, Teshima R, Mitaku S. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. *J Investigational Allergology Clinical Immunology*, submitted.
- 12) Kezuka Y., Itagaki T., Satoh R., Teshima R., Nonaka T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of major buckwheat allergen. submitted
- 3) 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：改訂版アレルギーデータベース ADFS(Allergen Database for Food Safety)について、*日本薬学会第127年会* (2007.3)
- 4) 中村里香、手島玲子、佐藤里絵、澤田純一、名古屋博之、遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルギー性について、*日本薬学会第127年会* (2007.3)
- 5) 中島治、手島玲子、高木加代子、奥貫晴代、澤田純一、組換え食品中の Cry1Ab と食物アレルギー患者血清との反応性評価の研究、*日本薬学会第127年会* (2007.3)
- 6) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、ソバアレルギー BwP16 の解析、*日本薬学会第127年会* (2007.3)
- 7) 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、澤田純一、オボムコイド(OVM)のマウス経口感作への油脂の影響について、*日本薬学会第127年会* (2007.3)
- 8) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、ソバ主要アレルギー BwP16 の解析、*日本分子生物学会2006フォーラム* (2006.12)
- 9) 手島玲子 児矢野聡 中村里香 中村亮介 佐藤里絵 高木加代子 澤田純一、そば 16kDa アレルギーの組換えタンパク質の調製と免疫学的特性の検討、第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2006.11)
- 10) 朝川直行、手島玲子、美宅成樹：アレルギータンパク質の頻出する配列領域の特徴、第7回日本蛋白質科学会年会(2007.5)
- 11) 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面喜之、小島幸一、手島玲子：経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(6)、第14回免疫毒性学会 (2007.9)
- 12) 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、佐藤雄嗣、穠山浩、澤田純一：食物アレルギー (オボムコイド) のマウス経口感作への油脂の影響について、第14回免疫毒性学会 (2007.9)
- 13) Teshima R., Nakamura R: Development of allergen database for food safety (ADFS), HESI new methods workshop (2007,10)
- 14) Teshima R.: GMO safety-assessment in Japan. International symposium on genetically modified organisms. (2007.10)
- 15) 中村里香、手島玲子、佐藤里絵、中島紫、川崎ナナ、山口照英、澤田純一、名古屋博之：GM 遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルギー性について、*日本生化学第80年会* (2007.12)
- 16) 中島治、児矢野聡、穠山浩、澤田純一、手島玲子：組換え食品中の Cry3Bb1 と食物アレルギー患者血清との反応性評価の研究、*日本薬学会第128年会* (2008.3)
- 17) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、リコンビナントソバアレルギー BwP16 の免疫科学的解析、*日本生化学第80年会* (2007.12)

## 2. 学会発表

- 1) 朝川直行、手島玲子、美宅成樹：アレルギータンパク質の頻出する配列領域の特徴、第7回日本蛋白質科学会年会(2007.5)
- 2) 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面喜之、小島幸一、手島玲子：経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(5)、第13回免疫毒性学会 (2006.9)

- 18)佐藤里絵、中村里香、小松晃、大島正弘、手島玲子：高トリプトファン含有遺伝子組換えイネ系統のアレルゲン性に関する研究、日本薬学会第 128 年会 (2008. 3)
- 19) Teshima R., Okunuki H., Nakamura R., Sawada J.: The effect of plant oil on oral sensitization of mice with ovomucoid., 13<sup>th</sup> International congress of mucosal immunology (2007.7)
- 20) Nakamura R., Nakamura R., Teshima R.:Allergen database/Introduction of ADFS, HESI novel protein safety evaluation workshop (2008.2)
- 21) Teshima R., Nakamura R., Sato R.; Analysis of allergens and allergenome/Fish, Rice, HESI novel protein safety evaluation workshop (2008.2)
- 22) 新藤智子、金澤由基子、小島幸一、手島玲子：腸管免疫を介したアレルギーマウスの食物アレルギーモデルの確立一、第 15 回免疫毒性学会 (2008.9)
- 23) 手島玲子:組換え植物の安全性評価の実際, 平成 20 年度日本植物細胞分子生物学会市民公開シンポジウム(2008.11)
- 24) 佐藤里絵、中村里香、小松晃、大島正弘、手島玲子：トリプトファン含量の高い遺伝子組換えイネのアレルゲン性の解析、日本生化学第 81 年会(2008. 12)
- 25)佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、澤田純一、手島玲子：ソバ主要アレルゲン BWp16 の解析、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会(2008.11)
- 26)中村亮介、酒井信夫、松岡英樹、秋山晴代、佐藤雄嗣、穂山浩、手島玲子：c-kit 欠損 W/W<sup>v</sup> マウスにおけるタンパク質の経口感作とその関連遺伝子、日本生化学第 81 年会(2008. 12)
- 27)中村里香、中村亮介、堀内浩幸、手島玲子：遺伝子組換え食品のアレルギー性評価法の確立、日本薬学会第 129 年会(2009. 3)
- 28)中村亮介、中村里香、手島玲子：アレルゲンデータベース ADFS のデータ改訂について、日本薬学会第 129 年会(2009. 3)
- 29)手島玲子：GM 作物の食品安全性評価の現状と課題、2009 年日本育種学会つくば大会シンポジウム(2009.3)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
吉川肇子	健康リスク・コミュニケーションの手引き	吉川肇子		ナカニシヤ出版		in press	
吉川肇子, 矢守克也, 杉浦淳吉	クロスロード・ネクスト: ゲームで学ぶリスク・コミュニケーション			ナカニシヤ出版		in press	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakayama T, Kurosawa Y, Furui S, Kerman K, Kobayashi M, Rao SR, Yonezawa Y, Nakano K, Hino A, Yamanura S, Takamura Y, and Tamiva E.	Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow PCR applications.	Anal. Bioanal. Chem.	385	1327-33	2006
Yamashita Y, Tategaki A, Ogawa M, Horiuchi H, Nishida K, Akita S, Matsuda H, and Furusawa S.	Effect of novel monoclonal antibodies on LIF-induced signaling in chicken blastodermal cells.	Dev. Comp. Immunol.	30	513-522	2006
Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S, and Amano F.	An anti-Salmonella antibody prevents the Salmonella enterica serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella.	Bioscience & Microflora.	25	117-119	2006
Takagi K, Teshima R, Nakajima O, Okunuki H, Sawada J.	Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	44	182-188	2006
Koyano S, Takagi K, Teshima R, Sawada J.	Molecular cloning of cDNA, recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16-kDa major allergen.	Int Arch Allergy Immunol.	54	73-81	2006
Horiuchi H, Furusawa S, and Matsuda H.	Maintenance of chicken embryonic stem cells in vitro.	Methods Mol. Biol.	329	17-34	2006
Toyota A, Akiyama H, Sugimura M, Watanabe T, Sakata K, Siramasa Y, Kitta K, Hino A, Esaka M, and Maitani T.	Quantification of 35S Promoter and MON810 Maize Construct- Specific Gene in Maize Using a Combination of a Capillary- Type Real- Time PCR System and a Plasmid Reference Standard.	Biosci. Biotech. Biochem.	70	2965-2973	2006
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 CryIAC Protein for Identifying Genetically Modified Rice using the Lateral Flow Test Assay.	J. Food Hyg. Soc. Japan.	47	111-114	2006
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
堀内浩幸, 山下裕輔, 西田憲正, 古澤修一, 松田治男	ニワトリにおける抗体エンジニアリングとトランスジェニックテクノロジー.	FFIジャーナル	211	948-955	2006
五十君静信	これからのプロバイオティクス: 遺伝子組換え微生物の利用と安全性.	アレルギーの臨床	26 (10)	855-860	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, and Sawada J.	Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv Mice.	Allergol. International	55	43-48	2006
渡邊敬浩, 笠間菊子, 菊地博之, 鈴木達也, 時下祥子, 坂田こずえ, 松木容彦, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄	遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810系統)の定量PCR法を対象とした外部精度管理試験.	食品衛生学雑誌	47	15-27	2006
Watanabe T, Tokishita S, Spiegelhalter F, Furui S, Kitta K, Hino A, Matsuda R, Akiyama H, Maitani T.	Development and Evaluation of Event-specific Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Bt10 Maize.	J. Agric. Food Chem.	55	1274-1279	2007
Corbisier PH, Broothaerts W, Gloria 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. Agric. Food Chem	55 (9)	3249-3257	2007
Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, Yamamoto S, Igimi S.	Intragastric immunization with recombinant <i>Lactobacillus casei</i> expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis.	Vaccine	25 (18)	3597-3605	2007
Nakajima O, Teshima R, Takagi K, Okunuki H, Sawada J.	ELISA method for monitoring human serum IgE specific for CryIAb introduced into genetically modified corn.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	47	90-95	2007
Akiyama H, Sasaki N, Sakata K, Ohmori K, Toyota A, Kikuchi Y, Watanabe T, Furui S, Kitta K, Maitani T.	Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products.	J. Agric. Food Chem.	55	5942-5947	2007
T. Mori, I. Hiraka, Y. Kurata, H. Kawachi, N. Mano, R. H. Devlin, H. Nagoya and K. Araki	Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon ( <i>Oncorhynchus masou</i> ) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity.	Gen. Comp. Endocrinol.	151	42-54	2007
渡邊敬浩, 白雅優子, 古井聡, 橋田和美, 峯岸恭孝, 穠山浩, 米谷民雄	安全性未審査遺伝子組換えコメ(LL rice)を対象とした検知, 技術の開発と評価.	J. Food Hyg. Soc. Japan	48	170-174	2007
新藤智子, 金澤由基子, 古谷真美, 田面善之, 小島幸一, 手島玲子	経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル.	秦野研究所年譜	30	9-16	2007
手島玲子	遺伝子組換え農作物の食品としての安全性評価技術.	農林水産技術研究ジャーナル	30 (9)	22-27	2007
Akiyama H, Sakata K, Kondo K, Tanaka A, Liu MS, Oguchi T, Furui S, Kitta K, Hino A, Teshima R.	Individual Detection of Genetically Modified Maize Varieties in Non-Identity Preserved Maize Samples.	J. Agric. Food Chem.	56	1977-1983	2008
Shimizu E, Kato H, Nakagawa Y, Kodama T, Futo S, Minegishi Y, Watanabe Y, Akiyama H, Teshima R, Furui S, Hino A, Kitta K.	Development of Screening Method for Genetically Modified Soybean by Plasmid Based Quantitative-Competitive PCR.	J. Agric. Food Chem.	56	5521-5527	2008
Kim TW, Igimi S, Kajikawa A, Kim HY.	Display of heterologous proteins on the surface of <i>Lactococcus lactis</i> using the	J. Appl. Microbiol.	104 (6)	1636-1643	2008