

表1 生イモ(可食部)の栄養成分

	エネルギー(kcal)	水分(g)	たんぱく質(g)	脂質(g)	炭水化物(g)	灰分(g)
D163	90	76.6	2.2	0.1	20.1	1.0
D164	92	76.3	2.0	0.2	20.5	1.0
35S	94	75.6	2.1	0.1	21.2	1.0
※	76	79.8	1.6	0.1	17.6	0.9

※五訂増補日本食品成分表より抜粋

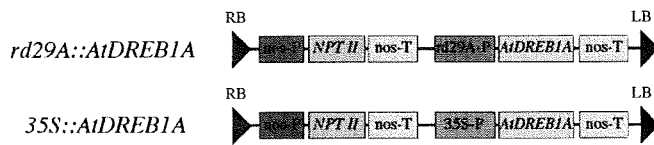


図1 遺伝子導入に用いたコンストラクト

35Sタイプ(下)は非ストレス条件下でも *AtDREB1A* 遺伝子を発現させるため、高発現体では生育阻害が起こる。そうした問題を解決するために、ストレス誘導性プロモーターに連結した *rd29A* タイプ(上)が開発された。*rd29A* プロモーターはシロイヌナズナ由来のプロモーターで DRE 配列を持つことからストレスにより誘導される。一度、導入遺伝子である *AtDREB1A* 遺伝子の発現が起こると、*AtDREB1A* タンパク質が *rd29A* プロモーターに働きかけ、ポジティブフィードバックが起こると考えられる。

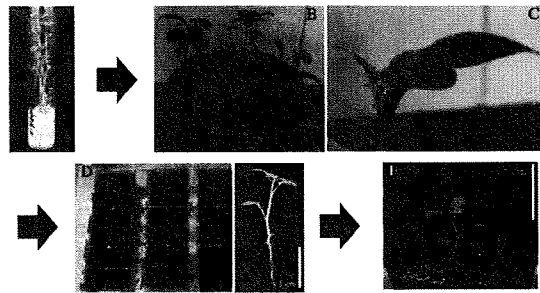


図2 植物材料の準備

培養植物(A)を栽培室でポット栽培し(B)、頂芽(C)を挿し芽増殖する(D)。馴化、生育させた後(E)、ポットに移植し、網室栽培用の材料とした。

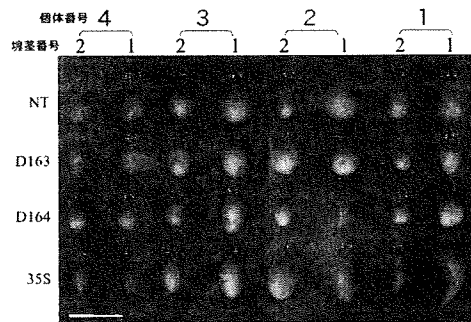


図3 各班に配布した塊茎

数字は塊茎重量。-は緑化塊茎であったので除外した。このうちNTの全系統、D163の1-1、2-1、2-2、3-1、4-1、D164の1-1、1-2、3-1、4-1、35Sの1-1、2-1、2-2、3-1、4-1、4-2が試験材料として各班に送られた。

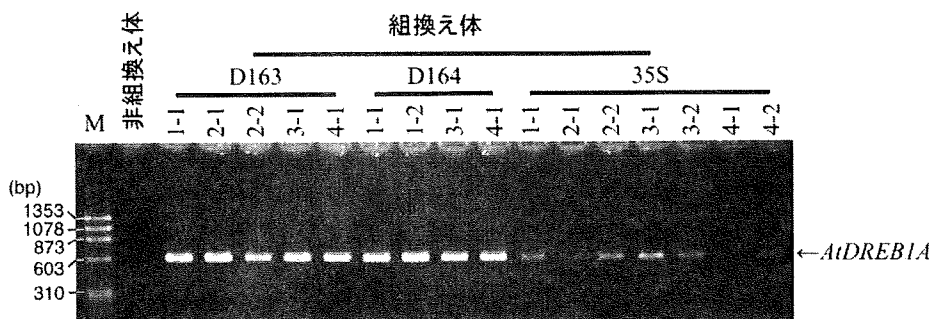


図4 遺伝子組換えジャガイモの塊茎における導入遺伝子の発現

各班に送付された組換え体について、その塊茎よりRNAを抽出しRT-PCR法により導入遺伝子の発現解析を行った。

付録1

クレハ培養土(JA)、バーミキュライト(牧野商店)、ビーナスライト7号(芙蓉パーライト株式会社)、ビートモス(牧野商店)を9:3:1:1:の比率で配合した培土。

平成 21 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）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 21 年度）

モデル組換え植物の開発並びにトランスクリプトーム解析（2）

研究分担者 小関 良宏 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 教授

研究要旨

近年、砂漠や塩害地域等でも生育できるように植物に環境耐性を付与するための遺伝子組換えについての研究がなされている。このような“第 3 世代”の遺伝子組換え植物が実用化された場合、食料原料等に遺伝子組換え植物が混入する危険性が排除できないため、これらのための安全性評価について検討しておくことが必要であると思われる。第 3 世代の遺伝子組換えでは、導入する遺伝子は転写調節因子など内生の遺伝子発現に大きな影響を与えるような遺伝子が利用される。そのため、このような遺伝子組換え植物では内生の遺伝子発現や代謝経路の変化が大きいと予想される。そこで、本研究では乾燥耐性を付与するために DREB 遺伝子を導入した馬鈴薯を用いて、遺伝子組換えによる遺伝子発現変動の解析にトランスクリプトーム解析を応用できるかについて検討するとともに、第 3 世代遺伝子組換え植物のモデルとして、RBP 遺伝子を導入した遺伝子組換えコメを作出することを目的として実験を行った。

研究協力者

佐々木 伸大（東京農工大学大学院共生科学技術
研究院助教）

A. 研究目的

これまでに様々な遺伝子組換え植物が作出され、食品の原材料として流通する機会も多くなっている。これまで実用化されているものは病虫害抵抗性などを付与したいわゆる、第一世代と呼ばれるものが中心であるが、近年、高トリプトファン米や、ゴールデンライスなどに代表されるような第二世代の栄養改変型の遺伝子組換え食品が実用化されつつある。また、最近では世界各地での環境悪化が進行する中で、砂漠地や塩害地に生育できるような環境ストレス耐性を付与するような遺伝子を食物となるような植物に導入する研究がなされている。このような第三世代と呼ばれる環境ストレス耐性を目的とした遺伝子組換えは、深刻になりつつある食糧問題を解決するための一手段として今後、多くの遺伝子組換え植物が作出されるものと予想される。そのため、将来子のような第三世代の遺伝子組換え植物が食品の原材料等に意図的・非意図的に混入する可能性は排除できない。

第三世代の遺伝子組換え植物の問題点は、導入した遺伝子によって生じる影響の幅が広い、あるいは導入した遺伝子によって生じた効果の作用機序が不明であるために、植物体内の遺伝子発現や代謝系路にどのような変化が現れるかが予想

困難であることである。第一世代の遺伝子組換え食品では、病虫害抵抗性のタンパク質を植物に生産させることで食害等を防いでいる。そのため、基本的には導入した病虫害抵抗性のタンパク質自体の全性評価が重要であった。しかし第二世代の遺伝子組換え食品では元来その植物が持っている代謝系の改変することで、栄養分を改変させるために、その代謝系に関わる代謝物・タンパク質・遺伝子等の変化を検討する必要がある。第三世代の遺伝子組換え食品では多くの遺伝子発現に関わる転写調節因子や、作用機序が完全には解明されていないような遺伝子が導入されるため、宿主となった植物の中でどのような遺伝子発現の変化、代謝経路の変化が引き起こされているかを予想するのは困難である。

そこで、本研究では植物に乾燥ストレス耐性を向上させる転写調節因子の一種である Drought response element binding protein (DREB) 遺伝子を導入した馬鈴薯を材料としてトランスクリプトーム解析を行うことで、どの程度の遺伝子発現が変化しているかを検討することを目的とした。また、モデル実験系を構築するために、環境ストレス耐性を向上させる RNA binding protein (RBP) 遺伝子を導入したイネを作出することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

植物材料としては、恒常的に発現するプロモーター下流に連結した DREB を導入した馬鈴薯 2 ライン各 1 個体 (35S-3-1-1, 35S-3-2)、ストレス応答性のプロモーター下流に連結した DREB を導入した馬鈴薯 3 ライン各 1 個体 (D164-1-1, D163-2-2, D164-3-1)、対照として非組換え馬鈴薯 3 ライン各 1 個体 (NT-1-1, NT-3-1, NT-4-1) の 8 個体を用いた。それぞれの塊茎をもちスライスしたものを液体窒素にて急速凍結したものをサンプルとして用いた。0.1 g の凍結サンプルを液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いてパウダー上になるまで磨砕した。磨砕したサンプルをマイクロチューブへ移し、そこに 1 ml の Fruits-mate (Takara Bioinc) を加えて直ちに混合した。12,000×g で遠心分離を行い、上清を新たな 2 本のマイクロチューブへ移した。等容の RLT buffer (Qiagen) を加えて混合し、20,000×g で遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清に 0.5 容のエタノールを加えて混和し、RNeasy column (Qiagen) にアプライした。10,000×g で 30 秒間遠心して、RNA をカラムに吸着させた後、700 μl の RW1 でカラムを洗浄した。40 μl の DNase I (Promega) 溶液をアプライして 37 °C で 30 分間処理して DNA を分解した。その後、RPE buffer で洗浄を行ったから、50 μl の水で RNA を溶出した。溶出した RNA はアガロースゲル電気泳動を行って、分解していないことを確認したうえで、DNA マイクロアレイ解析に供した。

DNA マイクロアレイはフィルジェン社の DNA マイクロアレイ受託解析サービスを利用した。DNA チップとしては馬鈴薯の転写産物が 18,722 スポットされた Filgen®Array Solanum tuberosum を用いた。

RBP 遺伝子組換えコメの作出

アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) 由来の RNA binding protein (RBP) を植物発現用ベクターである pBE7113 に導入した。作成したコンストラクトをアグロバクテリウム EHA105 に形質転換し、形質転換したアグロバクテリウムをイネカルスに感染させて遺伝子導入を行った。導入した遺伝子が発現しているかどうかについて、RT-PCR 法ならびにノーザンハイブリダイゼーション法によって確認をおこなった。RT-PCR 法は、TAKARA RNA PCR™ Kit (AMV) Ver. 3.0 を用いて、RT-PCR を行った。1.0 μg の RNA から、逆転写を行い、cDNA を合成し、rBP 756bp を増幅させた。コントロールとして、アクチン (1057bp) を用いた。用いた PCR プライマーは以下の通りであった。

RBP1: ATGTCTTCTGCAACAGCTAA

RBP2: CGCACGTCTTGGTCTTTCTT

Actin1: AGATCTGGCATCACACCTTC

Actin2: CAAGTGAGAACCACAGGTAGCA

ノーザンハイブリダイゼーションはイネの葉から RNA を抽出し、各レーンに 15 μg の total RNA を泳動し、メンブレンに転写した。プローブとして、RBP 遺伝子の 665 bp (195 bp~860 bp) の領域を用い、Roche 社の DIG 解析システムにより、遺伝子発現を確認した。

C. 研究結果および考察

馬鈴薯塊茎からの RNA 抽出

当初、馬鈴薯塊茎の凍結サンプル 0.1 g から GTC-フェノール法の変法である Sepazol (ナカライテスク) とシリカメンブレンカラムである RNeasy カラムを用いて total RNA の抽出を試みた。その結果、RNA は抽出可能であったが、DNA マイクロアレイのサンプルとして供することが出来る品質のものが獲得されていないことが分かった (図 1A)。ジャガイモ塊茎はデンプンや、褐変の原因物質となるようなポリフェノールを多く含んでいるため、GTC の様な化学物質を非常によく溶解することが出来る溶解液は馬鈴薯塊茎からの核酸抽出には適さないものと考えられた。そこで、ポリフェノールを多く含むサンプルに適した方法である、Fruit-mate を用いた方法を検討した。この方法では RNeasy 等のシリカメンブレンカラムを用いて RNA を精製する前処理として、Fruit-mate 溶液を試料に加えて、遠心分離を行うことでポリフェノールを除去することが可能な方法である。この Fruit-mate と RNeasy カラムとを組み合わせた方法で total RNA を抽出し、チップ電気泳動装置によって RNA の品質を検査したところ、DNA マイクロアレイに供するのに十分な品質の RNA が獲得できていることが分かった (図 1B)。収量は湿重量 0.1 g の試料から 5~12 μg 程度であった。これらのことから、馬鈴薯のサンプル 0.1 g から Fruit-mate/RNeasy カラム法によって DNA マイクロアレイに供することが可能な量、品質の RNA を簡便に確保することが可能であることが分かった。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

各サンプルから抽出した total RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行った。単色法によってラベルしたターゲット cDNA をチップ上のプローブとハイブリダイゼーションを行って洗浄をした後に各スポットの蛍光強度を観測した。

得られた結果をもとに、それぞれのサンプル間での遺伝子発現量の差をスキッタープロットによって比較した(図 2, 3)。NT-1-1 と NT-3-1 間、NT-1-1 と NT-4-1 間でのスキッタープロット解析における寄与率はそれぞれ 0.9219、0.7162 であった。また、D163-2-2 と D164-1-1 間では 0.7434、D163-2-2 と D164-3-1 間では 0.798、35S-3-1-1 と 35S-3-2 間では寄与率 0.9249 であった。このことから、同じ遺伝子を導入した馬鈴薯塊茎であっても、発現している遺伝子の揺らぎが比較的大きいことが分かった。そのため、サンプリングする時期や塊茎の部位等について検討する必要があるものと考えられた。一方、非組換え体である NT-1-1 と DREB を恒常的に発現するコンストラクトを導入した、35S-3-1-1 とでは寄与率が 0.8412 であり、NT-1-1 とストレス誘導的に DREB が発現するコンストラクトを導入した D163-2-2 との間では寄与率は 0.7558 であり、個体間におけるそれと同程度もしくは若干低い値であり、DREB 遺伝子を組換えた場合には遺伝子発現のプロファイルが若干変化している可能性が示唆された。プロテオーム解析やメタボローム解析を併せて行い、タンパク質や代謝物の変動が可食部である馬鈴薯塊茎において食品として認められる範囲内の揺らぎであるかどうかを検討する必要がある。

RBP 遺伝子組換えコメの作出

耐環境ストレス強化因子のひとつであるアイズプラント由来の *RNA binding protein* 遺伝子を恒常的に発現するプロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に挿入したコンストラクトを、アグロバクテリウム法を用いてイネ(日本晴)に導入した。ベクターの詳細を図 4 に示した。得られた形質転換イネカルスを再分化させた。それらのうち 2 個体について幼苗の葉から RNA を抽出して RT-PCR とノーザンハイブリダイゼーションを行って、導入遺伝子の mRNA の転写量を確認したところ、いずれの個体でも十分に mRNA が転写されていることが明らかとなった(図 5)。現在、これらの形質転換イネを育成中である。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

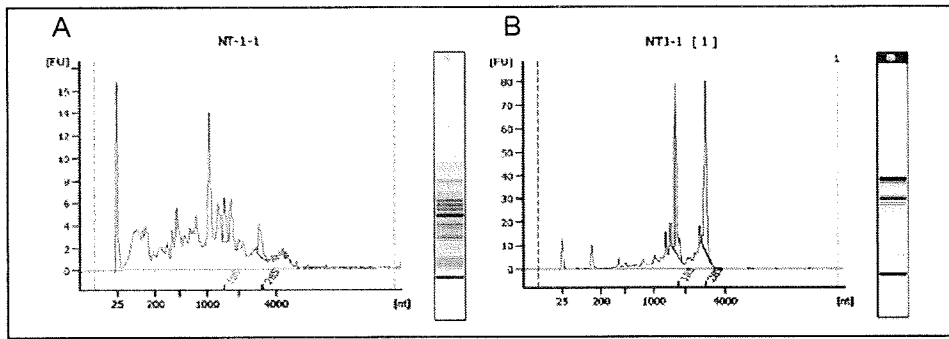


図1 馬鈴薯塊茎から抽出した RNA の品質検査結果

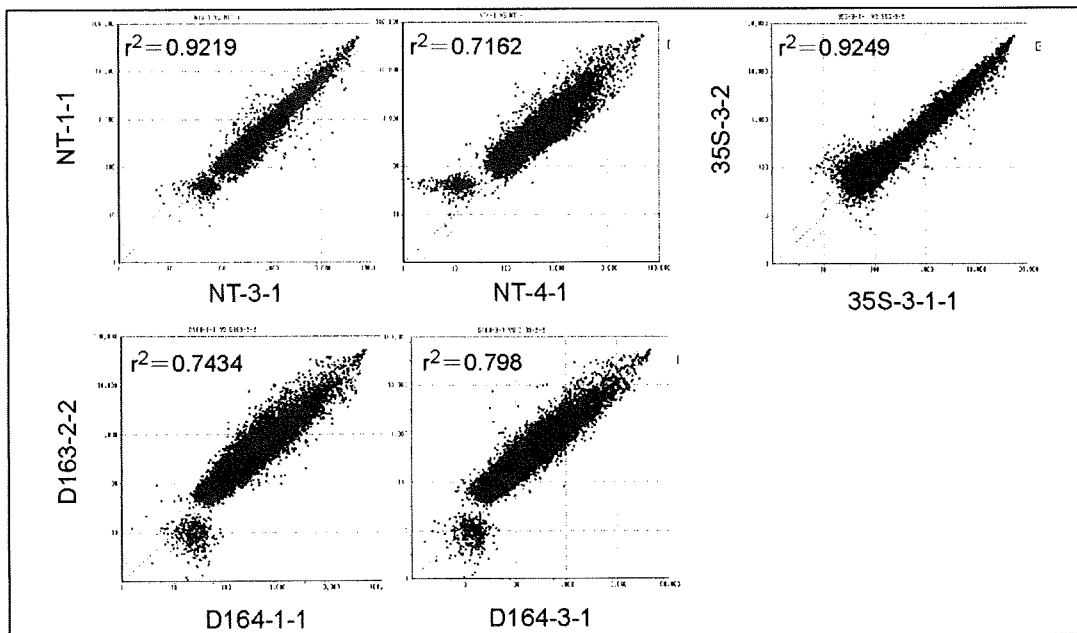


図2 遺伝子組換え、非組換え馬鈴薯塊茎におけるトランスクリプトーム解析

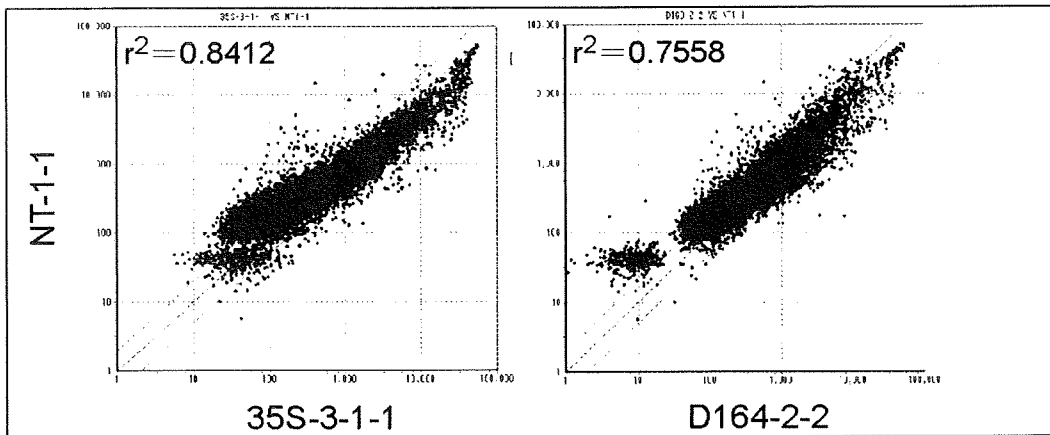


図3 遺伝子組換えによる遺伝子発現変動についての解析

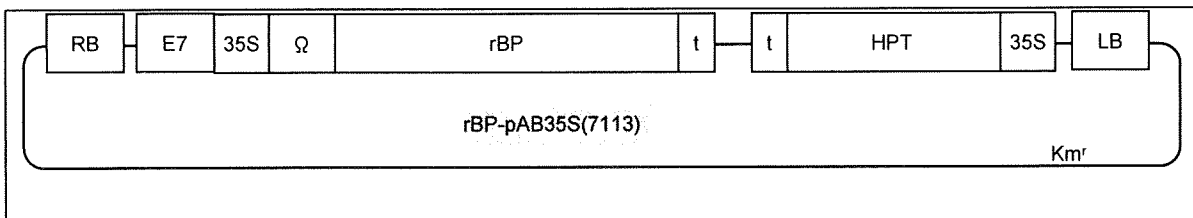


図4 RNA binding protein(RBP)組換えコメ作出のための導入コンストラクト

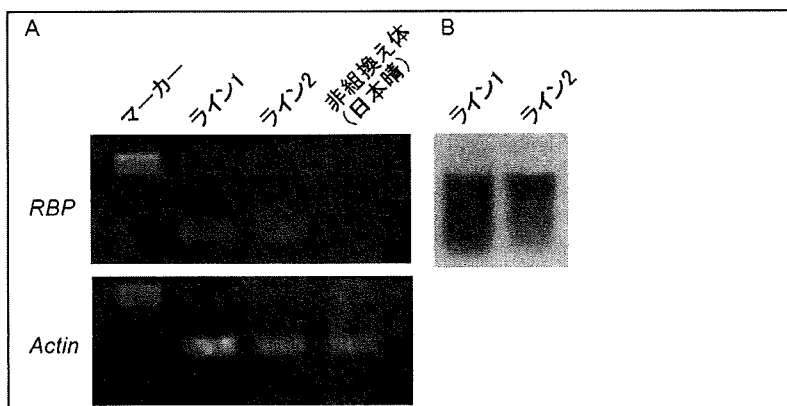


図4 RBP 組換えコメの導入遺伝子の発現解析

平成 21 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）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 21 年度）

組換え植物のメタボローム解析

研究分担者 太田 大策 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授

研究要旨

遺伝子組換え作物は第一世代（除草剤耐性，耐病性，あるいは昆虫忌避などの形質付与），第二世代（栄養成分改変など），第三世代（医療目的や環境ストレス耐性の増強など）に大別できる。

本研究では，第三世代遺伝子組換え作物の安全性評価を目的として，植物が環境ストレス耐性を獲得する際に発現する転写因子“*DREB 1a*”遺伝子を導入した組換えバレイショ塊茎のメタボローム解析を行った。

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータ（CaMV 35S）を用いて *DREB 1a* を恒常的に発現させた系統（35S），ストレス応答遺伝子プロモーター *rd29a* を用いて *DREB 1a* を発現させた 2 系統（D163, D164），形質転換のみの対照系統（NT）をメタボロミクスに供し，165 種類のメタボライトを検出した。GM（35S, D163, D164）と nonGM（NT）間で，グルタチオン代謝関連代謝，GABA 関連代謝，糖代謝関連， β -シアノアラニンなどの含量変動を認めた。

細胞毒性の可能性のある β -シアノアラニン，およびグリコアルカロイドであるソラニジン配糖体は詳細な定量データを取得した。ソラニジン配糖体含量は GM と nonGM 間に顕著な差は見られなかったが， β -シアノアラニン含量は GM で有意に高かった。 β -シアノアラニンは，植物の老化やストレス応答に関与する植物ホルモンであるエチレン産生の副産物として蓄積する。すなわち， β -シアノアラニンは植物ストレス反応，あるいは抵抗性誘導の結果として，エチレン生合成が亢進したこと，さらに副生成物である HCN の無毒化のために β -シアノアラニンが蓄積した可能性を示唆しており，ストレス応答制御に関わる *DREB 1a* の遺伝子操作との因果関係を解明しなければならない。

今後，環境ストレス耐性を増強させた GM 植物の β -シアノアラニンレベルと関連遺伝子発現の相関を明らかにする必要がある。また，nonGM 作物の種類や保存状態，輸送形態の違いなどを考慮し，nonGM の β -シアノアラニンレベル変動の情報収集が求められる。得られた情報を基にして，ストレス耐性形質を付与する遺伝子組み換え戦略そのものを見直しも議論する必要があるかもしれない。

A. 研究目的

本研究では，第 3 世代遺伝子組換え戦略によって作出された作物の実質的同等性評価を目的として，組換え体と非組換え体の中で代謝成分の総体（メタボローム）を比較した。

遺伝子組換え技術は，様々な生物に種を超えて有用形質の導入を可能にした。遺伝子組換え技術に基づいた植物機能改変は，農作物や食料品への適用，さらに工業原料の生産や地球温暖化対策のための重要基盤技術として必須である。その一方，遺伝子組み換え技術を使用して作出・生産された食品の安全性に関する科学的実証データの集積

は，社会的に重要な課題の一つであり，遺伝子組み換え作物の実質的同等性の確認を目的とした様々な分析が行われてきている。

遺伝子組換え（GM）植物は第 1 世代（除草剤耐性，耐病性，あるいは昆虫忌避などの形質導入），第 2 世代（栄養成分改変など），第 3 世代（医療目的や環境ストレス耐性の増強など）に大別できる。まず，ピンポイントで生物機能改変を目指した第 1・第 2 世代 GM 作物においては，意図した以外の代謝変動が起きる可能性は，理論的には極めて低い。これらの第 1・第 2 世代 GM 作物においても，その GM 育種の母本となる作物との実質的

等性が科学的に評価されてきた。すなわち、導入遺伝子の塩基配列由来のタンパク質に毒性やアレルギー性の検査にとどまらず、遺伝子組換え体と非組換え体の間で遺伝子発現の様相（トランスクリプトーム）やタンパク質の種類や量の変化（プロテオーム）が無いかどうか、さらに遺伝子組み換え操作によって非タンパク性成分（代謝成分の総体 = メタボローム）の種類や量に差異が生じることがあるかどうかについても検討が加えられている。

第3世代GM技術の目的の一つは、転写調節因子の導入によって植物代謝生理機能を包括的に改変し、ストレス耐性増強などの有用形質を付与することにある。しかしながら転写調節の改変・増強が、生体の機能全体にどのような影響を与えるかに関しては、明らかに情報が不足している。

本年度の研究には、アブラナ科のシロイヌナズナ由来 DREB1a 転写調節因子（dehydration response element binding motif）を介して乾燥、高塩環境、低温に対するストレス耐性遺伝子の発現を制御を導入したバレイショの塊茎組織（GM）を、非組換え体（nonGM）の塊茎組織のメタボロームを比較することを目的とした。

B. 研究方法

【供試試料】シロイヌナズナの DREB1a 転写調節因子の遺伝子を導入したバレイショ塊茎を供試した。DREB1a 遺伝子は恒常発現のためのカリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV 35S) プロモーター、及びシロイヌナズナ乾燥ストレス応答性遺伝子 RD29A のプロモーター (*rd29a*) の制御下にある。CaMV 35S にて発現させた試料は 1 系統 (35S), *rd29a* で発現させた 2 系統 (D163, D164), 形質転換のみの対照実験系統 (NT) の合計 4 種類を分析に使用した。

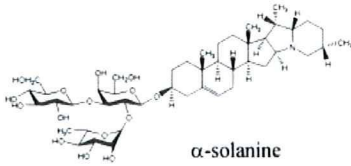
【試料調製】試料採集後、塊茎試料は溶媒抽出まで -80°C で保存した。凍結塊茎 (100 mg) は液体窒素下、内部標準試薬 (2 mg/mL リビトール 11・L) を加えたメタノール (LC-MS grade, 320・L) で抽出した。加熱処理 (70°C 15 min) 後に抽出液を 80%メタノール溶液とした。抽出液は、遠心分離上清をフィルター濾過 (DISMIC-13P, ADVANTEC) した。メトキシアミン塩酸 (無水ピリジン溶液) によるメトキシ化 (30°C 90 min) と N-methyl-N-trimethylsilyl-

trifluoroacetamide (1% TMSC) によるシリル化を行った。

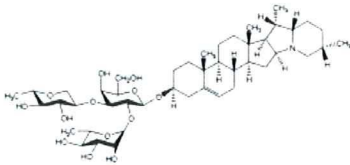
【GC-MS】GC-MS 分析は Varian-3800 ガスクロマトグラフに Saturn 2200 質量分離装置を連結して実施した。分析条件：インジェクション温度 230°C, インターフェース温度 270°C, He ガス流速 (1.5 mL/min), カラムオープン (80°C 2 min, 80°C から 330°C まで 8°C/min で上昇, 330°C 6 min 保持, 質量範囲 $m/z = 40 \sim 650$)。クロマトグラムとスペクトル解析には Saturn GC/MS Work Station ver. 5.5 (Varian) を用いた。

【LC-LIT-TOF-MS】高速液体クロマトグラフィーリニアイオントラップ - 飛行時間型質量分析装置 (LC-LIT-TOF-MS) は, Nano Frontier LF (Hitachi High Technologies) を用いた。試料分離は Cadenza CD-C18 (150x2mm, 3 mm, Imatakt) を用いた [カラム温度 40°C, N₂ ガス流速 0.190 mL/min, 0-50 min の直線勾配溶出: A 液, H₂O (HPLC grade WAKO) / 0.1% ギ酸; B 液 アセトニトリル (LC-MS grade) / 0.1% ギ酸; 0-5min まで A:B = 95%:5%, 5-50-min まで A 液 95% → 5%, B 液 5% → 95%]。データ前処理は Nano Frontier Data processing によって行った。

【グリコアルカロイド定量】分析には LC-LIT-TOF-MS を用いた。グリコアルカロイド定量にはソラニン標品を供試して作成した検量線を用いた。ソラニン ($m/z = 868.5 \pm 0.1$)、およびそのフラグメントイオンピーク ($m/z = 706.5$, $m/z = 565.5$, $m/z = 398.3$) のシグナルを合算してソラニンの総量とした。抽出中の配糖体加水分解は起こらないことを確認した。詳細な構造決定はフーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS) によって行った。バレイショには主要なグリコアルカロイドとしては α -ソラニンと α -チャコニンが蓄積する。両物質はソラニジンをアグリコンとするが、結合する糖の種類が異なる。本実験の HPLC 分離条件では、両物質は異なる保持時間で溶出されるため、それぞれを独立して定量することができた。また、組織の溶媒抽出中にソラニジン配糖体が加水分解され、定量性と分析精度が損なわれることは無かった。



C₄₅H₇₃NO₁₅ MW = 867.49802067



C₄₅H₇₃NO₁₄ MW = 851.50310605

C. 研究結果

【概略】CaMV 35Sにて発現させた系統(35S), *rd29a*で発現させた2系統(D163, D164), 形質転換のみの対照系統(NT)で検出できたメタボライト165種類の変動(p 値<0.05)を比較した。

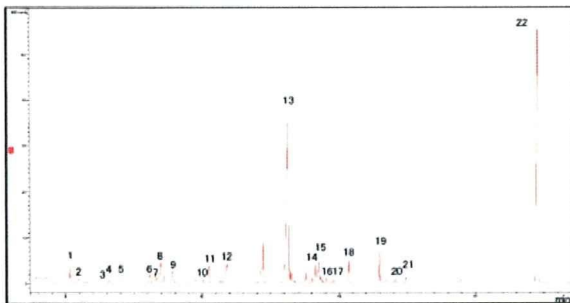


図 1. 塊茎(NT)のGC-MS分析(トータルイオンクロマトグラム)の例。各番号は、標準品分析により予めRT情報を取得し同定した化合物の一部に対応。1. Phosphate 2. Isoleucine 3. AcetylGlutamine 4. Serine 5. Threonine 6. Homoserine 7. 5-Oxoproline 8. Methionine 9. Asparagine+GABA 10. Phenylalanine 11. Glutamic acid, 12. Xylose 13. Citric acid 14. Galactose+Glucose 15. Tyrosine 16. Ascorbic acid 17. Ribitol (internal standard) 18. Gluconic acid 19. Myo-inositol 20. Tryptophan 21. Octadecanoic acid 22. Sucrose

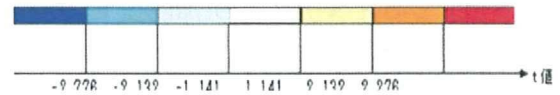
D163とNT比較(D163/NT)で変動が認められたメ

タボライト数は23種, そのうち14種がD163で有意に増加し9種が減少した。同様に, D164/NTの比較では, 総数24メタボライトの有意な変動(18種がD164で増加, D164で6種が減少), 35S/NTでは20メタボライトが変動(15種が35Sで増加, 35Sで5種が減少)があった。これらのメタボローム変動を次にまとめた。

【中心代謝系】検出メタボライトの相対的な比較を実施し, ヒートマップに表記した(表1)。各メタボライト蓄積量をGC-MS分析によって比較し, 算出した標準偏差から t 値を求めた[自由度4, 有意水準は, 68.3%($P=0.317$, $t=1.141$), 90%($P=0.10$, $t=2.132$), 95%($P=0.05$, $t=2.776$)。]

塩ストレスや乾燥耐性に関わる植物の浸透圧調節物質であるプロリンの含量が上昇する傾向にあったが, 別の浸透圧調節物質であるベタイン含量には有意な変化はなかった。

表1. 中心代謝経路のメタボライト変動。NTに対する35S, D163, D164系統のメタボライト蓄積量の比較。ヒートマップは赤が高蓄積を示し, 青が低蓄積を示す。



t値	35S/NT	D163/NT	D164/NT
L-Valine	4.06	7.81	2.06
Phosphate	0.62	-0.24	-0.57
betaine	-0.84	-3.03	-1.47
L-Proline	1.84	2.50	2.14
Succinate	-0.48	0.12	0.07
L-Isoleucine	2.38	6.62	1.10
Fumaric acid	1.29	3.62	3.00
b-cyanoalanine	7.73	5.46	1.90
N-Acetylglutamine	7.85	5.28	1.83
L-Seline	2.77	6.05	1.41
L-Threonine	2.15	2.94	1.17
L-Asparagine	1.86	0.61	1.04
beta-Alanine	0.41	2.44	0.48
L-Glutamine	10.25	5.52	4.44
Homoserine	3.66	-0.54	-1.81
L-Proline 5-oxo	0.33	-3.12	1.90
Malic acid	0.49	-3.29	-1.14
L-Methionine	2.28	11.09	1.35
L-Aspartic acid	3.55	3.92	0.63
GABA	3.48	6.17	3.70
α -Ketoglutarate	4.49	-10.39	-10.39
L-Phenylalanine	5.22	6.43	2.18
Glutamic acid	-1.25	-9.47	-1.20
Xylose	1.39	1.28	1.27

表 1. つづき

t値	35S/NT	D163/NT	D164/NT
Ribose	4.55	2.80	2.91
L-Lysine	1.25	4.41	0.26
L-Ornithine	-1.60	-2.88	-1.60
Putrescine	-5.67	-5.34	-1.63
Citric acid	-0.02	-1.44	0.91
Galactose	-0.51	-0.79	0.59
Glucose	-0.87	-1.02	0.46
Fructose	0.17	-0.37	1.38
L-Tyrosine	-1.09	0.40	-1.17
L-Ascorbic acid	-0.35	2.04	-1.28
Gluconic acid	-1.34	0.47	-2.25
Myo-inositol	0.06	3.16	1.55
L-Tryptophan	0.05	4.27	0.89
Octadecanoic acid	2.13	-1.15	0.98
G6P	0.34	1.48	0.18
F6P	-3.68	-1.06	1.46
Sucrose	1.38	1.55	1.74
Maltose	0.27	-0.39	-0.68
Campesterol	0.45	-2.40	0.76
Stigmasterol	1.61	1.70	1.64
beta-sitosterol	0.44	0.60	0.93

メタボライトの顕著な変動を次の図 2, 3, 4, 5 に示す. GM (赤字 35S, D163, D164) と nonGM (青字 NT) 間で, グルタチオン代謝関連 (図 2), GABA 関連代謝 (図 3), 糖代謝関連 (図 4), シアノアラニン (図 5) の 4 項目で差が認められた.

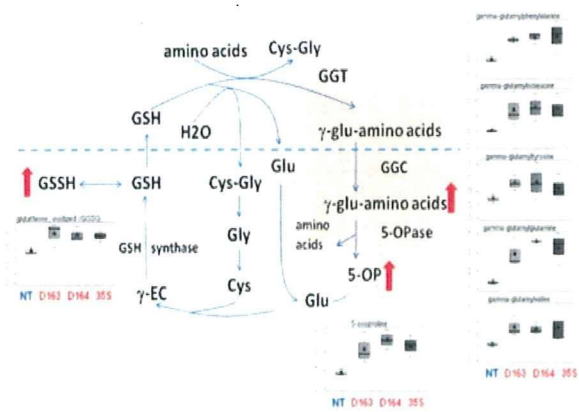


図 2. グルタチオン代謝関連物質レベル.

GM 系統では, γ -グルタミルアミノ酸, 5 - オキソプロリン, グルタチオンレベルが顕著に上昇した (図 2). 動物では酸化ストレスで γ -glutamyl transferase が誘導されるが, 植物ではほとんど γ -glutamyl transferase の機能は解明されていない. アミノ酸輸送 酸化還元レベルの恒常性, 外来薬物の解毒 に関与する可能性

があるが, *DREB1a* 遺伝子発現との関連性は不明である.

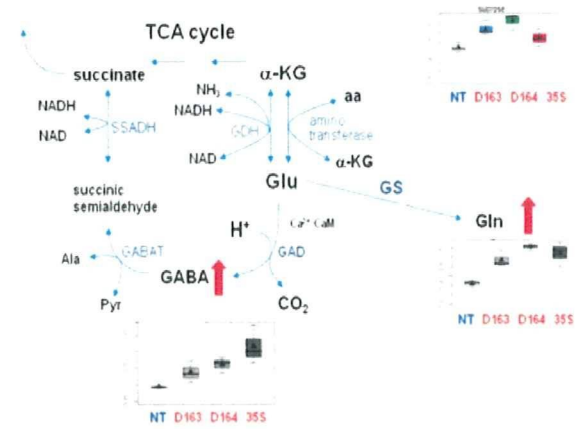


図 3. GABA レベルの上昇.

GABA レベルも GM 系統で上昇していた (図 3). グルタミン酸や GABA レベルの上昇は, TCA cycle や植物の無機窒素同化, α -ケトグルタル酸とグルタミン酸を介した光合成産物の輸送・転流が *DREB1a* の発現の影響を受けている可能性を示している.

GM 系統では糖代謝にも顕著な変動が認められた (図 4). 光合成産物の輸送・転流 (地上部から貯蔵組織へ) が促進されていることを示す.

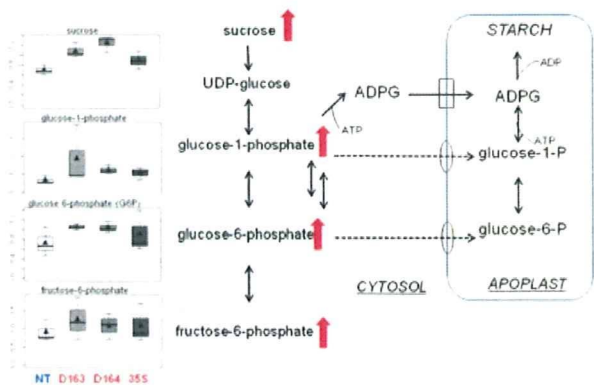


図 4. 糖代謝関連の変動

また, *DREB1a* の恒常的発現によって, シロイヌナズナの糖代謝の亢進が報告され, 低温ストレス耐性獲得との関連が示唆されている (Plant Physiol 2009 150:1972-1980).

図 5 には、GM 系統の β -シアノアラニンレベル上昇を示した。DREB1a 発現系統における β -シアノアラニン蓄積の誘導はこれまでに報告されていないまったく新しい知見である。 β -シアノアラニンは植物ストレス反応、あるいは抵抗性誘導の結果として、エチレン生合成が亢進したこと、さらに副生成物である HCN の無毒化のために β -シアノアラニンが蓄積した可能性を示唆している。

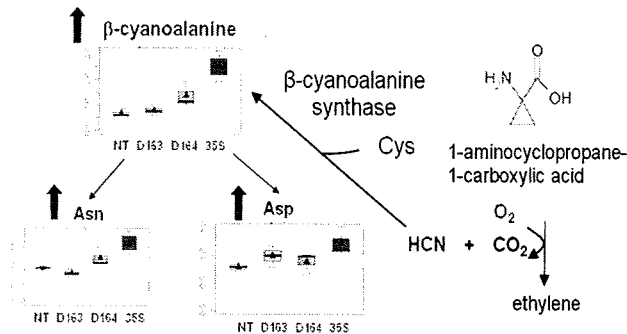


図 5. エチレン生合成と β -シアノアラニン

【グリコアルカロイド】

α -ソラニンと α -チャコニン (図 6) はバレイシヨが産生する毒性を有するグリコアルカロイド (PGA) である。図 6 に LC-LIT-TOF/MS クロマトグラム中の α -ソラニン由来フラグメントイオンを示した。 α -ソラニンと α -チャコニンはクロマトグラフィーによって分離が可能で、両物質の蓄積は、それぞれの物質由来のフラグメントイオンピーク面積から算出した。

表 1 に PGA 含量を比較した。各系統から独立した 3 サンプルを分析に供した。35S 系統では、NT と比較して PGA 含量が低下する傾向にあった。D163 と D164 の PGA 含量は NT と差は無かった。

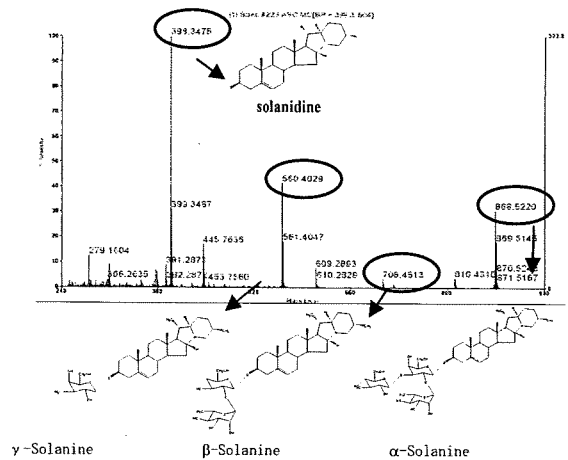


図 6. α -ソラニンの LC-LIT-TOF/MS クロマトグラム。アグリコンであるソラニジン ($m/z = 398.3$) と、配糖体から糖鎖部分が脱離したいくつかのフラグメントピークが確認された (γ -solanine $m/z = 560.4$, β -solanine $m/z = 706.4$, α -solanine $m/z = 868.5$)。フラグメントピークのイオン強度を含めて、各ピークのエリア値から検量線を作成し、 α -ソラニンおよび α -チャコニンを定量した。

表 1 DREB1a 転写調節因子の遺伝子を導入したバレイシヨバレイシヨ塊茎のグリコアルカロイド含量

	solanine $\mu\text{g/g FW}$		chaconine $\mu\text{g/g FW}$	
	平均	SD	平均	SD
NT	128.1	± 42.4	118.8	± 30.0
35S	67.0	± 56.7	84.7	± 69.7
D163	131.7	± 13.3	153.1	± 14.1
D164	130.6	± 4.46	148.1	± 11.9

ソラニジン配糖体は、光ストレスや傷害応答によりジャガイモ植物体に蓄積する。DREB1a の発現による新規ソラニジン配糖体の蓄積の可能性を検証するため、供試サンプル中にソラニジンの質量値 $[M+H]^+ = 398.3$ を有するメタボライト蓄積を検索したが、GM および nonGM とも、既知のソラニジン配糖体のみが観測された。

D. 考察

シロイヌナズナの乾燥ストレス耐性誘導に関わる転写因子 DREB1 と DREB2 は TACCGACAT の 9 塩基からなるシス配列 DRE を認識 (Mol Gen Genetics 236:331-340; Plant Cell 6:251-264; Plant Cell 10: 1391-1406) する。両 DREB タンパク質は植物特異的な ERF/AP2 DNA 結合ドメインを持つ。DREB1 に制御される遺伝子群はいずれも低温ストレスに関与し、DREB2 遺伝子群は乾燥・塩ストレス耐性に関わる。シロイヌナズナでは、CaMV35S による DREB1A 恒常発現によって糖やプロリンレベルが上昇し高レベルの乾燥・塩・低温ストレス耐性を示した (Nature Biotech 17: 287-291)。

DREB1A 遺伝子の恒常発現によって植物への高い環境ストレス耐性を付与できるが、生育阻害をとまなう。一方、乾燥や塩や低温ストレス誘導性の *rd29A* プロモーターを用いて *DREB1A* 遺伝子を発現させると、得られた組換え植物は高レベルの乾燥・塩・低温耐性を示し、生育阻害は軽減される。この時、ストレス耐性遺伝子は通常の生育環境ではほとんど発現せず、ストレス条件下で強く誘導されていた (Nature Biotech 17: 287-291)。

DREB1A 遺伝子を利用した作物の環境ストレス耐性付与も試みられている (Plant Cell Rep. 27:411-424)。双子葉植物であるタバコや単子葉植物であるイネでは *DREB1A* 遺伝子の過剰発現体が乾燥や塩や低温ストレスに対して耐性を示した。このように、シロイヌナズナの DRE/DREB 制御系が、植物種を超えて環境ストレス耐性獲得に機能することが明らかになった。

本研究では、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaMV 35S) を用いて *DREB1a* を恒常的に発現させた系統 (35S)、ストレス応答遺伝子プロモーター *rd29a* を用いて *DREB1a* を発現させた 2 系統 (D163, D164)、形質転換のみの対照系統 (NT) をメタボロミクス実験に供試した。

まず指摘すべき点は、本研究のメタボロミクスの結果、35S および *rd29a* のいずれのプロモーターで *DREB1a* 遺伝子を発現させても、類似のメタボロームを形成すること、それらのメタボロームは nonGM (NT) とは明確に異なることである。すなわち、塊茎はストレス環境下にあり、その結果 *rd29a* プロモーター制御下に置いた *DREB1a* 遺伝子がバレイショで発現し、35S 系統と類似のメタボロームが形成されたと考えられる。nonGM 塊

茎も同様のストレス環境下にあるはずだが、*DREB1a* 遺伝子導入が無いので、異なるメタボロームを形成されたと判断される。

GM (35S, D163, D164) では nonGM (NT) と比較して、グルタチオン代謝関連物質 (γ -グルタミルアミノ酸, 5-オキソプロリン (5-OP), グルタチオン) のレベルが上昇している傾向にあった (図 2)。動物では酸化ストレスで γ -glutamyl transferase を誘導されるが、植物では本酵素の生理機能はほとんど機能解明されていない。GM 系統ではアミノ酸輸送の亢進や酸化還元レベルの恒常性維持が活性化されている可能性がある。

GM では GABA レベル上昇が認められたが、*DREB1a* の転写調節との関連は不明である (図 3)。

また、糖質 (sucrose, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate) の含量増加傾向も認められた (図 4)。光合成産物の輸送 (地上部から貯蔵組織へ) が亢進されている可能性とともに、糖代謝そのものの活性化も示唆される。シロイヌナズナで *DREB1a* を恒常発現させた系統では、糖代謝の亢進が報告されており、低温ストレス耐性獲得との関連性が示唆されている (Plant Physiol 2009 150:1972-1980)。

GM 系統では β -シアノアラニンのレベルが上昇している傾向が認められた。 β -シアノアラニンは、植物ホルモンであるエチレン生合成の副産物である HCN の解毒反応の生成物である。本実験から、*DREB1a* 遺伝子の導入によってストレス応答が活性化され、その結果として β -シアノアラニンが蓄積したと推測される。これらの GM 系統において、 β -シアノアラニン産生に関わる β -シアノアラニン合成酵素、さらにエチレン生合成の ACC (1-amino cyclopropane 1-carboxylic acid) 合成酵素、ACC 酸化酵素遺伝子発現を解析する必要がある。

図 5 は相対値の比較を示しているため、 β -シアノアラニン標品を用いて定量した (表 2)。分析には、各系統から独立した 3 サンプルを供した。GM (35S, D163, D164) では nonGM (NT) よりも β -シアノアラニン含量が高いことが確認された。

与する遺伝子組み換え戦略そのものの見直しについても議論する必要があるかもしれない。

表 2. β -シアノアラニン含量の比較

35S	D163	D164	NT
($\mu\text{g/g FW}$)			
5.88 \pm 0.86	3.86 \pm 0.50	3.39 \pm 1.41	1.80 \pm 0.32

(n=3)

植物の環境ストレス応答と耐性獲得には、代謝生理機能の包括的な調節が必要である。今回のメタボロミクス結果では、糖代謝やアミノ酸代謝などの変動が顕著に認められ、これらはすでに報告されているストレス応答反応と整合性がある。

一方、シロイヌナズナ *DREB1a* 発現系統で、 β -シアノアラニン含量が高くなる傾向が認められた結果は、これまでに報告されていないまったく新しい知見である。 β -シアノアラニンは植物ホルモンであるエチレンの生成副産物と考えられている (Proc Natl Acad Sci U S A. 81:3059-3063)。エチレンは、生長の抑制、花芽形成の制御、成熟と老化、病原体への防御応答など多岐にわたる生理反応に関与する。したがって、*DREB1a* 発現によって、植物にグローバルなストレス応答が誘導され、その応答反応の一つとしてエチレン生成が促進されるとともに、 β -シアノアラニンレベルが上昇したのかもしれない。

E. 結論

今年度の分析では、異なるメタボロミクスプラットフォームによる分析 (大阪府立大学, 外部委託) で同様の結果が得られているので、 β -シアノアラニンレベルが GM と nonGM で異なる可能性は高い。毒性を有する化合物 β -シアノアラニンが第三世代遺伝子組換え作物に蓄積する可能性が示された。

今後、検体数を増やすことに加え、単一の塊茎からのサンプリング部位を均一にすること、さらにサンプリングから分析まで処理を明確にするなど、実験設計に配慮しながら β -シアノアラニン蓄積を明確にすることが必要である。また、品種や収穫後の貯蔵経歴の異なる市販バレイショ塊茎を供試し、 β -シアノアラニンの含量変動レベルについての基礎データ収集が必要である。

得られた情報を基にして、ストレス耐性形質を付

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

平成 21 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）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 21 年度）

遺伝子植物のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析

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

平成 21 年度は、第 3 世代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並びにプロテオーム解析に関する調査研究として、(1) 遺伝子組換えジャガイモ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) 動物を用いる組換えジャガイモの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アレルゲンデータベース (ADFS) のデータの更新、(4) 発現タンパク質の 2D-DIGE による網羅的解析を行った。具体的には、(1) シロイヌナズナの乾燥耐性に関する転写因子 *AtDREB1A* 遺伝子を導入したジャガイモと非組換えジャガイモの塊茎を用いて、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ジャガイモアレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。1D-および 2D-immunoblot 法によるアレルゲノーム解析の結果、遺伝子組換え (rd29A, 35S) ジャガイモは非組換え (NT) ジャガイモに比べて、アレルゲンの種類・質・量の顕著な変化はみられなかった。また、ジャガイモ中の IgE 結合タンパク質として、Patatin precursor, Serine protease inhibitor 2, pectinase inhibitor 2 を同定した。(2) 食物アレルギー動物モデルマウスを用いて、*AtDREB1A* 遺伝子導入ジャガイモと非組換えジャガイモの感作を行い、両者のアレルゲン性について比較検討を行った。BALB/c マウスを用い、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、組換えジャガイモ並びに非組換えジャガイモ塊茎抽出物の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、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両者で違いはみられなかった。また、本実験系で用いたマウスを用いる経口感作の成立過程において、抑制性 T (Treg) 細胞が関与している可能性が考えられた。

(3) アレルゲン予測の解析法の検討では、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、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) ピークと立体構造及びエピトープ位置の相関をより詳細に検討する手法の検討を行った。また、ADFSのアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、新たに 11 種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、エピトープ既知のアレルゲンの数は 91 種となった。(4) 発現タンパク質の 2D-DIGE による網羅的解析では、2D-DIGE の手法の確立のため、平成 21 年度に行った GFP 導入にわたり肉と非組換えにわたり肉を用いた比較検討を行い、続いて、*AtDREB1A* 遺伝子導入ジャガイモと非組換えジャガイモの比較検討を行った。EGFP 組換え鶏肉では EGFP の発現差異を検出することができた。DREB 組換えジャガイモでは、Patatin precursorをはじめ、いくつかの代謝系酵素の発現差異が検出された。

研究協力者

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、崎山則征

(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)

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」¹⁾ ([ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/al03_34e .pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/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。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、2008年の第31回コーデックス総会で、「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」、また、「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」の原案が最終的な合意が得られた。生産者のメリットを考慮した第1世代バイオテクノロジー応用食品に加え、第2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り、さらに環境への適応を考慮した第3世代遺伝子組換え作物も開発が進んでいる。

本分担研究では、第3世代遺伝子組換え作物の安全性評価の中で、遺伝子組換え体のアレルギー性評価並びのプロテオーム解析を担当し、第3世代遺伝子組換え作物のアレルギー性についての安全性評価のあり方、更には網羅的解析技術の安全性評価への応用の可能性について検討することを目的とする。具体的には、(1)遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた組換え食品のアレルゲン性の検討、(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及び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22年度は、(1)遺伝子組換えジャガイモ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)動物を用いる組換えジャガイモの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、(4)発現タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析をとりあげ、研究を進めた。具体的には、

(1) シロイヌナズナの乾燥耐性に関する転写因子*AtDREB1A*遺伝子を導入したジャガイモと非組換えジャガイモの塊茎を用いて、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ジャガイモ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) 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、*AtDREB1A*遺伝子導入ジャガイモと非組換えジャガイモの感作を行い、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)のインデックスと立体構造の揺らぎ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)に関しては、アレルゲン並びに、エピトープ情報の更新を行った。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析では、2D-DIGEの手法の確立のため、平成21年度に行ったEGFP導入にわとり肉と非組換えにわとり肉を用いた比較検討を行い³⁾、続いて、*AtDREB1A*遺伝子発現ジャガイモと非組換えジャガイモの比較検討を行った。

B. 研究方法

(1) 遺伝子組換えジャガイモアレルゲンの量的、質的変動の解析手法の検討

(i) Non-GM 及び GM ジャガイモ塊茎からのタンパク質の抽出

遺伝子組換え (GM) ジャガイモには、rd29A プロモーターあるいは CaMV (35S) プロモーターでドライブしたストレス応答転写因子 DREB をアグロバクテリウム法により導入したジャガイモを用いた。また、アレルゲン含量の比較用に、非組換え (Non-GM) ジャガイモを用いた。これらのジャガイモはすべて、筑波大学・菊池博士らによって作製された。ジャガイモ 1g に対し、Protease inhibitor cocktail (Sigma) を添加した 10mL の PBS を加え、Polytron (Kinematica) を用いてジャガイモ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。

(ii) ジャガイモ中に含まれる既知アレルゲンの定量

ジャガイモアレルゲン特異的抗体の作製は MBL 株式会社医学生物学研究所 (Nagoya, Japan) に委託した。既知アレルゲン Patatin, Cystein protease inhibitor (CPI), Knitz-type protease inhibitor (KPI), Serine protease inhibitor (SPI)の配列から、他のジャガイモタンパク質との相同性が低く、特異性の高いペプチド部位を検索し、合成ペプチドをウサギに免疫して特異的抗体を得た(表 1)。

Non-GM、GM (rd29A, 35S) ジャガイモタンパク質 (5.6µg /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)。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 で希釈した各アレルゲン特異的抗体溶液中で室温 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 Konica Immunostain (Konica) を用いて HRP 化学発色反応を行った。

(iii) ジャガイモ特異的 IgE 抗体陽性血清を用いた IgE 抗体結合タンパク質の検出

ジャガイモに対する特異的 IgE 陽性で、Immuno-CAP スコア 3 以上の患者 14 名の血清を用いた(表 2)。Subject 1-4 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 5-14 の血清は Plasma Lab. International (Washington, USA) より購入した。

SDS-PAGE により分離したジャガイモタンパク質 (4µg/lane) を転写した膜を、0.1% casein/PBS で 10 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。洗浄後、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、Konica Immunostain (Konica Minolta, Tokyo) を用いて HRP 化学発色反応を行った。

(iv) 2 次元電気泳動を用いたジャガイモ中の IgE 結合タンパク質スポットの検出および MALDI-TOF-MS/MS による IgE 結合タンパク質の同定

ジャガイモタンパク質 (20µg) 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) 250 µl に溶解し、Immobiline Drystrip (pH3-10 NL, 13cm 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 11kVh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ー (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 15 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ー中で室温 15 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、100 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 Regent (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、ジャガイモタンパク質 (100µg) 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・乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (30µg/ml Trypsin Gold-Mass Spec Grade [Promega, Madison, Wisc., USA], Protease max [Promega, Madison, Wisc., USA]) を加え、37°C で 2 時間ゲル内消化を行った。トリプシン消化ペプチドは α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α-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 nr タンパク質データベース内での相同性検索を行った。

(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 (Vehicle)、非組換えジャガイモ (NG)、組換えジャガイモ (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 5~6 匹/群で設定した。非組換えあるいは組換えジャガイモ 1 g に対して 3 mL のリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を加えてホモジネートした後、4°C 下で 1.5 時間、攪拌した。ホモジネートを 4°C 下、12000 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 ONA 群の媒体は、PBS 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 0.04 mg/匹を 4 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 6 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 6 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。

(実験 2) 7~10 週齢の雌性 BALB/c マウスに生理食塩液を媒体として OVA 1 mg を経口投与した (OVA/S)。投与 1、3、6、12 および 24 時間後に 3 匹のマウスから、パイエル板、腸管膜リンパ節および脾臓を採取し、コラゲナーゼ処理によってそれぞれの細胞 (PP、MLN および SL) を分離した。洗浄後の PP と MLN、赤血球を溶血させた後に洗浄した SL は 1 mL あたり 2×10^7 個に調整し、FITC 標識抗 CD4 抗体で染色した。Mouse Foxp3 Buffer Set (ベクンディッキンソン) を用いて、CD4 抗体標識後の細胞を PE 標識抗 Foxp3 抗体で染色した。CD4⁺Foxp3⁻細胞の割合はフローサイトメトリー (BD FACS Calibur, ベクンディッキンソン) で調べ、各投与時間の CD4⁺Foxp3⁻細胞の割合を無処置動物 (n=6) および昨年までに調べた食物アレルギー条件である SA/OVA/LL 群と比較した (t 検定)。

(実験 3) 7 週齢の雌性 BALB/c マウス 6~7 匹に SA 0.3 mg/匹、Flurbiprofen (FP) 0.2 mg/匹あるいは NS-398 (NS) 0.2 mg/匹を併用下、OVA 1 mg を生理食塩液 (OVA/S) あるいは LL 媒体 (OVA/LL) で 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 OVA 10 mg/0.4 mL /匹の割合で経口投与して惹起した 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。実験 1 と同様にアナフィラキシー症状を観察し、血清中の OVA 特異的 IgG1 抗体を測定した。

(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

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的手法を用いて、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。

すでに、データセットの準備は終わり、アレルゲンに特有のセグメント (3~8 残基) の周辺にどのようなアミノ酸が分布しているかを解析し、特徴的な分布を見いだしている。各アミノ酸配列に対して、アレルゲンらしさを特徴づけるプロット (AUF プロット) を作成し、AUF ピークと立体構造及びエピトープ位置の相関について解析を行った。

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

この一年間に新たに論文に発表されたエピトープについては、NCBI PubMed を検索し、11 種のアレルゲンで総エピトープ数 27 種について情報を追加した。

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²⁾。

(4) 発現タンパク質の 2D-DIGE による網羅的解析 (i) EGFP 組換え・非組換えモデル鶏肉のタンパク質発現差異解析

遺伝子組換えニワトリ³⁾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し、孵卵前後の個体を用いた。鶏肉 1g に対し 20mL の PBS を加え、Polytron (Kinematica) を用いて破碎し、鶏肉中のタンパク質を抽出した。10000rpm, 10min で沈殿を取り除いた後、Dismic-45 (Advantec) にてフィルター濾過後、試料とした。試料は使用時まで -80°C で保存し

た。

試料溶液中のタンパク質濃度を 2-D Quant Kit (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) にて測定し、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) を用いて脱塩・脱脂した。各個体 (非組換えニワトリ: 3 個体, 組換えニワトリ: 3 個体) から抽出した鶏肉タンパク質 50 μ g を 10 μ l の溶解バッファー (30mM Tris, 7M Urea, 2M Thiourea, 4% [w/v] CHAPS) に溶解後、400pmol の Cy5 で標識し、10pmol の Lysin で標識を停止した。内部標準として、6 個体から抽出した鶏肉タンパク質を等量ずつ混合し、400pmol の Cy3 で標識したものを用いた。Cy3 で標識した内部標準と Cy5 で標識したサンプルを混合し、等量の 2x サンプルバッファー (7M Urea, 2M Thiourea, 4% [w/v] CHAPS, 2% [w/v] DTT, 2% [v/v] IPG buffer pH3-11NL) を加えた後、410 μ l の膨潤バッファー (7M Urea, 2M Thiourea, 4% [w/v] CHAPS, 0.2% [w/v] DTT, 1% [v/v] IPG buffer pH3-11NL) を加え、Immobiline Drystrip (pH3-11 NL, 24 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、300V で 3 時間、600V で 3 時間、1000V で 3 時間、8000V で 7 時間、20°C 下で行った。等電点電気泳動終了後の Drystrip を 0.5% (w/v) DTT を含む平衡化バッファー (100mM Tris-HCl [pH8.0], 6M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS, and a small amount of BPB) 中で室温 15 分振とうして還元後、4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファー中で室温 15 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 EttanDALT six (GE Healthcare) を用いて分離し (2次元目)、Typhoon9400 (Amersham Biosciences) を用いて Cy3 (532nm/580BP30) および Cy5 (633nm/670BP30) の蛍光を検出した。取得した蛍光イメージは Image Quant TL (GE Healthcare) にて解析するエリアを切り出し、Decyder Software ver. 6 (GE Healthcare) にて蛍光発現差異解析を行った。

各サンプルの Cy5 蛍光強度を内部標準サンプルの Cy3 蛍光強度で補正し、各スポットの GM/Non-GM 比の平均値を求めた。Non-GM に対し GM で 2 倍以上の発現差異がみられたスポットについて、Student's t-test による有意差検定を行った。

発現差が認められたタンパク質の同定には、鶏肉タンパク質 (100 μ g) を 2次元分離した後、アクリルアミドゲルを CBB染色し、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 μ 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°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 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -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 タンパク質データベース (All entries) 内での相同性検索を行った。

(ii) 2D-DIGE 法による遺伝子組換え・非組換えジャガイモタンパク質の発現差異解析

ジャガイモタンパク質の抽出は、ジャガイモ 1g 当たり 5mL の細胞溶解バッファー (30mM Tris, 2M Thiourea, 7M Urea, 4% CHAPS) 中で、Polytron (Kinematica) を用いて破碎し、10000rpm, 10min で沈殿を取り除いた。試料は使用時まで -80°C で保存した。

試料溶液中のタンパク質濃度を 2-D Quant Kit (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) にて測定し、各群 (NT, rd29A, 35S) 5 個体から抽出したジャガイモタンパク質 25 μ g を 200pmol の Cy3 あるいは Cy5 で標識し、5pmol の Lysin で標識を停止した。内部標準として、全 15 個体から抽出したジャガイモタンパク質を等量ずつ混合し、Cy2 で標識したものを用いた。Cy2 で標識した内部標準と Cy3 あるいは Cy5 で標識したサンプルを混合し、等量の 2x サンプルバッファーを加えた後、膨潤バッファーを加え、Immobiline Drystrip (pH3-10 NL, 13 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、500V で 4 時間、1000V で 1 時間、8000V で 4 時間、20°C 下で行った。等電点電気泳動終了後の Drystrip を 0.5% (w/v) DTT を含む平衡化バッファー中で還元後、4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファー中で 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) 中で分離した (2次元目)。

Typhoon9400 (GE Healthcare) を用いて Cy2 (488nm/520BP40) Cy3 (532nm/580BP30) および Cy5 (633nm/670BP30) の蛍光を検出した。取得した蛍光イメージは Image Quant TL (GE Healthcare) にて解析するエリアを切り出し、Decyder Software ver. 6 (GE Healthcare) にて蛍光発現差異解析を行った。各サンプルの Cy3 あるいは Cy5 蛍光強度を内部標準サンプルの Cy2 蛍光強度で補正し、各スポットの GM/Non-GM 比の平均値を求めた。Non-GM に対し GM で 2 倍以上の発現差異がみられたスポットについて、Duunett 法による有意差検定を行った。

発現差が認められたタンパク質の同定には、ジャガイモタンパク質 (300 μ g) を 2 次元分離した後、アクリルアミドゲルを Sypro Ruby Protein Gel Stain (Molecular probes) 染色し、相当するスポットを切り出した。切り出したゲルは 40%メタノール・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、乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (30 μ g/ml Trypsin Gold-Mass Spec Grade [Promega, Madison, Wisc., USA], Protease max [Promega, Madison, Wisc., USA]) を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間ゲル内消化を行った。消化ペプチドを α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -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 nr タンパク質データベース内での相同性検索を行った。

C. 研究結果および D. 考察

(1) 遺伝子組換えジャガイモアレルゲンの量的、質的変動の解析手法の検討

(i) ジャガイモ中タンパク質の抽出

遺伝子組換え (GM)、非組換え (Non-GM) ジャガイモ塊茎 1g あたり約 6mg 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 (図 1a)。ジャガイモ中のタンパク質は種類が少なく、遺伝子組換え、非組換えジャガイモ間で顕著なパターンの変化はみられなかった。

(ii) Western blot 法によるジャガイモ中に含まれる既知アレルゲンの定量

ジャガイモアレルゲンには、表 1 に示すように 4 つのアレルゲンが知られており、これらを検出するために必要な特異的抗体を作製した。他のジャガイモタンパク質と交叉しないペプチド配列を検索し、合成ペプチドをウサギに免疫して特異

的抗体を得た (表 1)。Sola t 2 と Sola t 4 はアミノ酸配列の相同性が高く、2 つを分けて検出するのは困難なため、両方を同時に検出出来る配列を選択した。これらの既知アレルゲン特異的抗体を用いて Western Blot 法による Non-GM (NT)、GM (rd29A, 35S) ジャガイモ抽出物中のアレルゲン発現量変化の検討を行った (図 1b-d)。いずれのアレルゲンも、Non-GM と比べて GM の発現量に顕著な差はみられなかった。

(iii) ジャガイモ特異的 IgE 陽性血清を用いた IgE 結合タンパク質の検出

Non-GM および GM (rd29A, 35S) ジャガイモの抽出タンパク質を 1D-SDS-PAGE で分離し、ジャガイモ特異的 IgE をもつ患者血清との反応性をイムノプロットにより評価した。実験に使用した血清の情報は、表 2 にまとめた。実験の結果、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 (図 2)。ほとんどのジャガイモアレルギー患者血清中の IgE は、既知アレルゲン Patatin (Sola t 1) と分子量の等しい 42kDa タンパク質との結合が認められた。その他、ジャガイモ抽出タンパク質のうち血清中の IgE と結合したタンパク質には、14kDa (Subject 13)、21kDa (Subject 1, 5, 7, 8, 10, 11, 14)、75kDa (Subject 4) の分子量のものがあつて、患者による個人差がみられた。

さらに Non-GM および GM (35S) ジャガイモ抽出タンパク質を 2 次元電気泳動にて分離し、転写膜を Cy5 (総タンパク質) および ECL (血清中特異的 IgE) にて 2 重染色し、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。Subject 4 の血清を用いた結果を図 3 に示した。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、pI の変化などの質的変動はみられなかった。

(iv) 2 次元電気泳動を用いた IgE 結合タンパク質スポットの検出および同定

患者血清を用いた 1D-immunoblot では、いくつかの IgE 結合タンパク質が検出された。そこで、2D-immunoblot を用いて IgE 結合タンパク質スポットの同定を試みた。

1D-immunoblot で特徴的な IgE 結合パターンを示した 3 名 (Subject 4, 13, 14) の血清の IgE 結合タンパク質スポットの 2 次元電気泳動パターンを図 4 に示した。Cy5 および ECL による 2 重染色は実験 (3) と同様に行った。その結果、図中に矢印で示した IgE 結合タンパク質スポット 1-14 の位置を決定できた。これら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 フラグメントイオン質量データを NCBI nr データベース (Taxonomy; *Solanum*