

的IgG1抗体をELISAで測定し、感作の成立を確認した。

(3) アレルゲン予測の解析法

(i) タンパク質のアレルゲン性のバイオインフォマティクス手法による予測

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。これまでアレルゲンのアミノ酸配列の解析からタンパク質結合に関わる部位を予測するためのAUFプロットという計算法を開発した(図1)。平成23年度は、免疫系の中でデータが充実しているT細胞エピトープの物理的特徴の抽出を行うために、エピトープのアミノ酸配列を収めたImmune Epitope Databaseよりマラリア原虫のT細胞エピトープを取得し、解析データとした。

(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

2010年6月から2011年5月の間にNCBI PubMedに掲載された論文のうち、例年通りのキーワード検索によりエピトープ配列決定に関するものを抽出し、ピアレビューを行ってエピトープ情報を報告していると判断された文献に記載されているエピトープ情報をADFSのデータに追加した。具体的には、4報の論文から6種のアレルゲンについて、総エピトープ数32の情報を追加した(表1)。本年度のアレルゲンおよびエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1552となった。エピトープ既知のアレルゲン数は98種となった。

また、低分子量のアレルゲンに関する情報がまとめられたデータベースというものは2012年3月現在ウェブ上には存在せず、わずかに「AllAllergy」というDr Harris Steinmanらによる低分子・高分子を問わない形式のデータベースがあるのみである

(<http://www.allallergy.net/>)。

AllAllergyには2010年10月現在5226種のエントリが登録されているが、その中には、動物名や総称など、低分子アレルゲンデータベースに収載するにはふさわしくないエントリが多数含まれている。そこで、次の方法によりデータを精査・選別した。

- 1) AllAllergyの全データをHTMLでダウンロードし、Excelファイル形式に変換(5226件)。
- 2) 一般名称や動植物名などのエントリを削除(1906件)。
- 3) AllAllergyのDescription2種(IGE AND IMMUNE および NON IMMUNE) がともに「Ni1 または Unknown」であるものを削除(1468件)。

4) AllAllergyのIGE AND IMMUNE: 欄に、アレルギー・免疫系の関与を意図する記述がないエントリを削除(918件)。

なお、上記4)の作業時に、NCBI等の外部データベースから、CID(compound ID)やCAS番号などの情報を可能な限り取り入れた。以上の作業を図示すると、図2のようになる。

次に、上記データセットを基に、CTCラボラトリーシステムズ社に委託して、低分子アレルゲンデータベースのシステム開発を行った。URLは以前からのADFSと同一である

(<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>)。

画面はタンパク質アレルゲンと同様にメインウィンドウと詳細情報を表示するEntry Viewウィンドウとに分かれており、必要に応じNCBI PubChem等の外部サイトへのリンクが更に別ウィンドウで開くようになっている。

検索機能は下記の3種類を用意した。

- 1) Name Search: 低分子アレルゲンをアルファベット順にリストしたもの。
- 2) Keyword Search: 下記の15フィールドおよびそれら全てに対してキーワード検索をかけることができる。AllAllergy, Canonical SMILES, CAS Name, CAS Number, CID, Formula, InChI, InChI Key, Iso SMILES, IUPAC Name, Mol Weight, Name, Open Eye Name, Systemic Name, Traditional Name。
- 3) Structure Search: JChemPaint 3.2.0をエンジンとする構造検索ツールを実装した。これにより、ユーザーはクエリ構造を自分で描画し、部分一致あるいは完全一致により本データベースの化合物を検索することができる。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間での差を知るための網羅的解析

生物資源研究所より購入した10種(日本種6種 Nipponbare, Koshihikari, Sasanishiki, Akitakomachi, Hitomebore, Hinohikari、インディカ米1種 Kasalath、タイ米1種 Bleiyo、カリフォルニア米1種 Rexark、中国米1種 Cho-ko)の10種のコメの品種を用いて、それぞれ玄米を粉碎し、1N NaClで抽出し、抽出液中のタンパク質濃度をあわせて、2次元電気泳動用のサンプルとした。25ugのタンパク質を2-D Clean-Up Kitで精製後、日本晴は、内部標準品用としてCy2で標識し、一方、測定用として日本晴を含む10種の米をそれぞれCy3またはCy5で標識した。3種の蛍光剤で標識したコメ抽出タンパク質を等量混合し、溶液をImmobiline Drystrip (pH3-10 NL, 長さ13 cm)に付与した。Drystripを膨潤した後、1次元の等電点電気泳動は、20°Cで、500 V, 4 hr; 1000 V, 1 hr; 8000 V, 4 hrの順で行い、次いで、

strip を平衡化 buffer (100mM Tris-HCl [pH8.0], 6M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS) containing 0.5% (w/v) DTT で平衡化後、2 次元目は、10–20%のグラジエントゲル(DRC Co Ltd)を用いた SDS-PAGE を行った。2 次元電気泳動後、蛍光強度は、Typhoon 9400 画像解析装置 (GE Healthcare 社)にて、Cy2, Cy3, and Cy5 の蛍光色素をそれぞれ、520nm-bandpass (520BP40), 580nm-bandpass (580BP30), 670nm bandpass (670BP30) を用いて測定した。それぞれの蛍光色素標識で得られたスポットが一致するものか否かは、Decyder software version 6 (GE Healthcare)にて決定した。

また、コメタンパク質の 2D-DIGE の他機関との国際バリデーション試験を開始した。参加機関は、国立医薬品食品衛生研究所、(独)農研機構 食品総合研究所の国内 2 機関、および University of New York Buffalo, Donald Danforth Plant Science Center, Proteomics Center University of Nevada Reno の国外 3 機関である。

バリデーションのサンプルには、(独)生物資源研究所より入手した日本晴、コシヒカリ、Bleiyo, Rexark の 4 品種を用い、玄米を粉砕して各機関に送付した。各機関でコメタンパク質の抽出からタンパク質発現差異解析までを行い、検出スポット数および日本晴に対して 5 倍以上の発現差異がみられたスポット、さらにアレルゲンスポットのパターン及び発現差異結果を比較した。

C. 研究結果および考察

(1) 遺伝子組換えコメタンパク質の 2D-DIGE による量的、質的変動の解析手法の検討

(i) 通常栽培時の NT および RBP コメ間でのタンパク質発現差異解析

通常栽培時の RBP 組換え、および非組換えコメ (NT) の代表的な Cy 染色パターンを図 3 に示した。黄色に見えているスポットは 2 サンプル間での発現量が同等であるスポットを示している。赤色のスポットは RBP 組換えコメでの発現量が NT コメの発現量よりも多いスポットを、緑色のスポットは逆に NT コメの発現量よりも少ないスポットを示している。Decyder ソフトウェアによりスポットのマッチングを行い、再現良く得られた約 500 スポットのうち、RBP (通常) /NT (通常) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 以上あるいは 1/2 以下となるものを抽出した。その結果、NT 群に比べて 2 倍以上の発現変動がみられたスポットは 2 スポットのみであった (図 3、丸で示したスポット)。これらのスポットからタンパク質を抽出し、トリプシン消化ペプチドの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、Putative abscisic

acid-induced protein (spot A) が同定された (表 2)。

(ii) ストレス栽培による NT コメのタンパク質発現変動

次に、200 mM NaCl の塩ストレス下で 30 h 栽培した NT コメと通常栽培の NT コメ間で、発現が変動しているタンパク質を解析した。その結果、NT (ストレス) /NT (通常) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 倍以上となったスポットは 91 スポットであった (図 4)。これらのスポットの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、91 スポット中 50 スポットを同定することができた (表 3)。塩ストレス栽培した NT コメでは、アレルゲンタンパク質 RAG1 (spot J)、RAG2 (spot K)、および IgE 結合タンパク質である 19 kDa globulin precursor (spot L) のタンパク質発現が増大していた。

(iii) 塩ストレス栽培による RBP コメのタンパク質発現変動

同様に、塩ストレス下で栽培した RBP コメと通常栽培の RBP コメ間で、発現が変動しているタンパク質を解析した。その結果、RBP (ストレス) /RBP (通常) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 倍以上となったスポットは 7 スポットであった (図 5)。これらのスポットタンパク質同定結果は、表 4 に示した。NT コメにおいて塩ストレス栽培で発現が変動したスポットの多くは RBP コメでは発現の変動がみられなかった。さらに、塩ストレス栽培 NT コメにおいて発現が大きく変動していた malic enzyme (spot F)、granule-bound starch synthase I (spot G)、putative abscisic acid-induced protein (spot A) の発現量の変動も、塩ストレス RBP コメでは小さかった。アレルゲンタンパク質 RAG1、RAG2、および IgE 結合タンパク質 19 kDa globulin precursor の発現は、RBP コメでは塩ストレスの有無により変動していなかった。

(iv) 塩ストレス栽培時の NT および RBP コメ間でのタンパク質発現差異

塩ストレス栽培時の RBP および NT コメ間で、発現差の大きいタンパク質を解析した。その結果、RBP (ストレス) /NT (ストレス) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 倍以上となったスポットは 36 スポットであった (図 6)。これらのスポットの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、36 スポット中 20 スポットを同定することができた (表 6)。塩ストレス栽培時に NT コメで発現が大きく減少していた Heat shock protein 101 (spot C)、Heat shock protein 90 (spot E)、Putative late embryogenesis abundant domain-containing protein (spot F)、Putative seed maturation protein (spot D) の発現と、塩ストレス栽培時に

NTコメで発現が大きく増大していた
Glanule-bound starch synthase I (spot G)、Late embryogenesis abundant protein; expressed (spot H)、Cold shock domain protein (spot L) の発現に有意な差がみられた。

(v) 塩ストレス耐性遺伝子組換えスタックモデルタバコのタンパク質発現差異解析

タバコ葉から抽出したタンパク質を2D-DIGE法により2次元分離した後、Decyderソフトウェアによりスポットのマッチングを行ったところ、およそ700のスポットが再現良く検出された。

まず、WTとSeFLA単組換え株L11のタンパク質発現差異を解析し、L11/WTの蛍光比の平均値 (av. Ratio) が2以上あるいは1/2以下となるものを抽出した。その結果、WT群に比べて2倍以上の発現変動がみられたスポットは4スポットのみであった (図7、丸で示したスポット)。次に、WTとRBP単組換え株R74のタンパク質発現を比較したところ、3スポットにおいて2倍以上の発現差異が検出された (図 8)。

WTと、SeFLAおよびRBP組換えスタック株LR1のタンパク質発現を比較した結果、5スポットにおいて2倍以上の発現差異が検出された (図 9)。また、WTとスタック株LR2間でタンパク質発現が2倍以上異なるスポットは、9スポットであった (図 10)。単組換え株では2倍以下の発現差異であったにもかかわらず、スタック株で2倍以上の発現差異が現れたスポットは6スポットであった。

これらの発現差異を示したスポットをゲルから切り出し、トリプシン消化ペプチドのMALDI-TOF MS/MS相同性検索を試みたが、タンパク質含量が少ないために同定出来なかった。

(2) 動物を用いるアレルギー性の検討

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 0.5 に対して、陰性対照とした PEP 群は 0.0 と同レベルであった一方、陽性対照とした OVA 群は 2.3 と有意に上昇した。Vehicle 群に対して、通常および塩水栽培した組換えコメ系統 1 の GM1n および GM1 s 群のスコアが有意に上昇した。しかし、通常および塩水栽培コメとも非組み換えコメに対して組み換えコメ群間に有意な差は認められなかった (図 11)。また、組換えコメ系統 2 は Vehicle 群および非組み換えコメ群に対していずれも有意な差は認められなかった。非組み換え、組換えコメ系統 1 および組換えコメ系統 2 のいずれにおいても、通常および塩水栽培の間に差は認められなかった。

血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、通常栽培コメの NGn 群 3/7 例、GM1n 群 2/6 例、GM2n 群 0/6 例、塩水栽培コメの NG s 群

3/6 例、GM1s 群 2/6 例、GM2s 群 2/7 例のマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出された (図 12)。

マウスの食物アレルギーモデルを用いて、通常および塩水栽培した2系統の遺伝子組換えコメおよび非組換えコメ抽出蛋白質の食物アレルギー性を比較した。それぞれのコメ抽出液を濃縮して1匹あたり蛋白質0.8 mgを週に2回の頻度で経口投与し、それぞれ蛋白質8 mg (2回目) で惹起した。通常および塩水栽培のそれぞれにおいて、非組み換えコメに対して組換えコメ系統1および組換えコメ系統2ともアナフィラキシー症状のスコアに有意な差は認められなかった。抗原特異的IgG1抗体価検出の頻度および抗体価も同レベルであったことから、遺伝子組換えコメおよび非組換えコメの食物アレルギー性は同等であると考えられた。また、遺伝子組換えコメ1、遺伝子組換えコメ2および非組換えコメとも通常および塩水栽培間に食物アレルギー性の差は認められなかった。

(3) アレルギー予測の解析法

(i) タンパク質のアレルギー性のバイオインフォマティクス手法による予測

a) データセット

エピトープのアミノ酸配列を収めた Immune Epitope Database よりマラリア原虫の T 細胞エピトープを取得し、解析データとした。ただこれはエピトープ部分のデータしかないので、抗原タンパク質のアミノ酸配列全体をNCBIより取得した。また、タンパク質として細胞表面に出ている部分を注目するために、マラリア原虫由来の1本型膜貫通タンパク質を SOSUIMP1 で抽出し、その細胞外ドメインのアミノ酸配列を用いた。

b) エピトープ部位でのAUFピーク

図1のユニバーサルカーブは、アレルギーにおけるユニークな配列断片 (AUF) が示す特徴的なアミノ酸の分布である。これまでの研究でAUFはタンパク質の結合性と関係していることが分かっている。そして、各アミノ酸は、下の表に示した通りの強度分布でAUFに寄与している。そこで、図1のユニバーサル分布とAUFインデックスを用いて、アミノ酸配列だけからAUFプロットを作ると、そのピークは結合部位になりやすさの傾向を示していることになる。ただ実際のアミノ酸配列でAUFプロットを作ってみると、図13で示した通りAUFピークは実際のエピトープ部分以外にもかなり多く存在している。従って、エピトープ配列断片を予測するには、結合部位となっているAUFピークと結合とは関係のないAUFピークとを、別のアルゴリズムでアミノ酸配列から判別しなければならない

ここでは1本型膜タンパク質における細胞外ドメインにおけるエピトープを注目しているが、そ

の理由はアミノ酸配列全体の中で膜内領域と細胞内ドメインでは明らかにエピトープの頻度が少ないからである。まず、細胞外ドメインの中でエピトープの位置関係を調べたところ、配列上膜に近い根元の領域と先端領域にエピトープが多く存在していることが分かった。もちろん同じ領域に、エピトープの存在しないタンパク質も少なくないので、例えば先端領域のアミノ酸配列を切り出し、そこにあるエピトープ中の AUF ピークとそれ以外の AUF ピークをデータとして抽出し、判別の 2 群のデータとした。そして、ピーク前後 3 残基の電荷密度をプロットしたものが、図 14 である。これは正電荷密度と負電荷密度の 2 次元散布図に対して、頻度をバブルグラフ（頻度が円の大きさを示してある）で示したものである。興味深いことに、エピトープにある AUF ピークでは電荷の密度が低いのにに対して、エピトープ以外の部分での AUF ピークでは電荷密度が高いということが分かった。このことを利用してエピトープ部分の予測を試みたところ、表 6 のような高精度な予測結果が得られた。つまり、1 本型膜タンパク質の細胞外ドメインの先端部分にあるエピトープについて、その 3 分の 2 は抽出することが可能で、予測されたエピトープの 90% が正しい予測であった。以上、アレルゲンのアミノ酸配列に対する分布の解析から得られた AUF インデックスを用いて、T 細胞エピトープの予測が可能かどうかを調べてみた。T 細胞エピトープは、一旦樹状細胞で消化され、ポリペプチドの形で提示されるもので、表面抗原であるアレルゲンのエピトープとは大きく異なると考えられている。しかし、実際に提示されるポリペプチド部分がアレルゲンのエピトープと同じような分子認識によって選ばれているとすれば、予測が可能かもしれないと考え行ったら、アレルゲンのアミノ酸の解析から得られた情報を用いて T 細胞エピトープも予測可能であった。もちろんここでの解析対象は、マラリア原虫という 1 つの生物種に対して、1 本型膜タンパク質の細胞外ドメインだけという限られたものであった。従って、全 T 細胞エピトープへの一般化は早計かもしれないが、物性的な特徴があってエピトープ部分が選ばれていることは、非常に重要な結果であると思われる。

(ii) アレルゲンデータベース (ADFS) の構築について

今年度の追加作業により、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1552 本となった。また、エピトープ情報は 17 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ため(表 1)、エピトープ既知のアレルゲンの数は 98 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。また、低分子アレルゲンデータベース構築が平成 23 年度に終了し、これらの機能を実装した新バージョンの ADFS は、平成 24 年 3 月 22 日にリリースされた。ユニークユーザ数は 4 月 10 日時点で 1243 名である。

(4) 発現タンパク質の 2D-DIGE による品種間の差を知るための網羅的解析

コメタンパク質からは、およそ 700 スポットが再現性よく検出された。統計学的解析を行った結果、日本産 6 品種間のタンパク質発現差は少なく、日本晴における発現量に対し 5 倍以上の発現差を示したタンパク質スポット数は、いずれの品種も 3 以下であった。対して海外産 4 品種では、インド産の Kasalath では 29 スポット、タイ産の Bleiyo では 23 スポットが 5 倍以上の発現差を示した。アメリカ産の Rexark および中国産の Cho-ko はやや少なかったものの、それぞれ 7 スポット、9 スポットが 5 倍以上の発現差を示した (図 15)。日本晴と発現差異が 5 倍以上のみられたスポットからは、RA14 や RA17 などのアレルゲンタンパク質も同定された。

また、コメタンパク質の 2D-DIGE の他機関との国際間バリデーション試験は、各機関ともデータのばらつきがあるが、データの収集が終わり、解析作業を継続中である。

D. 結論

(1) RBP 遺伝子導入組換えコメタンパク質及び塩ストレス耐性遺伝子組換えスタックモデルタバコの 2D-DIGE による解析

2D-DIGE 法を用いて RBP 遺伝子導入コメと、非導入コメのタンパク質発現差異解析を行ったところ、RBP 遺伝子導入コメでは putative abscisic acid-induced protein の発現も増加していた。なお、RBP 組換えコメでは NT コメに比べ、塩ストレス栽培下と通常栽培時の間で、アレルゲンを含むタンパク質発現の変動が少ないことが明らかとなった。さらに、塩ストレス耐性を付与する遺伝子 SeFLA および RBP を、それぞれ単独導入したタバコおよびスタック株を用いた葉のタンパク質発現差異解析結果から、スタック株では単独発現株ではみられなかった、軽度の非組換え体とのタンパク質発現差異もみられる可能性が示唆された。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

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、組換えコメ及び非組換えコメ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

一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。

(3) アレルゲン予測の解析法では、

(i) タンパク質のアレルゲン性のバイオインフォマティクス手法による予測 - 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)ピークを用いてT細胞エピトープの予測も可能であることが示された。

(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ゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新作業を行った。新たに6種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、アレルゲンデータセットの整備、検索に用いるアレルゲンのMotifの更新を行った。また、新たに低分子アレルゲンの検索画面をADFS内に立ち上げた。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種の差を知るための網羅的解析

2D-DIGE法を用いて10品種の国産、国外のコメ塩抽出タンパク質の発現量の定量的に比較を行い、2D-DIGEが有用な方法であることが示された。また、4品目のコメを用いる5機関での国際バリデーション試験が進んでいる。

E. 参考文献

- 1) http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/codex/code_x.html
- 2) EFSA GMO Panel: Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed., EFSA J. (2010) 8(7):1700, p1-p168

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asakawa N, Sakiyama N, Teshima R, Mitaku S. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. *J. Biochem.*, 147, 127-133 (2010)
- 2) Satoh R, Nakamura R, Komatsu A, Oshima M, Teshima R. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 59, 437-444 (2011)
- 3) 手島玲子, 中村亮介: 食品中のアレルゲンの予測, *日本食品衛生学会誌*, 52, 1-9 (2011)
- 4) 手島玲子 非組換え植物の生物学的変化の評価とOmics技法の活用に関して, *イルシー*, 104, 4-8 (2011)
- 5) 手島玲子: わが国の食物アレルギー対策

と検査法, *月刊フードケミカル*, 2011-6, 19 (2011)

6) 手島玲子: アレルゲン検査の現状と課題, *日本小児アレルギー学会誌* 25(1), 57 (2011)

7) 中村里香: プロテオミクス技術を用いたアレルゲン解析法, *ぶんせき* 2011-6, 350 (2011)

8) 手島玲子 経口感作の成立と消化管粘膜免疫機構, *アレルギー・免疫* 19(1), 40-44 (2012)

9) 中村里香, 中村亮介, 手島玲子 古代米(赤米・黒米)のアレルゲン発現プロテオミクス解析 *日本食品化学学会誌* 18(3), 143-149 (2011)

10) 佐藤里絵, 中村里香, 手島玲子 イムノプロテオミクス手法を用いたソバIgE結合タンパク質の網羅的検出 *日本食品化学学会誌* 18(2), 103-109 (2011)

11) Shindo T., Kanazawa Y., Saito Y., Kojima K., Ohsawa M., Teshima R. Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate. *J. Toxicol. Sci.* 37, 307-315 (2012)

12) Teshima R., Nakamura R., Satoh R. Proteomic and allergenomic analyses of rice and potato proteins. *Proceedings of the 3rd international symposium on "Frontiers in Agriculture Proteome Research"* p124-p129 March(2012)

2. 学会発表

- 1) 中村里香, 中村亮介, 手島玲子 赤米・黒米におけるアレルゲンタンパク質発現量の解析 *日本食品化学学会第17回総会・学術大会* (2011.6)
- 2) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 島崎高嘉, 春日美江, 篠崎(山口)和子, 菊池彰, 渡邊和男, 手島玲子 プロテオミクス手法を用いた *Arabidopsis DREB1A-組換えジャガイモのアレルゲン性試験* 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)
- 3) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 手島玲子 プロテオミクスを用いたコメアレルゲンタンパク質アイソフォームの解析 第84回日本生化学会大会 (2011.9)
- 4) Nakamura R., Nakamura R., Teshima R. Proteomic analysis of rice allergens in red rice and black rice. (Proteomic and allergenomic analyses of rice and potato proteins. 3rd International Symposium *Frontiers in Agriculture Proteome Research* (2011.11)
- 5) Teshima R. Proteomic and allergenomic analyses of rice and potato proteins. 3rd International Symposium *Frontiers in Agriculture Proteome Research* (2011.11)
- 6) Satoh R., Nakamura R., Komatsu A., Teshima R. Immunoproteomic analysis of rice allergens between non-transgenic and transgenic plants with high-level tryptophan accumulation. 3rd International

Symposium Frontiers in Agriculture Proteome
Research (2011.11)

7) 中村里香、中村亮介、小関良弘、手島玲子 ストレス耐性遺伝子を導入した遺伝子組換えイネ種子のアレルゲン性評価 第132回日本薬学会年会 (2012.3)

8) 中村里香、佐藤里絵、手島玲子 赤米・黒米のアレルゲン発現プロテオミクス解析 日本薬学会第131回年会 (2011.3)

9) 中村亮介、石渡亜耶乃、樋口雅一、中村里香、川上 浩、手島玲子 新しいアレルギー試験法 EXiLE 法による加熱卵白アレルゲンの IgE 応答性の解析 日本薬学会第131回年会 (2011.3)

10) 手島玲子、中村亮介、食物アレルゲンの消化と抗原性. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2011.11)

11) 佐藤里絵、中村里香、手島玲子、ソバ IgE 結合タンパク質の網羅的検出. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(2011.11)

12) Teshima R. Characterization of food allergen, its prediction, and regulation of food containing allergic ingredients in Japan. Joint Congress of APAPARI 2011 & 48th JSPACI (2011.10)

13) 香取輝美、新藤智子、大沢基保、小島幸一、手島玲子、食物アレルゲン性の in vitro 評価系の開発: (3) In vitro 消化処理の適用方法. 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

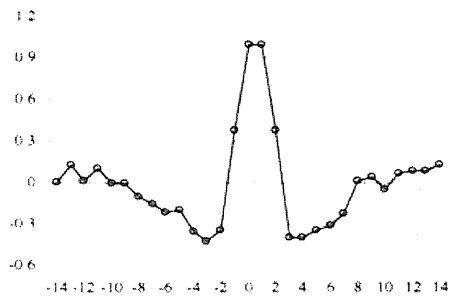
14) 新藤智子、香取輝美、金澤由基子、小島幸一、手島玲子、マウスの経口食物アレルギーモデルの発症機序: 腸管における IgA 産生の変化. 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

15) 石渡亜耶乃、中村亮介、樋口雅一、内田好海、中村里香、川上 浩、宇理須厚雄、手島玲子、培養細胞を用いた加熱卵白のアレルゲン性の解析, 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

16) Adachi, R., Sakai, S., Nakamura, A., Akiyama, H., Teshima, R., Urisu, A. A novel protein extraction method for ELISA to determine food allergens in processed foods. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011.9)

17) Kimura Y, Katayama S., Teshima R., Akiyama H., Nozawa A., Tozawa T., Nakamura S. Analysis of T cell epitopes of a major buckwheat allergen, Fag e 2, by using cell-free protein synthesis system. 第7回無細胞科学松山国際シンポジウム(2011.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



アミノ酸	A	アミノ酸	A
M	-201.5	D	170.0
W	-161.0	E	224.5
F	-159.0	A	238.5
C	-158.5	G	253.5
Y	-152.0	K	285.0
H	-141.0	それ以外	0.0
P	-90.0		

図 1. AUF のユニバーサル分布とアミノ酸の AUF インデックス。これを組み合わせることで、タンパク質結合に関わる部位を列挙できる

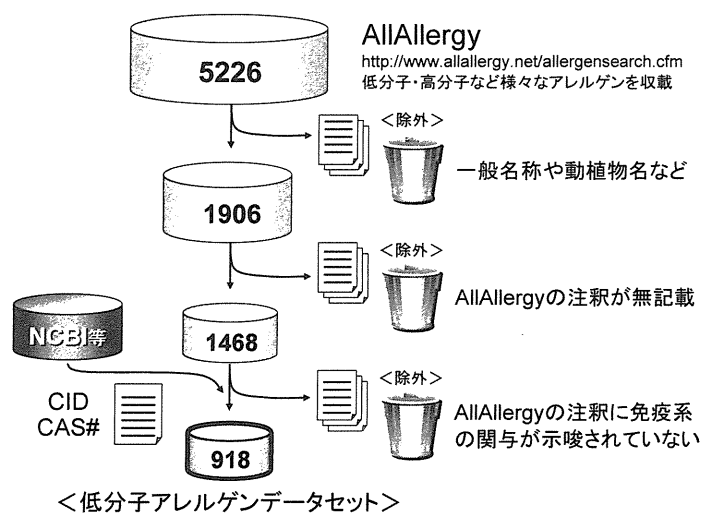


図 2. 低分子アレルゲンデータベースのデータセット作成の模式図

多くの高分子・低分子アレルゲンに関するデータを収載した既存のデータベース AllAllergy より、管理者の許可を得て 5226 種のデータを収集した。これらのデータに AllAllergy ID を振り、その後、3 段階のピアレビューにより 918 種まで低分子アレルゲンのデータを絞り込んだ。ここに、NCBI PubChem の CID、および CAS 番号を同定可能な限り付与し、CID もしくは AllAllergy ID を介して外部データの関連づけを行った。

表 1.今年度新たに追加されたアレルゲンエピトープ

#	N	start	end	Sequence	Description	Method	TYPE	Name	Reference (PMID)	GenBank acc.No
01	1	31	63	NIQLTNLNKVN SVGRVLYA MPVRIWSSATGNVA		SPOT assay	L	Ara h ?	20541807	AAM46958
	2	106	114	LGVS DTKGA		SPOT assay	L	Ara h ?		
	3	145	159	VDSVK T V P W N S V S G A		SPOT assay	L	Ara h ?		
	4	166	174	IYDSSTKTL		SPOT assay	L	Ara h ?		
	5	190	204	QVVDL KAKL P E R V K F		SPOT assay	L	Ara h ?		
	6	208	232	ASGSLGGRQIHLIRSW SFT STLITT		SPOT assay	L	Ara h ?		
02	1	1	15	TETTSFSITK FSPDQ		SPOT assay	L	Len c ?		7428789
	2	22	45	GDSYTTKGLTLTKAVKST VGRAL		SPOT assay	L	Len c ?		
	3	50	52	PIH		SPOT assay	L	Len c ?		
	4	80	88	VADGFTFFI		SPOT assay	L	Len c ?		
	5	101	112	YLG V F N S K E Y D K		SPOT assay	L	Len c ?		
	6	131	133	PSN		SPOT assay	L	Len c ?		
	7	137	163	HIGIDVNSIKSVNTKSWNLQ NGERANV		SPOT assay	L	Len c ?		
	8	194	205	LKD V V P E W V R I G		SPOT assay	L	Len c ?		
	9	215	234	AAQEVHSWSFNSQLGHTS KS		SPOT assay	L	Len c ?		
03	1	1	15	TETTSFLITK FSPDQ		SPOT assay	L	Pis s ?		230612+230613
	2	22	45	GDSYTTKEKGLTLTKAVKNT VGRAL		SPOT assay	L	Pis s ?		
	3	59	67	GNVANFVTS		SPOT assay	L	Pis s ?		
	4	77	88	SYNVADGFTFFI		SPOT assay	L	Pis s ?		
	5	104	112	VFNSAEYDK		SPOT assay	L	Pis s ?		
	6	122	133	DTFYNAAWDPSN		SPOT assay	L	Pis s ?		
	7	140	160	IDVNSIKSVNTKSWKLQNG EE		SPOT assay	L	Pis s ?		
	8	173	184	VLTVSLTYPNVT		SPOT assay	L	Pis s ?		
	9	194	202	LKD V V P E W V		SPOT assay	L	Pis s ?		
	10	215	236	AAHEVLSWSFHSSELSGTSS SKQ		SPOT assay	L	Pis s ?		
04	1	116	130	<u>ELFAREYEGVCKSGK</u>	Crucial residues are underlined	ELISA	L	Ani s 1	20655337	AB1000095
	2	136	150	<u>RGSQWMMTLGKSCD</u>	Crucial residues are underlined	ELISA	L	Ani s 1		
05	1	313	348	EEGQEEETTKVQRYRRL SPGDV L V I P A G H P V A I N		Peptide microarray	L	Len c 1.0101	20816193	Q84UI1
	2	340	366	PAGHPVAINASSDLNLIGF GINAKNNQ		Peptide microarray	L	Len c 1.0101		
	3	355	379	LIGFGINAKNNQRNFLAGEE DNVIS		Peptide microarray	L	Len c 1.0101		
	4	373	399	EEDNVISQIQRPVKELAFP GSSREVD R		Peptide microarray	L	Len c 1.0101		
06	1	257	278	TDAVPQKKAEDVAKLDIE KKS		Immunodot blotting	L	Cl a c 14.0101	21488999	GQ906475

文献調査により今年度新たに追加されたアレルゲンエピトープ。#, アレルゲンの番号; N, 各アレルゲンにおけるエピトープの番号; start および end, 該当エピトープ配列のタンパク質アミノ酸残基上での開始番号および終了番号; Sequence, エピトープ配列; Description, 当該配列の注釈; Method, エピトープの決定方法; TYPE, リニアエピトープは L, コンフォメーションエピトープは C と表す; Name, アレルゲン名; Reference, 一次情報の PubMed ID; GenBank acc.No, GenBank Accession Number.

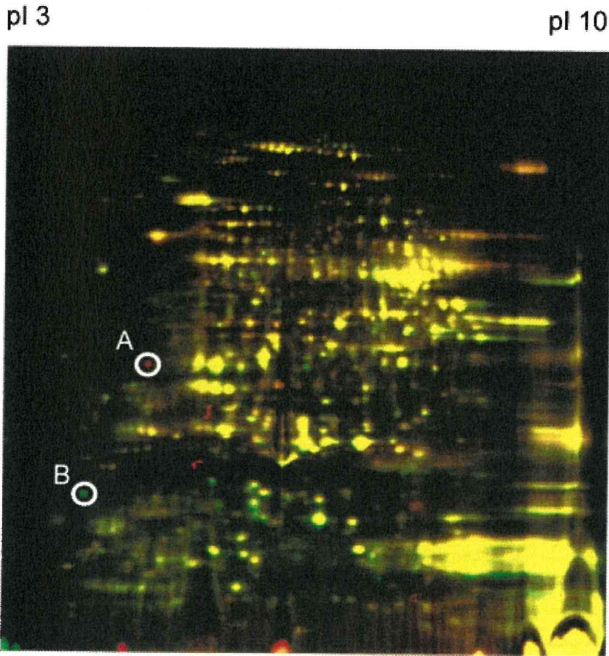


図 3 通常栽培時におけるRBP米とNT米のタンパク質発現差異

通常栽培したRBP米とNT米のタンパク質を蛍光標識後、2次元電気泳動に供した。2倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。

緑: Cy3 (通常栽培 NT 米)、赤: Cy5 (通常栽培 RBP 米)

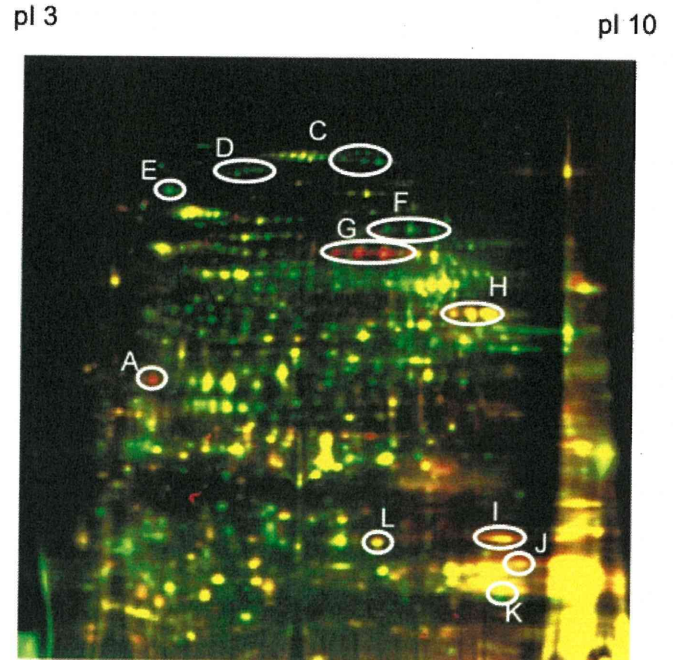


図 4 ストレス栽培によるNT米のタンパク質発現変動

通常栽培したNT米とストレス栽培したNT米のタンパク質を蛍光標識後、2次元電気泳動に供した。2倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。

緑: Cy3 (通常栽培 NT 米)、赤: Cy5 (ストレス栽培 NT 米)

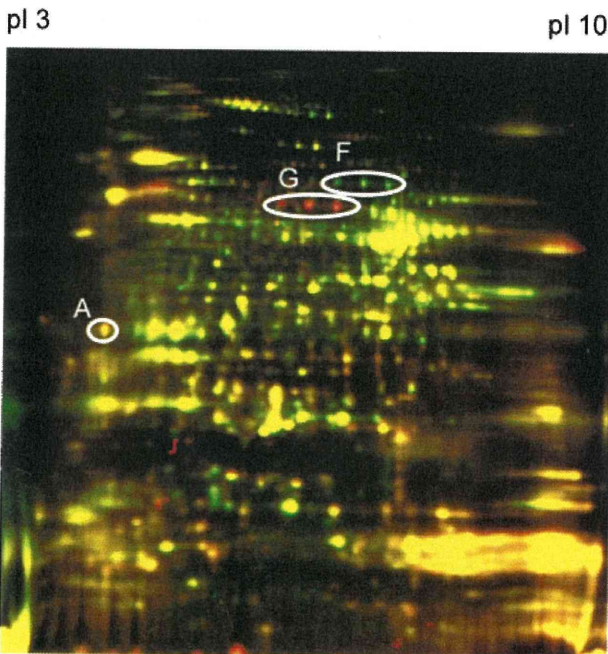


図 5 ストレス栽培によるRBP米のタンパク質発現変動

通常栽培したRBP米とストレス栽培したRBP米のタンパク質を蛍光標識後、2次元電気泳動に供した。2倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。

緑: Cy3 (通常栽培 RBP 米)、赤: Cy5 (ストレス栽培 RBP 米)

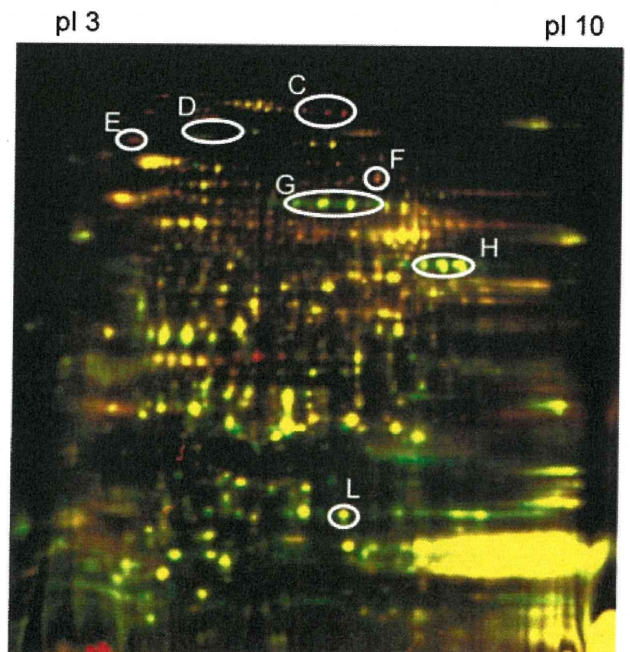


図 6 ストレス栽培時におけるRBP米とNT米のタンパク質発現差異

ストレス栽培したRBP米とNT米のタンパク質を蛍光標識後、2次元電気泳動に供した。2倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。緑: Cy3 (ストレス栽培 NT 米)、赤: Cy5 (ストレス栽培 RBP 米)

表 2 Different spots between RBP(normal) / NT(normal)

Spot reagon in Fig. 1	Spot No.	Appearance (/24 images)	Av. Ratio	pI	Mw	Protein Hits
A	444	24	2.3	4.95	27174	putative abscisic acid-induced protein
B	709	18	-2.55			n.d.

*n.d.; not identified

表 4 Different spots between RBP(stress) / RBP(normal)

Spot reagon in Fig. 3	Spot No.	Appearance (/24 images)	Av. Ratio	pI	Mw	Protein Hits
F	127	24	-2.06	6.5	64629	malic enzyme
G	180	24	2.76	8.34	66964	granule-bound starch synthase I
	185	24	2.61			
	184	24	3.49	8.45	66837	granule-bound starch synthase I
	186	24	3.83			
A	444	24	2.11	4.95	27174	putative abscisic acid-induced protein
	648	24	2.06			n.d.

*n.d.; not identified

表 5 Different spots between RBP(stress) / NT(stress)

Spot reagon in Fig. 4	Spot No.	Appearance (/24 images)	Av. Ratio	pI	Mw	Protein Hits
	22	18	2.64	5.17	93904	70 kDa heat shock protein
C	27	24	2	5.96	100945	heat shock protein 101
	28	21	2.2			
	30	24	2.1			
	42	18	2.34	5.85	94987	elongation factor 2
D	45	24	2.6			
	47	24	2.93			
	48	24	2.92	5.37	83028	putative seed maturation protein
	49	24	3.05			
	53	24	2.21			
	52	18	2.2	5.42	98597	putative aminopeptidase N
	61	21	2.24	7.36	91833	alpha 1; 4-glucan phosphorylase H isozyme
E	83	24	2.05	5.07	80449	heat shock protein 90
G	180	24	-2.11	8.34	66964	granule-bound starch synthase I
	185	24	-2.23			
	184	24	-2.15	8.45	66837	granule-bound starch synthase I
	186	24	-2.41			
H	315	24	-2.43	8.26	41835	late embryogenesis abundant protein: expressed
	320	24	-2.54			
L	698	21	-2.02	6.28	19024	cold shock domain protein 2

*n.d.; not identified

表 3 Different spots between NT(stress) / NT(normal)

Spot reagon in Fig. 2	Spot No.	Appearance (/24 images)	Av. Ratio	pI	Mw	Protein Hits
	22	18	-2.77	5.17	93904	70 kDa heat shock protein
C	27	24	-3.42	5.96	100945	heat shock protein 101
	28	21	-3.42			
	30	24	-3.57			
	31	21	-2.27	6.91	114900	putative 2-oxoglutarate dehydrogenase; E1 subunit
	42	18	-3.46	5.85	94987	elongation factor 2
	43	24	-2.41			
	45	24	-4.49			
	47	24	-4.93			
D	48	24	-2.65	5.37	83028	putative seed maturation protein
	49	24	-2.86			
	53	24	-2.33			
	52	18	-2.54	5.42	98597	putative aminopeptidase N
	60	18	-2.95	7.36	91833	alpha 1; 4-glucan phosphorylase H isozyme
61	21	-3.18				
E	83	24	-3.61	5.07	80449	heat shock protein 90
F	127	24	-3.9	6.5	64629	malic enzyme
	129	24	-3.03			
	166	21	-2.14	6.8	62716	phosphoglucose isomerase (Pgi-a)
G	180	24	4.81	8.34	66964	granule-bound starch synthase I
	185	24	6.18			
	184	24	7.07	8.45	66837	granule-bound starch synthase I
	186	24	9.91			
	222	24	-2.13	6.02	74685	Cupin family protein; expressed
	233	24	-2.41	5.62	53860	wheat adenosylhomocysteinase-like protein
	248	24	-2.15	7.51	21492	19 kDa globulin precursor
	614	21	2.04			
	639	24	2.42			
	699	21	2.32			
	849	24	2.21			
H	315	24	2.03	8.26	41835	late embryogenesis abundant protein; expressed
	320	24	2.19			
	332	24	-2.42	6.32	41567	alcohol dehydrogenase 1
	354	24	-2.35	8.35	39141	aldolase C-1
	377	24	-2.47	6.61	36641	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	378	24	-2.61			
	379	24	-2.56			
	380	18	-2.28	7.68	36716	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Phosphorylating)
	381	24	-2.64			
	382	24	-2.99			
A	444	24	4.02	4.95	27174	putative abscisic acid-induced protein
	468	24	2.08	9.09	56752	glutelin
	601	24	-2.12	5.97	24198	1-cys peroxiredoxin-A
	618	24	2.31	5.84	29087	gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase family protein; expressed
	698	21	2.28	6.28	19024	cold shock domain protein 2
I	754	24	2.77	6.55	16404	putative Bowman Birk trypsin inhibitor
	759	21	2.59			
K	790	24	2.26	8.06	18423	seed allergenic protein RAG2
J	811	21	2.01	6.92	18127	seed allergenic protein RAG1
	838	21	2.05	8.35	63845	putative globulin (with alternative splicing)
	870	21	2.09			putative globulin (with alternative splicing)/ trypsin amylase inhibitor-like protein

*n.d.; not identified

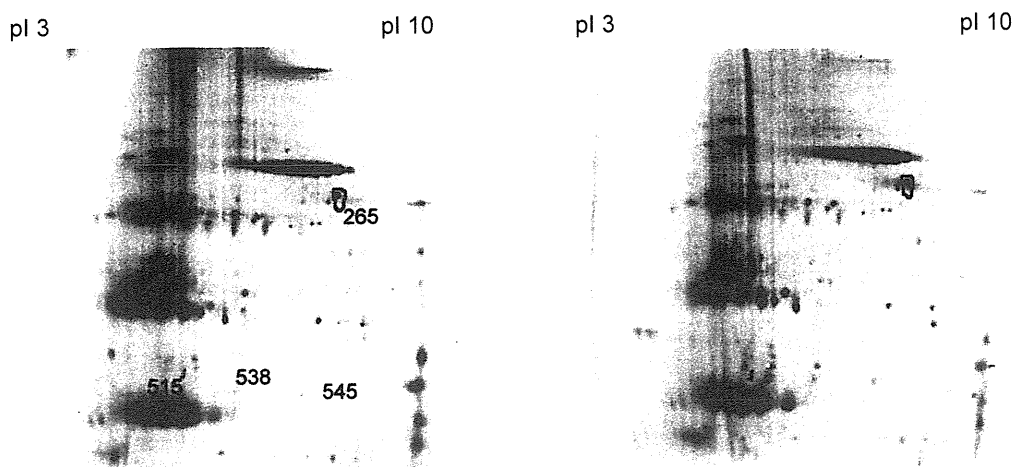


図 7 WT および L11 株間で発現差異のみられたタンパク質スポット

SeFLA を単独導入した L11 株と WT タバコ葉から抽出したタンパク質を蛍光標識後、2 次元電気泳動に供した。2 倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。A: WT (Cy3)、B: L11 株 (Cy5)

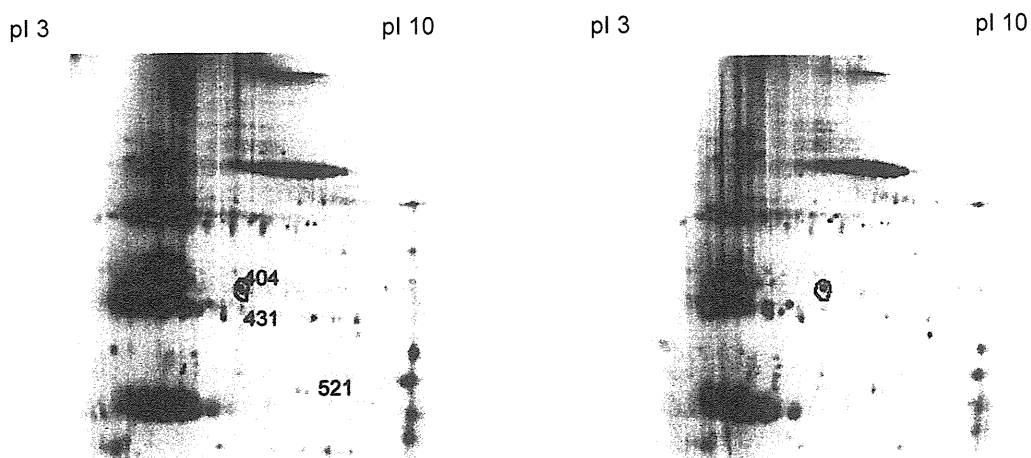


図 8 WT および R74 株間で発現差異のみられたタンパク質スポット

RBP を単独導入した R74 株と WT タバコ葉から抽出したタンパク質を蛍光標識後、2 次元電気泳動に供した。2 倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。A: WT (Cy3)、B: R74 株 (Cy5)

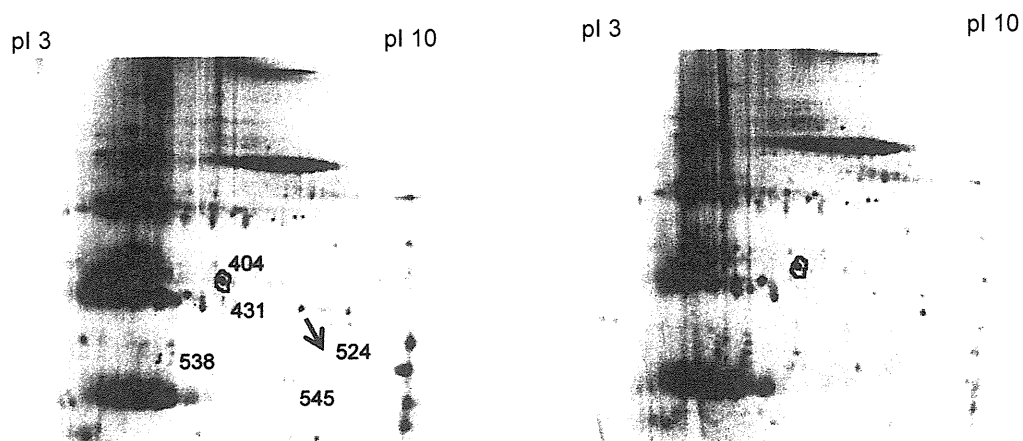


図 9 WT および LR1 株間で発現差異のみられたタンパク質スポット

スタック株 LR1 と WT タバコ葉から抽出したタンパク質を蛍光標識後、2 次元電気泳動に供した。2 倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。単独導入株ではタンパク質発現差異がみられなかったスポットは矢印で示した。A: WT (Cy3)、B: LR1 株 (Cy5)

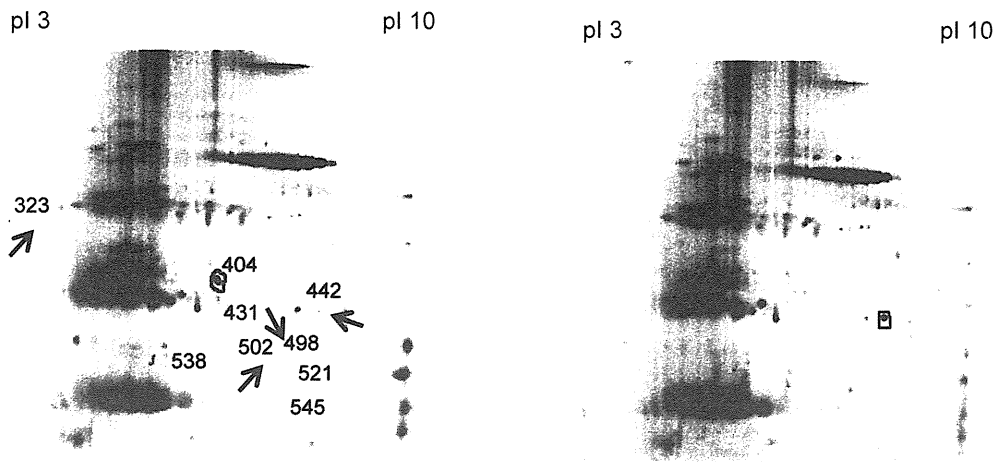
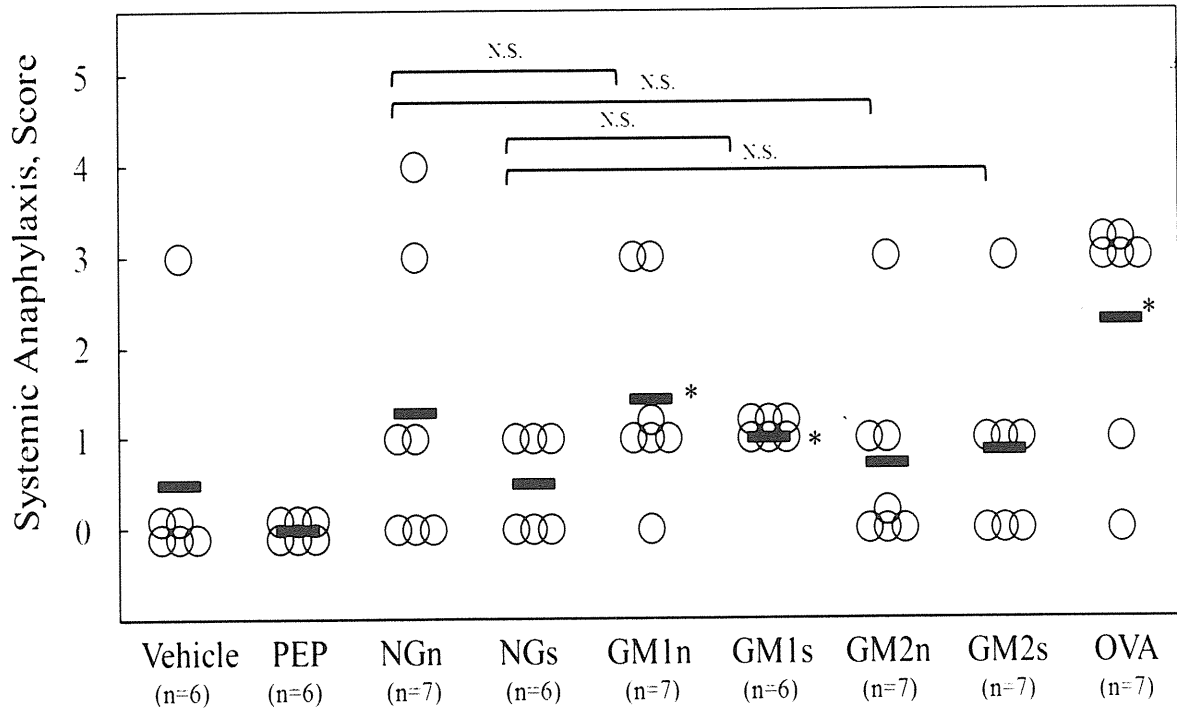
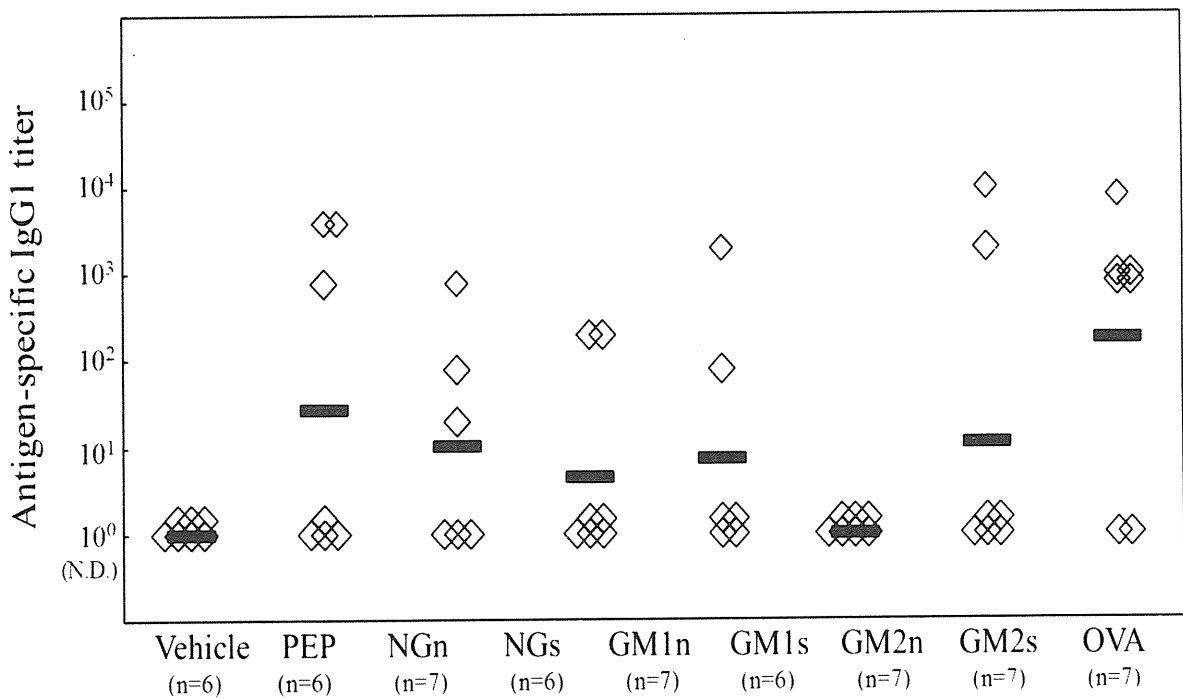


図 10 WT および LR2 株間で発現差異のみられたタンパク質スポット

スタック株 LR2 と WT タバコ葉から抽出したタンパク質を蛍光標識後、2次元電気泳動に供した。2倍以上の発現増減を示したスポットを、丸で示した。シングル株ではタンパク質発現差異がみられなかったスポットは矢印で示した。A: WT (Cy3)、B: LR2 株 (Cy5)



⊠ 11 Antigen-induced systemic anaphylactic scores at the 2nd challenge
*vs Vehicle (p<0.05)



⊠ 12 A comparison of the serum level of Antigen-specific IgG1 Antibody

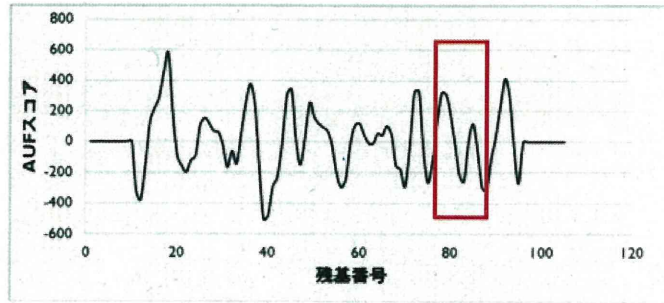


図 13. 1 本型膜タンパク質の細胞外ドメインの AUF プロット。エピトープ部分が赤の四角で囲ってある

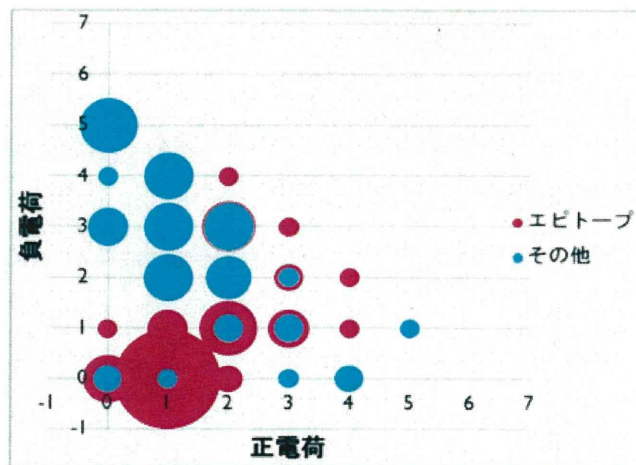


図 14. 1 本型膜タンパク質の細胞外ドメインにおける AUF ピークの電荷密度散布図

精度 (%)		含量 (%)	
エピトープ	その他	エピトープ	その他
90.4	67.1	66.2	90.7

表 6. マラリア原虫の 1 本型膜タンパク質におけるエピトープ予測の精度

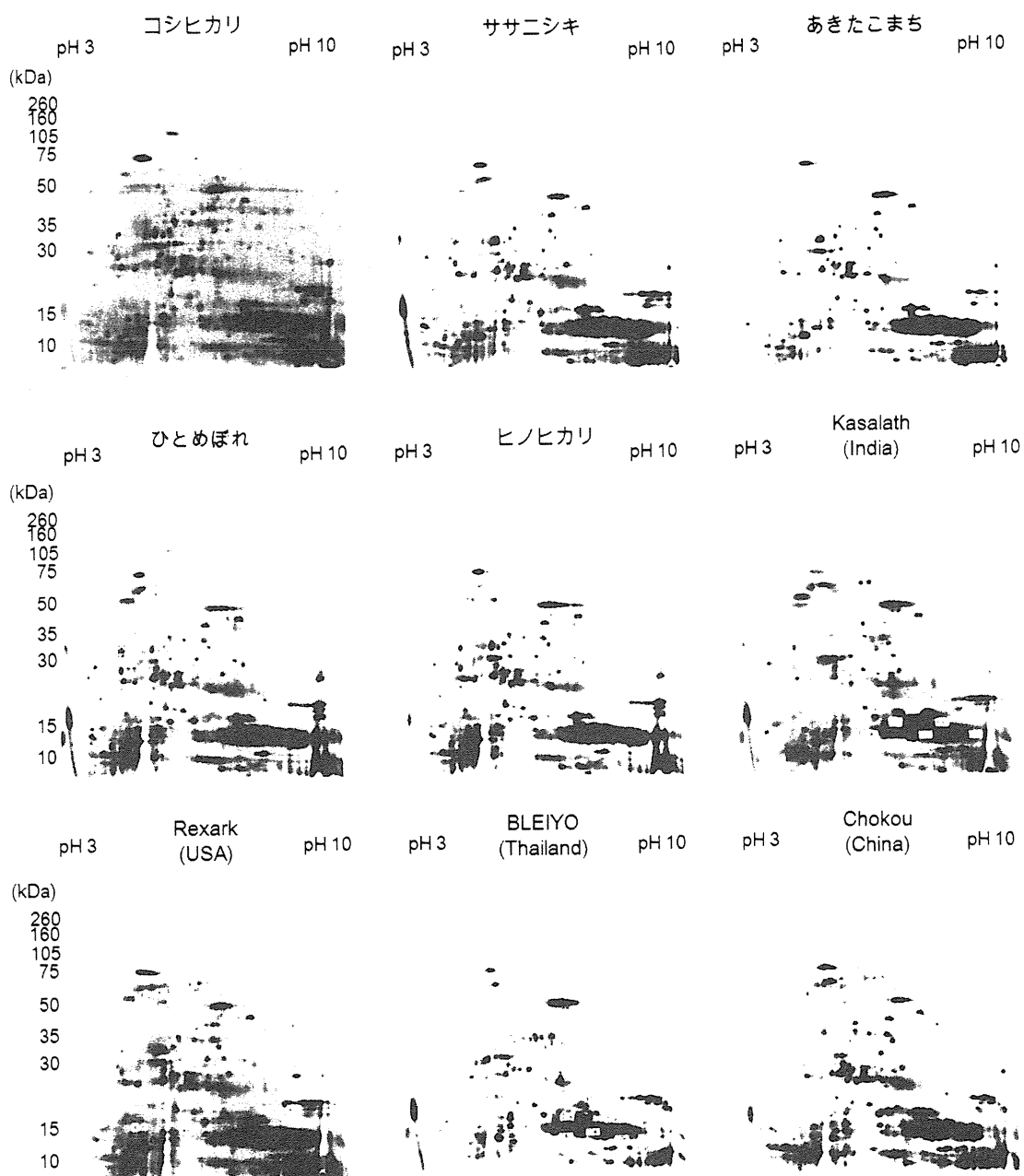


図 15 コメ 10 自然品種間のタンパク質発現差異解析パターン

10 品種のタンパク質を蛍光標識後、2次元電気泳動に供した。2D-DIGE 解析の結果、日本晴の発現量と比較して、5 倍以上の発現増減を示したスポットを丸で示した。

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 年度）

組換え植物の検知技術の開発に関する研究

研究分担者 近藤 一成 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨

1. コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良 ビーフンやコメ粉以外にフォー用乾麺、生春巻き用タピオカ入りライスペーパーなど、コメ加工品の種類は多様化しており、安全性未審査の遺伝子組換え (GM) コメを高感度に検査する方法が求められる。一部の加熱加工品において、従来のシリカゲル膜を利用したコメ DNA 抽出精製方法では十分な DNA の抽出精製ができず real-time PCR 反応を用いた高感度な検出が困難であった。そこで、より多様な加工品に対応できるコメ DNA 抽出精製方法の開発を行った。**2. コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の確立** リアルタイム PCR を使用したコメ内在性遺伝子 PLD について、従来の方法では 100% トウモロコシ試料において弱いながら反応する (Ct40<) ことが確認されたことから、より特異性の高い高感度なコメ内在性標的配列を検出する方法が求められていた。そこで、コメ内在性遺伝子の特異的な検出法の開発を目的に新しいリアルタイム PCR 用プライマー対・プローブの開発を行った。**3. 安全性未承認 GM コメのモニタリング検査** 文献等の情報を基に白葉枯病抵抗性 GM コメや除草剤耐性 GM コメの混入検査を含めたコメ加工品の GM コメのモニタリング検査を行った。**4. 安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 の検知法確立** 2009 年 11 月に中国で安全性認可が与えられた害虫抵抗性 GM コメ系統である Shanyou63 (63Bt) は、白葉枯病菌に感染しやすいことから白葉枯病原菌 *Xanthomonas oryzae* 耐性 Xa21 を発現させたスタック品種の開発が報告された。本研究ではアフリカの野生イネ由来の遺伝子 Xa21 のシーケンス解析から得られた情報を基に、リアルタイム PCR を用いた Xa21 コメの検知法の確立を試みた。アフリカの野生イネ由来遺伝子 Xa21 を検出する特異的プライマー対を用いて輸入コメ加工品を検査したところ、野生型コメ検体からは検出されないシーケンスを得た。**5. パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査** 35S プロモーター及び NOS ターミネーターを検出したパパイヤ加工品に安全性承認済み GM パパイヤ 55-1 系統検知法では検出されない加工製品 (缶詰 1 製品、漬物 2 製品、茶 1 製品) を確認した。35S プロモーター及び NOS ターミネーターは他の GM パパイヤのプロモーター、ターミネーターとして使用されていることから、55-1 系統以外の安全性未承認の GM パパイヤの混入の可能性が示唆された。そこで、GM パパイヤ含有に関するパパイヤ加工品の実態調査を行った。

協力研究者

中村 公亮、小林 友子 (国立医薬品食品衛生研究所)
橋田 和美、真野 潤一、高島 玲於奈
(独) 農研機構 食品総合研究所
大森 清美 (神奈川県衛生研究所)
笠原 正輝 (独) 農林水産省消費技術センター)
吉松 嘉代、河野 徳昭 (独) 医薬基盤研究所)
小関 良宏、佐々木 伸大 (東京農工大学)
名古屋 博之 (独) 水産総合研究センター)

A. 研究目的

現在、第 3 世代を含めた遺伝子組換え (GM) 食品の多様化が進んでいる。未承認 GM 食品の加

工品への混入は未然に防ぐことが求められている。そこで本研究では、第 3 世代を含めた GM 食品の流通阻止を監視するシステムの確立と、それらの検知技術の高度化及び新規検知技術の導入を検討した。

B. 研究方法

1. コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良

1. 試験試料

コメ加工品としてコメ粉及びコメ加工品 (ビーフン、フォー用乾麺、ライスペーパー) をインターネットにて購入し入手した。コメ対象試験用として非 GM コメ (日本晴、JP No. 9046) を農業生物

資源ジーンバンクより入手した。

2. DNA抽出精製

DNA 抽出精製は、従来法に従ったシリカゲル膜タイプの NIPPON GENE 社製 GM quicker 2 キットと Genetic ID NA 社製 FAST ID、及び、イオン交換樹脂タイプの QIAGEN 社製 Genomic-tip と GL サイエンス社製 mono FAS を使用した。コメ加工品の検体採取及び粉碎については、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(平成 13 年 3 月 27 日付け食発第 110 号)に従った。ライスペーパーに関しては、手で 3cm 角程度に千切り、ミルサーで十分粉碎し試料とした。 β -amylase (高濃度品)は Nippon Gene 社製 (特注品)、RNase A は QIAGEN 社製 (100 mg/mL, Cat. no. 19101)、Proteinase K は QIAGEN 社製 (20 mg/mL, Cat. no. 19133) を用いた。

① シリカゲル膜タイプ GM quicker 2 変法 (Quicker)

均質に細粉碎した試料 500 mg に GE1 緩衝液 2.1 mL、Proteinase K (20 mg/mL) 60 μ L、 α -Amylase (高濃度品) 6 μ L、及び、RNase A (100 mg/mL) 30 μ L を添加し、混和した。65°C、30 分間加温した後、GE2-K 緩衝液 225 μ L を添加し混和した。氷上に 10 分間静置後、6,000 x g 以上、4°C で 15 分間遠心した上清を新しい 2 mL チューブに移し、13,000 x g 以上、4°C、5 分間で遠心した。次いでその上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、上清 1 mL に対して GB3 緩衝液 375 μ L 及びイソプロパノール 375 μ L を添加し、10~12 回転倒混和した。その混合液を 700 μ L ずつ spin column に負荷した後、13,000 x g 以上、4°C、30 秒間で遠心し、溶出液を捨てた。すべての混合液を負荷するまでこの操作を繰り返した。さらに、GW 緩衝液 650 μ L を負荷し、13,000 x g 以上、4°C、1 分間で遠心し、溶出液を捨てた。最後に、spin column を新しいチューブに移し、水 50 μ L を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 x g 以上、4°C、1 分間で遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とした。

② イオン交換樹脂タイプ mono FAS 変法 (mono)

均質に細粉碎した試料 0.2 g は、Buffer A 1 mL、 α -amylase 5 μ L、RNase A 20 μ L、Proteinase K 50 μ L を加え混合し、50°C、30 分保温した。次に、Buffer B 150 μ L を混和し、5,000 x g、4°C、15 分間遠心した。得られた上清 700 μ L に対し、Buffer C 400 μ L を加え、5-10 回転倒混和し、20,000 x g、4°C で遠心した。得られた上清を mono FAS column に負荷し、20,000 x g、4°C で遠心後、溶出液は捨

てた。Buffer D 600 μ L を負荷し、20,000 x g、4°C で遠心後、溶出液は捨てた。Buffer E 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とした。

③ イオン交換樹脂タイプ Genomic-tip 変法 (QIA)

・試料 500 mg からの DNA 抽出精製

均質に細粉碎した試料 500 mg に G2 緩衝液 7.5 mL、 α -amylase (高濃度品) 6 μ L と RNase A (100 mg/mL) 30 μ L を加え混合し、37°C で 30 分保温した。次に、G2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K (20 mg/mL) 60 μ L を加え混合し、65°C で 30 分保温した。その後、その遠沈管を 3,000 x g、4°C、15 分間遠心した。その間、あらかじめ 50 mL 遠沈管上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液 4 mL を通して平衡化した。遠心終了後、得られた上清を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し、溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しい遠沈管上にセットし、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し、DNA を溶出した。DNA 溶出液にイソプロピルアルコール 2 mL を加えよく混合した。マイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) 1 本当たり 1 mL 程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000 x g 以上で、4°C、15 分間遠心した。上清を捨て、70% (v/v) エタノールを 1 mL ずつ 10,000 x g 以上で 4°C、5 分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を風乾させた後、予め 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とした。

・試料 2 g からの DNA 抽出精製

均質に細粉碎した試料 2 g は、G2 緩衝液 15 mL、 α -amylase (高濃度品) 12 μ L、RNase A (100 mg/mL) 60 μ L を加え混合し、37°C で 30 分保温した。次に、Proteinase K (20 mg/mL) 60 μ L を加え混合し、65°C で 30 分保温した。以下、上記と同様の操作を行い、DNA 試料原液を得た。

④ シリカゲル膜タイプ FAST ID 変法 (ID)

均質に細粉碎した試料 0.2 g は、Genome Lyse Buffer 1 mL、 α -amylase 5 μ L、RNase A 1 μ L、Proteinase K 10 μ L を加え混合し、65°C、30 分保温した。次に、13,000 x g、4°C、5 分間遠心し得られた上清 500 μ L に対し、Bind Buffer 500 μ L を加え、13,000 x g、4°C、5 分間遠心した。得られた上清を Binding column に負荷し、10,000 x g、4°C で遠心後、溶出液は捨てた。Wash Buffer 800 μ L を負荷し、13,000 x g、4°C で遠心後、溶出液は捨てた。75% (v/v) エタノールで 3 回洗浄後、65°C 10

分間、水 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とした。

3. DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製と保存

DNA試料原液の適当量を取り、水を用いて適宜希釈し、200–320 nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度 (O. D. 260 及びO. D. 280) を記録した。次いでO. D. 260の値を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出した。またO. D. 260/O. D. 280を計算し純度を推定した。DNA試料原液の濃度がPCRで規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試料液として用いた。

4. real-time PCRに用いたプライマー対及びプローブ

コメ陽性対照用のプライマー対及びプローブは、以下の配列のものを使用した。

プライマー対：

KVM159 : 5' -TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'

KVM160 : 5' -CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'

プローブ：

TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

5. real-time PCR反応及び結果解析と判定

PCR用反応液は25 μ L /wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各0.4 μ L、プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.25 μ Lを混合し、DNA試料液 5 μ L (10 ng/ μ L) を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ Lに調製した。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 20秒、60°C 1分を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン (3サイクルから15サイクル) の ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. Line 0.2) を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。48未満

のCt値が得られた場合、陽性と判定した。

2. コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発

1. 試験試料

コメDNA検出法の特異性確認試験のため、トウモロコシ (スーパーで購入)、オオムギ (在来裸麦、JP : 16719) 、カラスムギ (*A. fatua* オーストラリア産、JP : 41387)、ヒヨコマメ (T-87-2、JP : 97097)、テンサイ (はるまさり、JP : 97097)、コムギ (東錦、JP:20684)、ワタ (伯州綿、JP:222117)、コメ (日本晴、JP No. 9046)、ダイズ (スーパーで購入)、アマ (スーパーで購入)、ナタネ (*B. rapus* : 東北3号、JP:28633; 北陸19号、JP: 28714; NUGGET、JP: 29639; N-404, 46073)、コマツナ (*B. rapa*: 鳴沢菜、JP: 29927; 信夫冬菜、JP : 26902; 新黒水菜、JP: 29932; 仁井田青菜、JP: 29925)、ジャガイモ (男爵、スーパーで購入)、パパイヤ (Sunset、ハワイパパイヤ協会から購入)、パッションフルーツ (スーパーで購入)、パイナップル (スーパーで購入)、パッションフルーツ (スーパーで購入) を使用した。コメ対照用として、コメ (日本晴)、コメ粉及びコメ加工品 (ビーフン、ライスペーパー、フォー用乾麺) を使用した。

2. DNA 抽出精製と DNA 試料液の調製

粉碎した試験試料からのDNAの抽出精製は、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット (Genomic-tip) を用いた。O. D. 260の値を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出し25 ngをDNA試料として試験に供した。

3. real-time PCRを用いたプライマー対及びプローブ

・現コメ陽性対照用 (KVM)

KVM159 : 5' -TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'

KVM160 : 5' -CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'

TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

・新コメ陽性対照用 (PLD)

PLD3959F :

5' -GCTTAGGAACAGGGAAGTAAAGTT-3'

PLD4038R :

5' -CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA-3'

PLD-P :

FAM-TGAGTATGAACCTGCAGGTCGC-TAMRA

・旧コメ陽性対照用 (SPS)

Sps-Taq-1F :

5' -TTGCGCCTGAACGGATAT-3'

Sps-Taq-1R :

5' -CGGTTGATCTTTTCGGGATG-3'

Sps-P :

FAM-TCCGAGCCGTCGGTCCGTC-TAMRA

5. real-time PCR反応及び結果解析と判定

PCR用反応液は25 μ L /wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各0.4 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.25 μ Lを混合し、DNA試料液 5 μ L（10 ng/ μ L）を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ Lに調製した。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95 $^{\circ}$ C 20秒、60 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン（3サイクルから15サイクル）の Δ Rnのノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line（Th. Line 0.2）を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。2つのDNA抽出液のうち1 wellでも48未満のCt値が得られた場合、陽性と判定した。

3. 安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

1. 試験試料

検査対照は、非GMコメ（日本晴）及びコメ加工品（ビーフン、コメ粉、モチ米粉）の32検体を使用した（表5）。

2. DNAの抽出精製

コメ加工品の検体採取及び粉砕については、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」（平成13年3月27日付け食発第110号）に従った。

α -amylase（高濃度品）、RNase A（100 mg/mL）はNippon Gene社製（特注品）、Proteinase KはWAKO社製（100 mg, Cat. no. 169-21041）用いた。

① シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法①）（コメ及び未加熱コメ加工

品に適用）

均質に粉碎し得た試料 500 mgは、GE1緩衝液 700 μ L、Proteinase K（20 mg/mL）20 μ L、 α -Amylase（高濃度品）2 μ L、及び、RNase A（100 mg/mL）10 μ Lを添加し、混和した。それを65 $^{\circ}$ C、15分間加温した後、GE2-K緩衝液 85 μ Lを添加し混和した。氷上に10分間静置後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、5分間で遠心し得た上清 400 μ Lを、1.5 mLチューブに移し、GB3緩衝液 150 μ L及びイソプロパノール 150 μ Lを添加し、10~12回転倒混和した。その混合液 700 μ Lをspin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、30秒間で遠心し、溶出液を捨てた。さらに、GW緩衝液 650 μ Lを負荷し、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、1分間で遠心し、溶出液を捨てた。最後に、spin columnを新しいチューブに移し、水 50 μ Lを加え3分間室温で静置した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、1分間で遠心し、その得られた溶出液をDNA試料原液とした。

② シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法②）（ビーフン等の加熱加工品に適用）

均質に細粉碎し得た試料 500 mgは、GE1緩衝液 2.1mL、Proteinase K（20 mg/mL）60 μ L、 α -Amylase（高濃度品）6 μ L、及び、RNase A（100 mg/mL）30 μ Lを添加し、混和した。それを65 $^{\circ}$ C、30分間加温した後、GE2-K緩衝液 225 μ Lを添加し混和した。氷上に10分間静置後、6,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、15分間で遠心し得た上清を新しい 2 mLチューブに移し、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、5分間で遠心した。次いでその上清を新しい 1.5 mLチューブに移し、上清 1 mLに対してGB3緩衝液 375 μ L及びイソプロパノール 375 μ Lを添加し、10~12回転倒混和した。その混合液を700 μ Lずつspin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、30秒間で遠心し、溶出液を捨てた。すべての混合液を負荷するまでこの操作を繰り返した。さらに、GW緩衝液 650 μ Lを負荷し、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、1分間で遠心し、溶出液を捨てた。最後に、spin columnを新しいチューブに移し、水 50 μ Lを加え3分間室温で静置した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C、1分間で遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とした。

3. DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製と保存

DNA試料原液の適当量を取り、水を用いて適宜希釈し、200-320 nmの範囲で紫外外部吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度（O. D. 260及びO. D. 280）を記録した。次いでO. D. 260の値を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算