

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

総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究（1）

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：これまで実用化研究が進められてきた遺伝子組換え農作物の多くは、除草剤耐性や耐虫性などの形質を単独遺伝子の改変により付与したものであった。しかし、環境ストレス耐性等の付与を念頭に置いた場合、効果的に耐性を付与する手法として、内生遺伝子群の発現を制御することが出来る転写制御因子やモードオブアクションの明確でない因子の導入が試みられている。こうした遺伝子組換え体の安全性評価は生物多様性影響評価にとどまっており、食品安全性の観点から評価が行われた事例はない。本研究では転写制御因子やモードオブアクションの明確でない因子を導入した遺伝子組換え体を用いて、どのような要素を取り入れ食品安全性評価を行う必要があるかの検討を加えるため、多方面からの解析を実施し、評価基準の構築に向けての基盤研究を推進する必要がある。本研究では、第一に可食部生産の可能である遺伝子組換え体を特定網室で栽培し、実験材料となる遺伝子組換えジャガイモの可食部（塊茎）について供給を進める一方で、当該組換え体可食部、及び、環境ストレス耐性イネに関して、基本成分五成分の変動についての検討を行った。組換え体において基本食品成分には有意な差が認められなかった。しかし、通常流通している非組換え体における品種・栽培環境・貯蔵等の差異を考慮した、遺伝子組換え体評価基準の設定が必要であると考えられる。

協力研究者

菊池 彰（筑波大学 生命環境系
遺伝子実験センター）

A. 研究目的

これまで、多くの遺伝子組換え農作物の実用化研究が進められてきており、その殆どが形質発現にいたる作用起作の明らかとなっている遺伝子の改変により付与したものであった。しかし、近年になって、転写制御因子をはじめ、導入遺伝子により組換え体内でさまざまな因子を変化させ形質を発揮させるような、支配因子の全てが明らかにされていない遺伝子組換え植物の研究や開発が進められてきた。こうした遺伝子組換え体の安全性評価は生物多様性影響評価にとどまっており、食

品安全性の観点から評価が行われた事例はない。本研究ではモードオブアクションの明らかとなっていない遺伝子組換え食品について、研究協力者として材料を供給するとともに、各遺伝子組換え体の基本食品成分分析を行いその差異を検討する。組換え体の食品成分差異を見出すためには通常流通している食品が持っている、品質の幅を明らかにするため、多様な品種と産地を持つジャガイモを材料に、産地別の成分比較も合わせて行った。

B. 研究方法

＜植物材料の調整＞

ジャガイモは Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で 25℃、16 時間明期、8 時間暗期の光条件下

で培養した。3ヶ月に1回の継代培養により、系統を維持した。鉢植え栽培を行う場合は、10 cm 程度に成長した植物体を栽培室に移し、軽石を敷いたポリエチレン鉢 (φ10 cm) に混合培養土を入れたものに移植した。22°C、16 時間明期、8 時間暗期の光条件下で湿度を保ちながら、1 週間順化させた後、3 週間通常灌水で栽培した。

挿し芽増殖は、順化後 20 日目以上の鉢植え植物を用いた。茎頂を 5 cm 程度の長さに切り、茎に発根促進剤(ルートン:住化タケダ園芸)を粉衣した。良く湿らせた混合培養土に挿し、湿度を保ちながら 1 週間順化させた。その後、培養植物の馴化法と同様の条件下で約 10 日間栽培した。

これらを特定網室に移し、湿度を保ち、遮光しながら 3 日間馴化した。その後、軽石 (牧野商店) と赤玉土 (加藤産業) を敷いた上に培養土 (花と野菜の園芸培養土、加藤産業) を入れたポリエチレン鉢 (φ10 cm) に移植し、約 3 ヶ月栽培した。

食品成分分析用のサンプルは一部の未熟塊茎を除き、可食部 100 g を試験材料とした。

材料となる塊茎は収穫、洗浄後、遮光条件で 1 週間室温にてキュアリングを行い、皮と可食部に別け液体窒素にて急速冷凍し使用するまでは -80°C にて保存した。

<食品成分分析>

可食部 100 g を日本食品分析センターに送付し、5 成分 (水分、たんぱく質、脂質、炭水化物、灰分) とエネルギーの分析を依頼した。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質はケルダール法、脂質は酸分解法、灰分は灰化法により評価した。エネルギーと水分は下記の計算式により求めた。

$$\text{炭水化物} = 100 - (W + P + L + A)$$

$$\text{エネルギー} = 4P + 9L + 4C$$

W : 水分、P : たんぱく質、L : 脂質

C : 炭水化物、A : 灰分

<導入遺伝子の発現確認>

提供する材料の基礎情報として、導入遺伝子の発現量を確認した。凍結した塊茎の皮を約 0.3 g (生重量) を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中でパウダー状になるまで磨砕し、RNAqueous total RNA isolation kit (Ambion) を用いて Total RNA を抽出した。これから DNase により DNA を除去し、フェノールクロロホルム処理を行い、精製 RNA を得る。これを用いて、RNA PCR kit (AMV) ver 3.0 (TAKARA) により cDNA を合成、PCR により目的遺伝子を増幅した。

C. 研究結果

<導入遺伝子の発現量>

導入遺伝子の発現解析を行った結果、発現の強弱はあるものの全ての塊茎において導入遺伝子の発現が認められた。系統ごとに発現量が異なっており、導入遺伝子の発現量に応じて 2 つのグループに分け、各班に分配する遺伝子組換えジャガイモ系統を決定した。について、高発現系統、低発現系統にグループ分けし、オミクス用サンプルには高発現系統、低発現系統を、給餌用、栄養成分分析には高発現系統を用いた。

<遺伝子組換えジャガイモの栄養成分>

個別の遺伝子組換え体について栄養成分には、非組換え体との間に大きな差異は認められなかった。3 年間で実施した 2 品種 (Desiree、メークイン) の組換え体 (組換え体 5 種、10 系統) を用いた食品成分の分析結果を統合し、差異を示す成分や要因の検討を行った。その結果、品種間での比較を行った場合に炭水化物 ($p < 0.05$) と脂質 ($p < 0.01$) の含量に t 検定で有意差が認められた。組換え体と非組換え体、屋外栽培と網室栽培と言った要因ではどの成分にも有意差が見出されなかった。こうした点から、食品が持つ成分の振れ幅についての調査も必要であると考えられた。

<遺伝子組換えイネの栄養成分>

米粉を用いたこともあり、水分含量に差異が認められ、遺伝子組換え体で顕著であった。しかし、水分を除いた乾物での成分比較を行うと、その差異が不明瞭となった。サンプル数が少ないこともあり、有意差検定は出来ないが、食品中の水分について、その扱いをどのようにするかは検討が必要であると考えられた。

D. 考察

ジャガイモ、イネの食品成分から、その水分の変動が顕著に見出された。ジャガイモの場合、水分量に影響を与えるものは収穫期前の雨量や土質、収穫後の貯蔵等が考えられる。イネの場合は米粉にしたことにより乾燥が進んだ事が考えられる。このように、生育時の環境や収穫後の扱いによって水分含量は大きく変動する事が予想される。そのため、分析成分や食品の性質を勘案し、水分の扱いについて検討する必要があると考えられる。また、ジャガイモでしか検討されていないが、食品が持つ品種の幅も考慮に入れる必要があると考えられる。多くの農作物は多様な品種が流通しており、比較の対象を何処に据えるかによって、その判断が大きく変わる。食品は医薬品とは異なり、その成分は画一的に調整することが出来ない。成分へ与える影響が天候、土壌、収穫後の貯蔵など、様々な要因が影響を及ぼすと考えられる。

E. 結論

栄養成分について、今回分析した遺伝子組換え体では変化が認められなかった。しかし、ある食材の持つ幅は、品種、産地、作柄、貯蔵などで異なるた

め、基準をどう定めるかを明確にする必要が有る。また、食材の水分含量は産地、作柄、貯蔵などで大きく変わってしまう事が明らかとなったことから、乾重量ベースで比較すべき成分についても規定する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

R. Nakamura, R. Satoh, R. Nakamura, T. Shimazaki, M. Kasuga, K. Yamaguchi-Shinozaki, A. Kikuchi, K.N. Watanabe, R. Terashima. (2010) Immunoproteomic and 2D-DIGE Analysis of Arabidopsis DREB1A-Transgenic Potato. Biol. Pharm. Bull. 33(8):1418-1425.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究（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、多くの遺伝子組換え植物が開発・実用化され食品として流通している。最近では環境ストレスに対応するような遺伝子を組換えたものも開発されており、これらの場合、ストレス向上の作用機序が明確でないものや転写調節因子など他の多くの遺伝子発現に影響を与えることが予想される遺伝子が用いられている。さらに、最近ではこれらの遺伝子組換え植物を交配させた“スタック品種”も開発されている。これらの遺伝子組換え植物が近い将来流通する可能性は高く、それらの安全性を検討するために、遺伝子やタンパク質、代謝産物がどのように変化しているかを確認しておくことは重要である。そこで本研究では環境ストレス抵抗性の遺伝子を組換えたコメ、ジャガイモ、タバコを作出し、タバコにおいては遺伝子組換え体を交配した後代を獲得し、それらについてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、遺伝子を組換えたことによって発現量に変化している遺伝子も見受けられたが、遺伝子を組換えしていない植物体でもその個体や、生育環境によって遺伝子発現変動のプロファイルが揺らいでいることが判明した。また、スタック品種においては親世代で発現量に変化していた遺伝子のおおぐが、その発現量のまま引き継がれていることが示唆された。

協力研究者

佐々木 伸大 （東京農工大学大学院
共生科学技術研究院）

A. 研究目的

近年多くの遺伝子組換え植物が実用化され、安全性審査がなされたものが流通している。これらの多くは“第一世代”と呼ばれる害虫抵抗性や農薬耐性を持たせたものである。最近では、高オレイン酸ダイズや高トリプトファン米など付加価値を持たせたいわゆる“第二世代”のものや、“第三世代”と呼ばれる環境ストレス耐性を付与したものが開発されている。第一世代や第二世代の遺伝子組換え植物では、基本的には組換える遺伝子は、その遺伝子産物そのものの効果によって形質を獲得するものであり、他の代謝系にはほとんど影響を与えないか、または、すでに代謝経路が明らかとされている経路の1か所の酵素反応ステップを改変するものであり、食品としての安全性を評価する場合に、注目すべき遺伝子産物

や代謝経路が明確であった。これに対して第三世代の遺伝子組換え植物の作出に用いられる遺伝子は、転写調節因子や機能が明確にされていないものなどが多く、遺伝子を組換えた際の「モード・オブ・アクション」が明確ではない。そのため、これらの遺伝子組換え植物において組換えた遺伝子が内生のどのような遺伝子に影響を与え、どのような代謝経路、代謝産物に変化が起きているかを解析することは、解析すべき遺伝子に焦点を絞ることができないため非常に困難である。さらにはこれらの品種を交配させた“スタック品種”も開発されており、遺伝子組換え植物の品種数は増加し続けている。今後もこのような第三世代の遺伝子組換え植物やスタック品種は増加すると考えられるため、これらの安全性を評価するための方法を開発しておくことは重要である。これら増え続ける遺伝子組換え植物の安全性評価に対応するためには、一つの遺伝子産物や、一つの代謝経路に焦点を絞った解析方法ではなく、植物体における遺伝子発現やその転写産物、代謝産物を俯瞰

しながら解析できるような手法が必要となる。これには近年技術として確立されつつある網羅的解析手法が適していると考えられる。そこで、本研究においては、網羅的解析に先立って、現在開発中である第三世代の遺伝子組換え植物をジャガイモとイネで作出し、また、タバコを用いてスタック品種の一つのモデルを構築した。これらの遺伝子組換え体を用いて、組換えた遺伝子の影響を網羅的に解析することの可能性を検討するために、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、その性状についての検討を行った。

B. 研究方法

B-1 植物材料

B-1-1 遺伝子組換えジャガイモ

遺伝子組換えジャガイモは研究協力者である筑波大学の菊池彰博士らによって作出されたものを用いた。遺伝子組換えジャガイモ作出に用いられた遺伝子はシロイヌナズナ由来の乾燥ストレスに応答する転写因子の一つである DREB と、ジャガイモ近縁種から単離された root-knot nematode (RKN) 耐性遺伝子を用いた。恒常的に発現するプロモーターである CaMV35S プロモーター下流に連結した DREB を導入したジャガイモ 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 を導入したジャガイモ 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ジャガイモ 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。

CaMV35S プロモーター下流に連結した RKN 耐性遺伝子を組換えたジャガイモと、RKN 耐性遺伝子組換えジャガイモの中でも RKN 耐性遺伝子の発現量の高かった line 38-A, B と、対照として遺伝子非組換えジャガイモ line NT-A, B の 4 つの個体について収穫後、皮を剥いた可食部を液体窒素にて急速冷凍したものを用いた。

B-1-2 遺伝子組換えイネ

アイスプラント (*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。作成したコメで RBP が発現していることを確認した。発現が確認された遺伝子組換えイネを出穂するまで水耕液を用いて栽培した。出穂した時点で 200 mM の NaCl を含む水耕液に移植し、30 時間の培養を行った後に収穫を行った。対照としては NaCl 処理をせずに栽培したものを収穫した。また、遺伝子を組換えていない宿主である日本晴れについても、同じ栽培法で栽培した後に、NaCl 処理をしたものとしていないものについて収穫を行った。これらの RBP 組換え・非組換えコメについて、NaCl 処理有り・無しのサンプルそれぞれの葉から RNA を抽出して、塩ストレスに応答して発現することが報告されている SalT (Salt stress-induced gene (Claes et al., 1990 Plant Cell 2: 19-27)) 遺伝子を増幅するように設計したプライマーを用いて RT-PCR 法によってそれらの発現量を検討した。

B-1-3 遺伝子組換えタバコ

植物導入用ベクター pABN-Hm1 (Mita et al. Plant Physiology, 107: 895-904, 1995) の β -amylase プロモーター配列から GUS 遺伝子配列を除去し、その部分に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 SeFLA あるいは McRBP cDNA を連結した pAB35S/SeFLA と pAB35S/McRBP を構築した。構築したコンストラクトをアグロバクテリウム LBA4404 へ導入し、形質転換したアグロバクテリウムをタバコリーフディスクに感染させることで、タバコ植物体への遺伝子導入を行った。抗生物質であるハイグロマイシンを含む個体培地上で再生してきたシュートを新しい培地へ移植し、培養瓶の中で培養した。導入した遺伝子の発現量の高いライン L11 (SeFLA 組換え体) と R74 (McRBP 組換え体) をそれぞれ自家受粉することにより、形質転換から 3 世代後のホモラインを獲得した。これら T3 世代の L11 と R74 について他家受粉を行い、それらのスタック品種を作出した。作出したスタック品種の種子

を5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて20分間滅菌したのち滅菌水で7回洗浄した後にMS 個体培地上に播種し、発芽したものについて個体培地を入れた培養瓶へ移植し、葉が12枚程度つく程度まで培養を行った。培養した遺伝子組換えタバコの葉のうち上から3枚を除いた4枚目から1枚ずつ合計9枚収集し、液体窒素で急速冷凍した。それらのサンプルは3枚ずつトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析（国立医薬品食品衛生研究所にて実施）、メタボローム解析（大阪府立大学にて実施）に供した。

B-2 RNA 抽出方法

それぞれの塊茎を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、700µl 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℃で30分間処理してDNA を分解した。その後、RPE buffer で洗浄を行ってから、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。

B-3 組換え遺伝子転写量の確認

RBP 遺伝子組換えコメの作出 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: 5'-ATGTCTTCTGCAACAGCTAA-3'

RBP2: 5'-CGCACGTCTTGGTCTTTCTT-3'

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15µg 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。

タバコ葉における組換え遺伝子の転写量の解析は RT-PCR 法によって行った。抽出した total RNA 500 ng を鋳型として TaKaRa RNA PCR kit (AMV) ver. 3.0 (タカラバイオ社) を用いて reverse-transcription PCR を行った。方法はキットのマニュアルに従った。により用いたプライマーの組み合わせは以下の通りであった。

SeFLA-Fwd: 5'-GACGATTCGAGCGACGGAGGA GAGA-3'

SeFLA-Rv: 5'-ATTCCTTTTCATATTTTCATTACC C-3'

McRBP-Fwd: 5'-GAAAGGCCTCCTCGAGAGT T-3'

McRBP-Rv: 5'-GAACTACCGGTGTCAAAATATG AGC-3'

NtActin-Fwd: 5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTG GCA-3'

NtActin-Fwd: 5'-AGGACCTCAGGACAACGGAA AC-3'

PCR の条件は95℃で3分間の熱変性の後、92℃、30秒、58℃、30秒、72℃、1分を35サイクル行った。増幅産物は1.2%のアガロースゲル電気泳動によって分離し、確認した。

B-4 DNA マイクロアレイ解析

ジャガイモ塊茎におけるトランスクリプトーム解析はフィルジェン社の DNA マイクロアレイ解析系を利用した。DNA チップとしてはジャガイモの転

写産物が 18,722 スポットされた Filgen®Array Solanum tuberosum を用いて行った。遺伝子組換えコマのトランスクリプトーム解析はフィルジェン社の DNA マイクロアレイ解析系を利用した。転写産物が 68,682 スポットされた Filgen®Array Oryza sativa を用いて行った。タバコの葉におけるトランスクリプトーム解析はアジレント社製の Tobacco (Nicotiana tabacum) オリゴ DNA マイクロアレイ (プローブ数: 29,488、プローブ長: 60 nt) を用いて DNA チップ研究所の DNA マイクロアレイ解析系を利用した。

凍結してあった遺伝子組換えタバコの葉から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて total RNA を抽出した。抽出方法はキットのマニュアルに従った。

C. 研究結果

C-1 遺伝子組換えジャガイモにおけるトランスクリプトーム解析

当初、ジャガイモ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 su-per (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。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ジャガイモ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。収量は湿重量 0.1 g の試料から 5~12µg 程度であった。これらのことから、ジャガイモのサンプル 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判明した。

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クアタープロットによって比較した。

NT-1-1 と NT-3-1 間、NT-1-1 と NT-4-1 間でのスクア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。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。

RKN 耐性遺伝子を組換えていないジャガイモ 2 系統 NT-A と NT-B と RKN 耐性遺伝子を組換えたジャガイモで組換えた遺伝子の発現量が高かった 2 系統 38A、38B について DNA マイクロアレイ解析を行った。それぞれのサンプル間での遺伝子発現量の差をスクアタープロットによって確認した。その結果、遺伝子を組換えたものと組換えていないものでは、遺伝子を組換えていないサンプル間の遺伝子発現の変動が若干大きくなる傾向が見られた。しかし、遺伝子を組換えた 2 系統間においても、遺伝子を組換えていないサンプル間よりも遺伝子の発現量の差が大きかったことから、遺伝子発現の変動は、遺伝子

を組換えたことの影響よりも、系統間での差異が大きいことが示唆された。

C-2. 遺伝子組換えコメにおけるトランスクリプトーム解析

耐環境ストレス強化因子のひとつであるアイスプラント由来の 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（ニッポンバレ）に導入した。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。

RBP 遺伝子を組換えた場合の遺伝子発現に与える影響を検討するために、RBP 遺伝子を組換えた系統 R1 と R2 と、遺伝子を組換えていない宿主である日本晴のそれぞれを水耕栽培し、塩ストレス処理をしていないサンプルから RNA 抽出を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。それぞれの遺伝子発現の変化をスクアタープロットによって解析を行った。この方法では縦軸と横軸に 2 検体それぞれの遺伝子発現量をプロットすることにより、いずれでも発現量が同程度であれば左上がりの対角線上に、片側で発現量が多い場合には、そちらの軸に近づくようにプロットがなされる方法である。その結果、遺伝子組換え、非組換え間での遺伝子発現量の変動は非常に少なく、また、遺伝子を組換えた R1 と R2 の遺伝子発現量の変化も非常に小さいことが示された。

塩処理を行った場合にコメでの遺伝子発現に与える影響を検討するために、RBP 組換え、非組換えイネに塩ストレスを与えたもので、コメから抽出した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。まず、塩処理でイネが塩ストレス応答をしているかについて検討するために、塩処理をしたイネの葉から抽出した RNA を用いて、これまでに塩ストレスで誘導されることが分かっている SalT 遺伝子について遺伝子発

現を確認した。その結果、特に塩ストレスによって発現が上昇することが知られている SalT 遺伝子の発現が、塩ストレス処理によって上昇していたことから、イネが塩ストレス応答をしたことが示唆された。

塩ストレス処理を行った場合に RBP 遺伝子組換えコメ、非組換えコメとでどの程度遺伝子発現量の変動があるのかについて検討するために、塩処理を行った遺伝子組換えコメと、非遺伝子組換えコメでの遺伝子発現量の変化を解析した。その結果、遺伝子を組換えていないニッポンバレに対して、遺伝子を組換えた系統 R1 と R2 それぞれでの遺伝子の発現量の変化は、塩処理をしていない場合よりも若干分散する傾向が確認された。遺伝子を組換えた R1 と R2 間での遺伝子発現量の変動も、塩処理を施していない場合と比較して分散する傾向にあったことから、これらの遺伝子発現量の変化は、遺伝子を組換えたことよりもむしろ、塩処理を行ったことによる影響が大きいものと考えられた。

C-3 遺伝子組換えタバコスタック品種におけるトランスクリプトーム解析

SeFLA を導入したタバコと McRBP を導入したタバコの葉から RNA を抽出し、RT-PCR 法によりそれぞれの遺伝子の発現量を検討したところ、ライン L11 と R74 において SeFLA, McRBP mRNA の高い蓄積が認められた。そこで、これらのラインの自殖後代からホモの系統を選抜し、交配親として使用した。花粉親として L11 を用いた後代である LR1 と R74 を用いた後代である LR2 についてそれぞれの植物個体の葉における SeFLA と McRBP の遺伝子発現を検討したところ、いずれの遺伝子もそれらの親世代と同等の mRNA の転写が確認された。これらのライン L11, R74, LR1, LR2 について耐塩性が向上しているかについて検討を行うために、培地上に無菌播種し、発芽後 8 日の植物体を 250 mM の NaCl を含む培地と含まない培地へ移植した。その後 20 日間育成した後にそれらの個体の根の長さを測定した。その結果、SeFLA あるいは McRBP を組換えた個体（L11, R74）では遺伝子組換えをしていない個体（WT）と比較して根が長く伸びており、生重量も

増加していた。また、それらの交配後代 (LR1, LR2) においてはさらに根がよく伸長し、生重量も増加していた。また、その傾向は NaCl を含まない培地、含む培地において同様であった。このことから、SeFLA, McRBP とともに塩ストレスの有無にかかわらず植物体の生育を向上させているものと思われた。そこで、生育の良い条件である NaCl を含まない培地で育成した植物体をトランスクリプトーム、プロテオーム (国立医薬品食品衛生研究所にて実施)、メタボローム解析 (大阪府立大学にて実施) に供した。

WT, L11, R74, LR1 の葉 3 枚ずつをトランスクリプトーム解析に供した。単色法によってマイクロアレイ解析を行って観測されたシグナルをそれぞれの系統ごとに平均化を行った。平均化した各系統において WT を基準としたスクアタープロット解析を行った。その結果、WT と比較した場合の L11, R74 における遺伝子発現プロファイルと LR1 における遺伝子発現プロファイルに大きな変化は認められなかった。遺伝子発現の変動量が fold change 4.0 以上になるものについて着目し、ベン図を作成した。遺伝子発現が増加した遺伝子数は、L11 で 124, R74 で 254, LR1 で 237 であった。L11 と R74 の交配後代である LR1 において、変化量の大きかった 237 遺伝子のうち、116 については L11 あるいは R74 でも発現量の高い遺伝子であった。一方、遺伝子発現量が減少した遺伝子数は、L11 で 283, R74 で 476, LR1 で 504 であった。LR1 で遺伝子発現が減少した 504 の遺伝子のうち、294 については L11 あるいは R74 においても発現量が減少しているものであった。

D. 考察

遺伝子組換えジャガイモにおけるトランスクリプトーム解析の結果から、同じ遺伝子を導入したジャガイモ塊茎であっても、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。

遺伝子組換えコメではジャガイモと比較して遺伝子発現の変化が少なかった。これは、一つはジャガ

イモの可食部が塊茎で、土壤中で生育させたことから土壤中の栄養状態や、微生物叢の影響を受けやすいことが原因であったと考えられる。イネの栽培は水耕栽培によって均一な環境下で生育させたこと、また、イネの可食部であるコメが水耕液や土壌には直接接触することが無かったことも、遺伝子発現変化が少なかった原因と考えられる。

遺伝子組換えをしたコメと非組換えコメでは遺伝子発現の大きな変動はみられなかった。この原因としては今回組換えた遺伝子が RNA 結合タンパク質であり、生体内においては mRNA がストレス等を受けて高次構造をとるのを妨げることによって正常な機能を持つようにすることでストレス耐性を獲得していると思われる。そのため、これまでに発現していない遺伝子や、ストレス応答性の遺伝子の発現を誘導するのではなく、通常発現している遺伝子の発現量を下げないようにする働きをするため、RBP を遺伝子組換えしても遺伝子組換えしていないものと比較して遺伝子の発現量変化が少なかったと考えられる。

塩処理をしたイネとしていないイネについて代表的なストレス応答遺伝子の発現をみたところ、塩処理によってそれらの遺伝子発現量は上昇していたことから、植物体は塩ストレス応答をしていたと考えられた。それにも関わらず、コメでの網羅的に解析した場合、遺伝子発現量はそれほど大きく変動していなかった。この原因としては、ひとつは室内の環境が非常に整った場所で生育したことにより、植物体が受けた塩処理によるストレスが貯蔵組織であるコメにはそれほど大きな影響を与えなかったことが考えられる。また、今回行った塩処理は出穂してから 30 時間だけの間であったために、葉などではストレス応答遺伝子が発現したが、貯蔵組織ではストレスの影響が少なかったことが考えられる。今後、塩処理時間を出穂する前に与えたものや、長期間塩処理したイネを用いて遺伝子発現量変化を検討することが望まれる。また、水耕栽培だけでなく実際に屋外で土壌を用いて栽培した場合にどの程度遺伝子発現が変化するかについても確認することが望まれる。SeFLA あるいは McRBP を導入した遺伝子組換えタ

バコでは、NaClの有無にかかわらず非遺伝子組換え体に比較してその成長が良かったことから、ストレス耐性の向上というよりは、生育がよくなったことにより、結果としてストレスがかかった場合における生存率が高くなるものと考えられた。これらの効果がどのようなメカニズムによってもたらされるのかについては不明のままですが、SeFLAとMcRBP組換えタバコの交配後代においては、さらなる生育の向上が見られたことから、これらの遺伝子による効果は別々のメカニズムに基づくものであると思われる。マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的な解析を行った。その結果、SeFLAとMcRBP遺伝子を組換えた個体間、またそれらの交配後代の個体において遺伝子発現プロファイルの大きな変化は認められず、交配後代の個体において遺伝子発現が大きく変化していた遺伝子の約半分（増加したものでは49%、減少したものでは58%）についてはそれらの親の個体でも同様に遺伝子発現量が変化していた。すなわち、親世代で発現量が変化していた遺伝子の多くが交配した後代に遺伝し、発現量が高いあるいは低いまま維持されたものと考えられた。

これまでに食品として流通するような遺伝子組換え植物についてそれらを交配して作出されるスタック品種について、その親の世代で導入された遺伝子の発現、また導入されたことによって発現が変動した遺伝子がどのように遺伝するかについての知見はなかった。本研究において、遺伝子組換え植物同士の間において、親の世代で発現量が変化した遺伝子の多くが引き継がれていることが示唆された。今後、交配後代の個体のみで遺伝子発現量が大きく変動した遺伝子がどのようなものであるか、またそれらの遺伝子発現変動量が遺伝子を組換えていない個体を交配した場合に引き起こされる遺伝子発現変動量と比較したばあい、許容される範囲に収まるのかについて精査する必要があるものと考えられた。

E. 結論

遺伝子組換え生物が数多く開発され、それらが食品として流通し始めているが、食の安全という観点

から、これらの遺伝子組換え体について安全性評価を行う必要がある。しかし、遺伝子組換えに利用される遺伝子の種類は増加し続ける上に、“第三世代”と呼ばれる、生体内での働きや作用機序が明確でない遺伝子を組換えたものも開発され始めている。これらの遺伝子組換え体において、どのような遺伝子発現の変化が起きているかについて解析するために、第三世代の遺伝子組換え植物を作出し、さらにそれらの交配後代であるいわゆる“スタック品種”についても一つのモデルとして作出した。これらを用いて遺伝子発現について網羅的に解析を行ったところ、全体の遺伝子発現変動プロファイルは、遺伝子組換えコメにおいては若干の変化が認められたが、それ以上に遺伝子非組換え体においても、塩処理によって大きく変動していることが示唆された。また、ジャガイモにおいても遺伝子組換え、非組換え体における遺伝子発現プロファイルの変化よりも、個体間による変動が大きいことが示唆された。これらの結果から、プロテオーム解析やメタボローム解析を併せて行い、遺伝子組換え体可食部におけるタンパク質や代謝物の変動が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と考えられた。また、タバコのスタック品種においては遺伝子を組換えた親の世代に発現が変化していた遺伝子が受け継がれていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

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: 遺伝子組換え作物と非組換え作物の代謝成分の組成と含量を比較し、遺伝子組換え作物において栄養素の増減、あるいは有害成分の蓄積の有無を判別するためには、代謝成分の総和（メタボローム）を解析するメタボロミクス研究が必須である。本研究では、フーリエ変換型イオンサイクロトロン質量分離装置 (FT-ICR/MS)、GC-MS、LC-MS を組み合わせたメタボロミクスプラットフォームを基盤として、第3世代遺伝子組換え作物の代謝物一斉解析を実施した。平成21年度は転写因子 *DREB1a* 遺伝子導入組換えバレイショ塊茎を供試した。非組換え体との比較により、*DREB1a* 組換え体でストレス応答関連の代謝中間体含量の変動を確認した。特に、*DREB1a* 発現系統で β -cyanoalanine (β -CA) の有意な蓄積を認めた。 β -CA は、植物ホルモンであるエチレン生合成経路において、1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 酸化酵素反応の副産物である CN^- の除去反応によって生成する。すなわち *DREB1a* 遺伝子の発現によって、内生ストレス応答が活性化し、その二次的な結果としてエチレン生成の亢進と β -CA 含量増加に至った可能性が示唆された。平成22年度には、*LZ/NBS/LRR* 型に属する植物病害抵抗性遺伝子 (*RKM*) 導入バレイショ塊茎のメタボローム解析を実施した。野生型との比較から、組換え体で変動する代謝中間体を複数確認したが、これらに関連する代謝経路の活性変動との一貫した関連性は認められず、遺伝子組換えが直接の原因ではないと判断された。平成23年度は、リボソーム結合タンパク質遺伝子 (*MeRBP*) 導入イネとアラビノガラクトナンタンパク質遺伝子 (*SeFLA*) 遺伝子組換えタバコ、*McRBP* 遺伝子組換えタバコ、それらのスタック品種、および非組換え体タバコ緑葉のメタボローム解析を実施した。その結果、遺伝子組換えイベントそのものによるメタボローム変動よりも、ストレス応答による代謝活性のシフト、あるいは葉位別の代謝活性の違いを反映したメタボローム変動が顕著であることが分かった。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術は、生物種の垣根を越えて様々な有用形質を導入することを可能にした。遺伝子組換え技術に基づいた植物機能改変は、作物育種や食料品への適用、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。

遺伝子組換え植物は、導入された遺伝子の機能の違いによって大きく3種類に分類しうる。まず、除草剤耐性・病害虫耐性などが付与されたものを第1世代、成分改変による栄養成分改変やワクチン産生などの高付加価値を付与したものを第2世代組換え植物とするならば、転写調節因子や受容

体などの導入によって乾燥・塩害などの環境ストレス耐性付与を目指した遺伝子組換え技術は第3世代として分類される。

ピンポイントで生物機能改変を目指した第1・第2世代遺伝子組換え作物においては、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世代遺伝子組換え作物においても、その遺伝子組換え育種の母本となる作物との実質的同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世代遺伝子組換え植物の実質的同等性評価は、第1世代や第2世代組換え植物を対象とした場合と比べると、容易ではない。野生型植物では、時間的・空間的に厳密に制御された転写調節因子や受容体等が担う分子生理機構が解明されている。一方、これらの遺伝子を恒常的に発現した場合には、生理条件下では起こり得ない組合せの細胞機能に対して上位性を発揮する可能性も否定しえない。言い換えるなら、導入遺伝子が担う分子機構を基にして期待される有用形質以外の代謝変動は予測できない。したがって、意図しない細胞代謝機能の攪乱の有無を評価するための技術基盤が必須である。

遺伝子組換え植物を食用とする際の安全性に

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、遺伝子組換え植物の実質的同等性の評価を目的とした様々な分析が行われてきている。その中で、生体組織中の代謝物を一斉解析するメタボロミクス研究から得られる情報は、実質的同等性を評価するための基礎データとして極めて重要である。すなわち、メタボローム解析では、導入遺伝子機能に由来する代謝成分変動にとどまらず、それら以外の既知代謝物含量の比較とともに、未同定化合物の蓄積量の変動把握も可能である。

本研究では、第3世代遺伝子組換え作物のメタボローム解析を行った。平成21年度は、転写因子 *DREB1a* 遺伝子導入組換えバレイショ塊茎、平成22年度には、*LZ/NBS/LRR* 型に属する植物病害抵抗性遺伝子 (*RKM*) 導入バレイショ塊茎、平成23年度はアイスプラント由来リボソーム結合タンパク質 (McRBP) 遺伝子組換えイネ、アッケシソウ由来の新規アラビノガラクトナンタンパク質 (SeFLA) 遺伝子組換えタバコ、McRBP 遺伝子組換えタバコ、それらのスタック品種を供試し、メタボローム解析を実施した。

B. 研究方法

< 供試試料 >

シロイヌナズナの乾燥耐性誘導に関わる *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 (平成21年度)。*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. 平成 22 年度は, ネコブセンチュウ耐性遺伝子 *RKN* 遺伝子を高発現するバレイショ系統として R16, R34, R38 の 3 系統, および非組換え体 1 系統(NT)を供試した. これらの組換え体および非組換えバレイショは筑波大学(生命環境科学研究科遺伝子実験センター)隔離温室内で生育・収穫された. 採取された塊茎(直径約 30 mm)の表皮を除去し, 約 10 mm x 10 mm x 1 mm の切片に裁断した後, -80°C で保存した. 平成 23 年度は, SeFLA 組換えタバコ系統(L11), McRBP 組換えタバコ系統(R74), スタックタバコ系統(SeFLA 系統と McRBP 系統の交配によって作出された LR1 と LR2), 非組換えタバコ(WT)由来の緑葉(2 枚目, 5 枚目, 8 枚目)を供試した. また, McRBP イネ(系統1, 系統2)および非組み換え系統(日本晴)は, ストレス処理栽培(200 mM NaCl, 30h 処理)と通常条件栽培を行い, 収穫された玄米を供試してメタボローム解析を実施した. 分析試料は東京農工大・小関良宏教授から提供していただいた.

<方法>

化合物の抽出

凍結保存試料(約 30 mg)を乳鉢と乳棒を用いて磨砕した. 内部標準物質として 2 mg/mL リビトールを加えた 80%メタノールを磨砕組織の 50 倍容になるように加えた. 70°C で 15 min 加温した後, フィルター(Advantec, DISMIC-13JP, pore size; 0.2 μm)濾過することによって粗抽出液を得た. 玄米は 80%メタノール抽出に加えて, メタノール/クロロホルム(3:1)抽出を実施し, 脂溶性化合物の分析範

囲を拡大した. 試料は -80°C で保存した. 抽出物は 3 連で調製し, GC-MS 分析に供した.

GC-MS 分析用誘導体化

粗抽出液 500 μL を凍結乾燥した後, 無水ピリジンに溶解したメキシアミン塩酸塩(20 mg/mL)を 40 μL 加えた. 試料を完全に溶解後, 30°C で 90 min インキュベートした. さらに, 40 μL の N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド + 1% トリメチルクロシランを加え 37°C で 30 min インキュベートした.

質量分析実験

調製した抽出液は, Ion-trap GC-MS(Agilent 社製 Saturn 2000)分析と LC-LIT-TOF/MS(Hitachi 社製 NanoFrontier L)分析に供した. GC-MS 分析においては, 得られたマスプロファイルについて, 市販標準物質とのフラグメントピークの比較と検出時間の比較により化合物の同定を行った. 同定された化合物の相対含有量は, 各イオンピークの面積値を内部標準化合物として加えたリビトールの面積値との相対値として求めた.

Ion-trap GC-MS 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 (1.0 mL/min), カラムオープン(70°C 5 min; 70°C から 330°C まで $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇, 330°C で 2 min 保持, 質量範囲 $m/z = 40 - 650$). カラムは FACTOR FOUR column (30 m, 内径 0.25 mm, Agilent 社製)を用いた. クロマトグラムとスペクトル解析には Saturn Work Station ver. 6.3(Varian 社製)を用いた.

LC-LIT-TOF/MS 分析条件

カラムは Cadenza CD-C18 (Intakt 社製 150 x 2 mm, 3 μ m)を用いた。カラム温度 40°C, 流速 0.19 mL/min, 溶出溶媒として A 液;H₂O/0.1% ギ酸, B 液;アセトニトリル/0.1% ギ酸を用い, 0 - 5 min; A:B = 95%:5%, 5 - 50 min; A:B = 95%:5% → A:B = 60%:40%の直線勾配溶出を適用した。データ処理には Nano Frontier Data processing を用いた。

統計処理

組換え体および非組換え体の各試料について, それぞれ独立に3反復の分析操作を行った。3反復実験で得られた各同定化合物における相対含有量の平均値について, 主成分分析を実施した。組換え体において同定された化合物の相対含有量における変動の有意差判定は, t 検定によって評価した。各組換え体と非組換え体の組について, GC-MS 分析により得られた化合物の相対含有量について統計検定量を計算した。計算には Microsoft EXCEL (Microsoft 社)を用いた。

C. 結果・D. 考察

平成 21 年度に行った DREB1 遺伝子組換えバレイショ塊茎のメタボローム解析結果から, 組換え系統 (35S, D163, D164) では非組換え体 (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, グルタチオン), GABA のレベルが上昇している傾向にあり, 組換え系統でアミノ酸輸送の亢進や酸化還元レベルの恒常性維持の活性化が示唆された。また, 組換え系統では β -cyanoalanine (β -CA) のレベルが上昇している傾向が認められた。 β -CA は, 植物ホルモンであるエチレン生合成

の副産物として生成する HCN の解毒作用の結果として産生する。DREB1a 遺伝子の導入によってストレス応答が活性化された結果と推察される。本研究で検出された β -CA レベルは極めて微量であり, 細胞毒性を発揮するレベルからははるかに低い。バレイショが蓄積する糖アルカロイド(ソラニン, チャコニン)含量は, 非組換え体の方が有意に高かった。

平成 22 年度には, ネコブセンチュウ病耐性遺伝子組換えバレイショと非組換えバレイショ塊茎を供試し, それぞれのメタボロームを比較した。主成分分析の結果では, 3 系統の組換え体と非組換え体の中で代謝物の蓄積の違いを示唆する明確な差は検知されなかった。GC-MS による非ターゲット型メタボローム解析によって, 組換え体の一つの系統で有意に含量が増加した化合物(尿素, ピログルタミン酸)が存在することが明らかになったが, 他の 2 つの組換え体系統では有意差がなかった。バレイショが蓄積する糖アルカロイド(ソラニン, チャコニン)含量は, 非組換え体と組換え体の間で有意な差は認められなかった。組換え体の 3 系統の間でも代謝物蓄積に顕著な差が見られたことから, 個体差, 生育環境の差や収穫後の保管条件などの違いがメタボローム形成に大きく影響を及ぼし, その影響は組換え体と非組換え体間のメタボローム差よりも大きいと考えられた。

平成 23 年度は, SeFLA 遺伝子組換えタバコ, McRBP 遺伝子組換えタバコ, それらのスタック品種, および非組換え体タバコ緑葉, McRBP 組換えイネ系統と非組換えイネ(日本晴)から収穫された玄米の代謝物プロファイルを解析した。タバコ, イネともに組換え系統と非組換え系統の間で, 代謝機能のストレス応答性に差が認められた。しかし

ながら、実際のストレス処理、あるいは生物学的な内在性の代謝機能の違いは、導入遺伝子の有無によって生じる代謝機能の差よりもはるかに大きいことが分かった。

第3世代遺伝子組換え作物の実質的同等性評価の基盤整備として、作物固有のメタボロームの変動幅を統計的に把握することが重要である。そのためには、検定対象作物において、品種、生育条件、保管条件などが異なる試料を揃えて広範なメタボローム解析を実施する必要があると考えられる。

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
総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

組換え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：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)遺伝子組換えじゃがいも、遺伝子組換えコメ並びにタバコ葉を用いてアレルゲンを含むタンパク質の網羅的解析手法の検討、(2)動物を用いる組換え生物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、アレルゲンデータベース(ADFS)の更新並びに低分子アレルゲン解析ツールの新たな追加、(4)発現タンパク質の品種間でのばらつき調べるための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の塊茎、RKN(Root-knot nematodes)抵抗性遺伝子を導入したジャガイモの塊茎、RBP(RNA binding protein)を導入したコメ、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をモデル植物として用い、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動及び2D-DIGEによるタンパク質発現の量的、質的変動を調べた。DREB1A遺伝子導入ジャガイモで、非組換え体に比べ、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。また、RBP遺伝子を導入したコメでは、塩ストレス(200mM NaCl)存在下・非存在下で栽培した非組換え (NT)コメにおける発現量と比較したが、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。なお、RBPコメのストレス下で発現の上昇するタンパク質には、putative abscisic acid-induced protein等があった。(2)食物アレルギー動物モデルBALB/cマウスを用いてDREB1A遺伝子導入ジャガイモとその非組換え体、RKN抵抗性遺伝子導入ジャガイモとその非組換え体、RBP遺伝子導入コメと非組換えコメの感作を行い、それぞれ組換え体と非組換え体のアレルゲン性について比較検討を行った。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により、組換えによってアレルギー誘発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のため、T細胞エピトープの予測の可能性を、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)インデックスを用いて行ったところ、T細胞エピトープの予測が可能であることを示唆するデータが得られた。また、ADFSのアレルゲン及びエピトープ情報の更新を3年間続けて行い、文献検索により得られたエピトープ既知のアレルゲン34種を新たにADFSに搭載し、平成24年3月時点で、搭載されているアレルゲン数1583本、エピトープ既知のアレルゲン数は165種となった。また、平成24年3月に低分子アレルゲンの検索画面をADFS内に立ち上げた。(4)発現タンパク質の品種間での差を調べるための2D-DIGEによる網羅的解析では、in house試験としてコメ10品種を用いた品種間の差に関するデータの蓄積を行い、国産米とインディカ米でのタンパク質発現が大きく異なることを見出した。平成23年度にコメ4品種を用いた5機関での2D-DIGEの国際バリデーション試験を開始した。

協力研究者

中村 亮介、中村 里香

(国立医薬品食品衛生研究所)

美宅 成樹

(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

(財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)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に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し、(1)遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲンを含むタンパク質の量的、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、(4)発現タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析を行うことの4点をとりあげ、研究を進めた。

B. 研究方法

(1) 遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲンを含むタンパク質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入

<試料>

平成21年度は、筑波大学・菊池博士らによって供与された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DREB1A遺伝子をアグロバクテリウム法により導入した遺伝子組換え(GM)ジャガイモ塊茎と、比較対照としての、非組換え(Non-GM)ジャガイモを用い、平成22年度は、筑波大学・菊池博士らによって供与されたRKN(Root-knot nematodes)抵抗性遺伝子を導入したジャガイモの塊茎と、比較対照としての、非組換え(Non-GM)ジャガイモを用い、平成23年度は、東京農工大学・小関博士らによって供与されたRNA binding protein(RBP)をコードしている遺伝子をCaMV(35S)プロモーターでドライブしたイネ2系統(RBP1, RBP2)及び対照に非組換え(Non-TG; NT)イネ1系統(日本晴)由来で、出穂時点より、200mM NaClで30時間の塩ストレスをかけて栽培したものと、塩ストレスをかけずに栽培したもののコメを用いた。さらに、平成23年度は、スタック品種のモデルとして、東京農工大学・小関博士らによって供与されたWT3系統、SeFLA(Fasiclin-like arabinogalactan protein)を単独導入したL11株2系統、RBP(RNA-binding protein)を単独導入したR74株3系統、L11とR74をかけ合わせたLR1株2系統、LR2株3系統の遺伝子組換えタバコ(Nicotiana tabacum)から得た葉を用いた。

<方法>

(i) Non-GM及びDREB1A-GMジャガイモ塊茎からのタンパク質の抽出並びにアレルゲン並びにタンパク質の網羅的解析

DREB1A遺伝子導入(rd29A, 35S)またはnon-GM(NT)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℃で保存した。

アレルギーの検出に用いるジャガイモアレルギー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。既知アレルギー 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。Non-GM、GM (rd29A, 35S) ジャガイモタンパク質 (5.6 μ g/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ギー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。

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には、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。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 (4 μ g/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。

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を行うために、ジャガイモタンパク質 (20 μ g) 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 μ l 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 11kVhr 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 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、ジャガイモタンパク質 (100 μ 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・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°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の相同性検索を行った。

2D-DIGE による網羅的タンパク質解析は、以下の方法で行った。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°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 Inr タンパク質データベース内での相同性検索を行った。

(ii) Non-GM 及び RKN 抵抗性遺伝子導入 GM ジャガイモ塊茎からのタンパク質の抽出並びにタンパク質の網羅的解析

GM ジャガイモは、塊茎における RKN 抵抗性遺伝子の発現量から、発現量の低い 9 個体 (RKN low) と発現量の高い 9 個体 (RKN high) の 2 群に分類した。ジャガイモタンパク質の抽出は、ジャガイモ 1 g 当たり 5 mL の細胞溶解バッファー (30 mM Tris, 2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS) 中で、Polytron (Kinematica 社) を用いてホモジナイズし、10,000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿を取り除いた。試料は使用時まで-80°Cで保存した。2D-DIGE によるタンパク質の網羅的解析は、(i) に記した方法で行った。

(iii) Non-GM 及び RBP-GM コメタンパク質の抽出並びにタンパク質の網羅的解析

コメタンパク質の抽出は、Multi beads shocker (安井器械) を用いてホモジナイズし、玄米 10 粒 (約 0.5 g) 当たり 3 mL の 1M NaCl 溶液を加えて終夜 4°C で攪拌し、翌日 10,000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿を取り除いた。試料は使用時まで-80°Cで保存した。2D-DIGE によるタンパク質の網羅的解析は、(i) に記した方法で行った。

(iv) non-GM, GM タバコ葉からのタンパク質の抽出並びに網羅的解析

タバコ葉からのタンパク質の抽出には、P-PER Plant Protein Extraction Kit (Thermo Scientific 社) を用いて、キット添付のプロトコルに従い行った。2D-DIGE は、(i) と同様に行った。WT・L11・R74・LR1・LR2 の 5 群とし、Bonferroni 検定により、WT vs L11, WT vs R74, WT vs LR1, WT vs LR2 の発現差異検定を行い、2 倍以上の発現差異が $p < 0.05$ で有意であったスポットを抽出した。

(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アレルギー動物モデルの開発

(i) DREB1A-GM 及び non-GM ジャガイモ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。

(ii) RKN-GM及non-GMじゃがいも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のリノール酸緩衝生理食塩液 (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OVA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0.8 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 4 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、卵黄レシチンを用いたLLを媒体として8 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。

(iii) RBP-GM及びnon-GMコメ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、通常および塩水栽培した組換えコメ系統1 (GM1nおよびGM1s)、組換えコメ系統2 (GM2nおよびGM2s) および非組換えコメ (NGnおよびNGs) 投与群を6-7匹/群で構成した。また、媒体対照 (Vehicle)、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) 投与群を設定した。それぞれのコメは、1M 塩化ナトリウムと0.1M 水酸化ナトリウムの抽出液を混合した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。Vehicle、PEPおよびOVA群の投与検体は、0.4M NaCl 0.06 M NaOH水溶液 (コメ抽出液と同組成) 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0.8 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 8 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8 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。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、各投与群間の差はMann-Whitneyの方法で検定した。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。

(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フィオ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、バイオフィオ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。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。