

遺伝子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 食品部 部長

研究要旨:

平成25年度は、新開発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)成長ホルモン導入組換えアマゴを用いたタンパク質発現の非組換え体との網羅的比較解析、(2)マウスを用いる経口感作、経口惹起による低アレルゲン組換えコメのアレルゲン性の検討、(3)アレルゲンデータベース(ADFS)のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行った。具体的には、(1)2D-DIGE法を用いた100g、125g、150g体重の組換え(GM)並びに非組換え(NT)アマゴの筋肉タンパク質の発現差異解析の結果、100gで63 spots、125gで50 spots、150gで100 spotsのタンパク質で、2倍以上の発現差異がみられた。全体に、GMアマゴではNTアマゴと比較して、発現差違のみられたタンパク質では、発現量の低下しているタンパク質の方が多かったが、発現量の増加していたタンパク質に、ピルビン酸キナーゼがあり、解糖系の活性化の起きていることが示唆された。一方、発現の大きく低下していたタンパク質として、Creatine kinase, nucleoside diphosphate kinase等のエネルギー代謝に関連するタンパク質があった。Parvalbumin等のアレルゲンについては、GM並びにNTアマゴの間で差がみられないか、むしろGMの方で低下傾向が認められた。(2)非組換えコメあるいは低アレルゲン化(14-16kDaタンパク質発現抑制)組換えコメの抽出タンパク質で感作されたマウスにおける経口惹起時にみられるアナフィラキシー症状の比較を行ったが、低アレルゲン米群では、ほとんどアナフィラキシー症状を示さず、非組換え米群に比べて抗体価レベルが低かったことから、低アレルゲン米の食物アレルゲン性の低下が動物モデルにおいて検出されたと考えられた。(3)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10種のアレルゲンについて、総エピトープ数191の情報を追加し、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1698となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は137種となった。

協力研究者

西島 正弘	国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
酒井 信夫	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
中村 里香	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
安達 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
中村 亮介	国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
新藤 智子	(一財)食品薬品安全センター 秦野研究所
大沢 基保	(一財)食品薬品安全センター 秦野研究所
佐藤 里絵	(独)農業・食品産業技術総合 研究機構 食品総合研究所
近藤 康人	藤田保健衛生大学 坂文種報徳會病院
島田 浩章	東京理科大学 基礎工学部

A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物に限らず、遺伝子組換えニワトリやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実用化されつつある。これらはこれまで存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討しておく必要があると考えられる。さらには、最近問題となっているのは、遺伝子組換え植物同士を交配して得られる後代種である。これらは遺伝子を組換えて付与された機能が'スタック'することによって、生産性等の向上を図っているものであるが、これらのように遺伝子を組換えたものをさらに交配した後代において、形質にどのような変化が表れているかについて研究されている例は少ない。そ

のため、今後増えるであろうスタック品種についてもそれらの組換え遺伝子の検出技術や安全性評価基準について検討しておく必要が望まれる。遺伝子組換え技術による安全性を考えるうえで、遺伝子組換えによる非意図的な影響を明らかにすることが必要であり、プロテオミクス等の網羅的解析法も一つの有用となると考えられる。そこで本分担研究では組換え体と非組換え体を用いて 2D-DIGE を用いてプロテオミクスによる網羅的解析を行い、両者の比較を行うことを第一の目標とし、第二に、プロテオームのターゲットを絞った解析法であるアレルギーノーム手法でアレルギーに関する発現量の比較を行うこと、また、組換え体と非組換え体のアレルギー性の比較を動物モデルを用いて検討することを目的とする。

本年度は、組換え体として、成長過程の違う 3 段階の成長ホルモン導入アマゴ並びに同じ重量をもつ非組換えアマゴのプロテオーム解析を行った。また、昨年から解析を行っているアレルギー低減下コメに関しては、非組換えコメとともに動物モデルを用いるアレルギー性試験に供した。

B . 研究方法

(1) 供試試料

ベニザケ成長ホルモン遺伝子を過剰発現させた遺伝子組換え高成長アマゴ (GM アマゴ) は、水産総合研究センターの名古屋博之先生から提供していただいた。対照区として非遺伝子組換えアマゴ (non-GM アマゴ) を用いた。GM および non-GM アマゴは、生重量 (体重) が 100 g, 125g, 150 g に達した個体を 3 個体ずつサンプリングし、3 枚におろした片身 (筋肉組織) を液体窒素で急速凍結させた後、1cm 四方程度の大きさに破碎した状態の試料を供試された。

体重 100g の GM アマゴは GM100, non-GM アマゴは NT100, 体重 125g の GM アマゴは GM125, non-GM アマゴは NT125, 体重 150g の GM アマゴは GM150, non-GM アマゴは NT150 と命名した。

また、イネ種子中の主要アレルギーである

14-16 kDa タンパク質群をコードする遺伝子の発現が RNAi 法によって抑制された低アレルギーイネ RA14-pANDA 系統 (GM イネ) は、昨年同様、東京理科大学の島田浩章教授から提供していただいた。対照区として同様の屋内環境で栽培した非遺伝子組換えイネ (non-GM イネ) を用いた。これらの系統の種子を微粉末に加工した状態の試料が供試された。

(2) 成長ホルモン導入組換えアマゴを用いたタンパク質網羅的比較解析

組換え及び非組換えアマゴの筋肉断片 50mg をバイオマッシャー-III (Funakoshi 社) に入れて、Protease inhibitor cocktail (Sigma 社) を添加した 2D-lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 30mM Tris, 4% CHAPS, pH8.5) 200 μ L を加えてすりつぶし、攪拌子を除いて、10,000 rpm, 10 min で遠心後、溶出画分を再度 10,000 rpm, 10 min 遠心し、沈殿を除く。この操作をもう一度繰り返して、上清を 1.5mL エッペンチューブに分注して、一部は長期保存用に -80 で保存する。試料溶液中のタンパク質濃度は 2-D Quant Kit (GE Healthcare 社) にて測定し、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare 社) を用いてタンパク質を精製した。各群のアマゴタンパク質 25 μ g を 200 pmol の Cy3 または Cy5 で標識し、4 pmol の lysin で標識を停止した。また、各群のアマゴタンパク質 (6 群 18 匹分) を等量ずつ混合し、Cy2 で標識したものを内部標準として用いた。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 2 \times サンプルバッファーおよび膨潤バッファーを加えて 250 μ l とし、Immobiline Drystrip (pH 3-10 NL, 13 cm long, GE Healthcare 社) 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 Drystrip を IPGphor isoelectric focusing system III (GE Healthcare 社) の説明書に従い、500V で 4 時間、1000V で 1 時間、8000V で 4 時間、20 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 (13 x 13 cm, DRC 社) 中で 2 次元目の SDS-PAGE により分離し、Typhoon9400 (GE Healthcare 社) 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 社) にて解析するエリアを切り出し、Decyder Software ver. 7 (GE Healthcare 社) 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、各スポットの各群比の平均値を求めた。Student-*t* 検定により、NT 群と TF 群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。

発現差異が認められたタンパク質の同定には、コメタンパク質 (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。切り出したゲルは脱色した後、50% アセトニトリル・25 mM 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, 0.01 % Protease max [Promega 社]) 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 社) と混合し、4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて、トリプシン消化ペプチドの 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 社) を用い、NCBI nr タンパク質データベース内での同源性検索を行った。

(3) 動物モデルを用いる低アレルゲンコメのアレルギー性の解析

(実験 1) 7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (E)、非組換え米 (NG)、低アレルゲン米 (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 4-6 匹/群で設定した。非組換え米あるいは低アレルゲン米 1 g に対して 1 M 塩化ナトリウム溶液 15 mL を加えて乳鉢で粉碎した。ホモジネートを 4 下、1 時間振とう抽出した後、10000 g で 30 分間遠心分離し、上清を回収した (NaCl 抽出画分)。沈殿に 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加え、4 下、1 時間振とう抽出した後、10000 g で 30 分間遠心分離し、上清を回収した (NaOH 抽出画分)。NaCl 抽出画分と NaOH 抽出画分を 4:6 の割合で混合した後、限外ろ過膜 (分子量 3000) で濃縮して米抽出液とした。それぞれの米抽出液に、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。E、PEP および OVA 群の媒体は、0.4M NaCl 0.06 M NaOH 水溶液 (コメ抽出液と同組成) と LL の乳化液とした。いずれの群も 2 回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に各蛋白 7 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 7 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、感作終了時に採血し、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。

(実験 2) 7 w の BALB/c マウスを食物アレルギーモデルの条件、すなわちサリチル酸の併用下、乳化液媒体で OVA 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した (OVA/E+SA)。最終感作の 4 日後に血液を採取し、OVA 特異抗体価を確認した後、OVA 10 mg/0.4 mL LL/匹を経口投与して惹起 (1 回目) した。その 2 週間後にマウスを 2 群に分け、卵レシチンを用いた LL を媒体として 10 mg/0.4 mL/匹の割合で一方は OVA、他方はラクトグロブリン (LG) を経口投与して惹起し、アナフィラキシー症状の強度

を比較した。また、惹起の3日後に採血し、OVA特異抗体価を測定した。

(4) コメアレルギーのウェスタンブロットを用いる定量法の開発

(i) リコンビナント米アレルギーの発現・精製

リコンビナント米アレルギーGlyoxalase IおよびRAG2の発現には、独立行政法人農業生物資源研究所ジーンバンクより供与されたGlyoxalase I (Os08g0191700, AK066092) および RAG2 (Os07g0214300, AK107328) をコードする完全長cDNAを用いた。それぞれの完全長cDNAをpGEX-6P-1 GST Expression Vector (#28-9546-48, GE Healthcare U.K. Ltd.) にサブクローニングし、得られたプラスミドを *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS株に形質転換した。このプラスミドの導入された大腸菌株の前培養液を、波長600 nmでの濁度(OD値)が0.05になるよう、100 µg/ml Ampicillinおよび100 µg/ml Chloramphenicolを含むLysogeny Broth (LB) 培地200 mlに加え、振盪機 (EYELA Multi Shaker MMS, 東京理化学機器株式会社) による160~180 rpmの振盪速度で37℃にて培養した。培養液のOD値が0.4に到達した後、終濃度が0.2 mMとなるよう Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、25℃にて4時間振盪培養した。培養終了後、この培養液を11,000 xg、10 min、4℃にて遠心し、大腸菌を集菌した。次に、250 U/ml Benzonase (Benzonase Nuclease HC, #ML-71205-3, Novagen, Merck Millipore)、2 mg/ml Lysozyme (#L7651, Sigma-Aldrich Co. LLC.)、および大腸菌1 g当たり250 µLのProtease Inhibitor Cocktail (#P8465, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を含む BugBuster[®] Protein Extraction Reagent (#70584, Novagen, Merck Millipore) 5 mlに対し、集菌した大腸菌1 gをピペティング操作により懸濁した。この懸濁液を、ローテーター (RT-50, タイテック株式会社) を用いて5~10 rpmの回転速度で室温にて10分間攪拌した。この攪拌した懸濁液を14,000 xg、30 min、4℃にて遠心し、上清を得た。この上清に、PBSで3回洗浄したGlutathione

Sepharose 4B担体 (#17-0756-01, GE Healthcare UK Ltd.) を、大腸菌培養液200 ml当たり2 ml加え、ローテーター (RT-50, タイテック株式会社) を用いて5~10 rpmの回転速度で4℃にて終夜攪拌することでアフィニティー精製を行った。続いてこの担体をWash Buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1x Protease Inhibitor Cocktail] を用いて8回洗浄後、Cleavage Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] を用いて2回洗浄したのち同bufferに再懸濁し、次に担体1 ml当たり80 UのPrescission Protease (#27-0843-01, 500U, GE Healthcare UK Ltd.) を加えてリコンビナント体からGSTを切断した。このGST切断後のリコンビナントを含む溶液を、Amicon Ultra-0.5 ml (#UFC501096, Merck Millipore) を用いてPBSに置換並びに濃縮し、リコンビナントアレルギー溶出物とした。得られたリコンビナントアレルギー溶出物を、Laemmli法に従い10-17.5% Gradient Gel (NXV-3X8HP, 18 well, DRC Co., Ltd.) 中で300V、13分間の条件でドデシル硫酸ナトリウム ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (Quick-CBB, #299-50101, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 染色することで、そのバンドを検出した。得られたリコンビナントGlyoxalase Iのタンパク質定量は、BCA Protein Assay Reagent (#23227, Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いたピシンコニン酸 (BCA) 法により決定した。得られたリコンビナントGlyoxalase IIは1.5 mLチューブに小分けし、使用するまで-80℃にて保存した。得られたリコンビナントRAG2のタンパク質濃度は、濃度既知タンパク質とともにSDS-PAGEを行いCBB染色し、濃度既知タンパク質のバンドと比較することで推定した。得られたリコンビナントRAG2は使用するまで4℃にて保存した。

(ii) コシヒカリ玄米からの塩可溶性タンパク質画分の抽出

独立行政法人農業環境技術研究所より提供されたコシヒカリの玄米 4 g を、Multi-beads

Shocker用破碎チューブ(ST-0350F-0, 安井器械株式会社)に破碎用マグネット1個と共に入れ、Multi-beads Shocker(安井器械株式会社)を用い、室温にて2,500 rpmの回転速度で1分間振動することにより粉末状に破碎した。得られた粉末は直ちに氷冷し、うち0.5 gを15 mLチューブに量り取った。この粉末を、Protease Inhibitor Cocktail(EDTA-free, 100x, #78415, Thermo Fisher Scientific Inc.)を含む1M NaCl溶液5 mLに懸濁後、ローテーター(RT-50, タイテック株式会社)を用いて5~10 rpmの回転速度で4 にて一晩撹拌した。次に、撹拌後のサンプルを8,000 xg、10 min、4 にて遠心し、上清を得た。この上清を再度8,000 xg、10 min、4 にて遠心し、米の塩可溶性タンパク質画分を回収した。得られた溶液のタンパク質量はBCA法により決定した。得られた上清は1.5 mLチューブに小分けし、使用するまで-80 にて保存した。

(iii) SDS-PAGEによるリコンビナント米アレルゲンおよび米塩可溶性タンパク質画分の分離

リコンビナント Glyoxalase I(400, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2.5 ng) リコンビナント RAG2(500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2.5 ng) および米の塩可溶性タンパク質画分(10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 μ g)を、10-17.5% Gradient Gel(DRC Co., Ltd.)を用いて300V、13分間、SDS-PAGEを行った。次にSDS-PAGE後のゲルをCBB染色し、染色後のゲル画像をスキャナー(SAYACA-IMAGER, DRC Co., Ltd.)を用いて取り込んだ。続いてCBB染色後のゲルに脱色液(50% MeOH, 7% acetic acid)を用いて15分間の脱色・固定操作を2回行った後、SYPRO Ruby染色液中で一晩染色した。次に染色後のゲルを洗浄液(10% MeOH, 7% acetic acid)を用いて30分間洗浄し、蒸留水で洗浄後、Typhoon 9200(GE Healthcare UK Ltd.)を用い、励起波長:532nm、蛍光フィルター:610BP30、PMT ボルテージ:600、Pixel size:100 μ mの条件で検出した。

(iv) 米アレルゲン特異的抗体を用いたウェスタンブロット法による米アレルゲンの検出

(iii)と同様の方法で、リコンビナント米アレル

ゲンおよび米塩可溶性タンパク質画分のSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後のゲルをポリビニルイリデンジフルオライド(PVDF)膜(Immun-blot PVDF Membrane, 0.2 μ m, 162-0177, BIO-RAD)に38mA、定電流にて一晩転写した。転写後の膜を0.5% Casein-PBSで2時間ブロッキング後、一次抗体として1000倍希釈した抗Glyoxalase Iウサギ血清または1000倍希釈した抗RAG2ウサギ血清(Satoh et al., Regul. Toxicol. Pharmacol., 59, 437-444, 2011)に室温にて1時間反応させた。次に、一次抗体と反応させた膜をPBS with 0.05% Tween-20(PBS-T)を用いて3回洗浄した後、二次抗体としてHRP標識ウサギIgG抗体[Anti-rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ Fragment Donkey, GE Healthcare UK Ltd., 1:1,000希釈]を用い、室温にて1時間反応させた。その後、二次抗体と反応させた膜をPBS-Tによる3回の洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)溶液(TMB Solution for Membrane, #200-19433, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を用いた発色反応により検出した。発色反応後の膜の画像を、スキャナー(GT-9800F, EPSON)を用いて取り込んだ。

(5)アレルゲン予測の解析法

2013年6月から2014年5月の間にNCBI PubMedに収載された論文のうち、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。

C. 研究結果

(1)成長ホルモン導入組換えアマゴを用いたタンパク質網羅的比較解析

等体重の組換え及び非組換えアマゴの筋肉断片のプロテオーム解析を2D-DIGEで行った結果をFig.1からFig.3に示す。タンパク質のスポットとしては、約1390のスポットが得られたが、Fig.1に示すNT100とGM100のアマゴ筋肉の発

現差異解析では、63 スポットで2倍以上の差違がみられた。発現に差違のみられたタンパク質スポットを○印で示しているが、そのうち15 スポットについて、Table1 に示すようにMALDI-TOF MS/MS で同定することができた。GM100/NT100 の発現の比が、Table1 では fold change で示されているが、2 より大きい値を示す(すなわち GM100 の方が発現量が大きい)タンパク質として、スポット No.585, 586, 588 の pyruvate kinase 及びスポット No.990 の Pdlm7 があつた。一方、fold change が 0.5 以下のタンパク質として、スポット No. 766, 775 の creatin kinase, スポット No.1196, 1204, 1209, 1214 の nucleoside diphosphate kinase, スポット No.1278, 1380, 1382 の parvalbumin beta 1 があつた。

Fig.2 に示す NT125 と GM125 のアマゴ筋肉の発現差異解析では、50 スポットで2倍以上の差違がみられた。発現に差違のみられたタンパク質スポットを Fig. 1 と同様○印で示しているが、そのうち20 スポットについて、Table1 に示すようにMALDI-TOF MS/MS で同定することができた。同定されたタンパク質で、GM125/NT125 の発現の fold change が2以上のタンパク質は観察されず、fold change が0.5以下のタンパク質として、スポット No. 659 の alpha-2 enolase 1, スポット No. 736, 739, 766, 775, 780 の creatin kinase, スポット No. 817 の tropomyosin, スポット No.1028 の myosin light chain, スポット No.1196, 1204, 1209, 1214 の nucleoside diphosphate kinase, スポット No.1278, 1380, 1382 の parvalbumin beta 1 があつた。

Fig.3 に示す NT150 と GM150 のアマゴ筋肉の発現差異解析では、100 スポットで2倍以上の差違がみられた。発現に差違のみられたタンパク質スポットを○印で示しているが、そのうち10 スポットについて、Table1 に示すようにMALDI-TOF MS/MS で同定することができた。同定されたタンパク質で、GM150/NT150 の発現の fold change が2以上のタンパク質は観察されず、fold change が0.5以下のタンパク質として、スポット No. 736, 775, 780 の creatin kinase, スポット

No.1196, 1204, 1209, 1214 の nucleoside diphosphate kinase, スポット No. 1380 の parvalbumin beta 1 があつた。

(2) 動物モデルを用いる低アレルゲンコメのアレルギー性の解析

(実験1) 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、E群 0.0 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 1.8 と有意 ($p < 0.01$) に上昇した。NG 群と GM 群のスコアも E 群に対して、若干の上昇を示したが、NG 群と GM 群のスコア平均は 0.7 および 0.2 であり、両群のスコアに有意差は認められなかった。両群の動物が示した症状はいずれも軽微であったが、NG 群が 4/6 例のマウスに症状を認めたに対して、GM 群では症状を認めたマウスは 1/5 例であった (Fig.4)。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、NG 群は 4/6 例、GM 群は 2/5 例のマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出され、NG 群の方が高い抗体価を示した (Fig.5)。

(実験2) 血清中に OVA 特異 IgG1 抗体を産生し、OVA による1回目の惹起においてアナフィラキシー症状を示すことを確認したマウスでは、2回目の惹起において OVA によってアナフィラキシー症状が惹起されたが、異種蛋白質である LG では、OVA 特異抗体が存在している状態においても、アナフィラキシー症状は全く観察されなかった (Fig.6 および Fig.7)。

(3) コメアレルゲンのウェスタンブロットを用いる定量法の開発

大腸菌を用いた発現・精製の結果、リコンビナント Glyoxalase I はほぼ単一のバンドとして検出された (Fig. 8)。BCA 法によるタンパク質定量の結果、大腸菌 200 ml 培養液から 720 μ g のリコンビナント Glyoxalase I が得られた。一方、リコンビナント RAG2 として得られた溶出物には複数のバンドが見られた (Fig.8)。そこで、得られたリコンビナント RAG2 を濃度既知のアレルゲン (Fag e 2) とともに SDS-PAGE 後 CBB

染色し、濃度既知タンパク質のバンドと比較することでリコンビナント RAG2 の濃度を推定した。その結果、リコンビナント RAG2 の濃度は 67 ng/ μ l と推定された (Fig. 9)。また、コシヒカ리의玄米 0.5 g からは 6.6 mg の塩可溶性タンパク質画分が得られた。次に、リコンビナント米アレルギーおよび米塩可溶性タンパク質画分を用い、SDS-PAGE 後 CBB 染色 (Fig. 10 A, B, C)、SYPRO Ruby 染色 (Fig. 11 A, B, C)、および米アレルギー特異的抗体を用いたウエスタンブロットを行った (Fig. 12 A, B)。

ウエスタンブロットの結果、用いた抗体は、検出に用いたすべての量のリコンビナント Glyoxalase I およびリコンビナント RAG2 を検出することができ、2.5 ng まで検出できることがわかった。さらにこの方法では、0.05 μ g の米塩可溶性タンパク質画分に含まれる Glyoxalase I および RAG2 を検出することができた (Fig. 12)。

(4) アレルゲン予測の解析法

キーワード検索とピアレビューにより、本年度新たに追加したエピトープ情報は、10 報の論文から 10 種のアレルゲンについて、総エピトープ数 27 の情報を追加した (Table 2)。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 1698 となった。エピトープ既知のアレルゲン数は 137 種となった。

D . 考察

(1) 成長ホルモン導入組換えアマゴを用いたタンパク質網羅的比較解析

等体重の組換え及び非組換えアマゴの筋肉断片のプロテオーム解析を 2D-DIGE で行った結果から、全体に、GM アマゴでは NT アマゴと比較して、発現差違のみられたタンパク質では、発現量の低下しているタンパク質の方が多かった。発現量の増加していたタンパク質に、ピルビン酸キナーゼがあり、解糖系の活性化の起きていることが示唆された。一方、発現の大きく低下していたタンパク質として、Creatine kinase,

nucleoside diphosphate kinase 等のエネルギー代謝に関連するタンパク質があった。Parvalbumin 等のアレルゲンについては、GM 並びに NT アマゴの間で差がみられないか、むしろ GM の方で低下傾向が認められた。

(2) 動物モデルを用いる低アレルゲンコメのアレルギー性の解析

マウス経口感作並びに経口惹起を行うマウスモデルを用いて、低アレルゲン米の食物アレルギー性を非組換え米と比較評価した。低アレルゲン米は 1 g あたり 50~53 mg、非組換え米は 1 g あたり 36~45 mg の蛋白質がそれぞれ抽出された。低アレルゲン米から抽出される蛋白質量は非組換え米よりやや多かった。低アレルゲン米の抽出蛋白で感作したマウスは、ほとんどアナフィラキシー症状を示さず、非組換え米に比べて抗体価レベルが低かったことから、低アレルゲン米の食物アレルギー性の低下が動物モデルにおいて検出されたと考えられた。

新規導入蛋白質の食物アレルギー性評価においては、感作成立およびアレルギー反応誘発の両面から従来の食経験のある食品以上に食物アレルギーのリスクが上昇しないことを調べる必要がある。これに対して、低アレルゲン食品の性能評価においては特定の食品に感作されたヒトに対して、アレルギー反応の誘発を低減する性能があるかを調べる必要が生じる場合がある。本モデルは経口投与によって特定の蛋白質に対する感作を成立させ、特定の蛋白質の経口投与によってアレルギー反応を誘導できることから、従来の食品蛋白質を感作したマウスを用い、低アレルゲン化食品のアレルギー誘発能についても評価できると考えられる。本年度の研究で、経口投与によって OVA を感作し、血清中に OVA 特異抗体を有しているマウスを異種蛋白質である LG で惹起したところ、アレルギー反応が全く誘発されないことを観察した。本モデルでは感作蛋白質に対する特異的なアレルギー状態が形成されていることから、惹起反応に限定された低アレルゲン化食品の性能評価にも有用となる

可能性が考えられた。

(3) コメアレルゲンのウェスタンブロットを用いる定量法の開発

コメの主要アレルゲンである RAG2 と Glyoxalase 1 についてウサギ抗血清を用いるウエスタンブロットでコメ抽出物中の濃度を測定する方法の開発を試みた結果、用いた抗体は、検出に用いたすべての量のリコンビナント Glyoxalase 1 およびリコンビナント RAG2 を検出することができ、2.5 ng まで検出できることがわかった。さらにこの方法では、0.05 µg の米塩可溶性タンパク質画分に含まれる Glyoxalase 1 および RAG2 を検出することができた。以上のことから、今回用いたコメアレルゲン特異的抗体を用いたウエスタンブロット法は、コメアレルゲンを高感度に検出することが可能な検出手法であることがわかった。

E . 結論

(1) 成長ホルモン導入組換えアマゴを用いたタンパク質網羅的比較解析

2D-DIGE 法を用いた発達の段階の異なる等体重の GM 及び NT アマゴの筋肉断片タンパク質発現差異解析の結果、50-100 spots のタンパク質で、2 倍以上の発現差異がみられた。全体に、GM アマゴでは NT アマゴと比較して、発現差違のみられたタンパク質では、発現量の低下しているタンパク質の方が多かったが、発現量の増加していたタンパク質に、ピルビン酸キナーゼがあり、解糖系の活性化の起きていることが示唆された。なお、Parvalbumin 等のアレルゲンについては、GM 並びに NT アマゴの間で差がみられないか、むしろ GM の方で低下傾向が認められた。

(2) 動物モデルを用いる低アレルゲンコメのアレルギー性の解析

新規に開発される食品の安全性確保において、食物アレルゲン性を評価することは重要課題である。マウスの食物アレルギーモデルを用いて、

低アレルゲン米の食物アレルゲン性を評価したところ、食物アレルゲン性の低下が観察された。本モデルでは感作蛋白質に対する特異的なアレルギー状態が形成されていることから、低アレルゲン化食品の性能評価にも有用となる可能性が考えられた。

(3) コメアレルゲンのウェスタンブロットを用いる定量法の開発

コメの主要アレルゲンである RAG2 と Glyoxalase 1 についてウサギ抗血清を用いるウエスタンブロットでコメ抽出物中の濃度を測定する方法の開発を試みた結果、リコンビナントタンパク質を 2.5 ng まで検出できることがわかり、コメ抽出物中のこれらアレルゲンを高感度に検出できる系であることが確認された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 学会発表

- 1) 黒河志保, 中村里香, 目島未央, 秦裕子, 黒田昌治, 竹山夏実, 尾山大明, 佐藤茂, 清野宏, 増村威宏, 手島玲子, 幸義和: 経口コメ型ワクチン MucoRice-CTB における主要アレルゲンのプロテオーム解析 日本農芸化学会関西支部例会(第479回講演会)(2013.5)
- 2) 中村里香, 中村亮介, 安達玲子, 蜂須賀暁子, 三沢典彦, 手島玲子: アスタキサンチン組換えレタスを用いたアレルゲン性の解析 日本食品化学学会第 19 回総会・学術大会 (2013.8)

2. 論文発表

- 1) Kurokawa S, Nakamura R, Mejima M, Kozuka-Hata H, Kuroda M, Takeyama N, Oyama M, Satoh S, Kiyono H, Masumura T, Teshima R, Yuki Y: MucoRice-cholera Toxin B-subunit, a Rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of a-amylase-trypsin inhibitor-like protein family as

major rice allergens. *J Proteome Res.* 2013;12: 3372-3382.

2) Nakamura R., Teshima R.: Proteomics-based allergen analysis in plants. *J. Proteomics* 2003: 93:40-49

3) Nakamura R., Teshima R.: Immunoproteomic analysis of food allergens. *Methods Mol Biol.* 2014;1072:725-735.

4) Kurokawa S, Kuroda M, Mejima M, Nakamura R, Takahashi Y, Sagara H, Takeyama N, Satoh S, Kiyono H, Teshima R, Masumura T, Yuki Y. RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds. *Plant Cell Rep.* 2014;33(1):75-87.

5) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Hachisuka A, Yamada A, Ozeki Y, Teshima R.: Differential analysis of protein expression in RNA-binding-protein transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress. *J Proteome Res.* 2014;13(2):489-95.

6) Nakajima O, Nakamura K, Kondo K, Akiyama H, Teshima R: Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biol Pharm Bull.* 2013;36:1454-9.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 List of identified protein spots with differing expression in GM and non-GM amago salmon T

Master No.	Appearance	fold change ^a		Protein Hits	gi	MW (Da)	pI	score	sequence coverage	number of matched peptides
		GM100/NT100	GM125/NT125 GM150/NT150							
406	45 (54)	2.01		unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	47183395	9719	9.99	42	0.13	1
582	54 (54)	2.05		phosphoglucosyltransferase 1 [Danio rerio]	41056111	61375	5.74	60	0.03	1
585	33 (54)	2.12		pyruvate kinase, muscle [Danio rerio]	40786398	58591	6.54	82		2
586	48 (54)	2.04		pyruvate kinase, muscle [Danio rerio]	40786398	58591	6.54	93	0.03	2
588	39 (54)	2.12		pyruvate kinase, muscle [Danio rerio]	40786398	58591	6.54	79		3
659	42 (54)		0.38	alpha-2 enolase-1 [Salmo trutta]	11999267	39667	5.78	267	0.12	5
674	51 (54)		0.49	2.04 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	47210809	47423	5.99	297	0.1	4
736	51 (54)		0.38	0.48 creatine kinase muscle isoform 2 [Chaenocephalus aceratus]	31222099	42884	6.44	200	0.09	2
737	51 (54)		0.35	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	47221019	67700	6.61	103	0.03	2
738	48 (54)		0.37	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	47221019	67700	6.61	116		2
739	45 (54)		0.4	creatine kinase muscle isoform 2 [Chaenocephalus aceratus]	31222099	42884	6.44	161		2
763	45 (54)		0.4	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	47221019	67700	6.61	188		3
766	54 (54)	0.5	0.34	creatine kinase M3-CK [Cyprinus carpio]	4027929	43180	6.25	72	0.05	3
770	54 (54)		0.43	0.41 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	47221019	67700		225		3
775	54 (54)	0.5	0.38	0.44 creatine kinase M1-CK [Cyprinus carpio]	4027925	42980		132		2
780	54 (54)		0.39	0.49 creatine kinase muscle isoform 2 [Chaenocephalus aceratus]	31222099	42884		280		3
817	42 (54)		0.49	fast myotomal muscle tropomyosin [Salmo salar]	409468	32530	4.63	193	0.2	7
990	45 (54)	2.63		Pdim7 protein [Danio rerio]	45709024	23509	6.97	68	0.05	2
1028	48 (54)		0.48	myosin light chain 1 [Onchorhynchus mykiss]	14335429	21044	4.77	301	0.23	5
1196	51 (54)	0.14	0.19	0.08 nucleoside diphosphate kinase [Salmo salar]	2895763	17190	7.68	79	0.19	2
1204	54 (54)	0.09	0.16	0.08 nucleoside diphosphate kinase [Salmo salar]	2895763	17190	7.68	58		1
1209	54 (54)	0.08	0.16	0.08 nucleoside diphosphate kinase [Salmo salar]	2895763	17190	7.68	88		2
1214	51 (54)	0.16	0.42	0.16 nucleoside diphosphate kinase [Salmo salar]	2895763	17190	7.68	78		2
1378	45 (54)		0.32	Parvalbumin beta 1 (Major allergen Sal s 1)	2493445	12109	4.95	121	0.14	1
1380	48 (54)		0.35	0.5 Parvalbumin beta 1 (Major allergen Sal s 1)	2493445	12109	4.95	105		1
1382	45 (54)		0.37	Parvalbumin beta 1 (Major allergen Sal s 1)	2493445	12109	4.95	169		2

15/63 20/50 10/100 Number of identified spots/number of total differential spots

^aThe fold change of the normalized fluorescence intensity is shown.

Table 2 本年度新たに追加したエピトープ情報

Name	start	end	Sequence	Method	CTYPE	Reference	GenBank acc No
01 Bet v 1	132	154	EQVKASKEMGETLLRAVESYLLA	Immunoblot	L	PMID 23066955	P15494
02 Bos d 5	17	31	LIYDTMKGLDIQKV	SPOTs	L	PMID 22939793	P02754
Bos d 5	72	86	ILLQKWENGECAQKK	SPOTs	L	PMID 22939793	P02754
Bos d 5	92	106	TKIPAVFKIDALNEN	SPOTs	L	PMID 22939793	P02754
Bos d 5	152	166	FDKALKALPMHIRLS	SPOTs	L	PMID 22939793	P02754
03 Cap 1 ?	64	94	IHPFAQAQSLVYPTGPIPNLSLQNILPLTQ	Inhibition ELISA	L	PMID 22961864	P33048
04 Ara h 1				Dot-blot/ inhibition ELISA	C	PMID 22996799	P43238
05 Gal d 1	28	39	DCSRFPNATDKE	Peptide microarray	L	PMID 23257567	P01005
Gal d 1	115	128	FNPVCGTDGVTYDN	Peptide microarray	L	PMID 23257567	P01005
06 Gly m ?	5	38	ECEEGEIPRPRPRQHPEREQQPGKEEE	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	55	80	HEQREEQEWPRKEEKRGEGSEEEDE	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	90	115	QFFPPRPPHQKEERKQEEDEEQQR	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	110	135	DEEQRESEESSELSLRHKKNKPFLL	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	130	158	NKNPFLGNSRFETLTKNQYGRIRVLRGF	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	201	229	TAILSLVNDDRDSYRLQSGDALRVPSGT	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	231	259	YYVNPNDNENLRILTLAIPVKNKPGRFES	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	320	345	EGIRALSKRAKSSSRKTISSSEDKPFN	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	339	368	SEDKPFNLRSDPIYSNKLKGFIFEITPEKN	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	350	375	DFIYSNKLKGFIFEITPEKNPQLRDL	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
Gly m ?	511	540	QRESYFVDAQPKKKEEGNKGRKGPLSSILR	Dot-blot inhibition	L	PMID 23454299	Q22120
07 Cry j 2	169	176	KWVNGREI	ELISA	L	PMID 23504147	P43212
Cry j 2	286	305	GRENSRAEVS YVHWNGAKFI	ELISA	L	PMID 23504147	P43212
Cry j 2	366	385	TYKNIRGTSATAAIIQLKCS	ELISA	L	PMID 23504147	P43212
08 Ara h 3 (Oleolin 3)	2	9	SDQTRTGY	Inhibition ELISA	L	PMID 22790944	AALJ21501
09 Blo t 21				NMR / Point Mutation Assay / inhibition ELISA	C	PMID 22887997	A712F3 (UniProt)
Tri a ? (gamma-gliadin)			QPQQPPFQ	Pepsan / inhibition ELISA	L	PMID 22737987	P08453 (UniProt)
Tri a ? (omega-2 gliadin)			QPQQPPFQ	Pepsan / inhibition ELISA	L	PMID 22737987	Q9FUW7 (UniProt)