

Super Pathway	Sub Pathway	Name	Ratio (GM/non-GM)	t-test
Amino acid	Aromatic amino acid metabolism (PEP derived)	quinate	6.0	**
		tyrosine	3.4	*
		tryptophane	2.0	
		phenylalanine	1.8	
	Aspartate family (OAA derived)	threonine	0.1	*
		aspartate	2.0	
	Branched Chain Amino Acids (OAA derived)	isoleucine	2.0	
		leucine	2.0	
	Branched Chain Amino Acids (pyruvate derived)	valine	1.4	
		arginine	3.1	
	Glutamate family (alpha-ketoglutarate derived)	proline	2.6	
		serine	1.1	
	Carbohydrate	Amino sugar and nucleotide sugar	erythritol	4.6
Glycolysis		glucose	5.0	**
		glucose-6-phosphate	1.9	
		fructose-6-phosphate	1.5	
		lactate	0.9	
		glucose-1-phosphate	0.8	
Inositol metabolism		myo-inositol	3.1	*
Sucrose, glucose, fructose metabolism		fructose	6.6	**
		mannitol	20.3	**
		galactose	4.2	**
		sophorose	3.2	
		maltose	1.2	
		1-Kestose	1.3	
		sucrose	1.1	
		trehalose	1.2	
		malate	3.8	**
TCA cycle		cis-aconitate	1.0	

Table 1. GM 米と non-GM 米の代謝物の蓄積量比較. GC-MS によって取得したイネ種子中に含まれる極性化合物の蓄積量データに基づいて, GM 米で高蓄積していた化合物は赤で, non-GM 米において高蓄積していた化合物は緑で示す. t-test: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

Super Pathway	Sub Pathway	Name	Ratio (GM/non-GM)	t-test
Cofactors, Prosthetic Groups, Electron Carriers	Ascorbate metabolism	ascorbate	2.6	*
	CoA metabolism	pantothenate	4.2	**
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	nicotinate	1.9	
	Oxidative phosphorylation	phosphate	0.9	
	Tocopherol metabolism	beta/gamma-tocopherol	0.4	*
		alpha-tocopherol	0.9	
Lipids	Free fatty acid	hexadecanoate	1.6	*
		octadecadienoic acid	1.2	
		heptadecanoate	1.9	
	Glycerolipids	glycerol	4.9	**
		1-palmitoylglycerol	1.4	
	Phospholipids	glycerol-2-phosphate	1.4	
	Sterols	Campesterol	0.8	
		squalene	1.3	
Nucleotide	Purine metabolism	adenine	5.7	**
		guanine	1.2	
		adenosine	1.0	
	Pyrimidine metabolism	cytidine	4.9	**
		thymidine	1.8	
uridine	0.6			
Secondary metabolism	Amine derived	tryptamine	1.9	
	Terpenoids	sitosterol	1.5	
		stigmasterol	1.4	

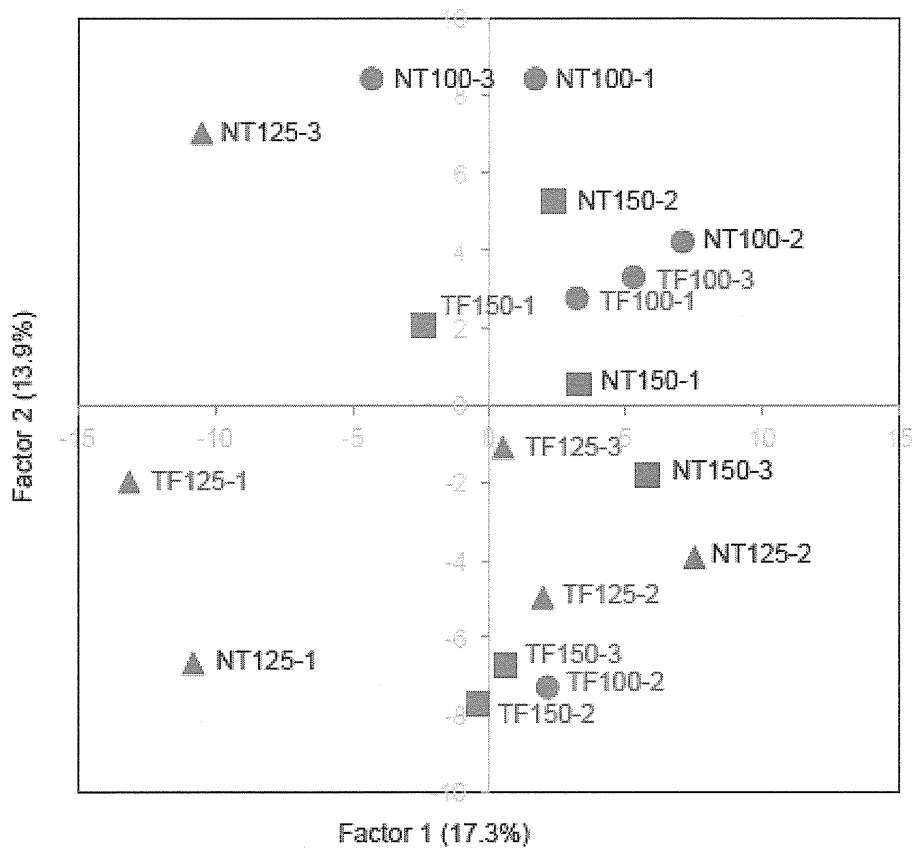


Fig. 9. GC-MS によって取得したアマゴ筋肉組織中に含まれる極性化合物の蓄積量データに基づく主成分分析.

Name	Ratio (GM/non-GM)	t-test
malate	0.526	**
gamma-aminobutylate (GABA)	0.158	**
adenine	0.509	*
glutamate	0.413	*
myo-inositol	1.566	*
phosphate	0.264	*
pantothenate	1.593	*
cis-aconitate	0.447	*
pyruvate	1.654	
beta-alanine	0.462	
5-oxoproline	0.605	
glycerol	0.588	
heptadecanoate	0.838	
putrescine	0.509	
galactose	1.034	
glucose	1.034	
erythritol	0.647	
lysine	3.776	
glycerol-2-phosphate	0.343	
ribose	0.513	
glucose-1-phosphate	0.745	
fructose	0.556	
tryptophane	1.457	
glycine	0.421	
cyano-alanine	0.22	
oxaloacetate	0.446	
cystein	0.72	
nicotinate	0.724	
glycerate	0.569	
glutamine	0.225	
mannitol	1.572	
ethanolamine	0.408	
succinate	1.832	
hexadecanoate	0.503	
squalene	0.818	
uridine	0.434	

Name	Ratio (GM/non-GM)	t-test
itaconate	0.592	
agmatine	0.739	
cholesterol	0.452	
maltose	1.167	
serine	0.709	
ornithine	0.78	
ribitol	0.768	
thymidine	0.79	
sucrose	2.062	
alpha-tocopherol	0.764	
fructose-6-phosphate	0.652	
histidine	1.216	
lactate	1.311	
valine	1.263	
threonine	1.414	
arginine	0.808	
isoleucine	1.199	
1-palmitoylglycerol	0.876	
ascorbate	0.787	
leucine	1.159	
tyrosine	1.186	
glucose-6-phosphate	0.521	
ribose-5-phosphate/R5P	0.828	
phenylalanine	0.87	
tryptamine	0.728	
proline	1.396	
cytidine	1.094	
sophorose	0.913	
fumarate	0.909	
octadecadienoic acid	0.931	
3-methyl-2-oxovalerate	0.779	
beta/gamma-tocopherol	0.79	
adenosine	0.946	
guanine	1.064	
quininate	0.963	
aspartate	1.023	

Table 2. GC-MS によって取得したアマゴ筋肉組織中に含まれる極性化合物の蓄積量データの比較. GM アマゴの筋肉組織において高蓄積していた化合物は赤で, non-GM アマゴにおいて高蓄積していた化合物は緑で示した. t-test: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

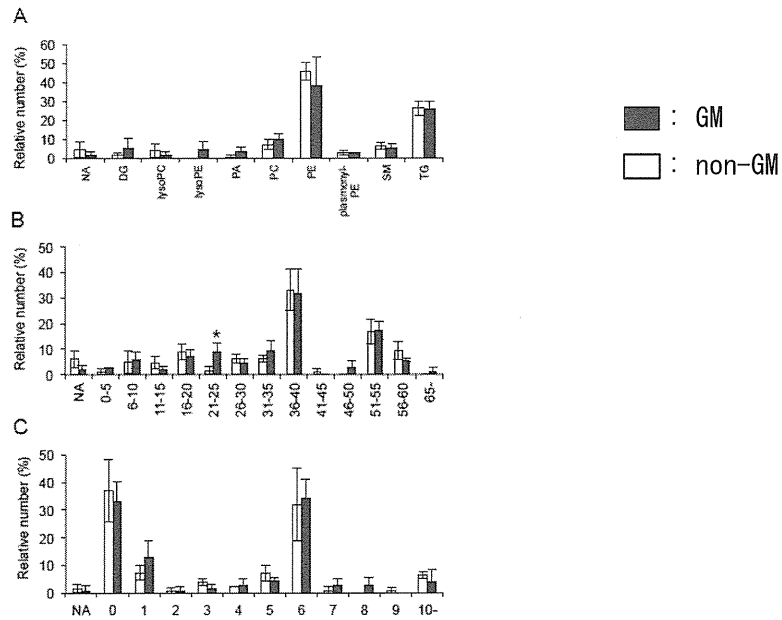


Fig. 10. LC-MS によって取得したアマゴ筋肉組織中に含まれる極性脂質のアノテーション結果の比較. A. 脂質クラス. B. 炭素鎖長. C. 不飽和結合数. t-test: *; $p < 0.05$.

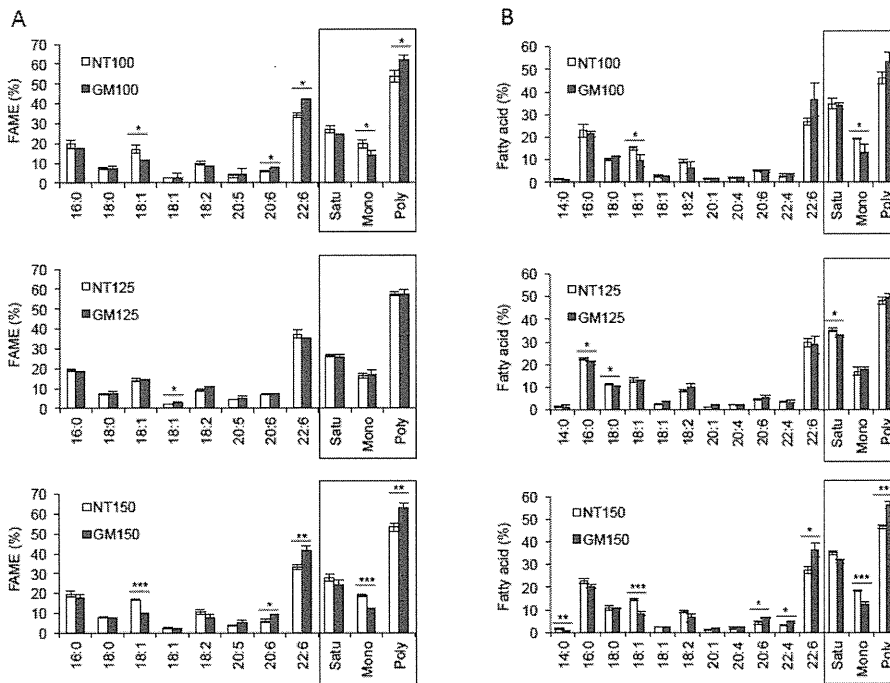


Fig. 11. GC-MS によって取得したアマゴ筋肉組織中に含まれる脂肪酸プロファイルの比較. 同一重量の個体を系統間で比較した結果. A. 脂肪酸メチルエステル (FAME). B. 脂肪酸. t-test: *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$. NT100, NT125, NT150: non-GM のアマゴサンプル, 数字は個体重量. GM100, GM125, GM150; GM アマゴのサンプル. 数字は個体重量.

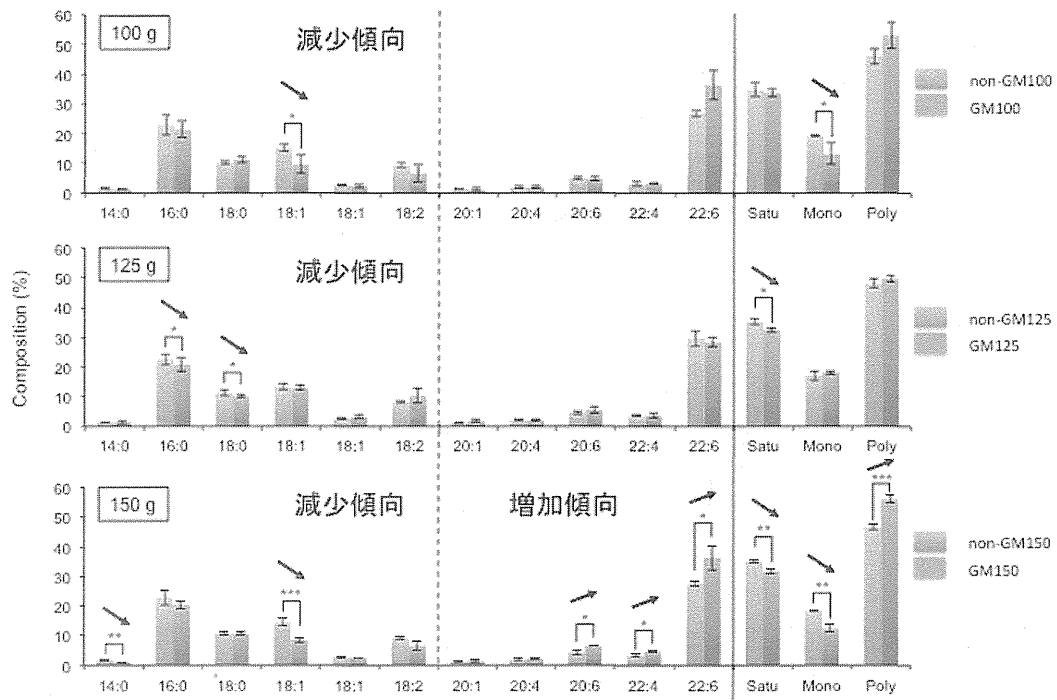


Fig. 12. 100g, 125g, 150g 個体の遊離脂肪酸含量比較. 横軸に脂肪酸炭素鎖長と不飽和度, 縦軸に各試料における各脂肪酸の含有率を示した. 炭素鎖長 18 以下の脂肪酸が減少し, 炭素鎖長 20 以上の脂肪酸が増加する傾向が有った. 多価不飽和脂肪酸が増加する傾向があった. 飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸が減少する傾向があった.

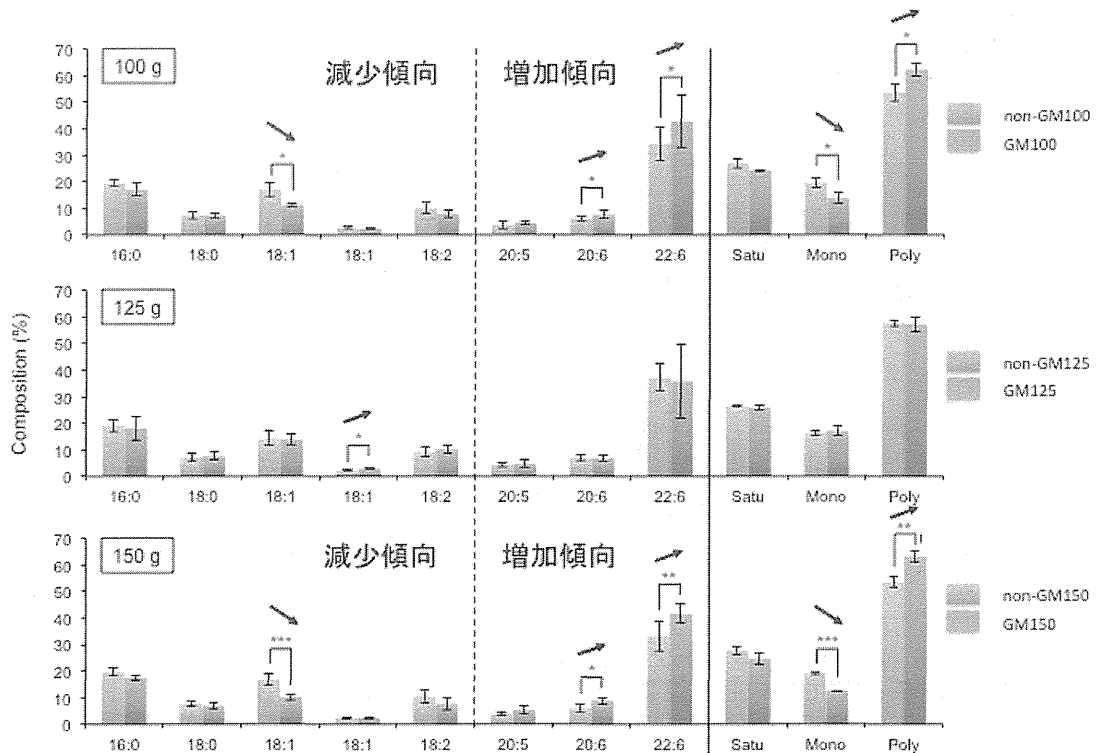


Fig. 13. 100g, 125g, 150g 個体のエステル化脂肪酸含量比較. 横軸に脂肪酸炭素鎖長と不飽和度, 縦軸に各試料における各脂肪酸の含有率を示した. 炭素鎖長 18 の脂肪酸が減少し, 炭素鎖長 20 以上の脂肪酸が増加する傾向が有った. 多価不飽和脂肪酸が増加する傾向があった.

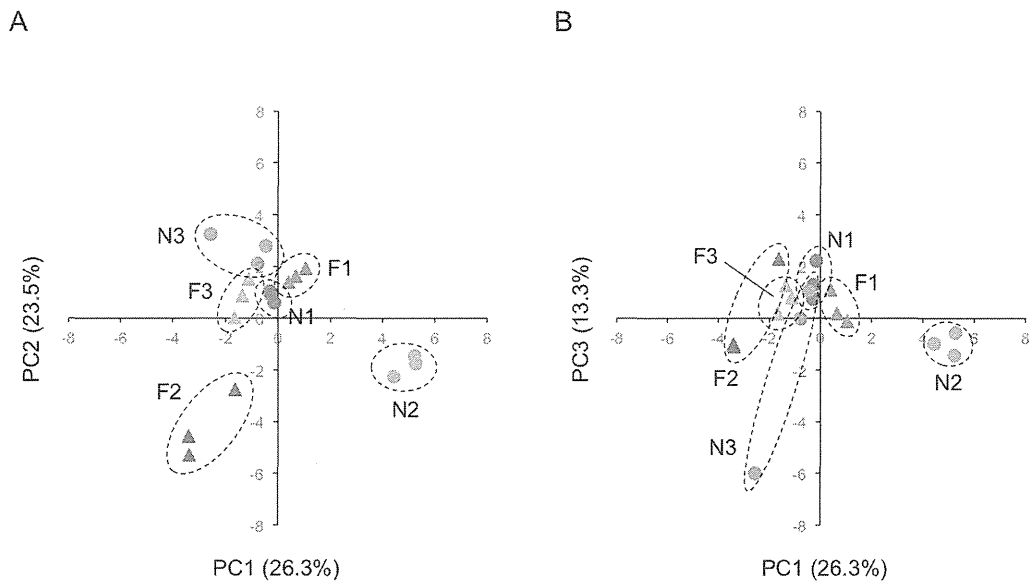


Fig. 14. 乳酸菌抽出液の極性フラクションに含まれる代謝産物 (289 個) の蓄積量に基づく主成分分析の結果. A. 第一主成分と第二主成分の主成分スコアの二次元プロット図. B. 第一主成分と第三主成分の主成分スコアの二次元プロット図. 第一から第三主成分までの累積寄与率は 63.1%. F: サルモネラ鞭毛抗原発現株 (Δ), N: 非発現株 (\circ). 株名の後の数字は, 培養の反復を示す ($n = 3$). 点線で囲った同型同色のプロットは, 相分離以降の実験過程の反復を示す ($n = 3$).

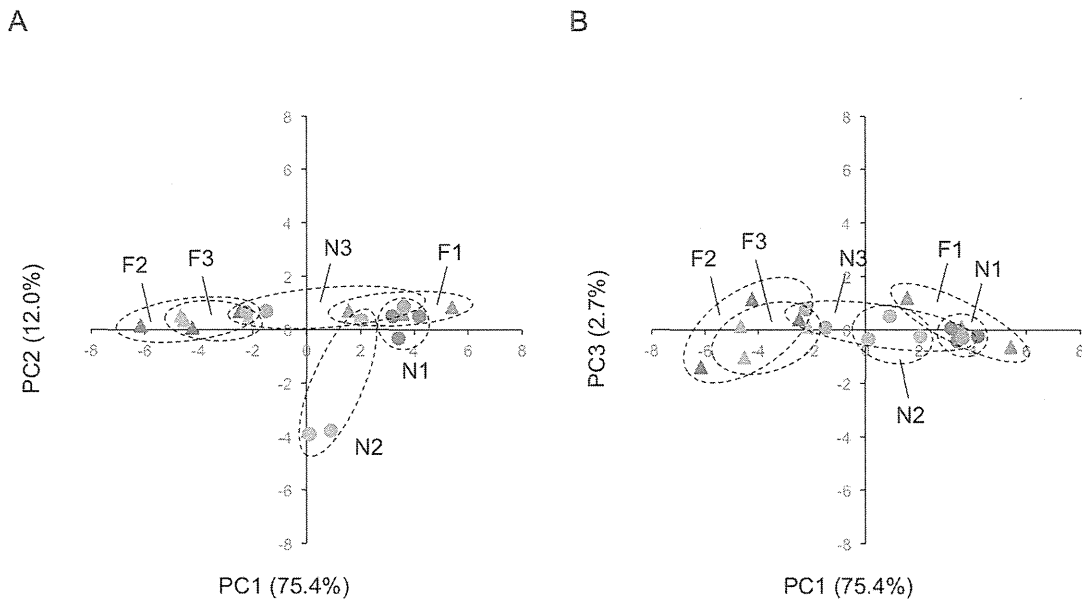


Fig. 15. 乳酸菌抽出液の非極性フラクションに含まれる代謝産物 (235 個) の蓄積量に基づく主成分分析の結果. A. 第一主成分と第二主成分の主成分スコアの二次元プロット図. B. 第一主成分と第三主成分の主成分スコアの二次元プロット図. 第一から第三主成分までの累積寄与率は 90.1%. F: サルモネラ鞭毛抗原発現株 (Δ), N: 非発現株 (\circ). 株名の後の数字は, 培養の反復を示す ($n = 3$). 点線で囲った同型同色のプロットは, 相分離以降の実験過程の反復を示す ($n = 3$).

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）
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
総合研究報告書（平成24～26年度：分担）

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： 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) アスタキサンチン発現レタス、低アレルゲン化コメ、成長ホルモン導入遺伝子組換えアマゴ、サルモネラ鞭毛抗原(フラジェリン)を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌を用いて、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) マウス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法を用いたプロテオーム解析で組換え体(GM)及び非組換え体(non-GM)に発現するたんぱく質の定量比較を行い、発現変動のみられたタンパク質について可能な限り質量分析で同定を行った。アスタキサンチン発現レタスでは、GMとnon-GMでタンパク質の発現変動はほとんどみられなかったが、低アレルゲン化コメでは、ターゲットタンパク質であるRAG2ファミリータンパク質の発現減少および、非ターゲットのGluteninの発現増加が明らかとなった。成長ホルモン導入遺伝子組換えアマゴでは、GM体とnon-GM体で100g、125g、150gと体重を揃えた個体間での筋肉タンパク質の発現比較を行ったが、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。GMアマゴでnon-GMアマゴと比較して、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の方で低下傾向が認められた。フラジェリンを菌体表層に固定化発現した乳酸菌では、GMの方で発現の増加したタンパク質には、挿入遺伝子産物であるフラジェリン以外に、細胞壁の分解酵素が確認された。(2) アスタキサンチン発現レタスの抽出蛋白質とnon-GMレタスタンパク質で感作されたマウスが示したアナフィラキシー症状のスコアに差は認められず、抗原特異的IgG1抗体価は両群ともほとんど検出されなかったことから、アスタキサンチン発現レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。また、低アレルゲン化コメタンパク質とnon-GMコメタンパク質で感作されたマウスモデルが示したアナフィラキシー症状においても、GMの方が低下傾向が認められた。また、本アレルギーモデルマウスを経口以外の感作モデルと比較したところ、本モデルは、消化管での反応性が特徴的なアレルギーモデルであると考えられた。また、本モデルによって抗原を経口投与したドナーマウスの腸間膜リンパ節から採取したCD4⁺細胞を移入したレシピエントマウスは抗原特異的なIgG1抗体を産生した。(3) ADFSのアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、3年間で新たに50種のアレルゲンについて、総エピトープ数396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1777となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は141種となった。

研究協力者

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 食品薬品安全センター秦野研究所
大沢基保 食品薬品安全センター秦野研究所
佐藤里絵 (独)農研機構 食品総合研究所
近藤康人 藤田学園大学坂文種報徳会病院
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及び発現に差違のあったタンパク質の同定を行って、Mode of action(MOA)を知ること、またそれらタンパク質のバイオマーカーとしての利用の可能性について検討する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ゲノーム手法でアレルゲン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。

3年間に、組換え体として、アスタキサンチン発現レタス、低アレルゲン化コメ、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、フラジェリンを菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌を用いてプロテオーム解析を行った。また、アスタキサンチン産生組換えレタス、アレルゲン低減下コメに関しては、非組換え体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

a) アスタキサンチン発現 (GM) レタスには、石川県立大学 三沢博士らによって作製された、*Paracoccus* 由来 *idi*、*Brevundimonas* 由来 *crtW*、*crtZ* をパーティクルガン法により導入したレタス 2 系統 (GM-1, GM-2) を用いた。また、対照に非組換え (Non-GM) レタス 2 系統を用いた。

b) 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。

c) コメ種子中の主要アレルゲンである 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ゲンコメ RA14-pANDA 系統 (GM コメ) は、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 コメ) 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。

d) サルモネラ鞭毛抗原 (TLR5 に結合可) を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え (GM) 乳酸菌、対照として用いた非遺伝子組換え (non-GM) 乳酸菌、及びその培養上清は、国立医薬品食品衛生研究所五十君博士より供与いただいた。菌体は、培養後遠心して回収し、PBS で洗浄し、破碎後液体窒素で急速凍結し、培養上清とともに -80°C で保管した。各試料に付した番号を以下に記す。

試料 No. 1: フラジェリン細胞表層発現乳酸菌 (GM)

試料 No. 2: 野生型乳酸菌 (non-GM)

試料 No. 3: GM 乳酸菌 培養上清

試料 No. 4: non-GM 乳酸菌 培養上清

(2) 組換え体と非組換え体の 2D-DIGE によるタンパク質網羅的比較解析

a) 細断したレタス 1 g に Protease inhibitor for

plant (Sigma 社) を添加した PBS 1.75 mL を加えてメッシュ袋内でホモジネートしてタンパク質を抽出し、10,000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿を取り除いた。抽出のレプリケートは2回とした。試料溶液中のタンパク質濃度を 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。各群のレタスタンパク質 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、両群のタンパク質を等量ずつ混合し、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 $^{\circ}$ 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 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、GM 群と non-GM 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。

レタス LTP (Lac s 1) に特異的なペプチド配列 CSGVKSLNSAART に対するウサギ抗体をアジュバントと共に反復免疫を行い作製した。レタス粗抽出タンパク質からの LTP の精製は、カルボキシメチルセルロース (CM) 担体に吸着させた後、0.5 M NaCl/20 mM phosphate (pH 5.0) で溶出させて行った。定法に従い Western blot を行い、LTP の検出を行った。ウサギ抗 LTP 抗体は 1000 倍、HTP 標識抗ウサギ抗体は 2000 倍で用

いた。

b) 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 $^{\circ}$ C 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。二次元電気泳動は、上記 a) のレタスの項目で行ったと同じ方法で行った。

発現差異が認められたタンパク質の同定には、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 $^{\circ}$ C で 2 時間ゲル内消化を行った。消化ペプチドを α -Cyano-4- hydroxycinnamic acid (α -CHCA, Sigma- Aldrich 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相同性検索を行った。

c) アレルゲン RA14-17 をノックダウンしたコメ (GM) 及び非組換えの日本晴 (non-GM) を用いた。コメ粉末 10 mg に溶解バッファー (30 mM Tris, 8 M urea, 4% CHAPS) 3 mL を加えてタ

ンパク質を抽出し、10,000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿を取り除いた。抽出のレプリケートは3回とした。a)と同様に2D-DIGEを行い、GMとnon-GM間で2倍以上の発現差異を示す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は、b)と同様の方法で行った。

d) 乳酸菌培養上清試料については、100 ml をアミコン Ultra-4 (ミリポア 社) に添加、7,000 x g で 50 ml まで 30 min 遠心濃縮したものを評価用試料とした。また、乳酸菌試料については、重量測定後に10倍容の Lysis Buffer (10mM Tris, pH8.0、7M ウレア、2M チオウレア、5mM 酢酸マグネシウム、4% (w/v) CHAPS、4mM Pefabloc SC PLUS) を加えた後に、超音波処理 (20 秒間 ON+30 秒間 OFF のサイクルを 3 回繰り返した) を実施した。超音波処理後に、8,000g x 10 分間遠心した後の上清を評価用試料とした。

処理後のタンパク質溶液に対して、200 pmol の Cy3 (DMF 溶液、1 ml) または Cy5 (DMF 溶液、1 ml) を添加した。N=3 でサンプルを調製した。また、評価用試料を全て混合したものをプール試料とし、プール試料に対して 200 pmol の Cy2 (DMF 溶液、1 ml) 添加後に氷上にて 30 分間静置してラベリング反応を実施した。反応液に過剰量のリジン溶液 (10mM 溶液、2ml) を添加して 10 分間保持し反応を終了した。反応終了後に反応液総量と等量の 2×サンプルバッファ (8M ウレア、4% (w/v) CHAPS、20 mg/ml DTT、2% (v/v) フェーマライト) を添加したものを 2D-DIGE 解析用の試料とした。2D-DIGE は、a) で記した方法に準じて行い、タンパク質の同定は、nanoLC-MS/MS 分析で行った。

(3) 動物モデルを用いる組換え体と非組換え体のアレルギー性の比較解析

a) アスタキサンチン発現レタスのアレルギー性の検討：7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (E)、非組換えレタス (non-GM)、アスタキサンチン発現レタス (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。非組換えあるいはアスタキサンチン発現レタス 1 g に対して 1 mL のリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を加えて乳鉢で粉碎した。ホモジネートを 4°C 下、10000 g で 30 分間遠心分離した上清を限

外ろ過膜 (分子量 3000) で濃縮して抽出液を得た。それぞれのレタス抽出液に、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、non-GM 群あるいは GM 群に用いた。E、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 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に各蛋白質 8 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、感作の成立を確認した。

(倫理面への配慮)

動物への投与実験においては、動物の苦痛を最小限に留めるよう務め、動物飼育・管理に当たっては食品薬品安全センター秦野研究所の利用規程に従った。

b) 低アレルギー性コメのアレルギー性の検討：7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (E)、非組換え米 (non-GM)、低アレルギー性米 (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ギー性米 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°C 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°C 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。

(4) アレルゲン予測の解析法

2011 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) アスタキサンチン発現レタスを用いたタンパク質網羅的比較解析

予備検討として、市販されているレタスの外側の葉と内側の葉からタンパク質を抽出し、蛍光標識して 2 次元電気泳動に供した。外側の葉と内側の葉ではタンパク質の組成が大きく異なっていることが明らかとなった。

Non-GM レタスと GM レタスの発現差異解析では、内側の葉と外側の葉を混合したサンプルを供した。1 次元電気泳動パターンを比較したところ、明らかに発現量が異なっているタンパク質のバンドは観察されなかった。また、2D-DIGE 解析の結果、再現性良く得られた (>50%) 450 スポットのうち、非組換えと組換え間で 2 倍以上の発現差を示すスポットは無かった。

アレルゲン LTP (11.5 kDa, pI 9.04) は粗抽出物の 2 次元マップより同定することができず、これはタンパク質含量が少ないためと考えられた。そこで、CM カラムによる LTP の精製を試みた。その結果、作製したウサギ抗 LTP 抗体を用いた Western blot にて、レタス葉重量に対し

て 0.00025% の LTP を精製できたことが確認された。なお、GM レタスと non-GM レタスで同様に精製した LTP タンパク質に関して発現量に大きな差はみられなかった。

(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

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 D-DIGE で行った結果、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、non-GM (100g) と GM (100g) 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。そのうち 15 スポットについて、MALDI-TOF MS/MS で同定することができた。GM の方が発現量が多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、GM の方が発現量が低いタンパク質として、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。

Non-GM (125g) と GM (125g) 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のうち 20 スポットについて、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、GM の方が発現量の多いタンパク質は観察されず、GM の方が発現量が低いタンパク質として、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 pervalbumin beta 1 があつた。

Non-GM (150g) と GM (150g) 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が、そのうち 10 スポットについて、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、GM の方が発現量の多いタンパク質は観察されず、GM の方が発現量の低いタンパク質として、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 perv-albumin beta 1 があつた。

(3) 低アレルゲンコメを用いたタンパク質網羅的比較解析

アレルゲン RA14-17 をノックダウンしたコメ (RA-KD) コメ (GM コメ) および non-GM コメの 2D-DIGE を行ったところ、タンパク質のスポットとして再現良く約 1000 スポットが得られた。そのうち、GM コメと non-GM コメで 2 倍以上の発現の差の見られたスポットは、20 スポットであった。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、GM の方が non-GM よりも発現の少ないタンパク質には、Allergenic protein や RAG2 といった主要アレルゲンが同定された。GM の方が non-GM と比較して発現が増大していたタンパク質には、Glutenin 等が含まれていた。

(4) フラジェリン菌体表層発現乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

GM 乳酸菌 (試料 No. 1) と non-GM 乳酸菌 (No. 2) の 2D-DIGE 及び GM 乳酸菌培養上清 (No. 3) と non-GM 乳酸菌培養上清 (No. 4) の 2D-DIGE を行ったところ、タンパク質のスポットとしては、菌体からは約 3700、培養上清からは約 2700 のスポットが得られた。Decyder BVA ソフトを使用して統計解析を実施した結果、GM 菌体タンパク質で、non-GM 菌体タンパク質に対して 1.5 倍以上の増加が検出されたスポットは 6 個で、1.5 倍以下の減少が見られたスポット数は 7 個であった。培養上清中タンパク質については、GM 上清の方が non-GM 上清よりも発現の高いスポットは 11 個で、GM で発現の減少したスポットは 4 個であった。

発現に変動のみられたタンパク質のうち、6 spot を選択し、nanoLC-MS/MS による MS 解析を行った。取得した MS/MS データから、タンパク質を同定したところ、GM 菌体タンパク質で non-GM より発現の高かった Spot No. 2212 及び 2266 は Cell Wall Hydrolase (細胞壁分解酵素) であった。同じく、GM 菌体で発現の高かった spot No. 822 は、乳酸菌のピルビン酸脱水素酵素とサルモネラフラジェリンがほぼ同様のペプチド断片のヒットがみられたため、両タンパク質を候補とした。また、GM 菌体の方が発現の低かった spot No. 1355 は、乳酸菌のホスホグルコムターゼと同定された。培養上清タンパク質の中で GM の方が発現の高かった

spot No. 856 及び 1233 は、それぞれフラジェリンとホスホグルコムターゼ、及びフラジェリンと乳酸菌の分子シャペロン GroEL がほぼ同様のペプチド断片のヒットが見られたため、両タンパク質を候補とした。

(5) 動物モデルを用いるアスタキサンチン発現レタスのアレルギー性の解析

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、媒体対照 (E) 群 0.4 に対して、陰性対照としたペプシン (PEP) 群は 0.0 と同レベルであった一方、陽性対照としたオボアルブミン (OVA) 群は 2.2 と上昇した。Non-GM 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 1.0 および 1.2 であり、両群のスコアは同程度であった。本実験では OVA 群をはじめ、いずれの群間にも統計学的な差を認めなかった。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、non-GM 群の 1/5 例以外、抗原特異的 IgG1 抗体は検出されなかった。

(6) 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

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。Non-GM 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、non-GM 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。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。

(7) 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、平成 24 年度新たに追加したエピトープは、17 報の論文から 33 種のアレルゲンについて、総エピトープ数 191 であった。平成 24 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 1407 となり、エピトープ既知のアレルゲン数は

132 種となった。

次いで、平成 25 年度に新たに追加したエピトープは、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 であった。平成 25 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。

さらに、平成 26 年度に新たに追加したエピトープは、7 報の論文から 7 種のアレルゲンについて、総数 14 のエピトープであった。また、ADFS とリンクするタンパク質情報リソースのデータ更新に伴い、IUIS Allergen Nomenclature 登録名及び UniProt 番号を修正した。本年度のアレルゲン及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 1,777、エピトープ既知のアレルゲン数は 141 種となった。また、構造既知のアレルゲン数は 128 種、糖鎖付加アレルゲン数は 129 種となった。

D. 考察

(1) アスタキサンチン発現レタスを用いたタンパク質網羅的比較解析

レタスは外側の葉と内側の葉でタンパク質組成が大きく異なることから、遺伝子組換えレタスの安全性評価にはサンプリングに注意する必要があると考えられた。また、アレルゲン LTP はレタス中の含量が少なく、粗タンパク質抽出後、CM による精製が必要であった。

2D-DIGE 解析の結果より、アスタキサンチン発現レタスでは非組換えレタスに比べ、タンパク質レベルでの大きな発現変動は無いと考えられた。

(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

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 non-GM 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 non-GM 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。

(3) 低アレルゲンコメのタンパク質発現差異解析

2D-DIGE 解析により、GM コメで non-GM コメ（日本晴）と比較して減少が明らかとなった Allergenic protein, RAG2 はノックダウンのターゲットタンパク質であり、意図した影響であると言える。一方、Glutenin の増加は非意図的なものであり、プロテオミクスによる網羅的解析の有用性が示された。非意図的に増加した Glutenin は毒性およびアレルゲンが知られているものではなく、安全性に影響を与えるものではないと考えられた。

(4) サルモネラ鞭毛抗原導入組換え乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で non-GM と比べ増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。この事実は、以前この乳酸菌モデル組換え体を培養細胞で評価したところ、GM は non-GM に比べ細胞からの TNF 誘導活性が低下しており、その理由として細胞壁のプロテアーゼに対する抵抗性が低下しているという知見との関連が示唆された。GM では、異種由来のタンパク質であるサルモネラの鞭毛抗原の発現により、その対応として細胞壁の融解酵素を誘導しているものと思われた。

(5) 動物モデルを用いるアスタキサンチン発現レタスのアレルギー性の解析

マウスアレルギーモデルを用いて、アスタキサンチン発現 (GM) レタスの食物アレルギー性を非組換え (non-GM) レタスと比較評価した。GM レタスは 1 g あたり 2.4~3.0 mg、non-GM レタスは 1 g あたり 1.1~1.4 mg の蛋白質がそれぞれ抽出された。非組換えレタスよりやや抽出される蛋白質量は多かったものの、非組換えレタスあるいはアスタキサンチン導入レタスの抽出蛋白質で感作されたマウスの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 抗体価は両群ともほとんど検出されなかったことから、アスタキサンチン発現レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。

(6) 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

マウスアレルギーモデルを用いて、低アレルギー(GM)コメの食物アレルギー性を非組換え(non-GM)コメと比較評価した。GMコメは1gあたり50~53mg、non-GMコメは1gあたり36~45mgの蛋白質がそれぞれ抽出された。GMコメから抽出される蛋白質量はnon-GMコメよりやや多かった。GM米の抽出タンパク質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、non-GMコメに比べて抗体価レベルが低かったことから、GMコメ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。

E. 結論

(1) アスタキサンチン発現レタスを用いたタンパク質網羅的比較解析

2D-DIGE法を用いた発現差異解析の結果、アスタキサンチン発現レタス中のタンパク質はすべて、非組換え対照との発現差が2倍以内であった。レタスアレルギーLTPの定量には可溶性タンパク質を抽出後、さらにCMカラムによる精製が必要であった。

(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

2D-DIGE法を用いた発達の段階の異なる等体重のGM及びnon-GM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non-GM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等のアレルギーについては、GM並びにnon-GM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。

(3) 低アレルギーコメのタンパク質発現差異解析

2D-DIGE法を用いた発現差異解析の結果、ターゲットタンパク質であるAllergenic proteinおよびRAG2の発現減少および、非ターゲットのGluteninの発現増加が明らかとなった。

(4) サルモネラ鞭毛抗原導入組換え乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

2D-DIGEによる、a)GM、b)non-GMの比較では、フラジェリン細胞表面発現させた菌体由来タンパク質a)に対してb)が、1.5倍以上減少したス

ポットが6スポット、同増加したスポットは6スポットであった。培養上清では、同減少が11スポット、同増加が4スポットであった。GMで増加した菌体抽出タンパク質の中から3スポット、non-GMで増加した1スポットについて、また培養上清タンパク質からはGMで増加したスポット2つを選び、MS解析を行い、タンパク質の同定を試みた。挿入遺伝子産物であるフラジェリン以外で、GMで増加が見られ、重要と思われるタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。

(5) 動物モデルを用いるアスタキサンチン発現レタス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、食物アレルギー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、アスタキサンチン導入レタスの食物アレルギー性を評価したところ、アスタキサンチン導入レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。

(6) 動物モデルを用いる低アレルギー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、食物アレルギー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、低アレルギー米の食物アレルギー性を評価したところ、食物アレルギー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、低アレルギー化食品の性能評価にも有用となる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1)中村里香, 中村亮介, 小関良弘, 手島玲子: 塩ストレス耐性遺伝子組換えイネ種子のアレルギーおよびプロテオーム解析 第18回日本食品化学学会総会・学術大会(2012.6)
- 2) Teshima R., Nakamura R., Kitta K., Satoh R., Lang G., Schegg K., Blumenthal K., Hicks L., Rouquié D., Herman R A, Herouet-Guicheney C., Ladics G., McClain S., Poulsen L.K., Privalle L., Ward J.M., Doerrer N. and Rasclé J.P.: "Inter-laboratory optimization of two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) of rice seed allergens in non-transgenic rice varieties"

- Euro. Acad. Allergy Clin. Immunol. Congress 2012 (2012. 6)
- 3) 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)
- 4) 手島玲子：コメ品種間のアレルゲン発現変動のアレルゲノーム解析 日本プロテオーム学会 (2012.7)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 手島玲子：遺伝子組換えコメのアレルギー性並びにプロテオーム解析の一例。ILSI Japan バイオテクノロジー研究部会勉強会(2015.10)
- 8) Teshima R, Nakamura R., Adachi R., Shindo T., Yamada A., Ohsawa A., Ozeki Y. Differential analysis of protein expression in RNA binding protein-transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress and allergenicity test of the rice extracts. 54rd Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2015. 3)
2. 論文発表
- 1) 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(2), 307-315, 2012
- 2) 佐藤里絵、中村里香、手島玲子：ソバに含まれるIgE結合タンパク質の解析、*FFI Journal* 218(1), 36-42 (2013)
- 3) 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 α -amylase-trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens. *J Proteome Res.* 2013;12: 3372 -3382.
- 4) Nakamura R., Teshima R.: Proteomics-based allergen analysis in plants. *J. Proteomics* 2003: 93:40-49
- 5) Nakamura R., Teshima R.: Immunoproteomic analysis of food allergens. *Methods Mol Biol.* 2014;1072:725-735.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Knipping K., Simons P.J., Buelens- Sleumer L.S., Cox L., den Hartog M., de Jong N., Teshima R., Garssen J., Boon L., Knippels L.M.J.: Development of β -lactoglobulin-specific chimeric human IgE monoclonal antibodies for in vitro safety assessment of whey hydrolysates., *PLOS ONE* 9(8), e106025 (2014)

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

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）
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
総合研究報告書（平成24～26年度）
組換え生物の検知技術の開発

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

研究要旨

遺伝子組換え作物は、多様な系統が開発されている。安全性が確認されていない遺伝子組換え食品が国内に流通しないように監視するためには検査基盤技術の開発が不可欠である。本研究では、主に作物特異的な内在性遺伝子検知法、効率的なスクリーニング手法、加工食品からの DNA 抽出法精製法の最適化、デジタル PCR を用いたコピー数評価を中心に行った。具体的には、1. インドやバングラディッシュなど南アジアの国々では、害虫抵抗性を獲得させた GM ヒヨコマメの商業栽培に向けた開発が進められている。加工品として混入する可能性があることから、内在性遺伝子検知法を検討し、ゲノム上 1 コピーの 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (CaNCED) をクローニングして特異性の高いリアルタイム PCR 法を確立した。2. カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S RNA プロモーター (P35S) の DNA メチル化修飾パターンを解析することで、ウイルス自身が原因で起こる遺伝子組換え食品の擬陽性判定することなくスクリーニングを行うことができる新規分析手法を確立した。3. デジタル PCR を用いて、過去に陽性であった中国由来の遺伝子組換えコメ加工品を用いて標的配列のコピー数を算出し、コメ加工品の特性（多コピー導入系統かどうか）を明らかにする事ができた。4. 加工食品中の DNA は断片化されており、そのような短い DNA 断片を効率よく抽出する方法として陰イオン交換樹脂を用いた方法が用いられるが、多糖など添加物が DNA 精製に与える影響することがあるためその影響を検討した。その結果、添加物増粘多糖類カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)がコメ由来 DNA の収量および精製度に与えることが判明した。

協力研究者

中村公亮（国立医薬品食品衛生研究所）
小林知子（国立医薬品食品衛生研究所）

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. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法開発

1-1 遺伝子配列の解析

1. 試料

非 GM ヒヨコマメは独立行政法人 農業生物資源研究所から購入した品種 T-87-2(配布

番号：JP97097, インド産、種皮：黄白)を用いた。遺伝子配列の特異性試験には、マメ科植物 5 種 (ササゲ, スタイロ, エンドウ, インゲン, ラッカセイ), その他作物 18 種 (ダイズ, トウモロコシ, イネ, オオムギ, カラスムギ, コムギ, ナタネ, コマツナ, テンサイ, アマ, ジャガイモ, トマト, ナス, ピーマン, ワタ, パパイア, ピーチ, パッションフルーツ) のゲノム DNA を供した。

2. PCR 用プライマー対

ヒヨコマメ由来 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (CaNCED) の遺伝子配列の解析には以下のプライマー対を使用した。

・ CaNCED 中心部分配列

DP1,5'A: (sense)

5'-GCCGGTCACCACTTCTTCGACG-3'

DP2,5': (anti-sense)

5'-CACTCTTCAAACCTCTCGTCGCATTC-3'

・ CaNCED 5'側部分配列

CP-F1: (sense)
 5'-CTTCAAACACATGGATCAACACCA-3'
 CP-F2: (sense)
 5'-ACAACAACAACCTTAATCCCCAC-3'
 CP-R1: (antisense)
 5'-AGCGGCAAGAGTAACTAACGG-3'
 ・ CaNCED 3'側部分配列
 CP-F3: (sense)
 5'-CTTGTATGACACCTGCAGATTCC-3'
 CP-R2: (antisense)
 5'-GAAAGTTCCATGGAACCCATAAGG-3'
 CP-R3: (antisense)
 5'-ACTGTGCTGAAACATAAGTTTAC-3'
 ・ CaNCED ORF 配列
 CaND-F: (sense)
 5'-CTCCACTCCCCTCAACTTTCC-3'
 CaND-R: (antisense)
 5'-GACATATCTGCAACCATCCCTC-3'

3. PCR

PCR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。2 \times PCR buffer 12.5 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs (2 mM) 5 μ L, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50 μ mol/L) 各 0.25 μ Lを混合し, DNA 試料液 (10 ng/ μ L) 5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ Lに調製した。反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分間加温し, その後, 95 $^{\circ}$ C 30秒, 55 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして, 40サイクルの増幅反応を行った。その後, 72 $^{\circ}$ C 5分保温した。

4.ゲノムウォーキング解析

Straight Walk[®] Kit (BEX CO., LTD) を用いて CaNCED のゲノムウォーキング解析を行った。まず, CaNCED の既知塩基配列に認識配列を含まない制限酵素 *Spe* I と *Xba* I を使用し, ヒヨコマメのゲノム DNA を分解した。*Spe* I 処理の場合, DNA 300 ng, 10 \times NE buffer 1 μ L, 100 \times BSA 0.1 μ L, *Spe* I (New England Biolabs) 1 μ L を混合し, MiliQ 水で 10 μ L に調整した。*Xba* I 処理の場合, 10 \times M buffer 1 μ L, 0.1% (w/v) BSA 1 μ L, *Xba* I (Takara) 1 μ L を混合し, MilliQ 水で 10 μ L に調整した。それらを 37 $^{\circ}$ C, 1 時間保温した。制限酵素処理後, 反応液 10 μ L に, Klenow enzyme (5U) 1 μ L, dCTP (1 mM) 1 μ L を加え, 25 $^{\circ}$ C, 15 分反応後, 次いで 75 $^{\circ}$ C, 20 分処理し, 一塩基伸長反応を行った。次に, 反応液 12 μ L に対し, アダプター-RWA-2

プライマー (10 μ M) 2 μ L, Ligation high(TOYOBO) 1 μ L を加え, 16 $^{\circ}$ C, 16 時間アダプター結合反応を行った。次いで, CaNCED 未知領域を増幅するため, nested PCR 反応を行った。PCR 反応液は 50 μ L/well に調製した。その組成は以下の通りである。1 回目の PCR 反応液は, 2 \times PCR buffer 25 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs(2 mM) 5 μ L, 既知配列用外側プライマー (SW2 又は SW3, 50 μ mol/L) 0.2 μ L, アダプター配列用プライマー (WP-1:5'-CGCAGGCTGGCAGTCTCTTTA G-3') 溶液 (50 μ mol/L) 1 μ L を混合し, 鋳型 DNA 溶液 (10 ng/ μ L) 1 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 50 μ L に調製した。2 回目の PCR 反応液は, 2 \times PCR buffer 25 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs(2 mM) 5 μ L, 既知配列用内側プライマー (SW1 または SW2, 50 μ mol/L) 0.2 μ L, アダプター配列用プライマー (WP-2:5'-ATGCGGCCGCTCTCTTTAGGG TTACACGATTGCTT-3') 溶液 (50 μ mol/L) 1 μ L を混合し, 1 回目の反応液を 10 倍希釈した鋳型 DNA 溶液 (10 ng/ μ L) 1 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 50 μ L に調製した。反応条件は, 94 $^{\circ}$ Cで2分間加温し, その後, 94 $^{\circ}$ C 30秒, 65 $^{\circ}$ C 30秒, 68 $^{\circ}$ C 5分を1サイクルとして, 30サイクルの増幅反応を行った。

CaNCED 既知配列用プライマーは, 以下の配列のものを使用した。

SW1 :
 5'-GGAGTGTTGTTTGGAGTGAGCATG-3'
 SW2 :
 5'-TGGGTTTTGTTTCGGAAGGTGGTGG-3'
 SW3 :
 5'-TGTTTCCACGAAGTCTAGGGCGG-3'

5.シーケンス解析

PCR 産物は 1%(w/v)アガロースゲル (エチジウムブロミド 0.1 μ g/mL 含有) で電気泳動後, UV 照射下で検出した。目的の DNA 増幅断片はゲルから切り出し, 精製後, 俵ファスマックにダイレクトシーケンス解析を依頼した。得られたシーケンスデータは, GENETYX Ver. 10.0.3 を用いて解析を行った。

6. サザンブロット法による遺伝子コピー数の解析

ヒヨコマメからの DNA 精製は、Nucleon PhytoPure (GE Healthcare Life Sciences) を使用した。購入した種子は発芽後、約 1 か月生育させ、幼苗の茎葉を 0.5 g 採取し、液体窒素で凍結させ、乳鉢で粉砕した。粉砕した試料は 15 mL 遠心チューブに入れ、ReagentI 2.4 mL, RNaseA 4 μ L と混合した後、37°C, 30 分間保温した。ReagentII 0.8 mL を加え転倒混和した後、65°C, 10 分間処理し、氷上で 20 分間静置した。次に、冷クロロホルム 2 mL, PhytoPure resin 200 μ L を加え、室温で 10 分間振盪後、2000 \times g, 10 min 遠心した。得られた上清は新しい 15 mL チューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加えて転倒混和し、4000 \times g, 5 分間遠心した。上清は取り除き、得られた沈殿に冷 70% (v/v)エタノール 10 mL を加え 4000 \times g, 5 分間遠心した。上清は取り除き、沈殿を乾燥させた後、水 300 μ L に溶解した。次いで、2000 \times g, 5 分間遠心し、得られた上清は 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の冷 100%(v/v)エタノールを加え、-80°C で 10 分間冷やした後、15,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心した。再び水 300 μ L に溶解し、これを DNA として試験に使用した。得られた DNA は以下の通り *Xba*I で消化した。DNA 10 ng に対し、10 \times NEB buffer 4 20 μ L, 100 \times BSA 2 μ L, *Xba*I (100U/ μ L) 1 μ L, 全量 200 μ L となるよう水を加えた。37°C で一晩処理後、10 U を加え、37°C, 1 時間追加処理し完全消化させた。これらの DNA 溶液は、水 200 μ L を加え、全量を 400 μ L とした後、等量のフェノール/キノリノール溶液を加え、転倒混和し、15,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心した。得られた上清は新しいチューブに移し、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、-80°C で 10 分間冷やした後、5,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心した。上清を捨て、得られた沈殿に冷 70%(v/v)エタノール 1 mL を加え、15,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿を乾燥後、水 10 μ L に溶解し、ゲル電気泳動のサンプルとした。

CaNCED 遺伝子の開始コドン付近 790 bp をサザンブロット検出用プローブとした。検出用プローブの作成は以下の通り行った。

ターゲットを増幅させるプライマーセットは、

CaND-F: (sense)

5'-CTCCACTCCCCTCAACTTTCC-3' と

CP-R1: (antisense)

5'-AGCGGCAAGAGTAACTAACGG-3'

を使用した。PCR 反応液は、DNA (10 ng/ μ L) 5 μ L, 各プライマー溶液 (50 μ M) 0.5 μ L, dNTP 5 μ L, 2 \times KOD FX PCR buffer 25 μ L, KOD FX 0.5 μ L, 水 13.5 μ L とした。PCR 反応条件は、まず 95°C で 5 分保温した後、95°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分を 40 サイクル、最後に 72°C 5 分、ついで 4°C で保温した。PCR で得られた産物は、2%(w/v)低融解アガロースゲルにて電気泳動し、790 bp 付近の断片を含む部分を切り出した。切り出したゲルは、1.5 mL チューブにいれ、buffer QG 300 μ L を加え 55°C, 5 分間保温し、ゲルを融解させた。その溶液にイソプロパノール 100 μ L を加え混合し、チューブにセットしたシリカゲルメンブレンに 12000 rpm, 1 分間遠心負荷した。次に buffer QG 500 μ L, buffer PE 750 μ L を順に 12000 rpm, 1 分間、遠心負荷し、メンブレンを洗浄した。最後に、12000 rpm, 1 分間遠心しメンブレンを乾燥させ、水 50 μ L で DNA を溶出し、プローブ溶液とした。さらに AlkPhos Direct Labeling and Detection system (GE Healthcare Life Sciences) を用いて、プローブの標識を行った。プローブ溶液 (10 ng/ μ L) 10 μ L は 96°C, 5 分間の変性処理後、氷中で急冷した。このサンプルに Reaction buffer 10 μ L を加え混合し、Labeling reagent 2 μ L を加えた。さらに、あらかじめ Cross-linker solution 2 μ L に水 8 μ L を加え希釈しておいた溶液を混合し、37°C, 30 分間保温した。これを氷上で冷やし、サザンブロットに使用する検出用 AP 標識プローブとした。

ゲル電気泳動は以下の通り行った。0.8% (w/v)アガロースゲルを用いて制限酵素処理したヒヨコマメの DNA 溶液及び 1 kb サイズマーカー各 10 μ L, 陽性コントロールとしてプローブ溶液 (10 ng/ μ L) 0.1 μ L を 10 \times ローディングダイと混合し、低電圧(50V)で泳動した。ローディングダイがゲルの 7 割まで移動したら泳動を終了し、ゲルを EtBr 溶液 (エチジウムブロミド 10 μ g を含む TAE バッファー 100 mL) 中で 30 分間振盪染色し

た。UV 照射下で泳動バンドの確認をした後、変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で 30 分間振盪し、次いで中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH7.2), 10 mM EDTA) で 30 分間振盪し、DNA の変性処理を行った。このゲルは 1×SSPE トランスファーバッファーを使用して、Hybond-N⁺ に毛細管現象を利用し 20 時間トランスファーさせ、その後 80°C、2 時間ベーキングを行い DNA をメンブレンに固定化した。ハイブリバックにメンブレンと 75°C に温めておいたハイブリバッファー (0.25 M NaCl) 15 mL を入れシールし、75°C、30 分間振盪し、プレハイブリを行った。次に、AP 標識プローブ 24 μL (DNA 75 ng) をハイブリバッファーによく混合し、75°C、3 時間振盪した。このメンブレンは、あらかじめ 75°C に温めておいた一次洗浄バッファーで 75°C、20 分間振盪した。一次洗浄はこれを 4 回繰り返した。二次洗浄は、二次洗浄バッファーで室温、10 分間の振盪を 2 回繰り返した。最後に CDP-star を添加し、LAS4000mini (GE Healthcare Life Sciences) にて化学発光を検出した。

1-2 ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法開発

リアルタイム PCR を使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

(1) 試料

非遺伝子組換えのヒヨコマメは、(独) 農業生物資源研究所から購入した T-87-2 品種 (JP No. 97097) を用いた。他のマメ科植物は、ササゲ (Juuroku sasage 品種、JP No.31615)、スタイロザンテス (Pauciflora 品種、JP No. 80020)、エンドウ (Denkou Kinuzaya 品種、JP No. 31448)、インゲンマメ (Toppu Kuroppu 品種、JP No.31351)、ラッカセイ (Chiba shouryuu 品種、JP No. 27301) を使用した。またマメ科以外の植物として、オオムギ (Zairai hadaka mugi 品種、JP No.16719)、カラスムギ (A. fatua [Australia san] 品種、JP No. 41387)、コムギ (Azuma nishiki 品種、JP No. 20684)、ナタネ (Tohoku 3 品種、JP No.26150)、コマツナ (Narusawana 品種、JP No.26902)、テンサイ (Harumasari 品種、JP No. 25562)、ワタ (Hakushuu wata 品種、JP No.222117)、及びダイズ、トウモ

ロコシ、イネ、アマ、ジャガイモ、トマト、ナス、ピーマン、パパイア、ピーチ、パッションフルーツを用いた。

(2) ヒヨコマメ内在性遺伝子検知用プライマーおよびプローブ

昨年度、明らかにした CaNCED 配列 (GenBank no.AB771415) を基にリアルタイム PCR 用プライマー対及びプローブを以下の通り設計した。設計した配列は、BLASTn 検索により特異性をデータベース上で確認を行った。

```
NCEDr-F1 :
ATCAGCCACAACAGCATCAAAC
NCEDr-R1 :
TTTAAGCTCAAATCTTTGAAAGGAG
NCEDr-P1 :
FAM-CCAAACTTGCATCATCATCATACTC-
TAMRA
```

(3) ヒヨコマメ陽性対照用プラスミドの作成

ヒヨコマメ内在性遺伝子検知用プライマーおよびプローブの標的とする塩基配列を含んだ 330 bp の DNA 断片を増幅するため、以下のプライマー対を使用し PCR を行った。

```
CaND-F:
5'-CTCCACTCCCCTCAACTTTCC-3'
SW1 : 5'
-GGAGTGTGTTTGGAGTGAGCATG-3'
```

PCR 反応条件は以下の通りとした。AmpliTaq Gold PCR Master Mix 12.5 μL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μmol/L) 各 0.4 μL、DNA 試料液 5 μL (10 ng/μL) を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μL に調製した。反応条件は、95°C で 5 分間加温し、その後、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして、30 サイクルの増幅反応を行った。その後、72°C 5 分保温した。

PCR 産物は 2% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 μg/mL) で電気泳動後、UV 照射下で検出し、目的の増幅長の DNA 断片をゲルから切り出し精製した。得られた DNA は pGEM-T easy に TA クローニングしプラスミドは大腸菌の形質転換に使用した。大腸菌を培養後、精製したプラスミドは M13F と M13R プライマーを使用し、シーケンス解析を行った。

M13F:5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
M13R:5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

プラスミドへ導入した配列は、シーケンスを確認した後、ヒヨコマメ陽性対照用プラスミド (pGEM-CaNCED) とした。

(4) リアルタイム PCR 反応および結果解析

PCR 用反応液は、25 μ L /well として調製した。反応液の組成は以下の通りとした。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 2.5 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、50°C 2 分、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 15 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。

(5) 検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ)
pGEM-CaNCED は分子量を計算し、CaNCED のコピー数を算出した。real-time PCR 用反応液 25 μ L 中 CaNCED がそれぞれ 2.5×10^5 、 2.5×10^4 、 2.5×10^3 、 2.5×10^2 、 2.5×10^1 、 1.25×10^1 、 2.5×10^0 の 7 段階に希釈し、各濃度をそれぞれ 21 回反復試験を行った。得られた Ct 値からコピー数を算出し、平均値からグラフを作成し、検出限界およ

び定量限界を確認した。

1-3 ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法特異性検討

CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の特異性について、以下の標準種子を用いて検討した。

供試ヒヨコマメ(非 GM)には、(独)農業生物資源研究所より入手した T-87-2 品種(配布番号: JP97097)、NEC-143 品種 (配布番号: JP 97333)、P-843 品種 (配布番号: JP 97307)、NEC-2290 品種 (配布番号: JP 97252)、PI 215702 品種 (配布番号: JP 96860)、P-922-1 品種 (配布番号: JP 97321)、NEC-204 品種 (配布番号: JP 96947)、P-9897 品種 (配布番号: JP 96982)、米国 USDA より入手した Krokmal #2 品種 (配布番号: W6 11343)、Krokmal #3 品種 (配布番号: W6 11344)、Sovhoznii 14 品種 (配布番号: W6 11345)、2728(8)品種 (配布番号: W6 15637)、ICC 8159 品種 (配布番号: PI 115448)、NO.12620 品種 (配布番号: PI 207470)、ICC 6293 品種 (配布番号: PI 239859)、SHIMBRA 品種 (配布番号: PI 331381)、及び、マメ科作物には 6 種類の植物(ササゲ、スタイロ、エンドウ、インゲン、ラッカセイ、ダイズ)を用いた。

2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討(内在性遺伝子)

1. 試料

コメ陽性対照には、日本晴から精製した DNA を使用した。特異性試験には、13 種の作物(トウモロコシ、オオムギ、カラスムギ、コムギ、ダイズ、ヒヨコマメ、ナタネ、コマツナ、テンサイ、アマ、ジャガイモ、ワタ、パパイヤ)から精製した DNA を供した。

2. DNA 精製

DNA 抽出・精製には、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出・精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を使用した改変法を用いた。ジャガイモ及びパパイヤは可食部をミルサーで均質に細粉碎し、10 g を DNA 抽出用試料とした。G2 緩衝液 30 mL, Cellulase 500