

縞葉枯れ病耐性遺伝子導入米のアレルゲン性評価

新 本 洋 士・一 色 賢 司*・早 川 孝 彦**

(東北農業試験場・*食品総合研究所・**植物工学研究所)

Analysis of Allergens of Transgenic Rice Resistant to Rice Stripe Virus

Hiroshi SHINMOTO, Kenji ISSHIKI* and Takahiko HAYAKAWA**

(Tohoku National Agricultural Experiment Station・

(*National Food Research Institute・**Plantech Research Institute)

1 は じ め に

遺伝子組換え作物を食品として摂取可能であることを判定するための考え方は、現存する同じ作物と組換え作物との間に差異がないことを証明することである。これは「実質的同等性」と呼ばれる概念である。そのなかでも、最も重要な安全性確認課題と考えられるのは、新規導入蛋白質それ自体のアレルゲン性である。厚生省の「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」別表 2 付表 2「アレルギー誘発性に関する安全性評価に必要な資料」では、①供与体の生物の食経験に関する資料、②遺伝子産物がアレルゲンとして知られているかに関する資料、③遺伝子産物の物理化学処理に対する感受性に関する資料、④遺伝子産物の摂取量を有意に変えるかに関する資料、⑤遺伝子産物と既知の食物アレルゲンとの構造相同性に関する資料、⑥遺伝子産物が一日蛋白摂取量の有為な量をしめるかに関する資料、の 6 項目を要求している。

植物工学研究所で樹立された縞葉枯れ病耐性稲は、縞葉枯れ病ウィルス外被蛋白質遺伝子を稲に導入し、縞葉枯れ病ウィルスに著しい耐性を持った稲である¹⁾。これまでに野外栽培実験による栽培時の安全性確認試験が終了し、現在は収穫した米についての食品としての安全性確認が行われている。

縞葉枯れ病ウィルス外被蛋白質は人工胃液を用いた消化実験により、プロテアーゼ感受性が高く、経口摂取後、直ちに胃内で分解されると推測されている(未発表データ)。食物アレルゲン蛋白質のほとんどはプロテアーゼ耐性であり、腸管で分解されずに吸収されることによって食物アレルギーを引き起こす。またこの外被蛋白質は既存のアレルゲンとの構造的相関も見られないため、外被蛋白質そのものは上記厚生省のアレルゲン誘発性に関する安全性評価に必要な条件は完全に満たしている。

しかしながら、米にはもともと 16kDa アレルゲンとして知られる分子量 14~16kDa のアレルゲンが存在し^{3, 4)}、これが米アレルギー発症に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。縞葉枯れ病耐性稲から得られた遺伝子組換え米において、導入遺伝子によって、まったく異なる遺伝子産物である米アレルゲン合成量が著しく変動させるか否かはこれまで明らかにされていない。そこで

本報告では、主要米アレルゲン遺伝子組換え米において、非組換え米と異なるか否かを電気泳動法及び、ヒト抗米 IgE 抗体を用いた競争酵素免疫測定法を用いて検討した。

2 試 験 方 法

(1) 米

キヌヒカリ、及びキヌヒカリをもとに樹立された縞葉枯れ病ウィルス外被蛋白質導入米 (TR 8-3) は、植物工学研究所から入手した。米は玄米をそのまま用いた。玄米を乳鉢で磨砕し、以下の抽出操作を行った。

(2) 米アレルゲンの抽出

松田らの方法⁵⁾に従って米アレルゲン画分を調製した。2 g の米粉を 0.5M 塩化ナトリウム溶液 20 ml に懸濁し、室温で 2 時間攪拌して米蛋白質を抽出した。混合液を 9,000 xg で 30 分間遠心し、上清を得た。上清を 5 µm のフィルターを通して清澄化し、粗アレルゲンとした。蛋白質濃度は DC プロテインアッセイによって測定した。キヌヒカリからは 39.6mg 組換え米からは 40.5mg の抽出物が得られた。

(3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Leammli の方法に従い、メルカプトエタノールを含む還元条件下で電気泳動を行った²⁾。ゲルは 10~20% のポリアクリルアミドゲル (第 1 化学) を用い、ゲルはクイック CBB (和光純薬) で染色した。

(4) 競争酵素免疫測定法による米抽出物のアレルゲン性評価

抗米アレルゲン IgE 抗体をもつ患者血清を用い、市販体外診断キットと組合わせた競争酵素免疫測定法 (ELISA) による組換え米のアレルゲン性評価を行った。診断キットにはアラスタット (三光純薬) を用いた。リガンド固定チューブに段階希釈したキヌヒカリと組換え米抽出物 50 µl 及び標準米アレルゲン溶液 50 µl を加えて混合し、ここに患者血清 50 µl を添加して室温で 2 時間振盪した。ここに抗リガンド溶液 50 µl を加えて 1 時間振盪し、標準米アレルゲンに結合した患者 IgE 抗体をチューブに固定させた。チューブを 2 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体 200 µl を添加して 1 時間振盪した。チューブを洗浄後、基質溶液を加え、30 分間酵素反応を行わせた後、1 規程硫酸で酵素反応を停止させ、490nm の吸光度を測定した。

3 試験結果及び考察

米粉を塩溶液で抽出した米蛋白質画分の還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図1に示す。特徴的ないくつかの蛋白質のバンドが見られた。松田らが報告している米主要アレルゲン相当する14~16kDa前後の蛋白質のバンド及びそれ以下の小さなバンドがみられた。また、25kDa付近及びそれ以上の分子量のバンドもみられた。遺伝子組換え米 TR-3 からの総蛋白質のパターンは、キヌヒカリからの抽出物のパターンとまったく変わらなかった。したがって、縞葉枯れ病耐性遺伝子導入

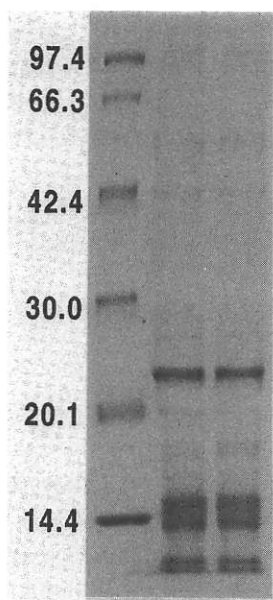


図1 還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるキヌヒカリ (中) と遺伝子組換え米 (右) 抽出物の蛋白質の比較 (左) 分子量マーカー蛋白質 (単位 kDa)

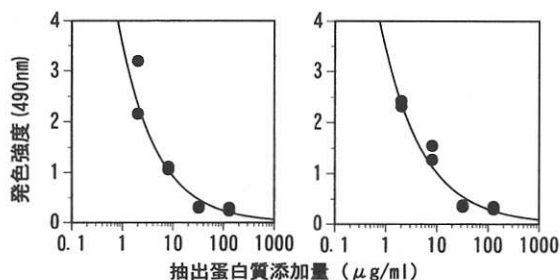


図2 標準米アレルゲンへの患者血清抗体の結合に対するキヌヒカリ (左) と遺伝子組換え米 (右) 抽出物の競争阻害作用

によって、米アレルゲンの著しい合成増加や、新たな蛋白質の合成は生じていないと推測された。

抗米アレルゲン抗体を含む患者血清を用いた組換え米のアレルゲン性の推定を行った。抗体の標準米アレルゲンへの結合に対する米抽出物の阻害作用を検討した。もし TR 8-3 がより強いアレルゲン性を持っているなら、より低い添加濃度でも強い競争阻害が起こるはずである。図2に示すように、キヌヒカリ、TR 8-3 とほぼ同程度の抗体結合阻害作用を示した。したがって、試料中の米のアレルゲン性は同程度であると推定された。

本研究で用いた縞葉枯れ病ウィルス外被蛋白質遺伝子導入遺伝子組換え米は既に野外試験を終了し、一般圃場での栽培が可能になっている。また、他の安全性評価試験も行われている。本研究ではこの遺伝子組換え米のアレルゲン性が、その母本であるキヌヒカリと同等であることが示された。今後、種々の安全性評価試験の結果をとりまとめ、実用化されることが期待される。

4 ま と め

縞葉枯れ病ウィルス外被蛋白質遺伝子導入米のアレルゲン性をキヌヒカリと比較した。塩可溶性蛋白質の収量及び電気泳動による主要米アレルゲンの分析結果には、差は認められなかった。米アレルゲンに対する患者 IgE を用いた競争酵素免疫測定法によるアレルゲン性比較においても、遺伝子組換え米とキヌヒカリには差は認められなかった。したがって、本遺伝子組換え米のアレルゲン性は、キヌヒカリと同等と考えられる。

引用文献

- 1) Hayakawa, T.; Zhu, Y.; Ito, K.; Kimura, Y.; Izawa, T.; Shimamoto, K.; Toriyama, S. 1992. Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9865-9869.
- 2) Leammli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 3) Matsuda, T.; Nomura, R.; Sugiyama, M.; Nakamura, R. 1991. Immunochemical studies on rice allergenic proteins. *Agric. Biol. Chem.* 55: 509-513.
- 4) Nakamura, R.; Matsuda, T. 1996. Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1215-1221.