

## 機能性作物としてのラクトフェリン高発現イネの作出

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者	保坂, 壮彦 樺沢, 満美子 高岩, 文雄 安西, 弘行
巻/号	53巻4号
掲載ページ	p. 250-251
発行年月	2004年12月

## 奨励賞

## 機能性作物としてのラクトフェリン高発現イネの作出

保坂壮彦<sup>1</sup>・樺沢満美子<sup>1</sup>・高岩文雄<sup>2</sup>・安西弘行<sup>1</sup><sup>1</sup>茨城大学遺伝子実験施設 <sup>2</sup>独農業生物資源研究所

## Transgenic Rice Expressing a Large Amount of Human Lactoferrin as a Functional Crop

Takehiko Hosaka<sup>1</sup>, Mamiko Kabasawa<sup>1</sup>, Fumio Takaiwa<sup>2</sup> and Hiroyuki Anzai<sup>1</sup><sup>1</sup>Gene Research Center, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-0393, Japan<sup>2</sup>National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan)

ラクトフェリン (LF) は、ヒトの母乳やウシの乳清中に含まれる80 kDaの二量体糖タンパク質であり、鉄イオンと結合する部位を持つトランスフェリンファミリーに含まれる。また、ラクトフェリンは多くの生理的な活性を持つ多機能分子でもあり、そのN末端側に抗菌・抗ウイルス作用と、生体の免疫活性化等に関するドメインを持つことが知られているのに加え、抗炎症効果や抗腫瘍活性を示すことも報告されている。よって日常的にラクトフェリンを摂取することは、健康な人の健康を増進するばかりでなく、病気などで免疫力が低下した人の抵抗力を高める効果が期待できるであろう。食生活において、ラクトフェリンの摂取元としては乳製品や、それから工業的に精製されたサプリメント等の補助食品が一般的だが、その効果を得るのに十分な量を、日常生活で少量の供給源から安価かつ簡便に摂取出来る方が望ましい。その方策として、ラクトフェリンを穀類などの食用作物に生産させて利用することが考えられた。これらは栽培技術が完成されていることや、これまでの研究により組換え体の開発が比較的容易であることに加え、得られた生産物を直接食べられるという利点を持っている。今回の研究では、日常的に食するだけで効果を得られる様なラクトフェリン高蓄積イネの作出を目的として、人間への親和性が高いヒトラクトフェリン (hLF) 遺伝子をイネに導入する実験を行った。

最初に、胚乳への発現タンパクの蓄積を促進させる試みとして、hLF 遺伝子配列の改変を行った。今回の実験では、hLF のN末端側にある局在性シグナル配列を、イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリンや10 kDa と13 kDa のプロラミンが持つシグナル配列と置換する操作、そしてhLF のC末端側に、タンパク質の小胞体局在シグナルである KDEL 配列を付加する操作を加え、これをユビキチンプロモーター、ないしは同じくイネ胚乳で特異的に発現するグロブリンプロモーターを接続した挿入カセットを構築した。これらを組み込んだ形質転換用バイナリーベクターは、アグロバクテリウム

法でイネ (品種名: 日本晴) カルスへ導入された。再分化個体から得られた組換えイネ種子は、磨砕後に Tris-NaCl バッファーを用いて水溶性タンパク質を抽出した。そして ELISA 法にて、それらの抽出サンプルの hLF 量を計測し、どの系統が高い蓄積量を示すか評価した。実験の結果、N末端をイネグルテリンシグナル配列に置換し、かつC末端に KDEL 配列を付加した系統 (Fig. 1) で、hLF 含量がより高まることを確認した。更に、ユビキチンプロモーターからグロブリンプロモーターに置換した系統において、非常に高い hLF 蓄積量を示す組換えイネ個体 (IG206-12) を選抜することに成功した。抽出したサンプルからは3.2~7.0 mg/g (玄米) に及ぶ hLF 蓄積量を確認し、SDS-PAGE でも濃

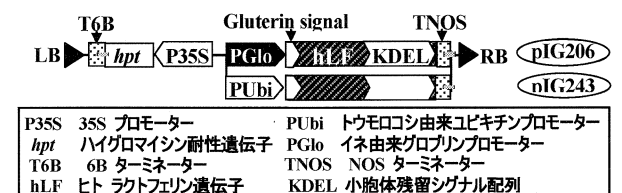
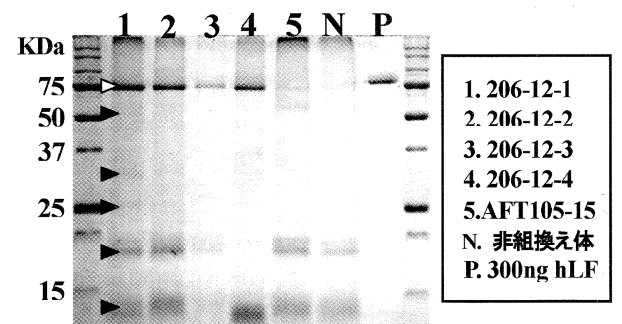


Fig. 1 ハイグロマイシンマーカーを持つ hLF 導入用挿入断片の構造



( 黒矢印 : イネの主要種子貯蔵タンパクの位置 )

Fig. 2 IG206-12種子由来水溶性タンパク試料の泳動結果

いバンドが観察された (Fig. 2 白矢印)。また、この hLF 高蓄積個体の後代系統を栽培し、世代ごとの hLF 蓄積量とそのばらつきについて追跡調査した結果、高発現個体の T<sub>2</sub> 系統種子において 0.9~4.6 mg/g、その後の T<sub>3</sub> 系統種子では 0.8~5.7 mg/g であり、各世代・系統間で同様に高い蓄積量を示していることを確認した。この抽出した水溶性タンパク中における hLF の割合は 40~50%にも達しており、全種子タンパクの 5%以上を占めると試算された。さらに、蛍光抗体染色法を用いて組換えイネ種子内に蓄積されている hLF の局在性を調査した結果、胚乳の細胞内や細胞膜周辺に広く分布している事が確認され、特定器官や部位への集積は見られなかった。

さらに、イネから単離された変異型アセト乳酸シンターゼ遺伝子 (mALS) をマーカーに用いた新規バイナリーベクター (クミアイ化学・生物研・北陸研究センターにより開発) を基に、新たな系統を構築した (Fig. 3)。mALS は除草剤 (ビスピリバック) 耐性マーカー遺伝子として働くため、これを用いたベクターは従来の抗生物質耐性マーカー遺伝子より Public Acceptance を得やすいという利点がある。これにターミネーター等を全てイネ由来の遺伝子に変換した IG206-12タイプの挿入カセットを連結し、イネへ導入した。得られた組換え植物体から種子を採取し、抽出サンプル中の hLF を定量した結果、IG206-12系統と比べて系統全体の平均蓄積量が増大しただけでなく、最大蓄積量も大幅に上昇したことが認められた。更にこの系統の中から IG206-12系統を越える hLF 超高蓄積個体 (IG255-08) が選抜され、その種子から抽出したサンプルでは、平均 7.8 mg (最高 15.1 mg)/g (玄米) に及ぶ hLF 蓄積量を確認した。

今回の実験において、我々はイネの貯蔵タンパクであるグロブリンのプロモーターを用いた挿入カセットにより、高い hLF 蓄積量を示す複数の系統を作出することに成功した (Fig. 4)。特に、IG255-08系統は大量の hLF を種子に蓄積しており、同系統の種子 1 kg (市販価格に換算して約 300円) から平均 7.8 g 以上のヒトラクtofエリン得ることが可能である。なお、これは含まれるラクtofエリン濃度から換算して牛乳約 30リットル、ヒトの母乳と比較しても約 4リットル分に相当すると試算された。また、IG206-12系統における鉄含有量は、非組換えイネ種子に比べて 2倍程度を示すこと

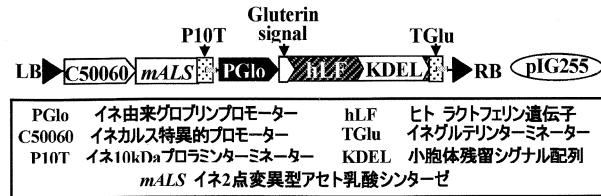


Fig. 3 ALS マーカーを持つ hLF 導入用挿入断片の構造

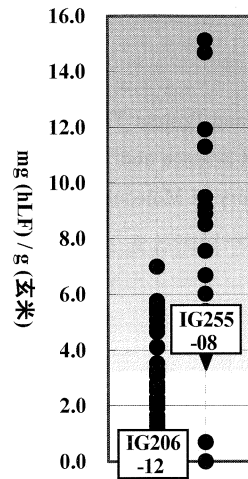


Fig. 4 高蓄積系統における種子での hLF 蓄積量

が確認されており、hLF の増大が鉄含有量の増大にも繋がっていることが示された。さらにタンパク質の修飾について、KDEL 配列の付加はイネ胚乳中で発現した hLF の蓄積量増大に効果を持つことが示唆された。本来、hLF は植物体内に存在しないタンパク質であるため、その分子がどのように分布するかは明確ではなかった。これに対して、グルテリンのシグナル配列は細胞質内のプロテインボディー-II へ発現タンパクを蓄積させると考えられ、また KDEL 配列は、タンパク質の小胞体局在に参与する配列であることから、細胞内の特定領域に蓄積することが予想された。今回の実験で、発現した hLF が細胞内全域から細胞間にも確認されたことは、シグナル配列や KDEL 配列付加により予想された局在化とは異なる現象として、さらに解析が要されるであろう。

なお、本研究は生研センターの新事業創出研究開発事業の一環として行なわれた。