

健康機能性を強化した遺伝子組換えイネの研究開発

独立行政法人 農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ 高岩 文雄

お米に、高血圧や糖尿病、高脂血症、肥満、ガンといった生活習慣病に対して予防効果のある機能性成分や花粉症等のアレルギー疾患を緩和する成分を付与した、新規な医食同源的機能をもつ遺伝子組換え米が、次々に開発されようとしている。お米は日本人の主食であり、こうしたお米を毎日食べることで生活習慣病の予防やアレルギー疾患を予防・緩和できるなら、高齢化社会を迎え今後益々増加すると予想される医療費の削減にも大いに貢献できると期待される。さらに消費者に利点があることから、現在多くの消費者が抱く遺伝子組換え作物に対する否定的なイメージも払拭できる可能性も高い。

1. はじめに

現在、商業栽培され日本に輸入されている遺伝子組換え作物は、除草剤耐性や害虫抵抗性のナタネやトウモロコシなどであり、生産者のみには利点が見えないため、多くの消費者にはほとんど受け入れられていない。遺伝子組換え作物が消費者に受け入れられるには、消費者ニーズにあった、消費者が利点と感じる形質の付与が不可欠ではある¹⁾。

近年、日本では食生活や生活スタイルの変化から、高血圧、糖尿病、高コレステロールなどと言った生活習慣病患者が急激に増加している。こうした中で、食品から派生する多種類の生理機能性成分を健康維持に生かそうとする機運がかつてなく高まっており、政府が設置したバイオ戦略会議でも重点分野として機能性食品が取り上げられている。我々は2000年より、生研機構のミレニアムプロジェクト新事業創出研究開発事業の中で“健康機能性作物の開発”を推進している。このプロジェクトを担当しているコンソーシアムチームでは、可食部に外来遺伝子を特異的に発現させるシステムとマーカーフリーの組換え作物作出技術を基盤技術とし、糖尿病や抗肥満、感染症予防、花粉症緩和などの健康機能性米の開発を実施している。実用化が可能になれば、こうした健康機能性を付与した遺伝子組換え作物は消費者利点をはっきりしていることから、現在停滞している遺伝子組換え作物開発の突破口になるのではないかと期待している。

2. 米の健康機能性成分と新規健康機能性成分の付与

突然変異を利用した育種や遺伝資源による遺伝的多様性を利用した交配育種だけでは、作物への健康機能性の強化はもはや限界にきているとあって良いだろう。米の機能性成分には、血圧降下作用のある GABA (γアミノ酪酸) や赤米や黒米に見られるポリフェノール、フィチン、イノシトール、γオリザノールなどが知られているにすぎない。しかも、これらの機能性成分は可食部の胚乳にはほとんど含まれていない。たとえば、GABA はほとんどが胚芽中にあり、胚乳中の含量は胚芽中に比較して 10%以下に過ぎない。従って、今後上記以外の新規の機能性をコメに付与するためには、遺伝子組換え手法による新規健

健康機能性成分の導入に頼らざるを得ない。すなわちイネ等の作物のみならず多様な生物より有用な機能性成分を探索し、それら遺伝子を単離後、米の可食部である胚乳中に発現・集積を行うというプロセスを経る必要がある。

健康機能性成分を付与したり強化する方法は、2つに大別できる²⁾。一つは生理活性ペプチドや機能性タンパク質また病原菌やアレルゲンなどの抗原を直接可食部に発現・集積させることである。もう一方は、代謝産物が機能性を有していることから、機能性のある代謝産物を代謝工学的手法で可食部に蓄積させることである。この場合、律速になっている酵素遺伝子や目的の代謝産物を合成するために必要な新規酵素遺伝子を付加したり、発現を高めたりといった手法で、機能性のある代謝産物を可食部に蓄積を図ることになる。

3. 健康機能性ペプチドやタンパク質を導入した新健康機能性米

食品には食べて胃や腸で消化され、小腸で吸収される10アミノ酸残基以下の小さなペプチドになった時に、機能性を発揮する数多くの生理活性ペプチドが明らかになっている。こうしたペプチドはコレステロール値低下作用や、高血圧低下作用、免疫賦活作用、抗菌活性、抗酸化作用、学習能など多様な機能をもっていることが明らかにされてきた³⁾。これら機能性ペプチドの利点は、内因性のペプチドホルモンほど低濃度で生物活性はないが、小さいサイズであるが故、消化酵素に耐性であり、小腸から吸収され易いという特徴を有している。また食品由来であることから導入遺伝子に対する抵抗感も比較的少ない。しかし、機能性成分の効果を発揮させるには、これらの機能性成分を含む食品を多量に摂取しなければならないという欠点がある。この欠点を補う方法として、ひとつには、一部アミノ酸を置換し、より高機能化する必要がある。たとえば卵白アルブミンのキモトリプシン処理から派生するオボキニンと呼ばれる6アミノ酸からなる生理活性ペプチドは、血管を広げることで特異的な血圧降下作用を持っているが、その効果を発揮させるためには、卵白アルブミンを2g/kg体重程度を摂取しなければならない。これは卵数十個をいっきに食べることに相当し、普通の食生活ではとうてい不可能である。しかし興味あることに、わずか2個のアミノ酸を置換するだけで、約120倍程度生理活性のものに高機能化できることが報告されている。次に問題になるのは、こうしたこうした低分子量の機能性ペプチドをどのように食品中に発現・集積させるかという点である。ほとんどの場合、こうした低分子量の機能性ペプチドは直接発現させても、安定的に集積させることができない。そこで我々はこうした低分子量の機能性ペプチドを集積させる方法として、貯蔵タンパク質の中に組み込み、貯蔵タンパク質の一部として発現・集積させる方法を開発している(図1)。

この方法を用いて、上記の改変オボキニンをイネの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンの酸性サブユニットや塩基性サブユニットの可変領域に挿入し、グルテリンの一部として、発現集積させる形で、改変オボキニンを集積させた高血圧予防米の開発を進めた。オボキニンが機能を発揮するためには、貯蔵タンパク質から切り出され、小腸から血中に取り込まれることが必須であることから、まず改変オボキニンが小腸に達するまで消化酵素により切断を受けず、胃を経由し小腸に達した時、小腸の消化酵素であるトリプシン等により効率的に切り出されるようにする必要がある。そこでトリプシンの切断認識配列を

ペプチドの両末端に配置した。現在、1個のグルテリンに4～5個の改変オボキニンを挿入し、改変オボキニンを蓄積させた遺伝子組換えイネの作出に成功している。

糖尿病患者の90%以上は膵臓からのインスリンの分泌が悪くなったⅡ型糖尿病であることが報告されている。そこで、こうしたインスリン分泌能の低下している糖尿病患者の食後の過血糖の是正、また耐糖能以上を有する血糖病予備軍の血糖の調節を目的に、血糖値に依存してインスリン分泌を促進する作用を有するヒトの内在性生理活性ペプチドグルカゴン様ペプチド(GLP-1)を胚乳中に集積させたイネの開発を進めている。GLP-1は30個のアミノ酸残基から構成されており、この配列中にはトリプシンによる認識サイトも存在するので、生理活性を失わないようにトリプシン耐性のアミノ酸へ置換を行う必要がある。この改変GLP-1ペプチドを改変オボキニンと同様にグルテリンの酸性サブユニットの可変部やグロブリンの可変部に挿入し、これら貯蔵タンパク質の一部として種子中に集積させた。現在、GLP-1を種子タンパク質あたり3%程度と高度に蓄積させたマーカーフリー高GLP-1集積遺伝子組換えイネの開発に成功している。このGLP-1集積コメから抽出した粗抽出液には、トリプシン処理してもすい臓ランゲルハンス島のβ細胞を用いたin vitroアッセイでインスリン分泌促進活性が認められた。今後、マウスでの給餌実験を通じて、GLP-1含有米のインスリン分泌促進能の有無を調べる予定である。

一方、機能性タンパク質としてコレステロール値低下機能をもつダイズグリシニンや鉄の貯蔵機能を有するフェリチンそのものを直接可食部に発現させることで、血清コレステロール値低下機能や鉄含量を高めたイネの開発も進めてきた⁴⁾。また抗菌活性のある母乳由来のラクトフェリンを胚乳中に集積された米も開発されており、抗菌や抗ウイルス活性、食べることで免疫系の賦活が確認されている。

新しい流れとして、アレルギー疾患の緩和や治療を目的に、第2世代の抗原特異的治療法であるT細胞エピトープを利用したペプチドワクチンが注目されている。この方法は従来の減感作療法と違い、IgE抗体との結合がなくB細胞エピトープを持たないことから安全で、短期間に治療できるという特徴が知られている。そこでこのペプチドワクチンの原理を利用して、スギ花粉アレルギー(Cry j 1およびCry j 2)由来の7個のヒトT細胞エピトープを連結したハイブリットペプチドを米の胚乳中に種子タンパク質あたり3%程度蓄積させたペプチドワクチン米の開発に成功した(図2)。このお米は毎日食べることで、経口免疫寛容の原理によりアレルギー症状の緩和・治療できる可能性のある⁵⁾。さらに、病原性のある細菌やウイルスの抗原そのものを可食部で発現させ、食べることでこれら抗原に対するIgAやIgGなどの中和抗体の産生を誘導させたり(能動免疫)、病原菌やウイルスの抗原に対するヒト抗体を種子中で発現・集積させることで、受動免疫の原理で感染を防御するといった食べるワクチンとしての組換え米の利用も積極的に進められている(表1)。

4. 代謝工学的手法を用いた健康機能性米

代謝工学的アプローチから機能性を高める手法は、ポストゲノム研究として最も注目すべき分野の一つである。マイクロアレー技術により、目的産物を発現させた可食部で、ど

の代謝ステップが律速になっているか、欠失しているのか明らかにすることができる。また多くの生物のゲノム解析が進む中で、外来の代謝酵素遺伝子を同定・導入することも容易である。こうした手法を用いることで代謝過程を付加したり、補強することで、本来発現していない組織に目的の代謝産物を任意に蓄積させることが可能になってきた。またマイクロアレー技術は、新規の代謝産物を導入したとき、本来の代謝プロセスに対してどのような負荷を与えるかという疑問に答えることもできる。すでにイネ種子では発現されていないゲラニルゲラニル 2 リン酸からβカロチンに至る3段階に関わる代謝遺伝子を導入・発現させることでプロビタミンA(βカロチン)の蓄積されたゴールデンライスが開発されている。一方、共役脂肪酸が抗肥満、抗ガン、抗動脈硬化作用等幅広い作用を有していることから、リノール酸を不飽和化する酵素を種子で発現させ、機能性共役脂肪酸を蓄積されたナタネやイネの開発も進められている。今後、ビタミンEやCまた骨粗しょう症に効果の期待できるマメのイソフラボンや抗酸化作用を通じて抗ガン効果の期待できるポリフェノールやフラボノイドを高めた遺伝子組換え米の開発も進むと期待される。

5. 健康機能性米作出に不可欠な技術 —可食部への高度発現—

機能性作物開発には、食する組織に、有用遺伝子産物をどのようにしたら高度に蓄積させることができるかということがキーポイントになる。たとえばイネやコムギ、トウモロコシなどの穀類では可食部である種子(特に種子の主要な部分を占める胚乳)に、トマトなら果実に外来の有用成分を高度集積させなければならない。特異的組織への発現には組織特異的プロモーターの単離が不可欠である。すでにイネの種子では、グルテリンの *GluB-1* や 26kD のグロブリンのプロモーターが、胚乳中で極めて高いプロモーター活性を有していることを明らかにしてきた⁶⁾。さらに外来遺伝子の発現の目的に応じて、種子の任意の部位に発現させることのできるプロモーターセットも準備できている。

一方、外来遺伝子産物の蓄積レベルは転写の段階で第一義的に決定されるが、転写後の制御としてmRNAの安定性、コドン、サブユニット間の会合また集積部位(空間)など様々な局面で制御を受けていることが近年明らかになってきた⁶⁾。

特に外来遺伝子産物を高度に集積させるためには、外来産物を集積させる空間を確保するなどの工夫が重要であることが示されてきた。たとえば貯蔵タンパク質の含量の低下している突然変異体に外来遺伝子を導入すると、普通のイネに導入する時よりも約2倍量外来遺伝子産物を蓄積させることができた(図3)。一方、プロモーター活性を上げ、外来遺伝子のmRNAの含量を5倍程度高めても、普通のイネに導入した場合、集積量の増加はわずかに20%程度しか高められない場合もある。これらの結果は、外来の遺伝子産物を高度に集積させるには、集積させるための空間の確保が重要であり、ない場合には翻訳された外来遺伝子産物の大部分はプロテアソームなどを介して分解されてしまい、わずかなスペースに外来産物が蓄積されるに過ぎないことを意味している。さらに、高蓄積には細胞内のどの部位に外来遺伝子産物を蓄積させるかという視点もまた重要である。タンパク質顆粒、アポプラスト、葉緑体、液胞、小胞体、細胞質など外来遺伝子産物ごとに集積に適した細胞内小器官を探す必要がある。一般的に、タンパク質のC末端にKDELの小胞体係留

シグナルを付加しておくタンパク質の集積が高まる傾向が見られる。効果的な場合には5～10倍程度高まることが報告されている。さらに、遺伝子のコドンの選択性も極めて重要になる場合も度々ある。コドンの使用頻度は導入する作物や組織により異なるのでこの点も注意しなければならない。

遺伝子の導入には、今後目的の遺伝子だけを導入するマーカーフリーの遺伝子導入技術が、商品開発上で不可欠となってくる。すでに本コンソーシアムでは選抜マーカー遺伝子（多芽体の形成に関与するサイトカイニン合成酵素遺伝子や抗生物質耐性遺伝子）と組換え酵素遺伝子の外側に組換え酵素遺伝子のターゲット配列を配置しておき、植物体の再分化過程で、マーカー遺伝子が除去され、目的の遺伝子のみが導入される MUT ベクターシステムをイネで開発している。この MAT ベクターシステムで遺伝子導入することで、外来遺伝子産物の集積が高まる例も知られている。

6. おわりに

種子は健康機能性成分を集積させる部位として優れた組織である。まず他に組織で発現させるとほとんど蓄積されない外来遺伝子産物でも種子で発現させると蓄積が見られることが多く、集積量も高い。種子に蓄積させた機能性成分は室温で1年以上放置しても安定であり、貯蔵や輸送といった取り扱いも他の組織より容易である。また精製することなく機能性成分の強化されたお米を炊飯してそのまま食べることができる利点も大きい。さらに、ヒトに感染するウイルスやプリオンなど混入は皆無であり、安全性にも優れている。そしてなによりも高機能性成分の付与されたお米は世代を重ねるごとに大量に増殖でき、最終的には全く普通のお米と同じ価格で生産できる点である。お米は日本で自給できる数少ない作物である。農作物のグローバルゼーションの中で、日本の米の高機能化は先進国の農業が生き残るために避けて通れないプロセスである。今後、遺伝子組換えイネであるという表示が高付加価値ブランド米を意味し、輸出できるようなイネを開発することが筆者らの夢である。

文献

- 1) 高岩文雄 消費者の観点に立った組換え作物の開発 (2000), バイオサイエンスとインダストリー, 58, 731-734.
- 2) 高岩文雄 (2001), 予防医療に期待される遺伝子組み換え食品, InterLab, 39-40.
- 3) 吉川正明 (1977), 食品および一般タンパク質から派生する生理活性ペプチド, 科学と工業, 71, 310-316.
- 4) 高岩文雄 (2000), 健康機能性組換えイネの開発, 農業および園芸, 75, 947-952.
- 5) 高岩文雄 (2002), 第2世代遺伝子組換え作物開発の現状, 農業技術, 57, 289-294.
- 6) 高岩文雄, 多田欣史 (2002), 種子を利用した組換えタンパク質生産システムの開発, 育種学研究, 4, 33-42

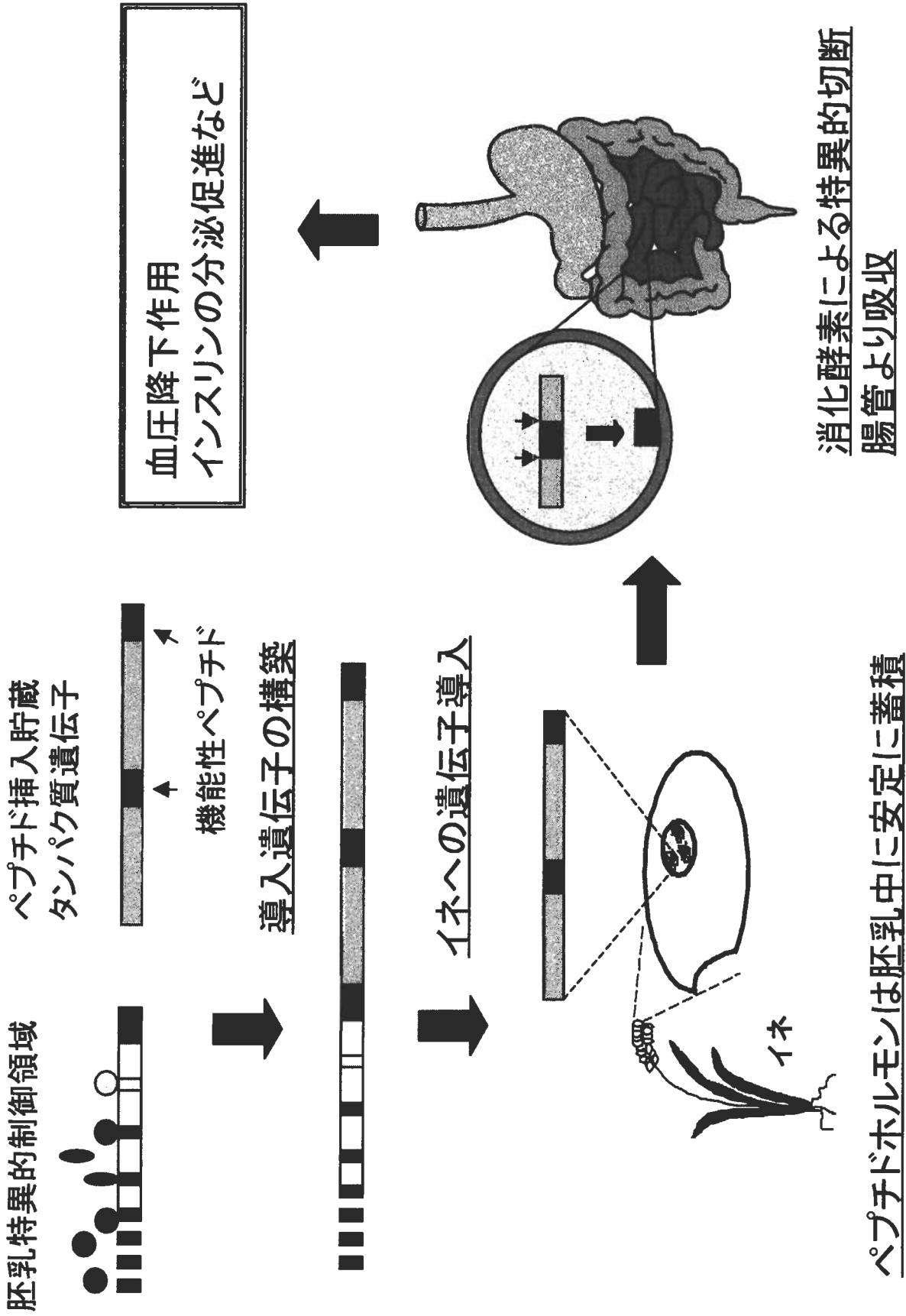
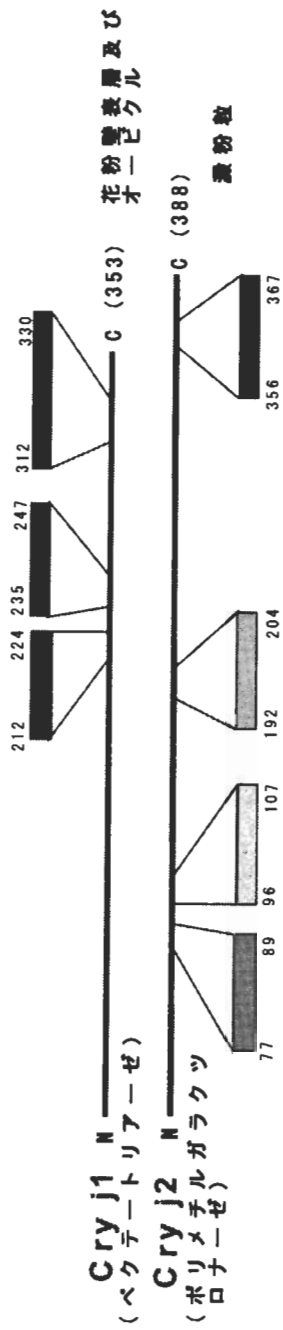
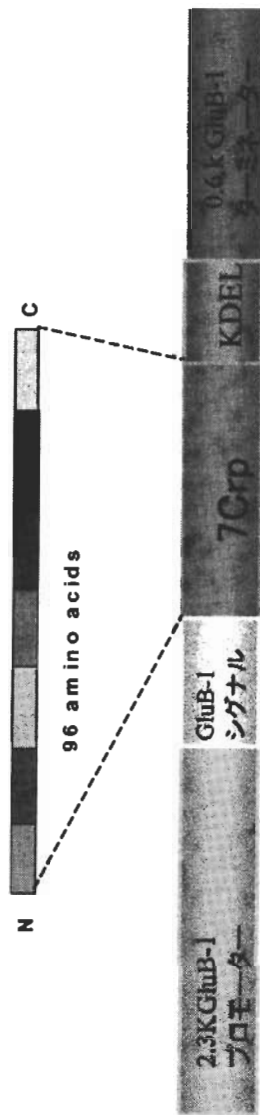


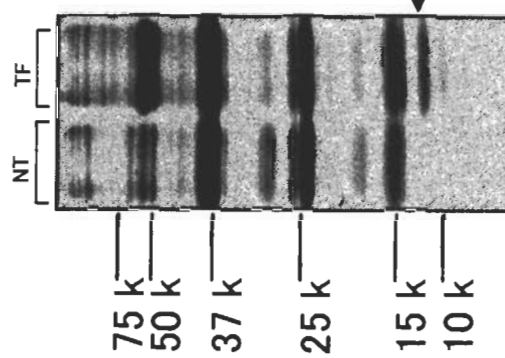
図1. 機能性ペプチドを種子中に安定的に集積させる技術



7crp (ヒト7連結T細胞エピトープ)



CBB 染色



ウイスタン

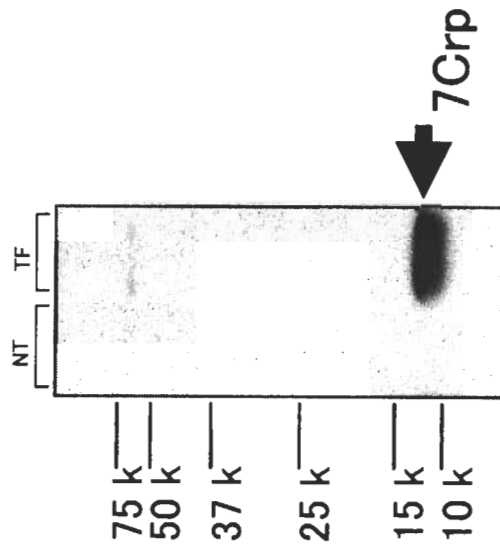


図2. ヒトの主要なスギ花粉アレルゲンエピトープの位置と7個のエピトープを連結した7Crp遺伝子を導入したイネ種子中での発現パターン

正常個体

突然変異体

正常個体への
遺伝子導入

突然変異体への
遺伝子導入

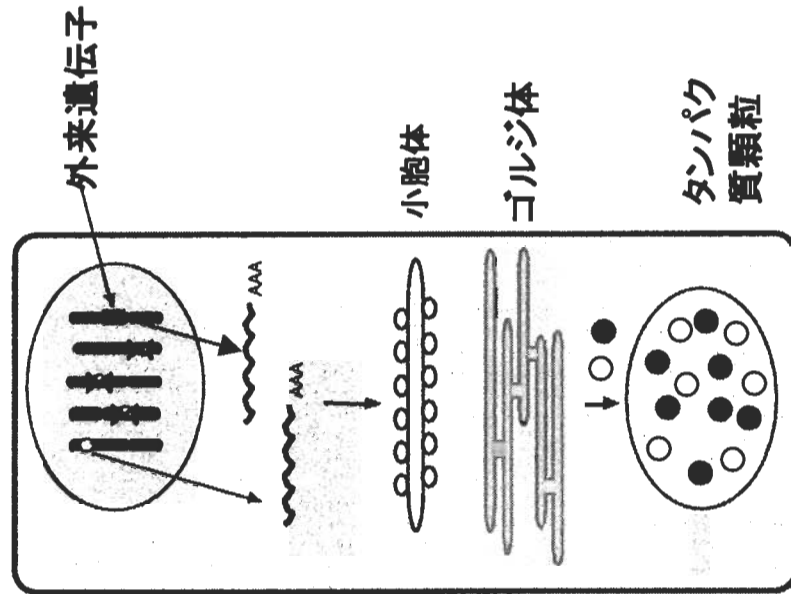
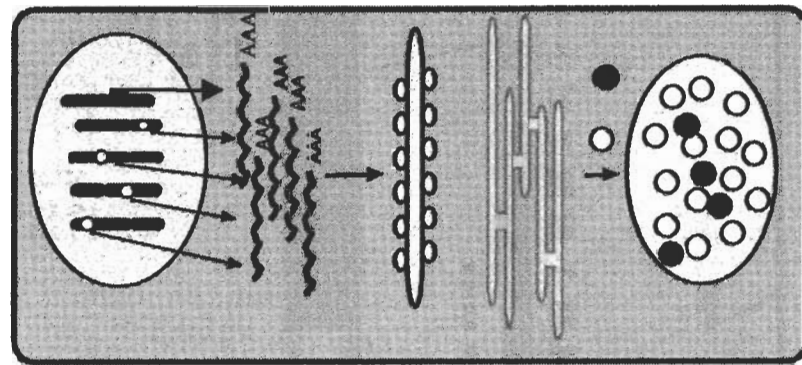
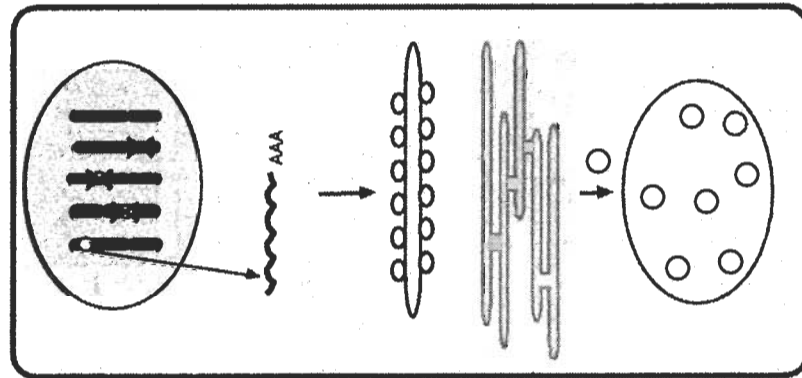
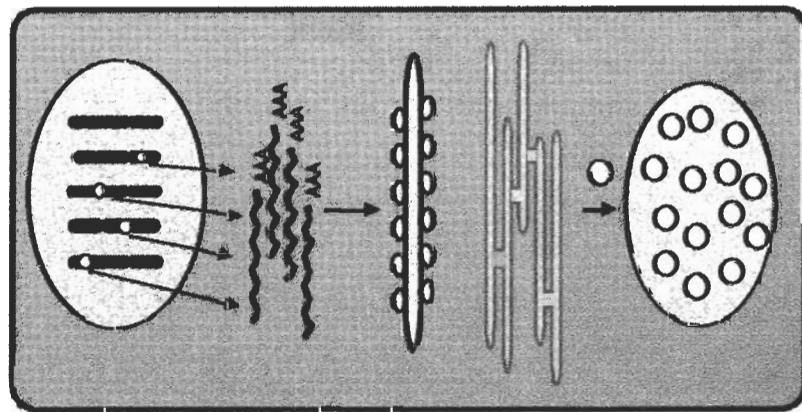


図3. 突然変異体を利用した高度集積

表 1. 健康機能性米の開発現状

目的	導入遺伝子産物	発現レベル
○ <u>生活習慣病予防</u>		
血清コレステロール値低下機能	ダイズグリシニン	種子タンパク質の 8~10%
糖尿病予防		
インスリン分泌促進	ヒト GLP-1 (グロブリンに挿入)	種子タンパク質の約 3%
高血圧予防		
血圧低下機能	卵白改変オボキニペンペプチド (グルテリンに挿入)	種子タンパク質の 0.4~0.6%
肥満・内臓脂肪防止	機能性共役脂肪酸 (共役リノール酸、共役リノレン酸) コンジュゲース、イソメラーゼ	種子脂肪酸の約 4%
貧血予防	ダイズフェリチン鉄貯蔵タンパク質	種子タンパク質の 0.3%
腎臓病対策	グルテリンアンチセンス	グルテリン約 30%程度に減少
○ <u>免疫系改善・感染症予防</u>		
スギ花粉症緩和	スギアレルゲン特異的 T 細胞抗原決定基(7crp)	種子タンパク質の 2~3%
ハウスダストアレルギー緩和	ダニアレルゲン特異的 T 細胞抗原決定基 ダニアレルゲン部分配列	
米アレルギー予防	16kDa アレルゲンアンチセンス	16 k Da アレルゲン約 20%程度に減少
抗菌・免疫賦活作用	ヒトラクトフェリン	種子タンパク質の約 1%
コレラ予防	コレラ菌毒素 B 鎖(CT-B)	種子タンパク質の約 2%