

| | | | | | |
|------|--|-------------|---|-----------------------------------|-----|
| 環境浄化 | 多剤排出型輸送体 (MATE : Multidrug And Toxin Extrusion) タンパク質 (オオムギ由来) | 植物 | グ オオムギ由来 MATE 導入により、アルミニウム誘導性のクエン酸輸送が活性化。 | 日・岡山大学 | 168 |
| 環境浄化 | 液胞ピロホスファターゼ | 植物 | Vacuolar pyrophosphatase (AVP1) : 耐塩性、土壌中リン取り込み量増加 | 米 | 169 |
| 環境浄化 | ヒ酸還元酵素 (ACR2、植物由来)、フィトケラチン生合成酵素 | 植物 | ヒ酸還元酵素 (ACR2、植物由来) 導入により、重金属耐性あるいは重金属を蓄積しない GM 植物の作出について記載。また、ヒ酸還元酵素 (ACR2、植物由来) 一植物発現調節配列一微生物由来フィトケラチン生合成酵素による GM 植物の作出についても記載。 | 米・マサチューセッツ大学 | 170 |
| 環境浄化 | 多剤耐性関連タンパク質 (MRP) (FeMPR3、ソバ由来) | シロイヌナズナ | FeMPR3 導入植物は、選択的に鉛を蓄積したが、カドミウムや酸化クロムは蓄積しなかった。この植物は土壌中の重金属除去に有効である。 | 日・中部電力&三重大学 | 171 |
| 環境浄化 | エンハンサー-Ac/Ds トランスポゾン | シロイヌナズナ | 土壌中のポリ塩化ビフェニル (PCBs) 除去 (アクチベーションタグにより、特定の遺伝子の機能を強化した組換え体を作成し、PCBs 分解能が向上した植物体を得る) | 日・麻布大学 | 172 |
| 環境浄化 | リグニン分解酵素 (白色腐朽菌由来) | シロイヌナズナ | 白色腐朽菌由来リグニン分解酵素遺伝子の導入により、土壌中のポリ塩化ビフェニル (PCBs) を除去する植物を作成 | 日・麻布大学 | 172 |
| 環境浄化 | Bowman-Birk プロテアーゼインヒビター (CjBBI、オウレン由来) | シロイヌナズナ、タバコ | 土壌中のカドミウム及び有機化合物除去 | 日・京都大学 | 173 |
| 環境浄化 | クエン酸合成酵素 (タバコ由来) | タバコ | クエン酸合成酵素産物のクエン酸は、細胞内、根から土壌中に放出されて土壌中のアルミニウムイオンとキレートを生成し、高レベルのアルミニウムの毒性を軽減する。光誘導性プロモーター (ルビスコモルサブユニット) による酵素タンパク質の発現は、非組換え植物の 1-1.5 倍で、GM 植物はより多くの有機酸を放出し、根の生育も良く、100-300 μ M のアルミニウムストレス下でも耐性を示した。 | 中・昆明理工大学 | 174 |
| 環境浄化 | 白色腐朽菌由来ラッカーゼ | タバコ | 白色腐朽菌由来ラッカーゼ (scL) の cDNA の CpG-ジヌクレオチドを 1.2% に低下させた scK12 遺伝子をタバコに導入したところ、scL 導入植物および野生型植物に比べて高いラッカーゼ活性が認められ、トリクロロフェノールを除去することが出来た | 日・静岡大 | 175 |
| 環境浄化 | 細菌由来無機水銀還元酵素 (merA and merB) | タバコ (葉緑体) | 組換え体は、非組換え体に比べ 100 倍の水銀耐性を示し、無機水銀、有機水銀どちらに対しても耐性を示した | 米・University of California | 176 |
| 環境浄化 | リン酸飢餓応答転写因子 PHR1 (シロイヌナズナ由来) | トレニア | 水中のリン酸イオン除去 | 日・サントリー | 177 |
| 環境浄化 | アグロバクテリウムトリプトファンモノオキシゲナーゼ (iaaM)、1-アミノシクロプロパンデアミナーゼ (ACC) | ベチュニア、タバコ | 木部特異的高グリシンタンパク質プロモーター制御下で iaaM 遺伝子を単独導入あるいは CaMV35S プロモーター制御下の ACC 遺伝子共に導入した植物を作成した。両方の遺伝子を発現させたベチュニアは 7.5mg/l の CoCl ₂ 存在下でも発根した。形質転換タバコ T1 植物は、Cu ²⁺ および Co ²⁺ を含む砂で生育し、部位特異的プロモーターで両方の遺伝子を発現させたタバコの方が生育が早く、バイオマスも増大し、より多くの重金属を蓄積した。また、この植物は、無機環境汚染物質だけでなく、有機環境汚染物質存在下でも生育が可能であった。 | 中・The Chinese Academy of Sciences | 178 |

表 13. 2006-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等

| 国名 | 機能性食品・嗜好品 | 経口ワクチン | 食用医薬 | ワクチン抗原 | 抗体医薬 | 治療薬 | 診断薬・試薬 | 環境浄化 | 合計 |
|---------|-----------|--------|------|--------|------|-----|--------|------|-----|
| 米国 | 11 | 8 | | 12 | 6 | 9 | 2 | 3 | 51 |
| カナダ | | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6 |
| メキシコ | | 2 | | | | | | | 2 |
| 英国 | 2 | | | | 2 | 1 | | | 5 |
| フランス | 1 | 1 | | | | 1 | | | 3 |
| ドイツ | 7 | | | | 2 | | | | 9 |
| オーストリア | | | | | 1 | | | | 1 |
| オランダ | | | | | 4 | | | | 4 |
| ベルギー | | | | | 1 | | | | 1 |
| イタリア | | | | 1 | | 1 | | | 2 |
| ギリシャ | | | | | 1 | | | | 1 |
| スペイン | | 1 | | | 2 | | | 1 | 4 |
| フィンランド | | | | | | 1 | | | 1 |
| ハンガリー | | | | | 1 | | | | 1 |
| ロシア | | 1 | | | | | | | 1 |
| イラン | | | | | 1 | | | | 1 |
| ヨルダン | | | | | | 1 | | | 1 |
| イスラエル | | | | | | 1 | | 1 | 2 |
| 南アフリカ | | | | 2 | | | | | 2 |
| インド | 1 | | | 1 | | | | 1 | 3 |
| オーストラリア | 2 | 1 | | | | | | | 3 |
| 韓国 | 1 | 4 | | | | 2 | | | 7 |
| 台湾 | | 2 | | | | | | | 2 |
| 中国 | 5 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 21 |
| 日本 | 14 | 6 | 8 | 2 | | 3 | 1 | 11 | 45 |
| 合計 | 44 | 35 | 9 | 20 | 23 | 22 | 5 | 21 | 179 |

環境浄化は 2007 年以降

表 14. 2006-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等

(作物別集計)

| 種別 | 作物 | 機能的食品・嗜好品 | 経口ワクチン | 食用医薬 | ワクチン抗原 | 抗体医薬 | 治療薬 | 診断薬・試薬 | 環境浄化 | 合計 |
|-------|---------------------|-----------|--------|------|--------|------|-----|--------|------|----|
| 食用 | アルファルファ | | 2 | | | | | | | 2 |
| | イチゴ | 1 | | 3 | | | | | | 4 |
| | イネ | 7 | 3 | 4 | 1 | | 1 | 2 | | 18 |
| | オオアラセイトウ | 1 | | | | | | | | 1 |
| | オオムギ | | | | | | 1 | | | 1 |
| | カラシナ | 1 | | | | | | | 1 | 2 |
| | クレソン | 1 | | | | | | | | 1 |
| | コムギ | 3 | | | | | | | | 3 |
| | サツマイモ | 1 | 1 | | | | | | | 2 |
| | サトウキビ | 1 | | | | | | | | 1 |
| | ジャガイモ | 1 | 3 | | | | | | | 4 |
| | ダイズ | 2 | | | | | | 1 | | 3 |
| | テンサイ | 1 | | | | | | | | 1 |
| | トウモロコシ | 2 | 3 | | | 3 | | 1 | | 9 |
| | トマト | 3 | 8 | | | 1 | | | | 12 |
| | ナタネ | 2 | | | | | | | | 2 |
| | ニンジン (細胞含む) | 1 | 2 | | | | | 1 | | 4 |
| | ハツカダイコン | | 1 | | | | | | | 1 |
| | 穀類 | 1 | | | | | | | | 1 |
| | 油糧作物 | 2 | | | | | | | | 2 |
| ラッカセイ | 1 | | | | | 1 | | | 2 | |
| リンゴ | 1 | | | | | | | | 1 | |
| レタス | 2 | 4 | 1 | | | | | | 7 | |
| 非食用 | ウキクサ | | | | | 2 | 1 | | | 3 |
| | ケシ | | | | | | 1 | | | 1 |
| | シダ | | | | | | | | 1 | 1 |
| | シバ | | | | | | | | 1 | 1 |
| | シャリンバイ | | | | | | | | 1 | 1 |
| | シロイヌナズナ | 3 | 2 | | | 1 | 1 | | 4 | 11 |
| | タバコ (ウイルススペクター含む) | 5 | 7 | | 16 | 13 | 12 | 2 | 5 | 60 |
| | タルウマゴヤシ | 1 | | | | | | | | 1 |
| | トレニア | | | | | | | | 1 | 1 |
| | 植物 (細胞、ウイルススペクター含む) | 3 | 3 | 1 | 3 | 2 | 4 | 2 | 8 | 26 |
| | ハルザキヤマガラシ | 1 | | | | | | | | 1 |
| | ヒカリツメゴケ | | | | | 1 | | | | 1 |
| | ペチュニア | 1 | | | | | | | 1 | 2 |
| | ミヤコグサ | | 1 | | | | | | | 1 |
| | レンギョウ | 1 | | | | | | | | 1 |
| 合計 | 50 | 40 | 9 | 20 | 23 | 24 | 7 | 23 | 196 | |

環境浄化は 2007 年以降

同じ論文に複数の作物が使用されたものは個別に集計したため、表 13 より件数が多くなっている。

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究
遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究（1）

研究分担者 小関 良宏 東京農工大学工学部 教授

研究要旨

今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とし、栄養改変型遺伝子組換えコメ、ダイズ、また、遺伝子組換えアマゴおよび遺伝子組換えニワトリを用いて、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体における遺伝子発現の変化についてトランスクリプトーム解析を用いた安全性評価の可能性を探った。ダイズ、アマゴについては問題なくトランスクリプトームに供することができるだけの RNA が抽出されたが、コメやニワトリ各組織から RNA 抽出を行ったところ RNA の分解が認められた。このことから材料によっては流通に回った可食部からはトランスクリプトーム解析に用いることができる品質の RNA が得られないことが明らかになった。しかし、材料採取の際に時間をおかず直ちに急速冷凍したサンプルを用いることで、マイクロアレイに供する純度の RNA が抽出できることが分かった。遺伝子組換えダイズ、アマゴ、ニワトリ各組織を用いた遺伝子発現解析の結果、遺伝子組換え体と非組換え体において各組織間の発現プロファイルに顕著な差は認められず、遺伝子組換えによって遺伝子発現が大きく異なる可能性は低いことが示された。

研究協力者

佐々木伸大（東京農工大学大学院・共生科学技術
研究院・生命機能科学部門）

A. 研究目的

近年、遺伝子組み換え農作物は栄養改変・付与といった第 2 世代の物が実用化されつつある。これらの第 2 世代の組み換え農作物では代謝プールを変動させるような組み換えを行うため、その影響で宿主の遺伝子発現の変動、それに伴う発現タンパク質の変動、更に意図しなかった宿主の代謝プールの変動が想定される。その為、これらの遺伝子組換え食品では、遺伝子発現、タンパク質、代謝物について標的を定めずに一斉解析を行う必要がある。また最近では、遺伝子組換え農作物は植物のみならず、畜産物についても実用化に向けて研究がなされている。特に遺伝子組換え魚や、遺伝子組換えニワトリが実用化を目指して研究されている。そこで、本研究では 2 種類の栄養改変遺伝子組換え農作物である、高トリプトフ

アン米とアラキドン酸合成ダイズの食用部である種子、ならびに 2 種類の遺伝子組換え動物である、ベニザケ成長ホルモン遺伝子を導入したアマゴ、緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した遺伝子組換えニワトリの可食部を材料として、プロテオーム及びメタボローム解析による遺伝子発現の分析の可能性を検討するために、その第一段階にあたるトランスクリプトーム解析についての検討を行い安全性評価の可能性を探った。

B. 研究方法

<試料>

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所稲遺伝子技術研究チームより供与された遺伝子組換えイネの種子と比較対照用原種として日本晴の種子、サントリー株式会社研究センター田中良和博士より供与された遺伝子組換えダイズと宿主の非組換えダイズ、農水省水産総合研究センターより供与された遺伝子組

換えアマゴと1齢と2齢の非遺伝子組換えアマゴ、および広島大学大学院生物圏科学研究科堀内浩幸助教より供与された遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリより摘出された胃、肝臓、表皮、筋肉を材料として用いた。

<方法>

アマゴからの RNA 抽出

アマゴ背肉約 0.5 g を乳鉢を用いて液体窒素中でパウダー状になるまで磨砕し、液体窒素が蒸発しきったところで、5 ml の TRIzol 溶液を加えてよく混合してから、室温で5分間静置した。遠心して上清を新たな試験管に移し 1 ml のクロロホルムを加えてよく混合し、3分間室温に静置した。15,000xg、10分間遠心した後、上層を新たな試験管に移し、0.5容のイソプロパノールを加えてよく混合した後、15,000xg で15分間遠心して RNA を沈殿させた。沈殿した RNA を 1 ml の 70% エタノールで洗浄した後風乾した。沈殿した RNA を RNeasy mini kit (キアゲン社) を用いて精製した。方法はキットのマニュアルに従った。

コメからの RNA 抽出

コメ約 1 g を液体窒素中で破砕機(安井器械)を用いてパウダー状になるまで破砕した後、10 ml の抽出バッファー (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2, 150 mM NaCl, 1% SDS) の入っている試験管に移し入れた。更に平衡化フェノール (pH 8.2) -クロロホルム液 (Phe/Chl) を 10 ml を加えて激しく攪拌した。1,800 x g で15分間遠心して上清を新たな試験管に移した。下層に 3 ml の抽出バッファーを加えてよく混合し、1,800 x g で15分間遠心してその上清を先の上清と合わせて 10 ml の Phe/Chl を加えてよく混合した。4,000 x g、10分間遠心した後、上層を新たな試験管に移し、Qiagen DNA/RNA カラムにチャージした。QW バッファー 3 ml、3回で洗浄した後、QRU バッファーで RNA を溶出した。溶出した RNA 溶液に等容の 2-プロパノールを加えて混合し、20,000 x g 15

分間の遠心で RNA を沈殿させた後風乾した。低分子の RNA を除去するため沈殿した RNA を RNeasy カラムを用いて精製した。

ダイズからの RNA 抽出

ダイズからの RNA 抽出は RNeasy Plant mini kit を用いて行い、その方法はマニュアルに従った。

ニワトリ各組織からの RNA 抽出

凍結したニワトリ各組織約 0.2~0.5 g (生重量) を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中でパウダー状になるまで磨砕し、50 ml 遠沈管に移してから -80°C で液体窒素を完全に気化させた。そこに 5 ml のセパゾールスーパー (ナカライテスク社) を加えてよく混合してから室温で5分間静置した。さらに 1.6 ml のクロロホルムを加えてよく混合し、室温で3分間静置した後に、7,500 x g で15分間遠心して上層を新たな遠沈管に移した。そこに等容の 2-プロパノールを加えて混合し室温で10分間静置してから 20,000 x g で10分間遠心分離を行い RNA を沈殿させた。沈殿を 70% 冷エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた RNA を RNeasy カラム (キアゲン社) を用いて精製した。

DNA マイクロアレイ解析

アマゴとコメの遺伝子発現解析にはジーンフロンティア株式会社の DNA マイクロアレイ解析サービス “なんでもアレイ” を利用した。アマゴ背肉の遺伝子発現についてはアマゴの DNA チップは存在しなかったため、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) のものを用いた。ダイズ、ニワトリの遺伝子発現解析はクラボウ社の “GeneChip® Expression Array 受託解析サービス” を利用した。

C. 結果 および D. 考察

C-1. 遺伝子組換え農作物からの RNA 抽出

アマゴ背肉からの RNA 抽出は、最も汎用的な方法である GTC/塩化セシウム密度勾配超遠心法では、油脂分が多く抽出が困難であったが、TRIzol Reagent と RNeasy Plus Kit を組み合わせて用い

ることで DNA マイクロアレイに供するのに十分な純度の RNA を抽出することができた。収量はアマゴ背肉約 0.5 g あたり、total RNA 約 60~120 μ g であった。

コメからの RNA 抽出は SDS-フェノール法とイオン交換カラムを用いることで効率よくマイクロアレイ解析に十分な純度で精製することが可能であった。しかしながら、マイクロアレイ解析に供するのに十分な純度の RNA を獲得できなかったため、poly(A)⁺ RNA を精製し、マイクロアレイ解析に供した。玄米では約 7 g の試料から約 4 μ g の mRNA が、白米では 11 g の試料から約 3 μ g の mRNA が抽出された。

遺伝子組換えコメ HW-5 系統とそのホストである“日本晴れ”の玄米を上記の方法で RNA 抽出を行い、RNA の純度をチップ電気泳動装置で解析した。その結果、独立に抽出を行った前サンプルについて RNA の分解が見られ、マイクロアレイ解析に供するのに十分な品質の RNA を得ることができなかった。今後、遺伝子組換えコメについて遺伝子発現等の解析を行う場合、サンプルの収穫時期、保存方法が重要であることが示唆された。

組換えダイズ、非組換えダイズ 4 粒ずつを破碎し、3 等分して、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析に供した。ダイズからの RNA 抽出には RNeasy kit を用いた。終了は total RNA はダイズ種子およそ 100 mg から約 11~36 μ g であった。

組換えニワトリ、非組換えニワトリの筋肉・胃・表皮・肝臓から抽出した RNA は分解が認められ、マイクロアレイ解析に供することができないことが判明した。そこで、新鮮な材料を可能な限り速やかに液体窒素で凍結したものを新たにサンプルとして RNA 抽出を行ったところ、表皮以外ではマイクロアレイ解析に十分な純度で精製することができた。RNA の収量は、湿重量 0.2~0.5g 程度の試料から 5~25 μ g 程度であったが、これは RNeasy カラムにアプライできる

量が限られているためであり、実際の組織内の RNA 量はさらに数倍存在していると思積られる。マイクロアレイ解析等の高感度分析以外の実験に供する場合にはカラムを複数使用する等の工夫をすることで材料を増やすことなく高収量を得られると考えられた。また、ニワトリ各組織からの RNA を分解されること無く抽出するためには新鮮な組織を解体後速やかに急速冷凍することが肝要であると思われた。そのため、ニワトリのトランスクリプトーム解析を行うには、屠殺後の時間の過ぎた市販の鶏肉や臓器を材料として供することは RNA の十分な品質を確保できず困難であると考えられた。

C-2. 遺伝子組換えアマゴを用いたトランスクリプトーム解析

アマゴ非組み換え体 1 年齢を基準として非組み換え体 2 年齢と、組み換え体 1 年齢について DNA マイクロアレイで得られたシグナルをスクエアープロットによって解析したが、いずれの比較においても大きな差異は見出されなかった。また、非組み換え体 2 年齢と組み換え体の発現プロファイルについても同様に解析を行ったが、有意な差異は見出されなかった。また、非組み換え体 1 年齢の遺伝子発現量と比較して 1.5 倍以上であった遺伝子の数は、組み換え体では 302、非組み換え体 2 年齢では 271 で両方に共通していたものは 48 であり、全体の 1.5% 程度であった。また、遺伝子発現量が 0.66 倍以下であったものは組み換え体で 207、非組み換え体 2 年齢で 205、両方に共通のものは 44 であり、全遺伝子に占める割合は約 1.1% であった。これらの結果からも、特に発現に変化のある遺伝子に偏りは無く、組み換えた遺伝子によって遺伝子の発現が大きく変化していることは確認できなかった。

DNA マイクロアレイ解析は DNA チップとして魚類では最も研究が進んでおり、搭載遺伝子数も最も多いゼブラフィッシュのものを用いて行ったが、若干シグナルが弱めに検出されたが、

42,065 種すべての遺伝子のプローブにおいてシグナルが観測されており、統計学的な処理を行うに十分な情報量が得られたものと考えられる。このことは他の種の遺伝子組み換え魚においてもゼブラフィッシュのDNAチップを用いたトランスクリプトームの可能性を示唆している。また、トランスクリプトーム解析の結果、非組み換え体1年齢、2年齢、組み換え体1年齢の各個体間において遺伝子発現に有意な差異は認められなかった。今回用いた検体は1年齢と2年齢の2種類の魚齢についてのみであったが、他の発達段階や他の部位、組織についての解析の必要性についても示唆された。

本研究において遺伝子組み換え魚の一例としてアマゴを用いてトランスクリプトーム解析を行い、その条件等について十分に検討できたものと考えられた。

C-3. 遺伝子組換えコメを用いたトランスクリプトーム解析

玄米は1 μg ずつ3つに、白米は2つに分けてそれぞれをから cDNA を合成し、マイクロアレイ解析に供した。その結果、玄米検体間、白米検体間においては遺伝子発現について大きな差は見出されなかったが、玄米-白米間においては、発現している遺伝子が大きく異なることが示唆された。これは玄米と白米とでは胚乳、胚芽等、含まれる組織の割合が異なること、また、精米の際に発する熱が影響していることも考えられた。

C-4. 遺伝子組換えダイズを用いたトランスクリプトーム解析

組換えダイズ、非組換えダイズ4粒ずつを破碎し、3等分して、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析に供した。DNA マイクロアレイにより得られたシグナルから発現する遺伝子をスクATTERプロットによって解析した。その結果、発現量が低い遺伝子群については組換え体、非組換え体各個体間で発現量が分散する傾向が見られたが、発現量がある程度以上

では各個体間では有意な差は認められず、また、組換え体と非組換え体間を比較しても、特定の遺伝子の発現が有意に変化していることは確認できなかった。

C-5. 遺伝子組換えニワトリを用いたトランスクリプトーム解析

ニワトリ由来の転写産物約 33000 がスポットされたマイクロアレイを用いた解析では、まず、非組換えニワトリ、遺伝子組換えニワトリ各々で各組織ごとの発現量の比較を行った。筋肉-肝臓、筋肉-胃、肝臓-胃、それぞれの遺伝子の発現量をそれぞれ縦軸・横軸にとったスクATTERプロットによって解析したところ、各組織間では各遺伝子の発現量に相関が無いことが分かった。また、その結果は遺伝子非組換え体、組換え体のいずれのサンプルにおいても同様の傾向が見られた。

筋肉・胃・肝臓における組換えニワトリ、非組換えニワトリでの遺伝子発現のプロファイルをスクATTERプロットによって解析した。その結果、筋肉・胃・肝臓それぞれにおいて、発現量が低い遺伝子については分散する傾向が見られたが、発現量が中盤以上のものについては、有意な差は認められず、遺伝子組換えによる遺伝子発現の有意な変化は認められなかった。マイクロアレイ解析によってニワトリ各組織間の遺伝子発現量の差異を検討したところ、筋肉、胃、肝臓それぞれの遺伝子発現には明らかな相関は認められなかった。また、遺伝子発現の変化は各組織間で、組換え、非組換えにおいて非常に似通ったデータとなり、これらの発現量の違いは個体差よりも、組織間の差が検出されているものと考察された。遺伝子組換え・非組換えニワトリにおける遺伝子発現解析においては、各組織間で発現量が有意に異なる遺伝子はほとんど無かったが、今後、今回確立された方法をもとに検体数を増やして統計学的処理を行って検討するとともに、今回導入したGFP以外の遺伝

子が導入された検体についても評価していく必要があるものと考えられる。

E. 結論

遺伝子組換えアマゴ、コメ、ダイズ、ニワトリについて RNA 抽出を行ったが、コメについては収穫時期、保存方法を検討必要が示唆された。また、ニワトリについては市場に流通しているような材料からは高品質の RNA が抽出できないことが示された。そのため、遺伝子組換え作物でトランスクリプトーム解析を行う場合には材料の確保・保存について十分に検討する必要があると考えられた。

遺伝子組換え、非組換えのアマゴ、ダイズ、ニワトリ各組織から抽出した RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行い、対応する種において遺伝子発現を比較したが、いずれも、個体差あるいは組織間の差が大きく遺伝子を組換えることによって、遺伝子発現のプロファイルが大きく異なることは見出されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究
遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究（2）

研究分担者 小関 良宏 東京農工大学工学部 教授

研究要旨：

今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とし、栄養改変型遺伝子組換え植物である改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を導入した高トリプトファン含有イネおよび糸状菌由来の $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を導入したアラキドン酸蓄積ダイズ、ベニザケの成長ホルモンをコードする遺伝子を導入したアマゴおよび発光クラゲの蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリを用いて、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体における発現タンパク質の違いをプロテオーム解析により比較検討した。

協力研究者

佐々木和生（東洋大学生命科学部）

梅津博紀（岐阜聖徳学園大学短期大学部）

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められる一方、国際的な基準作りが進められている。バイオテクノロジーを応用した食品の中でも、特に、除草剤耐性、害虫抵抗性等の第一世代の遺伝子組換え作物の開発、作付けが米国を中心に進み、これら遺伝子組換え食品の国際的な流通が急速に広まっている。また、近年では、組換え微生物を利用した食品や組換え魚などの新たな遺伝子組換え食品や、食品の栄養成分を改変した遺伝子組換え食品の開発が進むとともに、とうもろこし等の作物を組換え、医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。わが国においては、平成 13 年 4 月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、最新の科学的知見に基づく審査を行うとともに、遺伝子組換え食品の表示について義務付けし、輸入時にモニタリング検査等を行っている。

このような状況の中、生産者のメリットを考慮した第一世代バイオテクノロジー応用食品に加え、消費者のメリットも考慮したモダンバイオテクノロジー応用食品についても実用化が現実のものとなりつつある現状に対応するため、本研究においては、今後実用化が見込まれる栄養改変し

た組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とした。本研究では、栄養改変型遺伝子組換え植物である改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を導入した高トリプトファン含有イネおよび糸状菌由来の $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を導入したアラキドン酸蓄積ダイズ、ベニザケの成長ホルモンをコードする遺伝子を導入したアマゴおよび発光クラゲの蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリの発現タンパク質の変化をプロテオーム解析によりプロファイリングすることを目的とし、それぞれの遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体を用いて、プロファイルの比較検討を行った。

B. 研究方法

<材料>

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所稲遺伝子技術研究チームより供与された遺伝子組換えイネの種子と比較対照用原種として日本晴の種子、サントリー株式会社研究センター田中良和博士より供与された遺伝子組換えダイズと宿主の非組換えダイズ、農水省水産総合研究センターより供与された遺伝子組換えアマゴと 1 齢と 2 齢の非遺伝子組換えアマゴ、および広島大学大学院生物圏科学研究科堀内浩幸助教より供与された遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリより摘出された胃、肝臓、表皮、筋肉を材料として用いた。

<方法>

タンパク質抽出

粉碎した種子に抽出バッファー (8M Urea, 4%(W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl, 1% Protease inhibitor mixture (GE Healthcare Biosciences)) を加え、10,000rpm で10分間遠心分離して上清を得た。得られた上清は再度15,000rpm で20分間遠心分離して、得られた上清を粗抽出物とした。

電気泳動用サンプル調製

粗抽出物を 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare Biosciences) を用いて精製した。精製後得られた沈殿を 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare Biosciences) に溶解し、限外濾過膜 (Microcon YM-10, Millipore) により低分子性物質を除去した。2-D Quant Kit によりタンパク質量を定量し、30・g 相当を電気泳動に供した。

電気泳動

・1次元目電気泳動 (IEF)

サンプルおよび 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare Biosciences) を用いて Immobiline DryStrip 3-10NL 18cm (GE Healthcare Biosciences) を膨潤させ、Ettan IPGphor II (GE Healthcare Biosciences) を用いて電気泳動した。500V で1時間、1000V で1時間通電した後、8000V で5時間30分泳動した。

・2次元目電気泳動 (SDS-PAGE)

IEF 終了後の Immobiline DryStrip は、SDS を含むバッファーで平衡化し、ExcelGel SDS XL Gradient 12-14 (GE Healthcare Biosciences) 上で、MultiPhor II (GE Healthcare Biosciences) を用いて泳動した。1000V 20mA で35分間通電した後、1000V 40mA で2時間40分間泳動した。

タンパク質の検出

PhastGel Silver Staining Kit (GE Healthcare Biosciences) を用いて銀染色によりタンパク質を検出した。染色後、ゲルを室温で乾燥させ、スキャナを用いてコンピュータに画像を取り込んだ。得られた画像は Image Master Platinum (GE Healthcare Biosciences) により画像解析を行った。

C. 研究結果

遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴのプロテオーム解析

遺伝子組換えアマゴと1齢および2齢の非遺

伝子組換えアマゴそれぞれ4個体を1つのグループとし、3つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

非遺伝子組換えアマゴのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、遺伝子組換えアマゴのグループと、非遺伝子組換えアマゴのグループ間で、89.5%のスポットが共通して検出され、残りの10.5%に相当するスポットが遺伝子組換えアマゴのグループのみで検出された。

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネのプロテオーム解析

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネそれぞれ3個体について、1次元目の電気泳動 (IEF) を同時に行い、2次元目の電気泳動 (SDS-PAGE) をそれぞれ個別に行い、可能な限り同じ条件で染色し、画像の取り込みを行った。遺伝子組換えイネ3個体と非遺伝子組換えイネ3個体をそれぞれ1つのグループとし、2つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

非遺伝子組換えイネのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、887個のスポットが非遺伝子組換えイネのグループのいずれかの個体で検出され、749個は複数の個体で共通して検出された。非遺伝子組換えイネのグループと遺伝子組換えイネのグループで共通して検出されたスポットは、89.9%に相当する797個であった。残りの10.1% (90個) は非遺伝子組換えイネのグループのみで検出された。また、遺伝子組換えイネのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、823個のスポットが遺伝子組換えイネのグループのいずれかの個体で検出され、672個は複数の個体で共通して検出された。遺伝子組換えイネのグループと非遺伝子組換えイネのグループで共通して検出されたスポットは、94.5%に相当する778個であった。残りの5.5% (45個) は遺伝子組換えイネのグループのみで検出された。

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズそれぞれ4個体について、1次元目の電気泳動 (IEF) を同時に行い、2次元目の電気泳動 (SDS-PAGE) をそれぞれ個別に行い、可能な限り同じ条件で染色し、画像の取り込みを行った。遺伝子組換えダイズ4個体と非遺伝子組換えダイズ4個体をそれぞれ1つのグループとし、2つのグ

グループ間のプロファイルの比較検討を行った。

非遺伝子組換えダイズのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、968個のスポットが非遺伝子組換えダイズのグループのいずれかの個体で検出され、881個は複数の個体で共通して検出された。非遺伝子組換えダイズのグループと遺伝子組換えダイズのグループで共通して検出されたスポットは、94.5%に相当する915個であった。残りの5.5% (53個) は非遺伝子組換えダイズのグループのみで検出された。また、遺伝子組換えダイズのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、1000個のスポットが遺伝子組換えダイズのグループのいずれかの個体で検出され、908個は複数の個体で共通して検出された。遺伝子組換えダイズのグループと非遺伝子組換えダイズのグループで共通して検出されたスポットは、93.4%に相当する934個であった。残りの6.6% (66個) は遺伝子組換えダイズのグループのみで検出された。

遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリのプロテオーム解析

遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリそれぞれ3個体より抽出された器官または組織より調製されたタンパク質抽出物について、1次元目の電気泳動(IEF)を同時に行い、2次元目の電気泳動(SDS-PAGE)をそれぞれ個別に行い、可能な限り同じ条件で染色し、画像の取り込みを行った。

ニワトリより抽出された、胃、肝臓、表皮、筋肉のサンプルの中で、再現性よくタンパク質の2次元電気泳動パターンが得られたのは、筋肉のサンプルだけであった。胃、肝臓および表皮のサンプルは、同じ条件でタンパク質を抽出しても得られる電気泳動パターンの再現性は低く、プロファイルの比較はできなかった。

再現性よく電気泳動パターンが得られた、筋肉のサンプルについて、遺伝子組換えニワトリ3個体のサンプルと非遺伝子組換えニワトリ3個体のサンプルをそれぞれ1つのグループとし、2つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

遺伝子組換えニワトリのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ(図1)、1059個のスポットが遺伝子組換えニワトリのグループのいずれかの個体で検出され、388個は遺伝子組換

えニワトリのグループ内の複数の個体で共通に検出された。非遺伝子組換えニワトリのグループと遺伝子組換えニワトリのグループで共通に検出されたスポットは、47.5%に相当する503個であった。残りの52.5% (556個) は、非遺伝子組換えニワトリのグループのみで検出された。また、非遺伝子組換えニワトリのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ(図2)、1215個のスポットが非遺伝子組換えニワトリのグループのいずれかの個体で検出され、364個は非遺伝子組換えニワトリのグループ内の複数の個体で共通に検出された。非遺伝子組換えニワトリのグループと遺伝子組換えニワトリのグループで共通に検出されたスポットは、44.4%に相当する539個であった。残りの55.6% (676個) は非遺伝子組換えニワトリのグループのみで検出された。

D. 考察

遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴのプロテオーム解析

遺伝子組換えアマゴは、サケの成長ホルモンを導入することにより、発達ステージが非遺伝子組換えアマゴとは大きく異なっているため、発達ステージが1歳や2歳といった限られたアマゴとの比較だけでは、中間的な発達ステージに特異的なタンパク質を見落としてしまう可能性がある。よって、本研究では、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間で10.5%のタンパク質の差を検出したが、これらが遺伝子を組換えることにより、新たな遺伝子発現を誘発して生じた差であるとは結論づけることはできない。より詳細なプロファイリングをする必要があると考えらる。

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネのプロテオーム解析

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネの間で、10%程度のグループ特異的なスポットが検出されたが、このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要がある。しかし、それぞれのグループ内では、10%程度のスポットが同じグループ内で共通に検出されておらず、これらは個体差を反映するスポットであると考えられるため、グループ特異的なスポットとして検出されたタンパク質も、個体差を反映している可能性が高いと考えられる。よって、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を組換えることにより、高トリプトフ

アンを含有するイネにおいて発現するタンパク質には、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットのタンパク質を除いて、個体差によって生じる以上の変化は起こっていないことが示唆される。

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズの間で、5%程度のグループ特異的スポットが検出されたが、このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要がある。しかし、それぞれのグループ内では、10%程度のスポットが同じグループ内で共通に検出されておらず、これらは個体差を反映するスポットであると考えられるため、グループ特異的スポットとして検出されたタンパク質も個体差を反映している可能性が高いと考えられる。よって、糸状菌由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を組換えることにより、アラキドン酸を蓄積するダイズにおいて発現するタンパク質には、糸状菌由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素のタンパク質を除いて、個体差によって生じる以上の変化は起こっていないことが示唆される。

遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリのプロテオーム解析

今回の研究に用いた、ニワトリより摘出された、胃、肝臓、表皮、筋肉のサンプルにおいて、筋肉では再現性のある泳動パターンが得られたが、胃、肝臓および表皮については、泳動パターンの再現性は低い結果となった。これは、器官または組織に含まれるタンパク質分解酵素によるタンパク質の分解や器官または組織からのタンパク質の抽出効率が影響した結果であると考えられる。今後、これらの器官または組織については、タンパク質の抽出法の改良を行う必要がある。

筋肉のサンプルについて、遺伝子組換えニワトリまたは非遺伝子組換えニワトリのグループ内で、いずれかの個体間で共通に検出されたスポットは、40%程度であり、同じグループ内においても、検出されるタンパク質について、大きな個体差があると考えられる。個体差を小さくするには、個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要がある。一方、遺伝子組換えニワトリのグループと非遺伝子組換えグループ間では、共通に検出されるスポットは45%程度であり、若干ではあるが、グループ内で共通に

検出されるスポットの割合を上回る結果を得た。これは、比較に用いた個体数が、グループ内では3個体であるが、グループ間では6個体のデータを解析に用いるために、個体差が僅かに圧縮されたことによると考えられる。よって、遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリのプロファイルと比較するには、個体数を増やして検討することが必要である。また、今回の結果より、遺伝子を組換えることにより、個体差によって生じる以上の変化は起こっていないことが示唆される。

E. 結論

遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴのプロテオームによるプロファイルの比較検討を行ったが、遺伝子組換えアマゴにおいて遺伝子を組換えることにより新たな遺伝子発現が起こっていることを明確に示す結果は得られなかった。

栄養改変型の遺伝子組換え植物について、プロテオームによるプロファイルの比較検討を行ったが、遺伝子組換え植物において、導入遺伝子の発現タンパク質を除いて、個体差以上の発現タンパク質の変化は起こっていないと考えられる。

遺伝子組換えニワトリについて、プロテオームによるプロファイルの比較検討を行ったが、個体数を増やして、より詳細に解析する必要があるものの、個体差によって生じる以上の変化を検出することはできなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

佐々木和生、梅津博紀、山川隆、太田大策、小関良宏「プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用 3. 組換えダイズと非組換えダイズのプロファイルの比較」日本食品化学学会第12回学術大会、名古屋、2006年6月。

佐々木和生、梅津博紀、太田大策、名古屋博之、佐々木伸大、小関良宏「遺伝子組換え体の安全性評価へのポストゲノム手法の応用 1. プロファイリング技術による遺伝子組換え魚の非意図

的影響の評価」日本食品化学学会第 13 回学術大会、東京、2007 年 6 月。

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

平成 18～20 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」
総合研究報告書（平成 18～20 年度：分担）

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究 遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究（3）

研究分担者 小関 良宏 東京農工大学工学部 教授

研究要旨

遺伝子組換えによる食品素材中の栄養素の増減、あるいは有害成分蓄積などを判別するための基礎データ取得を目指して、遺伝子組換えと非組換えのアマゴ、イネ種子（コメ）およびニワトリ肉の非タンパク性成分（代謝成分）の総和（メタボローム）をメタボロミクスによって比較・検討した。本研究では、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析装置（FT-ICR/MS）による高分解能マススペクトル測定によって代謝成分の一斉分析を行った。FT-ICR/MS 法では、試料抽出物を未精製のまま一斉分析することが出来るため、食品の安全性評価のためのメタボローム情報を迅速に取得することが可能である。

平成 18 年度は、遺伝子組換えアマゴ（1 年齢）と非組換えアマゴ（1 年齢、2 年齢）について、代謝成分抽出法、FT-ICRMS 分析、マススペクトルデータ（質量数と各ピーク強度）の高速処理と多変量解析の実験系を整備し、各試料のメタボロームを比較した。組換え、非組換えによるメタボロームの差は見られなかったが、1 年齢の組換えアマゴと 2 年齢の非組換えアマゴのメタボロームに類似性が認められたことから、遺伝子組換えによる成長促進の結果と推察された。平成 19 年度は、遺伝子組換えイネ〔トリプトファン（Trp）高含有米、HW-5 系統〕と非組換えイネ（日本晴）を供試し、代謝成分抽出法、FT-ICRMS 分析、多変量解析による実験系によってメタボロームを比較した。主成分分析では、明確に異なるメタボロームクラスターが形成されたが、HW-5 のメタボロームデータから Trp と Trp 付加イオンを除いて解析を行ったところ HW-5 と日本晴のメタボロームに差異は認められず、今回の分析条件下では、遺伝子操作によって意図的に増加させた Trp 以外には、HW-5 と日本晴の間には顕著な差がないことがわかった。平成 20 年度は、遺伝子組換えニワトリ肉（GM）と非組換えニワトリ肉（nonGM）について、代謝成分抽出法、FT-ICR/MS 分析、マススペクトルデータ（質量数と各ピーク強度）の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。GM と nonGM の筋肉組織中のメタボロームクラスターには顕著な差はなかったが、表皮組織抽出液の分析では、脂質組成の差に由来するメタボロームの相違が見られた。

協力研究者

太田大策（大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科）

A. 研究目的

遺伝子組換え技術によって様々な生物に有用形質を導入することが可能である。遺伝子組換え技術を使用した生物機能改変技術は、食料品

への応用に留まらず、工業原料の生産や地球温暖化対策のための重要基盤技術として、今や必須の役割を担っていると言える。このような背景において、遺伝子組換え技術を使用して作出・生産された食品の安全性に関する科学的実証データの集積は、社会的に重要な課題の一つであり、遺伝子組換え作物の実質的同等性の確認を目的とした様々な分析が行われてきている。導入遺伝子の塩基配列由来のタンパク質において毒性やアレルギー性が無い事は当然のこととして、遺伝子組換え体と非組換え体の間で遺伝子発現の様相(トランスクリプトーム)やタンパク質の種類・量(プロテオーム)に変化が生じていないか、さらに遺伝子組み換え操作によって非タンパク性成分(代謝成分=メタボローム)の種類や量に差異が生じることがあるかどうかについても検討が加えられる必要がある。本研究では、遺伝子組換えと非組換えのアマゴ、イネ種子(コメ)およびニワトリ肉の低分子有機化合物成分組成(メタボローム)をメタボロミクスによって比較・検討した。

B. 研究方法

<試料>

遺伝子組換えアマゴ(1年齢、5検体)と非組換えアマゴ(1年齢 5検体、2年齢 5検体)の背肉部分、Trp含量の増大を目的として作出された遺伝子組換えイネ(HW-5系統)から収穫された玄米と非組換えイネ(日本晴)から収穫された玄米、および遺伝子組換えニワトリ肉と非組換えニワトリ肉(モモ肉、表皮)を供試した。

<方法>

試料抽出物の調製

アマゴ背肉を液体窒素により凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。2 ml のメタノールを加え、さらに磨砕した後、フィルター(Advantec,

DISMIC-13JP, pore size; 0.2 μ m) 濾過して粗抽出液とした。玄米は液体窒素により凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。2 ml のメタノールを加え、さらに磨砕した後、フィルター濾過して粗抽出液とした。ニワトリ組織は液体窒素により凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。組織5倍容のメタノールを加え、さらに磨砕した後、フィルター濾過して粗抽出液とした。

これらの粗抽出液を蒸発乾固した後、溶媒(50% (v/v) アセトニトリル / 水)に溶解した。LC/MS 分析にはこの溶液に 0.1% (v/v) ギ酸を加えたものをサンプルとした。FT-ICR/MS 分析には、陽イオン測定時には 0.1% (v/v) ギ酸を含む 50% (v/v) アセトニトリルで 10 倍希釈、陰イオン測定時には 0.1% (v/v) NH_4OH を含む 50% (v/v) アセトニトリルで 100 倍希釈したものをを用いた。質量補正のため内部標準物質としてリドカイン(MW 234.34)とレゼルピン(MW 608.69)を用いた。これらの内部標準は、陽イオン測定時には 1 μM 、陰イオン測定時には 10 μM の濃度にて添加した。

質量分析実験調製した各サンプル溶液は、7 テスラの超伝導磁石を備えた FT-ICR/MS (Varian 社製) 分析と LC-Linear-Trap-TOF/MS (Hitachi) に供した。

FT-ICR/MS

Needle voltage; 3000 V, Capillary DC; 75 or -75 V (Positive mode or Negative mode), Skimmer voltage; 15 or -15 V, Shutter voltage; -50 or 50 V, ADC Rate; 4 MHz, Number of sample; 512 or 1024 k (Pos or Neg), Accumulation time at hexapole; 5000 or 8000 msec (Pos or Neg), Flow rate; 0.5 or 0.35 ml/min (Pos or Neg).

LC-Linear-Trap-TOF/MS

Column: Cadenza CD-C18 (150 x 2 mm, 3 μ m), Column Temp: 40 $^{\circ}$ C, Flow rate: 0.2 mL/min, Solvent A: H₂O/0.1% Formic acid, Solvent B: Acetonitrile/0.1% Formic acid, 0 - 5 min; A:B = 95%:5%, 5 - 50 min; A 95 - 5% and B 5 - 95% Linear gradient, Injection volume; 5 μ L. Spray potential; 4000 or 3500 V (Pos or Neg), Ex potential; 110 V, AP2 potential; 45 V, Accumulation time; 20 msec.

FT-ICR/MS 分析条件で、各抽出液から 30 回の分析マスペクトルを取得した。それぞれのマスペクトルから約 300 のイオンピークを観測した。観測したすべてのイオンピークは添加した質量補正用の内部標準物質の質量理論値を用いて自動補正した。得られた精密質量データと存在比データは、多変量解析によって代謝産物の成分の種類と含量の傾向としてクラスター化して比較した。本研究においては FT-ICR/MS 分析で得られた分子イオン観測データに対する主成分分析のため、独自に開発した FT-ICR/MS メタボミクス計算アルゴリズムを使用した。

C. 結果 および D. 考察

C-1. アマゴ背肉のメタボローム一斉解析

組換え体アマゴ背肉成分と非組換え体アマゴ背肉成分について FT-ICR/MS 分析を行った。その結果、組換え体と非組換え体では明確なメタボローム差はなかったが、魚齢によるメタボローム差が認められた。すなわち組換え体 1 年齢と非組換え体 2 年齢のメタボロームはほとんど区別できなかったが、非組換え体 1 年齢は独立したメタボロームクラスターを形成する傾向にあった。一方、陰イオンモード分析では、組換え体と非組換え体の間でのメタボローム変動は認め

られなかった。また、陽イオンモード分析で認められた魚齢に依存したメタボローム形成は認められなかった。

C-2. 玄米のメタボローム一斉解析

玄米に含まれる成分のメタノール抽出物を FT-ICR/MS で分析した。本分析実験では、玄米中の Trp 含量が 500 nmol/mg DW 以上であればダイレクトインフュージョン一斉分析で検出可能であった。供試した HW-5 玄米中には 2322 \pm 272 nmole/gDW の Trp が蓄積していることがわかった。文献的には HW-5 には約 3000 nmole/gDW の Trp が蓄積していることが報告されている(植物化学調節学会研究発表記録集、40:26)。今回の分析条件では、アントラニル酸など、HW-5 と日本晴の間で含量の差が報告されているシキミ酸経路に関連するメタボライト動態変化は検出されていない。

HW-5 玄米と日本晴玄米成分のメタボロームを主成分分析によって解析した結果、陽イオン、陰イオンモードの両方において HW-5 玄米と日本晴玄米成分の明確なメタボローム差を示した。しかし、HW-5 玄米の分析結果から Trp 関連イオンを除いて主成分分析したところ、両サンプルのメタボロームは区別できなかった。以上の結果は、HW-5 玄米と日本晴玄米の低分子成分の組成、すなわちメタボロームに差異があること、その差異には HW-5 系統作出において意図的に改変された Trp 含量の差が大きく寄与していることを示している。

C-3. ニワトリ肉のメタボローム一斉解析

遺伝子組換えニワトリ肉 (GM) と非組換えニワトリ肉 (nonGM) 表皮組織抽出液の陽イオン、陰イオンモード分析ともに GM、nonGM 間において明確なメタボローム差が認められた。一方、モモ肉抽出液の陽イオン、陰イオンモード分析では、ともに顕著なメタボロームの差異は認められなかった。

表皮組織サンプルの主成分分析における第一主成分について明確なメタボローム差を与えた代謝物は、FT-ICR/MSの精密質量データから、脂肪酸類（パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸等）であることが示された。これらのサンプルをLC-Linear-Trap-TOF/MSを用いて分析したところ、FT-ICR/MSによる分析結果と同様、GMニワトリ表皮では、nonGM表皮と比較してパルミチン酸、リノール酸、オレイン酸などの脂肪酸類の蓄積量が減少していることが確認された。本分析に供試したGM個体とnonGM個体の齢数や経歴は不明であるが、代謝産物蓄積量に差があることが示された。

E. まとめ

組換え体および非組換えアマゴ背肉のメタボロームを比較した。その際の主成分分析の結果は、それぞれを特徴づけるメタボロームの差が無いことを示していた。すなわち、今回供試したアマゴ背肉メタボロームは、組換、非組換えの違いに特徴的に存在する代謝産物によって形成されるものではないと考えられる。一方、生育速度の速い組換え体1年齢は非組換え体2年齢と類似のメタボロームを形成している可能性が示唆され、生育量に依存した肉質変化を反映しているものと推察された。

組換え体玄米（HW-5）および非組換え玄米（日本晴）を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。主成分分析の結果は、HW-5玄米と日本晴玄米のそれぞれを特徴づけるメタボロームの差が認められたが、その差異はHW-5系統において意図的に改変されたTrp含量の差によるものであった。すなわち、今回の分析条件下では、原因不明の代謝成分変動は検出されなかった。

遺伝子組換えニワトリ肉と非組換えニワトリ肉を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。表皮組織における主成分分析の結果、メタ

ボロームの差が検出され、GMニワトリ表皮では、nonGM表皮と比較し、脂肪酸類蓄積の減少が顕著であった。このような脂肪酸類の蓄積の差は、FT-ICR/MSとLC-Linear-Trap-TOF/MSの二種類の質量分析実験によって確認された。

これまでに構築したFT-ICR/MSを基礎とした実験系において、組換え体と非組換え体の代謝成分の一斉分析と主成分分析によるマクロなレベルでのメタボローム比較が可能であった。FT-ICR/MS分析による超精密質量データ（1 ppm以下の精度）からは分子式の推定が可能であり、すでに整備している代謝物データベースを基にしてメタボロームクラスター形成に寄与する成分の物質同定も可能である。今後、個体差や産地差などの情報を加味して比較するための、詳細かつ綿密な実験計画が必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

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

遺伝子組換え体の検知技術の開発に関する調査研究

研究分担者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LLRice601 系統)を対象とした検知技術の開発

安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメ(LLRice601 系統)を対象とした検知技術として、コメに特化した簡便な DNA 抽出法を開発した。また、開発会社から提供された real-time PCR の原理に基づく方法の改良及び、新規の結果判定法の開発により、LLRice601 系統を正確に検知することが可能となった。さらに、本技術の妥当性を 2 分析機関による共同試験によって確認した。

2. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメ(Bt rice)の検知技術の検討

EU で中国産安全性審査遺伝子組換えコメがビーフン等の加工品に流通していた事実が報道された。そこで遺伝子組換えコメが使われているビーフンを入手し、DNA 抽出法、DNA 解析を行った。その結果、当該ビーフンには GM Shanyou 63 系統である Bt コメが混入されていることが明らかとなった。またその解析結果をもとに PCR 法を用いた米粉及び米を含む加工品中の Bt63 米の定性検知法を開発した。これに関して文献情報と DNA データベース情報に基づいた解析により、輸入もち米から未知 Bt 系統の混入を同定した。またその未知 Bt 系統混入もち米検体から、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現領域も新たに検出した。さらにこの領域から、新規検知法を開発するために必要な同カセットの未知領域を導き出す Inverse PCR 法と、Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。また、この領域から、新規検知法開発に必要な同カセットの未知領域を導き出すため、Inverse PCR、Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。これと並行して文献情報を収集し、このトリプシンインヒビター近傍領域を予想、プライマーを設計をして定性 PCR を実施した。Inverse PCR にて既知領域の上流 135 塩基の検出に成功し、文献情報より設計したプライマーによる定性 PCR にて検出された配列と一致した。

3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の確立

LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法について改良を行った。分析試料であるゲノミック DNA に超音波処理および制限酵素処理を組み合わせて施すことによりプラスミド DNA とゲノミック DNA の PCR 効率を一致させることが可能となった。さらに PCR 試薬、PCR 温度条件の検討と併せて検討し、繰り返し再現性良く遺伝子組換えトウモロコシ(MON810)を定量可能な分析法を確立した。さらに、ABI7500 を用いて検証を行ったが、ゲノムの前処理による PCR 効率の顕著な差は認められなかった。

4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

GM ダイズ 1 系統(RRS)の定性検知技術について、その妥当性を確認することを目的とした。国内 14 機関の参加の下、試験所間試験を行い、その結果を集計・解析したところ、RRS の定性分析法の検知下限は 0.1% であることが示され、妥当性の検証がなされた。

5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

インターネット上に公開されているデータベースを精査することにより、これまでに開発された遺伝子組換え作物の作物種、付与された形質の種類、作出方法及び、形質発現のために使用されたシスエレメントの種類に関する様々な情報を整理、蓄積した。

6. トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出精製法の検討

DNA 抽出精製法の効率化を目的とし、現行のトウモロコシ加工食品の試料調製法について比較検討を行った。その結果、乾燥状態のトウモロコシ加工食品については、試料調製法に厚労通知法の乾式法を適用することにより、作業効率の改善が可能となった。また、DNA 抽出精製法については、厚労-Gtip 法を種々のトウモロコシ加工食品に適用することにより、抽出操作の簡略化および経費削減が可能とな

った。

7. リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発

従来の PCR 法に加え LCR 法を GM 検知技術に新たに導入した点で有意義であり、また、本研究で開発した技術は広範囲の GM 農作物の高感度な定性検出を効率的に実施可能な点で有用である。今後、本研究で分析に供した GM トウモロコシ、GM ダイズ系統以外の GM 植物の検出に関する実証データの取得が望まれる。また、標的となる組換え DNA 領域を新たに反応に追加することで、検出可能な GM 農作物の拡充が期待される。

8. シリカベースレジスタタイプキット法を用いたパパイヤからの DNA 抽出精製法の検討

遺伝子組換え(GM)パパイヤ検知のための DNA 抽出精製

法として、新たに Promega Wizard DNA Clean-Up Resin System を用いたパパイヤ生試料およびパパイヤ凍結乾燥試料からの DNA 抽出精製法(WCR 法)を検討した。WCR 法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、WCR 法は、シリカゲル膜タイプキット法および CTAB 法よりも DNA 収量が著しく高く、様々な熟し度合いのパパイヤからも、定性 PCR 用として十分な濃度の DNA 試料原液を得ることが可能となった。

9. 中国産 GM トマト及びピーマンの検知法の確立と調査

トマトおよびピーマンを原料に用いた加工食品からの DNA 抽出を行ったところ、Stool mini kit 法によって、定性 PCR に供するための DNA を確実に得られた。いずれの試料においても内在性遺伝子である CPO は全て検出された。特にトマトを原料に用いた食品にはレトルトのソース類など加工度の高いものが多いことから、Stool mini kit 法は有効な抽出精製法と考えられた。市場で購入したトマトおよびピーマンを原料に用いた加工食品 22 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

10. 三成分同時発光酵素イムノアッセイによる未承認遺伝子組換えパパイヤ検知の検討

イクオリン(Aq)、ピオチン化ルシフェラーゼ(b-Luc)及び西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)の三酵素同時発光検出法を用いた、三成分同時発光酵素イムノアッセイによる GM パパイヤの検知法を確立した。

11. リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

リアルタイム PCR アレイ分析の結果として得られる遺伝子組換え(GM)農作物に共通性が高い組換え DNA セグメント及び承認 GM 系統特異的検出の結果に加え、承認 GM 系統が有する組換え DNA セグメントの情報を総合的に判断することで、未承認 GM 農作物の混入が推定可能であることを見出した。また、リアルタイム PCR アレイの分析結果を入力するだけでこの推定プロセスを簡便に実施可能なソフトウェアを開発した。

12. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討

未承認 GM 赤唐辛子のための DNA 抽出精製法として、Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法について検討を行った。Genomic-tip 20/G を用いた方法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、Plant Kit 法よりも DNA 収量が高く、精製度についても良好な DNA 試料原液を得ることができた。次に市販の乾燥トウガラシの実態調査を行った。トウガラシから種子のみを採取して試料とし Genomic-tip 20/G による抽出精製法で、定性 PCR 及びリアルタイム PCR を用いた定性 PCR に供するための高純度及び高収量の DNA が得られた。いずれの試料においても赤トウガラシ内在性遺伝子は検出された。市場で購入した赤トウガラシ 6 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

13. GM 魚の検出法の確立と調査

マダイの魚類検体について 3 種類のキットを用いて DNA 抽出を試行したところ、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた。白鮭、銀鮭、アトランティックサーモン、紅鮭、トラウトサーモン、マサバの 6 検体を用いて動物(魚類)検知用プライマー対を用いて得られた DNA が PCR 法にて検出可能であるか検討した。並行して成長ホルモン付加型の遺伝子組換え魚の構造特異的配列プライマー対を用いて実態調査を行った。

協力研究者 米谷民雄、渡邊敬浩、近藤一成、手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、橋田和美、古井聡、真野潤一、小口太一（食品総合研究所）、大森清美（神奈川県衛生研究所）、豊田安基江（広島県保健環境センター）、笠原正輝、児玉貴志（独立行政法人農林水産省消費技術センター）、吉松嘉代、河野徳昭（独立行政法人医薬基盤研究所）、小関良宏、佐々木伸大（東京農工大学）

A. 研究目的

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LLRice601系統)を対象とした検知技術の開発：平成18年8月、アメリカ農務省により、安全性の確認されていない遺伝子組換えコメ(LLRice601系統)が微量に栽培されかつ流通していた事実が公表された。LLRiceと呼ばれる遺伝子組換えコメの系統には、LLRice06、LLRice62及びLLRice 601の3系統が存在する。これらの系統は、類似の形質転換用ベクターを用いて作出されたと推定され、さらに組換え親の品種もしくは組換えの手法が異なる(このため、正確には各系統は系統として区別されるのではなく、独立した遺伝子組換えコメ品種として識別されるべきと考える)。米国内においては、平成18年末にLLRice601系統の安全性には問題がないとの発表が成されたことにより、前述の3系統の全てが承認済みの状態にある。しかし、我が国においては、いずれの系統も安全性審査に諮られておらず、これまでにスターリンク(CBH351系統)やBt10系統等に対してとられたものと同様、少なくとも食品としては国内流通を禁止する施策がとられるものと考えられる。また、上記施策を講じるためには、LLRice各系統を特異的かつ高感度に検知可能な科学的検証法が必要とされる。本研究においては、安全性審査の状況から勘案し、3系統を区別することなく検知可能なコンストラクト特異的な検知技術の開発を試みた。流通の事実及び入手試料の制限により、開発された方法の検証作業には、開発者であるBayer社より提供されたLLRice601系統を含む標準試料を用いた。このため、開発された検知技術に基づき評価された分析法は、LLRice601系統を対象とした分析法となる。なお、検知技術の開発に当たっては、real-time PCRを応用した定性分析法がBayer社から各国政府に対し公開されたため、本方法を骨格とした改良法について検討した。また、改良法の性能を評価する目的で、2分析機関による共同試験を実施し、得られた結果を解析した。

2. 安全性未審査遺伝子組換えコメ(Bt系統)の検知

技術の検討：中国で開発された遺伝子組換え米(Bt63米)は、殺虫活性を示す*Bacillus thuringiensis*(Bt)由来CryIAcタンパク質の遺伝子を導入した遺伝子組換え米である。日本ではBt63米に関して食品の安全性未審査であるため、輸入時に米及び米を含む加工品に対しモニタリング検査を行い、国内流通を未然に防ぐ必要がある。本研究では、文献情報とDNAデータベース情報に基づいた解析から輸入ピーフンからBt63米の混入を同定した。またその解析結果をもとにPCR法を用いた米粉及び米を含む加工品中のBt63米の定性検知法を開発した。なお、本報告においてはCryIAcタンパク質を発現する遺伝子組換えコメをBtコメと仮称することとする。

さらに、文献情報とDNAデータベース情報に基づいた解析により未知Bt系統を調査し、安全性未審査遺伝子組換えコメ全般を対象とした検知技術を開発した。またこのような未知系統にも迅速に対応し、新たな検知法を確立させるための手段として、スクリーニングで明らかになった未知系統組み換え配列の一部から、その近傍領域を解析する方法を検討した。

3. LightCycler systemを用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良：定量PCR法は、安全性審査を終了した遺伝子組換え作物(トウモロコシ5系統、ダイズ1系統)を対象とする定量分析法として、現行公定法(最新は食安発第0629002号(一部改正)、平成18年6月29日)において示されている分析方法である。本定量PCR法の適用可能機種としては、ABI PRISM 7700, 7900(96ならびに384well), 7000, 5700, 7500およびLightCycler systemが指定されているが、平成15年度に実施された外部精度管理試験の結果として、LightCycler systemを用いることにより真値とは異なる分析結果が得られる場合があり、また結果の安定性にも問題があることが指摘された。LightCycler systemは公定分析法に示されている他の定量PCR機器と異なり、キャピラリー型専用の反応チューブを用いて反応を行う仕様となっている。このため、反応に供されるDNA試料の質、高次構造が定量結果に影響を与えている可能性が考えられた。本研究においては、遺伝子組換えトウモロコシを対象にLightCycler systemを用いて得られる定量結果の安定性向上のために、公定分析法に示されている方法とは異なるDNA抽出法の適用および定量PCR試薬の変更、抽出ゲノムの前処理法について検討した。さらに、LightCycler