

それぞれの発表者がそれぞれのコンテキストで解釈し、論点を挙げていた点が、議論をあいまいなものにしていたように感じた。

その他、GMと同様新たな技術の食品分野への適用ということで近年関心が高まっているナノテクノロジーに関する報告も行われた。

(2) 会議から得られた示唆・成果

参加主体が政治学者や行政関係者が中心となっていたので、規制に関して多くの情報収集が可能となった。また、今後比較研究を行う際の人的なネットワークの構築が可能となった。特に、米国や欧州の規制・リスクコミュニケーション等の研究をしている研究者との交流は今後の調査を行ううえでも有用と思われる。

課題としては、上述の通り、新世代 GM の定義が明確でなく、まずは定義を明確にする必要があると感じた。これは更なる確認が要されるが、欧州においては、第 2 世代、第 3 世代というカテゴリー分けも一般的で無いようで、従来の GM（除草剤耐性、害虫耐性等）に対して、栄養改変も環境にメリットのある GM もすべて次世代 GM あるいは第 2 世代と呼んでいるようであった。

本研究においてもタイトルの第三世代が何を意味するのか、第 2 世代と第 3 世代のカテゴリーをどう切り分けるのかを明確にする必要があると感じた。

主催者は、今後この会議の発表報告内容をもとに個々の発表者が整理し、コンセプトを改めた上で、書籍等の出版につなげたいとしていたので、その実現を期待したい。

(参考・発表要旨)

“Regulatory development and experiments of participatory technology assessment of GM food and crops in Japan,”

Hideaki Shiroyama* and Makiko Matsuo**,

* Professor, Graduate School of Public Policy, the University of Tokyo, [siroyama<at mark>j.u-tokyo.ac.jp](mailto:siroyama@j.u-tokyo.ac.jp)

** Project Researcher, Graduate School of Public Policy, the University of Tokyo, [matsuoma<at mark>j.u-tokyo.ac.jp](mailto:matsuoma@j.u-tokyo.ac.jp)

*** Please replace <at mark> with @ when you give us e-mail.

Abstract

Japan is known as one of the countries where there is no cultivation of commercialized GM crops (except for the blue rose developed by the private company) and social acceptance for such food is low. However, observation of the many aspects of GMOs in Japan will make one very puzzled to find out a lot of gaps and discrepancies. On the one hand, people are expressing resistance to GM foods and labeling is required for such food, but on the other hand, they are consuming substantial amount of such foods through processed foods and animal feedings. Furthermore, many of them are consuming without noticing it partly because there is exemption for labeling requirements. Japan's public sector is putting a lot of energy on research and development of GM rice but commercialization is yet to be achieved. All these are only part of the discrepancies we can observe in the situation surrounding GM food and crops in Japan.

The objectives of this paper are as follows:

identify the gaps and discrepancies by analyzing the market, research and development and regulatory framework of GM foods and crops in Japan

explore the past experience of participatory technology assessment (TA) in Japan to deal with these gaps

introduce some surveys of Japanese public acceptance on GM food and crops to show current public attitude toward such foods

and induce some lessons for the governance of next generation GM

The presentation concludes that although some attempts of participatory TA have taken place, its impact was limited in scope and the outcome is not widely shared by public at large. Surveys tell that Japanese are still concerned about GM foods, but the divergence in Japanese attitude toward different GM shows the potential for higher acceptance. The challenge for the governance of next generation GM food is how those differences can be communicated. Another

point to make for the governance of future GM in Japanese context is that we must overcome the bureaucratic rivalry. The case of the R&D of the GM rice that eases hay fever tells us the importance of the coordination between the governments' agencies from the early stage of R&D. Finally, we must also keep in mind of the lesson from recent re-politicization of GM foods in Japan. How the technology is treated not only depends on the consumer attitude or what the consumer organizations and other stakeholders do, but also on the "political will" of the decision maker. However, although TA is not the only solution, it can be one of the tools that can ease too much politicized situation, which enables balanced and rational decision-making.

(参考・会議プログラム)

**Regulating Next Generation Genomics:
Emerging Agricultural Biotechnology Governance Challenges**

Brocher Foundation Symposium, Hermance, Switzerland

July 8-9, 2010

July 8: Registration, 8.30 – 9.00

July 8 morning panels

PANEL 1: Past Lessons [9.15 – 10.30]

Chair: Eric Montpetit, Political Science, Université de Montreal

Les Levidow, Open University, UK: “GM Food on Trial: Testing European Democracy”

Christoph Rehmann-Sutter, Head, Unit for Ethics in the Biosciences, University of Lubeck, “2nd generation governance for 2nd generation GM”

Catherine Lyall, ESRC Innogen Centre, University of Edinburgh: “The Limits to Governance: Some Lessons for Policy”

PANEL 2: Drivers of Change [10.45 – 12.00]

Chair: Paulette Kurzer, Political Science, University of Arizona

Michael Howlett, Burnaby Mountain Professor, and Andrea Migone, Political Science, Simon Fraser University: “A Framework for Analysis of the Regulatory Issues Raised by Second Generation Genomics Research”

Eric Montpetit, Political Science, Université de Montreal “The role of independent scientists in the legitimization of biotechnology policy choices in North America and Europe”

Steven Weldon and David Laycock, Political Science, Simon Fraser University: “Public opinion across the generations of genomic applications: Canadian and comparative evidence”

Keynote talk by *George Gaskell, BIOS, London School of Economics*

July 8: Afternoon

PANEL 3: Comparative Experiences (1): Europe [13.30 – 14.45]

Chair: Les Levidow, Open University

Paulette Kurzer, Political Science, University of Arizona: “An Unfinished Project: the evolution of EU's mode of governance of biotechnology”

Anthony R. Zito, Politics, Newcastle University, and Sarah Lieberman, Applied Social Sciences, Canterbury Christchurch University: “Government and Governance in European GMO Policy”

Anders Johansson, Department of Water and Environmental Studies, Linköpings universitet, Sweden: “Pragmatism revisited: the development of regulatory regimes of GMOs in EU”

PANEL 4: Comparative Experiences (2): Asia [15.00 – 16.45]

Chair: Grace Skogstad, Political Science, University of Toronto

Yves Tiberghien, Political Science, University of British Columbia: "The Global battle over Governance of Agricultural Biotechnology: the roles of Japan, Korea, and China"

Hideaki Shiroyama and **Makiko Matsuo**, Graduate School of Public Policy, Tokyo University: "Regulatory development and experiments of participatory technology assessment of GM food and crops in Japan"

Dayuan Xue, Chief Scientist on Biodiversity, Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Environmental Protection, China: "Public participation on Biosafety Issues in China"

Darryl Jarvis and **Noah Richmond**, Lee Kuan Yew School of Public Policy, National University of Singapore: "Regulating Nanotechnology in Asia: A Comparative Study of China and Taiwan"

July 9: Morning

PANEL 5

International Governance: Clash of international regimes? [9.00 – 10.00]

Chair: Catherine Lyall, ESRC Innogen Centre, University of Edinburgh

Jorgen Schlundt, Director, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, World Health Organization, Geneva: "The joint international normative work defining a globally agreed risk analysis framework for Genetically Modified Food - what is still missing?"

Grace Skogstad, Political Science, University of Toronto, "Legitimizing International Regulatory Governance of GMOs"

Panel 6 – Stakeholders and practitioners' Roundtable [10.15 – 12.00]

Chair: Yves Tiberghien, Political Science, University of British Columbia

PANEL 7 - Future Directions [13.30 – 15.00]

Chair: Michael Howlett, Political Science, Simon Fraser University

Alan McHughen, Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside: "Learning from experience: How do we use what we've learned to reform regulatory oversight of agricultural biotechnology?"

Mike Burgess, Director, W. Maurice Young Centre for Applied Ethics, University of British Columbia: "Deriving policy and governance from deliberative events and mini-publics"

Laurence Boisson de Chazournes, Director, Department of Public International Law and International Organization, Faculty of Law, University of Geneva, and **Makane Mbengue**, Faculty of Law, University of Geneva: "Mutual supportiveness, the road ahead"

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 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 教授

研究要旨

これまで実用化研究が進められてきた遺伝子組換え農作物の多くは、除草剤耐性や耐虫性などの形質を単独遺伝子の改変により付与したものであった。しかし、環境ストレス耐性等の付与を念頭に置いた場合、効果的に耐性を付与する手法として、内生遺伝子群の発現を制御することが出来る転写制御因子の導入が試みられている。こうした遺伝子組換え体の安全性評価は生物多様性影響評価にとどまっておらず、食品安全性の観点から評価が行われた事例はない。本研究では転写制御因子を導入した遺伝子組換えジャガイモを用いて、どのような要素を取り入れ食品安全性評価を行う必要があるかの検討を加えるため、多方面からの解析を実施し、評価基準の構築に向けての基盤研究を推進する必要がある。本研究では、第一に可食部生産の可能である遺伝子組換え体を特定網室で栽培し、実験材料となる遺伝子組換えジャガイモの可食部（塊茎）について供給を進めた。得られた塊茎について導入遺伝子の発現解析を非可食部である塊茎皮部分を用いて実施し、提供材料の全てで導入遺伝子の発現を確認した。一方、塊茎可食部を用いて食品成分についての調査を行った。組換え体において基本食品成分には差が認められず、遺伝子発現量に伴う成分変化の傾向は見出されなかった。

研究協力者

菊池 彰（筑波大学大学院・生命環境科学研究科・遺伝子実験センター）

A. 研究目的

これまで、多くの遺伝子組換え農作物の実用化研究が進められてきており、その殆どが除草剤耐性や耐虫性などの形質を作用起作の明らかとなっている遺伝子の改変により付与したものであった。しかし、近年になって、転写制御因子をはじめ、導入遺伝子により組換え体内でさまざまな因子を変化させ形質を発揮させるような、支配因子の全てが明らかにされていない遺伝子組換え植物の研究や開発が進められてきた。こうした遺伝子組換え体の安全性評価は生物多様性影響評価にとどまっておらず、食品安全性の観点から評価が行われた事例はない。本研究ではジャガイモ近縁野生種から単離された作用起作不明の線虫抵抗性遺伝子を導入した遺伝子組換えジャガイモを用いて、どのような要素を取り入れ食品安全性評価を行う必要があるかの検討を加えるため、多方面からの解析を実施し、評価基準の構築に向けての基盤研究を推進する。

B. 研究方法

<植物材料>

ジャガイモ近縁野生種由来線虫抵抗性遺伝子である *Rmi* 遺伝子を構成的発現性プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと連結したコンストラクト（図 1）をジャガイモ（*Solanum tuberosum* cv. Desiree）にアグロバクテリウム法で導入し、遺伝子組換えジャガイモを作成した。開発中の遺伝子組換え体であるため予備的な線虫抵抗性の確認にとどまっているが、28 系統の *Rmi* 遺伝子組換えジャガイモがこれまでに作製されている。

<植物材料の調整>

ジャガイモ（*Solanum tuberosum* cv. Desiree）は Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で 25℃、16 時間明期、8 時間暗期の光条件下で培養した。3 ヶ月に 1 回の継代培養により、系統を維持した。鉢植え栽培を行う場合は、10 cm 程度に成長した植物体（図 2A）を栽培室に移し、軽石を敷いたポリエチレン鉢（φ 10 cm）に混合培養土を入れたものに移植した。22℃、16 時間明期、8 時間暗

期の光条件下で湿度を保ちながら、1週間順化させた後、3週間通常灌水で栽培した(図2B)。

挿し芽増殖は、順化後20日目以上の鉢植え植物を用いた。茎頂を5cm程度の長さに切り(図2C)、茎に発根促進剤(ルートン:住化タケダ園芸)を粉衣した。良く湿らせた混合培養土(付録1)に挿し、湿度を保ちながら1週間順化させた(図2D)。その後、培養植物の馴化法と同様の条件下で約10日間栽培した(図2E)。

これらを特定網室に移し、湿度を保ち、遮光しながら3日間馴化した(図2F)。その後、軽石(牧野商店)と赤玉土(加藤産業)を敷いた上に培養土(花と野菜の園芸培養土、加藤産業)を入れたポリエチレン鉢(φ10cm)に移植し、約3ヶ月栽培した。

オミクス解析用、給餌実験用のサンプルについては、非組換え体と各遺伝子組換え系統を3-6個体の栽培を行い、塊茎を得た。各個体に得られた塊茎のうち、大きいサイズのものを実験材料として供した。これらの可食部は、各研究班に冷凍状態で送付され、班ごとの研究材料として用いられた(図3、表1、2)。

一方、食品成分分析用のサンプルは遺伝子組換えジャガイモ4系統、非組換え体1系統を各4個体のポットから得られた塊茎を系統ごとにまとめて行った。食品成分は塊茎の登熟度でその結果が大きく変わることが予想されたので、出来るだけ均一に成熟した塊茎を得るため、地上部が枯れ上がるまで塊茎の成熟を充分待ち収穫を行った。一部の未熟塊茎を除き、可食部100gを試験材料とした。

材料となる塊茎は収穫、洗浄後、遮光条件で1週間室温にてキュアリングを行い、皮と可食部に別け液体窒素にて急速冷凍し使用するまでは-80℃にて保存した。

<導入遺伝子の発現確認>

特定網室で栽培された遺伝子組換え体全28系統のうち、成長性が良く塊茎量の十分な11系統について、試験に用いる系統を決定するために塊茎表皮での遺伝子の発現量を調査した。

凍結した塊茎の皮を約0.3g(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、RNAqueous total RNA isolation kit(Ambion)を用いてTotal RNAを抽出した。得られたRNAからDNase(Promega)によりDNAを除去

し、フェノールクロロホルム処理を行い、精製RNAを得る。これを用いて、RNA PCR kit (AMV) ver 3.0 (TAKARA)によりcDNAを合成、PCRにより目的遺伝子を増幅した。用いたプライマーは*Rmi*遺伝子の802bpを増幅するものを用いた。アガロースゲル電気泳動を行い、増幅したDNA断片を検出し導入遺伝子の発現を確認し、発現量に応じて2つのグループに分けた(図4)。

<食品成分分析>

冷凍した塊茎の可食部100gを日本食品分析センターに送付し、5成分(水分、たんぱく質、脂質、炭水化物、灰分)とエネルギーの分析を依頼した。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質はケルダール法、脂質は酸分解法、灰分は灰化法により評価した。エネルギーと水分は下記の計算式により求めた。

$$\begin{aligned} \text{炭水化物} &= 100 - (W + P + L + A) \\ \text{エネルギー} &= 4P + 9L + 4C \\ W &: \text{水分}, P: \text{たんぱく質}, L: \text{脂質} \\ C &: \text{炭水化物}, A: \text{灰分} \end{aligned}$$

C. 結果

<導入遺伝子の発現量>

導入遺伝子の発現解析を行った結果、発現の強弱はあるものの全ての塊茎において導入遺伝子の発現が認められた(図4)。系統ごとに発現量が異なっており、導入遺伝子の発現量に応じて2つのグループに分け、各班に分配する遺伝子組換えジャガイモ系統を決定した。について、高発現系統、低発現系統にグループ分けし、オミクス用サンプルには高発現系統、低発現系統を、給餌用、栄養成分分析には高発現系統を用いた(表1、2)。

<遺伝子組換え体の栄養成分>

遺伝子組換え体の栄養成分は表3のようになった。遺伝子組換え体4系統と非組換え体との間に大きな差異は認められなかった。

D. 考察

分配した遺伝子組換え塊茎は、*Rmi*遺伝子の発現量に応じグループ分けし、各研究グループの希望に合わせたサンプルの送付を行った。分配された系統のうち、一部の線虫抵抗性が予備的に調べられており、R16、R34、R38、R111の4系統につ

いては線虫抵抗性が認められている。それ以外の R30、R115、R122 については未検定である。

栄養成分の結果から、非組換え体において、高発現 4 系統の組換え体に比べ、カロリー、炭水化物で低い値を示した。しかし、五訂増補日本食品成分表と合わせて比較した場合、組換え体と非組換え体の間には大きな差異は見出されず、導入遺伝子の発現に伴う成分変化は認められなかった。

E. 研究発表 なし

表1. 生イモ(可食部)の栄養成分

	エネルギー (kcal)	水分 (g)	たんぱく質 (g)	脂質 (g)	炭水化物 (g)	灰分 (g)
NT	70	81.1	1.9	0.1	16.0	1.0
R16	72	80.4	1.9	0.1	16.5	1.2
R30	75	79.5	2.1	0.1	17.2	1.2
R34	74	79.8	2.0	0.1	17.1	1.1
R38	77	79.2	1.8	0.1	17.8	1.2
※	76	79.8	1.6	0.1	17.6	0.9

※五訂増補日本食品成分表より抜粋

表2. オミクス解析用に各班に分配された塊茎の情報

高 発 現 系 統	系統名	16					
	個体名	A	B	C	D		
	塊茎番号	I	I	I	II	I	
	手島研	◎	◎	◎	-	-	
	小関研	◎	◎	-	◎	-	
	岩城研	◎	◎	◎	-	◎	
	系統名	30					
	個体名	A	B	C	D	E	F
	岩城研	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	系統名	34					
個体名	A	B	C	D	E		
手島研	◎	◎	◎	-	-		
小関研	◎	◎	◎	-	-		
岩城研	◎	◎	◎	◎	◎		
系統名	38						
個体名	A	B	C	D	E		
塊茎番号	I	I	I	I	I		
手島研	◎	◎	-	◎	-		
小関研	◎	◎	-	◎	-		
岩城研	◎	◎	◎	◎	◎		
非 組 換 え	系統名	NT					
	個体名	A	B	C	D	E	F
	塊茎番号	I	I	I	I	I	I
	手島研	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	小関研	◎	◎	◎	-	-	-
岩城研	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
低 発 現 系 統	系統名	111					
	個体名	A	B	C			
	手島研	◎	◎	◎			
系統名	115						
個体名	A	B	C				
手島研	◎	◎	◎				
系統名	122						
個体名	B	C	D				
手島研	◎	◎	◎				

表3. 給餌用に分配された塊茎の情報

系統名	38						総重量 約 21 g
個体名	A		B		D		
塊茎番号	I	II	I	II	I	II	
サンプル重(g)	6.3	3.2	2.3	5.7	2.0	1.8	
系統名	NT						総重量 約 22 g
個体名	A		B		C		
塊茎番号	I	II	I	II	I	II	
サンプル重(g)	1.3	1.7	4.3	6.3	3.3	4.8	

給餌用サンプルは量が必要であるため、1塊茎毎に別けることが出来ず、系統をバルクして提供した。系統38は高発現系統、NTは非組換え体。

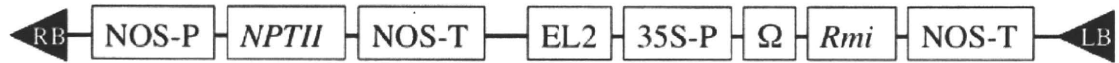


図1 遺伝子導入に用いたコンストラクト

EL2-Ω配列を持つ35Sプロモーターで導入遺伝子を高発現させるpBE2113をベースに作製した。このコンストラクトをアグロバクテリウム法によりジャガイモに導入した。

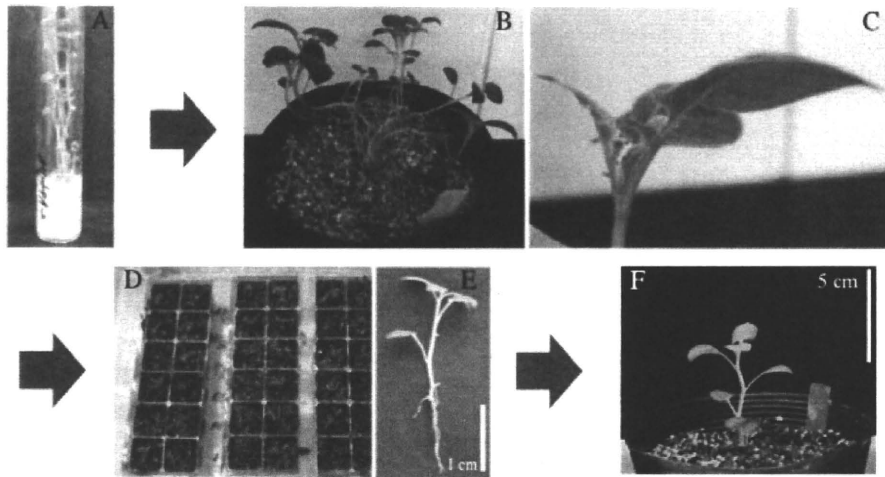
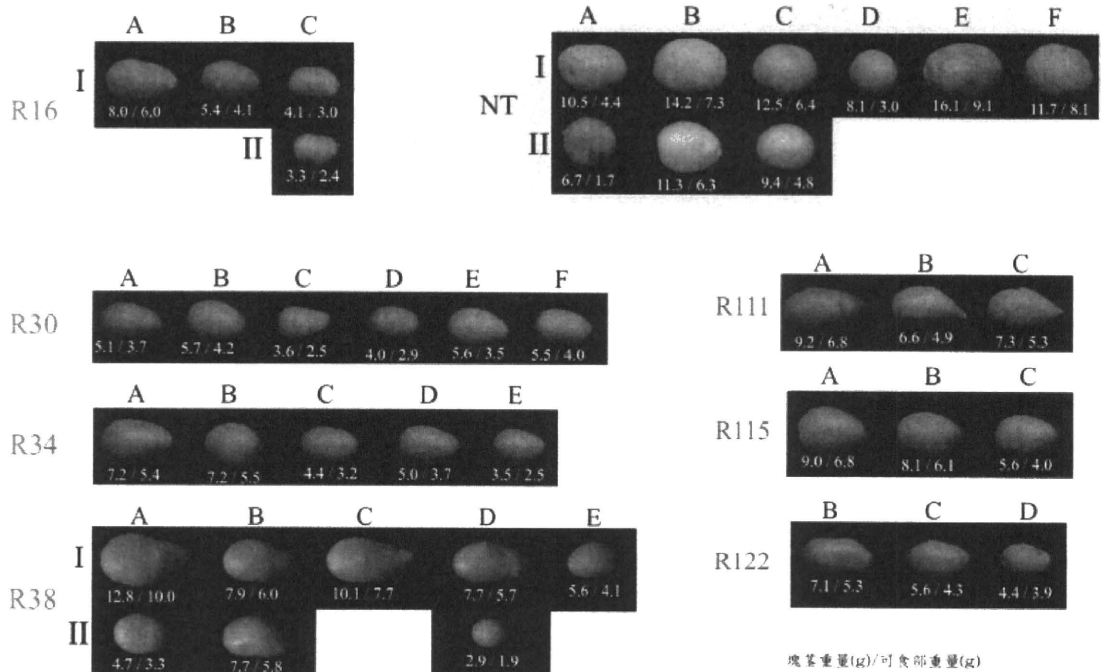


図2 植物材料の準備

培養植物(A)を栽培室でポット栽培し(B)、頂芽(C)を挿し芽増殖する(D)。馴化、生育させた後(E)、ポットに移植し、網室栽培用の材料とした。



塊茎重量(g)/可食部重量(g)

図3 各班に配布した塊茎の写真

数字は塊茎重量。R16、R30、R34、R38は高発現系統、R111、R115、R122は低発現系統。A～Fは各系統での別個体、I、IIは同一個体の別塊茎を示す。

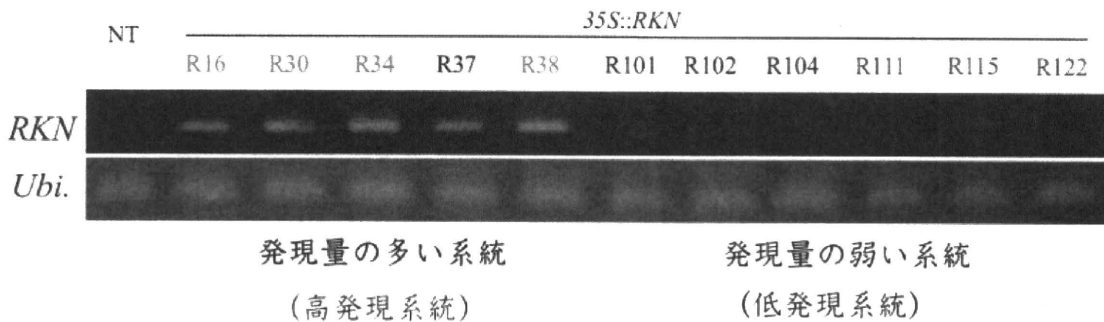


図4 遺伝子組換えジャガイモの塊茎における導入遺伝子の発現

各班に送付する系統を決定するため、生産性の良かった11系統の組換え体について、その塊茎よりRNAを抽出しRT-PCR法により導入遺伝子の発現解析を行った。

付録1

クレハ培養土(JA)、バーミキュライト(牧野商店)、ビーナスライト7号(芙蓉パーライト株式会社)、ビートモス(牧野商店)を9:1:1:1:の比率で配合した培土。

平成 22 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）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 22 年度）

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 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 教授

研究要旨

昨今、様々な種類の遺伝子組換え植物が作出されている。これまでは害虫抵抗性や、栄養価を高めるような遺伝子組換え植物が多かったが、近年では、耐乾燥性や耐塩性などの環境抵抗性を持たせるための遺伝子組換えが行われており実用化されつつある。これらの環境抵抗性を付与するための遺伝子は転写調節因子や、RNA 結合タンパク質など、生体内の遺伝子発現に大きな影響を与えると考えられるものや、その作用機序が明確でないものが用いられている。その為、このような遺伝子組換え植物では内生の遺伝子の発現プロファイルが大きく変動していることが考えられるため、それらの影響が食品としての安全性にどの程度影響するかについて検討しておくことは重要である。そこで本研究では、root-knot nematodes 耐性遺伝子を組換えたジャガイモと、RNA 結合タンパク質を組換えたいネを材料として、トランスクリプトーム解析を行うことでそれらの内生の遺伝子変動がどの程度揺らぐのかについての検討を行った。

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）

A. 研究目的

遺伝子組換え植物の流通は年々増加しており、それらの組換える遺伝子の種類も非常に多様化している。近年までは、害虫抵抗性のタンパク質をコードしている遺伝子等を導入した、いわゆる「第一世代」のものが流通し、栄養価を高めるような遺伝子を組換えたいわゆる「第二世代」のものが実用化されつつある。このような遺伝子組換え植物の安全性については、作用機序がある程度明確であるため、比較的検討しやすいと考えられるが、最近では、乾燥地や塩害地に生育できるようなストレス耐性を付与する遺伝子を組換えたい植物も実用化に向けて研究されている。このようないわゆる「第三世代」の遺伝子組換え植物は、将来の食料問題等の解決の一つの手段として利用される可能性が非常に高い。このような耐ストレス遺伝子組換え植物の作出には、ストレス応答に関わる転写調節因子を植物に導入することで達成されることが多い。更には、核酸結合タンパク質や、機能未知のタンパク質をコードした遺伝子を導入することで、それらの作用機序は明確にされないまま、対ストレス性遺伝子組換え植物

が作出されていることも数多く報告されている。ストレス応答に関わる転写調節因子等を組換えたい場合、それらのストレスに関わるであろう、その転写調節因子の支配下にある遺伝子群の発現が変化していることが予想される。しかし、機能未知のタンパク質や、核酸結合タンパク質など、どのようにストレス耐性に関わっているのかが明確でない遺伝子については、どのような遺伝子発現変化が起こっているかについて予想することは困難であり、このような場合、トランスクリプトーム解析などの網羅的な解析手段が有効であると考えられる。昨年度は「第三世代」遺伝子組換え植物の 1 モデルとして乾燥ストレス応答に関与する転写調節因子である drought response element binding protein (DREB) 遺伝子を導入したジャガイモを材料としてトランスクリプトーム解析が適用できるかについて検討した。本年度は、「第三世代」遺伝子組換え植物の中でも作用機序について全く見当がつけられていない RNA binding protein を組換えたいコメならびに、root-knot nematodes 耐性を付与する機能未知のタンパク質をコードした遺伝子を組換えたいジャガイモを材料として、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、その有効性について検討した。

B. 研究方法

DNA マイクロアレイに供する材料としては、root-knot nematodes (RKN) 耐性遺伝子を組換えたジャガイモと、RNA binding protein (RBP) をコードしている遺伝子を組換えたコメを用いた。RKN 耐性遺伝子組換えジャガイモの中でも RKN 耐性遺伝子の発現量の高かった line 38-A, B と、対照として遺伝子非組換えジャガイモ line NT-A, B の4つの個体について収穫後、皮を剥いた可食部を液体窒素にて急速冷凍したものをを用いた。RBP 組換えコメは、昨年度報告した方法で作成した。作成したコメで RBP が発現していることを確認した。発現が確認された遺伝子組換えイネを出穂するまで水耕液を用いて栽培した。出穂した時点で 200 mM の NaCl を含む水耕液に移植し、30 時間の培養を行った後に収穫を行った。対照としては NaCl 処理をせずに栽培したものを収穫した。また、遺伝子を組換えていない宿主である日本晴れについても、同じ栽培法で栽培した後に、NaCl 処理をしたものとしていないものについて収穫を行った。これらの RBP 組換え・非組換えコメについて、NaCl 処理有り・無しサンプルそれぞれの葉から RNA を抽出して、塩ストレスに反応して発現することが報告されている SalT (Salt stress-induced gene (Claes et al., 1990 Plant Cell 2: 19-27)) 遺伝子を増幅するように設計したプライマーを用いて RT-PCR 法によってこれらの発現量を検討した。

ジャガイモ塊茎とコメからの RNA 抽出は昨年度と同様に Furits Mate (TakaraBio) と RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を組み合わせて行った。

DNA マイクロアレイ解析はフィルジェン社の DNA マイクロアレイ解析系を利用した。DNA チップとしてはジャガイモの転写産物が 18,722 スポットされた Filgen®Array Solanum tuberosum とコメの転写産物が 68,682 スポットされた Filgen®Array Oryza sativa を用いて行った。

C. 研究結果

C-1. RKN 耐性遺伝子組換えジャガイモにおけるトランスクリプトーム解析

遺伝子を組換えていないジャガイモ 2 系統 NT-A と NT-B と RKN 耐性遺伝子を組換えたジャガイモで組換えた遺伝子の発現量が高かった 2 系統 38A, 38B について DNA マイクロアレイ解析を行った。それぞれのサンプル間での遺伝子発現量の差

をスクタープロットによって確認した。その結果、遺伝子を組換えたものと組換えていないものでは、遺伝子を組換えていないサンプル間の遺伝子発現の変動が若干大きくなる傾向が見られた (図 1)。しかし、遺伝子を組換えた 2 系統間においても、遺伝子を組換えていないサンプル間よりも遺伝子の発現量の差が大きかったことから、遺伝子発現の変動は、遺伝子を組換えたことの影響よりも、系統間での差異が大きいたことが示唆された。

C-2. RBP 組換えコメと非組換えコメにおける遺伝子発現解析

RBP 遺伝子を組換えた場合の遺伝子発現に与える影響を検討するために、RBP 遺伝子を組換えた系統 R1 と R2 と、遺伝子を組換えていない宿主である日本晴のそれぞれを水耕栽培し、塩ストレス処理をしていないサンプルから RNA 抽出を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。それぞれの遺伝子発現の変化をスクタープロットによって解析を行った。この方法では縦軸と横軸に 2 検体それぞれの遺伝子発現量をプロットすることにより、いずれでも発現量が同程度であれば左上がりの対角線上に、片側で発現量が多い場合には、そちらの軸に近づくようにプロットがなされる方法である。その結果、遺伝子組換え、非組換え間での遺伝子発現量の変動は非常に少なく、また、遺伝子を組換えた R1 と R2 の遺伝子発現量の変化も非常に小さいことが示された (図 2)。

C-3. 塩ストレス処理を行ったイネにおけるコメでの遺伝子発現解析

塩処理を行った場合にコメでの遺伝子発現に与える影響を検討するために、RBP 組換え、非組換えイネに塩ストレスを与えたもので、コメから抽出した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。まず、今回試した塩処理でイネが塩ストレス応答をしているかについて検討するために、塩処理をしたイネの葉から抽出した RNA を用いて、これまでに塩ストレスで誘導されることが分かっている SalT 遺伝子について遺伝子発現を確認した。その結果、特に塩ストレスによって発現が上昇することが知られている SalT 遺伝子の発現が、塩ストレス処理によって上昇していたことから、イネが塩ストレス応答をしたことが示唆された (図 3)。そこで、この植物体の可食部であるコメにお

ける遺伝子発現の変化を検討したところ、遺伝子を組換えた系統 R1、R2、遺伝子非組換え日本晴れそれぞれにおいて、塩処理によって、大きく遺伝子発現が変動していることは確認されなかった(図 4)。

C-4. 塩ストレス処理を施した RBP 組換え、非組換えコメにおける遺伝子発現解析

塩ストレス処理を行った場合に RBP 遺伝子組換えコメ、非組換えコメとでどの程度遺伝子発現量の変動があるのかについて検討するために、塩処理を行った、遺伝子組換えコメと、非遺伝子組換えコメでの遺伝子発現量の変化を解析した。その結果、遺伝子を組換えていない日本晴れに対して、遺伝子を組換えた系統 R1 と R2 それぞれでの遺伝子の発現量の変化は、塩処理をしていない場合よりも若干分散する傾向が確認された(図 5)。遺伝子を組換えた R1 と R2 間での遺伝子発現量の変動も、塩処理を施していない場合と比較して分散する傾向にあったことから、これらの遺伝子発現量の変化は、遺伝子を組換えたことよりもむしろ、塩処理を行ったことによる影響が大きいものと考えられた。

D. 考察

コメではジャガイモと比較して遺伝子発現の変化が少なかった。これは、一つはジャガイモの可食部が塊茎で、土壤中で生育させたことから土壤中の栄養状態や、微生物叢の影響を受けやすいことが原因であったと考えられる。イネの栽培は水耕栽培によって均一な環境下で生育させたこと、また、イネの可食部であるコメが水耕液や土壌には直接接触することが無かったことも、遺伝子発現変化が少なかった原因と考えられる。

遺伝子組換えをしたコメと非組換えコメでは遺伝子発現の大きな変動はみられなかった。この原因としては今回組換えた遺伝子が RNA 結合タンパク質であり、生体内においては mRNA がストレス等を受けて高次構造をとるのを妨げることによって正常な機能を持つようにすることでストレス耐性を獲得していると思われる。そのため、これまでに発現していない遺伝子や、ストレス応答性の遺伝子の発現を誘導するのではなく、通常発現している遺伝子の発現量を下げないようにする働きをするため、RBP を遺伝子組換えしても遺伝子組換えしていないものと比較して遺伝子

の発現量変化が少なかったと考えられる。

塩処理をしたイネとしていないイネについて代表的なストレス応答遺伝子の発現をみたところ、塩処理によってそれらの遺伝子発現量は上昇していたことから、植物体は塩ストレス応答をしていたと考えられた。それにも関わらず、コメでの網羅的に解析した場合、遺伝子発現量はそれほど大きく変動していなかった。この原因としては、ひとつは室内の環境が非常に整った場所で生育したことにより、植物体が受けた塩処理によるストレスが貯蔵組織であるコメにはそれほど大きな影響を与えなかったことが考えられる。もう一つの原因として、今回行った塩処理は出穂してから 30 時間だけの間であったために、葉などではストレス応答遺伝子が発現したが、貯蔵組織ではストレスの影響が少なかったことが考えられる。今後、塩処理時間を出穂する前に与えたものや、長期間塩処理したイネを用いて遺伝子発現量変化を検討することが望まれる。また、水耕栽培だけでなく実際に屋外で土壌を用いて栽培した場合にどの程度遺伝子発現が変化するかについても確認することが望まれる。

E. 結論

環境ストレス耐性を付与するようないわゆる「第三世代」遺伝子組換え植物の作出には、作用機序が明確でない遺伝子も利用されている。このような遺伝子組換え植物の場合、非遺伝子組換え植物との同等性を証明するのは非常に困難であると思われる。本研究では、作用機序が明確ではない遺伝子を組換えたジャガイモ、コメについてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、遺伝子を組換えたことよりも、個体、系統間の差や生育環境の影響の方が遺伝子発現に与える影響が大きいように思われたが、RKN 組換えジャガイモにおいては、いくつかの遺伝子について、遺伝子組換えによってその発現量が上昇していることが示唆された。今後その様な遺伝子がどの程度存在するのか、また、その発現量の変化が培養変異や生育環境の影響等ではなく組換えた遺伝子の直接の影響なのか等について詳細に検討する必要があるものと思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

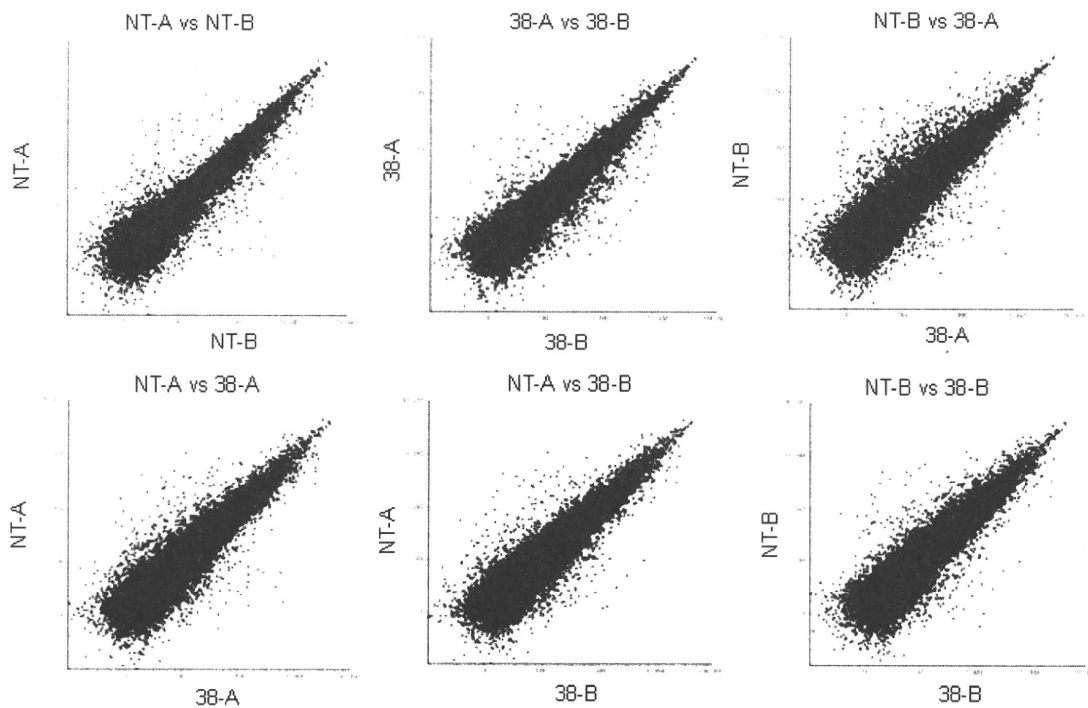


図 1 Root-knot nematodes (RKN) 耐性遺伝子組換えジャガイモと非組換えジャガイモを用いた遺伝子発現解析

RKN 耐性遺伝子を組換えたジャガイモのうち、その発現量が高い系統 38 の個体 A, B (38-A, 38-B) と遺伝子を組換えていない系統の 2 個体 (NT-A, NT-B) を DNA マイクロアレイ解析に供した。それぞれの遺伝子発現量変化をスクエッタープロットによって解析した。

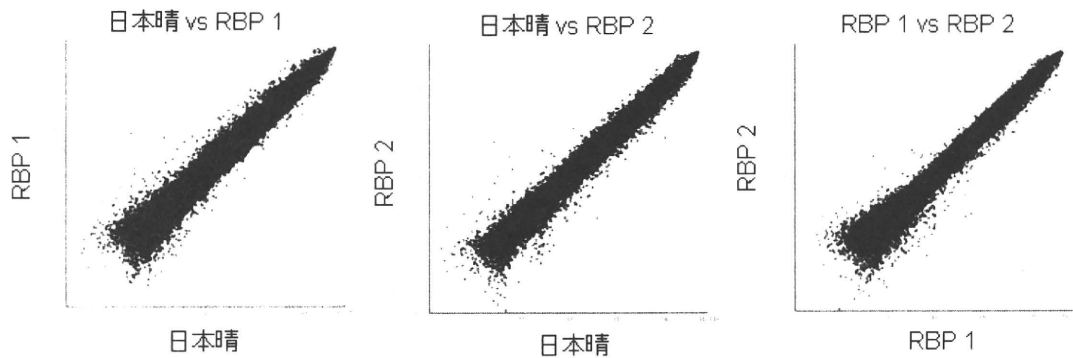


図2 RNA binding protein (RBP) 遺伝子組換えコメの遺伝子発現量変化

RBP 遺伝子を組換えたイネのうち、発現量の高い系統（系統 1、2）と遺伝子を組換えしていないイネ（日本晴）のコメを用いて DNA マイクロアレイ解析に供した。それぞれの遺伝子発現量変化をスカッタープロットによって解析した。

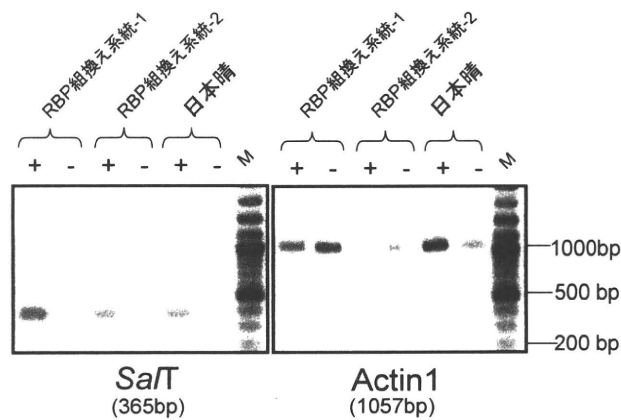


図3 RBP 遺伝子組換え、非組換えイネにおける塩ストレス応答遺伝子の発現解析

RBP 遺伝子を組換えたイネと、組換えしていないイネに塩ストレス処理をした後にそれぞれの葉から抽出した RNA 用いて RT-PCR 法により SaIT 遺伝子の発現量を検討した。対照として Actin 遺伝子を用いた。遺伝子組換え、非組換えイネの葉において SaIT 遺伝子の発現が確認され、塩ストレス応答をしていることが示唆された。

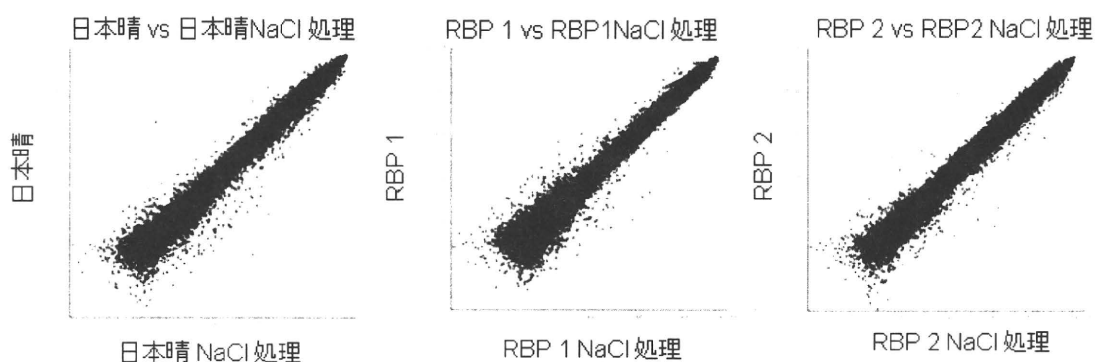


図 4 RBP 遺伝子組換え・非組換えイネにおける塩ストレス処理・未処理後の遺伝子発現量変化の解析

RBP 遺伝子を組換えたイネ 2 系統 (RBP1, 2) と、組換えていないイネ (日本晴) に塩ストレス処理をした後に、それぞれのコメから抽出した RNA を DNA マイクロアレイ解析に供した。それぞれの系統につき、NaCl 処理を施したものと施していないものについての遺伝子の発現量の変化をスカッタープロットによって解析した。

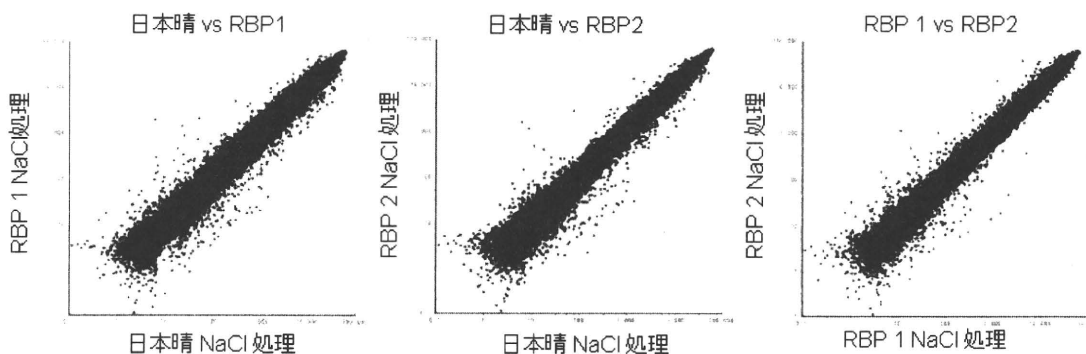


図 5 RBP 遺伝子組換え、非組換えイネにおける塩ストレスによる遺伝子発現量変化

RBP 遺伝子を組換えたイネ 2 系統 (RBP1, 2) と、組換えていないイネ (日本晴) に塩ストレス処理をした後に、それぞれのコメから抽出した RNA を DNA マイクロアレイ解析に供した。遺伝子を組換えたものと組換えていないもの、遺伝子を組換えた 2 系統間での NaCl 処理による遺伝子発現量の変化を解析した。

平成 22 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）

第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と

リスクコミュニケーションに関する研究

分担研究報告書（平成 22 年度）

組換え植物のメタボローム解析

研究分担者 太田 大策 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授

研究要旨

第 3 世代遺伝子組換え作物に分類される *RKN* 遺伝子導入バレイショ由来の塊茎を供試し、メタボローム解析によって実質的同等性の評価試験を実施した。*RKN* 遺伝子は、ネコブセンチュウ耐性を持つバレイショ近縁野生種から単離された *LZ/NBS/LRR* 型に属する植物病害抵抗性遺伝子の一種である。*RKN* 遺伝子を導入されたバレイショ栽培種はネコブセンチュウ耐性を獲得するが、多様な *LZ/NBS/LRR* 型遺伝子ファミリーのそれぞれが担う機能そのものが明確に整理されているわけではなく、*RKN* 遺伝子導入によるネコブセンチュウ耐性獲得の分子メカニズムも不明である。さらに、*LZ/NBS/LRR* 型遺伝子の導入によって育種された耐病性作物に関する実質的同等性の評価に関する知見もほとんど報告されていない。

本年度は、独立した 3 系統の *RKN* 遺伝子導入バレイショから収穫された塊茎を供試し、*RKN* 遺伝子導入による代謝変動の有無を非ターゲット型メタボローム解析によって評価した。メタボローム解析はガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS)、および液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-LIT-TOF/MS) を使用した。GC-MS 法では、糖、アミノ酸、脂質などの中心代謝に関わる 96 種類の代謝物の定量分析を行い、LC-LIT-TOF/MS 法によってステロイドアルカロイドの定量分析を行った。

GC-MS による同定・定量分析の結果を多変量解析によって比較したところ、組換え体と非組換え体のメタボロームクラスターは明確に分離しなかった。一部の代謝物では、組換え体で有意に含量が増加したが、すべての系統に一貫して確認されることはなかったため、導入された *RKN* 遺伝子との関連性は不明である。また、LC-LIT-TOF/MS によるステロイドアルカロイドの定量分析の結果から、遺伝子組換えバレイショ塊茎における含量増加は認められなかった。以上の結果から、*RKN* 導入が原因と理由づけられる有意な代謝変動は認められないと結論づけた。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術によって、様々な有用形質が作物に導入されてきた。遺伝子組換え植物は、導入された遺伝子の機能の違いによって大きく 3 種類に分類しうる。まず、除草剤耐性・病害虫耐性などが付与されたものを第 1 世代、成分改変による栄養成分改変やワクチン産生などの

高付加価値を付与したものを第 2 世代組換え植物とするならば、転写調節因子や受容体などの導入によって乾燥・塩害などの環境ストレス耐性付与を目指した遺伝子組換え技術は、第 3 世代として分類される。

第 3 世代遺伝子組換え植物の実質的同等性評価は容易ではない。転写調節因子や受容体など

は、生理条件下で時間的・空間的に精密に制御された場合に発揮する分子機構が明らかにされている。一方、これらの遺伝子を恒常的・構成的に発現した場合には、どのような細胞機能に対して上位性を発揮しうるかは不明である。すなわち、導入遺伝子が担う分子機構を基にして設計された形質付与以外に、どのような細胞機能変動が起こるかは予測できず、意図しない細胞代謝機能の攪乱の可能性を排除できない。

メタボロミクス研究は遺伝子組換え作物の実質的同等性評価において必須の役割を担う。遺伝子組換え植物を食用とする際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、遺伝子組換え植物の実質的同等性の評価を目的とした様々な分析が行われてきている。その中で、生体組織中の代謝物総体（メタボローム）を一斉解析するメタボロミクス研究から得られる情報は、実質的同等性を評価するための基礎データとして極めて重要である。すなわち、メタボローム解析では、導入遺伝子機能に由来する代謝成分変動にとどまらず、それら以外の既知代謝物含量の比較とともに、未同定化合物の相対的な変動の把握も可能である。

本研究では、第3世代遺伝子組換え作物に分類されるネコブセンチュウ病耐性遺伝子（*RKN*）組換えバレイショ塊茎のメタボローム解析を実施した。*RKN* 遺伝子は、ネコブセンチュウ耐性を持つバレイショ近縁野生種から単離され、*RKN* 遺伝子導入されたバレイショ栽培種はネコブセンチュウ耐性を獲得する。*RKN* 遺伝子は植物病害抵抗性遺伝子の一種である *LZ/NBS/LRR* 型に属する。しかし、多様な *LZ/NBS/LRR* 型病害抵抗性遺伝子それぞれが担う生理機能が完全に解明されているわけではなく、*RKN* 導入によるネコブセンチュウ耐性獲得の分子メカニズムも不明である。

*RKN*組換えバレイショを供試した統合オミクス解析によって、*LZ/NBS/LRR*型耐病性遺伝子を

利用した第3世代遺伝子組換え作物の実質的同等性と安全性の評価に関する重要な知見が得られる。

B. 研究方法

<供試試料>

過剰発現用 35S プロモーター下流にネコブセンチュウ耐性遺伝子 *RKN* を挿入したシャトルベクターを用いて、アグロバクテリウム法により形質転換されたバレイショ植物体のうち、*RKN* 遺伝子高発現系統として R16, R34, R38 の3系統、および非組換え体 1 系統 (NT) を本実験に供した。組換え体および非組換えバレイショは筑波大学（生命環境科学研究科遺伝子実験センター）隔離温室内で生育・収穫された。採取された塊茎（直径約 30 mm）の表皮を除去し、約 10 mm x 10 mm x 1 mm の切片に裁断した後、-80 °C で保存した。

<方法>

バレイショ塊茎に含まれる化合物の抽出

試料約 100 mg 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。内部標準物質として 2 mg/mL リビトールを加えた 80%メタノールを磨砕組織の 50 倍容になるように加えた。70 °C で 15 min 加温した後、フィルター（Advantec, DISMIC-13JP, pore size; 0.2 μm）濾過することによって粗抽出液を得た。抽出試料は-80 °C で保存した。

GC-MS 分析用誘導体化

粗抽出液 500 μl を凍結乾燥した後、無水ピリジンに溶解したメトキシアミン塩酸塩（20 mg/ml）を 40 μl 加えた。試料を完全に溶解後、30 °C で 90 min インキュベートした。さらに、40 μl の N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド + 1% トリメチルクロロシランを加え 37 °C で 30 min インキュベートした。

質量分析実験

調製した抽出液は、Ion-trap GC-MS (Agilent 社製 Saturn 2000) 分析と LC-LIT-TOF/MS (Hitachi 社製 NanoFrontier L) 分析に供した。GC-MS 分析においては、得られたマスプロトグラムについて、市販標準物質とのフラグメントピークの比較と検出時間により化合物の同定を行った。同定された化合物の相対含有量は、各イオンピークの面積値を内部標準化合物として加えたリビトールの面積値との相対値として求めた。

ナス科植物であるパレイショは、毒性を持つステロイドアルカロイド類を産生する。ステロイドアルカロイド定量には、LC-LIT-TOF/MS を用い、市販ソラニン ($m/z = 868.5$) のフラグメントイオンピーク強度について作製した検量線を用いて試料中のソラニン含量を計算した。 α -ソラニンと α -チャコニンはソラニジンをそれぞれのアグリコンとし、異なる3つの六単糖が結合した共通の構造を持つ。チャコニン含量は、各フラグメントイオンピークの合計値についてソラニン検量線から算出した。

Ion-trap GC-MS 分析条件

インジェクション温度 230°C, インターフェース温度 270°C, He ガス流速 (1.0 mL/min), カラムオープン (70°C 5 min; 70°C から 330°C まで 5°C/min で上昇, 330°C で 2 min 保持, 質量範囲 $m/z = 40 - 650$)。カラムは FACTOR FOUR column (30 m, 内径 0.25 mm, Agilent 社製) を用いた。クロマトグラムとスペクトル解析には Saturn Work Station ver. 6.3 (Varian 社製) を用いた。

LC-LIT-TOF/MS 分析条件

カラムは Cadenza CD-C18 (Intakt 社製 150 x 2 mm, 3 μ m) を用いた。カラム温度 40°C, 流速

0.19 mL/min, 溶出溶媒として A 液:H₂O/0.1% ギ酸, B 液; アセトニトリル/0.1% ギ酸を用い, 0 - 5 min; A:B = 95%:5%, 5 - 50 min; A:B = 95%:5% → A:B = 60%:40%の直線勾配溶出を適用した。データ処理には Nano Frontier Data processing を用いた。

統計処理

組換え体 (R16, R34, R38) および非組換え体 (NT) の各試料について、それぞれ独立に3反復の分析操作を行った。

多変量解析として3反復実験で得られた各同定化合物における相対含有量の平均値について、DrDMass⁽¹⁾を用いて主成分分析を実施した。

組換え体において同定された化合物の相対含有量における変動の有意差判定は、t 検定によって評価した。各組換え体 (R16, R34, R38) と非組換え体 (NT) の組について、GC-MS 分析により得られた化合物の相対含有量について統計検定量を計算した。計算には Microsoft EXCEL (Microsoft 社) を用いた。検定統計量の絶対値が 3.747 以上のものを有意水準 1% ($p < 0.01$), 2.132 以上のものを有意水準 5% ($p < 0.05$) ので有意差があるとした。

C. 結果

GC-MS, LC-LIT-TOF/MS メタボローム解析プラットフォームの構築

生体試料中のメタボローム解析のため、標準化合物を選定した。生化学的性質より7つのカテゴリーを設定し、代謝経路、文献情報などをもとに GC-MS では 96 種類、LC-LIT-TOF/MS では 39 種類の化合物を選定した (Table 1)。それらの市販化合物を入手し GC-MS および LC-LIT-TOF/MS 分析によって、それぞれの溶出時間、マススペクトル情報などを取得し、既知化合物の分析条件を整備した。本研究における化合物同定数は、パレイショ塊茎メタボロームを構成する代謝物の網羅性として十分なもので