

若干高い値を示していた（表2）。

昨年度までに実施された遺伝子組換えジャガイモ（品種：Desiree）の分析結果と今年度の分析結果（品種：メイクイン）を統合し、差異を示す成分や要因の検討を行った。その結果、品種間での比較を行った場合に炭水化物($p < 0.05$)と脂質($p < 0.01$)の含量に t 検定で有意差が認められた。組換え体と非組換え体、屋外栽培と網室栽培と言った要因ではどの成分にも有意差が見出されなかった。

D. 考察

ジャガイモの食品成分について、遺伝子組換えによる有意な差異は認められず、品種間差の方が栄養成分に影響を及ぼすと考えられる。一方、RBP 導入遺伝子組換えイネにおいては、微量元素の脂質に若干の変動が認められた。しかし、生育環境などの外的要因を検討しておらず、当該差異が意味のあるものであるかはジャガイモ度と同様の評価を行う必要があると考えられる。また、多くの農作物は多様な品種が流通しており、比較の対象を何処に据えるかによって、その判断が大きく変わる。食品は医薬品とは異なり、その成分は画一的に調整することが出来ない。成分へ与える影響が天候、土壌、収穫後の貯蔵など、様々な要因が影響を及ぼすと考えられる。

E. 結論

栄養成分について、今回分析した遺伝子組換え体では変化が認められなかった。ある食材の持つ幅は、品種、産地、作柄、貯蔵などで異なるため、基準をどう定めるかを明確にする必要が有ると思われる。また、食材の水分含量は産地、作柄、貯蔵などで大きく変わってしまう事が明らかと

なったことから、乾重量ベースで比較すべき成分についても規定する必要があると考えられる。

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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 白米の5栄養成分とエネルギー

	エネルギー	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分
一般ほ場	357 kcal	15.2 g	6.9 g	1.1 g	76.4 g	0.4 g
網 NT	377 kcal	10.7 g	6.4 g	1.2 g	81.3 g	0.4 g
室 RBP	393 kcal	7.1 g	7.4 g	1.6 g	83.3 g	0.6 g
食品成分表	356 kcal	15.5 g	6.1 g	0.9 g	77.1 g	0.4 g

食品成分表は五訂日本食品標準成分表（平成 12 年：科学技術庁資源調査会編）を参照

表2 水分を除いた白米の主要栄養成分

	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分
一般ほ場	8.1 %	1.3 %	91.0 %	0.5 %
網 NT	7.2 %	1.3 %	90.1 %	0.4 %
室 RBP	8.0 %	1.7 %	89.7 %	0.6 %
食品成分表	7.2 %	1.1 %	91.2 %	0.5 %

食品成分表は五訂日本食品標準成分表（平成 12 年：科学技術庁資源調査会編）を参照

産地別栄養成分

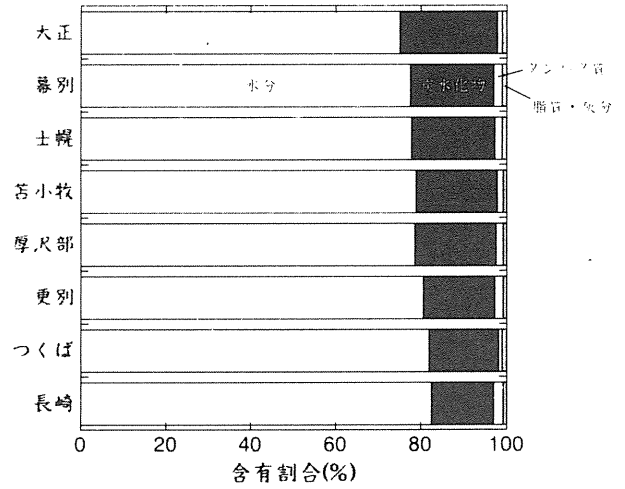


図2 8産地の栄養成分比較

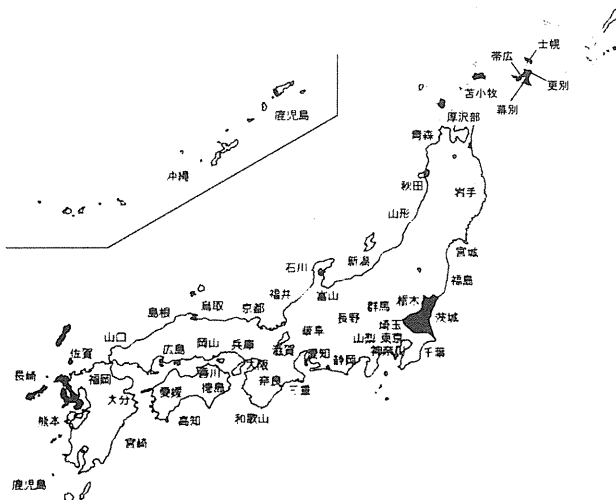


図1 分析に用いた非組換えメークイン産地

栄養成分構成

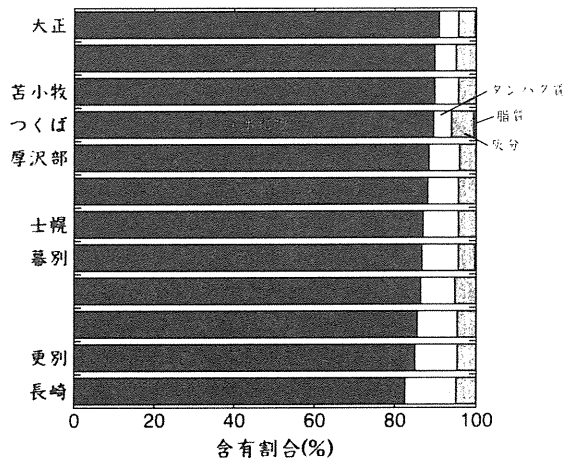


図3 水分を除いた栄養成分比較

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 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:近年数多くの遺伝子組換え植物が開発され、食品としても流通している。また、最近では遺伝子組換え植物同士を交配したいわゆる「スタック」品種も作出され始めている。しかし、これら遺伝子組換え植物同士を交配させた品種において組換えた遺伝子の影響がどのようになるかについて研究されていない。そこで、本研究ではタバコを用いてスタック品種のモデルとなる遺伝子組換え植物を作出することと、それらの植物体を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、遺伝子発現量の変化を俯瞰した場合には、遺伝子を組換えた植物体と、それらの交配後代であるスタック品種とにおいて、大きな遺伝子発現のプロファイル変化は見られなかった。また、スタック品種において遺伝子非組換え体と比較して明らかに発現量が増大していた遺伝子の約半数は、それらの親の世代でも発現量が増加していた遺伝子であり、遺伝子非組換え体と比較して変動量の大きかった遺伝子の多くが後代でもその変動量を保っていることが判明した。

協力研究者

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

遺伝子組換え植物が食品として流通されるようになって久しい。現在までに、さまざまな遺伝子組換え植物が生産され流通している。これまで開発され実用化されてきた遺伝子組換え植物は、害虫抵抗性や農薬抵抗性を持たせることで、生産性を向上させたいわゆる“第一世代”と呼ばれるものや、高トリプトファン含有コメやゴールドライスなどに代表される、付加価値を持たせたいわゆる“第二世代”のものが中心であった。近年では、乾燥や高塩濃度に耐性を持たせるために、転写調

節因子や RNA 結合タンパク質などをコードした遺伝子を導入したいわゆる“第三世代”の遺伝子組換え植物の開発が盛んになされている。さらにはこれらの遺伝子組換え体を交配し、2 種類以上の組換え遺伝子を持ったいわゆる“スタック品種”も盛んに作出され始めている。“第一世代”“第二世代”の遺伝子組換え植物では、基本的には導入した遺伝子から転写・翻訳されたタンパク質自身の働きであるか、または目的とする代謝経路の中の一つの反応を触媒する酵素によって形質を付与されたものであるため、導入した遺伝子の影響がどのようなものであるかが明確であった。しかし“第三世代”遺伝子組換え植物では転写調節因子や RNA 結合タンパク質など、一つの代謝経路のみならず他種の代謝経路に影響を及ぼすものや、どの

ような他種のタンパク質の翻訳にかかわる可能性が高いものなど、それらの作用点が明確でない点が多い遺伝子が利用されている。このため、これら“第三世代”やそれを交配した“スタック品種”の遺伝子組換え植物の食品としての安全性を評価する場合、入れた遺伝子そのものの効果だけではなく、その効果によって引き起こされるであろう多くの代謝経路への影響を検討する必要がある。そのため、遺伝子を組換えた影響を検討するためには一つの代謝系に焦点を絞らない網羅的な解析が必要となる。そこで、本研究では昨年度までに遺伝子組換え体の安全性の評価にポストゲノム的手法が適応可能であるかについて検討を行ってきた。

そこで、本研究では“第三世代”の遺伝子組換え植物の“スタック品種”の一つのモデルとし遺伝子組換えタバコを作出し、それらを交配することによってそれらの両遺伝子を持った“スタック品種”を作成し、作成したスタック品種とそれらの親系統を用いてトランスクリプトーム解析を行うことを目的として実験を行った。本来は実際に食品として流通する可能性が高い遺伝子組換えトウモロコシやコメなどで“スタック”品種を作成するのが望ましいが、これらの植物ではスタック品種を作成するまでに少なくとも数年以上かかるため、本研究では形質転換効率がよく生育も早く、交配実験も比較的容易であるタバコを用いた。組換え遺伝子として、これまでに当研究室において、大腸菌を用いた機能スクリーニング法によって獲得された大腸菌への塩ストレス耐性を向上させる遺伝子として耐塩性植物であるアッケシソウから単離されたファシクリンライクアラビノガラクタンタンパク質 (SeFLA) とアイスプラントから単離された葉緑体移行型 RNA 結合タンパク質 (McRBP) を用いた。

B. 研究方法

B-1 遺伝子組換えタバコ導入用コンストラクトの構築

植物導入用ベクター pABN-Hm1 (Mita et al. *Plant Physiology*, 107: 895-904, 1995) の β -amylase プロモーター配列から GUS 遺伝子配列を除去し、その部分にカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に SeFLA あるいは McRBP cDNA を連結した pAB35S/SeFLA と pAB35S/McRBP を構築した (図 1)。

B-2 遺伝子組換えタバコの作出とそれらの交配によるスタック品種

構築したコンストラクトをアグロバクテリウム LBA4404 へ導入し、形質転換したアグロバクテリウムをタバコリーフディスクに感染させることで、タバコ植物体への遺伝子導入を行った。抗生物質であるハイグロマイシンを含む個体培地上で再生してきたシュートを新しい培地へ移植し、培養瓶の中で培養した。導入した遺伝子の発現量の高いライン L11 (SeFLA 組換え体) と R74 (McRBP 組換え体) をそれぞれ自家受粉することにより、形質転換から 3 世代後のホモラインを獲得した。これら T3 世代の L11 と R74 について他家受粉を行い、それらのスタック品種を作出した。作出したスタック品種の種子を 5% の次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて 20 分間滅菌したのち滅菌水で 7 回洗浄した後に MS 個体培地上に播種し、発芽したものについて個体培地を入れた培養瓶へ移植し、葉が 12 枚程度つく程度まで培養を行った。培養した遺伝子組換えタバコの葉のうち上から 3 枚を除いた 4 枚目から 1 枚ずつ合計 9 枚収集し、液体窒素で急速冷凍した。それらのサンプルは 3 枚ずつトランスクリプトーム解析、プ

ロテオーム解析、メタボローム解析に供した。

B-3 RT-PCR による組換え遺伝子 mRNA 転写量の確認

凍結してあった遺伝子組換えタバコの葉から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社)を用いて total RNA を抽出した。抽出方法はキットのマニュアルに従った。500 ng の抽出した total RNA を鋳型として TaKaRa RNA PCR kit (AMV) ver. 3.0 (タカラバイオ社) を用いて reverse-transcription PCR を行った。方法はキットのマニュアルに従った。により用いたプライマーの組み合わせは SeFLA: forward, 5'-GACGATTCGAGCGACGGAGGAGAGA-3', reverse, 5'-ATTCCCTTTTCATATTCATTACCC-3', McRBP: forward, 5'-GAAAGGCCTCCTCGAGAGTT-3', reverse, 5'-GAACTACCGGTGTCAAATATGAGC-3', actin: forward, 5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3', reverse, 5'-AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3'であった。PCR の条件は 95°C で 3 分間の熱変性の後、92°C、30 秒、58°C、30 秒、72°C、1 分を 35 サイクル行った。増幅産物は 1.2%のアガロースゲル電気泳動によって分離し、確認した。

B-4 遺伝子組換えスタック品種を用いたトランスクリプトーム解析

抽出した total RNA を DNA マイクロアレイ解析に供した。DNA マイクロアレイ解析はアジレント社製の Tobacco (*Nicotiana tabacum*)オリゴ DNA マイクロアレイ (プローブ数: 29,488、プローブ長: 60 nt) を用いて DNA チップ研究所の DNA マイクロアレイ解析系を利用した。

C. 研究結果

SeFLA を導入したタバコと McRBP を導入した

タバコの葉から RNA を抽出し、RT-PCR 法によりそれぞれの遺伝子の発現量を検討したところ、ライン L11 と R74 において SeFLA,McRBP mRNA の高い蓄積が認められた (図 2)。そこで、これらのラインの自殖後代からホモの系統を選抜し、交配親として使用した。花粉親として L11 を用いた後代である LR1 と R74 を用いた後代である LR2 についてそれぞれの植物個体の葉における SeFLA と McRBP の遺伝子発現を検討したところ、いずれの遺伝子もそれらの親世代と同等の mRNA の転写が確認された (図 2)。これらのライン L11, R74, LR1, LR2 について耐塩性が向上しているかについて検討を行うために、培地上に無菌播種し、発芽後 8 日の植物体を 250 mM の NaCl を含む培地と含まない培地へ移植した。その後 20 日間育成した後にそれらの個体の根の長さを測定した。その結果、SeFLA あるいは McRBP を組換えた個体 (L11, R74) では遺伝子組換えをしていない個体 (WT) と比較して根が長く伸びており、生重量も増加していた。また、それらの交配後代 (LR1, LR2) においてはさらに根がよく伸長し、生重量も増加していた (図 3)。また、その傾向は NaCl を含まない培地、含む培地において同様であった (図 3)。このことから、SeFLA, McRBP とともに塩ストレスの有無にかかわらず植物体の生育を向上させているものと思われた。そこで、生育の良い条件である NaCl を含まない培地で育成した植物体をトランスクリプトーム、プロテオーム (国立医薬品食品衛生研究所にて実施)、メタボローム解析 (大阪府立大学にて実施) に供することとした。

WT, L11, R74, LR1 の葉 3 枚ずつをトランスクリプトーム解析に供した。単色法によってマイクロアレイ解析を行って観測されたシグナルをそれぞれの系統ごとに平均化を行った。平均化した各

系統においてWTを基準としたスクータープロット解析を行った。その結果、WTと比較した場合のL11, R74における遺伝子発現プロファイルとLR1における遺伝子発現プロファイルに大きな変化は認められなかった。遺伝子発現の変動量がfold change 4.0以上になるものについて着目し、ベン図を作成した(図4)。遺伝子発現が増加した遺伝子数は、L11で124、L74で254、LR1で237であった。L11とR74の交配後代であるLR1において、変化量の大きかった237遺伝子のうち、116についてはL11あるいはR74でも発現量の高い遺伝子であった。一方、遺伝子発現量が減少した遺伝子数は、L11で283、R74で476、LR1で504であった。LR1で遺伝子発現が減少した504の遺伝子のうち、294についてはL11あるいはR74においても発現量が減少しているものであった。

D. 考察

SeFLAあるいはMcRBPを導入した遺伝子組換えタバコでは、NaClの有無にかかわらず非遺伝子組換え体に比較してその成長が良かったことから、ストレス耐性の向上というよりは、生育がよくなったことにより、結果としてストレスがかかった場合における生存率が高くなるものと考えられた。これらの効果がどのようなメカニズムによってもたらされるのかについては不明のままであるが、SeFLAとMcRBP組換えタバコの交配後代においては、さらなる生育の向上が見られたことから、これらの遺伝子による効果は別々のメカニズムに基づくものであると思われた。マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的な解析を行った。その結果、SeFLAとMcRBP遺伝子を組換えた個体間、またそれらの交配後代の個体において遺伝子発現プロファイルの大きな変化は認められず、交配後代の個体において遺伝子発

現が大きく変化していた遺伝子の約半分(増加したものでは49%、減少したものでは58%)についてはそれらの親の個体でも同様に遺伝子発現量が変化していた。すなわち、親世代で発現量が変化していた遺伝子の多くが交配した後代に遺伝し、発現量が高いあるいは低いまま維持されたものと考えられた。

これまでに食品として流通するような遺伝子組換え植物についてそれらを交配して作出されるスタック品種について、その親の世代で導入された遺伝子の発現、また導入されたことによって発現が変動した遺伝子がどのように遺伝するかについての知見はなかった。本研究において、遺伝子組換え植物同士の交配後代において、親の世代で発現量が変化した遺伝子の多くが引き継がれていることが示唆された。今後、交配後代の個体のみで遺伝子発現量が大きく変動した遺伝子がどのようなものであるか、またそれらの遺伝子発現変動量が遺伝子を組換えていない個体を交配した場合に引き起こされる遺伝子発現変動量と比較したばあい、許容される範囲に収まるのかについて精査する必要があるものと考えられた。

E. 結論

研究室レベルで頻用されるタバコ植物体を用いて、いわゆる「第3世代」の遺伝子組換え個体を作成し、さらにそれらの交配後代を獲得した。それら親の世代と後代についてトランスクリプトーム解析を行った結果、遺伝子非組換え体と比較して変動量の大きかった遺伝子の多くが後代でもその変動量を保っていることが判明した。

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

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

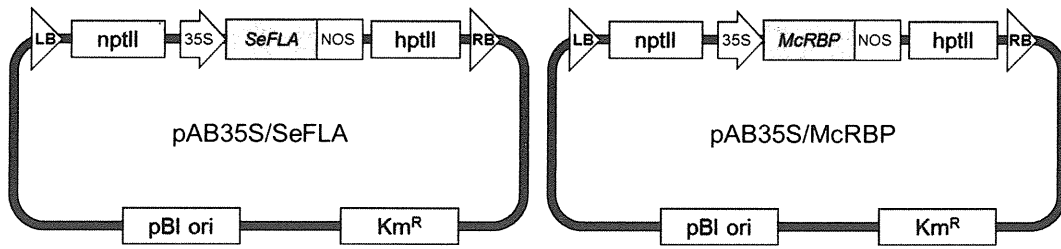


図1 遺伝子組換えに用いたベクターコンストラクト

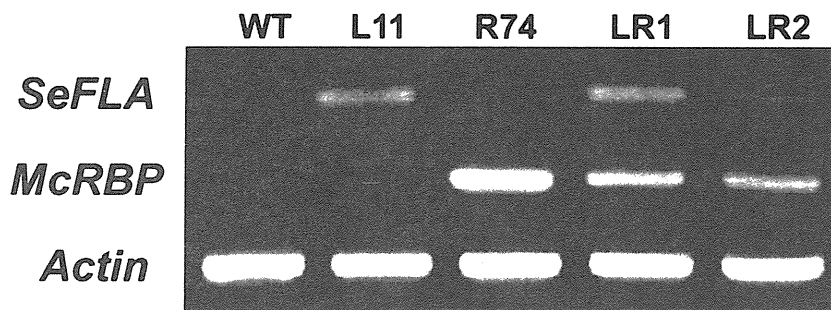


図2 遺伝子組換えタバコとスタック品種における導入遺伝子発現の確認

L11: SeFLA 遺伝子組換え体、R74: McRBP 遺伝子組換え体、LR1: L11 と R74 の交配後代

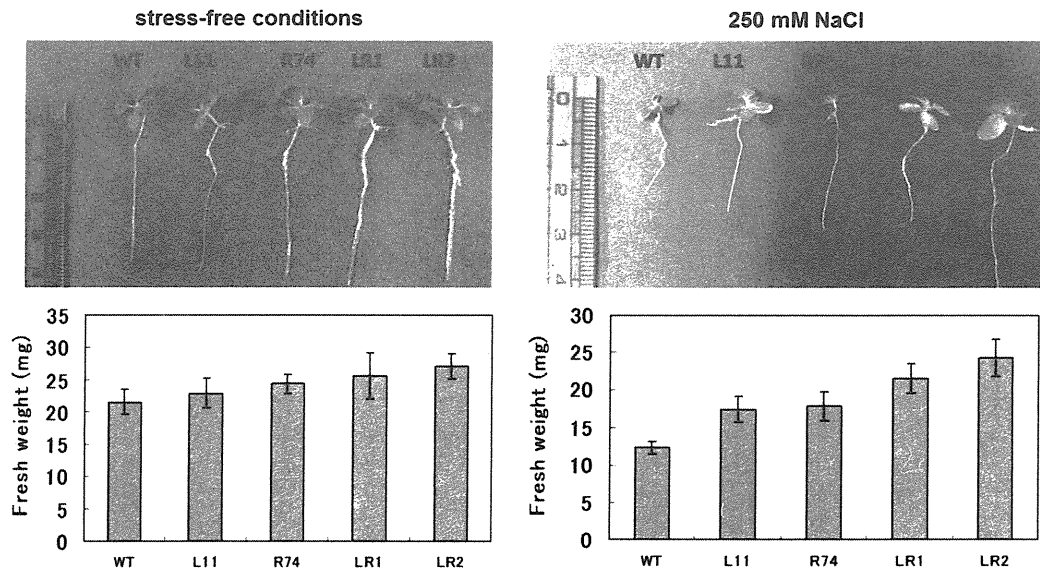


図3 遺伝子組換えタバコの生育試験

NaCl を含まない培地に播種し、発芽後 8 日目の個体を NaCl を含む培地と含まない培地へ移植し、20 日後に根の長さとし重量を測定した。

L11: SeFLA 遺伝子組換え体、R74: McRBP 遺伝子組換え体、LR1: L11 と R74 の交配後代

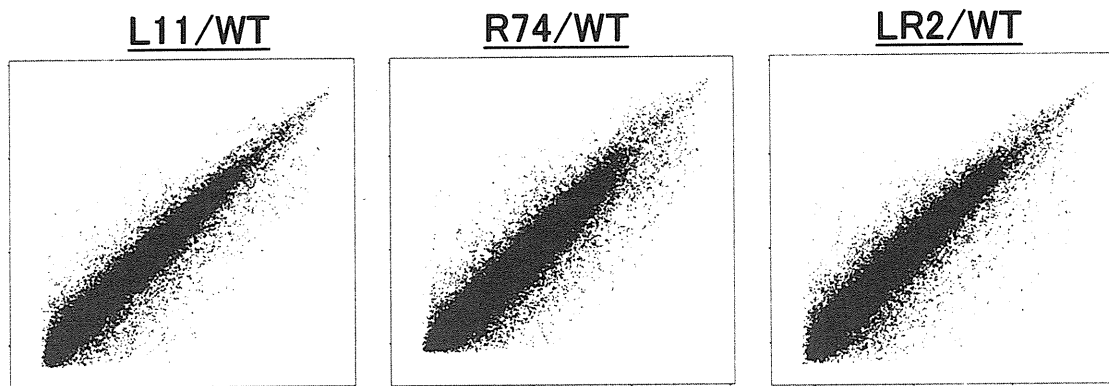


図4 スキャタープロットによる遺伝子発現プロファイル解析

遺伝子組換え体 (L11, R74) とそれらの交配後代 (LR2) における遺伝子発現量縦軸に、遺伝子非組換え体 (WT) の遺伝子発現量と横軸にプロットした。

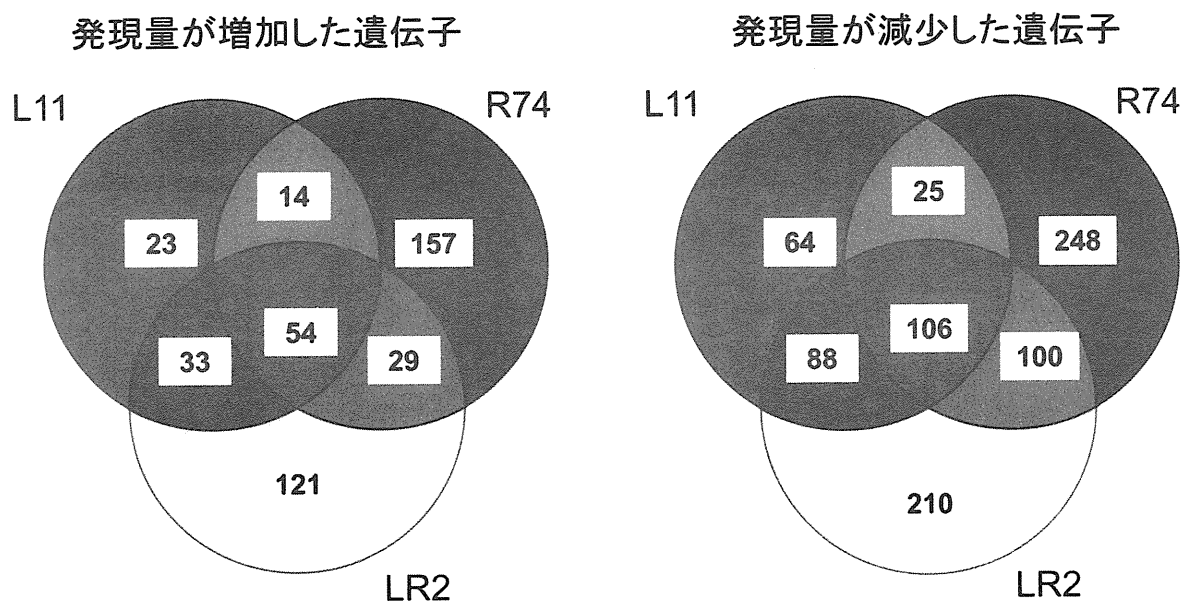


図5 遺伝子組換え体とそれらの交配後代における発現量が大きく変化した遺伝子数

L11: SeFLA 遺伝子組換え体、R74: McRBP 遺伝子組換え体、LR1: L11 と R74 の交配後代

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 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:本研究は、質量分析を基盤としたメタボローム解析によって、遺伝子組換え作物における代謝動態変化の有無を明らかにし、遺伝子組換え作物の安全性評価の基礎データとすることを目的としている。まず、SeFLA(アラビノガラクトナンタンパク質)遺伝子組換えタバコ、McRBP(リボソーム結合タンパク質)遺伝子組換えタバコ、それらのスタック品種、および非組換え体タバコ緑葉から 80%メタノール抽出物を調製しメタボローム解析に供した(103 種類の化合物由来イオンピークを検出し、53 種類の代謝物を同定・定量)。その結果、各系統は独自のメタボロームを形成したが、葉位による代謝活性の差はそれらよりもはるかに大きかった。McRBP 系統では、Val, Ile, 2-oxoglutaric acid, Asp, Glu, 2-amino adipic acid, sucrose レベルが顕著に上昇しており、同化窒素の輸送、あるいはグルタチオン経路の活性化が示唆された。SeFLA 系統では 2-oxoglutaric acid, putrescine, 2-amino adipic acid, inositol, sucrose レベルが上昇していた。これらの代謝物増減はスタック系統でも保持されていた。続いて、塩ストレス環境下で栽培された McRBP 組換えイネ系統と非組換えイネから収穫された玄米の代謝物プロファイルを解析した。80%メタノール、およびメタノール/クロロホルム(3:1)の 2 種類の抽出溶媒を用いて質量分析用抽出液を調製し、メタボローム解析を実施した。メタノール抽出液から 88 種類の化合物由来イオンピークを検出(54 種類を同定)、メタノール/クロロホルム抽出液から 26 種類の化合物由来イオンピークを検出(7 種類を同定)した。McRBP 組換えイネと非組換えイネの両者で、塩ストレスによって大きく代謝プロファイルが変動すること、その要因として TCA 回路代謝物レベルの変動が示唆された。

以上の結果から、導入遺伝子の種類によらず、ストレス応答に関わる代謝活性が亢進(例えば GSH 系路)していることがわかった。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術は、生物種の垣根を越えて様々な有用形質を導入することを可能にした。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。初期の遺伝子組換え植物作出には、酵素反応などの明確かつ固有の生化学的機能を持つタンパク質の遺伝子が用いられた。第 1 世代の遺伝子組換え作物を代表する例として、除草剤耐性・病害虫耐性など

の付与が挙げられる。さらに、複数の代謝酵素遺伝子の導入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する技術は第 2 世代組換え植物開発に結び付いた。近年、ゲノム情報の利用やシステム生物学的戦略によって、転写調節因子や受容体などを導入し、細胞機能を包括的に改変し乾燥・塩害などの環境ストレス耐性付与を目指す研究が急速に発展している。さらに、異なる有用組換え形質を保有する品種の交配によって

作出されるスタック品種の開発も急速に進んでいる。これらは第3世代遺伝子組換え植物として分類される。

第3世代遺伝子組換え植物の実質的同等性評価は、第1世代や第2世代組換え植物を対象とした場合と比べると、容易ではない。野生型植物では、時間的・空間的に厳密に制御された転写調節因子や受容体等が担うストレス応答の分子生理機構が解明されつつある。一方、これらの遺伝子を恒常的に発現した場合には、生理条件下では起こり得ない組合せの細胞機能に対して上位性を発揮する可能性も否定しえない。言い換えるなら、導入遺伝子が担う分子機構を基にして期待される有用形質以外の代謝変動は予測できない。したがって、意図しない細胞代謝機能の攪乱の有無を評価するための技術基盤が必須である。

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、未同定化合物の蓄積量の変動把握も可能である。

本研究では、第3世代遺伝子組換え作物に分類されるアイズプラント由来リボソーム結合タンパク質（McRBP）遺伝子組換えイネ、アッケシソウ由来の新規アラビノガラクトナンタンパク質（SeFLA）遺伝子組換えタバコ、McRBP 遺伝子組換えタバコ、それらのスタック品種を供試し、メタボローム解析を実施した。

McRBP 組換えイネ、SeFLA 遺伝子組換えタバコは、野生型に比べて顕著な塩類ストレス耐性、高浸透圧耐性を示すが、耐性増強のメカニズムは十分には説明されていない。統合オミクス解析によ

って、このような有用遺伝子発現によるストレス耐性育種、さらにそれらの形質を集積したスタック系統の細胞代謝機能の比較が可能となり、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>

SeFLA 組換えタバコ系統（L11）、McRBP 組換えタバコ系統（R74）、スタックタバコ系統（SeFLA 系統と McRBP 系統の交配によって作出された LR1 と LR2）、非組換えタバコ（WT）由来の緑葉（2枚目、5枚目、8枚目）を供試した。また、McRBP イネ（系統1、系統2）および非組み換え系統（日本晴）は、ストレス処理栽培（200 mM NaCl, 30h 処理）と通常条件栽培を行い、収穫された玄米を供試してメタボローム解析を実施した。分析試料はすべて、東京農工大・小関良宏教授から提供していただいた。

<方法>

化合物の抽出

凍結保存試料（約 30 mg）を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 リピトールを加えた 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・ μ m）濾過することによって粗抽出液を得た。玄米は 80%メタノール抽出に加えて、メタノール/クロロホルム（3:1）抽出を実施し、脂溶性化合物の分析範囲を拡大した。試料は-80°C で保存した。抽出物は3連で調製し、GC-MS 分析に供した。

GC-MS 分析用誘導体化

粗抽出液 500 μ L 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 μ L 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 μ L 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、得られたマスクロマトグラムについ
て、市販標準物質とのフラグメントピーク比較と
検出時間比較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。

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 μm) 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

組換え体および非組換え体の各試料について、そ
れぞれ独立に 3 反復の分析操作を行った。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
有量変動の有意差は、t 検定によって評価した。
各組換え体と非組換え体の組について、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。

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。

本研究のメタボローム解析 (同定・定量) のた
めの代謝物網羅性は、先行研究と比較して全く遜
色は無い。^(2,3 4,5,6)

Table 1. メタボローム解析プラットフォームにおける同定化合物のリスト(カテゴリー名を太字で示した。括弧内の数字はカテゴリーに含まれる化合物の個数)。

(1)GC-MS 分析対象化合物

Amino acid(41)	<i>N</i> -Acetyl-proine	Sucrose	4-methyl-2-oxo-pentanoate
2-Amino adipate	<i>O</i> -Acetyl-serine	Trehalose	Campesterol
5-Oxo-proline	Ornithine	Xylose	1-Palmitoylglycerol
Agmatine	Phenylalanine	Gluconic acid	β -Sitosterol
Alanine	Pipecolate		Stigmasterol
Amino adipate	Proline	Energy (8)	Octadecanoic acid
Arginine	Putrescine	Citric acid	Myo-inositol
Asparagine	Pyroglutamic acid	Fumaric acid	Inositol-1-phosphate
Aspartic acid	Serine	α -Ketoglutarate	Palmitic acid
β -Alanine	Threonine	Malic acid	Stearic acid
β -Cyanoalanine	Tryptophane	Succinate	
Betaine	Tyrosine	3-Ureidopropionate	Cofactors (7)
Cysteine	Valine	Glutaric acid	Ascorbic acid
GABA	Urea	Phosphate	Dehydroascorbate
Glutamic acid			Threonate
Glutamine	Carbohydrate (15)	Nucleotide (8)	α -Tocopherol
Glycine	Erythritol	Xanthine	γ -Tocopherol
Glycylglycine	Fructose	Hypoxanthine	Phytonadione
Histidine	Fructose-6-phosphate	Adenine	Pyridoxine chloride
Homoserine	Galactose	Guanine	
Hydroxyproline	Glucose	Guanidine	Xenobiotics (6)
Isoleucine	Glucose-6-phosphate	Urate	glycerol 2-phosphate
Lysine	Glyceric acid	Allantoin	2-Pyrrolidinone
Methionine	Inositol	Uracil	3-Idolylacetoneitrile
N-6-Trimethyllysine	Maltose		Sedoheptulose anhydride
<i>N</i> -Acetyl-glutamine	Ribose	Lipid (11)	Methyl nonadecanoate
<i>N</i> -Acetyl-glycine	Sedoheptulose-7-phosphate	Glycerol 3-phosphate	Ribitol

(2)LC-LIT-TOF/MS 分析対象化合物

Amino acid (20)		Nucleotide (5)	Cofactors (5)
3-Ureidopropionate	Glutathione	Adenosine	Nicotinamide ribonucleotide
Tyramine	Aspartylphenylalanine	1-Methyladenosine	NADH
3-Methoxytyrosine	Leucylproline	2'-Deoxyadenosine	Riboflavin
3-Methyl-2-oxovalerate	Threonylphenylalanine	Adenosine 3'-monophosphate	Pantothenate
4-Methyl-2-oxopentanoate	Glutamylvaline	Adenosine 5'-monophosphate	Pyridoxate
S-Adenosylhomocysteine	γ -Glutamylleucine		
Argininosuccinate	γ -Glutamylcysteine	Lipid (3)	Xenobiotics (4)
<i>N</i> -Acetylmethionine	γ -Glutamylphenylalanine	3-Hydroxytetradecanedioate	5-Formylsalicylate
<i>N</i> -Acetylproline		Choline phosphate	Jasmonic acid
5-Methylthioadenosine	Carbohydrate (2)	Glycerophosphorylcholine	Sinapate
Spermidine	Raffinose		Pheophorbide
4-Guanidinobutanoate	Maltotetraose		

SeFLA 組換えタバコ系統のメタボローム解析

遺伝子組換え作物試料として SeFLA 組換えタバコ系統 (L11), McRBP 組換えタバコ系統 (R74), スタックタバコ系統 (LR1, LR2), 非組換えタバコ (WT) の 5 種類のタバコ植物緑葉 (2 枚目, 5 枚目, 8 枚目) 供試し, 非組換え体量解析で比較した。第 1 主成分と第 2 主成分に

(WT) とのメタボローム比較を行った。それぞれの試料から 80%メタノール抽出画分を調製し GC-MS 分析に供した。103 種類の化合物由来イオンピークを検出し, 53 種類の代謝物を同定・定量した。

GC-MS 分析により得られた各系統のメタボロームについて主成分分析 (PCA) による多変についての散布図を Fig. 1A に示した (第 1 主成

分の寄与率 66.0%, 第 2 主成分の寄与率 (15.2%). 非組換え体と組換え系統を区別するような, 特徴のある違いは確認できなかった. 一方, 葉位(2枚目と5, 8枚目)による明確なメタボローム差が検出された.

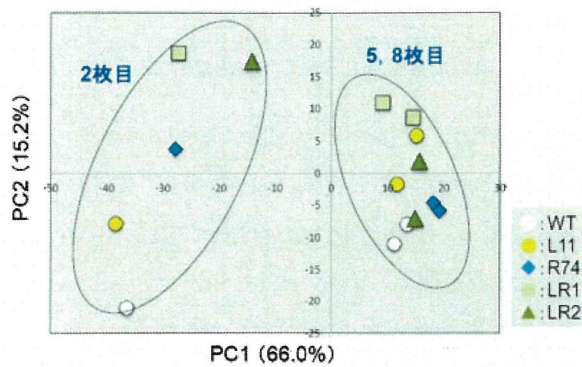


Fig. 1A. SeFLA 組換えタバコ系統メタボローム解析 (主成分分析: 第 1 主成分と第 2 主成分). WT (野生型), L11 系統, R74 系統, LR1 と LR2 (L11 と R74 の交配系統(スタック系統)比較).

第 2 主成分と第 3 主成分の散布図(Fig. 1B)では, 各系統間で明瞭なメタボローム形成の差異が認められた. これらは Fig. 1A と同様, 野生型と組換え体を区別するものではなく, あくまでもそれぞれの系統間でのメタボロームの差であった.

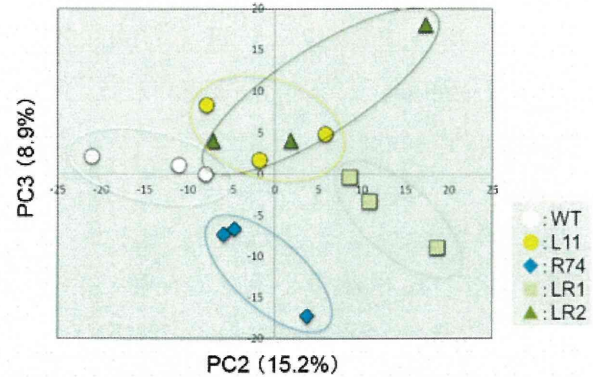


Fig. 1B. SeFLA 組換えタバコ系統メタボローム解析 (主成分分析: 第 2 主成分と第 3 主成分). WT (野生型), L11 系統, R74 系統, LR1 と LR2 (L11 と R74 の交配系統(スタック系統)比較).

Table 2. 遺伝子組換えタバコ抽出物中の化合物相対含有量の変動

	2枚目				5枚目				8枚目			
	L11	R74	LR1	LR2	L11	R74	LR1	LR2	L11	R74	LR1	LR2
L-Valine [2TMS]	-1.106	5.774	2.814	0.603	-3.070	5.063	-1.390	2.956	-3.325	3.881	-1.175	-3.816
Urea [xTMS]	-0.533	0.321	1.468	0.573	-0.544	-0.513	-0.591	0.680	-0.313	0.636	1.097	3.103
L-Alanine [3TMS]	2.430	2.786	1.708	3.306	0.889	1.325	0.678	-0.122	-1.588	0.091	-1.521	-3.160
L-Isoleucine [2TMS]	-2.445	4.908	0.811	-1.465	-4.477	3.790	-5.131	3.417	-1.646	2.355	0.054	-3.299
L-Proline [2TMS]	-0.330	-4.591	-4.763	-3.214	-1.307	-2.668	-3.825	1.247	-2.187	-3.584	-0.955	-3.635
DL-Glyceric acid [3TMS]	7.408	0.742	8.121	0.532	4.712	-0.836	3.438	1.247	0.180	-1.556	-0.188	2.640
Fumaric acid [2TMS]	-1.724	5.438	-3.980	-5.021	-0.517	-1.415	-1.483	1.472	-1.396	-0.972	4.472	0.996
N-Acetylproline [2TMS]	1.571	1.415	-0.933	1.983	-1.160	1.312	-2.838	1.517	-0.200	0.769	-0.423	-1.273
L-Serine [3TMS]	1.385	1.634	-0.325	1.789	-1.298	3.263	-3.745	1.123	-0.633	0.565	-0.200	-0.986
beta-Alanine [3TMS]	-0.176	1.136	-3.169	1.487	-3.743	5.737	-2.143	-0.921	-2.590	-0.029	-1.977	-1.968
Malic acid [3TMS]	-0.031	-0.417	-1.724	-0.847	0.428	0.291	3.453	1.565	-3.490	-13.119	-0.534	-0.137
Glutathione [xTMS]	-0.401	-0.628	-0.557	-2.434	0.719	-0.321	-0.406	-1.017	-3.843	-0.727	-0.676	-3.953
L-Glutamine [3TMS]	-2.200	-0.509	-3.732	0.171	-0.188	0.916	-2.104	-3.926	-0.798	-1.146	-0.331	-0.263
N-Acetyl-Glutamic acid	0.735	12.572	12.183	3.625	-1.813	1.411	1.595	0.718	0.135	0.549	1.988	1.280
L-Aspartic acid [3TMS]	0.744	-1.387	-0.124	-1.098	-0.275	-2.045	-0.473	-0.733	-0.172	-3.248	-4.855	3.398
meso-Erythritol [4TMS]	-0.269	-4.825	-2.211	-2.433	0.433	-1.653	-0.359	-0.633	1.742	-15.284	3.153	0.936
2-oxo-Glutaric acid [2TMS]	3.918	8.926	3.612	1.607	1.874	1.898	1.919	2.393	0.692	0.529	0.242	2.672
L-Asparagine [3TMS]	-0.181	6.715	2.397	1.143	-1.359	0.487	-0.124	0.233	-1.754	-0.447	0.323	0.038
L-Glutamic acid [3TMS]	-0.586	3.892	1.881	3.681	-0.658	1.116	-0.032	-0.403	0.897	0.832	2.037	3.575
Putrescine [4TMS]	2.978	-1.481	-1.072	-3.754	-2.605	3.784	-0.353	2.864	2.714	2.119	5.497	0.840
Citric acid [4TMS]	-0.571	2.685	1.963	-0.706	0.840	1.293	8.445	-0.035	1.311	0.982	-1.180	1.135
L-Proline [2TMS]	2.006	1.243	3.051	2.172	0.989	1.205	8.952	-2.130	-0.548	-0.794	-0.745	-0.994
D-Fructose [4TMS, 1ME]	0.191	0.143	-0.575	-2.196	2.224	-1.701	1.661	-0.715	-0.134	2.847	-1.954	-0.498
D-Ribose [3TMS, 1ME0]	0.191	0.117	0.685	-0.151	0.924	-2.426	1.189	-1.652	-1.940	-12.961	-2.710	-1.471
L-Ascorbic acid [4TMS]	-3.560	-4.307	-0.190	0.012	0.149	-1.721	1.985	0.955	-7.345	0.486	0.038	6.412
2-Amino adipic acid [2TMS]	3.518	14.570	8.417	9.059	-1.321	0.153	1.319	-0.972	-4.631	-3.135	-1.795	1.878
Inositol [6TMS]	9.741	-8.985	-8.178	7.159	2.639	-4.230	-4.365	0.173	4.091	-10.035	-4.286	-11.969
Sucrose [8TMS]	5.448	-5.831	30.720	5.958	1.272	0.035	3.127	0.993	7.333	-0.534	3.903	5.976

遺伝子組換え体と野生型の間の代謝物変動レベルの t 検定結果 (検定統計量を記載した). 有意差は有意水準 1%未満を (■) で, 5%未満を (■) の色で表した.

続いて、各化合物の相対含有量について、組換え体における有意な変動の有無を調べるために、非組換え体との間で t 検定による有意差検定を行った (Table 2)。

SeFLA 系統では、glyceric acid, 2-oxoglutaric acid, putrescine, 2-amino adipic acid, inositol, および sucrose レベルの上昇が認められた。一方、McRBP 系統では、Val, Ile, N-acetyl-glutamate, 2-oxoglutaric acid, Asp, Glu, 2-amino adipic acid, sucrose レベルが顕著に上昇していた。

着目すべき点として、これらの代謝物レベル増減の傾向は、両組換え系統の交配によって作出されたスタック系統でも保持されていた事が挙げられる。

RBP 組換えイネ玄米のメタボローム解析

McRBP 組換えイネ系統 (二種類) と非組換え体 (日本晴) から収穫された玄米のメタボローム比較を行った。それぞれの試料から 80% メタノール抽出物およびメタノール/クロロホルム抽出物を得て、GC-MS 分析を実施した (3 回の独立した抽出実験と 3 回繰り返し測定)。玄米メタノール抽出液から 88 種類の化合物由来イオンピークを検出 (54 種類を同定)、メタノール/クロロホルム抽出液から 26 種類の化合物由来イオンピークを検出 (7 種類を同定) した。イネは、塩ストレス処理 (200 mM NaCl, 30h 処理) を施し、通常栽培実験区と比較した。

組換え体 (系統1, 系統2) と非組換え体を区別するようなメタボローム差は検出されなかった (Fig. 2)。一方、それぞれの系統で、塩ストレス処理によって明確なメタボローム変動が起こったことがわかった。

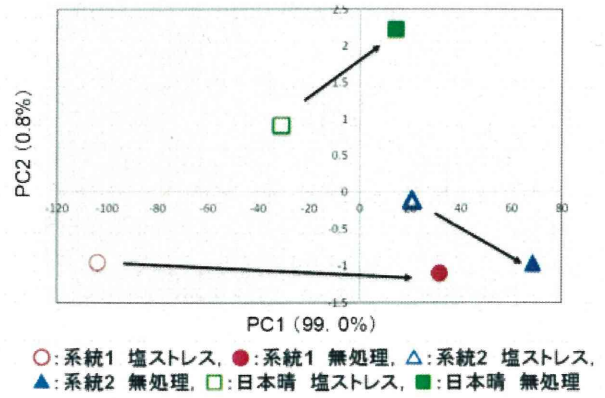


Fig. 2. RBP 組換えイネ玄米のメタボローム解析 (主成分分析: 第 1 主成分と第 2 主成分)。系統 1, 系統 2, 非組換え (日本晴) の塩ストレス処理区と無処理区の比較。図はメタノール抽出物の分析結果を基にした主成分分析結果。





Table 3. 遺伝子組換えイネ玄米含有の化合物相対含有量の変動。それぞれの系統ごとに、塩ストレス処理区と無処理区から収穫された玄米に含有される代謝物の相対含有量を t 検定によって比較した。表は系統間で差が認められた代謝物および塩ストレスで変動する可能性がある代謝物を示している。

	系統1	系統2	日本晴
L-Alanine [3TMS]	6.477	-0.365	-3.307
L-Isoleucine [2TMS]	-0.801	-0.805	0.805
L-Proline [2TMS]	-0.827	-0.212	0.801
Succinic acid [2TMS]	1.770	-2.818	4.509
Fumaric acid [2TMS]	2.789	-2.462	1.060
beta-Alanine [3TMS]	1.064	-0.487	0.072
Malic acid [3TMS]	5.760	-3.208	-4.271
L-Hydroxyproline [3TMS]	0.141	-3.222	-4.356
GABA [3TMS]	-1.000	-2.428	0.591
Glutathione [xTMS]	-0.855	-0.263	-7.222
L-Glutamine [3TMS]	-1.746	-0.058	-9.062
L-Pyroglutamic acid [2TMS]	13.263	-1.817	-22.211
meso-Erythritol [4TMS]	10.504	-0.343	1.550
2-oxo-Glutaric acid [2TMS]	1.484	-1.500	-1.081
Putrescine [4TMS]	2.138	-0.353	2.656
DL-Isocitrate [4TMS]	2.395	-1.323	-0.559
Citric acid [4TMS]	1.935	-0.229	-4.546

>99% significant increase
>95% small decrease
>95% small increase
>99% significant decrease

Table 4. 遺伝子組換えイネ玄米含有の化合物相対含有量の変動. それぞれの系統は, 塩ストレス処理区と無処理区の相対的な比較.

	1-non	2-non	1-stress	2-stress	w-stress
GABA [3TMS]	-1.74	4.18	-15.43	-1.46	0.59
Gluthathione [xTMS]	0.87	0.29	0.42	0.14	-7.22
L-Glutamine [3TMS]	2.13	0.04	10.15	-0.32	-9.06
L-Pyroglutamic acid [2TMS]	-89.61	1.88	5.28	0.90	-22.21
DL-Isocitrate [4TMS]	-5.37	-0.94	-5.97	-3.32	-0.56
Citric acid [4TMS]	-11.84	-4.51	-4.03	-10.40	-4.55

	>99% significant increase		>-95% small decrease
	>95% small increase		>-99% significant decrease

1-non; 無処理の非組換え体と無処理の組換え体(系統 1)の比較, 2-non; 無処理の非組換え体と無処理の組換え体(系統 2)の比較, 1-stress; 無処理の非組換え体とストレス栽培の組換え系統 2 の比較, 2-stress; 無処理の非組換え体とストレス栽培の組換え系統 2 の比較, w-stress; 無処理の非組換え体とストレス栽培の非組換え体の比較.

メタノール抽出物の代謝物分析結果から, 組換え体と非組換え体を区別するメタボローム差は無かった. また, 組換え体の系統 1 と系統 2 は明確に異なるメタボロームプロファイルを示すことが明らかとなった. 導入遺伝子の発現量の差, あるいは塩ストレス耐性との関連性は不明である. Table 3 と Table 4 の結果は, 組換え系統ではグルタミンの含量が変動することを示している. 特に, 系統 1 のストレス処理で顕著に認められた (Table 4, 1-stress). さらに, イソクエン酸, クエン酸レベルの変動は, 塩ストレス処理によって大きく変動する事が明らかになった.

メタノール/クロロホルム抽出物の分析結果では, ステロール類(コレステロール, カンペステロール, シトステロール)の含量に変動は認められなかった. 一方, 組換え系統では, パルミ

チン酸, ステアリン酸含量がストレス処理によって上昇することが分かった. 非組換え系統では, 塩ストレス処理によって若干の減少傾向が認められるものの, 脂肪酸レベルに有意な変動は見られなかった.

D. 考察

SeFLA 遺伝子組換えタバコ, McRBP 遺伝子組換えタバコ, それらのスタック品種, および非組換え体タバコ緑葉のメタボロームを解析した. その結果, 組換え体と非組換え体の違いによらず, それぞれの植物に固有のメタボローム形成が認められたが (Fig. 1B 第 2 主成分と第 3 主成分), 葉位による代謝活性の差はそれらをはるかに上回るほど大きかった (Fig. 1A 第 1 主成分と第 2 主成分). すなわち, 遺伝子組換えの影響よりも, タバコ植物本来が持つ生物学的な代謝活性 (若葉と成熟葉が担う生理機能の違い) の差がメタボローム形成に反映されたと考えられる.

McRBP 系統のメタボロームを特徴づける代謝物として, Val, Ile, 2-oxoglutaric acid, Asp, Glu, 2-amino adipic acid, sucrose レベルの顕著に上昇が認められ, 同化窒素の輸送, あるいはグルタチオン経路の活性化が示唆された. SeFLA 系統では 2-oxoglutaric acid, putrescine, 2-amino adipic acid, inositol, sucrose レベルが上昇していた. 特に着目すべきは, これらの代謝物増減がスタック系統でも保持されていた点である. リボソーム結合タンパク質とアラビノガラクトナンタンパク質のそれぞれが, どのような代謝生化学的影響を及ぼし塩ストレス耐性に寄与するかは明らかではない. しかし, それぞれの有用遺伝子は, 冗長的ではなく独自の生理機能の活性化に関わり, 塩ストレス耐性の相加的な増強に貢献すると推察される.

塩ストレス環境下で栽培された McRBP 組換

エイネ系統と非組換えエイネ(日本晴)から収穫された玄米の代謝物プロファイルを解析した。タバコ葉と同様に、組換え体と非組換え体を差別化するメタボローム形成は認められなかった。非組換えエイネと McRBP 組換えエイネの両者で、塩ストレス処理によって玄米の代謝プロファイルが顕著に変動すること(Fig. 2), その要因としてTCA回路代謝物レベルの変動が示唆された。以上の結果から、導入遺伝子の種類によらず、ストレス応答に関わる代謝活性が亢進(例えば GSH 系路)していること、さらにメタボロームがストレスによって誘導変化することが明らかになった。

本年度のメタボローム解析では、タバコ、イネともに組換え系統と非組換え系統を差別化するメタボロームは認められなかった。一方で、組換え系統では、代謝機能のストレス応答性に差が認められた。しかしながら、実際のストレス処理、あるいは生物学的な内在性の代謝機能の違いは、導入遺伝子の有無によって生じる代謝機能の差よりもはるかに大きかった。

第3世代遺伝子組換え作物の実質的同等性評価の基盤整備のためには、検定対象作物において、品種、生育条件、保管条件などが異なる試料を揃えて広範なメタボローム解析を実施し、それぞれの作物種に固有の生物学的な代謝変動幅を把握するための分析計画が必要と思われる。

E. 参考文献

- 1) Oikawa A., Nakamura Y., Ogura T., Kimura A., Suzuki, H., Sakurai N., Shinbo Y., Shibata D., Kanaya S., Ohta D.: Clarification of Pathway-Specific Inhibition by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance/Mass Spectrometry-Based Metabolic Phenotyping Studies. *Plant Physiol*, 142, 398-413 (2006)
- 2) Rossner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey

R.N., Willmitzer L.: Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J*, 23, 131-142 (2000)

- 3) Dobson G., Shepherd T., Verrall SR., Conner S., McNicol JW., Ramsay G., Shepherd VT., Davies HV., Stewart D.: Phytochemical diversity in tubers of potato cultivars and landraces using a GC-MS metabolomics approach. *J Agric Food Chem*, 56, 10280-10291 (2008)
- 4) Galindo F.G., Dejmek P., Lundgren K., Rasmusson A.G., Vicente A., Moritz T.: Metabolomic evaluation of pulsed electric field-induced stress on potato tissue. *Planta* 230, 469-479 (2009)
- 5) Takahara K, Kasajima I, Takahashi H, Hashida SN, Itami T, Onodera H, Toki S, Yanagisawa S, Kawai-Yamada M, Uchimiya. Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing Arabidopsis NAD kinase gene. *Plant Physiol*. 152: 63-73 (2010)
- 6) Chang Y, Zhao C, Zhu Z, Wu Z, Zhou J, Zhao Y, Lu X, Xu G. Metabolic profiling based on LC/MS to evaluate unintended effects of transgenic rice with cry1Ac and sck genes. *Plant Mol Biol*. 78:477-87 (2012)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 年度）

遺伝子植物のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

研究要旨：平成23年度は、第3世代バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関するアレルギー性評価並びにプロテオーム解析に関する調査研究として、(1)遺伝子組換えコメ並びにタバコ葉を用いてアレルゲンを含むタンパク質の網羅的解析手法の検討、(2)動物を用いる組換えコメのアレルゲン性の検討、(3)アレルゲン予測の解析法の検討、アレルゲンデータベース(ADFS)のタンパク質アレルゲンデータの更新並びに低分子アレルゲン解析ツールの新たな追加、(4)発現タンパク質の品種間でのばらつきを調べるための2D-DIGEによる網羅的解析を行った。具体的には、(1) RBP(RNA binding protein)を導入したコメをモデル植物として用い、塩ストレス(200mM NaCl)存在下・非存在下で栽培したアレルゲンを含むタンパク質の発現を、同じく塩ストレス存在下・非存在下で栽培した非組換え (NT)コメにおける発現量と比較した。RBP組換えコメではNTコメに比べ、塩ストレス栽培下と通常栽培時の間で、アレルゲンを含むタンパク質発現の変動が少ないことが明らかとなった。なお、RBPコメのストレス下で発現の上昇するタンパク質は、granule-bound starch synthase, putative abscisic acid-induced proteinであった。また、塩ストレス耐性を付与する遺伝子SeFLAおよびRBPを、それぞれ単独導入したタバコおよびスタック株を用いた葉のタンパク質発現差異解析結果から、スタック株では単独発現株ではみられなかった、軽度の非組換え体とのタンパク質発現差異もみられる可能性が示唆された。(2) 食物アレルギー動物モデルマウスを用いて、RBP遺伝子導入コメと非組換えコメの感作を行い、両者のアレルゲン性について比較検討を行った。BALB/cマウスを用い、溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、組換えコメ並びに非組換えコメ抽出物の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、アレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体産生及びアナフィラキシー症状は両者で同等と考えられた。(3) アレルゲン予測の解析法の検討では、エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討のため、T細胞エピトープの予測の可能性を、既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)インデックスを用いて行ったところ、T細胞エピトープの予測が可能であることを示唆するデータが得られた。また、ADFSのアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、新たに6種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、エピトープ既知のアレルゲンの数は98種となった。また、新たに低分子アレルゲンの検索画面をADFS内に立ち上げた。(4) 発現タンパク質の品種間での差を調べるための2D-DIGEによる網羅的解析では、コメ4品種を用いた5機関の国際バリデーション試験を開始した。

協力研究者

中村 亮介、中村 里香

(国立医薬品食品衛生研究所)

美宅 成樹

(名古屋大学工学部)

近藤 康人

(藤田学園大学坂文種報徳会病院)

新藤 智子

(財食品薬品安全センター泰野研究所)

A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品

が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス(Codex)食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、バイオ食品特別部会(TFFBT)が設置され、バイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2003年7月にコーデックス総会で採択された「組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」¹⁾

ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/al03_34e.pdf

で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性（特にペプシン抵抗性）並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対するIgE抗体の存在の有無のスクリーニングがあげられ、検討項目として、動物モデルの使用の推奨等が述べられている。また、国内においては、組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準が平成16年1月に作定された。

さらに、2008年の第31回コーデックス総会で、「組換えDNA動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」、また、「栄養または健康に資する組換えDNA植物由来食品の安全性評価」の原案が最終的な合意が得られた。生産者のメリットを考慮した第1世代バイオテクノロジー応用食品に加え、第2世代の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り、さらに環境への適応を考慮した第3世代遺伝子組換え作物も開発が進んでいる。

本分担研究では、第3世代遺伝子組換え作物の安全性評価の中で、遺伝子組換え体のアレルギー性評価並びのプロテオーム解析を担当し、第3世代遺伝子組換え作物のアレルギー性についての安全性評価のあり方、更には網羅的解析技術の安全性評価への応用の可能性について検討することを目的とする。具体的には、(1)遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた組換え食品のアレルゲン性の検討、(3)エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討及びアレルゲンデータベース(ADFS)の充実を図ることを目的に研究を行う。

平成23年度は、(1)遺伝子組換えコメ並びにスタック品種として2種の環境耐性遺伝子を導入したタバコ葉を用いてアレルゲンを含むタンパク質の2D-DIGE法による量的、質的変動の解析、(2)動物を用いる組換えコメのアレルゲン性の検討、(3)アレルゲン予測の解析法の検討並びにADFSのデータの更新、(4)品種間の差を知るための発現

タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析のためのバリデーション試験をとりあげ、研究を進めた。具体的には、

(1) RBP(RNA binding protein)遺伝子を導入したコメと非組換えコメを用いて、塩ストレス存在下・非存在下で栽培した条件でのアレルゲンを含むタンパク質の2D-DIGE法による比較を行い、量的、質的変動の解析を行った。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討では、マウスを用いる経口感作、経口惹起のメカニズムについて更なる検討を加えるとともに、RBP遺伝子導入コメと非組換えコメの感作を行い、両者のアレルゲン性について比較検討を行った。

(3) アレルゲン予測の解析法の検討では、(i)新規導入タンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスを用いてT細胞エピトープの予測可能性について検討を行った。(ii)新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)に関しては、タンパク性アレルゲン並びにエピトープ情報の更新に加えて、低分子アレルゲン解析ツールの新たな追加を行った。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間での差を知るための網羅的解析では、コメ4品種を用いた5機関のバリデーション試験を開始した。

B. 研究方法

(1) RBP 遺伝子組換えコメのアレルゲンを含むタンパク質の量的、質的変動の解析手法の検討

(i) Non-GM 及び GM コメタンパク質の抽出

遺伝子組換え(TG)コメには、RNA binding protein(RBP)をコードしている遺伝子をCaMV(35S)プロモーターでドライブしたイネ2系統(RBP1, RBP2)を用いた。また、対照に非組換え(Non-TG; NT)イネ1系統(日本晴)を用いた。これらのイネは東京農工大学・小関博士らによって作製された。日本晴およびRBP1, RBP2は出穂時点より、200 mM NaClで30時間の塩ストレスをかけて栽培した。コントロールとして、塩ストレスをかけずに栽培した日本晴およびRBP1, RBP2(通常栽培)の種子を用いた。コメタンパク質の抽出は、Multi beads shocker(安井器械)を用いてホモジナイズし、玄米10粒(約0.5 g)当たり3 mLの1M NaCl溶液を加えて終夜4°Cで攪拌し、翌日10,000 rpm, 10 minで遠心後、沈殿を取り除いた。試料は使用時まで-80°Cで保存した。

(ii) 2D-DIGEによるタンパク質の網羅的解析

試料溶液中のタンパク質濃度を2-D Quant Kit

(GE Healthcare社)にて測定し、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare社)を用いてタンパク質を精製した後、RBP1および2の2系統から抽出したタンパク質を等量ずつ混合してNT (通常)・NT (ストレス)・RBP (通常)・RBP (ストレス)の4群とした。各群のコメタンパク質25 μ gを200 pmolのCy3またはCy5で標識し、4 pmolのlysineで標識を停止した。また、全4群のコメタンパク質を等量ずつ混合し、Cy2で標識したものを内部標準として用いた。Cy2で標識した内部標準とCy3あるいはCy5で標識したサンプルを混合し、等量の2 \times サンプルバッファおよび膨潤バッファを加えて250 μ lとし、Immobiline Drystrip (pH 3-10 NL, 13 cm long, GE Healthcare社)に終夜膨潤させた。1次元目の等電点電気泳動は、膨潤後のDrystripをIPGphor isoelectric focusing system III (GE Healthcare社)の説明書に従い、500Vで4時間、1000Vで1時間、8000Vで4時間、20 $^{\circ}$ C下で行った。等電点電気泳動終了後のDrystripを0.5% (w/v) DTTを含む平衡化バッファ中で還元後、4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファ中でSH基の保護を行った。平衡化後のDrystripを10-20%アクリルアミドゲル (DRC社)中で2次元目のSDS-PAGEにより分離し、Typhoon9400 (GE Healthcare社)を用いてCy2 (488nm/520BP40) Cy3 (532nm/580BP30) およびCy5 (633nm/670BP30)の蛍光を検出した。取得した蛍光イメージはImage Quant TL (GE Healthcare社)にて解析するエリアを切り出し、Decyder Software ver. 6 (GE Healthcare)にて蛍光発現差異解析を行った。各サンプルのCy3あるいはCy5蛍光強度を内部標準サンプルのCy2蛍光強度で補正し、各スポットの各群比の平均値を求めた。Bonferroni検定により、NT (通常) vs TG (通常)、NT (通常) vs NT (ストレス)、TG (通常) vs TG (ストレス)、NT (ストレス) vs TG (ストレス)の発現差異検定を行い、2倍以上の発現差異が $p < 0.05$ で有意であったスポットを抽出した。

発現差異が認められたタンパク質の同定には、コメタンパク質 (100 μ g) を2次元分離した後、アクリルアミドゲルをSilver Stain for Mass Spectrometry (Thermo scientific社)を用いて染色し、相当するスポットを切り出した。切り出したゲルは脱色した後、50%アセトニトリル・25 mM重炭酸アンモニウム溶液で脱水し、乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (30 μ g/ml Trypsin Gold-Mass Spec Grade [Promega社], Protease max [Promega社])を加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間ゲル内消化を行った。消化ペプチドを α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (α -CHCA, Sigma-Aldrich社)と混合し、4800 MALDI TOF/TOF

Analyzer (Applied Biosystems社)を用いて、トリプシン消化ペプチドのMSスペクトルおよびMS/MSフラグメントイオン質量を取得した。タンパク質同定のサーチエンジンにはMascot MS/MS ion search (Matrix Science社)を用い、NCBI Inrタンパク質データベース (*Oryza sativa*) 内での相同性検索を行った。

(iii)組換えスタックモデルタバコのタンパク質発サンプルには、WT3系統、SeFLA (Fasciclin-like arabinogalactan protein)を単独導入したL11株2系統、RBP (RNA-binding protein)を単独導入したR74株3系統、L11とR74をかけ合わせたLR1株2系統、LR2株3系統の遺伝子組換えタバコ (*Nicotiana tabacum*)から得た葉を用いた。これらのタバコは東京農工大学・小関博士らによって作製された。タバコ葉からのタンパク質の抽出には、P-PER Plant Protein Extraction Kit (Thermo Scientific社)を用いて、キット添付のプロトコルに従い行った。2D-DIGEは、(ii)と同様に行った。WT・L11・R74・LR1・LR2の5群とし、Bonferroni検定により、WT vs L11、WT vs R74、WT vs LR1、WT vs LR2の発現差異検定を行い、2倍以上の発現差異が $p < 0.05$ で有意であったスポットを抽出した。

(2)食物アレルギー動物モデルの開発

実験には7週齢の雌性BALB/cマウスを用い、通常および塩水栽培した組換えコメ系統1 (GM1nおよびGM1s)、組換えコメ系統2 (GM2nおよびGM2s)および非組換えコメ (NGnおよびNGs)投与群を6-7匹/群で構成した。また、媒体対照 (Vehicle)、陰性対照としてペプシン (PEP) および陽性対照として卵白アルブミン (OVA) 投与群を設定した。それぞれのコメは、1M塩化ナトリウムと0.1M水酸化ナトリウムの抽出液を混合した液に等量のリノール酸/大豆レシチン混合液4:1 (LL)を加え、乳化して用いた。Vehicle、PEPおよびOVA群の投与検体は、0.4M NaCl 0.06 M NaOH水溶液 (コメ抽出液と同組成)をLLと等量混合、乳化して用いた。いずれの群も2回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質0.8 mg/匹を2回/週の頻度で経口投与して3週間感作した。感作3週間後に各蛋白質 8 mg/匹の割合で経口投与して1回目の惹起、その2週間後に8 mg/匹の割合で経口投与して2回目の経口惹起を行った。惹起時にはアナフィラキシー症状の有無を観察してアレルギーの成立を確認した。惹起後30分間に観察されるアナフィラキシー症状の強さにスコアをつけ、1匹のマウスが示した症状の最大スコアをその個体のスコアとし、各投与群間の差はMann-Whitneyの方法で検定した。2回目の経口惹起の5日後に採血し、血清中の抗原特異