

図1 アマゴの五栄養成分とエネルギー
**はp < 5% を示す (T検定)。

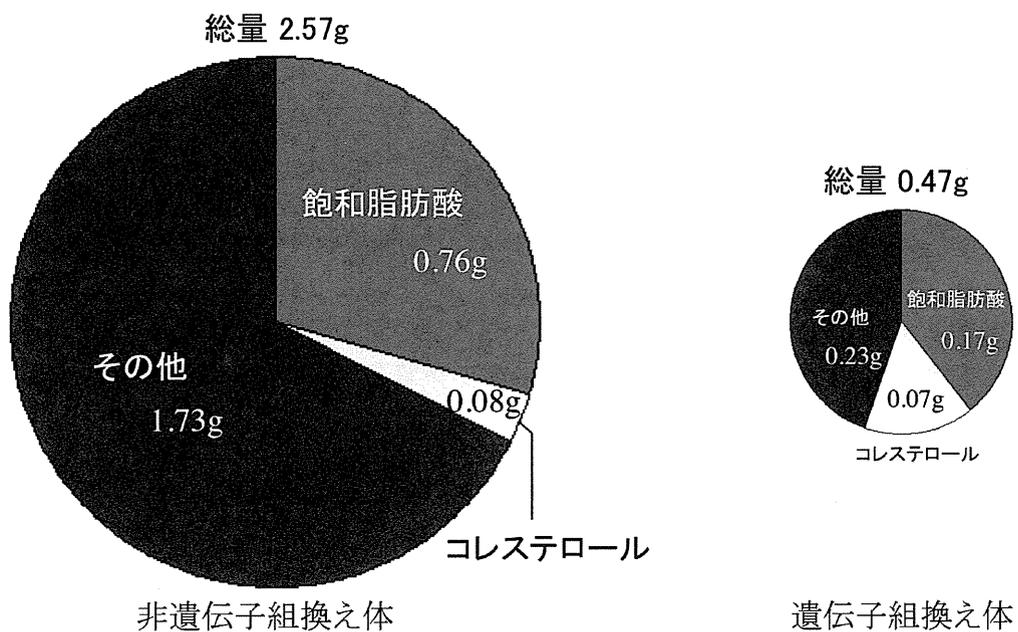


図2 100g あたりのアマゴに含まれる脂質組成

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 工学研究院 教授

研究要旨:

これまでの遺伝子組換え植物は害虫抵抗性や除草剤抵抗性といった比較的単純なものであったが、最近では、機能性を付与したものや遺伝子組換え植物同士の交配によって、複数の機能を持たせるなど、複雑かつ多様な植物が生み出されている。また、植物にとどまらず、バクテリア、魚、ニワトリなど植物以外の遺伝子組換え生物も実用化されつつある。これらのように多様化、複雑化しつつある遺伝子組換え生物を由来とする食品の安全性について評価する場合、その複雑性や多様性、また、安全性評価すべき観点もはっきりとしないといった問題点がある。そこで本研究では、これらの安全性を評価するうえでどのような評価が可能であるかについて探るために、アスタキサンチン合成レタスと低アレルゲンコムについてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、アスタキサンチン合成レタスでは非組換え体と比較して大きな変化は認められなかったが、低アレルゲンコムについてはアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子の発現が顕著に低下していることが認められた。

協力研究者

佐々木 伸大 東京農工大学大学院
工学研究院 助教

A. 研究目的

現在では遺伝子組換え植物が食品として非常に身近に流通している。これらは遺伝子組換え食品は安全性評価が科学的になされたうえで国の承認のもとに安全に流通しているものである。しかし、近年、さまざまな機能を付加した遺伝子組換え植物が開発され、また、組換える遺伝子も、従来のような害虫抵抗性や除草剤耐性などのシンプルな機能付加ではなく、もともとその宿主が持つ代謝経路を改変するものや、複合的な要因によって環境耐性を付加する等、それらの安全性を評価する場合に、その評価すべき観点が多様化、複雑化している。また、最近では遺伝子組換え植物のみならず、遺伝子組換えニワトリやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実用化されつつある。これらはこれまでに存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討し

ておく必要があると考えられる。さらには、最近問題となっているのは、遺伝子組換え植物同士を交配して得られる後代種である。これらは遺伝子を組換えて付与された機能が‘スタック’することによって、生産性等の向上を図っているものであるが、これらのように遺伝子を組換えたものをさらに交配した後代において、形質にどのような変化が表れているかについて研究されている例は少ない。そのため、今後増えるであろうスタック品種についてもそれらの組換え遺伝子の検出技術や安全性評価基準について検討しておく必要が望まれる。昨年度は植物研究によく使用されているタバコを用いてモデルとなるスタッキング品種を作成し解析を行ったが、今年度は、スタック品種の遺伝子や代謝物の変化を更に詳細に解析することを目的として、植物の中で最も研究が進んでいるシロイヌナズナを用いてスタック品種を作製を行った。

また、代謝経路を変化させた遺伝子組換え植物として、アスタキサンチンを合成するようにしたレタスと、アレルゲンタンパク質の生産を低減さ

せたコメを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

B. 研究方法

B-1 植物材料

アスタキサンチン合成レタスは *Brevundimonas* sp. SD212 株由来 *CrtZ*, *CrtW* 遺伝子と *Paracoccus* sp. N81106 株由来 *Idi* 遺伝子を含む上記コンストラクトをパーティクルガン法によりレタス (*Lactuca sativa*) に導入し、葉緑体ゲノムとの相同組換えを行うことで獲得されたものを、石川県立大学の三沢典彦教授より分与いただいた。低アレルゲンコメは東京理科大島田浩章教授に分与いただいたものを用いた。

B-2 RNA 抽出方法

レタスとシロイヌナズナからの RNA 抽出は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて行い、方法はそのマニュアルに従った。コメからの RNA 抽出は、液体窒素中で磨砕したコメ粉末を Fruits Mate (タカラバイオ社) で処理した後に RNeasy Plant Mini Kit を用いて行い、方法はそれらのマニュアルに従った。

B-3 マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

アスタキサンチンレタスから抽出した RNA を DNA マイクロアレイ解析に供した。レタスの DNA チップは市販されていないため、植物で最も研究報告例の多いシロイヌナズナの DNA マイクロアレイチップ (*Arabidopsis* オリゴ DNA マイクロアレイ) を用いた。このチップ上には約 40,000 のプローブが固定化されており、シロイヌナズナの全遺伝子および転写産物をカバーしているものであった。

低アレルゲンコメの DNA マイクロアレイ解析は、薬 42,000 種のイネの遺伝子が搭載された DNA マイクロアレイチップ (イネオリゴ DNA アレイ 4x44K RAP-DB) を用いて行った。いずれの解析もタカラドラゴンジェノミクスセンターの受託解析を用いた。

B-4 遺伝子組換えシロイヌナズナの交配によるスタッキング植物の作出

環境耐性遺伝子の例として、塩性植物であるシチメンソウ (*Suaeda japonica*) から大腸菌の耐塩

性向上効果を持つ遺伝子として当研究室で単離された、fructose bisaldorase 相同遺伝子 (SjFBA) と *relA/spot* 相同遺伝子 (SjRSH) をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流に連結したベクターを構築し、アグロバクテリウムを介してフローラルディッピング法によってシロイヌナズナに導入して作成された系統を用いた。これらの系統を自家受粉して導入された遺伝子をホモで持つ系統を抗生物質耐性を指標として選抜した。SjFBA 組換え体と SjRSH 組換え体のホモの系統を交配してそれらのスタック系統を作出した。作出したスタック系統が SjFBA、SjRSH 両方の遺伝子を有しているかについて RT-PCR 法によって検定した。抽出した 500 ng の 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。用いたプライマーの組み合わせは SjFBA : forward, 5'-AGCCAGAGATCCTGC-3', reverse, 5'-CTCTGGTTCATTGCATTCAAG-3', SjRSH : 5'-CATGATGTCGAGGAGCTTACG-3', reverse, 5'-GCTAGCCAAAAGCACTGCAG-3' であった。また、RNA 量のコントロールとしてシロイヌナズナの elongation factor 1 α (*AtEF1 α* : forward, 5'-ACCACCACTGGGCACTTGATC-3', reverse, 5'-GTGCAGTAGTACTTGGTGGTCT-3') を用いた 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。

C. 研究結果

C-1 アスタキサンチン合成レタスのトランスクリプトーム解析

遺伝子組換えによってアスタキサンチンを合成するようになったレタスと遺伝子を組換えしていないレタスとから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供することができる品質であるかについてチップ電気泳動を行って解析を行ったところ、RNA の分解は認められなかった (図 1) ことから、このサンプルをマイクロアレイ解析に供した。レタス用の DNA マイクロアレイは市販

されていないことから、今回はモデル植物として最も実施例の多いシロイヌナズナのマイクロアレイを用いてアスタキサンチンレタスの遺伝子発現プロファイル変化を検討することとした。マイクロアレイ解析の結果、検出された各遺伝子のスポットにおいて、十分信頼できる強度の蛍光が観測されたのは全体の10%程度であった(表1)。シグナルが観測された遺伝子についてそれらの発現量をスクエアープロットによって解析したところ、非組換え体2個体間、組換え体2個体間それぞれにおいて、遺伝子発現プロファイルに大きな差は認められなかった(図2 NT1 vs NT2, TF1 vs TF2)。これに対し、非組換え体と組換え体とは非組換え体に対して、組換え体において若干分散する遺伝子が見られた。これらの遺伝子がどのようなものか確認したところ、rubisco large subunit や histon 3、phosphate transporter、などが、遺伝子組換え体で発現量が增大しており、wound response family protein などでは遺伝子組換え体でその発現量が減少していたことが判明した。

C-2 低アレルゲン化コメのトランスクリプトーム解析

遺伝子組換えコメと遺伝子を組換えしていないコメとから RNA を抽出し、その品質検査を行ったところ、遺伝子非組換えコメでは若干の RNA の分解が認められた(図3)。このサンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、約70%以上のスポットにおいて信頼性の高いシグナルが検出されていることが判明した(表2)。そこで、これらのコメにおける遺伝子発現量の変化をスクエアープロットによって解析した。その結果、遺伝子組換えコメにおいて明らかに発現量が減少している遺伝子群が存在していることが分かった(図4)。これらの遺伝子がどのようなものであるかについて解析をおこなったところ、ほぼ全ての遺伝子がイネ種子(すなわちコメ)のアレルゲンタンパク質であった(図4)。また、遺伝子組換えコメで発現量が減少していた遺伝子は未だに機能未知のタンパク質をコードする遺伝子であった。

C-3 遺伝子組換えスタッキングモデル植物の作成

遺伝子組換えスタック品種のモデルとなる植

物を作成するために、環境耐性向上効果が期待されるシチメンソウ由来の fructose bisaldolase 遺伝子(SjFBA)と RelA/SpoT homolog 遺伝子(SjRSH)をそれぞれ組換えたシロイヌナズナの交配育種を行った。それぞれの遺伝子を組換えた系統を自家受粉して自殖後代を獲得した。それらのうち抗生物質耐性がほぼ100%であった系統を用いてそれぞれを花粉親、また、種子親として人口受粉を行い、それらの交配後代を獲得した。親系統とその後代の系統3系統ずつについて組換えた遺伝子が発現しているかについて RT-PCR によって確認を行ったところ、いずれの系統においても予想される組換え遺伝子の発現していた(図5)このことから、シロイヌナズナを用いて遺伝子組換えスタック系統を少なくとも6系統獲得できていることが確認された。

D. 考察

食品用に用いられる遺伝子組換え植物は研究用途に用いられるいわゆる“モデル植物”等ではないことから、それらについて遺伝子やタンパク質、代謝物等について網羅的に解析し要旨とした場合、それらを解析するプラットフォームが確立していないことが多い。本研究で用いたレタスにおいても、トランスクリプトーム解析に用いるための DNA マイクロアレイは市販されていないため、レタスでの解析を行う場合には、解析する者がその遺伝子配列情報の獲得からマイクロアレイプローブの設計し、作製までを行う必要があり、膨大な手間と予算がかかる。そこで、本研究では、レタスとは植物種が異なるが、遺伝子情報が最も多く蓄積されているシロイヌナズナ用の DNA マイクロアレイを用いた場合に、どの程度解析が可能であるかについての検討を行った。その結果、信頼性の高いデータはマイクロアレイ上の遺伝子の約10%程度であったが、それらの中で遺伝子組換えと非組換え体とで発現量が異なっているものについては再現性が得られていたことから、植物種間でよく保存されている遺伝子についての解析の可能性が示されたものと考えられた。

低アレルゲンコメのトランスクリプトーム解析では、約7割のスポットにおいて信頼性の高いデータが得られた。今回用いたサンプルでは遺伝子

非組換え体において RNA の若干の分解が認められたことから、品質のよい RNA を用いることで、更に信頼性の高いデータが得られるものと予想された。組換えた遺伝子の効果によって発現が減少したと思われる遺伝子が複数検出され、それらのいずれもアレルゲンタンパク質をコードしているものであった。数種の遺伝子については遺伝子組換えによって発現が上昇していることが確認されたが、これらの遺伝子発現の変化が、個体や系統間の差であるのか、あるいは、遺伝子を組換えたことによる副次的な効果によるものであるのかについては今後の検討が必要であると考えられる。

遺伝子組換えモデル植物の作出については環境抵抗性向上効果が期待される遺伝子 2 種についてそれぞれ遺伝子組換えしたシロイヌナズナを用いて、それらの交配後代を獲得し、それぞれにおいて組換えた遺伝子が発現していることを確認した。次年度これらの系統についてオミクス手法を用いた網羅的な解析を行う予定である。

E. 結論

シロイヌナズナ用の DNA マイクロアレイを用いたアスタキサンチンレタスのトランスクリプトーム解析では、遺伝子組換えによって発現量が著しく変化する遺伝子についてはほとんど確認されなかった。低アレルゲンコメにおいては、遺伝子を組換えた場合にはアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子群の発現が大幅に減少していることが確認され、その他の遺伝子の変動はほとんど確認されなかった。

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

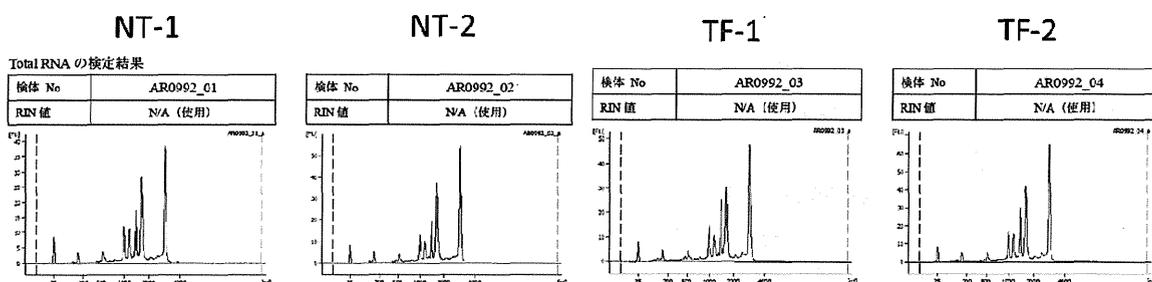


図 1. アスタキサンチンレタスから抽出した RNA の品質検査結果

表 1. アスタキサンチンレタスから抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析のスポット検出率

0 : 信頼性が低いシグナル強度、1: 信頼性が高くないシグナル強度、3 : 信頼性の高いシグナル強度

	検体 No	0 (%)	1 (%)	2 (%)
NT-1	AR0992_01	63.34	25.37	11.29
NT-2	AR0992_02	64.30	23.75	11.95
TF-1	AR0992_03	64.30	25.41	10.28
TF-2	AR0992_04	68.24	22.25	9.51

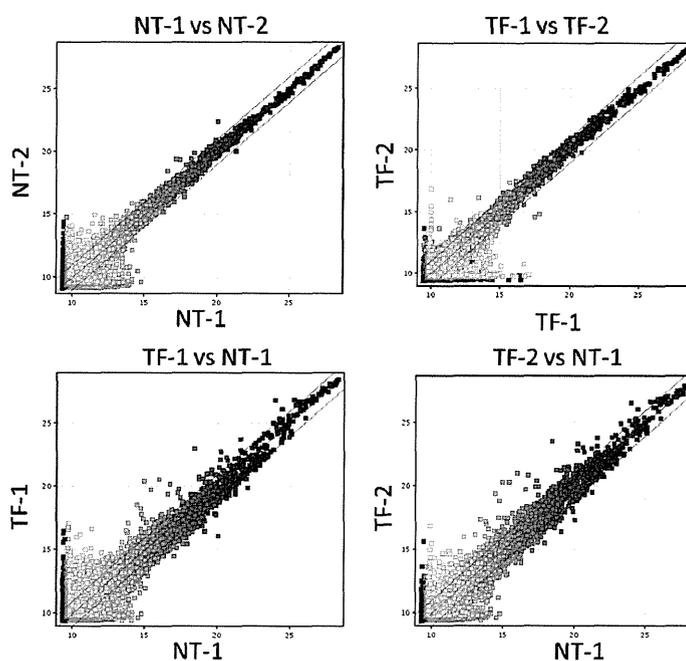


図 2. アスタキサンチンレタスから抽出した RNA を用いたマイクロアレイ結果のスカタープロット解析

Total RNA の検定結果

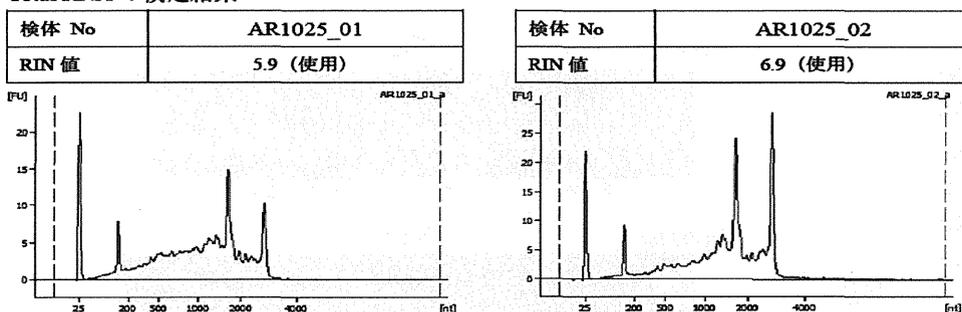


図 3. 低アレルゲンコメから抽出した RNA の品質検査結果

左：遺伝子非組換えコメ、右：遺伝子組換え低アレルゲンコメ

表 2. 低アレルゲンコメから抽出した RNA を用いたマイクロアレイのスポット検出率
 0：信頼性が低いシグナル強度、1：信頼性が高くないシグナル強度、3：信頼性の高いシグナル強度

	検体 No	0 (%)	1 (%)	2 (%)
Non-GM	AR1025_01	12.43	14.85	72.73
GM	AR1025_02	14.62	16.47	68.91

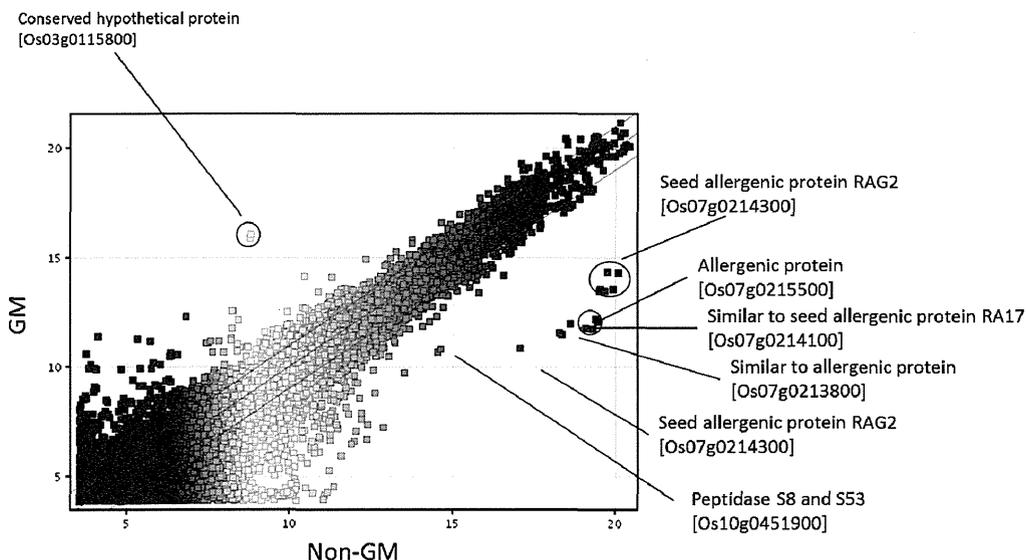


図 4. 低アレルゲンコメのスキヤタープロットによる遺伝子発現プロファイル解析

1. FBA 1
2. FBA 2
3. FBA 3
4. RSH 1
5. RSH 2
6. RSH 3
7. FBA × RSH 1
8. FBA × RSH 2
9. FBA × RSH 3
10. RSH × FBA1 1
11. RSH × FBA1 2
12. RSH × FBA1 3
13. RSH × FBA2 1
14. RSH × FBA2 2
15. RSH × FBA2 3
16. WT 1
17. WT 2
18. WT 3
19. FBA vector
20. RSH vector

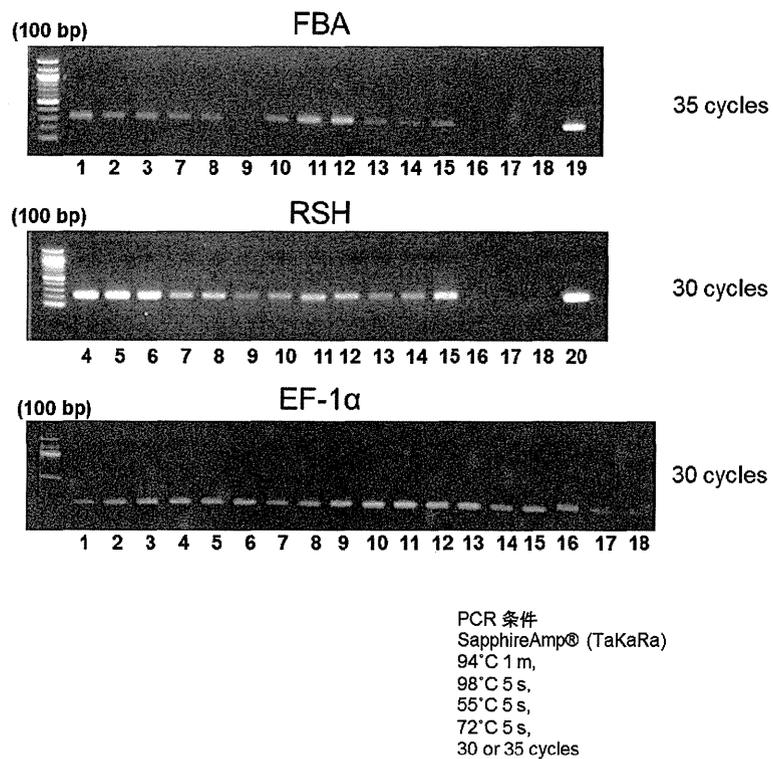


図5. シロイヌナズナスタッキング系統の組換え遺伝子発現解析

SjFBA と SjRSH を組換えた親系統と、それらを花粉親、種子親として用いた場合と、その逆の交配を行った後代3系統ずつについて RT-PCR 法によって組換え遺伝子の発現解析を行った。

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)
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書(平成24年度)

バイオテクノロジー応用食品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:

本研究課題では、質量分析を基盤としたメタボローム分析によってバイオテクノロジー食品の成分を網羅的に解析し、その安全性検証のための情報を取得することを目的としている。平成24年度は、バイオテクノロジー食品試料として、海洋微生物由来の *idi* (isopentenyl pyrophosphate-isomerase), *crtW* (β -carotene ketolase) および *crtZ* (β -carotene hydroxylase) を導入し、アスタキサンチン産生能を高めた遺伝子組換えレタスを分析サンプルとして供試した。供試サンプルから80%メタノール抽出物を調製しLC-LIT-TOF/MSによるメタボローム解析を実施した(112種類の代謝物分析プラットフォームにおいて、29種類の代謝物を同定・定量)。その結果、アスタキサンチンを高産生する組換えレタスでは、*idi* 遺伝子の導入によって、解糖系中間体を經由したイソプレノイド生合成とカロテノイド生合成の促進を実証する広範な代謝変動を認めた。これらの代謝変動は代謝生化学的に理解することが可能である。

本研究で供試したアスタキサンチン高産生レタスに代表されるように、意図的に機能性成分や有用成分を高産生させるための代謝機能改変を施した作物では、非組換え体と比較して代謝成分に差異が認められることは自明である。このようなバイオテクノロジー食品と従来型食品の間で認められる質的变化を科学的実証データに基づいて正しく評価し、特性を判定する基準作成が求められる。

A. 研究目的

日本を取り巻く政治情勢・経済環境の急激な変化は、食の安心・安全への関心をいやが上にも高めている。このような状況下で、バイオテクノロジーを応用して生産された素材を食用とする際の安全性に関するデータ集積は、重要かつ喫緊の課題である。

バイオテクノロジーは、農作物を始め様々な食料の生産や製品開発に広く応用されている。しかしながら、遺伝子組換え以外のバイオテクノロジー応用食品の安全性に関する議論が十分に尽くされているとは言えない。例えば、作物の育種技術としては、化学薬品による変異誘発や中性子線照射など、生物のゲノム構造そのも

のが影響を受ける育種法が従来から日常的に実施されているが、その安全性に関する懸念は殆ど議論されていない。また、海外企業を中心とする遺伝子組換え技術は、農作物にとどまらず、微生物や魚類、家禽・家畜の改良にまで応用範囲が広がっている。加えて、遺伝子組換え法と細胞生物学を駆使したクローン技術など、多岐にわたる最先端技術が応用されている。しかしながら、バイオテクノロジーの関与する食品素材が実際に市場に流通する製品に使用されているのか、あるいは混入しているのかを議論するための情報は殆ど無い。

本研究報告では、これらの先端バイオテク

ロジーによって作出・生産された食品あるいは食品素材をバイオテクノロジー食品と呼称する。また、同じ食品素材でバイオテクノロジーが応用されていない食品を従来型食品と呼ぶ。バイオテクノロジー食品の安全性に関する研究では、改変目的以外に、どのような二次的影響が細胞活動に及んでいるのか、あるいは全く影響は認められないのかを検証するため、科学的な実証データの提供が目的となる。従来型食品と比較して、バイオテクノロジー食品になんらかの成分変動があるならば、その変動は安全性に影響を及ぼすのか否かを科学的・論理的に議論する必要があり、その目的達成のためには生物機能の包括的解析が可能なオミクス研究が必須である。

本研究では、最先端メタボロミクスによって科学的実証データを取得する。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、バイオテクノロジー食品の成分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、改変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を可能にすることで、バイオテクノロジー食品の安全性確保並びに国民受容に貢献する。

B. 研究方法

<供試試料>

バイオテクノロジー食品試料として、海洋微生物由来の3遺伝子⁽¹⁾を導入し、アスタキサンチン産生能を高めた遺伝子組換えレタスを供試した（石川県立大学生物資源工学研究所、三沢典彦教授から分与いただいた）。アスタキサンチン産生のために導入された3遺伝子は(Fig. 1), *Paracoccus* 属 N81106 株由来の

idi (isopentenyl pyrophosphate-isomerase), *Brevundimonas* 属 SD212 株由来の

crtW (β -carotene ketolase) および

crtZ (β -carotene hydroxylase)

である。これらの3遺伝子を保持するプラスミド (pRL-crtZWidi) を用い、栽培品種レタス (*Lactuca sativa* var. Barkley) にパーティクルガン法によって導入されている。導入されたプラスミド上の *rbcl* および *accD* 領域と、形質転換母本レタスの葉緑体ゲノム上の *rbcl* および *accD* 領域との間での位置特異的相同組換えによって、上記3遺伝子が葉緑体ゲノムに組み込まれている。得られた葉緑体ゲノム改変 T₀ 個体 [pRL-crtZW-lettuce (Barkley) B1] を育成して種子 (T₁) を収穫した。T₁ 種子を寒天培地に播種し、発芽生育した T₁ 個体を5ヶ月間栽培した植物体を分析に供試した。

<方法>

サンプリング

非組換えレタス (NT-1, NT-2), およびアスタキサンチン高産生の目的で代謝改変された遺伝子組換えレタス (TF-1-TF-2) のそれぞれ2個体 (Fig. 2) の地上部を収穫し、新鮮重量の秤量後 (NT-1; 152.85g, NT-2; 144.88g, TF-1; 133.60, TF-2; 96.40g), 直ちに液体窒素で凍結しドライアイスで保冷した。試料は分析直前まで-80°Cで保存した。

化合物の抽出

凍結保存試料(約 50 mg)を、液体窒素を用いて乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。内部標準物質として 5.83 μ M の reserpine を含む 80%メタノールを 300 μ ・加え、2分間磨砕した。磨砕液を 2 mL 容のサンプリングチューブに回収し、15,000 rpm (4°C, 10 min) の遠心後、その上清を粗抽出液とした。粗抽出液はフィルター濾過 (Advantec,

DISMIC-13JP, pore size; 0.2 μm)濾過し, 分析試料($n = 5$)とした.

質量分析実験

LC-LIT-TOF/MS (Hitachi 社製 NanoFrontier L) 分析に供した. カラムは Cadenza CD-C18 (Intakt 社製 150 x 2 mm, 3 \cdot m)を用いた. カラム温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.2 mL/min, 移動相として A:水 (0.1% ギ酸), B:アセトニトリル (0.1% ギ酸) を用い, 2% B \rightarrow 100% B (0 - 49 min); 100% B (5 min), 100% B \rightarrow 2% B (1 min), 2% B (5 min) から成る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. 112 種類の標準化合物のカラム保持時間, 検出イオン種, m/z 値のデータを取得した (Fig. 3). これらの化合物に対するダイナミックレンジの判定を実施し検量線を作成し, 同定と定量のプラットフォームとした. また, 本 LC-LIT-TOF/MS システムにおいては, 質量分析装置に PDA 検出器 (photo diode array detector) を前置している. これにより抽出液中の化合物は LC 分離後に吸収スペクトルを計測することが可能である. 本研究では, PDA をカロテノイド関連物質の検出と特性解析に用いた. 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)

分析データ解析

非組換え体と組換え体の各サンプル個体から, 5 連の抽出操作を実施し, それぞれの抽出液に対して 1 回の質量分析を実施した. すなわち, 各個体について 5 回の独立した測定データを取得した. 得られた質量分析クロマトグラムからのピーク抽出およびピーク面積値は, Nano Frontier Data Processing を用いて算出した. 化合物同定は, 精密質量情報, フラグメントピーク, カラム保持時間を市販標準物質と比較するために準備した分析プラットフォームを用い

て行った (Fig. 3). 異なるサンプル間における化合物の含量比較は, 各クロマトグラムにおいて検出される内部標準物質 reserpine のピーク面積値との相対比較によって算出した, 面積値を元にして実施した. 各個体について 5 回の分析データにおいて検出されたそれぞれの化合物の相対面積値を算出し, それらの平均値を個体間における相対含有量の比較に用いた.

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, 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.

C. 結果

LC-LIT-TOF/MS メタボローム解析

非組換え体抽出物および組換え体抽出物の PDA 情報から, カロテノイドに特徴的な複数の吸収⁽²⁾が見られることがわかった (Fig. 4). カロテノイド関連物質と推定される化合物のカラム保持時間, 吸収スペクトルの形状および吸収極大波長の値から (Fig. 5), 組換え体レタスで検出された最も強い吸収を示すピークはアスタキサンチンに帰属されると推定した.⁽²⁾ また, 組換え体レタスにはアスタキサンチンに次いでカンタキサンチンが高蓄積していた. これらの主要カロテノイド分子種以外にも, カロテノイド類縁体と推定される化合物のプロファイルに差異が認められたことから, アスタキサンチン合成の中間体および最終産物レベルに顕著な変動が認められると推察した (Fig. 4). 本研究では, カロテノイド分析に特化した抽出法や分析条件を適用していないにもかかわらず, アスタキサンチン高産生レタスの開発目的を反映したカロテノイド関連物質の変動が認められた (Figs. 4, 5).

カロテノイド関連物質の蓄積以外にも, 組換え体レタスと非組換え体レタスの代謝物プロファイルに顕著な差を見出した (Figs. 6, 7). 分

析に供試したレタス抽出物の LC-LIT-TOF/MS クロマトグラムで検出されたそれぞれの化合物ピークに対して、本実験における同定・定量が可能な標準化合物 (Fig. 3) との照合を行い、29 種類の代謝物を同定することができた。これらの化合物について、非組換えレタスと組換えレタスの間での蓄積量を比較した。

まず、解糖系においては、glucose-1-phosphate と glycerate の含量が組換え体での有意な上昇していることを認めた。一方、glyceraldehyde-3-phosphate と 6-phosphogluconate は組換え体で含量が減少していた (Fig. 6)。TCA 経路においては顕著な差異を認めなかった。これらの代謝物レベルの変動は、導入された *idi* 遺伝子 (isopentenyl pyrophosphate isomerase 遺伝子) の高発現によって (Fig. 1)、解糖系中間体を經由した代謝フラックスがカロテノイド生合成の方向に向かった事を示唆している。

核酸 (adenosine, adenine, uridine, AMP, allantoin) の含量が組換えレタスで顕著に上昇していたが (Fig. 7)、アスタキサンチン高産生の目的で改変された代謝経路との直接的な関連性は明らかではなく、どのような経路で核酸代謝に影響が及んだかは不明である。

芳香族アミノ酸であるチロシンとトリプトファン の含量が、組換え体で顕著に減少していた (Fig. 7)。これらのアミノ酸は、解糖系中間体である phosphoenolpyruvate を前駆体とするシキミ酸経路によって生合成される。本研究に供試したアスタキサンチン高産生レタスにおいて、*idi* 遺伝子は解糖系中間体からカロテノイド生合成を増強する意図で導入されているので (Fig. 1)、アスタキサンチン高産生レタスでシキミ酸経路の反応産物のレベルに影響が及ぶことと矛盾は無い。これらの結果は、フェニルアラニン (あるいはトリプトファン) を前駆体として生合成される植物二次代謝産物であるフラボノイドあるいはリグニンの含量にも影響が及んでい

る可能性を示唆している。

アスタキサンチン高産生レタスでは、アルギニンのレベルが低下し、グルタミン酸レベルが上昇していた。アスタキサンチンを高産生する代謝改変が窒素代謝にも何らかの二次的な影響を及ぼした可能性を示唆する。前述のように、非組換えレタスには核酸の代謝に関わる代謝物の含量が上昇する傾向が認められた。核酸代謝は、無機窒素の欠乏状態で活性化されることが知られており、⁽⁸⁾ 核酸化合物レベルの減少は、組換え体で窒素のリサイクルが活発に行われている可能性も示唆される。しかしながら、アスタキサンチン生合成の活性化と窒素欠乏を論理的に結びつける情報は無い。

D. 考察

非組換えレタス (NT-1, NT-2) とアスタキサンチン高産生の目的で代謝改変された遺伝子組換えレタス (TF-1-TF-2) のそれぞれ2個体 (Fig. 2) 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では、代謝工学的改変の意図を反映して、カロテノイド関連物質のプロファイル (分子種とそれぞれの含量) に顕著な差異を認めた (Figs. 4, 5)。供試したアスタキサンチン高産生レタスにおいては、複雑な代謝ネットワーク (Fig. 1) によってカロテノイドプロファイルが変動していると推察される。(詳細な分析はサンプルを提供いただいた石川県立大学の三沢典彦教授が実施中)。

非組換え体と組換え体のメタボロームを差別化する代謝物として、解糖系中間体と芳香族アミノ酸が挙げられる (Figs. 6, 7)。これらの代謝変動は、アスタキサンチン高産生を目的として導入された *idi* 遺伝子がコードする isopentenyl pyrophosphate isomerase の反応基質が解糖系中間体から供給されることが原因と考えられる。言い換えるなら、これらの代謝変動の原因はイソプレノイド生合成経路への代謝フラックス促進に帰することができる。すな

わち、組換え体レタスと非組み換え体レタスのメタボローム差異は、分析実験を実施するまでもなく予測できる結果と言える。

一方、芳香族アミノ酸レベルへの影響は今回のメタボローム解析によって初めて明らかになったことであるが、代謝生化学的な知見からは極めて順当な結果であると言える。芳香族アミノ酸は、多様な植物二次代謝産物（フラボノイドやアントシアニンなどの色素、生体防御物質、リグニン）の生合成前駆体となるので、トリプトファンやチロシンの含量が低下したアスタキサンチン高産生レタスの色素生合成能やストレス抵抗性などは今後の評価項目として挙げられる。

非組換えレタスとアスタキサンチン高産生レタスの間で検出された核酸類の含有量変動も、カロテノイド類の生合成促進と関連があるかもしれない。すなわち、*idi* 遺伝子導入によって IPP isomerase 反応が増強され、その結果として解糖系からの IPP isomerase への基質供給が促進され、核酸の生合成に関与する 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) 供給量あるいはプールサイズにも影響が及んだ可能性がある。アスタキサンチン生合成の促進された組換え体ではリボフラビン含量が上昇していたが、リボフラビン生合成にも PRPP や核酸生合成が関与する。⁽⁹⁾

以上のように、アスタキサンチンを高産生する組換えレタスでは、導入された *idi* 遺伝子の導入によって、イソプレノイド生合成とカロテノイド生合成が促進されたことを実証する広範な代謝変動を認めた。これらの代謝変動は、代謝生化学的に理解することが可能であり、遺伝子組換えによって食用レタスとしてネガティブな影響が生じていないことを示す結果である。

本研究で供試したアスタキサンチン高産生レタスのように、意図的に代謝機能を改変した作物では、非組換え体と比較して代謝成分に差異が認められることは自明である。このような場合、

安全性議論において基準とされる実質的同等性とは、どのような科学的エビデンスに基づいて定義すべきかを再確認する必要がある。バイオテクノロジー食品と従来型食品の間で認められる質的变化を正しく評価するための基準作成が求められる。すなわち、検定対象のそれぞれに固有の生物学的な代謝成分変動幅を把握するための分析計画が必要である。

参考文献

- 1) Hasunuma T, Miyazawa S-I, Yoshimura S, Shizaki Y, Tomozawa K-I, Shindo K, Choi S-K, Misawa N, Miyake C. (2008) Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J.* 55:857-868.
- 2) Makino T, Harada H, Ikenaga H, Matsuda S, Takaichi S, Shindo K, Sandmann G, Ogata T, Misawa N. (2008) Characterization of cyanobacterial carotenoid ketolase CrtW and hydroxylase CrtR by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 49:1867-1878.
- 3) Matsuda F, Hayashi M, Kondo A. (2011) Comparative profiling analysis of central metabolites in *Euglena gracilis* under various cultivation conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75:2253-2256.
- 4) Iwaki T, Guo L, Ryals JA, Yasuda S, Shimazaki T, Kikuchi A, Watanabe KN, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Ogawa T, Ohta D. (2013) Metabolic profiling of transgenic potato tubers expressing *Arabidopsis* dehydration response element-binding protein 1A (DREB1A). *J Agric Food Chem.* 61:893-900.
- 5) Galindo F.G., Dejmek P., Lundgren K., Rasmusson A.G., Vicente A., Moritz T. (2009) Metabolomic evaluation of pulsed electric field-induced stress on potato tissue. *Planta* 230:469-479.
- 6) Takahara K, Kasajima I, Takahashi H, Hashida SN, Itami T, Onodera H, Toki S, Yanagisawa S, Kawai-Yamada M, Uchimiya. (2010) Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing

Arabidopsis NAD kinase gene. *Plant Physiol.* 152: 63-73.

- 7) Chang Y, Zhao C, Zhu Z, Wu Z, Zhou J, Zhao Y, Lu X, Xu G. (2012) Metabolic profiling based on LC/MS to evaluate unintended effects of transgenic rice with cry1Ac and sck genes. *Plant Mol Biol.* 78:477-87.
- 8) Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 57:805-836.
- 9) Jiménez A, Santos MA, Revuelta JL. (2008) Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *BMC Biotechnol.* 8:67.

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

Fig.1 アスタキサンチン高生産レタス代謝改変

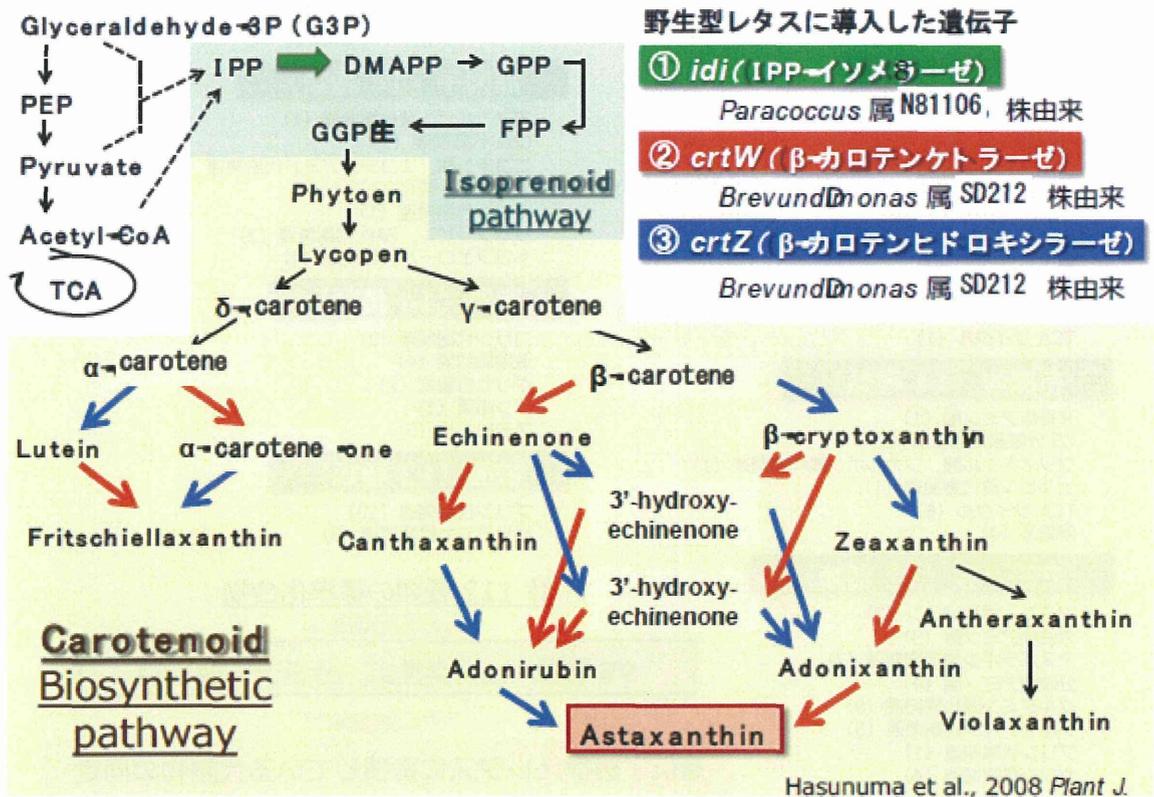


Fig. 2. 分析実験に供試したレタスの地上部

(a) 非組換え体, (b) アスタキサンチン高生産する遺伝子組換えレタス

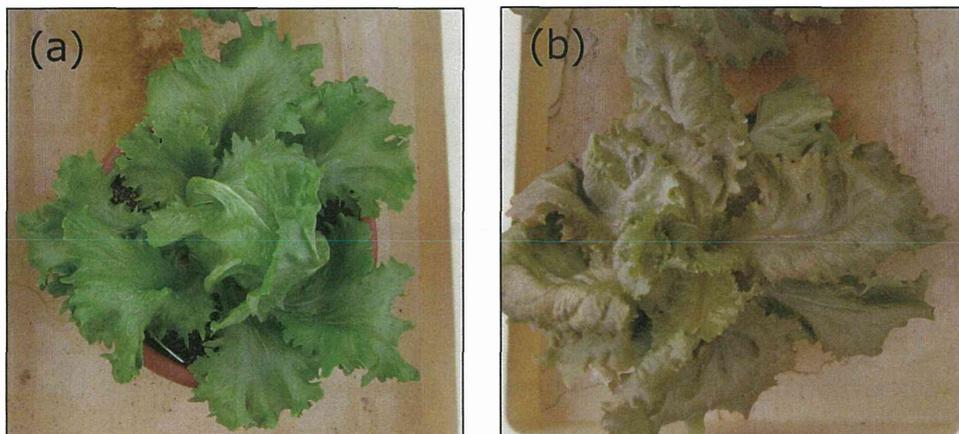


Fig. 3 LC-IT/TOF/MS 分析プラットフォームの整備

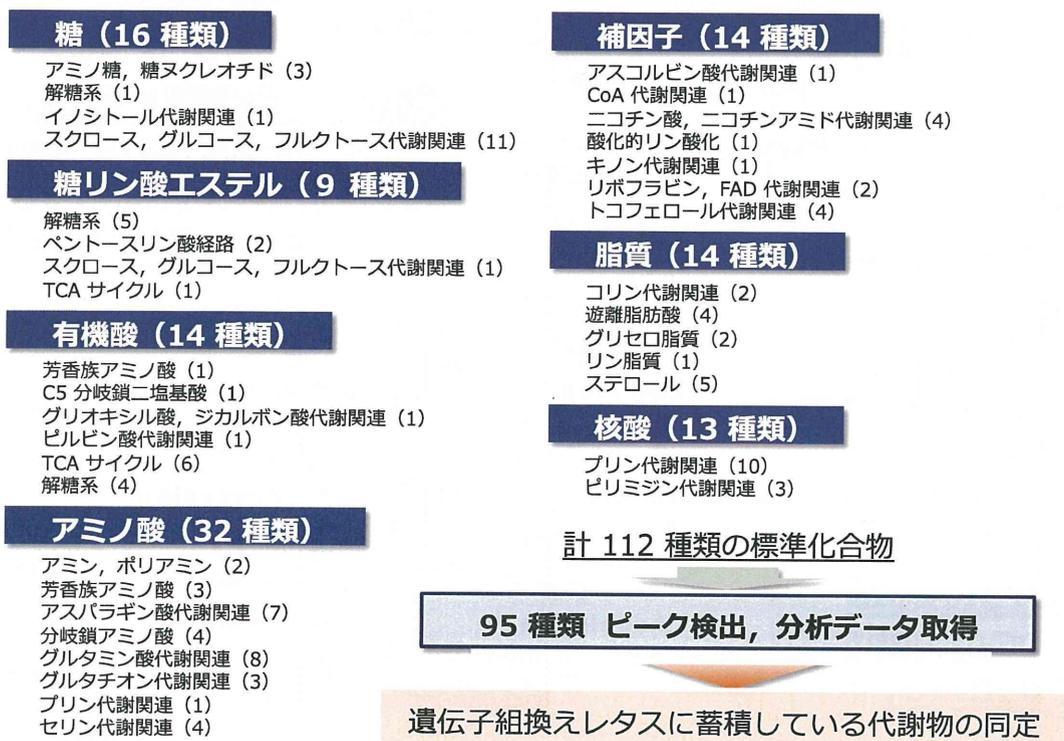


Fig. 4 LC-PDA-IT/TOF/MS を用いたカロテノイドの分析

組換えレタスでカロテノイド由来の強い吸収が検出された

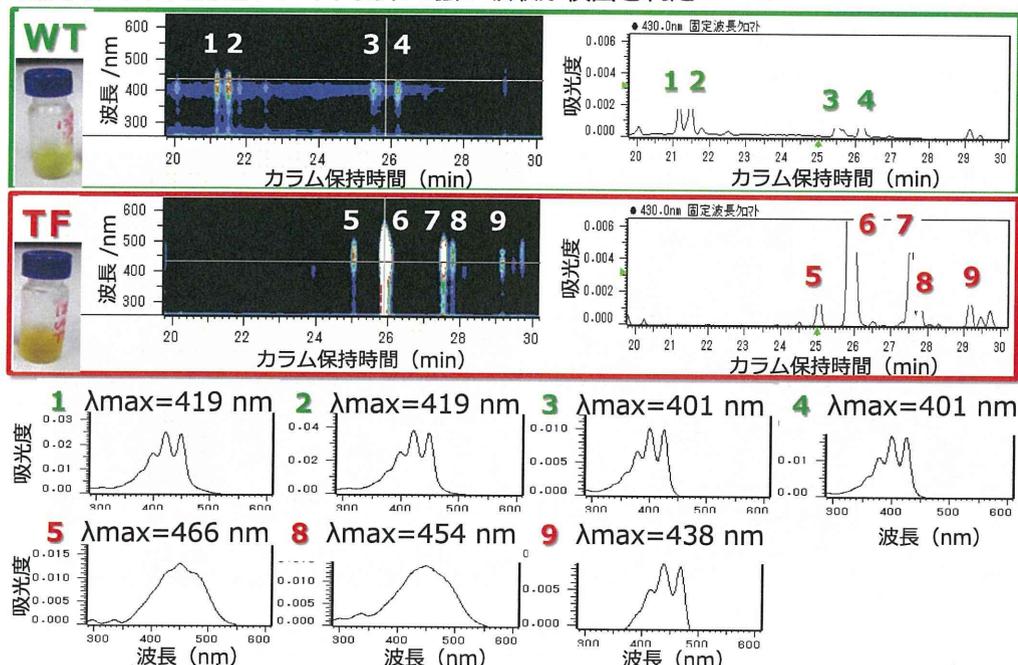


Fig.6 解糖系を中心とした代謝変動

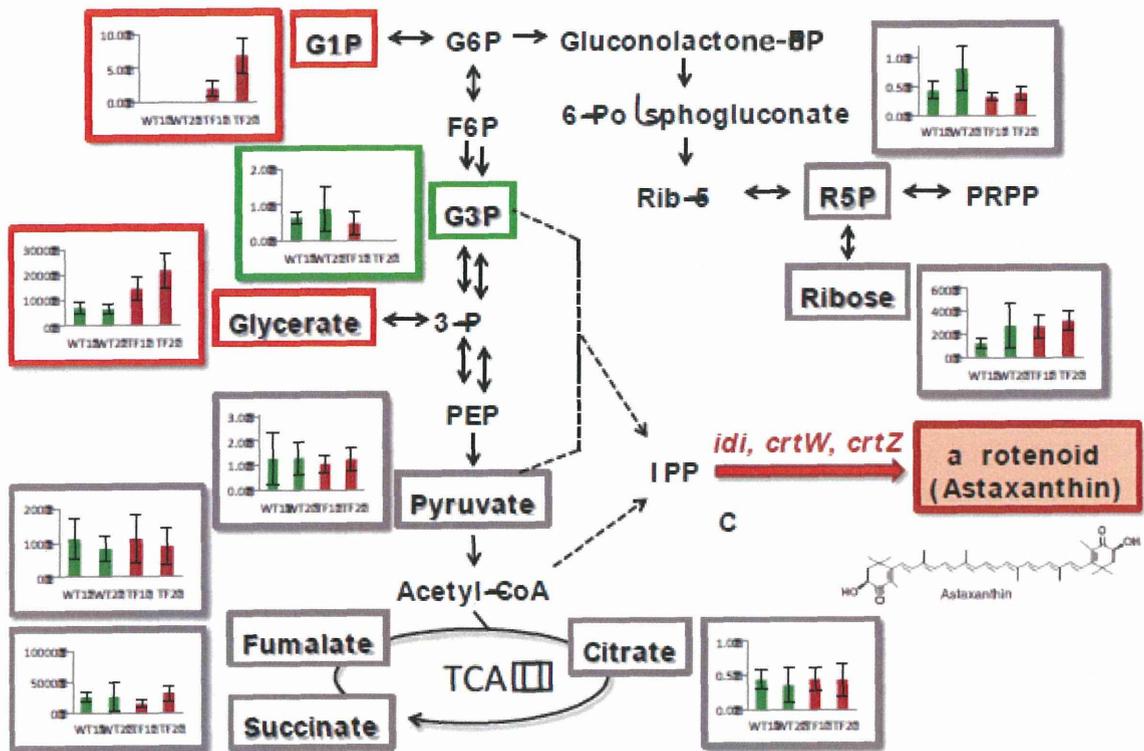
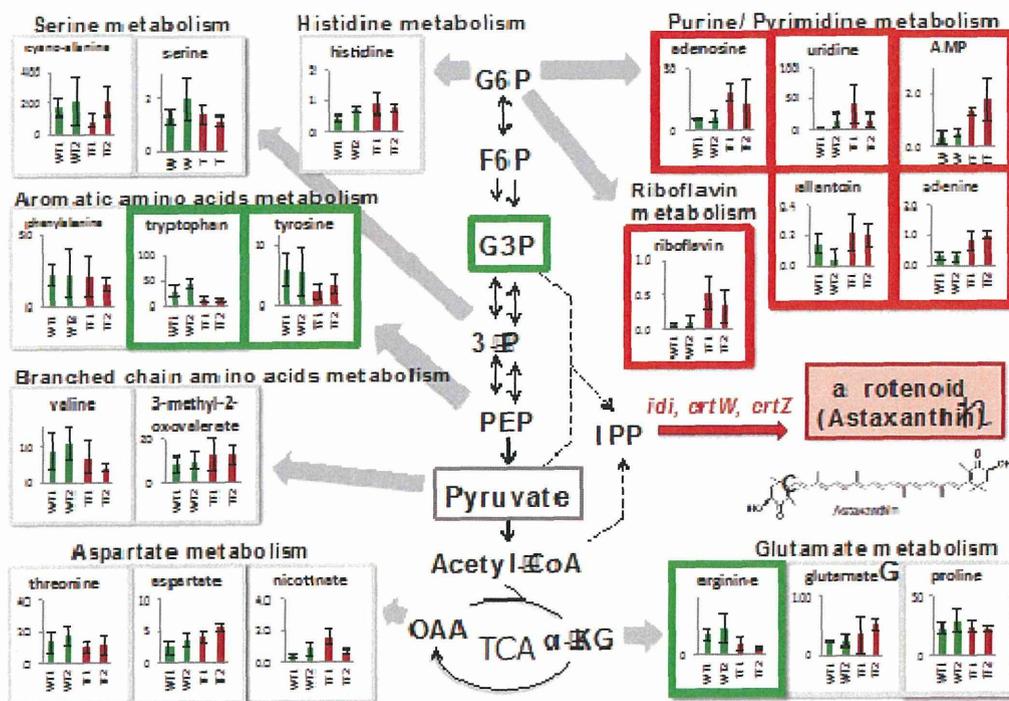


Fig 7. アミノ酸、核酸レベルに見られる代謝変動



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)
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書(平成24年度)

遺伝子組換え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24年度は、新開発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)アスタキサンチン産生レタスを用いたアレルギーを含むタンパク質の網羅的解析、(2)動物を用いる組換えレタスのアレルギー性の検討、(3)低アレルギーコメを用いたタンパク質の網羅的解析、(4)アレルギーデータベース(ADFS)のアレルギー及びエピトープ情報の更新を行った。具体的には、(1)2D-DIGE法を用いた発現差異解析の結果、アスタキサンチン産生レタス中のタンパク質はすべて、非組換え対照との発現差が2倍以内であった。レタスアレルギーLTPの定量には可溶性タンパク質を抽出後、さらにCMによる精製が必要であると考えられた。(2)非組換えレタスあるいはアスタキサンチン遺伝子導入レタスの抽出蛋白質で感作されたマウスが示したアナフィラキシー症状のスコアに差は認められず、抗原特異的IgG1抗体価は両群ともほとんど検出されなかったことから、アスタキサンチン遺伝子導入レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。(3)2D-DIGE法を用いた発現差異解析の結果、ターゲットタンパク質であるRAG2ファミリータンパク質の発現減少および、非ターゲットのGlutelinの発現増加が明らかとなった。(4)ADFSのアレルギー及びエピトープ情報の更新を行い、新たに33種のアレルギーについて、総エピトープ数191の情報を追加した。本年度の更新作業により、アレルギーおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1407となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は132種となった。

研究協力者

西島 正弘	国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
中村 亮介	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
中村 里香	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
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 秦野研究所
島田 浩章	東京理科大学 基礎工学部

用化されつつある。これらはこれまで存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討しておく必要があると考えられる。さらには、最近問題となっているのは、遺伝子組換え植物同士を交配して得られる後代種である。これらは遺伝子を組換えて付与された機能が「スタック」することによって、生産性等の向上を図っているものであるが、これらのように遺伝子を組換えたものをさらに交配した後代において、形質にどのような変化が表れているかについて研究されている例は少ない。そのため、今後増えるであろうスタック品種についてもそれらの組換え遺伝子の検出技術や安全性評価基準について検討しておく必要が望まれる。遺伝子組換え技術による安全性を考えるうえで、遺伝子組換えによる非意図的な影響を明らかにすることが必要であり、プロテオミクス等の網羅的解析法も一つの有用

A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物に限らず、遺伝子組換えニワトリやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実

な方法となると考えられる。そこで本分担研究では組換え体と非組換え体を用いて 2D-DIGE を用いてプロテオミクスによる網羅的解析を行い、両者の比較を行うことを第一の目標とし、第二に、プロテオームのターゲットを絞った解析法であるアレルゲノーム手法でアレルゲンに関する発現量の比較を行うこと、また、組換え体と非組換え体のアレルギー性の比較を動物モデルを用いて検討することを目的とした。

本年度は、組換え体として、代謝経路を変化させアスタキサンチンを合成するようにしたレタスと、アレルゲンタンパク質を低減させたコメを用いることとした。アスタキサンチン産生レタスに関しては、プロテオーム解析、動物モデルを用いるアレルギー性の比較検討を行い、アレルゲン低減化米に関しては、プロテオーム解析を行った。

B. 研究方法

(1) アスタキサンチン発現レタスのタンパク質発現差異解析

アスタキサンチン発現 (TF) レタスには、石川県立大学 三沢博士らによって作製された、*Paracoccus* 由来 *idi*、*Brevundimonas* 由来 *crtW*、*crtZ* をパーティクルガン法により導入したレタス 2 系統 (TF-1, TF-2) を用いた。また、対照に非組換え (Non-TF; NT) レタス 2 系統を用いた。細断したレタス 1 g に Protease inhibitor for plant (Sigma 社) を添加した PBS 1.75 mL を加えてメッシュ袋内でホモジネートしてタンパク質を抽出し、10,000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿を取り除いた。抽出のレプリケートは 2 回とした。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。各群のレタスタンパク質 25 μ g を 200 pmol の Cy3 または Cy5 で標識し、4 pmol の lysin で標識を停止した。また、両群の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×サンプルバッファーおよび膨潤バッファーを加えて 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°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ー中で還元後、4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファー中で 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 社) 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。Student-*t* 検定により、NT 群と TF 群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。

レタス LTP (Lipid transfer protein, Lac s 1) に特異的なペプチド配列 CSGVKSLNSAART に対するウサギ抗体をアジュバントと共に反復免疫を行い作製した。レタス粗抽出タンパク質からの LTP の精製は、カルボキシメチルセルロース (CM) 担体に吸着させた後、0.5 M NaCl/20 mM phosphate (pH 5.0) で溶出させて行った。定法に従い Western blot を行い、LTP の検出を行った。ウサギ抗 LTP 抗体は 1000 倍、HTP 標識抗ウサギ抗体は 2000 倍で用いた。

(2) 低アレルゲン (主要アレルゲン RA14-17 ノックダウン) イネの作出

14-17 kDa アレルゲンタンパク質 (RA14-17) を抑制するための RNAi の標的配列の選択と RNAi の構築

RNAi となる標的配列は、緑葉の RNA から取得することとし、発芽後 5 週目のイネの緑葉から