

D. 「あなた」について伺います。

問 63. あなたの最終学歴を教えてください。

- 1. 中・高校卒業・専門学校卒業
- 2. 短期大学・4年制大学卒業
- 3. 大学院卒業
- 4. その他【 】[]

問 64. あなたの職業を教えてください。

- 1. 会社員（法人勤務含む）（医療関係以外）
- 2. 公務員（医療関係以外）
- 3. 自営業（医療関係以外）
- 4. パート・アルバイト
- 5. 学生
- 6. 専業主婦・主夫
- 7. 無職
- 8. 医療関係
- 9. その他【 】[]

問 65. あなたの世帯全体の年収はどのくらいですか。

- 1. 100万円未満
- 2. 100万円台
- 3. 200万円台
- 4. 300万円台
- 5. 400万円台
- 6. 500万円台
- 7. 600万円台
- 8. 700万円台
- 9. 800万円台
- 10. 900万円台
- 11. 1,000万円以上
- 12. わからない／答えたくない

問 66. あなたには、子供（0歳～19歳）がいますか。

- 1. はい
- 2. いいえ

問 67. あなたは、医療に関する報道でどの報道機関を信頼していますか。

- 1. 新聞
- 2. テレビ
- 3. 書籍
- 4. インターネット（ソーシャルネットワークや体験談など）
- 5. インターネット（厚生労働省や医療機関、公的機関の専門サイトなど）
- 6. その他【 】[]

問 68. いままでに以下の治療を受けたことがありますか。複数ある場合は、あなたにとって一番重い病名をお答えください。（1つだけ選んでください）

- 1. がん
- 2. 心疾患
- 3. 脳血管疾患
- 4. 肺炎
- 5. 糖尿病
- 6. 上記以外での病気にともなう手術（【 】[]
- 7. どの治療も受けたことがない

問 69. 現在もその病気の治療を継続して受けていますか。

- 1. はい
- 2. いいえ

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25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(1)

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、遺伝子組換えアマゴ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、遺伝子組換えアマゴでは非組換え体と比較してアレルゲン遺伝子発現の低下が認められ、低アレルゲンコムにおいても前回と同様に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

宮原 平 東京農工大学大学院工学研究院

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。これらの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定しておく必要が望まれる。今年度は代謝経路を変化させた遺伝

子組換え動物として、成長ホルモン遺伝子 (Growth hormone 1: GH1) 導入アマゴを用いたトランスクリプトーム解析と、前年度とは異なるロットの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サンプル間にトランスクリプトーム解析の結果に大きな差がないことの確認を行った。また、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、前年度、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作製したスタック品種のトランスクリプトーム解析を委託した。

B. 研究方法

B-1 植物材料

GH1 導入アマゴは生育段階を生重量 100, 125, 150g に分けたものをヘテロ GH1 組換えアマゴと非組み換えアマゴの2種について水産総合研究センター増養殖研究所名古屋博之育種グループ長に分与していただいた。

低アレルゲンコメ (14-16kDa knock out 体) は東京理科大島田浩章教授から前年度とは異なるロットのサンプルを分与していただいた。

シロイヌナズナスタック個体は、まず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システムを用いた。これらのシステムを自家受粉して導入された遺伝子をホモで持つシステムを抗生物質耐性を指標として選抜した。*SjFBA* 組換え体と *SjRSH* 組換え体のホモのシステムを交配し

てそれらのスタックシステムを作出したものを使用した。

B-2 RNA 抽出方法

アマゴからの RNA 抽出は筋肉組織を液体窒素中で磨砕した後に、RNase-Free 水に懸濁しその上清から NucleoSpin RNA Blood Kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて RNA 抽出を行った。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。

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。

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

GH1 遺伝子導入アマゴから抽出した RNA を DNA マイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイチップはアマゴと同じサケ科のサーモンの DNA マイクロアレイチップ (Salmon Gene Expression Microarray 4x44) を用いた。このチップ上には約 43,000 のプローブが固定化されている。

低アレルゲン化コメの DNA マイクロアレイ解析は、約 42,000 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。

シロイヌナズナスタック品種のアレイ解析ではチップは Arabidopsis オリゴ DNA マイクロアレイ Ver. 4.0 を使用した。これは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る。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委託解析を用いた。

C. 研究結果

C-1 GH1 導入アマゴのトランスクリプトーム解析

GH1 導入アマゴと非組み換えアマゴから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行うことができる品質であるかについて検査を行ったところ、RNA の分解は認められなかった (Fig. 1) ことから、このサンプルを使用してマイクロアレイ解析を行った。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 50% 程度であった (Table 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同一の生重量間の組換え体と非組換え体で比較したところ (NT-100 vs GM-100、NT-125 vs GM-125、NT-150 vs GM150)、まず解析の指標として組換え体では GH1 遺伝子が成長に伴いその発現が増加していることが示された。この結果より解析が正しく行っていると判断し、他の遺伝子についても比較検討を行った (Table 2)。これまでの GH1 導入アマゴでの肝組織で発現比較の報告と同様に、組換え体のアマゴでは脂肪酸関連遺伝子の発現が低下していることが確認された。これは GH1 組換えアマゴでは脂肪組織の蓄積が少ないとする先の報告とも一致した結果である。またアレルギー物質である Parvalbumin は非組換え体と比較してどの成長ステージにおいても 3 割程度の発現量であったことから、組換え体では Parvalbumin の蓄積量は低下していることが示唆された。他にも糖代謝やサイトカイン関連遺伝子でも成長ステージに関わりなく組換え体において発現が変動していることが確認された。

C-2 低アレルギー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非組換えコメから RNA を

抽出し、その品質検査を行ったところ、両者において若干の RNA の分解が認められた (Fig. 2)。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 50% 程度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 (Table 3)。そこで、これらのコメにおける遺伝子発現量の変化を比較した。その結果、前年度の解析と同様に遺伝子組換えコメにおいてアレルギー関連遺伝子群の発現が低下していることが明らかとなった (Table 4)。また、発現の低下した割合も各遺伝子で前回と大きく変動しておらず、どの遺伝子においても非組換え体の 1 割以下まで発現が低下していることから、この低アレルギー化コメは安定的にアレルギー関連遺伝子群の発現が低下していることが示された。

C-3 遺伝子組換えスタッキングモデル植物のトランスクリプトーム解析

現在、委託解析中。

D. 考察

代謝改変や環境抵抗性が付与された新機能遺伝子組換え植物、さらにそれらの後代交配品種が実用化されている。また遺伝子組換え動物として成長ホルモン遺伝子導入サーモンが商品化されようとしている。新機能遺伝子組換え植物において、導入遺伝子が宿主の遺伝子発現や栄養成分に与える影響について解析したデータは少ない。また遺伝子組換え動物についても、それらデータの蓄積が乏しい。そこで、これらについてトランスクリプトーム解析および食品成分分析を行なって、安全性評価の上で必要とされる項目を明確化することを目的とした。まず、GH1 導入アマゴでは、信頼性の高いデータはマイクロアレイ上の遺伝子の約 50% 程度であったが、導入されている

GH1 遺伝子は組換え体において確かに発現が上昇しており、脂肪酸関連遺伝子およびアレルゲン遺伝子は発現が低下していることが示された。

低アレルゲン化コメのトランスクリプトーム解析では、約 5 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組換え体と非組換え体のどちらにおいても 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、それらのいずれも前回と同様にアレルゲンタンパク質をコードしているものであった。一方で、前回では α -グルコシダーゼ遺伝子の発現に変動が確認されていたが、今回の解析ではこれらの遺伝子発現に変化は見られなかったことから、これらに関しては個体や系統間の差であることが示唆された。

遺伝子組換えモデル植物のスタック個体の作出については前年度に得られていたスタック個体から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を委託した。

E. 結論

成長ホルモン遺伝子導入アマゴでは脂肪酸関連遺伝子とアレルゲン関連遺伝子の発現が非組換え体よりも低下していた。低アレルゲンコメにおいては、前年度と同様にアレルゲン関連遺伝子の発現が顕著に低下していることが示され、本研究で用いた組換え体は安定的にアレルゲン物質の蓄積が低下していることが示唆された。

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

伊東篤志、田口朋之、田名網健雄、羽田聖治、中村公亮、近藤一成、穂山浩、手島玲子、佐々木伸大、山口友紀絵、山田晃世、小関良宏：DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会第 19 回学術大会 (2013. 8. 30、名古屋・金城学院大学)

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

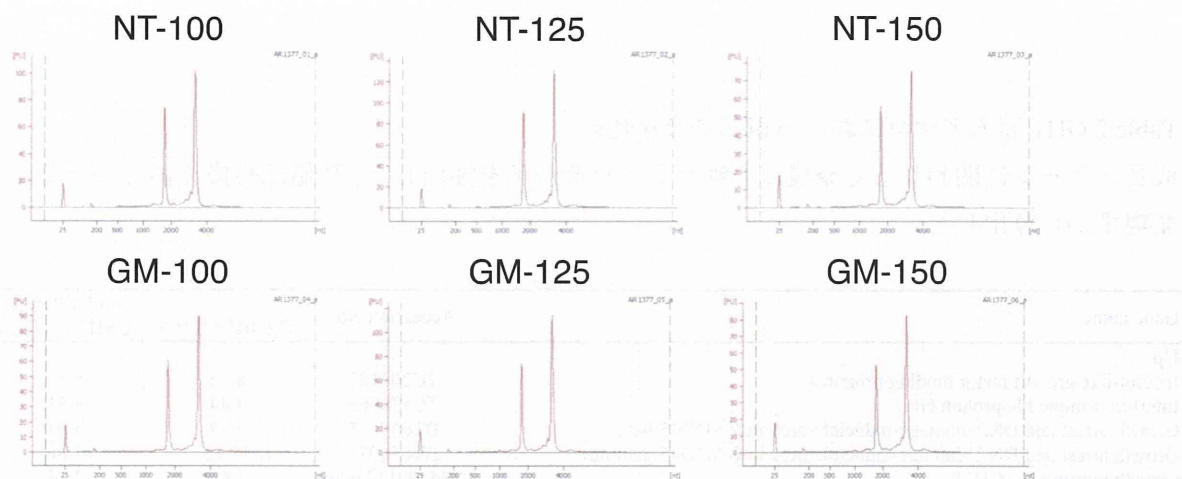


Figure 1 成長ホルモン遺伝子導入アマゴから抽出した RNA の品質検査結果

Table 1 成長ホルモン遺伝子導入アマゴの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: 信頼性の高くないシグナル強度、2: 信頼性の高いシグナル強度

検体 No	0 (%)	1 (%)	2 (%)
NT-100	24.42	19.51	56.07
NT-125	23.80	18.71	57.49
NT-150	22.00	17.95	60.06
GM-100	33.64	18.17	48.19
GM-125	27.40	23.37	49.23
GM-150	21.22	18.50	60.28

Table 2 GH1 導入アマゴにおける遺伝子発現比較

成長ステージに関わりなく発現に変動があった遺伝子を抽出した。数値は組換え体での発現量/非組換え体での発現量から算出した。

Gene name	Accession No.	Fold difference		
		GM100/NT100	GM125/NT125	GM150/NT150
Up				
Insulin-like growth factor binding protein 4	TC204183	8.34	5.17	2.75
Interferon-inducible protein GIG2	TC176963	4.44	8.51	8.22
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 beta	BT049695	5.98	5.94	6.77
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 gamma	BT056971	17.15	5.86	2.57
Growth hormone 1 (GH1)	NM_001123676	1.60	2.45	21.26
6-phosphofructokinase type C	NM_001173694	2.23	2.58	5.98
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	TC178950	13.36	7.16	38.32
Down				
Interleukin-6 receptor subunit alpha	NM_001173710	0.13	0.17	0.35
Interleukin-10 receptor beta chain precursor	BT047745	0.32	0.30	0.34
Interferon-induced 35 kDa protein homolog	NM_001141821	0.26	0.38	0.34
Interferon-induced GTP-binding protein Mx	NM_001139918	0.25	0.40	0.18
Interferon regulatory factor 7	NM_001136548	0.17	0.31	0.18
Epidermal growth factor receptor 5	TC205748	0.40	0.18	0.41
Opioid growth factor receptor	AM259613	0.13	0.38	0.40
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	NM_001140391	0.42	0.70	0.67
Transforming growth factor-beta-inducible early growth response protein 3	NM_001139829	0.41	0.75	0.88
Transforming growth factor beta-1	TC176824	0.37	0.55	0.79
Very-long-chain acyl-CoA synthase	TC179203	0.15	0.07	0.21
Mid1-interacting protein 1	BT045165	0.05	0.44	0.20
Acyl-CoA desaturase	BT059328	0.26	0.21	0.37
Fatty acid-binding protein	BT047488	0.09	0.14	0.25
Liver-type fatty acid-binding protein	TC202180	0.05	0.23	0.67
Fatty acid-binding protein	BT049320	0.28	0.12	0.29
Fatty acid-binding protein	TC179933	0.05	0.01	0.22
Fatty acid-binding protein	BT057126	0.25	0.29	0.62
Muscle fatty acid binding protein	NM_001123578	0.12	0.21	0.11
Intestinal fatty acid binding protein	TC196919	0.15	0.09	0.41
6-phosphofructokinase, muscle type	TC208420	0.46	0.11	0.26
Enolase	TC173506	0.25	0.24	0.61
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	BT046468	0.15	0.03	0.67

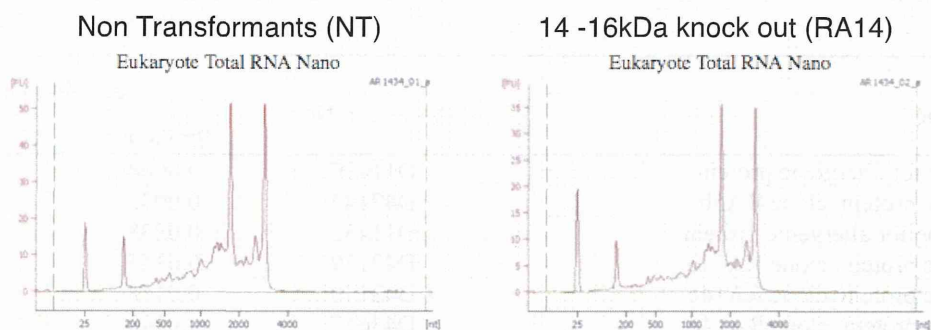


Figure 2. 低アレルゲン化コメから抽出した RNA の品質検査結果
 左：遺伝子非組み換えコメ、右：遺伝子組み換え低アレルゲン化コメ

Table 3 低アレルゲン化コメの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: 信頼性の高くないシグナル強度、2: 信頼性の高いシグナル強度

検体 No	0 (%)	1 (%)	2 (%)
NT	31.57	24.39	44.04
RA14	26.83	23.40	49.77

Table 4 低アレルゲン化コメにおけるアレルゲン関連遺伝子の発現比較

前回 (Previous) と今回 (This time) の解析を比較した。数値は組換え体での発現量/非組換え体での発現量から算出した。

Gene name	Accession No.	Fold difference	
		Previous	This time
RA5 gene for allergenic protein	D11430	0.0064	0.0084
Allergenic protein, clone RA5b	D42142	0.0045	0.0077
RA14 gene for allergenic protein	D11432	0.0238	0.0308
Allergenic protein, clone RA14b	D42139	0.0185	0.0218
Allergenic protein, clone RA14c	D42140	0.0158	0.0201
Allergenic protein, clone RA14d	D43657	0.0140	0.0178
Allergenic protein, clone RA14f	D43659	0.0158	0.0202
Allergenic protein, clone RA16	D42141	0.0053	0.0098
RA17 gene for allergenic protein	D11431	0.0088	0.0094
Allergenic protein RA17 precursor	X66257	0.0097	0.0055
Seed allergenic protein RAG2 precursor	AK107328	0.0138	0.0050
Allergenic protein	AF042200	0.0061	0.0083
Similar to allergenic protein	AK107215	0.0102	0.0100
Low molecular weight globulin	X62091	0.0123	0.0172

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25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 工学研究院 教授

研究要旨:

遺伝子組換え作物は世界で広く利用されているが、3大作物(トウモロコシ、ダイズ、ナタネ)、2大特性(害虫抵抗性、除草剤耐性)がその大部分を占めている。しかしながら、イネやコムギ等の作物を宿主としたり、乾燥抵抗性や栄養成分改変、機能性分子付与等の新たな特性を導入したり、新たな組換え作物の開発も盛んに進められており、そのいくつかは、既に商品化に近いところまで進んでいる。また、魚類や家禽類を宿主とした食用を目的とした組換え生物の開発・商品化もすすめられている。多様化する組換え体の食品としての安全性評価に際し、科学的知見としてオーム解析や成分分析等の一斉分析手法によって得られるデータの有効性の検証を目的とし、モデル組換え体を材料に、一斉分析を実施する。本年度は、低アレルゲンイネ玄米を分析対象とし、食品五成分の分析を行い、分析値を従来品種の値と比較した結果、大きな差異は認められないことを確認した。

協力研究者

小口 太一 筑波大学・生命環境系
遺伝子実験センター
菊池 彰 筑波大学・生命環境系
遺伝子実験センター

としての安全性評価に際し、科学的データとしてのオーム解析や成分分析等の一斉分析手法によるデータの活用可否や有効性の検証を目的とし、本研究グループでは、モデル組換え体材料を様々な成分分析試験に供し、その分析値の従来品種や非組換え体との比較から、組換え体の食品における安全性評価への活用の有効性等を検証する。

A. 研究目的

遺伝子組換え作物は世界で広く利用されているが、3大作物(トウモロコシ、ダイズ、ナタネ)、2大特性(害虫抵抗性、除草剤耐性)がその大部分を占めている。しかしながら、近年では、イネやコムギ等の新たな作物を宿主とした組換え作物や、乾燥抵抗性や栄養成分改変、機能性分子付与等の新たな特性の作物への導入した組換え体の開発が進んでいる。これら新たなタイプの組換え作物の開発は、既に商品化に近いところまで進んできている。また、食用を目的として、魚類や家禽類を宿主とした組換え生物の開発・商品化もすすめられている。多様化する組換え体の食品と

B. 研究方法

<植物材料>

低アレルゲンイネは閉鎖系環境で栽培したイネから採取した種子(玄米)を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。また、同条件で栽培した非組換えイネ(品種:日本晴)玄米を対象として用いた。

<食品成分分析>

組換えイネ玄米、非組換えイネ玄米各28gを、日本食品分析センターに送付し、五成分(水分、

たんぱく質、脂質、炭水化物、灰分) 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。

$$\text{炭水化物} = 100 - (W + P + L + A)$$

W : 水分、P : たんぱく質、L : 脂質

C : 炭水化物、A : 灰分

C. 研究結果

低アレルゲンイネ玄米および同環境で栽培した非組換え日本晴玄米の成分分析結果に大きな違いは見られなかった(図1)。また、同分析値を日本食品成分分析表(五訂増補)および農研機構食品総合研究所の組換え農作物の安全性評価のための食品データベース収載データと比較を行ったところ、本試験分析値ではタンパク質量が多い傾向が確認された(図1)。

D. 考察

低アレルゲンイネ玄米と非組換え対照日本晴玄米の間で成分分析結果に大きな違いが見られなかったことから、本低アレルゲン化遺伝子の導入によりイネ玄米の食品成分に大きな違いが生じないことが示唆される(図1)。また、本試験分析結果と公表データベースの収載データとのタンパク質量の違いは、本試験分析試料が人工環境で栽培されたことから、栽培環境の違いに起因すると考察される。今後、本組換えイネを、太陽光を利用した温室や圃場で栽培し、成分を比較することが望ましい。

E. 結論

低アレルゲンイネ玄米において非組換え対照イネとの間で栄養成分に大きな差異は検出され

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

G. 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

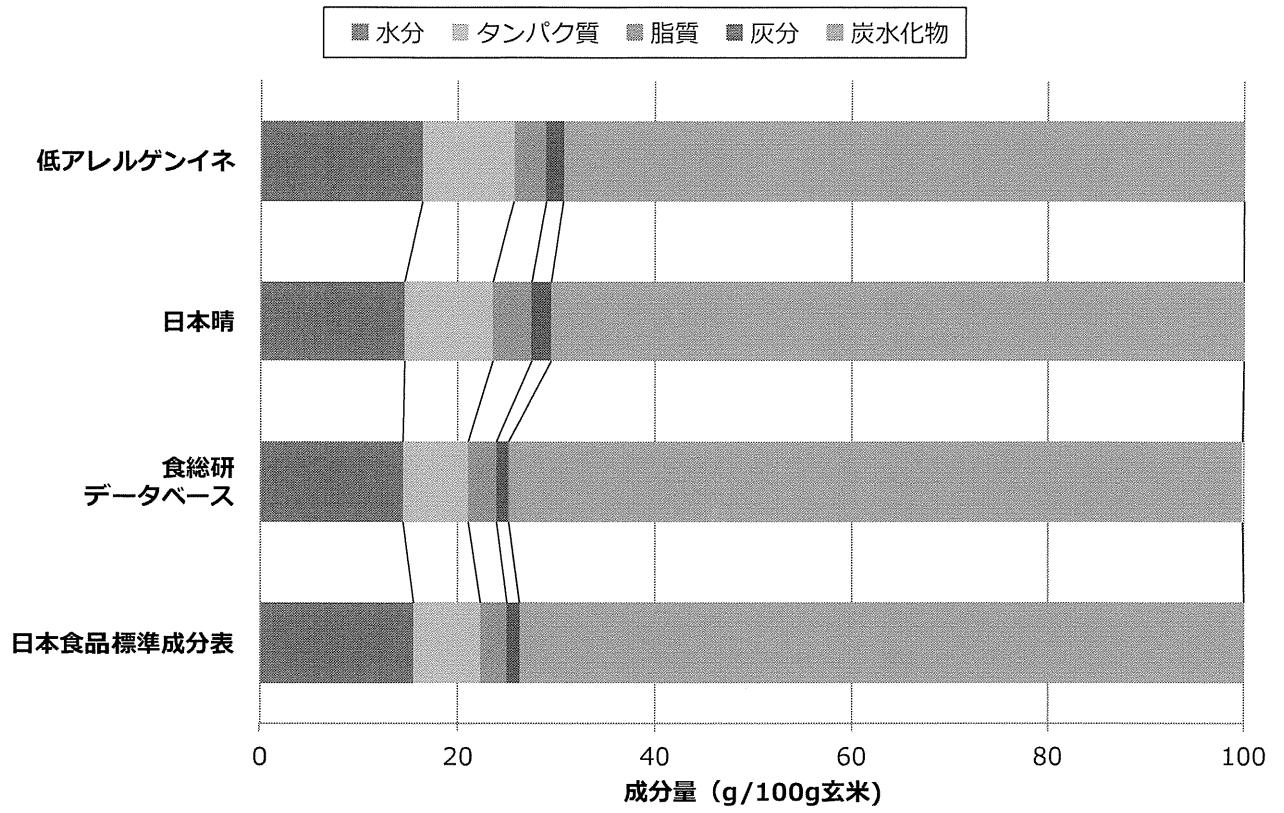


図 低アレルギーイネ玄米の成分分析の結果

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25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:

本研究は、バイオテクノロジーの応用によって新開発される食品中に含まれる低分子有機化合物(生体成分)を質量分析装置によって一斉分析し、安全性評価のための基礎データとすることを目的としている。平成25年度は、1) 植物性食品であるイネ科のイネ種子と、2) 動物性食品であるサケ科アマゴを解析対象とした。まず、1) イネ種子中の主要アレルゲンである14-16 kDa タンパク質群(α -amylase/trypsin 阻害タンパク質ファミリータンパク質群)の発現をRNAi法で抑制したRA14-pANDA系統(GMイネ)、および非組換え体(non-GMイネ)の種子からメタノール/クロロホルム/水抽出液を調製しGC-MSを用いたメタボローム解析に供した。GC-MS分析によるすべての計測データ(イオン化されて検出された化合物の質量値とイオン強度の情報)を用いて主成分分析したところ、GMイネとnon-GMイネは独自のメタボロームを形成することが明らかとなった。標準化合物を用いて同定・定量した52化合物に関する主成分分析に於いても、GMイネとnon-GMイネが独立したメタボロームを形成した。これらのメタボロームクラスター形成は、GMイネにおける14種の化合物(アミノ酸2種類、炭化水素7種類、補酵素2種類、脂質1種類、核酸2種類)の蓄積量の有意な増加と、2種類の化合物(アミノ酸1種類、補酵素1種類)の蓄積量の有意な減少によるものであった。GMイネにおいては、RNAi法によって α -amylase/trypsin 阻害タンパク質ファミリーのタンパク質群の発現が抑制された結果、種子貯蔵デンプンおよび種子貯蔵タンパク質の分解に関わる代謝活性が亢進したと考えられ、遺伝子組換えによる代謝変動の範疇に入るものと推察される。次に、2) ヒト成長ホルモンGHをアマゴで高発現させた遺伝子組換え体GH系統(GMアマゴ)と非組換え体(non-GMアマゴ)の3段階の生育ステージ(100g, 125g, 150g)にある個体から採取した筋肉組織を供試し、そのメタノール/クロロホルム/水抽出液をGC-MSメタボローム解析に用いた。GC-MS分析によるすべての計測データを用いて主成分分析したところ、GMアマゴとnon-GMアマゴが形成するメタボロームには明確な差は無かった。GMアマゴでは、同定した72化合物のうち大部分の化合物の蓄積量に変化は認められなかったが、4種類の化合物(cis-aconitate, GABA, glutamate, phosphate)の蓄積量が有意に減少していた。LC-MS/MSを用いた脂質プロファイリングに供した。その結果、GMアマゴとnon-GMアマゴの極性脂質プロファイルに顕著な違いは認められなかった。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術の発達は生物の遺伝情報の総体であるゲノムを人為的に改変し、多様な形質を付与することを可能とした。これまでに、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法といった遺伝子導入技術を用い、主に作物を対象として、栽培コストの削減、日持ち性の向上、栄養価の向上などの有用形質が導入されてきた。これらの遺伝子組換え生物に導入された遺伝子の機能は多岐に渡るが、除草剤耐性や昆虫食害抵抗性、内生の代謝改変を目的とした多様な酵素タンパク質などが挙げられる。近年では、環境ストレス応答性の転写調節因子遺伝子の導入によって、乾燥ストレスや浸透圧ストレス（塩ストレス）耐性を付与した遺伝子組換え作物が注目されている。さらに、新しい遺伝子組換え技術として、ゲノム上の特定の領域を編集することが可能なゲノム編集法が実用化されつつあり、遺伝子組換え生物が今後も生まれ続けると予想される。

遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーの応用によって新機能を賦与された生物に於いては、当初目的の機能改変を達成するとともに、全般的な細胞機能の状態を把握するための解析情報の取得も必要となる。このような解析目的には、生物の構成要素の総体をシステム的に理解することを目的としたオミクス研究手法が極めて有用である。代表的なオミクス解析として、転写産物の総体を対象とするトランスクリプトーム解析、タンパク質の総体を対象とするプロテオーム解析、代謝産物の総体を対象とするメタボローム解析が挙げられる。

本研究では、質量分析によるメタボローム解析を実施し、遺伝子組換え生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ための基礎データを取得することを目的とした。平成 25 年度は、植物性食品であるイネ科のイネと、動物性食品であるサケ科のアマゴを解析対象

とし、GC-MS を用いた中心代謝産物の一斉解析と LC-MS を用いた極性脂質の一斉解析を実施した。

B. 研究方法

< 供試試料 >

イネ種子中の主要アレルゲンである 14-16 kDa タンパク質群をコードする遺伝子の発現が RNAi 法によって抑制された低アレルゲンイネ RA14-pANDA 系統 (GM イネ) は、東京理科大学の島田浩章教授から提供していただいた。対照区として非遺伝子組換えイネ (non-GM イネ) を用いた。これらの系統の種子を微粉末に加工した状態の試料を供試した。

ヒト成長ホルモン遺伝子を過剰発現させた遺伝子組換え高成長アマゴ (GM アマゴ) は、水産総合研究センターの名古屋博之先生から提供していただいた。対照区として非遺伝子組換えアマゴ (non-GM アマゴ) を用いた。GM および non-GM アマゴは、生重量が 100 g, 125g, 150 g に達した個体を 3 個体ずつサンプリングし、3 枚におおした片身 (筋肉組織) を液体窒素で急速凍結させた後、5 mm 程度の大きさに破碎した状態の試料を供試した。

< 方法 >

1. 中心代謝産物の GC-MS 分析

1-1. 抽出

代謝物の抽出溶媒としてメタノール:クロロホルム:水 = 3:1:1 (v/v/v) 混合溶媒を用いた。内部標準として、イネでは reserpine (混合溶媒中の濃度 125 μ g/mL) を、アマゴでは stigmasterol (混合溶媒中の濃度 50 μ g/mL) を加えた。液体窒素を用いて予冷した乳鉢と乳棒を用いて凍結試料を磨砕し、液体窒素を用いて予冷した 2.0 mL チューブに新鮮重量で 50 mg を秤量した。そのチューブに 500 μ L の氷冷したメタノール/クロロホルム/水混合溶

媒と 300 mg の石英砂を加えボルテックスミキサーを用いて 10 秒間混合し、続いてミキサーミル MM400 (Retsch 社) にセットし frequency 30 回/毎秒で 2 分間粉碎した (アルミブロックは予め氷冷したものをを用いた)。次に、10 分間遠心し (16,200 × g, 4° C), 上清 500 μL を新しい 2.0 mL チューブに回収した。回収した上清 100 μL を新しい 2.0 mL チューブに分注し、遠心エバポレータ CC-105 (TOMY 社) で 3 時間乾固させ、さらに、凍結乾燥機 FDU-1200 (EYELA 社) にかかけ 12 時間乾固させた。

1-2. 誘導体化

抽出した代謝産物の誘導体化はトリメチルシリル化剤である MSTFA

[N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] を用いた。まず、2.0 mL チューブ内で乾固させた試料に 40 μL の MSTFA を加え、ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間混合した。続いて 2.0 mL チューブを Thermomixer comfort (Eppendorf 社) にセットし 1,000 rpm, 37° C の条件で 45 分間反応させた。反応後の 2.0 mL チューブを 37° C に予熱したヒートブロックに移し、反応液の温度を徐々に室温まで下げた。次に、2 分間遠心し (16,200 × g, 室温), 上清 35 μL を回収した。

1-3. GC-MS の設定

誘導体化した試料の分析には、GC-TOF/MS (Autosampler, PAL GC-xt, JASCO 社; GC, Agilent 6890N, Agilent 社; MS, GCT premier, Waters 社) を用いた。MSTFA により誘導体化した試料 1 μL を GC-MS にインジェクトした。インジェクター温度は 230° C (cold trap splitless mode) に設定した。GC の分離には HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) (Agilent Technologies 社) を

用いた。キャリアガスはヘリウムを用い、ガス流量は 1.0 mL / min とした。GC の昇温条件は、70° C (1 min), 1° C/min, 76° C (0 min), 6° C/min, 350° C (1 min) とした。GC-MS トランスファーラインは 250° C, MS イオン源温度は 250° C とした。イオン化は electron-ionization (EI) モード (70 eV) で行い、スキャン範囲は m/z 40-650 とした。

1-4. データ取得

GM および non-GM イネは、粉末試料からそれぞれ 4 回の独立した抽出を行い、各抽出液を 1 回 GC-MS 分析に供した。また、GM および non-GM アマゴは、各個体由来の試料からそれぞれ 1 回抽出を行い、各抽出液を 1 回 GC-MS 分析に供した。得られたマスプロトグラムからのピーク抽出およびピーク面積値の算出は MassLynx (Waters 社) を用いた。個々の化合物の同定は、93 化合物を同定することが可能な in house の化合物ライブラリ (市販標準物質の精密質量情報, フラグメントピーク情報, カラム保持時間の情報を格納) を用いた。同定された化合物の相対含有量は、内部標準物質のピーク面積値との比較による相対面積値として算出した。

1-5. データ解析

GM と non-GM それぞれから検出された代謝産物について、平均値の差を Student's t-test により検定した。また、主成分分析 (Principal component analysis) により GM と non-GM の代謝プロファイルを比較した。Student's t-test は Microsoft Excel (Microsoft 社) を用い、主成分分析は統計解析ソフト Pirouette (Infometrix 社) を用いた。

2. 極性脂質の LC-MS 分析

2-1. 総脂質の抽出

アマゴ筋肉組織からの総脂質の抽出は Folch method¹⁾の改変法を用いた。総脂質の抽出溶媒としてクロロホルム:メタノール = 2:1 (v/v) 混合溶媒を用いた。

液体窒素を用いて予冷した乳鉢と乳棒を用いて凍結試料を磨砕し、液体窒素を用いて予冷した 2.0 mL チューブに 50 mg (wet weight) を秤量した。そのチューブに 500 μ L の氷冷したクロロホルム/メタノール混合溶媒と 300 mg の石英砂を加えボルテックスミキサーを用いて 10 秒間混合し、ミキサーミル MM400 (Retsch 社) にセットし frequency 30 回/毎秒で 2 分間粉碎した (アルミブロックは予め氷冷したものを用いた)。ローテーター RT-50 (TAITEC 社) にセットし室温で 15 分間攪拌した後、10 分間遠心し (16,200 \times g, 室温), 上清 450 μ L を新しい 2.0 mL チューブに回収した。回収後の残存物に 500 μ L の氷冷したクロロホルム:メタノールを加え、同様の手順で再抽出後、10 分間遠心し (16,200 \times g, 室温), 上清 450 μ L を先に回収したチューブに加えた。次に、180 μ L の 0.9% NaCl (0.2 \times volume) を加え、10 秒間ボルテックスし、3 分間遠心 (16,200 \times g, 室温) 後、上層を除去した。チューブに残存した中間層と下層を遠心エバポレータで乾固した。乾固した総脂質抽出物に 1 mL のメタノールを加え、ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間混合し 3 分間遠心 (16,200 \times g, 室温) 後、上清を孔径 0.22 μ m の PTFE メンブレンフィルター (Millipore 社) で濾過しバイアルに回収した。

2-2. LC-MS の設定

極性脂質の分析には、LC-iontrap TOF/MS (Nano Frontier LD, Hitachi HighTechnologies 社) を用いた。クロロホルム/メタノール混合溶媒により抽出した試料 5 μ L を LC-MS にインジェクトした。LC の分離には、YMC-Pack Diol-120-NP column (150 \times

2.0 mm, 粒子径 5 μ m, YMC 社) を用いた。移動相は A (水, 0.1% ギ酸), B (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) を用い、流量は 0.2 mL/min, カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。グラジエント条件は, 0 min, 3% A; 20 min, 35% A; 20.1 min, 50% A; 25 min, 50% A; 25.1 min, 3% A; 37 min, 3% A に設定した。

2-3. 開裂フラグメント情報の取得

LC-MS を用いたデータ取得は, full MS スキャンとデータ依存的 MS/MS スキャンを組み合わせで行った。Full MS のスキャン範囲は m/z 100-1500 とし、スキャン毎に m/z 400-1500 の範囲の親イオン (イオン強度順に上位 2 番目まで) を対象とし開裂フラグメントの情報を取得した。

2-4. 開裂フラグメントの情報に対する注釈付け

極性脂質の開裂フラグメント情報に対する注釈付けには LipidBlast ライブラリ²⁾を用いた。LipidBlast ライブラリはインシリコで予測された脂質分子の開裂フラグメント情報のデータベースであり、極性脂質を中心として約 12 万の脂質分子の開裂フラグメント情報が格納されている

(<http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast>)。

LipidBlast ライブラリを利用して脂質分子に注釈付けをおこなった³⁾。まず、NIST Mass Spectral Search Program (version 2.0) に LipidBlast ライブラリをインポートし、相同性検索のリファレンスライブラリとして指定した。次に、LC-MS を用いて取得した脂質分子の開裂フラグメント情報を分析データごとに Mascot Generic Format (MGF) ファイルとして取り出し、NIST Mass Spectral Search Program にインポートした。1 個の MGF ファイルには、1 回の LC-MS 分析で取得した \sim 100 個の親イオンの開裂フラグメント情報が含まれている。個々の親イオン由来の開裂フラグメント情報をクエリとして NIST Mass Spectral

Search Program により相同性検索を実行すると、LipidBlast ライブラリに格納されている開裂フラグメント情報の中から類似性の高い開裂フラグメント情報を持つ脂質分子の構造情報が一覧として表示される。開裂フラグメント情報の類似性は dot product 値として算出される。Dot product 値は 0-1000 の範囲の値を取り、この値が大きいほど 2 者の開裂フラグメント情報の類似性が高いことを意味する。本研究では、個々のクエリに対する注釈として、dot product 値が最も高いライブラリ中の脂質分子の構造情報を採用した。これらの注釈情報のうち、dot product 値が 600 以上のものを対象として、脂質クラス、炭素鎖長、不飽和結合数の 3 通りの視点から整理して GM と non-GM 間で比較した。

C. D. 結果と考察

1. 低アレルゲン米のメタボローム解析

GM イネおよび non-GM イネの種子からメタノール/クロロホルム/水抽出液を調製し GC-MS を用いたメタボローム解析に供した。得られた GC-MS 全イオンクロマトグラム中には、アミノ酸、有機酸、単糖、二糖、三糖、脂肪酸、ステロールが含まれていた。得られた全イオンのイオン強度情報を用いて主成分分析を行った結果、各系統は独自のクラスターを形成した (Fig. 1A)。GC-MS 全イオンクロマトグラムから標準化合物の分析データに基づいて 52 化合物を同定し、その 52 化合物の蓄積量の情報を用いて主成分分析を行った結果、全イオンのイオン強度情報を用いた場合と同様に、各系統は独自のクラスターを形成した (Fig. 1B)。両者の代謝プロファイルの違いに関わる化合物を特定するために、ローディングプロットを調べたところ、GM イネにおいて高蓄積している化合物として、adenine, glycerol などが見出され、逆に non-GM イネにおいて高蓄積している化合物として、threonine, β/γ -tocopherol (β -

および γ -tocopherol は RT やマススペクトルからは区別できないため、両者の面積値の合計値をもとにして評価した) などが見出された (Fig. 1C)。

次に、GM イネと non-GM イネの種子抽出物に含まれる化合物の蓄積量の平均値の差を Student's t-test により検定した (Table 1)。同定・定量できた化合物 (合計 52 種) のうち、GM イネでは 2 種のアミノ酸類 (quininate, tyrosine), 7種の炭化水素類 (erythrytol, glucose, myoinositol, fructose, mannitol, galactose, malate), 補酵素 2 種類 (ascorbate, pantothenate), 脂質 (glycerol), 核酸 2 種類 (adenine, cytidine) の合計 14 種類の化合物蓄積量が有意に増加しており、2 種類の化合物 (threonine, β/γ -tocopherol) の蓄積量が有意に減少していることが分かった (Table 1)。

GM イネにおいてノックダウンされている 14-16 kDa アレルゲンタンパク質は、イネ種子の主要なタンパク質の一群であり、 α -amylase/trypsin inhibitor family に属する。これらのタンパク質群は、貯蔵多糖として種子中にデンプンを蓄えるイネにおいて、種子の登熟段階や休眠期間中の α -amylase の活性を抑制し、デンプンの蓄積を促す役割を担うと考えられる。Western-blot の結果から、GM イネ種子の 14-16 kDa タンパク質群の蓄積量の減少が示されている (東京理科大学島田教授)。今回の分析に供した GM イネ種子においては、14-16 kDa アレルゲンタンパク質 (α -amylase/trypsin inhibitor) の発現が抑制され、その結果、 α -amylase 活性が野生型に比べて高く維持されることで、デンプン分解活性および糖代謝、アミノ酸合成活性に影響が及んだ可能性が考えられた (Table 1)。

2. 高成長アマゴのメタボローム解析

GM アマゴおよび non-GM アマゴの筋肉組織成分を、GS-MS 分析による中心代謝分析と、LC-MS

による脂質プロファイリングによって比較解析した。試料のメタノール/クロロホルム/水抽出液を GC-MS を用いたメタボローム解析に供して得られた全イオンクロマトグラム中には、アミノ酸、有機酸、単糖、糖リン酸、脂肪酸、ステロールが含まれていた。得られた全イオンのイオン強度情報を用いて主成分分析を行った結果、各系統あるいは魚体重の差を反映する明確なクラスターは形成されなかった (Fig. 2)。GC-MS 分析によって同定・定量できた 72 化合物の蓄積量の差を Student's t-test により検定したところ、GM アマゴでは 4 種類の化合物 (*cis*-aconitate, glutamate, GABA, phosphate) の蓄積量が有意に減少していることが分かった (Table 2)。

次に、リン脂質などの極性脂質やトリアシルグリセロールなどの中性脂質の蓄積プロファイルを調べるために、LC-MS/MS を用いた脂質プロファイリングに供した。検出されたすべてのイオンに対し、LipidBlast ライブラリを用いて注釈情報を付与した。付与した注釈情報を脂質クラス、炭素鎖長、不飽和結合数ごとに分類し、その結果を Fig. 3 に示した。GM アマゴでは炭素鎖長が 21-25 の脂質分子の注釈数の有意な増加が認められたが (Fig. 3)、その他の脂質カテゴリでは注釈情報の数に有意な差は見られなかった。

GC-MS による中心代謝の解析と LC-MS/MS による脂質プロファイルの解析結果から、GM アマゴと non-GM アマゴの極性脂質プロファイルに顕著な違いは認められなかった。今後は魚体重に加えて、GM と non-GM 生育齢を合わせた比較メタボローム解析の実施が必要であると考えられる。

E. 参考文献

1) Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):

497-509 (1957)

2) Kind T., Liu K.H., Lee do Y., DeFelice B., Meissen J.K., Fiehn O.: LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat Methods*. 10(8): 755-758 (2013)

3) Takumi O., Takeshi F., Atsushi O., Rai N., Masami N., Tobias K., Oliver F., Shigehiko K., Masanori A., Daisaku O.: Exploration of polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed in silico. *Biosci Biotechnol Biochem* (in press)

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

1) 佐々木貴子・小川拓水・岡澤敦司・三沢典彦・太田大策: 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスの代謝プロファイリング, 第 31 回日本植物細胞分子生物学会大会, (2013. 9)

2) 佐々木貴子・小川拓水・岡澤敦司・三沢典彦・太田大策: 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスのメタボローム解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会 (2014. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

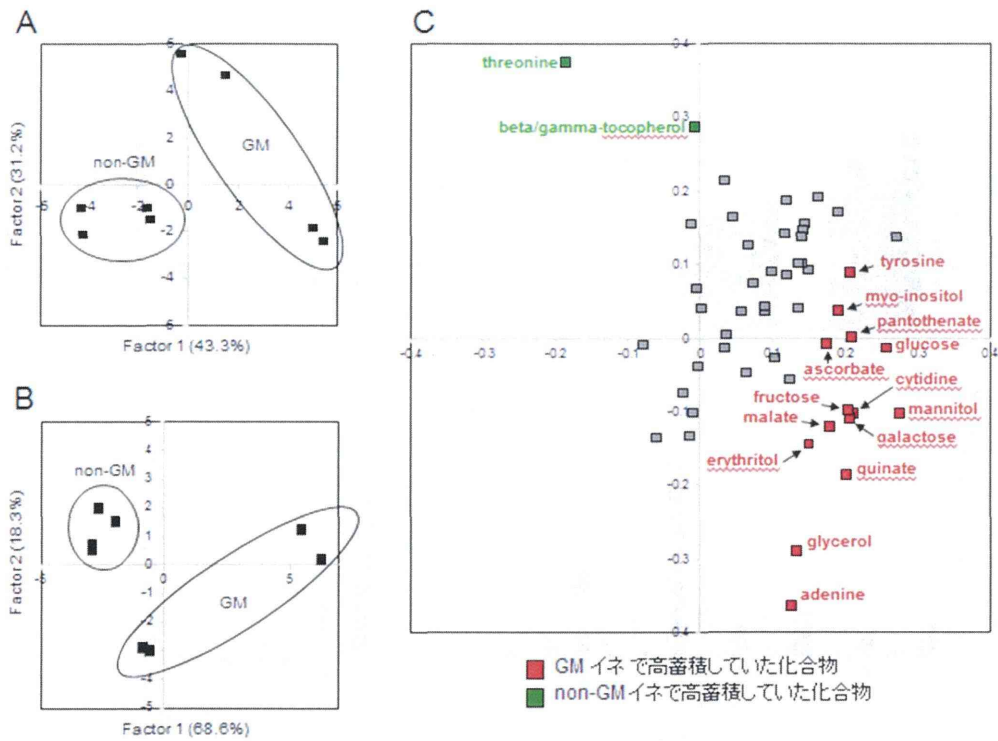


Fig. 1. GMイネ種子抽出物のメタボローム解析(主成分分析). A. GC-MS分析で計測した全イオンによる主成分分析結果. B. 同定・定量した52化合物の主成分分析. C. Bで示した52化合物の主成分分析のローディングプロット.

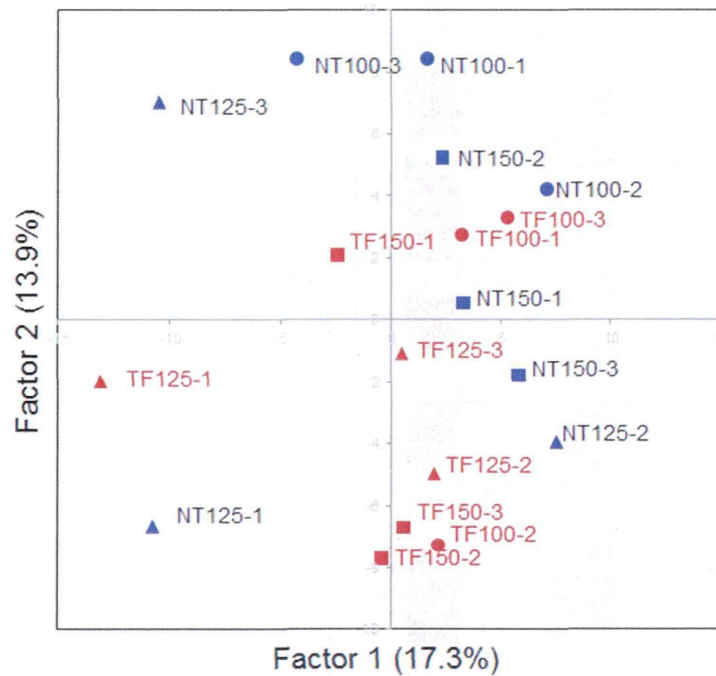


Fig. 2. GMアマゴ抽出物のGC-MSメタボローム解析(主成分分析).