

C. 研究結果

C-1 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

スタック系統の作出元である親個体の *SjFBA* 過剰発現体、*SjRSH* 過剰発現体およびそのスタック系統 3 サンプル全てにおいてアレイ解析で信頼性の高いシグナル強度が得られた遺伝子が 1,288 遺伝子得られたため、これらの遺伝子を解析対象とした。まず、非組換え体と比較して発現が上昇した遺伝子は *SjFBA* 過剰発現体で 664、*SjRSH* 過剰発現体で 688、スタック系統で 699 遺伝子が確認された。このうち全ての個体で発現が上昇した遺伝子は 459 遺伝子あった (Fig. 1A)。さらにこの 459 遺伝子中でスタック系統において発現の上昇が親個体よりも増強された遺伝子は 8 遺伝子が確認された (Table 1)。8 遺伝子中にストレス応答に関連のある遺伝子が 4 遺伝子確認された。次に、非組換え体と比較して発現が低下した遺伝子は、*SjFBA* 過剰発現体で 613、*SjRSH* 過剰発現体で 599、スタック系統で 588 遺伝子が確認された。このうち全ての個体で発現が低下した遺伝子は 386 遺伝子あった (Fig. 1B)。さらにこの 386 遺伝子中でスタック系統において発現の低下が親個体よりも著しい遺伝子は 10 遺伝子が確認された (Table 1)。10 遺伝子とも耐塩性メカニズムとの関連は不明であった。スタック系統で変動のあった遺伝子は花粉親 (*SjFBA* 過剰発現体) で変動のあった遺伝子の 70% 程度であったのに対し、種子親 (*SjRSH* 過剰発現体) では 90% 程度であった。スタック系統のみで発現が変動した遺伝子は今回対象とした遺伝子のうち 2% 程度であり、非組換え体での発現と比較すると 2 倍程度の発現変動が確認された。

C-2 GH1 導入アマゴのトランスクリプトーム解析

昨年度は GH1 導入アマゴと非組み換えアマゴのマイクロアレイ解析で各成長ステージ 1 検体ずつのみの解析であったため、今年度はさらに GH1 導入アマゴで各成長ステージ 2 検体ずつ、非組換えアマゴで 1 検体ずつ追加して発現解析を行った。昨年度報告していたサイトカイン、成長因子、脂肪酸代謝、糖代謝に関連があると考えられる遺伝子の変動が確認された (Table 2)。この結果、導入された GH1 遺伝子はアマゴの成長とともに発現が上昇することが示された。またアレルゲン物質である parvalbumin はどの成長ステージにおいても非組換え体よりも発現が抑制されていることが示された。昨年度報告した以外に組換え体において 46 遺伝子が全ての成長ステージで発現が上昇しており、61 遺伝子が低下していた。また、3 遺伝子は成長ステージ 100 g と 125 g で非組換え体よりも発現量が大きく、150 g では非組換え体よりも発現量が低下していることが示された。

C-3 フラジェリン遺伝子導入乳酸菌のトランスクリプトーム解析

次世代シーケンスの結果、タンパク質をコードしている 2,997 遺伝子の配列を獲得し、この獲得配列の 8 割程度を今回使用した IGM393 株と同系統の *Lactobacillus casei* BL23 株のゲノム配列にマッピングすることができた。*L. casei* BL23 は 3,044 種のタンパク質をコードする遺伝子の存在が報告されていることから今回の次世代シーケンスの結果はほぼ全ての遺伝子の配列を網羅できた結果となった。ベクターコントロールとの遺伝子発現量を比較した結果、フラジェリン遺伝子組換え体では 20 種類の遺伝子で発現が上昇していることが示された。特にゲノム領域の LCABL_03590 ~ 03730 の遺伝子の発現がフラジ

ェリン遺伝子組換え体において特異的であることが示された。また、トランスポゼースをコードする 1 遺伝子のみがフラジェリン遺伝子組換え体で発現が低下していた (Table 3)。

D. 考察

代謝改変や環境抵抗性が付与された新機能性遺伝子組換え植物、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。新機能性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。

耐塩性遺伝子を導入したシロイヌナズナのスタックシステムの解析では、花粉親よりも種子親の形質をより強く引き継いでいることが示唆された。また親個体で共通して変動している遺伝子のうち 2% 程度がスタック種において変動が増強されており、特に発現が上昇した遺伝子ではストレス応答に関連のある遺伝子が確認された。スタックシステムのみで発現に変動がある遺伝子も確認されたが、発現の変動は小さく、導入している遺伝子特異的な発現の変動なのかまたは個体間の差であるか確認する必要がある。少なくとも全ての組換え体は非組換え体と同様に成長し結実することから、一次代謝系に大きな変化は起きていないことが考えられた。

GH1 導入アマゴでは、脂肪酸合成関連遺伝子およびアレルゲン遺伝子の発現が低下していることが示された。また昨年度にアマゴのプロテオミクス解析で報告のあったピルビン酸キナーゼ

とエノラーゼに関して今回のトランスクリプトーム解析でも同様に発現が変動している結果が得られた。アレルゲン物質である parvalbumin の結果もプロテオミクス解析の結果と一致していた。

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌では、フラジェリン遺伝子組換え体の株において特徴的にゲノムの特定の領域の遺伝子に発現が見られた。この結果は、今回と同じベクターコントロール株のゲノム解読を行った際に同一のゲノム領域の配列が得られなかったとの報告があることから (国立医薬品食品衛生研究所食品管理部 梶田和彌博士)、使用したベクターコントロール株において組換え時または培養変異などの要因によりこのゲノム領域が欠落している可能性が考えられた。この領域以外の遺伝子で顕著に発現が変動しているものは確認されなかった。

E. 結論

シロイヌナズナ耐塩性スタックシステムでは、種子親の形質が強く現れており、親個体よりもストレス応答遺伝子の発現変動に増強が見られた。成長ホルモン遺伝子導入アマゴでは脂肪酸合成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。フラジェリン遺伝子導入乳酸菌では特定のゲノム領域の遺伝子の発現がみられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura, R., Nakamura, R., Adachi, R., Hachisuka, A., Yamada, A., Ozeki, Y. and Teshima, R. Differen-

tial analysis of protein expression in RNA-binding-protein transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress. J. Proteome Res., 13(2): 489-495 (2014)

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、穉山浩、手島玲子、何思巖、宮原平、山田晃世、小関良宏：DNA マイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパパイヤのスクリーニング検査法、日本食品化学学会第20回学術大会（2014.5.23、東京・東京ビッグサイト）

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

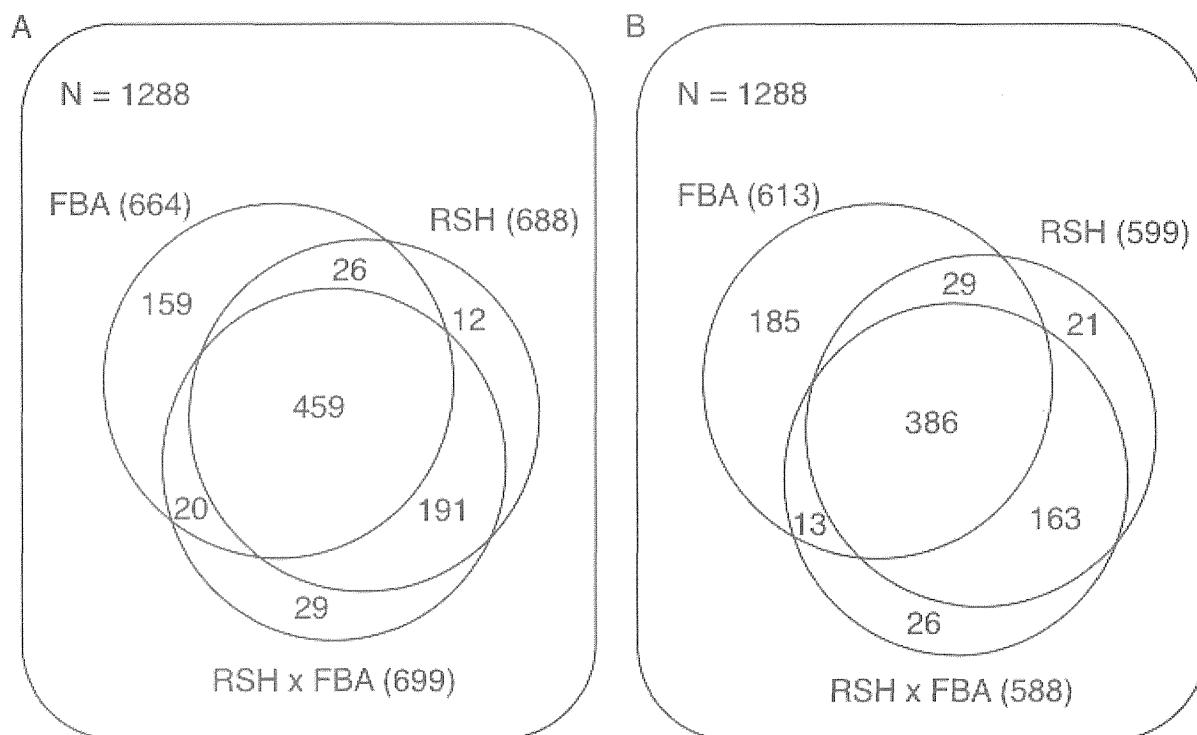


Fig. 1 耐塩性シロイヌナズナ FBA 過剰発現体、RSH 過剰発現体およびそのスタック系現に変動があった遺伝子の内訳。マイクロアレイ解析でシグナル強度が十分に得られた

Table 1 耐塩性シロイヌナズナスタック系統において親系統よりも発現に増強が確認された遺伝子

Gene Description	Expression Ratio (GM/NT)		
	FBA	RSH	RSH x FBA
Up			
Phosphate starvation-response 3.1	3.49	2.87	15.39
Methylthioalkylmalate synthase 3	8.51	8.32	22.40
Uncharacterized protein	2.48	5.03	8.75
Drought-repressed 4	3.66	2.36	5.33
Senescence associated gene 1	2.09	4.52	6.51
Pathogenesis-related 4	3.05	6.16	8.70
ABC transporter B family member 27	3.20	3.40	3.50
Uncharacterized protein	3.04	8.34	8.50
Down			
Cellulose synthase-like A01	0.47	0.12	0.04
Phragmoplast orienting kinesin 1	0.21	0.42	0.14
Photosystem II manganese-stabilising protein	0.42	0.41	0.33
Protein forked1	0.30	0.32	0.23
Rubber elongation factor protein	0.49	0.22	0.16
Uncharacterized protein	0.24	0.21	0.17
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	0.45	0.47	0.40
Pentatricopeptide repeat-containing protein	0.26	0.11	0.10
Hypothetical protein	0.26	0.27	0.25
Pentatricopeptide repeat-containing protein	0.33	0.36	0.32

Table 2 GH1 導入アマゴにおける全ての成長ステージで共通して発現が変動していた遺伝子

Gene Description	Accession No.	Expression Ratio (GM/NT)		
		100 g	125 g	150 g
Up				
Insulin-like growth factor binding protein 4	TC204183	3.82 ± 3.20	3.83 ± 1.00	2.17 ± 0.49
Interferon-inducible protein GIG2	TC176963	10.14 ± 6.54	7.31 ± 0.88	6.59 ± 4.07
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 beta	BT049695	3.42 ± 1.81	3.81 ± 1.55	4.62 ± 1.79
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 gamma	BT056971	7.49 ± 6.87	3.77 ± 1.80	1.06 ± 1.06
Growth hormone	NM_001123676	1.42 ± 0.16	3.71 ± 0.90	10.52 ± 7.59
Down				
Interleukin-6 receptor subunit alpha	NM_001173710	0.56 ± 0.31	0.37 ± 0.16	0.48 ± 0.10
Interleukin-10 receptor beta chain precursor	BT047745	0.53 ± 0.17	0.66 ± 0.30	0.42 ± 0.18
Interferon-induced 35 kDa protein homolog	NM_001141821	0.54 ± 0.22	0.45 ± 0.08	0.35 ± 0.06
Epidermal growth factor receptor 5	TC205748	0.57 ± 0.19	0.59 ± 0.34	0.36 ± 0.07
Opioid growth factor receptor	AM259613	0.73 ± 0.43	0.41 ± 0.13	0.44 ± 0.11
Transforming growth factor beta-1	TC176824	0.49 ± 0.13	0.87 ± 0.30	0.70 ± 0.25
Very-long-chain acyl-CoA synthetase	TC179203	0.24 ± 0.17	0.73 ± 0.49	0.16 ± 0.05
Mid1-interacting protein 1	BT045165	0.32 ± 0.20	0.45 ± 0.12	0.18 ± 0.04
Acyl-CoA desaturase	BT059328	0.39 ± 0.24	0.39 ± 0.13	0.24 ± 0.10
Liver-type fatty acid-binding protein	TC202180	0.05 ± 0.01	0.33 ± 0.11	1.37 ± 1.25
Fatty acid-binding protein	BT049320	0.50 ± 0.27	0.72 ± 0.43	0.18 ± 0.08
Fatty acid-binding protein	BT057126	0.35 ± 0.20	0.88 ± 0.48	0.35 ± 0.19
Muscle fatty acid binding protein	NM_001123578	0.35 ± 0.28	0.53 ± 0.24	0.11 ± 0.03
Intestinal fatty acid binding protein	TC196919	0.49 ± 0.25	0.53 ± 0.31	0.18 ± 0.16
Enolase	TC173506	0.50 ± 0.41	0.55 ± 0.23	0.46 ± 0.16
Parvalbumin	BT057662	0.67 ± 0.22	0.58 ± 0.18	0.35 ± 0.01

各成長ステージ 3 検体の発現比率の平均値およびその標準偏差を示した。

Table 3 フラジェリン遺伝子導入乳酸菌の発現比較

Gene Locus	Gene Description	Control Reads	Transformant Reads
Up			
LCABL_00230	Surface antigen	6368	13854
LCABL_02480	Cell wall-associated hydrolase	3346	7227
LCABL_03590	Hypothetical protein	65	4203
LCABL_03600	Beta-fructosidase	1	7214
LCABL_03610	Hypothetical protein	0	1513
LCABL_03620	Hypothetical protein	0	1207
LCABL_03640	Hypothetical protein	0	1054
LCABL_03650	Hypothetical protein	0	431
LCABL_03660	Beta-lactamase class A	1	3599
LCABL_03670	Lipoprotein	0	2031
LCABL_03680	Hypothetical protein	0	671
LCABL_03690	Galactose operon repressor	0	3450
LCABL_03700	PTS system transporter subunit IIC	0	4167
LCABL_03710	PTS system sugar-specific transporter subunit IID	0	4350
LCABL_03720	Hypothetical protein	0	131
LCABL_03730	Phosphonate monoester hydrolase	158	3089
LCABL_15340	Hypothetical protein	11	23
LCABL_21390	Hypothetical protein	377	5878
LCABL_24090	Hypothetical protein	3331	10009
LCABL_24520	PII-type proteinase (lactocepin)	18263	72000
Down			
LCABL_29980	Transposase	5627	2403

Control はベクターコントロール株、Transformant はフラジェリン遺伝子導入株。2000 万リードあたりのリード数を正規化した値を示した。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）
「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 26 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 26 年度は、動物性食品であるサケ科アマゴ、およびサルモネラ鞭毛抗原遺伝子を導入した乳酸菌を対象としてメタボローム解析を実施した。GC-MS による脂質分析の結果、ヒト成長ホルモン高発現アマゴ（GM アマゴ）と非組換えアマゴ（non-GM アマゴ）にわずかな脂肪酸蓄積プロファイルの違いを認めた。すなわち、炭素鎖長 18 以下の脂肪酸が減少し、炭素鎖長 20 以上の脂肪酸が GM アマゴで増加する傾向があった。また、飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸が減少し、多価不飽和脂肪酸（PUFA）が GM アマゴで増加する傾向が認められた。乳酸菌の遺伝子組換え株（GM）と非組換え株（non-GM）を GC-MS 分析に供試し、極性画分と非極性画分のそれぞれから 289 個、及び 235 個の代謝産物ピークを特定した。これらの代謝産物ピークから極性画分では 69 個、非極性画分では 52 個を同定し、GM 菌株と non-GM 菌株の代謝物蓄積量を定量的に比較したが、GM と non-GM を区別する有意な差異は認められなかった。以上、メタボローム分析では、遺伝子組換えが原因であると判断すべき代謝プロファイルの差は認められなかった。

A. 研究目的

食の安心・安全への関心は急激に高まりつつあり、遺伝子組み換え技術を使用して作出・生産された食品の安全性に関わる科学的データの集積が社会的に重要な課題である。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。また、海外企業は、農作物にとどまらず、微生物や魚類、家禽・家畜にいたるまで、遺伝子組換え技術を用いた新品種開発を進めている。

遺伝子組換え以外にもバイオテクノロジーが多数応用されている。例えば、作物の育種技術として、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ランダムに影響を与える可能性のあ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。加えて、遺伝子組換え法と発生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。さらに、新しい育種・品種改良技術として、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る。

このような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おいては、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系統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、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応用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。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。平成 26 年度は、動物性食品であるサケ科のアマゴ、およびを遺伝子組換え乳酸菌解析対

象とし、GC-MS を用いた代謝産物の一斉解析を実施した。

B. 研究方法

< 供試試料 >

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）を供試した。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 アマゴ 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 枚におろした片身（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（水産総合研究センター 名古屋博之博士）。

乳酸菌へのサルモネラ鞭毛抗原遺伝子の導入が乳酸菌の代謝産物蓄積プロファイルに及ぼす影響の有無をメタボローム解析によって評価するため、乳酸菌サルモネラ鞭毛抗原発現株（F 株；GM）と非発現株（N 株；non-GM）を供試した（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第 1 室）。集菌時クエンチ溶液として、0.85% (w/v) 炭酸アンモニウムを含む 60% メタノール溶液を用いた¹⁾。

< GC-MS 分析 > 供試アマゴ組換え体（GM アマゴ）の遺伝子型は、ヘテロ（雌親がトランスジェニック、雄親がノーマル）で、対象実験として同一重量の非組換え体（non-GM アマゴ）を用いた。アマゴ組織からの代謝物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 stigmasterol（混合溶媒中の濃度 50 μ g/mL）を加えた。凍結試料は液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて磨砕し、氷冷したメタノール/クロロホルム/水混合溶媒を加えて粉碎した。次に遠心上清（16, 200 \times g,

4° C, 10 分間)を回収し, 遠心エバポレータで乾固した後, 凍結乾燥機で乾固した.

乳酸菌サルモネラ鞭毛抗原発現株 (F 株, GM) と非発現株 (N 株, non-GM) を供試した. 乳酸菌の単一コロニーを, 3 本の独立した培養瓶に植菌・培養した. 代謝物の抽出に用いた乳酸菌培養液 10 mL 当たりの生菌数を計数した (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第 1 室). 菌の代謝活性停止 (クエンチ) と代謝物抽出は下記方法で行った. クエンチ溶液は, 0.85% (w/v) 炭酸アンモニウムを含む 60% メタノール溶液を用いた¹⁾. 抽出溶媒は, メタノール:クロロホルム:2% ギ酸 = 5:2:1 (v/v/v) の混合溶媒を用いた²⁾. 培養瓶ごとに区別した培養液 (F 株 3 本, N 株 3 本) を 50 mL 容のコニカルチューブに 4 mL サンプリングし, 予め -30° C に冷却したクエンチ溶液を 12 mL 加え, 速やかに攪拌し, -30° C で 30 分間静置した. 高速冷却遠心機を用いて遠心した (3000×g, 5 分間). 上清を除き, 再びクエンチ溶液を 12 mL 加え, 高速冷却遠心機を用いて遠心した (3000×g, 5 分間). 上清を除き, 細胞ペレットの湿重量を秤量した. 上清を除いたコニカルチューブに 4 mL の抽出溶媒を加え, ピペティングにより細胞ペレットを懸濁させた後, 懸濁液全量をネジ蓋付ガラス遠沈管に回収した. ガラス遠沈管をウォーターバスで加温し (65° C, 30 分間), その後, 氷上で 5 分間冷却した. 高速冷却遠心機を用いて遠心し (3000×g, 5 分間), 得られた上清を新しいネジ蓋付ガラス遠沈管に回収し, 乳酸菌代謝産物の粗抽出液とした.

乳酸菌代謝産物の粗抽出液に上記抽出溶媒を加え, さらに, 内部標準物質として, リビトール (0.1 µg/mL) とテストステロン (0.1 µg/mL) を, 加えて混合し, 遠心分離によって極性画分と非極性画分に分画し誘導体化の

ために真空冷却濃縮器を用いて乾固した²⁾.

誘導体化 (トリメチルシリル化) は MSTFA [N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] を用いて行った. 極性画分には MSTFA を加え, 糖, アルコール, アミノ酸, 有機酸等をトリメチルシリル化し, GC-MS 試料とした. 非極性画分に, ナトリウムメトキシドメタノール溶液を加え, エステル化脂肪酸を脂肪酸メチルエステルに変換し, 引き続き MSTFA を加え, 非エステル化脂肪酸, ステロール等をトリメチルシリル化し, GC-MS 試料とした. 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. 得られたマスクロマ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.

分析データ (Waters.raw ファイル) は, MetAlign³⁾を用い, マススペクトルデータのベースラインとカラム保持時間を指標にしてマススペクトルを構成する全イオンの整列 (データ間での対応付け) を行ったのち, それぞれのイオンのスキャン番号, カラム保

持時間, m/z , 各試料のイオン強度の情報を付加した. 上記の全イオン整列データは, AIoutput を用い (/AIoutput/index.html), カラム保持時間の保持指標への変換, マスクロマトグラム中のピーク分離, 解析対象ピークを選択した. 化合物の同定と定量は, 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. ピーク同定は, 代謝産物ピークを構成するマススペクトルのパターンと代謝産物ピークのカラム保持指標を標準化合物と比較することで行った^{4, 5)}. 検出された代謝産物について, 平均値の差を Student t -test により検定した. また, 主成分分析 (Principal component analysis) により代謝プロファイルと比較した. Student 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.

C. 結果・考察

高成長アマゴのメタボローム解析

平成 25 年度にはアマゴの筋肉組織の極性化合物を GC-MS で分析した. その結果, 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, 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, 各系統あるいは重量ごとに明確なクラスターは形成されなかった. GM アマゴと non-GM アマゴの筋肉組織抽出物中に含まれる化合物の蓄積量の平均値の差を Student t -test により検定したところ, GM アマゴでは, 同定した 72 化合物のうち 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. LC-MS 分析による脂質プロファイリング結果では, GM アマゴでは炭素鎖長が 21-25 の脂質分子が増加する傾向があったが, その他の脂質カテゴリでは有意な差は見られなかった.

平成 26 年度は, 組織中の非極性化合物の蓄積レベルを GC-MS 分析によって比較した (Fig. 1, Fig. 2). 非極性画分の分析によるすべての GC-MS 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. GC-MS による脂質分析の結果, わずかな脂質蓄積プロファイルの違いを認めた. すなわち, 炭素鎖長 18 以下の脂肪酸が減少し, 炭素鎖長 20 以上の脂肪酸が増加する傾向があった. また, 飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸が減少し, 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が増加する傾向が認められた (Fig. 3, Fig. 4).

乳酸菌のメタボローム解析

生菌数及び細胞ペレット湿重量の株間での比較した (Fig. 5). 同一条件下の培養で, サルモネラ鞭毛抗原発現 F 株 (GM) は, 非発現株 N 株 (non-GM) よりも増殖が遅いと考えられる. F 株 (GM) と N 株 (non-GM) の GC-MS 分析において, 極性及び非極性画分から 5512 個及び 13129 個のイオンを検出し, それぞれ 289 個及び 235 個の代謝産物ピークを特定し, 同定結果を付与した. その結果, 極性画分の誘導体化試料では 69 個 (同定率 23.9%), 非極性画分の誘導体化試料では 52 個 (同定率 23.1%) の代謝産物ピークを同定した. 同定できた代謝産物ピークは同定結果を代謝産物名とした. 同定できなかった代謝産物ピークは, 通し番号とカラム保持指標を代謝産

物名とした。このようにして得られた代謝物由来の情報を用いて代謝プロファイル解析を行った。

乳酸菌の株間で代謝プロファイルを比較するために、代謝産物の蓄積量からなるデータ行列を用いて主成分分析を行った。代謝産物の蓄積量は、各サンプル分析において検出される内部標準物質のシグナル強度にを介して補正した相対値に換算した。極性画分のデータ行列を用いた主成分分析の結果、第一主成分、第三主成分、第三主成分の寄与率は、それぞれ 26.3%, 23.5%, 13.3% であった。第一主成分から第三主成分までの累積寄与率は 63.1% であった (Fig. 6)。第一主成分と第二主成分の主成分得点のプロット図では、N2 (N 株培養 No. 2) のクラスターが第一主成分でその他のサンプルと明確に分離しており、F2 (F 株培養 No. 2) 及び N2 (N 株培養 No. 2) のクラスターが第二主成分でその他のサンプルと明確に分離していた (Fig. 6)。第一主成分と第三主成分の主成分得点のプロット図では、N3 (N 株培養 No. 3) のうち一つのプロットが他のサンプルと分離していた (Fig. 6)。

非極性画分のデータ行列を用いた主成分分析の結果、第一主成分、第三主成分、第三主成分の寄与率は、それぞれ 75.4%, 12.0%,

2.7% であった。第一主成分から第三主成分までの累積寄与率は 90.1% であった

(Fig. 7)。第一主成分と第二主成分の主成分得点のプロット図 (Fig. 7)、第一主成分と第三主成分の主成分得点のプロット図 (Fig. 7) とともに、GM と non-GM を区別するような明確なクラスター分離、および代謝物蓄積の相違は認められなかった。

まとめ

GM アマゴおよび non-GM アマゴの組織のメタボローム解析において、*cis*-aconitate, glutamate, GABA, phosphate と脂肪酸プロファイルに差異を認めた。しかしながら、ヒト成長ホルモン遺伝子の高発現が代謝活性に影響を及ぼしたかどうかは明らかではない。一方、遺伝子組換え乳酸菌においては、顕著な代謝変動は認められなかった。

本研究で供試したいずれの試料においても、想定外の不都合な代謝プロファイル変動が起こったとは認められなかった。生物が具有する柔軟性・可塑性は、遺伝子導入による無作為な代謝機能攪乱を許容することが無かったことを示している。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も加味して議論する必要がある。

E. 引用文献

- 1) Faijes M, Mars AE, Smid EJ. (2007) Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact.* 6:27
- 2) Furuhashi T, Ogawa T, Nakai R, Nakazawa M, Okazawa A, Padermschoke A, Nishio K, Hirai YM, Arita M, Ohta D. (2015) Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia. *Metabolomics* 11:175-183.
- 3) Lommen A. (2009) MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal Chem.* 81: 3079-3086.
- 4) Tsugawa H, Tsujimoto Y, Arita M, Bamba T, Fukusaki E. (2011) GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics.* 12:131.
- 5) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

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)
- 3) 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 2015 年度大会 (2015. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

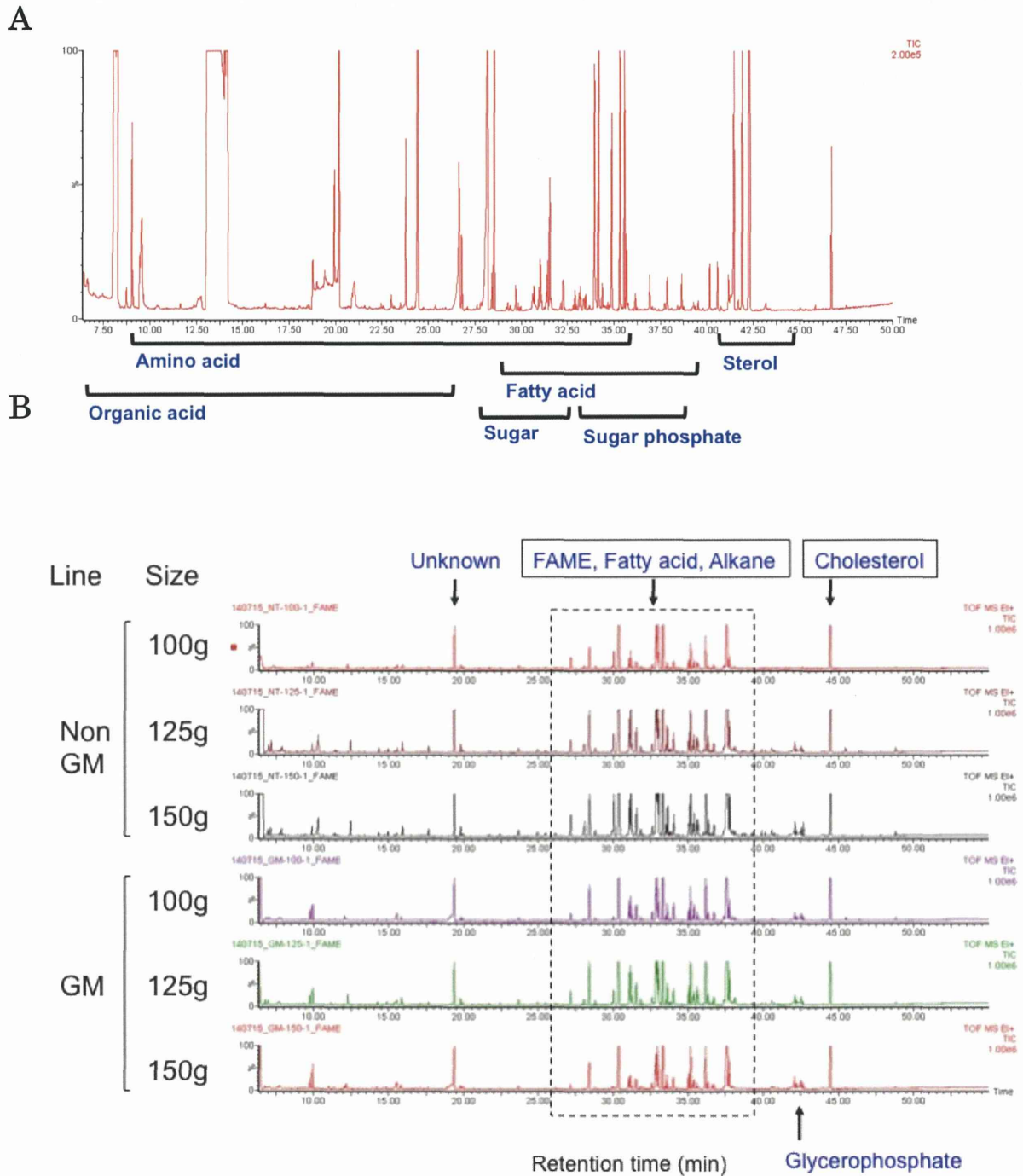


Fig. 1. GC-MS 分析. 72 化合物を同定・定量した。
 A. GC-MS クロマトグラムの化合物分離. 横軸は溶出時間, 縦軸はイオン検出シグナル強度.
 B. GM と non-GM アマゴの 100g, 125g, 150g 個体の分析例を示す. 点線で囲った部分に脂質成分が溶出する.

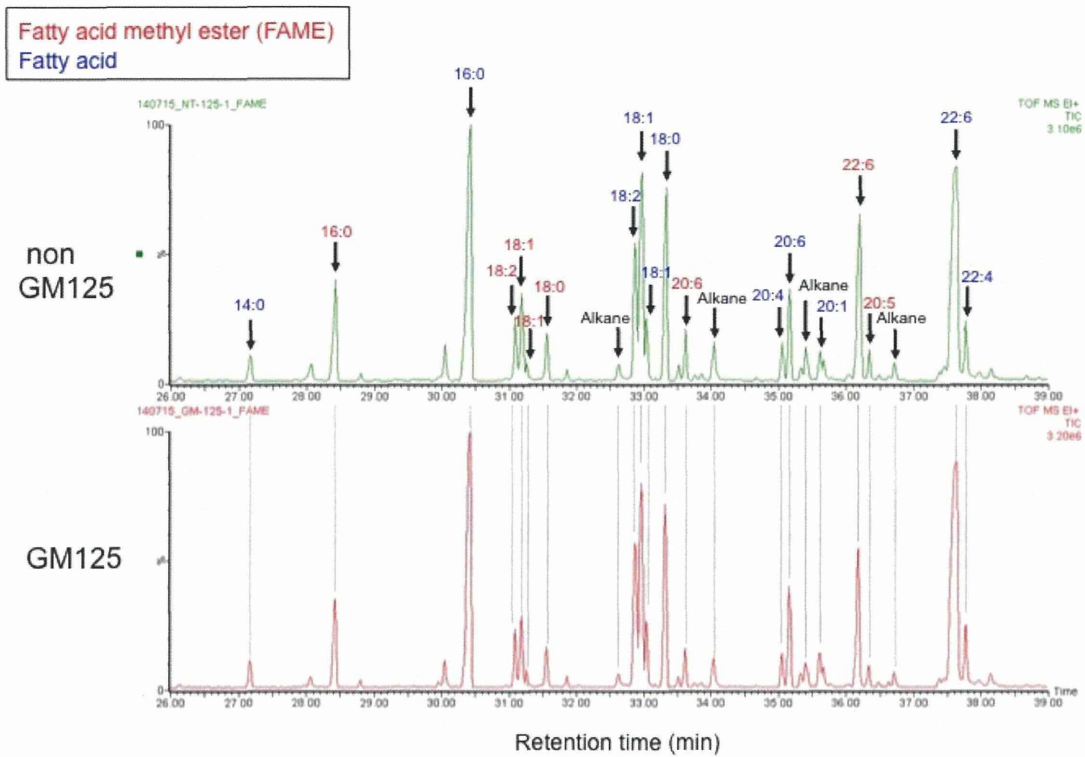


Fig. 2. GC-MS クロマトグラム上での脂肪酸の同定. 脂肪酸メチルエステルと遊離脂肪酸の同定は標準化合物を用いた溶出時間とイオン開裂パターンを用いて行った. 125g の個体から得た試料の分析例を示す. 横軸が溶出時間, 縦軸はシグナル強度.

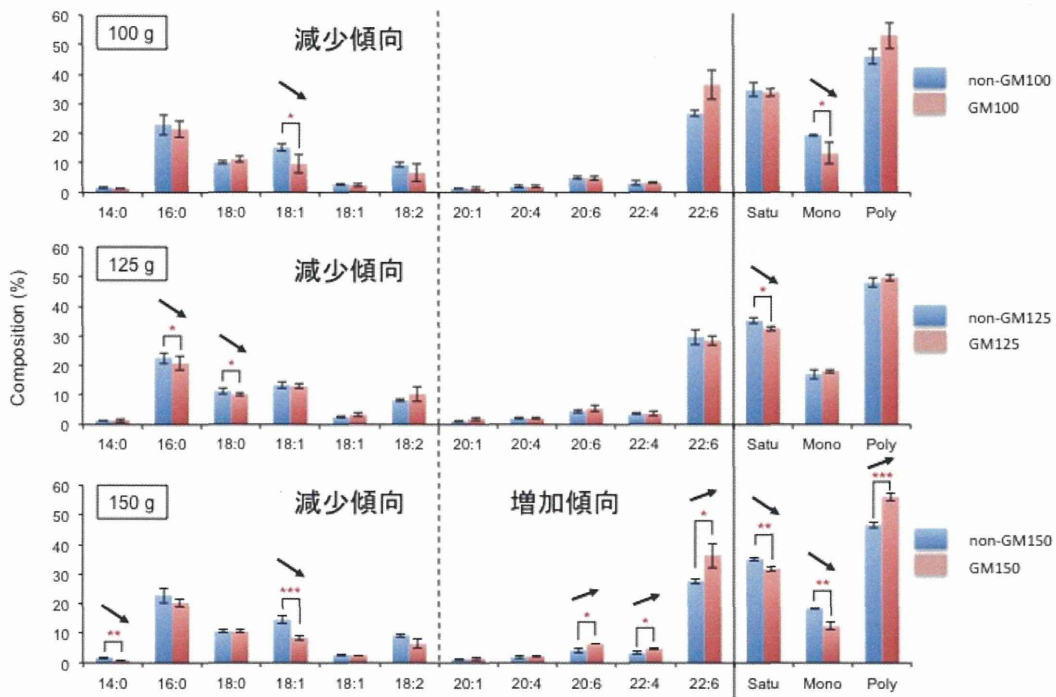


Fig. 3. 100g, 125g, 150g 個体の遊離脂肪酸含量比較. 横軸に脂肪酸炭素鎖長と不飽和度, 縦軸に各試料における各脂肪酸の含有率を示した. 炭素鎖長 18 以下の脂肪酸が減少し, 炭素鎖長 20 以上の脂肪酸が増加する傾向が有った. 多価不飽和脂肪酸が増加する傾向があった. 飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸が減少する傾向があった.

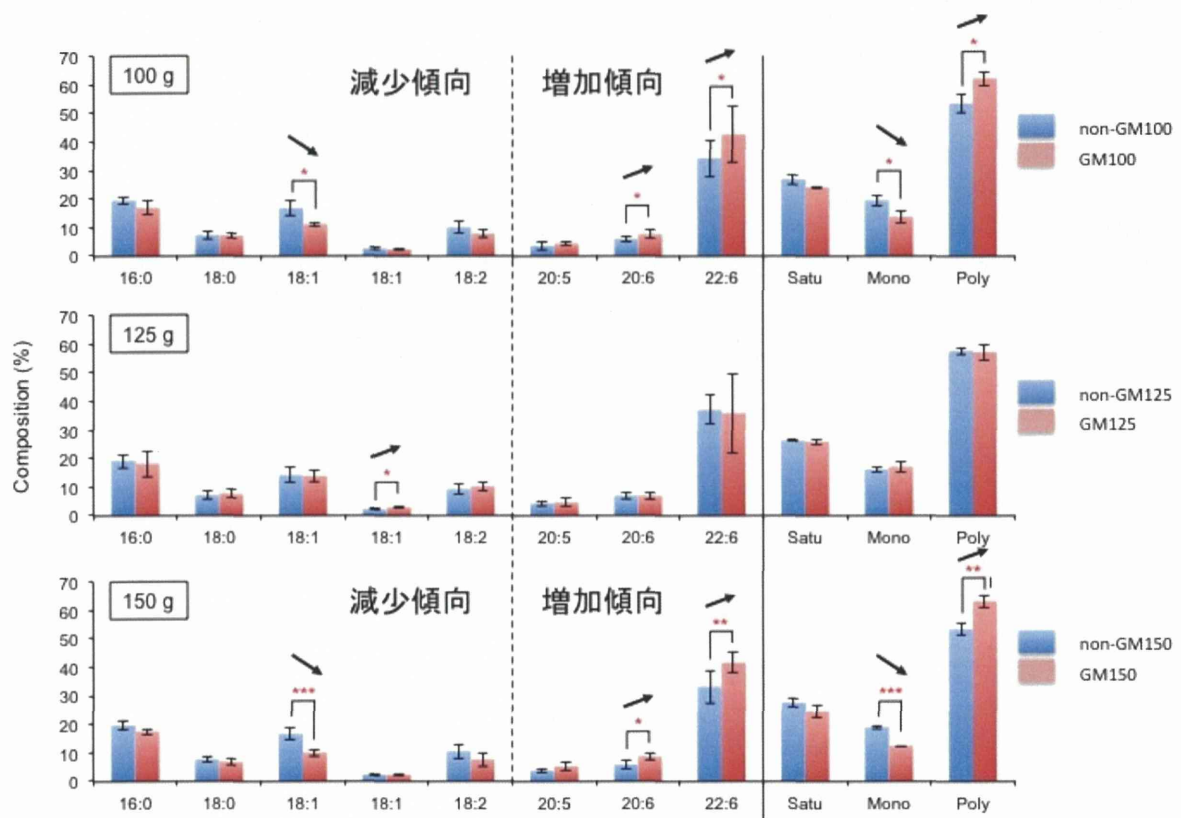


Fig. 4. 100g, 125g, 150g 個体のエステル化脂肪酸含量比較. 炭素鎖長 18 の脂肪酸が減少し, 炭素鎖長 20 以上の脂肪酸が増加する傾向が有った. 多価不飽和脂肪酸が増加する傾向があった.

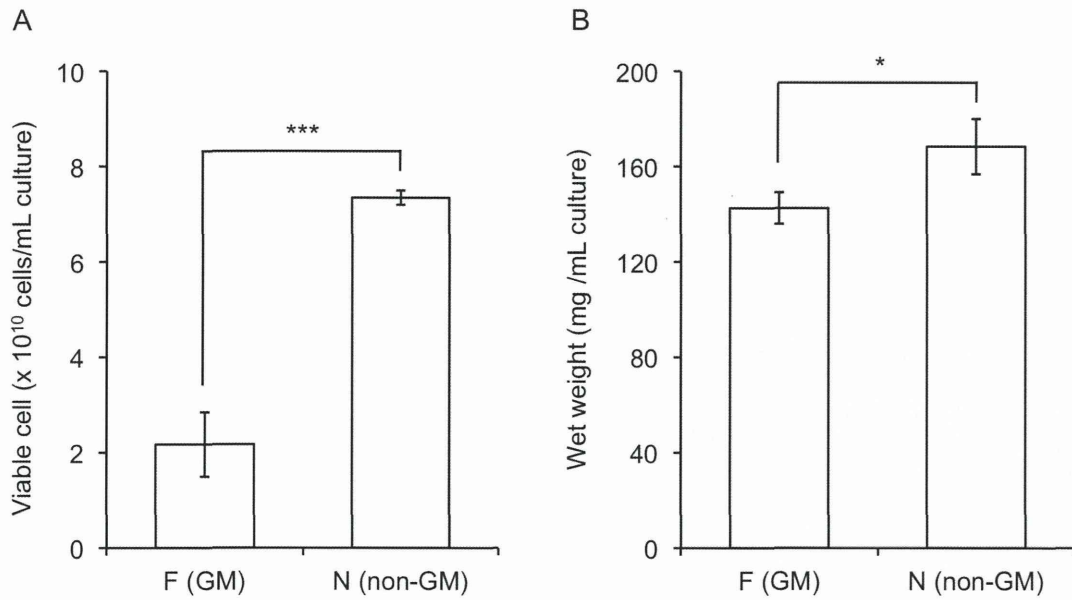


Fig. 5. 生菌数及び細胞ペレット湿重量の株間での比較. A. 生菌数の比較, B. 菌体重の比較. F: サルモネラ鞭毛抗原発現株, N: 非発現株. 平均値 ± 標準偏差 (n = 3, 培養操作の反復実験), Student-t 検定: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

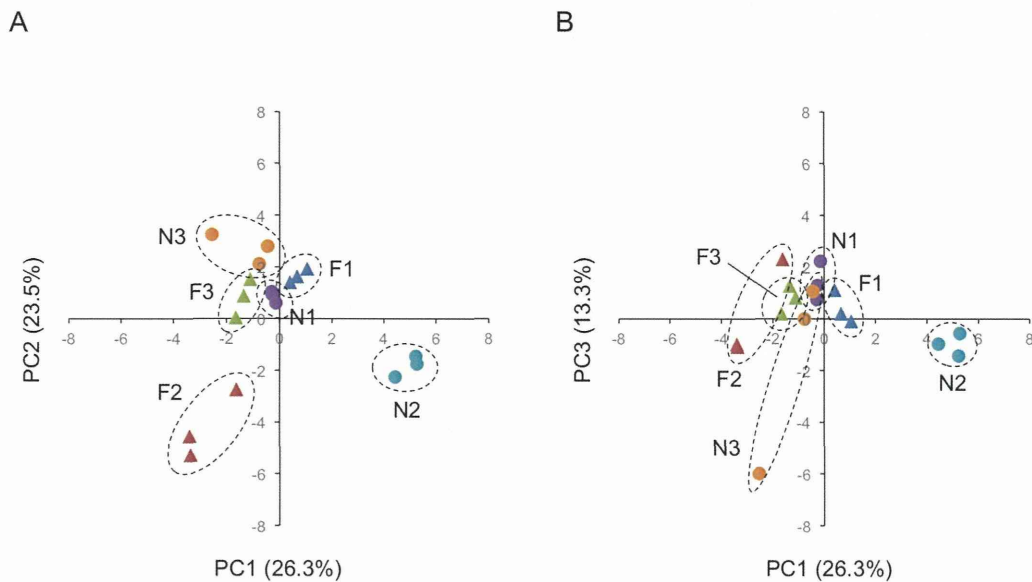
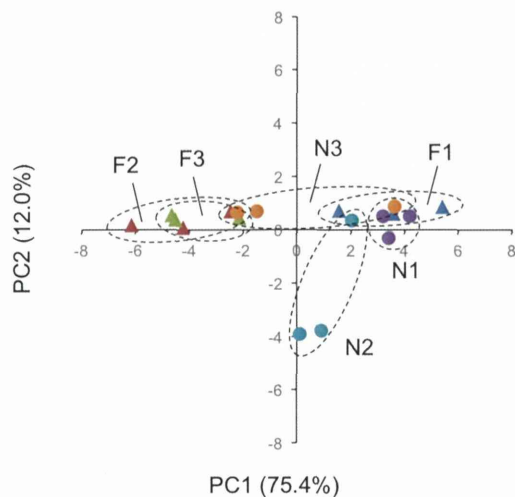


Fig. 6. 乳酸菌抽出液の極性画分に含まれる代謝産物 (289 個) の蓄積量に基づく主成分分析の結果. A. 第一主成分と第二主成分の主成分スコアの二次元プロット図. B. 第一主成分と第三主成分の主成分スコアの二次元プロット図. 第一から第三主成分までの累積寄与率は 63.1%. F: サルモネラ鞭毛抗原発現株 (Δ), N: 非発現株 (\circ). 株名の後の数字は, 培養の反復を示す (n = 3). 点線で囲った同型同色のプロットは, 相分離以降の実験過程の反復を示す (n = 3).

A



B

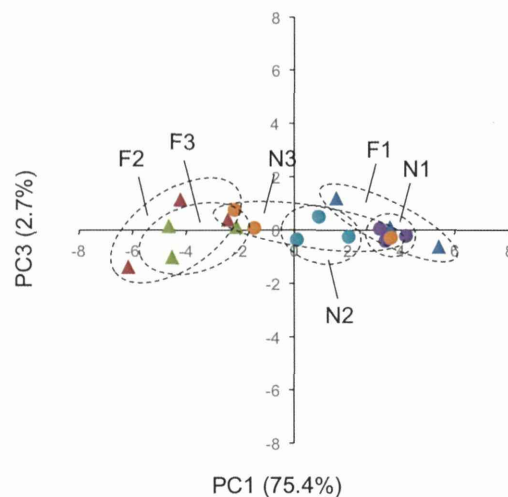


Fig. 7. 乳酸菌抽出液の非極性画分に含まれる代謝産物 (235 個) の蓄積量に基づく主成分分析の結果. A. 第一主成分と第二主成分の主成分スコアの二次元プロット図. B. 第一主成分と第三主成分の主成分スコアの二次元プロット図. 第一から第三主成分までの累積寄与率は 90.1%. F: サルモネラ鞭毛抗原発現株 (Δ), N: 非発現株 (\circ). 株名の後の数字は, 培養の反復を示す ($n = 3$). 点線で囲った同型同色のプロットは, 相分離以降の実験過程の反復を示す ($n = 3$).

平成 26 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）
「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 26 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 食品部部长

研究要旨：平成 26 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) サルモネラ鞭毛抗原(フラジェリン)を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌と、非組換え乳酸菌(宿主菌)について、プロテオーム(網羅的)解析を行い両者の違いについて検討し、(2) マウスの経口感作、経口惹起によるアレルギー発症のメカニズム解析、(3) アレルゲンデータベース(ADFS)のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行った。具体的には、(1) 2D-DIGE 法を用いて a)組換え並びに b)非組換え乳酸菌の抽出物のタンパク質の発現差異解析の結果、a)に対して b)が 1.5 倍以上減少したスポットが 6 スポット、同増加したスポット 7 スポットであった。GM で増加した菌体抽出物から 3 スポット、non-GM で増加した 1 スポットについて、nanoLC-MS/MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。GM で発現の増加したタンパク質には、挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外に、細胞壁の分解酵素が確認された。2) 経口感作、経口惹起による食物アレルギーマウスモデルにおいて発症するアレルギー状態を経口以外の感作モデルと比較し、経口感作によるアレルギーの特徴を調べたところ、消化管での反応性が特徴的なアレルギーモデルであると考えられた。また、本モデルによって抗原を経口投与したドナーマウスの腸間膜リンパ節から採取した CD4⁺細胞を移入したレシピエントマウスは抗原特異的な IgG1 抗体を産生した。(3) 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 10 種のアレルゲンについて、総エピトープ数 191 の情報を追加し、本年度のアレルゲンおよびエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1698 となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は 137 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
酒井信夫 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
安達玲子 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部
中村亮介 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部
新藤智子 食品薬品安全センター秦野研究所
大沢基保 食品薬品安全センター秦野研究所
佐藤里絵 (独) 農研機構 食品総合研究所
近藤康人 藤田学園大学坂文種報徳会病院

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な方法になると考えられる。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、及び発現に差違のあったタンパク質の同定を行って、Mode of action(MOA)を知ること、またそれらタンパク質のバイオマーカーとしての利用の可能性について検討することを目的とする。なお、従前より、GM 植物、GM 動物を評価する際に重要となるアレルギー性については、アレルギーモデルマウスを用いて投与実験を行ってきたが、今年度の対象品目である GM 乳酸菌に関しては投与実験は行わず、アレルギー発症にいたるメカニズムについて更なる解析を行うことを目標とした。以下、今年度の概要を記す。

今年度は、組換え体として、サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌と、非組換え乳酸菌のプロテオーム解析を行った。また、本研究班で継続して検討を行っている経口感作、経口惹起のアレルギーマウスモデルについて、アレルギー発症のメカニズム解析を行った。さらに、アレルギーデータベース(ADFS)のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行った。

B. 研究方法

(1) 供試試料

サルモネラ鞭毛抗原 (TLR5 に結合可) を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え (GM) 乳酸菌¹⁾、対照として用いた非遺伝子組換え (non-GM) 乳酸菌、及びその培養上清は、国立医薬品食品衛生研究所五十君博士より供与いただいた。菌体は、培養後遠心して回収し、PBS で洗浄し、破碎後液体窒素で急速凍結し、培養上清とともに -80°C で保管した。各試料に付した番号を以下に記す。

試料 No. 1: フラジリオン細胞表層発現乳酸菌(GM)

試料 No. 2: 野生型乳酸菌 (non-GM)

試料 No. 3: GM 乳酸菌 培養上清

試料 No. 4: non-GM 乳酸菌 培養上清

(2) サルモネラ鞭毛抗原導入組換え乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

菌体培養上清試料については、100 ml をアミコン Ultra-4 (ミリポア社) に添加、 $7,000 \times g$ で 50 ml まで 30 min 遠心濃縮したものを評価用試料とした。また、乳酸菌試料については、重量測定後に 10 倍

容の Lysis Buffer (10mM Tris, pH8.0、7M ウレア、2M チオウレア、5mM 酢酸マグネシウム、4%(w/v) CHAPS、4mM Pefabloc SC PLUS) を加えた後に、超音波処理 (20 秒間 ON+30 秒間 OFF のサイクルを 3 回繰り返した) を実施した。超音波処理後に、 $8,000g \times 10$ 分間遠心した後の上清を評価用試料とした。

処理後のタンパク質溶液に対して、200 pmol の Cy3 (DMF 溶液、1 ml) または Cy5 (DMF 溶液、1 ml) を添加した。N=3 でサンプルを調製した。また、評価用試料を全て混合したものをプール試料とし、プール試料に対して 200 pmol の Cy2 (DMF 溶液、1 ml) 添加後に氷上にて 30 分間静置してラベリング反応を実施した。反応液に過剰量のリジン溶液 (10mM 溶液、2 ml) を添加して 10 分間保持し反応を終了した。

反応終了後に反応液総量と等量の $2 \times$ サンプルバッファ (8M ウレア、4% (w/v) CHAPS、20 mg/ml DTT、2% (v/v) フェアライト) を添加してさらに 10 分間氷上に保持したものを 2D-DIGE 解析用の試料とした。サンプルは、Cy2 でラベルしたプール試料を混合した後に試料を二次元電気泳動に供した。

二次元電気泳動の操作、装置及び条件について以下に記す。

(a) 一次元目電気泳動条件: MultiphoreII (GE ヘルスケア社) 及び、IPG(Immobilized pH Gradient) Strips (24 cm, pI3-11NL、GE ヘルスケア社) を用い、36 kWh (300 V; 5 hr, 300-3500 V; 1.5 hr, 3500 V; 10 hr) で泳動を行った。泳動後、平衡化溶液 (50 mM Tris、pH8.8、6 M ウレア、30%グリセロール、2% SDS) に 0.25% (w/v) DTT を添加した A 液及び同様に 4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを添加した B 液に対して各々 10 分間ずつ平衡化を行った。

(b) 二次元目電気泳動条件: 平衡化終了後、Ettan DALT II システム (GE ヘルスケア社) 及び 12% 均一ゲル(自作)を用いて二次元目の SDS-PAGE ゲル電気泳動を行った。泳動は、 3W (15°C) 一定で泳動先端が完全に溶出するまで (約 15 時間) 行った。

ゲル画像取り込みは、Typhoon9400 (GE ヘルスケア社) を使用して行い、二次元電気泳動ゲルイメージは、Dycyber Ver7.0 (GE ヘルスケア社) を用い、画像品質確認及び定量