

初年度では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遺伝子組換えレタスを使用してマイクロアレイ解析を行った。2年度目ではアレルゲンタンパク質の生産を低減させた遺伝子組換えコメおよび成長ホルモン遺伝子 (growth hormone 1: GH1) 導入アマゴを用いたマイクロアレイ解析、3年度目ではシロイヌナズナに耐塩性を付与した遺伝子組換え個体同士を交配したスタック系統のマイクロアレイ解析とフラジェリン遺伝子を導入した遺伝子組換え乳酸菌の次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析によっ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。

GH1 導入アマゴは生育段階を生重量 100, 125, 150 g 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。

シロイヌナズナスタック系統は、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 bisaldolase 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。スタック系統は、*SjFBA* 組換え体の花粉を *SjRSH* 組換え体のめしべに受粉させて交配作出したのものを使用した。

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌 (*Lactobacillus casei* IGM393 株) およびベクターコントロールである組換え乳酸菌からの total RNA 抽出物は国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部五十君静信博士より分与していただいた。

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。

アマゴからの total 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。

乳酸菌からの total RNA 抽出は、国立医薬品食品衛生研究所食品管理部榊田和彌博士によって RNeasy Kit (Qiagen) を使用して行っていただいた。

B-3 マイクロアレイおよび次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析

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る。

低アレルゲンコメの DNA マイクロアレイ解析は、約 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。

GH1 遺伝子導入アマゴのアレイ解析では、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。

シロイヌナズナスタック系統のアレイ解析では上述のレタスと同様のチップを使用した。レタス、コメ、アマゴ、シロイヌナズナ、いずれのマイクロアレイ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により行った。

乳酸菌のトランスクリプトーム解析には適したマイクロアレイチップを用意できなかったため次世代シーケンスによる mRNA 網羅的解析 (RNA-seq) によって組換え体とベクターコントロールでの遺伝子発現解析を行った。解析は、rRNA 枯渇処理の後、次世代シーケンサー HiSeq2000 によって 2000 万リードでユーロフィン社に委託した。

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レタスと遺伝子を組換えしていないレタスから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析

を行った結果、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シグナルが観測されたのは全体の 10% 程度であった。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キッタ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。これに対し、非組換え体と組換え体とで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増大しており、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ることが判明した。

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、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た。そこで、これらのコメにおける遺伝子発現量の変化をスキッタ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わかった。これらの遺伝子は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。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 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のマイクロアレイ解析でサイトカイン、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。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。これ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高く、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-4 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

スタックシステム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システム 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、スタックシステムで 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。さらにこの 459 遺伝子中でスタックシステム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。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、スタックシステムで 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 遺伝子であった。さらにこの 386 遺伝子中でスタックシステム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。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。スタックシステム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。スタックシステム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-5 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。

D. 考察

代謝改変や環境抵抗性が付与された新機能的

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。

本研究で用いたレタスでは、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、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。

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。

耐塩性遺伝子を導入したシロイヌナズナのスタック系統の解析では、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。

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。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。シロイヌナズナ耐塩性スタック系統では、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。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. Differential 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

(1) 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）

(2) 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、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

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

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

先端的バイオテクノロジーが食料・食品の生産の幅広く応用されている。特に遺伝子組換え作物の開発は多岐にわたり、除草剤耐性や耐病性、昆虫食害耐性の付与などの従来型技術をはじめとして、機能性成分産生能の付与や環境抵抗性増強、すでに実用化された組換え系統の交配による複数の有用形質付与のための技術開発などが進んでいる。遺伝子組み換え技術は作物育種にとどまらず、ニワトリやサケなどの動物の育種にも利用されている。本研究では、メタボロミクスによる代謝物一斉解析によって、バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する総合的評価のための基礎データ取得を目的とする。研究期間中、アスタキサンチン産生能を高めた遺伝子組換えレタス、低アレルゲン米、ヒト成長ホルモンGHを高発現させた組換えアマゴ系統（GHアマゴ）、および遺伝子組換え乳酸菌を対象としたメタボローム解析を実施した。いずれの場合においても代謝プロファイルへの著しい影響は認められず、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は無かった事を示唆している。

A. 研究目的

食の安心・安全に対して社会的関心が高まっている。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重要な課題であるが、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ない。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にランダムに影響を与える可能性のある育種法が実施されているが、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。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。

このようなバイオテクノロジーを応用して生産された食品の安全性に関しては科学的な実証データが基礎となることは言うまでもない。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、その変動を科学的・論理的に議論する必要がある。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、最先端メタボローム解析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。メタボローム解析では、機能改変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。

B. 研究方法

<供試試料> アスタキサンチン産生能を高めた遺伝子組換えレタス (GM レタス), 低アレルゲン米 (GM 米), ヒト成長ホルモン高発現アマゴ系統 (GH アマゴ), および遺伝子組換え乳酸菌を分析対象とし, 以下に述べる GC-MS 分析と LC-MS 分析によって代謝物一斉解析を実施した。

アスタキサンチン産生能を高めた遺伝子組換えレタスは¹⁾, 海洋細菌由来の 3 遺伝子 (*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) (Fig. 1) を導入して作出された (石川県立大学生物資源工学研究所, 三沢典彦教授)。これらの 3 遺伝子を保持するプラスミド (pRL-crtZWidi) が, 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 T_0 個体 [pRL-crtZW-lettuce (Barkley) B1] を育成して種子 (T_1) を収穫した。 T_1 種子を寒天培地に播種し, 発芽生育した T_1 個体を 5 ヶ月間

栽培した植物体 (GM レタス) を分析に供試した。非組換えレタス (non-GM レタス, NT-1 と 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 GM レタス (TF-1 と TF-2) (Fig. 2) の地上部を収穫し, 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。

イネ種子中の主要アレルゲン 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遺伝子組換え低アレルゲンイネ RA14-pANDA 系統 (GM 米), 対照区として非遺伝子組換えイネ (non-GM 米) 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入手し実験に供試した (東京理科大学 島田浩章教授)。

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²⁾。

<GC-MS 分析> 凍結試料 (イネ種子粉末; アマゴ組織) は乳鉢と乳棒を用いて液体

窒素中で磨砕し、氷冷したメタノール/クロロホルム/水混合溶媒による抽出の後、遠心 (16,200 × g, 10 分, 4°C) 上清を凍結乾燥機で乾固し、後述する誘導体化に用いた。GM 米と non-GM 米は、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。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。乳酸菌は培養の後に、予め -30°C に冷却したクエンチ溶液を加え、速やかに攪拌し、-30°C で 30 分間静置し、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、抽出溶媒でメタノール:クロロホルム:2% ギ酸 = 5:2:1 (v/v/v) の抽出した⁽³⁾。上清を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、内部標準物質として、リビトール溶液 (0.1 mg/mL, 超純水に溶解) とテストステロン溶液 (0.1 mg/mL, クロロホルムに溶解) を加え、水層 (極性フラクション) とクロロホルム層と中間層 (非極性フラクション) を得た。乳酸菌は GM と non-GM のそれぞれ独立した 3 培養フラスコから得た菌体をそれぞれ 3 回抽出し分析に供した。

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。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、フリーソフトウェア MetAlign 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、それぞれのイオンについてスキャン番号、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、フリーソフトウェア AIoutput を用い、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。

<LC-MS 分析> レタス凍結保存試料は、液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。内部標準物質として 5.83 mM の reserpine を含む 80%メタノールを加え、2 分間磨砕した。磨砕液を 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し、分析試料 (n = 5) とした。アマゴ筋肉組織からの総脂質の抽出は Folch method⁶⁾ の改変法を用いた。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。

抽出試料は LC-LIT-TOF/MS (Hitachi 社製 NanoFrontier L) 分析に用いた⁷⁾。カラムは Cadenza CD-C18 (Intakt 社製 150 x 2 mm, 3 mm) を用いた。カラム温度 40°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 → 100% B (0 - 49 min); 100% B (5 min), 100% B → 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。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 (Fig. 3)。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、カロテノイド関連物質の検出と特性解析に用いた。

アマゴ極性脂質はクロロホルム/メタノール抽出物を LC-LIT-TOF/MS で分析した。

LC の分離には、YMC-Pack Diol-120-NP column (150 x 2.0 mm, 粒子径 5 μm, 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°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。

LC-MS 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。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。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。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。

極性脂質プロファイリングには LipidBlast ライブラリ^{8, 9)} 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>). 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. それぞれの MGF ファイルには, 1 回の LC-MS 分析で取得した ~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. 結果

レタスのメタボローム解析

GM レタスと non-GM レタスの抽出物分析の PDA 情報から, カロテノイドに特徴的な複数の吸収⁽¹⁰⁾が見られた (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), GM 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.⁽¹⁰⁾ また, GM 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, アスタキサンチン生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, 5). 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, GM レタスと non-GM レタスの間での蓄積量を比較した.

解糖系においては, glucose-1-phosphate と glycerate の含量が GM レタスで上昇を認めた. 一方, glyceraldehyde-3-phosphate と 6-phosphogluconate は GM レタス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上昇する傾向にあったが (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, どのような機序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), 解糖系中間体のレベル変動と関連がある可能性が示唆される。

低アレルゲン GM 米のメタボローム解析

低アレルゲン GM 米および non-GM 米のメタノール/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、低アレルゲン GM 米および non-GM 米は独自のクラスターを形成した (Fig. 8A). 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、低アレルゲン GM 米および non-GM 米は独自のクラスターを形成した (Fig. 8B). 両者の代謝プロファイルの違いに関わる化合物を調べるために、ローディングプロットを調べたところ、低アレルゲン GM 米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 米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 GC-MS 分析で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. 8C). 低アレルゲン GM 米および non-GM 米の抽出物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。その結果、低アレルゲン GM 米では、同定した 52 化合物のうち 14 種類の化合物 (アミノ酸 3 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) の蓄積量が有意に増加しており, 2 種類の化合物 (アミノ酸 1 種類, 補酵素 1 種類) の蓄積量が有意に減少していることが分かった (Table 1).

高成長アマゴのメタボローム解析

GM アマゴおよび non-GM アマゴの筋肉組織のメタノール/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, 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 (Fig. 9). GM アマゴと non-GM アマゴの筋肉組織抽出物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 (Table 2).

次に、GM アマゴおよび non-GM アマゴ筋肉組織の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組成を調べるために、両系統の組織からクロロホルム/メタノール抽出液を調製し 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 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た結果を Fig. 10 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が増加していた (Fig. 11). 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. アマゴ組織中の代謝物は, メタノール/クロロホルム/2% 酢酸= 2.5:1:0.5 (v/v/v) を用いて抽出し, GC-MS による脂質分析の結果, GM アマゴと non-GM アマゴにわずかな脂肪酸蓄積プロファイルに違いを認めた. 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 (Figs. 12, 13).

乳酸菌のメタボローム解析

F 株 (GM) と N 株 (non-GM) の GC-MS 分析において, 極性及び非極性フラクションから 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, 極性フラクションの誘導体化試料では 69 個 (同定率 23.9%), 非極性フラクション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. 乳酸菌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, 各サンプルの分析で検出された内部標準物質のシグナル強度を介して補正した相対値に換算した.

極性フラクション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. 14). 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. 14A). 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. 14B).

非極性フラクション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. 15). 第一主成分と第二主成分の主成分得点のプロット図 (Fig. 15A), 第一主成分と第三主成分の主成分得点のプロット図 (Fig. 15B) 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と代謝物蓄積の相違は見られなかった.

D. 考察

GM レタスと non-GM レタスを解析した結果, 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 (GM 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. GM レタスと non-GM レタス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。GM レタスと non-GM 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。

低アレルゲン GM 米と non-GM 米の比較では、中心代謝経路における代謝物（特に糖とアミノ酸）の含量に変動が見られた。低アレルゲン GM 米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 分析の結果から、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。低アレルゲン GM 米では、 α -amylase 活性の抑制が十分でなくデンプンが分解される結果として糖代謝やアミノ酸合成が亢進している可能性が考えられた。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もアミノ酸と極性脂質炭素鎖長に差異を認めたと、成長ホルモン遺伝子の過剰発現との因果関係は明らかではない。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。

以上、本研究で供試したいずれの試料においても、想定外の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である。

E. 引用文献

- 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) Faijes M, Mars AE, Smid EJ. (2007) Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact.* 6:27
- 3) 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.
- 4) Lommen A. (2009) MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal Chem.* 81: 3079-3086.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Kind T, Liu KH, Lee do Y, DeFelice B, Meissen JK, Fiehn O. (2013) LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat Methods.* 10: 755-758
- 9) Ogawa T, Furuhashi T, Okazawa A, Nakai E, Nakazawa M, Kind T, Fiehn O, Kanaya S, Arita M, Ohta D. (2014) Exploration of polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed in silico. *Biosci*

- 10) 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.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

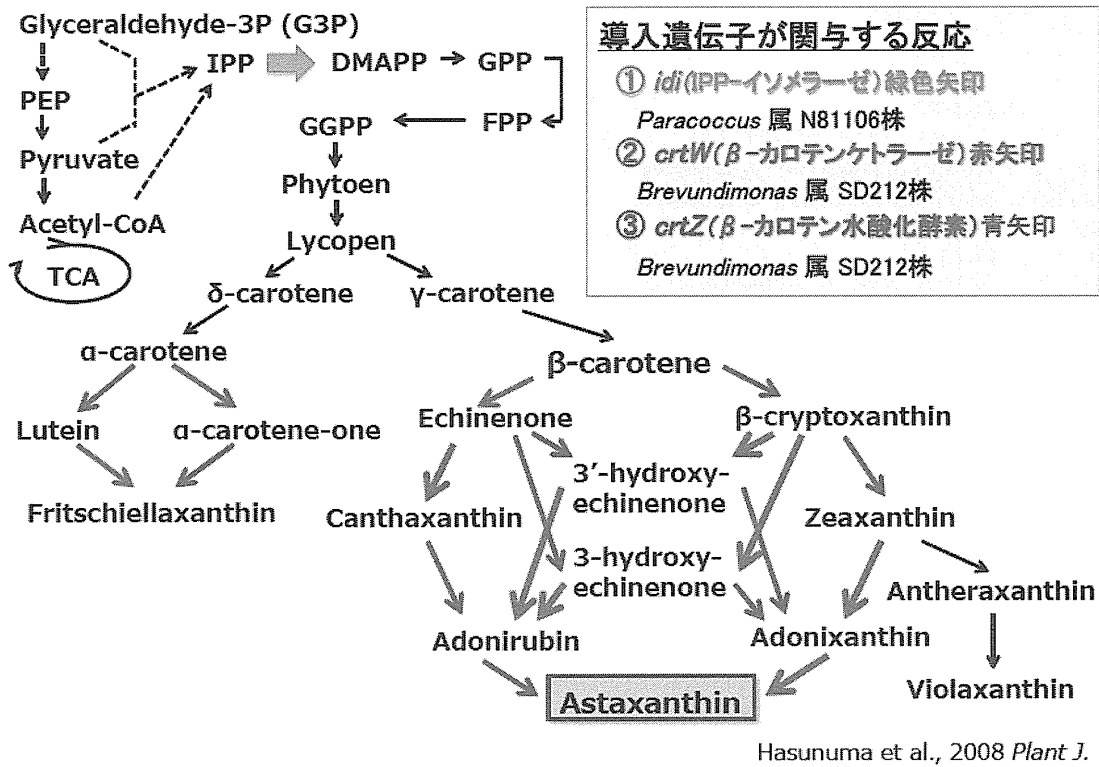


Fig. 1. 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスにおいて改変された代謝経路.

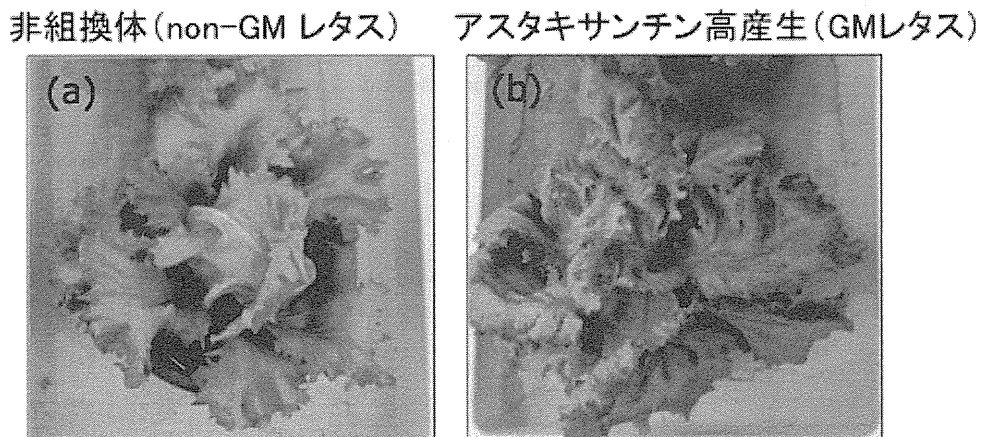


Fig. 2. 分析に供試した non-GM レタスと GM レタス地上部.

<p>糖(16種類)</p> <p>アミノ糖, 糖ヌクレオチド(3) 解糖系(1) イノシトール代謝関連(1) スクロース, グルコース, フルクトース代謝関連(11)</p>	<p>補因子(14種類)</p> <p>アスコルビン酸代謝関連(1) CoA 代謝関連(1) ニコチン酸, ニコチンアミド代謝関連(4) 酸化のリン酸化(1) キノン代謝関連(1) リボフラビン, FAD 代謝関連(2) トコフェロール代謝関連(4)</p>
<p>糖リン酸エステル(9種類)</p> <p>解糖系(5) ペントースリン酸経路(2) スクロース, グルコース, フルクトース代謝関連(1) TCA サイクル(1)</p>	<p>脂質(14種類)</p> <p>コリン代謝関連(2) 遊離脂肪酸(4) グリセロ脂質(2) リン脂質(1) ステロール(5)</p>
<p>有機酸(14種類)</p> <p>芳香族アミノ酸(1) C5 分岐鎖二塩基酸(1) グリオキシル酸, ジカルボン酸代謝関連(1) ピルビン酸代謝関連(1) TCA サイクル(6) 解糖系(4)</p>	<p>核酸(13種類)</p> <p>プリン代謝関連(10) ピリミジン代謝関連(3)</p>
<p>アミノ酸(32種類)</p> <p>アミン, ポリアミン(2) 芳香族アミノ酸(3) アスパラギン酸代謝関連(7) 分岐鎖アミノ酸(4) グルタミン酸代謝関連(8) グルタチオン代謝関連(3) プリン代謝関連(1) セリン代謝関連(4)</p>	

Fig. 3. LC-MS 分析プラットフォームにおいて同定と定量が可能な化合物のリスト

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

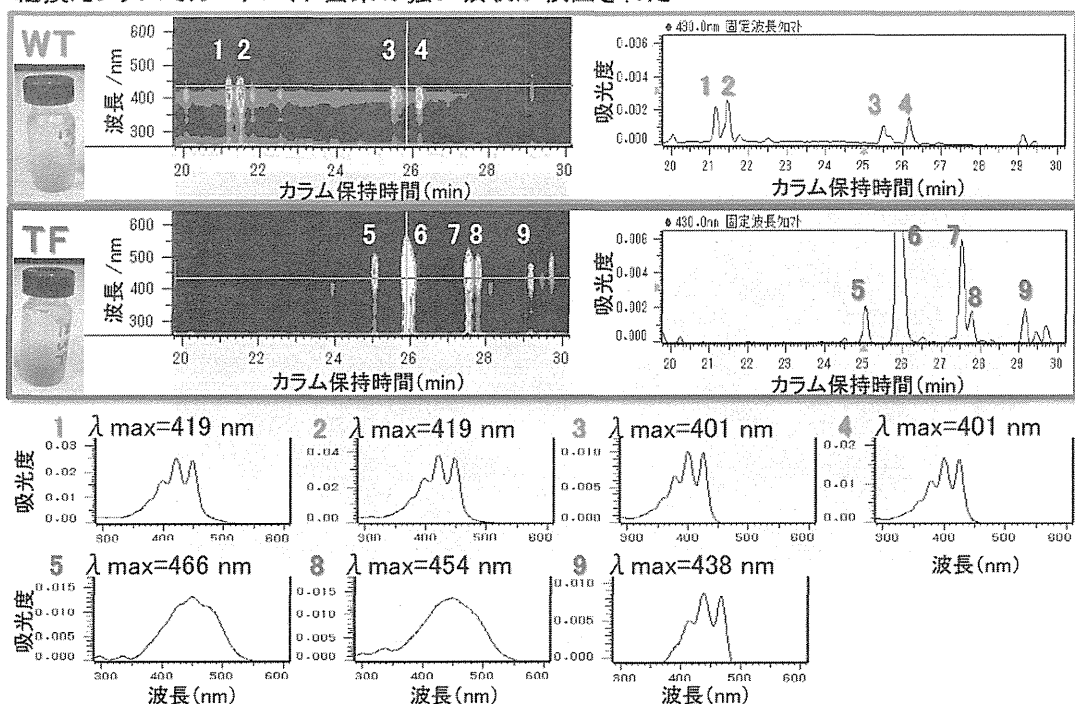


Fig. 4. LC-PDA TOF-MSによるカロテノイド分析結果. WTはnon-GM, TFはGMレタスの実験結果を示す. 図中の数字(緑, 赤)はそれぞれnon-GM, TFはGMレタスに対応する.

WT specific

- 1: RT 21.2 min
- 2: RT 21.4 min
- 3: RT 25.5 min
- 4: RT 26.2 min

TF specific

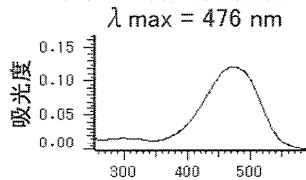
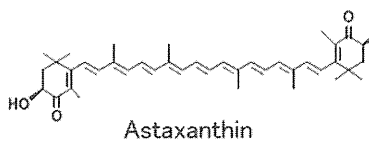
- 5: RT 25.1 min
- 6: RT 25.9 min
- 7: RT 27.5 min
- 8: RT 27.8 min
- 9: RT 29.7 min

Peak 6

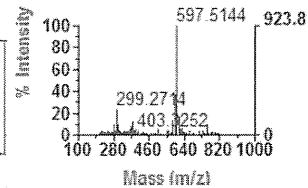
アスタキサンチン

分子式 : C₄₀H₅₂O₄

精密質量 : 596.3865 Da



m/z = 597.5
([M+H]⁺)



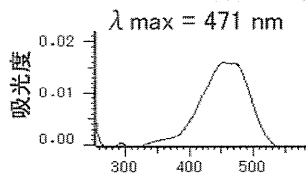
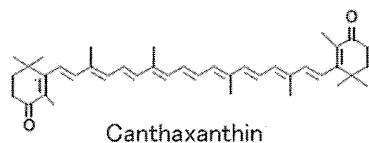
Makino et al., 2008, PCP

Peak 7

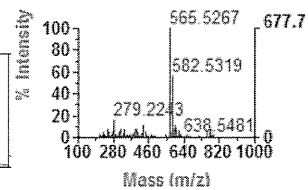
カンタキサンチン

分子式 : C₄₀H₅₂O₂

精密質量 : 564.3967 Da



m/z = 565.5
([M+H]⁺)



Makino et al., 2008, PCP

Fig. 5. GM レタスに特異的に蓄積している化合物の推定.

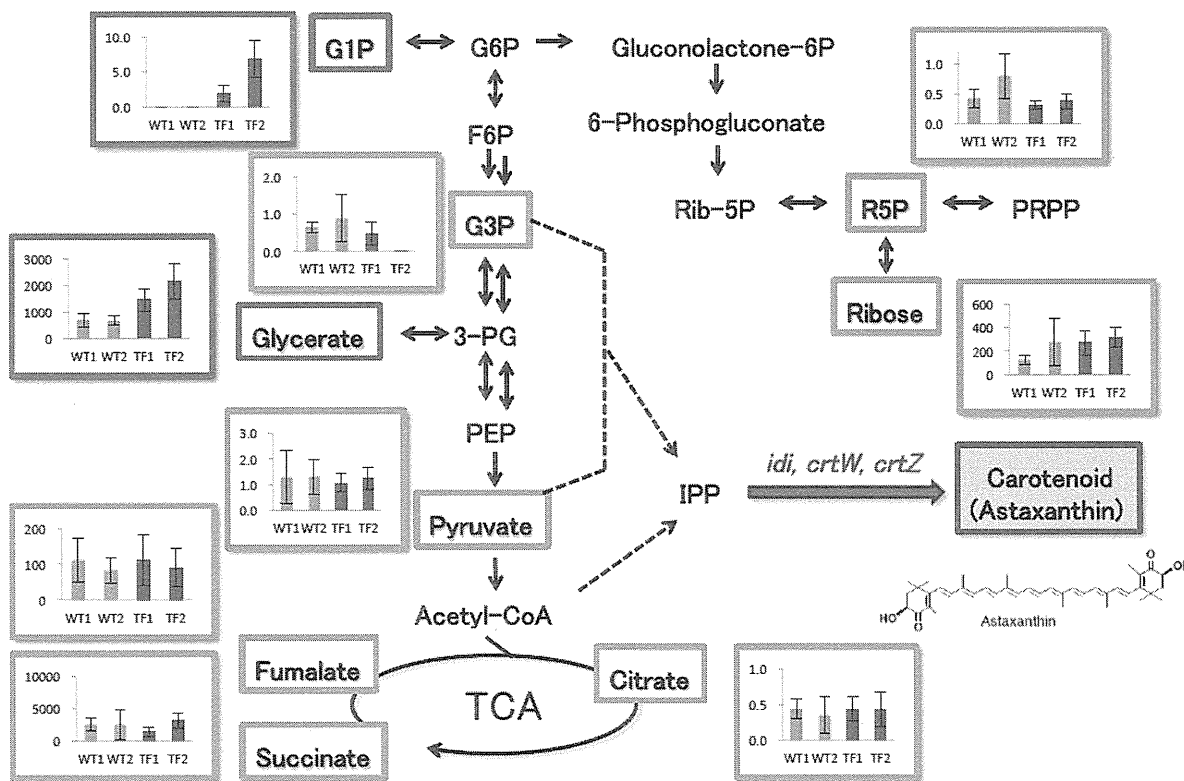


Fig. 6. 中心代謝経路代謝物の蓄積量比較. WT は non-GM, TF は GM レタスを示す.

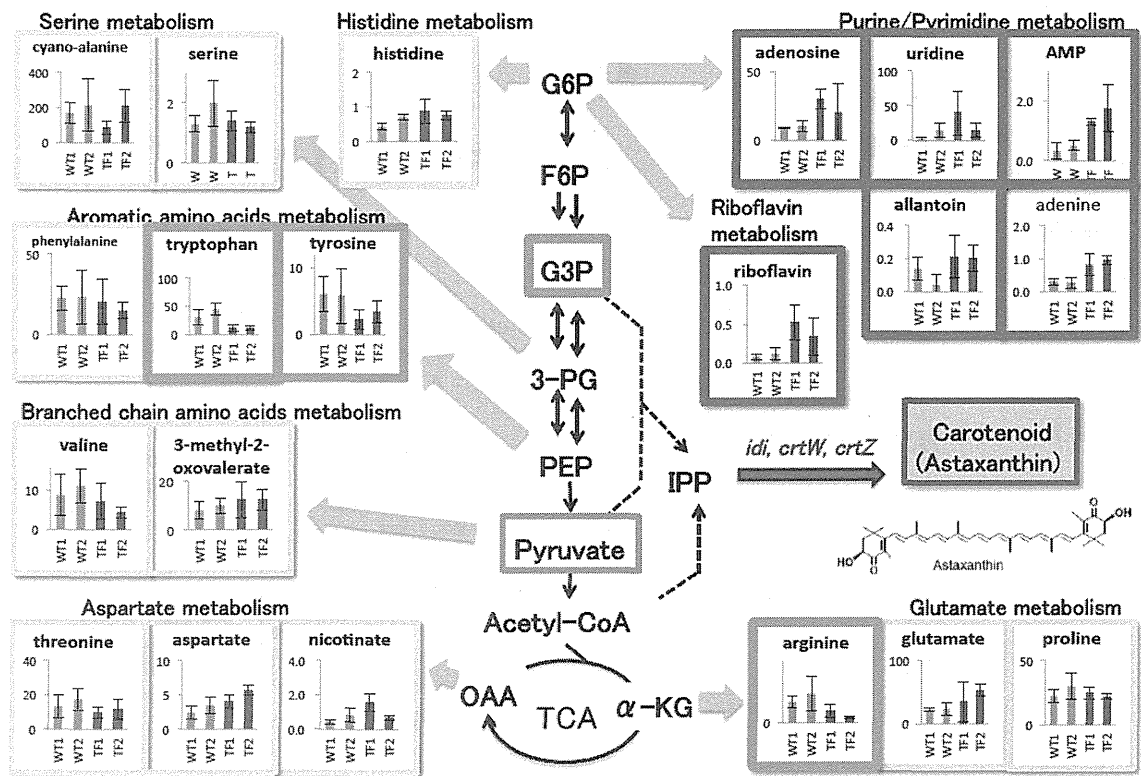


Fig. 7. アミノ酸、核酸の蓄積量比較. WT は non-GM, TF は GM レタスを示す.

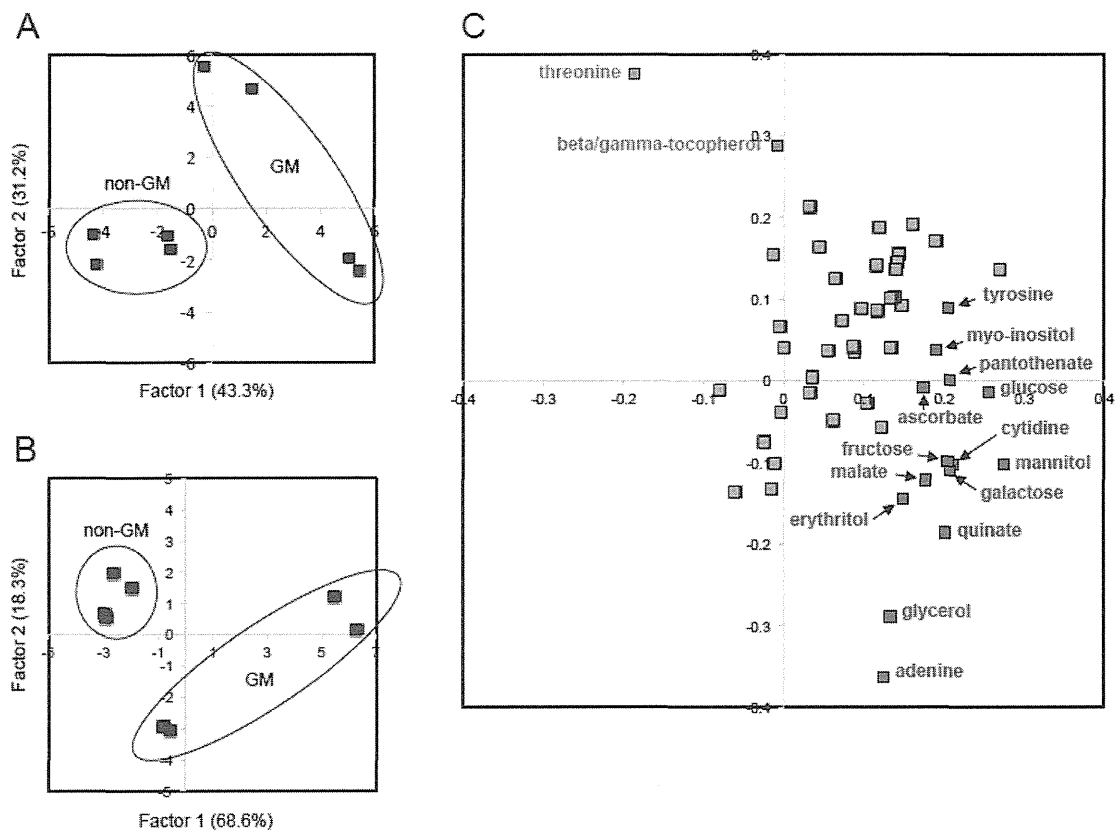


Fig. 8. 低アレルゲンGM米とnon-GM米のメタボローム解析(主成分分析). A. GC-MS分析で検出した全代謝物ピークによる結果, B. 同定できた52代謝物の結果, C. Bの主成分分析のローディングプロット.