

201522026A

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

バイオテクノロジーを用いて得られた食品の
リスク管理及び国民受容に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書

(H27-食品-一般-004)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所

平成28(2016)年3月

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

バイオテクノロジーを用いて得られた食品の
リスク管理及び国民受容に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書

(H27-食品-一般-004)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所

平成28(2016)年3月

目 次

I. 平成 27 年度総括研究報告書	
バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理 及び国民受容に関する研究	1
研究代表者 五十君 静信	
II. 分担研究報告書	
1. バイオテクノロジー応用微生物の安全性	11
五十君 静信	
バイオテクノロジー応用魚の安全性	19
名古屋 章	
2. バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析	23
手島 玲子	
3. バイオテクノロジー応用食品の トランスクリプトーム解析 (1) (2)	35
小関 良宏	
4. バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析	41
太田 大策	
5. ニワトリのモデル組換え体の作出	53
堀内 浩幸	
6. バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する リスクコミュニケーション	57
今村 知明	
7. 遺伝子組換え食品の検知技術の開発	103
近藤 一成	
8. アレルゲンデータベースによるアレルゲン性評価に関する研究	141
安達 玲子	

成 27 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）
総 括 研 究 報 告 書

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長

研究要旨

種子植物を宿主にした遺伝子組換え(GM)食品の安全性確保と安全性にかかわる評価法に関する研究に加え、バイオテクノロジー技術を用いて開発が進んでいる GM 微生物応用食品、GM 動物等を対象として研究を行った。多様な機能を有する GM が実用化に向けて開発され、バイオテクノロジー技術も多様化していることから、それらの安全性評価並びに規制のあり方、検知法、さらにはリスクコミュニケーションのあり方などについて検討することは急務である。多様化・複雑化するバイオテクノロジー応用食品の安全性評価に対応するためのオミクス手法の整備、定量解析手法並びに規格への反映化をめざすこと、消費者に受容されにくい状況が続いている GM 食品の本質的原因の究明並びに社会的受容の促進を大きな柱とし研究を進めた。加えて未承認 GM 食品の検知技術の開発及びスタック品種の検知法について検討を行った。

オミクス解析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積・整備では、バイオテクノロジー技術を用いて開発された GM 微生物食品、GM 動物等に関して、それらの安全性評価への網羅的技術（トランスクリプトーム、プロテオーム及びメタボローム）による解析結果を総合することで、モデル GM を対象として安全性評価法の検討を行った。さらに新開発食品の安全性評価で現在最も重要となっているアレルギー性に関するデータベース化、多様化するバイオテクノロジー技術並びに多様化する GM 食品の機能に関する情報収集を行った。

リスクコミュニケーション関連では、消費者に受容されにくい状況が続いているバイオテクノロジー応用食品の本質的原因の究明並びに社会的受容の促進を試みる。GM 食品が受容されない本質的原因の究明に取り組むとともに、動植物の育種や品種改良の現場における技術として、重要性が増す一方である GM 及び NBT 技術について、国民の正しい理解と判断を手助けするために必要なコミュニケーションツールおよび手法の開発に取り組んだ。

平成 27 年度は、分担研究者らにより新たに開発された GM ニワトリ、GM 微生物等のモデル GM について各種オミクス技術を用いる解析・検討を行った。リスクコミュニケーションに関する検討と未承認 GM 食品の検知技術の開発をおこなった。倫理規定並びにカルタヘナ法等各種法令遵守のうえ研究を行った。

研究分担者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部室長	
手島玲子	徳島文理大学・香川薬学部 特任教授	安達玲子	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部室長
今村知明	奈良県立医科大学・健康政策医学 講座教授		
小関良宏	東京農工大学大学院・工学研究院 教授	A. 研究目的	
太田大策	大阪府立大学大学院・生命環境科学 研究科教授		本研究は、多様化、複雑化する新機能を持った遺伝子組換え食品の安全性確保のための科学的知見の蓄積、当該食品並びに未承認組換え食品の検知に関する試験法の確立、安全性審査基準への反映並びに社会的受容の促進を図る
堀内浩幸	広島大学大学院・生物圏科学研究 科教授		

ためのリスクコミュニケーションのあり方を研究することを目的とする。

B. 研究方法

バイオテクノロジー応用食品の安全性評価では、トランスクリプトーム、プロテオーム及びメタボローム等のオミクス技術による網羅的解析は、客観的な安全性評価が期待でき、非常に有用であると考えられている。本研究班では、微生物、ニワトリ、魚、植物等のモデル組換え体を作成し、これらを用いてオミクス技術による評価を試み、その有用性の検証を進めた。オミクス技術としては、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどを行い、これらの結果から必要に応じて、当該生物のゲノム解析を行った。

バイオテクノロジー応用微生物では、GM 微生物の生菌の安全性や環境放出を含めた議論が遅れている。一方、GM 大腸菌で産生後精製されたタンパク質を菌体表面へ埋め込んだ乳酸菌のような、宿主菌には GM 遺伝子を含まない新しいタイプのバイオテクノロジー応用微生物食品の開発が進んでいる。また、従来の食品添加物に含まれず、新開発食品として扱われる GM 微生物から精製された物質等が登場している。このような多様化するバイオテクノロジー応用微生物のリスク管理に通じる知見を提供し、その規制のあり方を提案することを目指して検討を進めた。

また、異なる技術を用いて作成したアレルゲン低減化ニワトリ由来の食品（卵及び肉）の安全性につき解析し、非 GM ニワトリ由来のものと比較を行った。

リスクコミュニケーションでは、先行研究により GM 食品に対する消費者の意識は、実際のリスクを明確に認識していない一方で、摂食意欲は低く、リスク認知と受容性の乖離が大きいねじれ現象が発生していることを示した。他の食品リスク（添加物、食中毒、放射能等）と比較しても特殊な状況であり、コミュニケーションの促進がその改善の一助となる可能性がある。本研究では、消費者意識を把握し、また先進的な方策を行っている諸外国の消費者の受容性を調査し、双方の比較を行うことに特徴がある。バイオテクノロジー応用食品について、国民が正しく理解した上で判断するために、厚労省の GM 食品の Q&A やパンフレットへの活用を目的とし研究を進めた。

食品の安全性で重要なアレルギーおよび未承認 GM に関する情報収集とデータベースの更

新、これまでの検知技術では対応できない未承認 GM の検知技術の開発が求められている。これらについては、既に当研究班のメンバーはデータベースの構築並びに検知法を通知法に反映した経験があり、引き続き未承認の GM 食品等に対する新たな検知技術の開発を進めた。

研究方法の詳細については、分担研究報告書を確認していただきたい。

倫理面への配慮

GM 微生物ならびに動物において、いずれも閉鎖系での栽培・飼育になるので、各分担研究者の所属する研究所での遺伝子組換え生物安全管理委員会の許可を得て研究を行った。さらにその GM の各研究所への配布については、カルタヘナ国内法に準拠するため、生殖不可能な状態にして配布することに配慮した。

動物実験については、分担研究者の所属する研究所での動物実験倫理規定に従って行った。

リスクコミュニケーションに関する研究での、意見聴取、インタビューにおいては不利益な個人情報が出ないような配慮を講じた。また、人を対象とする疫学研究に関する倫理指針に該当する研究内容が含まれるため、奈良県立医科大学の倫理委員会に於いて承認を受けて研究を行った。

C. 研究結果 および D. 考察

バイオテクノロジー応用魚・微生物の安全性

サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現した GM 乳酸菌とその宿主菌についてオミクス解析を行った結果について検討を進めた。また、新たなモデル組換え体として E7 パピローマウイルス膜抗原発現乳酸菌株 (E7 発現株) 並びに精製した E7 タンパクを非 GM 乳酸菌に結合させた乳酸菌株 (E7 結合株) を作成し、手島らはプロテオーム解析を行った。

鞭毛を固定化発現させたモデル GM 乳酸菌とその宿主菌トランスクリプトーム解析では、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 の遺伝子の発現が一律増加していることが示された。また、トランスポーズをコードする 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。観察された結果を分析すると、ゲノムの一部の大幅な欠損が生じている可能性が示されたことから、元株及び GM 株の全ゲノム解析を行い、ゲノムの欠損に関する検

証を行ったところ、GM 株では上述の遺伝子群の多くの部分について、ゲノムが欠損していることが検証された。この結果を受けて、GM 乳酸菌で発現が上昇と判定された遺伝子のうち、欠損によりトランスクリプトームの評価として発現が上昇していると思なされた遺伝子を除き、再度 GM と non-GM 株におけるトランスクリプトーム評価を行った。細胞壁の分解酵素について GM 株で発現の増強が認められた他は、GM 乳酸菌とその宿主菌で、差異は認められなかった。この結果は手島らが以前行ったプロテオーム解析では、挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された結果と良く一致している。

魚については、海外の実用化の動向について情報収集を行った。

バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析

乳酸菌またはにわとり血液より抽出した各タンパク質溶液を Cy3 または Cy5 で標識し、さらに Cy2 で標識した内部標準サンプルを加えて 2D-DIGE (蛍光二次元電気泳動) を行った。蛍光画像は Typhoon に取り込み比較定量解析し、差のみられたスポットにつき、タンパク質の同定を nanoLC-MS/MS 分析で行った。具体的には、(i) E7 パピロウウイルス膜抗原発現乳酸菌株 (E7 発現株) 並びに E7 結合乳酸菌株 (E7 結合株) の 2D-DIGE で、両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析を行い、約 2400 のスポットのうち、2 倍以上の発現の差異のあるスポットが 66 個確認された。E7 発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等の細胞内エネルギー産生に関与するタンパク質が多く、一方、E7 発現株で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し ATP 依存性に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質等があった。(ii) 次年度に解析を行う予定の卵白アレルゲン低減化組換えニワトリのプロテオーム解析の準備として、1 か月令の雌雄それぞれ 3 匹ずつの非組換えにわたりの血清について、個体差また雌雄差を調べるために 2D-DIGE を行った。約 1500 スポットのうち、個体差で 2 倍以上の発現の差異のみられたスポットは 32 個観察され、それらのタンパク質のうち 8 個について MS 解析にて同定を行った。一方、雌雄差はほとんどみられなかった。以上、プロテオミクス解析は、作用機作を知る観点から有用であるとともに、安全性評価への応用に関して、組換え微生物や組換え動物にお

いても non-GM 及び GM 生物の間の比較情報が蓄積されてきている現状に鑑みて、有用な手法になり得ると思われた。

バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析

ゲノム編集技術によりアレルゲン遺伝子をノックアウトしたニワトリの評価を行うため、1 年目はその基礎段階としてニワトリの雌雄でのトランスクリプトーム解析を行い、雌雄間での遺伝子発現の変動を確認した。2 年目以降は今回の結果を基にゲノム改変個体での評価を行う。

野生種ニワトリ 1-2 か月齢の白血球におけるトランスクリプトーム解析から雌において性決定関連遺伝子で雄よりも発現上昇が確認された。ハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現には変動は確認されなかった。今後の解析に向けて、発現に変動が確認された遺伝子をリストアップした。

トマトやジャガイモ等をモデルとし、組換え体-非組換え体間での接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析を実施し、食品としての利用に際する安全性評価基準や規制のあり方の議論を進めていく上での科学的知見の提供を目的とする。本年度は、GUS 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間で接ぎ木を予備的に計 5 個体の組換え-非組換え接ぎ木トマトを作成し、今後の分析試料協供給の基盤を確立した。また、予備的に作成した接ぎ木は、接ぎ木施術により無傷のトマトと比較して施術による生育への影響はあるが、形態・結実性等に大きな違いがないことを確認した。マイクロトム接ぎ木体の作成・生育のための実験環境が整備できた。今後は、トランスクリプトーム解析や食品成分分析に向けての試料提供の準備をすすめる。

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析

質量分析によるメタボローム解析によって、バイオテクノロジーを用いて得られた改変生物の代謝プロファイリングによって、食品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ている。平成 27 年度は、平成 28 年度に実施予定であるニワトリ改変体における代謝成分の包括的な評価に向け、ニワトリ非改変体を対象としたメタボローム解析を実施した。また、平成 29 年度に実施予定である乳酸菌の改変体における代謝成分の包括的な評価

に向け、生物資源バンクから入手した乳酸菌の非改変体の代謝プロファイリングを行った。

ニワトリについては、血漿中の代謝物を解析対象とした。一ヶ月齢の個体（雄雌、各 3 個体）から採取した血液試料から血漿サンプルを調製し、親水性画分と疎水性画分に分画し、それぞれの画分に含まれる代謝物をガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置により測定した。再現性よく検出された 97 個の代謝物ピークのうち 70 個を同定し、相対面積値を算出し、各種の統計解析を行った。まず、データセットの特徴を俯瞰するために主成分分析を行った。第一主成分から第四主成分までの主成分は、特定の個体の代謝レベルと関連付けることができた。第二主成分は、雌雄の違いを反映する可能性が示唆された。そこで、雄雌間でレベル差のある代謝物を調べたところ、2 倍以上のレベル差があり、かつその差が有意であった代謝物は 1 種類のみであった。以上の結果から、血漿中の代謝物レベルには、一ヶ月齢のニワトリ個体では、性別による差は比較的小さいと考えられた。また、性別による差と比較して、同性内の独立 3 個体の間での差が比較的大きいことが明らかとなった。すなわち、改変体における代謝動態変化を評価する際に、改変体および非改変体それぞれについて、独立した複数個体を確保することで、再現性よく信頼性の高い分析結果が得られると判断した。

ニワトリ改変体の代謝物蓄積レベルの評価に向け、非改変体の代謝プロファイリングを実施した。一ヶ月齢の個体から採取した血液から調製した血漿を試料として、独立 3 個体間、あるいは、雌雄間において、レベル差が生じる可能性がある代謝物をリスト化した。得られた結果は、ニワトリ改変体における代謝解析のための基礎データとして使用する。

乳酸菌については、産業利用されている種を中心として、国内外の生物資源バンクから 4 株のラクトバチルス属乳酸菌を入手した。今後、菌体のサンプリング方法の違い（代謝活性のクエンチング法）が測定結果に及ぼす影響について検討した後、特定の菌株において、対数増殖期、定常期、死滅期それぞれにおける菌体中の代謝物の組成や含量を比較して、増殖ステージの違いによってレベルが変動する可能性のある代謝物の有無を精査する。

ニワトリのモデル組換え体の作出

食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変ニワトリをモデルに、オミクス解

析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことが目的である。平成 27 年度は、外来遺伝子を組込んだ生殖系列キメラニワトリ 4 羽の作出とゲノム編集技術により鶏卵のアレルゲンを遺伝子破壊（ノックアウト）した 19 羽のキメラニワトリを作出した。またアレルゲンノックアウトキメラニワトリから交配により、340 羽の子孫を作出したが、ノックアウトの表現型を有するニワトリは得られなかった。次年度以降にこれらのニワトリのオミクス解析を行なうために、非組換えニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者に依頼し、各オミクス解析における個体差や雌雄差の基礎データの蓄積を行なった。

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション

GM (genetically modified) 食品に対する日本の消費者の受容は、その登場時から一貫して低く、改善の兆しは見られない。その一方で、GM 技術は発展してきており、従来の GM 技術とは異なる特徴を持った NBT (new breeding technologies) のような技術も登場している。このような状況下でリスクコミュニケーションの複雑性は増し、また、一層慎重な対応が求められるようになってきている。

GM 食品が受容されない本質的原因の究明として、消費者の年代別による生物の基礎的知識やリテラシーの違いを把握し、年代によるコミュニケーション手法の検討、および円滑なリスクコミュニケーションに必要な要因の抽出を実施した。また、海外の最新動向として、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) による GM サーモンの承認を受けて、日米の GM サーモンに対する報道状況を整理し、消費者の反応の実態を把握した。

遺伝子組換え食品の検知技術の開発

パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) 病に抵抗性を有する遺伝子組換え (GM) パパイヤは、東南アジアなど世界的に開発されてきた。これまでに、台湾産、タイ産、中国産などが未承認 GM パパイヤとして報告されてきた。このような背景から、今後国内侵入の可能性のある様々な GM パパイヤ系統を網羅的に検出して未承認 GM パパイヤ系統を判別可能な効率的な検出技術開発が求められている。その結果、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが混入した食品を検知可能なスクリーニング法を開発し

た。GM パパイヤゲノムに導入された P35S と T-nos を標的にリアルタイム PCR より概算されるコピー数から、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤの判定を可能にした。また、PRSV 株由来外皮タンパク質 (PRSV-cp) を発現するトランジェニック構造配列のシーケンスから GM パパイヤ系統の同定も可能であることが示唆された。

内在性プロモーターの使用や新植物育種法 (NBT) によって開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では遺伝子組換え体であることを確認することは極めて困難である。この問題を解決する手法の一つで、既知配列から導入遺伝子やゲノム上の導入位置を迅速に明らかにできる Linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR) 法について、本研究では配列情報が既知である GM パパイヤ 55-1 系統をモデル作物として検討を行った。対象の既知 DNA 配列として、導入された遺伝子カセット以外に異なる染色体に導入されている nptII 部分配列および導入された遺伝子カセットには存在しない tetA 部分配列を用いた。nptII 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施した結果、2 つの増幅産物が検出され、ゲノム中のコピー数が 2 であることが確認された。また、導入された遺伝子カセットの nptII 周辺領域、および導入された遺伝子カセット以外の nptII 部分配列におけるゲノムとの境界領域の情報が得られた。一方で、tetA 部分配列をもとに LAM-PCR を実施した結果でもコピー数と周辺ゲノム境界領域が解明出来た。以上の結果から、LAM-PCR 法は小さい既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできる有効な手段の一つであることが示された。LAM-PCR 法を用いることで、内在性プロモーターの使用や NBT によって開発された GM 作物を迅速に特定することが可能になると期待される。

アレルギーデータベースによるアレルギー性評価に関する研究

2014 年 6 月から 2015 年 5 月までの 1 年間に NCBI PubMed に掲載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。これらの論文についてピアレビューを行い、5 報の論文から 5 種のアレルゲンについて、総数 17 のエピトープ情報を新たに ADFS に追加した。また、AllergenOnline の登録アレルゲン (アミノ酸配列情報) に関するアップデートを ADFS に反映させた。この情報更

新により遺伝子組換え食品のアレルゲン性評価・予測方法である ADFS をより充実させることができた。

E. 結論

バイオテクノロジー応用魚・微生物の安全性

新たなモデル組換え体として E7 パピローマウイルス膜抗原発現乳酸菌株 (E7 発現株) 並びに精製した E7 タンパクを非 GM 乳酸菌に結合させた乳酸菌株 (E7 結合株) を作出し、分担研究者によりプロテオーム解析を行った。

鞭毛を固定化発現させたモデル GM 乳酸菌とその宿主菌トランスクリプトーム解析では、観察された結果を分析すると、ゲノムの一部の大幅な欠損が生じている可能性が示されたことから、元株及び GM 株の全ゲノム解析を行い、ゲノムが欠損していることが検証された。この結果を受けて、再度 GM と non-GM 株におけるトランスクリプトーム評価を行った。細胞壁の分解酵素について GM 株で発現の増強が認められた他は、GM 乳酸菌とその宿主菌で、差異は認められなかった。この結果はプロテオーム解析で得られた挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で増加が見られ、重要と思われるタンパク質が、細胞壁の分解酵素である結果と良く一致していた。

魚については、海外の実用化の動向について情報収集を行った。

バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析

E7 パピローマウイルス膜抗原発現乳酸菌株 (E7 発現株) 並びに E7 結合乳酸菌株 (E7 結合株) の 2D-DIGE で、両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析を行い、約 2400 のスポットのうち、2 倍以上の発現の差異のあるスポットが 66 個確認された。E7 発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等の細胞内エネルギー産生に関するタンパク質が多く、一方、E7 発現株で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し ATP 依存性に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質等があった。

次年度に解析を行う予定の卵白アレルゲン低減化組換えニワトリのプロテオーム解析の準備として、1 か月令の雌雄それぞれ 3 匹ずつの非組換えにわたりの血清について、個体差また雌雄差を調べるために 2D-DIGE を行った。約 1500 スポットのうち、個体差で 2 倍以上の発現の差異のみられたスポットは 32 個観察され、

それらのタンパク質のうち 8 個について MS 解析にて同定を行った。一方、雌雄差はほとんどみられなかった。

バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析

ニワトリの評価を行うため、1 年目はその基礎段階としてニワトリの雌雄でのトランスクリプトーム解析を行い、雌雄間での遺伝子発現の変動を確認した。野生種ニワトリ 1-2 か月齢の白血球におけるトランスクリプトーム解析から雌において性決定関連遺伝子で雄よりも発現上昇が確認された。ハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現には変動は確認されなかった。今後の解析に向けて、発現に変動が確認された遺伝子をリストアップした。

GUS 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間で接ぎ木を予備的に計 5 個体の組換え-非組換え接ぎ木トマトを作成し、今後の分析試料協供給の基盤を確立した。また、予備的に作成した接ぎ木は、接ぎ木施術により無傷のトマトと比較して施術による生育への影響はあるが、形態・結実性等に大きな違いがないことを確認した。

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析

平成 28 年度に実施予定であるニワトリ改変体における代謝成分の包括的な評価に向け、ニワトリ非改変体を対象としたメタボローム解析を実施した。また、平成 29 年度に実施予定である乳酸菌の改変体における代謝成分の包括的な評価に向け、生物資源バンクから入手した乳酸菌の非改変体の代謝プロファイリングを行った。

血漿中の代謝物レベルには、一ヶ月齢のニワトリ個体では、性別による差は比較的小さいと考えられた。また、性別による差と比較して、同性内の独立 3 個体の間での差が比較的大きいことが明らかとなった。すなわち、改変体における代謝動態変化を評価する際に、改変体および非改変体それぞれについて、独立した複数個体を確保することで、再現性よく信頼性の高い分析結果が得られると判断した。

ニワトリのモデル組換え体の作出

外来遺伝子を組込んだ生殖系列キメラニワトリ 4 羽の作出とゲノム編集技術により鶏卵のアレルゲンを遺伝子破壊（ノックアウト）した 19 羽のキメラニワトリを作出した。またアレル

ゲンノックアウトキメラニワトリから交配により、340 羽の子孫を作出したが、ノックアウトの表現型を有するニワトリは得られなかった。次年度以降にこれらのニワトリのオミクス解析を行なうために、非組換えニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者に依頼し、各オミクス解析における個体差や雌雄差の基礎データの蓄積を行なった。

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション

GM (genetically modified) 食品に対する日本の消費者の受容は、その登場時から一貫して低く、改善の兆しは見られない。その一方で、GM 技術は発展してきており、従来の GM 技術とは異なる特徴を持った NBT (new breeding technologies) のような技術も登場している。このような状況下でリスクコミュニケーションの複雑性は増し、また、一層慎重な対応が求められるようになってきている。

GM 食品が受容されない本質的原因の究明として、消費者の年代別による生物の基礎的知識やリテラシーの違いを把握し、年代によるコミュニケーション手法の検討、および円滑なリスクコミュニケーションに必要な要因の抽出を実施した。また、海外の最新動向として、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) による GM サーモンの承認を受けて、日米の GM サーモンに対する報道状況を整理し、消費者の反応の実態を把握した。

遺伝子組換え食品の検知技術の開発

今後国内侵入の可能性のある様々な GM パパイヤ系統を網羅的に検出して未承認 GM パパイヤ系統を判別可能な効率的な検出技術開発が求められている。その結果、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが混入した食品を検出可能なスクリーニング法を開発した。

内在性プロモーターの使用や新植物育種法 (NBT) によって開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では遺伝子組換え体であることを確認することは極めて困難である。既知配列から導入遺伝子やゲノム上の導入位置を迅速に明らかにできる Linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR) 法について、本研究では配列情報が既知である GM パパイヤ 55-1 系統をモデル作物として検討を行った。nptII 部分配列および導入された遺伝子カセットには存在しない tetA 部分配列を用いた。nptII 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施

した結果、2つの増幅産物が検出され、ゲノム中のコピー数が2であることが確認された。一方で、tetA部分配列をもとにLAM-PCRを実施した結果でもコピー数と周辺ゲノム境界領域が解明出来た。以上の結果から、LAM-PCR法は小さい既知DNA配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできる有効な手段の一つであることが示された。LAM-PCR法を用いることで、内在性プロモーターの使用やNBTによって開発されたGM作物を迅速に特定することが可能になると期待される。

アレルギーデータベースによるアレルギー性評価に関する研究

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理に関する研究の一環として、アレルギー性予測解析法の1つとして運用・公開しているアレルギーデータベース(ADFS; Allergen Database for Food Safety)について、新たに公開・論文発表されたアレルギー情報及びエピトープ情報を追加し、データベースの更新を行った。その結果、アレルギー及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報251、及び、5種のアレルゲンについて総数17のエピトープ情報を追加した。本年度の更新作業により、アレルギー及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は2028となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は143となった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh R., Teshima R. "Genetically modified organisms in food" 40. Allergen Analysis in plants and use in the assessment of genetically modified plants. ed., Watson RR and Preedy VR, Academic Press, pp453-463 (2015)
- 2) Ogawa T., Sasaki T., Okazawa A., Teshima R., Misawa N., Ohta D." Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives" Jap. J. Food Chem. Safety (in press)
- 3) Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, Kiyono H. "Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody" .Regul Toxicol Pharmacol.76, 128-136 (2016)
- 4) Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. "Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272" Food Hyg.Saf.Sci. 57, 1-6 (2016)
- 5) Takumi Ogawa, Takako Sasaki, Atsushi Okazawa, Reiko Teshima, Norihiko Misawa, Daisaku Ohta : Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. 日本食品化学学会誌, 印刷中
- 6) 今村知明、高谷幸、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、森川恵介、長谷川専、山口健太郎、池田佳代子. 食品防御の考え方とその進め方~よくわかるフードディフェンス~. 今村知明 編著. 2015 Apr;p.1-243 全文.
- 7) 今村知明. 【第2版】食品の安全とはなにか- 食品安全の基礎知識と食品防御-. 2015; p.1-237
- 8) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H. Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via down-regulation of T helper 17 (Th17) cell responses. Molecular Nutrition & Food Research, 59, 1406-1410, 2015.
- 9) Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. Food Control, 50, 949-955, 2015.
- 10) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami,

T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 240, 413-422, 2015.

- 11) Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., & Nishimaki-Mogami, T. Interlaboratory study on unauthorized genetically modified papaya PRSV-YK real-time PCR detection method. *Data in Brief*, 2016. (Accepted)
 - 12) Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T. Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method. *Food Chemistry*, 2016. (Accepted).
 - 13) Mano, J., Takashima, K., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R. and Kitta, K. (2015) Method modifications and validation of group testing, evaluation method of GM maize content. *Rep. Nat' l Food Res. Inst.* in press
2. 学会発表
- 1) 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。乳酸菌学会セミナー (2015. 5、サンライズ淡路)
 - 2) 梶川 揚申、緑川 恵美子、近藤 和穂、入澤 友啓、榊田 和彌、五十君 静信、田中 尚人、岡田 早苗。Lactobacillus agilis BKN88 のべん毛におけるフラジェリンの構成。日本乳酸菌学会2015年度大会。2015. 7。和洋女子大
 - 3) 赤間一望、田中健一、石浜峻、榊田和彌、佐々木泰子、川名敬、五十君静信。Lactobacillus casei IGM394 を用いた HPV 16 E7 ワクチンの開発。日本乳酸菌学会2015年度大会。2015. 7。和洋女子大
 - 4) 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。日本乳酸菌学会2015年度大会・セミナー。2015. 7。和洋女子大
 - 5) 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。有用乳酸菌株の情報公開。日本微生物資源学会。2015. 9.
 - 6) 高倉麻菜美、田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。東京農大菌株保存室に保存されている菌株の機能～Micrococcus luteus に対する抗菌性について～。食香粧研究会。2015. 9
 - 7) 中川祐樹、江崎僚、佐久間哲史、黒岩麻里、山本卓、堀内浩幸、ゲノム編集技術を用いた鳥類の性決定関連遺伝子の解析、第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 (神戸)
 - 8) 康原夏子、岡本左和子、和田千津子、植原慶太、濱田未来、尾花尚弥、今村知明。医療における国民のリスク認知と意思決定に関する研究。第 54 回近畿公衆衛生学会。2015. 5.
 - 9) 岡本左和子。医療の質向上を目指して～患者と医療者を守るため医療コミュニケーション～。第 114 回日本皮膚科学会総会。2015. 5.
 - 10) 岡本左和子、尾花尚哉、濱田未来、今村知明。がん患者の治療前後の状況の変容に伴った支援に関する研究。日本ヘルスコミュニケーション学会第 7 回学術集会。2015. 9.
 - 11) 岡本左和子、野田龍也、濱田美来、尾花尚哉、今村知明。治療に伴うリスクの受容と決断のための患者のニーズと医師からの支援。第 74 回日本公衆衛生学会総会。2015. 11.
 - 12) 康原夏子、岡本左和子、濱田美来、尾花尚弥、今村知明。国民の受療意思へのリスク情報の影響に関する研究。第 74 回日本公衆衛生学会総会。2015. 11.
 - 13) 康原夏子、岡本左和子、今村知明。糖尿病の発症・治療状況と社会性の関連に関する考察。第 36 回奈良県公衆衛生学会。2015. 11.
 - 14) Nakamura, K., Ishigaki, T., Hanada, K., Akimoto, S., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. DNA methylation pattern analysis of common plant virus

- promoter used to develop genetically modified crops, PacifiChem2015, Hawaii, USA, 2015.12.
- 15) Kondo, K., Sakata, K., Noguchi, A., Nakamura, K., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. A new analytical methodology for unknown genetically modified organisms using linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR), 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015.11.
 - 16) Kondo, K., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. Rapid identification of poisonous *Entoloma rhodopolium* and edible *E. sarcopum* mushrooms using PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR, 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015.11.
 - 17) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：汎用性ウィルスプロモーター導入によるクロマチンループ内の内在性遺伝子発現への影響、日本薬学会 第136年会、2016.3.
 - 18) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、布施谷実聡、川上浩、田中秀典、明石良、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：我が国における未承認遺伝子組換えパパイヤの食品への混入に関する事例と検知法開発の現状、第52回全国衛生化学技術協議会年会、2015.12.
 - 19) 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の妥当性評価、第52回全国衛生化学技術協議会年会、2015.12.
 - 20) 福田(佐藤)のぞみ、近藤一成、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、最上(西巻)知子：遺伝毒性試験および全ゲノム解析を用いたCRISPR/Cas9のDNA二本鎖切断ポテンシャル、第38回日本分子生物学会年会、2015.12.
 - 21) 坂田こずえ、近藤一成、野口秋雄、中村公亮、福田のぞみ、石垣拓実、最上(西巻)知子、LAM-PCRを用いた組換え作物中の未知領域解析法の検討、第110回日本食品衛生学会学術講演会、2015.10.
 - 22) 野口秋雄、町井香苗、中村公亮、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、川上浩、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、2015.10.
 - 23) 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、青塚圭二、鈴木智宏、最上知子、手島玲子、近藤一成：ツキヨタケのPCR-RFLPを用いた迅速同定法の検討(第2法)：加熱、消化処理サンプルへの適用、第110回日本食品衛生学会学術講演会、2015.10.
 - 24) 中村公亮、近藤一成、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-HN系統)の検出と検知法開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、2015.10.
 - 25) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穂山浩、近藤一成、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：未承認遺伝子組換え食品検知法の開発：未承認遺伝子組換えジャガイモ検知を例に、第1回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2015.9.
 - 26) 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：食品遺伝子検査を簡易化するダイレクトリアルタイムPCR、2015年度AOAC International日本セクション年次大会、2015.6.
 - 27) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：次世代ゲノム編集技術による遺伝子組換え食品の内在性遺伝子発現への影響、日本食品化学学会 第21回総会・学術大会、2015.5.
 - 28) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えヒヨコマメ検査法確立に向けたヒヨコマメ内在性遺伝子(CaNCED)特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第21回総会・学術大会、2015.5.
 - 29) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上(西巻)知子、高島令王奈、橘田和美：リアルタイムPCRによるDNA断片化測定法の改良と市販加工食品の分析、第110回日

本食品衛生学会学術講演会，2015.10.

- 30) 高島令王奈，鍵屋ゆかり，峯岸恭孝，Sabina Yeasmin，布籐聡，野口秋雄，近藤一成，最上（西巻）知子，真野潤一，橘田和美：LAMP 法による安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの網羅的簡易迅速検知法の開発，第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会，2015.10.
- 31) 野口秋雄，近藤一成，最上（西巻）知子：

LAMP 法を用いた遺伝子組換え作物の簡易検査法の開発，第 67 回日本生物工学会大会，鹿児島，2015.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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)
「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究」
分担研究報告書(平成27年度)

バイオテクノロジー応用微生物の安全性

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物のヒトや動物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え細菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を行う。

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(宿主菌)について、網羅的オミクス解析を行い両者の違いについて検討を行った。オミクス解析は、プロテオーム解析(手島博士)、メタボローム解析(太田博士)、トランスクリプトーム解析(小関博士)が分担しておこなった。プロテオーム解析については、大腸菌で鞭毛抗原—アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、非組換え乳酸菌にふりかけアンカーにより菌体表層に結合させた組換え遺伝子を含まない乳酸菌についても解析し、遺伝子組換え乳酸菌、宿主菌との比較を行った。プロテオーム解析により、膜上のプロテアーゼの発現が変化していることが観察された。メタボローム解析では、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。トランスクリプトーム解析では、コントロール株の一群の遺伝子の脱落が疑われる結果が得られた以外は、両者の差は、トランスポーズを除き見られなかった。トランスクリプトーム解析で得られたGMの宿主として用いたクローンと、元株との全ゲノム解析を行い、GM株のゲノムに欠損について明らかとした。

協力研究者

梶田和彌 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
手島玲子 徳島文理大学香川薬学部
小関良宏、宮原平 東京農工大学大学院
太田大策 大阪府立大学大学院

モデル組換え体を作成し組換え微生物で特に重要と思われる安全性に関する知見を集積し、これらの検討により得られた有用な安全性評価手法を提供する。これまでの研究により、遺伝子組換え乳酸菌の免疫系への影響は、組み込む遺伝子産物単独の性質を必ずしも反映しないことが示されており、用いた宿主乳酸菌と挿入遺伝子産物の組合せにより多様な免疫影響が起こることが示されており、挿入遺伝子産

A. 研究目的

物単独の示す免疫影響とは異なった免疫影響が観察されることがある。

先行する研究成果により、サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現したモデル乳酸菌組換え体に対しオミクス解析を行い、組換え体と非組換え体の網羅的な比較を行った。その結果が、元株と GM 株のゲノムの一部が欠損しているのではないかという知見が得られてため、全ゲノム解析により比較検討を行い、遺伝子の状況を評価することにした。

B. 研究方法

1. 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

サルモネラ鞭毛抗原の遺伝子を乳酸菌用ベクタープラスミドに組み込み、菌体表層に固定化して発現させた。

2. オミクス解析

①オミクス解析に用いた乳酸菌

1) 菌の種類：

- a) サルモネラフラジェリン抗原(TLR5 に結合可)細胞表層発現乳酸菌(GM)
- b) 野生型乳酸菌(non-GM)

2) 菌の保存：

乳酸菌を培養し遠心にて回収、PBS で洗浄後に菌体を液体窒素で急速凍結、 -80°C に保管。それぞれのオミクス解析に湿重量 1g を調整。(1g 湿重量あたりのタンパク質含量 10 数%, RNA 含量 1-2mg)

3) 解析方法：

a) プロテオーム- 2D-DIGE (LC-MS/MS) (手島) 2D-DIGE 並びにショットガン LC-MS によるプロテオーム解析及びアレゲノーム解析を行った。分析方法等は、手島博士分担報告書を参照。

b) メタボローム---LC-MS, GC-MS etc. (太田) 乳酸菌のメタボローム解析には、集菌後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。菌体の処理方法は、図 1 に示した。分析方法等は、太田博士分担報告書参照。

c) トランスクリプトーム-DNA tip (小関) 乳酸菌のトランスクリプトーム解析には適したアレイチップを用意できなかったため次世代シーケンサーによる 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。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析手法の要約は図 1 に示した。

②プロテオーム解析用追加試料

1) 菌の種類：

c) 1-a) GM 乳酸菌の比較対象として、フラジェリン抗原を菌株表層固定化された組換えにならない乳酸菌を使用：具体的には、大腸菌にフラジェリン抗原-アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、精製タンパク質を non-GM 乳酸菌死菌に混ぜて、アンカーにより菌体表層に結合させて作成した。

解析方法：a), b), c) 3 種の乳酸菌のたんぱく質発現の差を 2D-DIGE で解析した。

C. 研究結果

(1) プロテオーム解析

2D-DIGE による、a)GM、b)non-GM の比較では、菌体の処理を行った 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は 6 スポットであった。培養上清では、同減少が 11 スポット、同増加が 4 スポットであった。GM で増加した菌体抽出から 3 スポット、non-GM で増加したスポット 1 について、培養上清では GM で増加したスポット 2 つを選び、MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。図など詳しいデータは

“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”平成26年度総括・分担研究報告書の手島博士の分担報告書に示した。

(2) メタボローム解析

生菌数及び細胞ペレット湿重量の菌株間の比較では、サルモネラ鞭毛発現株 (GM) は、非発現株 (non-GM) よりも増殖が遅いことが推定された。GM 株と non-GM 株で、GC-MS 分析で、それぞれ 289 個、235 個の代謝物ピークを特定した。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%) の代謝物ピークを同定した。

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。図など詳しいデータは “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”平成26年度総括・分担研究報告書の太田博士分担報告書に示した。

(3) 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。図など詳しいデータは “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”平成26年度総括・分担研究報告書の五十君分担報告書に示した。

この結果を受けて、元株及び GM 株の全ゲノム解析を行い、観察されたゲノムの一部の大幅な欠損が生じているかどうかの検証を行ったところ、GM 株では図2に示す箇所について、ゲノムが欠損していることが検証された。この結果を受けて、遺伝子欠損部分のトランスクリプトームの評価を除き、再度 GM と non-GM 株におけるトランスクリプトーム評価を行った結果を表に示した。

D. 考察

(1) プロテオーム解析

挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で non-GM と比べ増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。この事実は、以前この乳酸菌モデル組換え体を培養細胞で評価したところ、GM は non-GM に比べ細胞からの TNF 誘導活性が低下しており、その理由として細胞壁のプロテアーゼに対する抵抗性が低下しているという知見との関連が示唆された。GM では、異種由来のタンパク質であるサルモネラの鞭毛抗原の発現により、その対応として細胞壁の融解酵素を誘導しているものと思われる。

(2) メタボローム解析

GM と non-GM では、増殖性がやや異なっていた。代謝物蓄積量を定量的に比較したが、遺伝子組換えが原因であると判定すべき代謝物プロファイルの差は認められなかった。

(3) トランスクリプトーム解析

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。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ことが今回の全ゲノム解析の結果、確認された。この領域以外の遺伝子で発現が変動している遺伝子は、プロテオーム解析で得られたGMとnon-GMの間に認められた細胞壁の分解酵素について、トランスクリプトーム解析でも同様な結果が得られた。

E. 結論

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌のプロテオーム解析では、GMで、挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、細胞壁の分解酵素の増加が確認された。メタボローム解析では、代謝物蓄積量を定量的に比較したが、遺伝子組換えが原因であると判定すべき代謝物プロファイルの差は認められなかった。トランスクリプトーム解析ではコントロール株の一群の遺伝子の脱落が示唆され、全ゲノム解析を行ったところ、GM株の一部の遺伝子群の欠損が確認された。欠損部分を除いた、両者の差は、プロテオーム解析と同様に細胞壁の分解酵素の増加が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

①田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレク

ションからの乳酸菌株情報発信の試み。乳酸菌学会セミナー（2015.5、サンライズ淡路）

②梶川 揚申、緑川 恵美子、近藤 和穂、入澤 友啓、榊田 和彌、五十君 静信、田中 尚人、岡田 早苗。*Lactobacillus agilis* BKN88 のべん毛におけるフラジェリンの構成。日本乳酸菌学会 2015 年度大会。2015.7. 和洋女子大

③赤間一望、田中健一、石浜峻、榊田和彌、佐々木泰子、川名敬、五十君静信。*Lactobacillus casei* IGM394 を用いた HPV 16 E7 ワクチンの開発。日本乳酸菌学会 2015 年度大会。2015.7. 和洋女子大

④田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。日本乳酸菌学会 2015 年度大会・セミナー。2015.7. 和洋女子大

⑤田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。有用乳酸菌株の情報公開。日本微生物資源学会。2015.9.

⑥高倉麻菜美、田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。東京農大菌株保存室に保存されている菌株の機能～*Micrococcus luteus* に対する抗菌性について～。食香粧研究会。2015.9

3. その他発表

乳酸菌 *Lactobacillus casei* BL23 : 環状ゲノム 3,079,196 bp、3,044 種のタンパク質をコードする遺伝子がある。(Maze et al.,2010 によりゲノム解読済み)

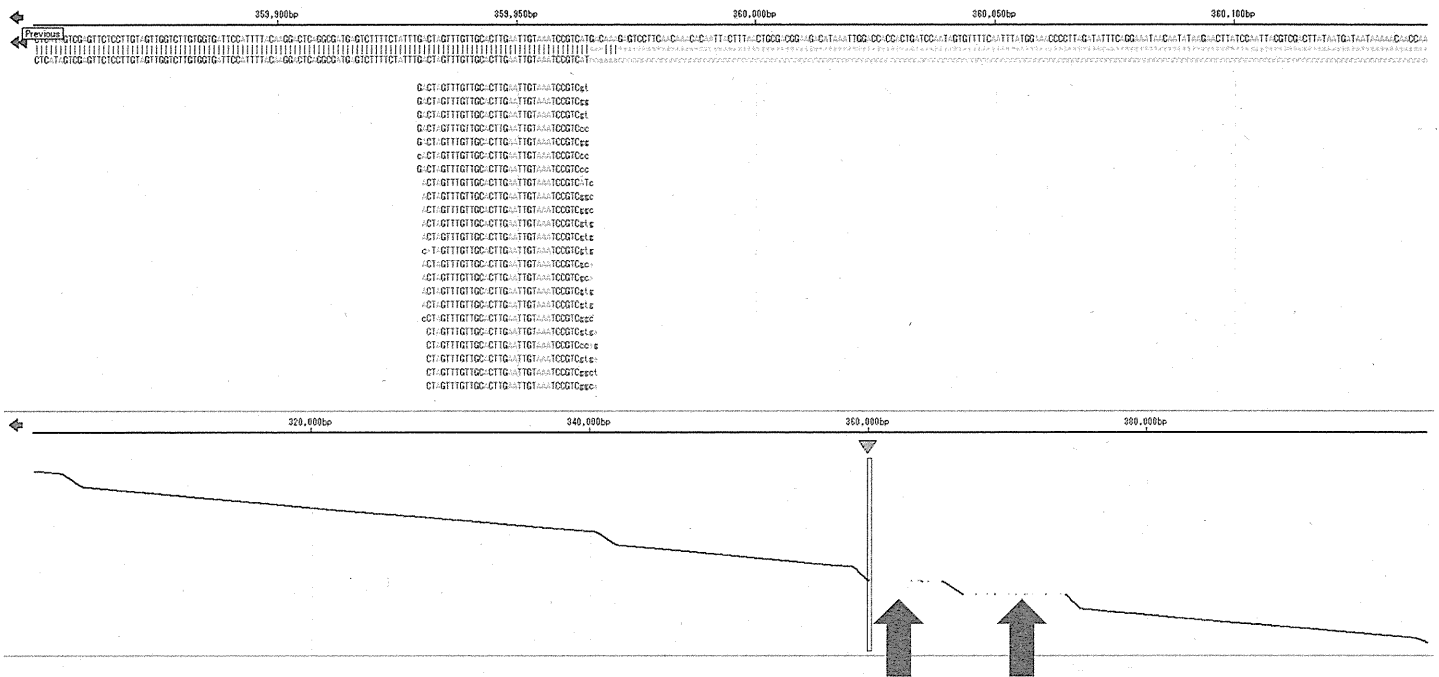
非組み換え株 (NT) と Flagellin 導入株 (GM) から DNeasy Kit (QIAGEN社) を使用し total RNA を抽出し、rRNA 枯渇処理の後に HiSeq2000 により網羅的に配列を解析 (eurofins社)。マッピングのリファレンスには BL23 のゲノム配列を使用した。

General Information	
Sequence Mode	2*100
Instrument	HiSeq2000
	HiSeq Control Software 2.2.38
Software	RTA 1.18.61
	bcl2fastq 1.8.4
Flow Cell ID	C5RD5ACXX

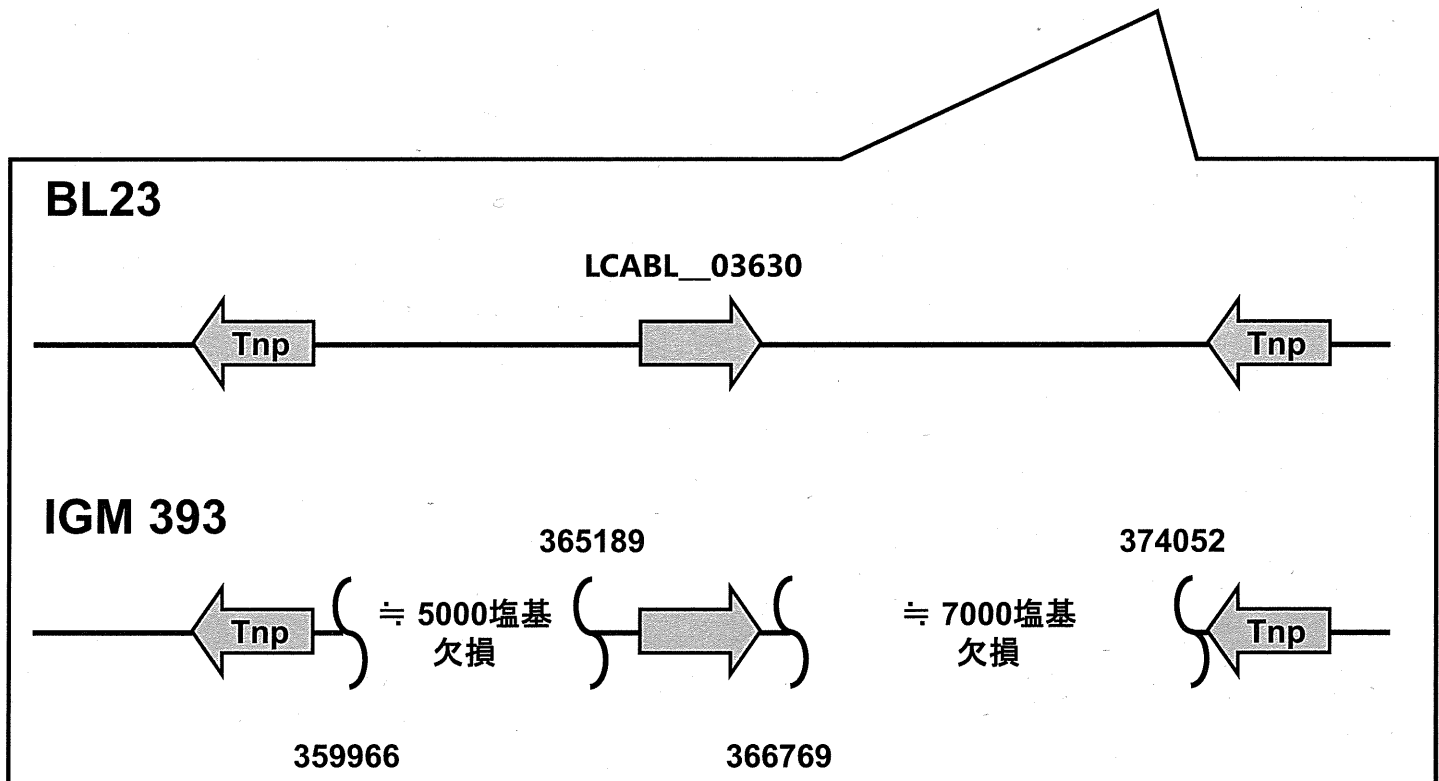
Mapping Overview					
Sample	Total Reads (M)	Cleaned Reads (M)	Reads Mapped (M)	Reads Unmapped (M)	Mapping Rate (%)
Control-strain	27.3	25.4	19.4	5.9	76.12
Flagellin-expressing-strain	16.7	15.5	12.2	3.3	78.31

2,997 遺伝子の配列を読むことができ、NT と GM での発現量比較解析を行った。

図1. 次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析手法



BL23株のゲノムに対してIGM393株のゲノムには欠損部位が存在



L. casei IGM393株はLCABL_03630を除き
LCABL_03590~LCABL_03760の領域が欠損

図2. Genome mapping (*L. casei* BL23 vs *L. casei* IGM393)

表. ゲノム欠損部を除いた発現量比較解析

Locus Tag	Gene Symbol	Gene Description	NT Reads	GM Reads	GM / NT	
LCABL_00230		surface antigen	6368.4	13854	2.2	Up
LCABL_02480		cell wall-associated hydrolase	3345.8	7227	2.2	
LCABL_15340		hypothetical protein	11.3	23	2	
LCABL_21390		hypothetical protein	376.6	5878	15.6	
LCABL_24090		hypothetical protein	3330.7	10009	3	
LCABL_24520	prtP	PII-type proteinase (lactocepine) (LP151)	18262.7	72000	3.9	Down
LCABL_29980	tnp6	transposase	5627.1	2403	0.4	

発現量に2倍以上差があるものを抽出。6種類の遺伝子がGMで発現が上昇していた。