

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）  
平成 27 年度 分担研究報告書

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

分担課題 遺伝子組換え魚研究の現状調査研究

研究分担者 名古屋 博之（国立研究開発法人 水産総合研究センター  
増養殖研究所 育種研究センター 基盤グループ長）

### 研究要旨

本年度は、2015 年 11 月 19 日に米国食品医薬品局（FDA）が認可した遺伝子組換え大西洋サケについて情報を改めて整理することを目的とした。Aquabounty Technologies 社はゲンゲ由来の不凍性タンパクプロモーター下流にマスノスケ成長ホルモン遺伝子 cDNA をつなげたプラスミッドを挿入した遺伝子組換え大西洋サケの食品としての認可を FDA から得た。その内容は同社のカナダのプリンスエドワード島にあるふ化施設で生産した全雌三倍体発眼卵をパナマの養殖施設に運び、そこで養殖して、パナマで加工、アメリカに出荷するという内容である。食品としての安全性とパナマでの環境影響評価は FDA が、カナダでの環境影響評価はカナダ環境省が実施した。認可された申請内容は遺伝子組換え大西洋サケの定義とそれらを飼育する施設（場所）を限定した内容となっているので、これらの遺伝子組換え大西洋サケをほかの場所で養殖しようとした場合、新たに申請する必要がある。アメリカに出荷された製品に関しては、遺伝子組換え大西洋サケが安全性、栄養成分ともに非遺伝子組換え大西洋サケと変わらないので、遺伝子組み換え動物であることを明記する必要はない、が、販売業者などに対し、遺伝子組換え食品であることを自主的に表示するよう求める指針も公表した。新聞等の報道ではアラスカ出身の上院議員などが表示を義務化する法案を準備している、とある。認可された遺伝子組換え大西洋サケは早ければ 2017 年に市場に出てくることが考えられる。

#### A. 研究目的

現在、短期間に成長を促進する遺伝子組換え大西洋サケが米国 FDA に食品として利用できるように申請中で、本研究を実施している 2015 年に FDA から認可された。また、中国においても遺伝子組換えコイの開発が進んでいる。本研究では、遺伝子組換え大西洋サケを中心に、これらの遺伝子組換え魚類の情報を文献検索、マスコミ、特許等を用いて収集する。

#### B. 研究方法

遺伝子組換え魚類の情報は遺伝子組換え魚に関する論文を文献検索するとともに、遺伝子組換え大西洋サケの開発会社である AquaBounty Technologies 社のホームページなどを参考に収集した。また、中国やその他の遺伝

子組換え魚に関する情報は Web of Science、MEDLINE、Current Contents Connect 等の文献データベースを用いて行う。

倫理面への配慮  
特になし

#### C. 研究結果

##### 1. 遺伝子組換え大西洋サケの認可

米国食品医薬品局（FDA）はかねてより AquaBounty Technologies 社から申請のあった不凍タンパクプロモーターの下流にマスノスケというサケ科魚類の成長ホルモン遺伝子 cDNA を組み込んだ遺伝子組換え大西洋サケの食品としての認可を認める方針を 2015 年 11 月 19 日に発表した。本報告書ではこれまでの認可に

関わる経緯と認可内容について記述する。

#### 1) 遺伝子組換え大西洋サケ研究の歴史

認可された遺伝子組換え大西洋サケに導入されている遺伝子は当時、カナダの大学病院にいた Hew (現シンガポール大学教授) らが開発したものであった。彼らは長年にわたって凍結抵抗性メカニズムを研究していたが、産業の需要に応えることを模索していた。一方、カナダ大西洋岸地域の大部分における冬期の海洋環境は、水温が 0°C~-1.8°C になり、サケ科魚類及びその他の商業的に重要な魚類は海面養殖ができなかった。そこで、不凍タンパク質遺伝子を与えることにより凍結耐性のサケを生産することと、成長ホルモン遺伝子を導入することにより越冬が不要となるよう成長速度を促進することで、これらの問題を解決しようと考えた。

Fletcher ら (1986) はウインターフラウンダー (カレイの仲間) から精製した不凍タンパク (AFP) をニジマスに注射したところ、ニジマスの凍結耐性が血液中の AFP 量に正比例して向上したことを観察した。そこで、ウインターフラウンダー凍結抵抗性遺伝子を大西洋サケに導入することが試みられ、実際に遺伝子組換え大西洋サケが作出された (Davies, Fletcher and Hew, 未発表)。しかし、この遺伝子組換え大西洋サケ血液中には前駆体 AFP が認められたものの、AFP を生産するために必要な酵素大西洋サケが持たないため低濃度で、凍結耐性を得るために十分な AFP を産生しなかった。そこで、成長ホルモン遺伝子を導入して成長を促進することによって、海面生簀養殖期間の必要をなくすような方法を考えることにした。

Du ら (1992) はゲング由来の AFP プロモーター (opAFP) の下流にマスノスケ GHcDNA を組み込んだプラスミッドを構築し、大西洋サケに遺伝子導入したことを報告した。1989 年にマイクロインジェクション実験を開始し、遺伝子組換え大西洋サケを作出した (以上、Hew, Fletcher and Davis, 1995: Transgenic salmon: tailoring the genome for food production から引用)。

以来、1994 年に F<sub>1</sub> を作出し、以後、2 年ごとに世代交代を繰り返している。2014 年には F<sub>11</sub>

を作出している。2015 年に認可が下りたことから、2016 年の冬に F<sub>12</sub> を用いて食用として出荷する遺伝子組換え大西洋サケの生産を開始すると考えられる。

#### 2) 遺伝子組換え大西洋サケ認可の経緯

次に AquaBounty Technologie 社が FDA に遺伝子組換え大西洋サケを申請した経緯について記述する。

1989 ; 研究開始

1992 ; 遺伝子組換え大西洋サケ F<sub>1</sub> の作出

1995 ; A/F Protein 社は FDA の獣医センター (CVM) と調査開始

2000 ; AquaBounty Farms に社名変更

2003 ; FDA に初めての動物医薬申請を行う  
このときは食品としての遺伝子組換え動物を申請するシステムが無かったことから、動物医薬品として取り扱われた

2004 ; AquaBounty Technologies に社名変更

2006 ; 株式上場、3000 万ドル調達

2008 ; FDA が AquaBounty ふ化施設を AquAdvantage<sup>®</sup> Salmon (AAS) 卵の生産施設として調査  
陸上養殖を始めるため、パナマ高地に施設を設置

2009 ; CVM が遺伝子組換え動物を評価するためのガイダンス 187 を公表

ここで初めて、遺伝子組換え動物を食品として申請するシステムができる  
FDA が AAS 生産のパナマ施設を検査

2010 ; FDA からの 7 調査項目を受理

FDA が獣医諮問委員会 (VMAC) を開催、AAS について協議  
VMAC も FDA に同意 (食べても安全、環境への脅威無し)

2011 ; FDA が国立海洋漁業局と米国魚類野生生物局に AAS が環境に悪影響を与えない、ということでもいいか、賛同を求める

2012 ; FDA が AAS に対する環境アセスメント原案を公表

60 日間 (その後 120 日間延長) パブリックコメント期間を公表

## FDA が AquaBounty Canada の孵化場を視察

2013 ; 4 月にパブリックコメント期間終了(環境アセスメントと環境への有意な影響をもたらさないという原案に対する)

カナダ環境省から AquaBounty Canada の商業規模での孵化場として認可

2015 ; FDA が遺伝子組換え大西洋サケを食用として問題ないと認可

以上のように F<sub>1</sub> を作った段階で食品として生産するため、FDA の獣医センターに相談を始めている。しかし、当時は遺伝子組換え動物を食品として認可するシステムは存在せず、動物医薬品として取り扱われた。食品としての認可を申請して認可をもらおうとする Aquabounty Technologists 社と動物医薬品として扱おうとする FDA のミスマッチから正式に FDA に申請した 2003 年から 2009 年まで特に認可状況に変化はなかった。しかし、2009 年に遺伝子組換え動物について、食用を目的としたものを評価することを含むガイダンスを公表されたことによって、状況が変わった。このようにして FDA は 2015 年 11 月 19 日遺伝子組換え大西洋サケが食品として安全であると認可することとなった。

### 3) 認可の内容 (申請した製品の定義)

FDA が遺伝子組換え大西洋サケを認可した、ということだけを聞くと、これからはどこでも遺伝子組換え大西洋サケが養殖され、それらの魚が自然界に逃避するようなことがないのか、または、日本でそのような遺伝子組換え大西洋サケを養殖することはないのか、といったことが考えられるが、今回の Aquabounty Technologies 社が申請した内容について以下に示す。

#### 申請した製品の定義

#### AquAdvantage Salmon (AAS) の定義

EO-1 $\alpha$  系統の  $\alpha$  遺伝子座に安定に取り込まれた  $\alpha$  型 opAFP-GHc2 遺伝子構築体の 1 コピーを持つ三倍体の大西洋サケのことで、物理的に封じ込められた生産施設における全雌三倍体魚養殖のための発眼卵として生産され、その個体群は、現在の養殖方式より、給餌開始から 2700°C・日以内に平均体重が 100 グラムまで成長し、さらにその殆どが 100 グラムを上回る。

#### 生産・利用環境

1. カナダのプリンスエドワード島で発眼卵生産
2. 発眼卵をパナマへ出荷
3. パナマ高地にて養殖
4. パナマにて加工
5. 加工済みの魚をアメリカ合衆国に出荷

上述した製品の定義について説明を加える。AquAdvantage Salmon とは同社が遺伝子組換え大西洋サケにつけた名称で大文字の部分をとって、略称を AAS とした。また、三倍体とは植物で利用されている種無しブドウと同じ原理で作られた雌の染色体を 2 セット、雄の染色体を 1 セット持っている個体のことで、通常は受精して、卵の第 2 成熟分裂が再開され、第 2 極体が放出されるが、温度刺激のような処理をすることにより第 2 極体が放出されるのを防ぐことによって染色体が 3 セットの三倍体が生産される。これらの個体は不妊になる。全雌三倍体というのは、魚類の場合、ホルモン等によって性が転換できるので XX 型の雌をホルモンによって雄にしておき、この偽雄と受精させることによって性染色体を XXX とした個体のことである。三倍体雄型 (XXY) はしばしば 2 次性徴を示したり、不完全な精子を作ったりすることがあるが、三倍体雌型は 2 次性徴を示すことも無く、成熟することも無い。従って、ここでは偽雄の精子を用いて全雌三倍体を生産している。「°C・日」とは積算温度を表しており、収容している水槽の水温と日を掛けた数値である。2700°C・日であれば水温 10°C で 270 日飼育したという意味である。プリンスエドワード島で受精、発眼させた卵をパナマへもって行って養殖するのはパナマ高地で養殖した遺伝子組換え大西洋サケが、もし逃避した場合でも沿岸の海水温が高水温で大西洋サケが生存できない、ということを考えているからである (大西洋サケは生まれた後、河川に 1 年から数年とどまるが、やがてすべての個体は海水に下り、海水で数年過ごしたのち、再び河川へ遡上して産卵行動をする)。

このように、今回の申請の内容からパナマ以外の施設で遺伝子組換え大西洋サケを養殖することはできない。現在、同社では会社が開発した陸上飼育での循環システムによる遺伝子組換えサケを施設とセットでの販売を考えているようである。しかし、そのような場合、新たな場所で飼育しようとするれば、FDA に当たら

に申請する必要がある。しかし、その場合は食品としての遺伝子組換え大西洋サケの安全性については終了しているので、新たにデータをとるような事項は環境アセスメントに関する項目だけであると思われる。

#### 考察

1990年初めから研究の始まった遺伝子組換え大西洋サケが食品として2015年に認可された。遺伝子組換え植物に慣れたアメリカ国民も遺伝子組換え動物には無抵抗、ということでは無かったようである。実際に、新聞等の報道では認可された後も、大手スーパーの一部が販売をしない方針を表明したり、環境保護団体が承認の取り消しを求める訴訟を起こしたりする動きが出ていると報道されている。

世界のサケ供給量の推移を見ると、天然と養殖の生産量は1997年に養殖生産量が天然生産量を上回っている。2012年には世界のサケ・マス類の養殖生産量は311.5万トンと漁業生産量の3倍以上になっている。特に大西洋サケの海面養殖生産量は2012年には200万トンを超えている。養殖生産量が急激に増えた理由はノルウェーやチリ等の生産量が多くなったためである。日本がサケを輸入している国はチリ、ノルウェー、ロシア、アメリカの順である。輸入している魚種では大西洋サケが最も多く、次いでトラウト（ニジマスのこと）、紅ザケ、銀鮭の順となっている。

このような順位を見ると、日本に輸入されているサケのうち、大西洋サケが占める割合が大きい。

現在はノルウェーやチリでは遺伝子組換え大西洋サケを養殖しようとする動きは無いが、将来、遺伝子組換え大西洋サケがアメリカ等で抵抗感が無くなり、しかも、養殖するメリット（養殖期間が短い、餌料効率がよいので低コスト等）が認められると、遺伝子組換え大西洋サケを養殖しようとする企業も現れてくることも考えられる。世界で有数のサケの輸入国である日本へも輸出の動きが出てきても不思議では無い。

#### E. 結論

FDAは2015年11月に遺伝子組換え大西洋サケを食品として利用することを認可した。この申請ではカナダで発眼卵を生産し、パナマで養殖し、生産するという申請内容なので、他の地域ですぐに遺伝子組換え大西洋サケが養殖されるわけでは無い。しかし、遺伝子組換え大西洋サケは生産者にとってはメリットもあることから、今後も遺伝子組換え大西洋サケの養殖に注意して、その動向を見守っていく必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・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食品のプロテオーム解析

研究分担者 手島玲子 徳島文理大学香川薬学部 特任教授

研究要旨：平成 27 年度は、バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析に関する調査研究として、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。

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生活衛生  
化学部  
佐藤里絵 (独) 農研機構 食品総合研究所  
秋山晴代 神奈川衛生研究所

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。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、また安全性評価への応用について検討することを目的とする。以下、今年度の概要を記す。

今年度は、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 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った。また、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。

B. 研究方法

(1) 乳酸菌のプロテオーム解析

(i) 供試試料

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) 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、-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: E7 発現株

試料 No.2: E7 結合株

(ii) E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

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 x 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 µl) または Cy5 (DMF 溶液、1 µl) 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 µl) を添加後に氷上にて 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 µl) 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×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比較解析を行った。

次いで、発現量の変動のみられたタンパク質の同定を行うために質量分析 (MS) 解析を行った。質量分析用には、タンパク質を 2D-DIGE の時と同様の条件で二次元電気泳動を行い、Ruby 染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析 (2D-DIGE) のゲルイメージを Decyber BVA ソフトを用いてマッチングして、2D-DIGE の解析結果に基づいて 23 スポット (表 1 から 13 spot (No. 417, 184, 845, 1508, 728, 1227, 1857, 893, 1436, 1592, 1830, 1784, 1351), 表 2 から 9 spot (No. 800, 451, 1637, 448, 827, 2494, 976, 499, 474) を指定し、スポットピッカー (GE ヘルスケア社) を用いてゲルプラグをピックアップした。ピックアップしたゲルプラグを 50%メタノール溶液で洗浄した後に、100 µl の 100 mM 炭酸水素アンモニウム及び還元処理液 (1.5 mg の DTT を 1 ml の 100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10 µL を添加して 57 °C で 30 分間静置した。さらに、アルキル化処理液 (10 mg のヨードアセトアミドを 1 ml の 100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10 µL を添加して室温で 30 分間静置した。還元アルキル化処理後の試料に対してトリプシン消化液 2 µL を加えた後に、50 mM 炭酸水素アンモニウム 10 µL を加えた。チューブを 30°C に設定したドライバス上で一晚培養して消化した。消化後の液を含むチューブを遠心乾燥機に入れて乾燥した。乾燥後に LC-MS/MS 測定用の溶媒 (1%蟻酸) 20 µL を加えた。チューブを Vortex した後に MS 解析用 Total recovery tube (ウォーターズ社) に移した。

回収したペプチド溶液は、nanoLC-MS/MS 分析は、LC 部分に UltiMate® 3000 HPLC (ダイオネクス社)、質量分析装置に Q-Exactive Plus (サーモサイエンティフィック社) を用

い Xcalibur (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で LC 及び MS を制御して測定を実施した。データベース検索は Mascot (マトリックスサイエンス社) を使用し Swiss-Prot 及び NCBIInr の最新版に対して、Lactobacillus (*Taxonomy ID*: 1578) を指定もしくは、指定せずに検索を行った。

## (2) ニワトリ血清のプロテオーム解析

### (i) 供与試料

1 か月令の雌雄それぞれ 3 匹ずつの非組換えニワトリ血清約 0.5ml を広島大学大学院堀内教授より供与いただいた (動物 No: 雄; 113, 115, 117, 雌; 111, 112, 118)。供与いただいた血清は、 $-80^{\circ}\text{C}$ ディープフリーザー内に保管した。

### (ii) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

ニワトリ血清試料各 32  $\mu\text{L}$  に Buffer A (Equil load wash, Agilent cat No. 5185-5987) 368  $\mu\text{L}$  を添加して攪拌し、Spin Filters (0.22  $\mu\text{m}$ ) でろ過した後、Multi Affinity Removal Spin Cartridge MARS Hu-6HC で試料中のアルブミン等を除去した。除去後の試料を Amicon Ultra-0.5 により濃縮した試料を評価用試料とした。

タンパク質の蛍光標識、二次元電気泳動については、上記乳酸菌の場合と同様、 $n=3$  で同様の手法で行った。

発現量の変動のみられたタンパク質については、質量分析用の Ruby 染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと雄 3 匹分の血清について実施した定量比較解析のゲルイメージを Decyder BVA ソフトを用いてマッチングして、個体間で発現変動の大きかった 8 スポット (No. 403, 451, 694, 961, 982, 1056, 1060, 1299) をスポットピッカー (GE ヘルスケア) を用いてピックアップした。ピックアップしたゲルプラグを 50%メタノール溶液で洗浄した後、100  $\mu\text{l}$  の 100 mM 炭酸水素アンモニウム及び還元処理液 (1.5 mg の DTT を 1 ml の 100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10  $\mu\text{L}$  を添加して  $57^{\circ}\text{C}$  で 30 分間静置した。さらに、アルキル化処理液 (10 mg のヨードアセトアミドを 1 ml の 100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10  $\mu\text{L}$  を添加して室温で 30 分間静置した。還元アルキル化処理後の試料に対してトリプシン消化液 2  $\mu\text{L}$  を加えた後に、50 mM 炭酸水素アンモニウム 10  $\mu\text{L}$  を加えた。チューブを  $30^{\circ}\text{C}$  に設定したドライバス上で一晩インキュベートして消化した。

消化後の液を含むチューブを遠心乾燥機に入れて乾燥した。乾燥後に LC-MS/MS 測定用の溶媒 (1%蟻酸) 20  $\mu\text{L}$  を加えた。チューブを Vortex した後に MS 解析用 Total recovery tube (ウォーターズ社) に移した。

回収したペプチド溶液は、nanoLC-MS/MS 分析は、LC 部分に UltiMateR 3000 HPLC (ダイオネクス社)、質量分析装置に Q-Exactive Plus (サーモサイエンティフィック社) を用い Xcalibur (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で LC 及び MS を制御して測定を実施した。LC、MS の分析条件を以下に示した。データベースは検索は Mascot (マトリックスサイエンス社) を使用し NCBIInr の最新版に対して、Gallus gallus を指定して検索を行った。

## C. 研究結果

### (1) E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

試料 No. 1 と No. 2 の重ね合わせ 2D-DIGE ゲルイメージを図 1 に示した。Decyder DIA ソフトを使用して自動検出されたタンパク質のスポット数は、約 2400 であった。Decyder BVA ソフトを使用して統計解析を実施した結果、試料 No. 1 と No. 2 の比較の増減が確認されたスポットのデータを表 1~表 2 に示した。また、有意差が検出されたスポットのゲルイメージ上の位置を図 2、図 3 に示した。

表 1 に示すように、E7 発現株タンパク質で、E7 結合株タンパク質に対して 2 倍以下の減少が検出されたスポットは 36 個で、表 2 に示すように、2 倍以上の増加が見られたスポット数は 30 個であった。なお、3 倍以上の変動のみられたタンパク質に限定すると、変動のみられたタンパク数は 20 個であった。

発現に変動のみられたタンパク質のうち、方法の項目で述べた 23 spot を選択し、MS 解析を行った。取得した MS/MS データを NCBIInr 及び Swiss-Prot データベース内で検索し、ヒットした結果を表 3、表 4 に示した。また、図 4、図 5 に解析スポットの番号と同定されたタンパク質を 2 次元電気泳動の画像の中に記したものを示した。図 4 に示すように、No. 1 で減少のみられたタンパク質は、グルコース、ガラクトース、マンニトール等の糖代謝等に関係する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、No. 1 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や細胞膜表面で働く  $\alpha$ -アミラーゼ等があり、外界との物質の交換が盛んになっていることが示唆された。なお、検索されたスポットのタンパク質は乳酸菌由来のものだけで、導入タンパク質である E7 パピローマウイルス膜抗原タンパク質については、Papillomaviridae (Taxonomy ID:151340) の中から non mammal papilloma viruses (Taxonomy ID:485243) と non primate mammal papilloma viruses (Taxonomy ID:333938) を除いた範囲で検索した際にヒットしなかったため、2次元電気泳動での位置を特定することはできなかった。なお、パピローマウイルス関連では、唯一、E1 rotein (Lynx rufus papilloma-virus type 1) (gi 62547900) が coverage 4%と低いけれども検出された。

#### (2) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

雌雄にわたり 6 個体ともに血清のアルブミン除去タンパク質としてそれぞれ約 1500 のスポットが 2D-DIGE で検出された。雄 3 匹、雌 3 匹につき、個体差を検出する目的で、 $n=3$  で解析した定量比較画像データについて変動の大きさにつき解析を行った。個体間で 2 倍以上変動のみられたかつ  $p < 0.01$  の有意差の得られたスポットが図 6 に示すように 32 個検出されたが、そのうち 8 スポットにつき MS 解析を行った。

MS 解析を実施したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置を図 6 に、MS 解析を実施したスポット一覧を表 5 に、MS 解析によるタンパク質の同定結果を表 6 に、各スポットの個体間での変動のグラフを図 7 に示した。

図 7 の MS 解析を行ったそれぞれのスポットの雌雄 6 個体の変動のグラフをみると、スポット No. 1299 の C-reactive protein は、雌の 2 個体で発現が高く、スポット No. 694 の免疫グロブリン H 鎖は、雄 2 個体で高いという結果が得られたが、他のスポットでは、雌雄の差は見られなかった。以上、非組換えニワトリの血清タンパク質を標的にしたプロテオーム解析により、血清タンパク質は、雌雄も含めた個体間での変動があまり大きくなく、遺伝子組換えによる非意図的影響を調べるためのよいマーカー

ーになると思われた。

#### D. 考察

##### (1) E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

E7 発現型及び E 結合型乳酸菌を用いて、2D-DIGE で、両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析を行ったところ、E7 発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等に関係する細胞内エネルギー産生に参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。これは、E7 発現株では、外界との物質の交換が盛んになっていて、細胞間コミュニケーションが行われやすい状況になっている一方で、細胞内の糖を介するエネルギー代謝能が、E7 結合体に比べ幾分低下傾向にあるものと思われた。

##### (2) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

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りの血清について、個体差また雌雄差を調べるために 2D-PAGE を行ったところ、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 個と比較的少なく、雌雄の差もほとんどみられなかった。

#### E. 結論

##### (1) 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

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 36 個確認され、そのうち 23 スポットにつきタンパク質の同定を行った。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参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り、外界との物質の交換が盛んになっていることが示唆された。プロテオーム解析は、安全性評価ばかりでなく、組換え体の作用機



作 (Mode of Action) を知るうえでも有用であることが示された。

## (2) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

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-PAGE を行った。各個体血清タンパク質として約 1500 スポットが観察されたが、そのうち、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 個と比較的少なかった。この変動の見られたタンパク質のうち、8 個のタンパク質を MS 解析から同定した。また、血清タンパク質の発現量に雌雄の差もほとんどみられなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

なし

### 2. 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)

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

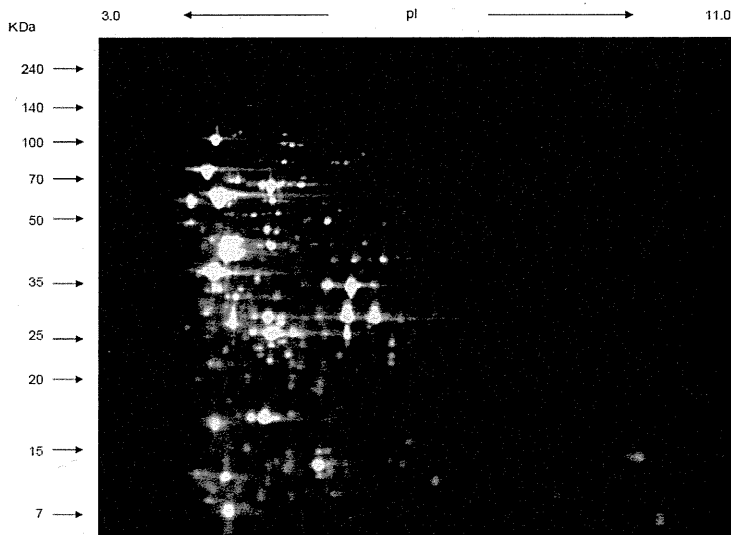


図1 No.1 と No.2 の重ね合わせ 2D-DIGE-gel イメージ  
 Cy3: 緑- No.1 E7 発現株 , Cy5: 赤-No.2 E7 結合株 (両サンプルに同程度含まれるスポットは黄色で表示される.)

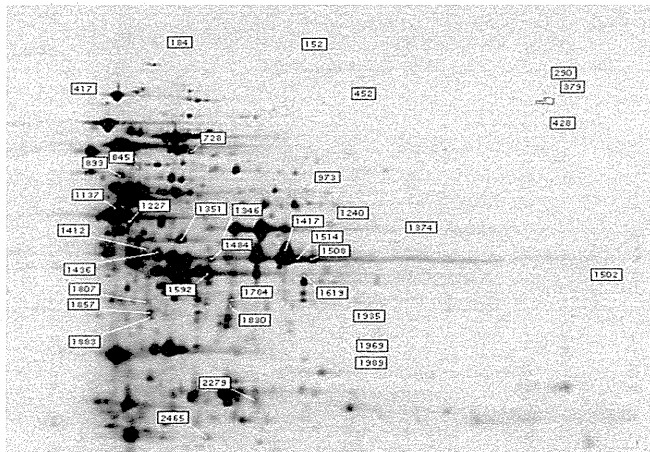


図2 試料 No.2 に対して試料 No.1 で 2 倍以下の減少が検出されたスポットの  
 二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

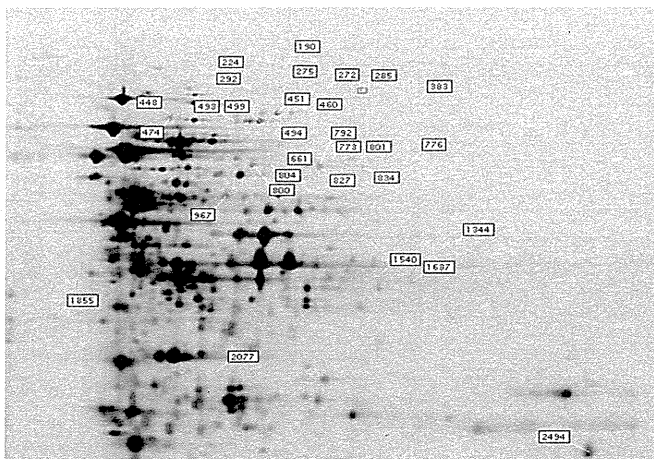


図3 試料 No.2 に対して試料 No.1 で 2 倍以上の増加が検出されたスポットの  
 二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

表1 試料 No.2 に対して試料 No.1 で2倍以下の減少が検出されたスポット

No.	Master No.	P-value	Av. Ratio <sup>*1</sup>
1	379	3.40E-06	-8.95
2	1989	0.0011	-7.1
3	417	0.0001	-4.65
4	1969	0.00042	-4.5
5	1935	0.00011	-4.4
6	428	0.00048	-4.23
7	1240	0.00013	-3.54
8	1374	4.80E-05	-3.37
9	1137	0.00076	-3.16
10	1417	0.00015	-3.14
11	184	2.50E-06	-3.09
12	845	2.70E-05	-3.05
13	1508	0.00023	-2.98
14	728	1.40E-06	-2.68
15	1807	7.20E-05	-2.62
16	1227	0.0021	-2.59
17	1857	0.00057	-2.58
18	893	0.00082	-2.55
19	1436	9.90E-06	-2.55
20	1514	0.0019	-2.5
21	152	0.0053	-2.46
22	1346	0.0012	-2.46
23	1592	0.00038	-2.44
24	1619	0.00015	-2.44
25	2279	0.00037	-2.44
26	2465	0.00052	-2.4
27	1830	0.00017	-2.28
28	1784	9.20E-06	-2.27
29	1412	8.50E-05	-2.26
30	1883	2.10E-05	-2.22
31	452	0.00024	-2.19
32	973	0.00012	-2.14
33	1351	3.30E-05	-2.13
34	1502	0.0028	-2.04
35	1484	5.00E-05	-2.03
36	290	0.0013	-2.02

\*1:スポット容積比 (試料 No. 1/試料 No.2)  
 ・MS 解析を行ったスポットは、マスターNo.の部分を赤で示した。

表2 試料 No.2 に対して、試料 No.1 で2倍以上の増加が検出されたスポット

No.	Master No.	p-value	Av. Ratio <sup>*1</sup>
1	285	0.00013	14.75
2	800	5.80E-06	4.74
3	383	0.00081	3.88
4	292	6.00E-06	3.48
5	451	1.80E-08	3.45
6	272	2.50E-05	3.19
7	1637	0.0021	3.08
8	448	2.40E-06	3.06
9	804	0.005	2.99
10	834	3.80E-05	2.83
11	801	3.70E-05	2.69
12	661	1.30E-05	2.66
13	827	2.20E-05	2.66
14	190	0.00053	2.64
15	1344	0.0022	2.64
16	2494	0.0072	2.64
17	967	0.0048	2.59
18	1855	0.0005	2.47
19	460	0.00013	2.41
20	494	2.90E-05	2.39
21	499	2.00E-06	2.29
22	275	0.00062	2.22
23	474	0.00032	2.15
24	1540	0.0004	2.14
25	493	6.30E-05	2.08
26	792	3.80E-05	2.07
27	2077	0.00088	2.07
28	773	0.0011	2.05
29	776	0.00022	2.03
30	224	0.00016	2.01

\*1:スポット容積比 (試料 No. 1/試料 No.2)  
 ・MS 解析を行ったスポットは、マスターNo.の部分を赤で示した。

表3 試料 No.1 で減少が観察されたスポットの MS 解析

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio	Ac. No.	Protein Name	Score <sup>*1</sup>	Mw <sup>*2</sup>	Coverage	Peptides <sup>*3</sup>
1	417	0.0001	-4.65	gil646849568	dienelactone hydrolase [Lactobacillus casei]	4611	58407	43%	16
2	184	2.50E-06	-3.09	CARB_LACCB	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	12606	116311	67%	59
3	845	2.70E-05	-3.05	gil501468381	hydantoinase subunit beta [Lactobacillus casei group]	3208	54510	44%	14
4	1508	0.00023	-2.98	gil489659931	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Lactobacillus casei group]	9353	36912	67%	18
5	728	1.40E-06	-2.68	gil501467845	phosphoglucomutase [Lactobacillus casei group]	4453	63492	59%	26
6	1227	0.0021	-2.59	gil489662460	3-oxoacyl-ACP synthase [Lactobacillus casei group]	3203	42111	67%	10
7	1857	0.00057	-2.58	gil489663441	galactose mutarotase [Lactobacillus casei group]	4224	32378	67%	14
8	1436	9.90E-06	-2.55	gil489663439	tagatose-bisphosphate aldolase [Lactobacillus casei group]	6539	36401	70%	22
9	893	0.00082	-2.55	gil489680884	dipeptidase [Lactobacillus casei group]	4763	52335	57%	18
10	1592	0.00038	-2.44	gil489663939	PTS mannose transporter subunit IIB [Lactobacillus casei group]	4822	35296	66%	18
11	1830	0.00017	-2.28	gil489701580	2-nitropropane dioxygenase [Lactobacillus casei group]	2318	34290	55%	9
12	1784	9.20E-06	-2.27	gil511663357	dioxygenase [Lactobacillus paracasei]	1282	34276	38%	7
13	1351	3.30E-05	-2.13	MTLD_LACC3	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase OS=Lactobacillus casei (strain ATCC 334)	17753	42615	82%	31

\*1:スコア数は、The Mowse scoring algorithmに基づいて計算した値。スコア値が高い方が間違いである可能性が低い。

\*2:登録されている全長配列の分子量(MW)

\*3:ヒットしたペプチド数

表4 試料 No.1 で増加が観察されたスポットの MS 解析

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio	Ac. No.	Protein Name	Score	Mw	Coverage	Peptides
1	800	5.80E-06	4.74	gil489661856	citrate lyase subunit alpha [Lactobacillus casei group]	10601	54684	53%	18
2	451	1.80E-08	3.45	gil504379464	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein [Lactobacillus casei]	9466	82152	66%	48
3	1637	0.0021	3.08	gil489661115	LysR family transcriptional regulator [Lactobacillus casei group]	2200	37283	34%	10
4	448	2.40E-06	3.06	gil489671882	multidrug ABC transporter ATP-binding protein [Lactobacillus casei group]	3671	72564	47%	23
5	827	2.20E-05	2.66	gil501467679	alpha-amylase [Lactobacillus casei group]	8979	61895	42%	22
6	2494	0.0072	2.64	RL6_LACC3	50S ribosomal protein L6 OS=Lactobacillus casei (strain ATCC 334)	15675	19322	74%	12
7	967	0.0048	2.59	gil518722693	threonine synthase [Lactobacillus paracasei]	5098	55434	63%	18
8	499	2.00E-06	2.29	gil489675889	ATP-dependent protease ATP-binding subunit [Lactobacillus casei]	7394	78414	59%	31
9	474	0.00032	2.15	gil489665891	GTP-binding protein [Lactobacillus casei group]	7204	67958	54%	23

\*1:スコア数は、The Mowse scoring algorithmに基づいて計算した値。スコア値が高い方が間違いである可能性が低い。

\*2:登録されている全長配列の分子量(MW)

\*3:ヒットしたペプチド数

図 4. MS 解析データを付した試料 No.2 に対して試料 No.1 で減少が検出されたスポット

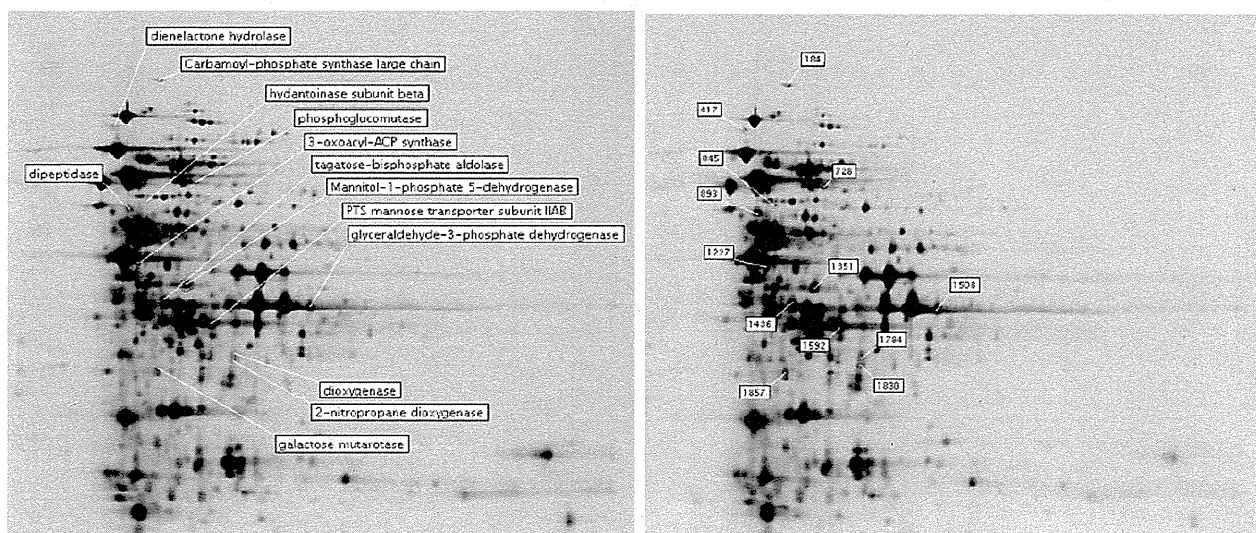


図 5. MS 解析データを付した試料 No.2 に対して試料 No.1 で増加が検出されたスポット

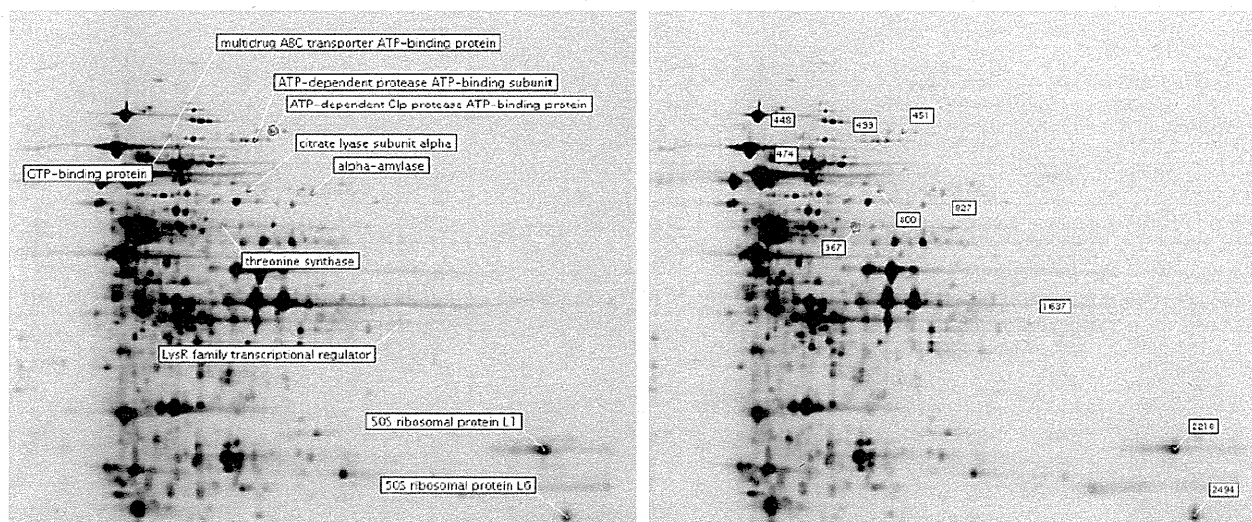


図 6 ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの  
二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

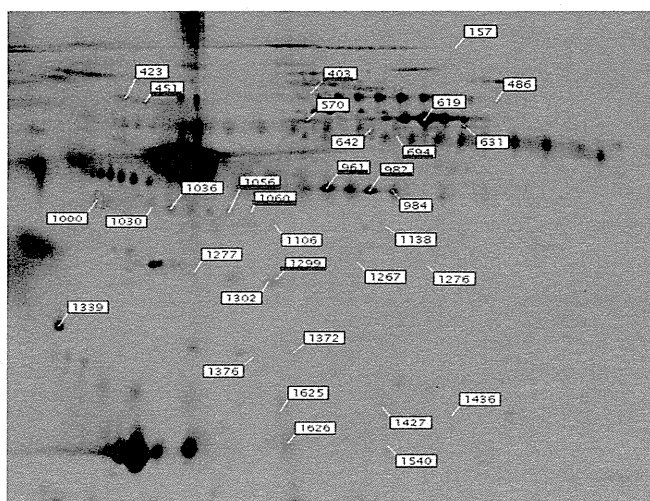


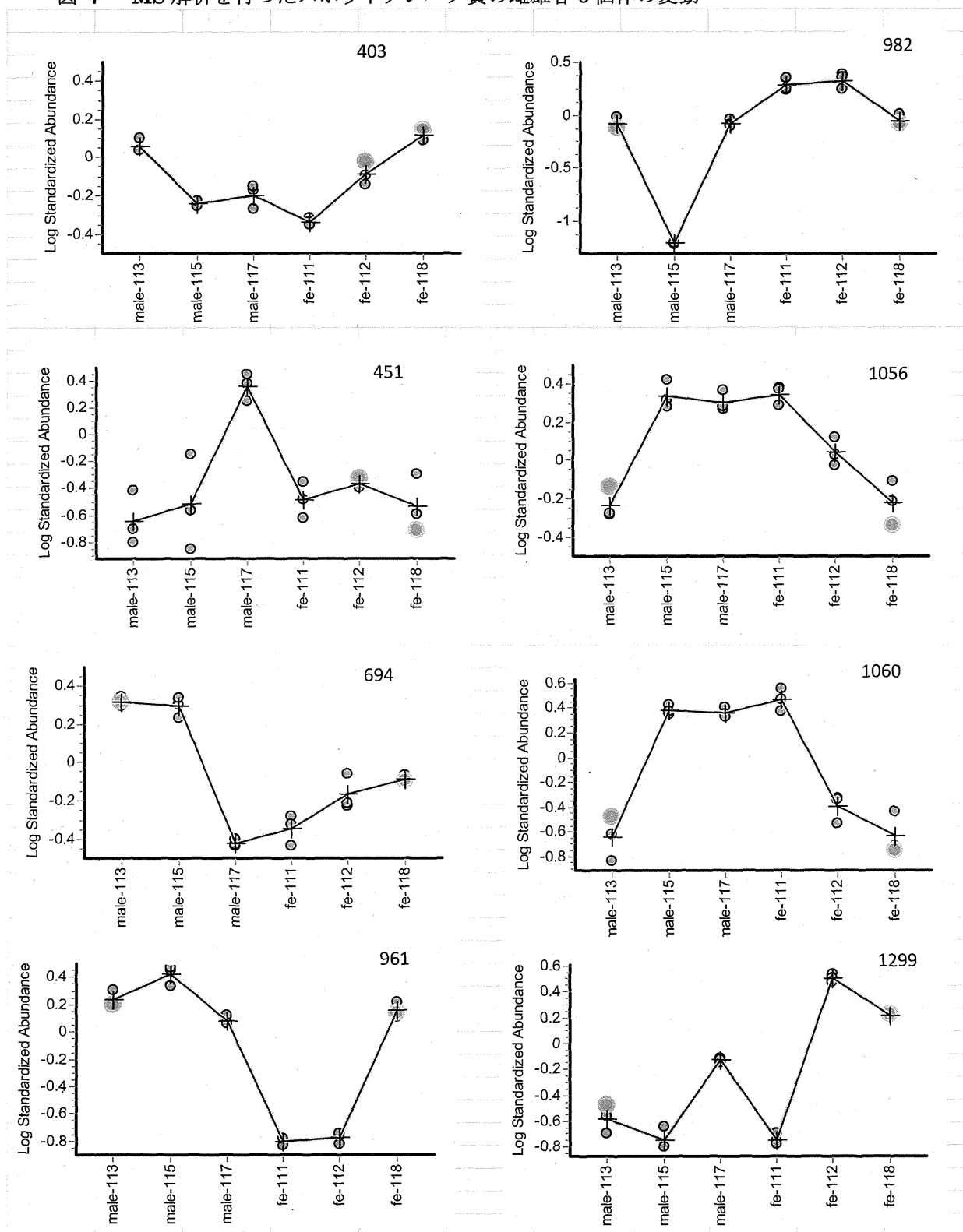
表 5 MS 解析を実施したスポット

No.	male-115 / male-113		male-117 / male-113		male-117 / male-115		fe-112 / fe-111		fe-118 / fe-111		fe-118 / fe-112	
	T-test	Ratio	T-test	Ratio	T-test	Ratio	T-test	Ratio	T-test	Ratio	T-test	Ratio
403	0.00018	-2.00	0.0039	-1.79	0.31	1.12	0.002	1.79	1.80E-05	2.82	0.0061	1.57
451	0.64	1.53	0.0016	9.38	0.015	6.15	0.2	1.28	0.75	-1.07	0.24	-1.37
694	0.52	-1.05	2.20E-06	-5.51	2.80E-05	-5.23	0.063	1.52	0.005	1.81	0.19	1.19
961	0.029	1.54	0.021	-1.43	0.002	-2.2	0.46	1.06	9.90E-06	9.02	1.80E-05	8.52
982	5.50E-06	-13.35	0.91	1.01	7.10E-07	13.45	0.43	1.12	0.0023	-2.20	0.0018	-2.47
1056	0.00079	3.75	0.00068	3.45	0.53	-1.09	0.004	-2.01	0.0015	-3.65	0.028	-1.81
1060	0.00066	10.07	0.00072	9.52	0.5	-1.06	0.00052	-7.21	0.00062	-11.91	0.12	-1.65
1299	0.11	-1.48	0.0021	2.76	0.00031	4.09	2.10E-06	17.59	2.70E-06	9.07	0.00011	-1.94

表 6 ニワトリ血清タンパク質 MS 解析同定結果

Spot No.	Protein Name	Ac. No.	Mw	Peptides	Score	Coverage
403	alpha-2-macroglobulin isoform X3 [Gallus gallus]	gij363728304	165956	5	141	4%
451	alpha-2-macroglobulin-like protein 1-like [Gallus gallus]	gij513225677	165463	18	1618	17%
694	gamma-immunoglobulin heavy chain	gij63524	54462	9	731	25%
961	vitamin D-binding protein precursor [Gallus gallus]	gij45382425	55362	10	690	19%
982	vitamin D-binding protein precursor [Gallus gallus]	gij45382425	55362	12	722	23%
1056	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 precursor [Gallus gallus]	gij478246985	48854	13	297	32%
1060	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 precursor [Gallus gallus]	gij478246985	48854	10	200	26%
1299	C-reactive protein, pentraxin-related precursor [Gallus gallus]	gij922959946	35307	2	148	6%

図 7 MS解析を行ったスポットタンパク質の雌雄各6個体の変動



## 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

### 分担課題 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)

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)  
研究協力者 宮原 平 (東京農工大学大学院工学研究院・助教)

#### 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改変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やゲノム編集技術により作出された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、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。

#### A. 研究目的

技術の発展により、現在、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、またさらには新しい技術としてゲノム編集技術による遺伝子組換えを伴わない遺伝子改変生物も開発され実用化されつつある。近年では、遺伝子組換えを伴わない遺伝子改変技術としてゲノム編集技術が急速に進展しており、ゲノム編集生物の評価系構築の必要が迫られている。今後、ゲノム編集生物由来の食品の安全性を評価する上で、ゲノム編集生物において意図しない遺伝子、およびタンパク質の発現による栄養成分の変化を調査するべく網羅的なオーム解析の必要がある。本研究事業では昨年度までにゲノム編集生物のモデルとして人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたアレルゲンノックアウトニワトリが作出されている。そこで本研究ではゲノム編集ニワトリのトランスクリプ

トーム解析を行う準備段階として、次年度以降予定されているゲノム編集ニワトリでのトランスクリプトーム解析での評価のために必要な基礎データの収集を目的として、アレルゲンノックアウトニワトリ作出に使用したニワトリ品種の野生種での雌雄間でのトランスクリプトーム解析を行った。

#### B. 研究方法

広島大学の堀内教授により、ニワトリの黄斑プリマスロック種 1-2 か月齢の白血球から抽出した total RNA をサンプルとした。解析は雌雄 3 個体ずつで行った。

トランスクリプトーム解析は アジレント・テクノロジー社の Agilent Expression Array に委託した。解析内容は、ラベリング方法 1 色法、DNA チップは Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color、Gene Expression Hybridization Kit、Gene



Expression Wash Buffers Pack を使用し、方法はマニュアルに従い行われた。検出シグナルは専用解析ソフトウェア Agilent Feature Extraction により数値化された。納品されたデータは雌雄間 3×3 通りで発現量の比較を行い、各サンプルで共通して 2 倍以上発現が変動している遺伝子を抽出し、ソフトウェア GeneSpring を使用して解析した。

#### 倫理面への配慮

該当なし

#### C. 研究結果

使用した Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 には 43,803 個のプローブが搭載されており、全てのサンプルで全プローブの 8 割程度で十分な強度のシグナルが検出された。検出された十分な強度の全てのシグナルから雄 3 個体での平均値と雌 3 個体での平均値を算出し、散布図にプロットしたところほとんどの遺伝子では雌雄間で 2 倍以上の発現変動はないことが分かった (Fig. 1)。次に雌雄間で発現に 2 倍以上の変動が確認された遺伝子のみを抽出し、さらに解析を進めた (Fig. 2)。雄で発現が 2 倍以上上昇していた遺伝子は 49 プローブあり、Avidin、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの複数のプローブで発現の上昇が確認された (Table 1)。雌で発現が 2 倍以上上昇している遺伝子は 186 プローブあり、性決定関連遺伝子、Histidin triad nucleotide binding protein W、Olfactory receptor などの複数のプローブで発現の上昇が確認された (Table 2)。2 年目以降の研究で遺伝子改変ニワトリと非改変ニワトリとの発現比較において内部標準となることが考えられる、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH は 2 プローブが検出されており、どちらも雌雄間で発現に変動は確認されなかった。また鶏卵アレルギーであるオボムコイド関連遺伝子は 1 プローブが検出されており、こちらも雌雄間で発現に変動は見られなかった。

#### D. 考察

ゲノム編集技術により作出されたアレルゲンノックアウトニワトリの評価系を構築するために、今年度は事前準備として同品種の野生種ニワトリにおける雌雄間でのトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、雄では主に卵白中に含まれる糖タンパク質である Avidin 遺伝子と、解糖系からクエン酸回路への反応を調整するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ遺伝子の上昇が見られた。雌では性決定関連遺伝子の発現に上昇に加え、ヒスチジン三連構造ヌクレオチドタンパク質、嗅覚受容体遺伝子 (Olfactory receptor) の発現上昇、また、2 倍程度の発現量の差ではあるが、卵アレルギーの原因物質であるオボアルブミン関連遺伝子においても上昇が見られた。性差を決定する遺伝子の発現差異が見られたことから本研究結果のポジティブコントロールとして妥当性を得られた。また、内部標準であるハウスキーピング遺伝子として報告されている GAPDH 遺伝子については性差で変動がないことも確認できた。発現変動の確認された他の遺伝子については現状では変動原因は不明であるが、今後、同週齢のゲノム改変個体の解析の際には結果を考慮すべき遺伝子群としてリストアップすることができた。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) なし

2) なし

2. 学会発表  
 1) なし  
 2) なし

H. 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

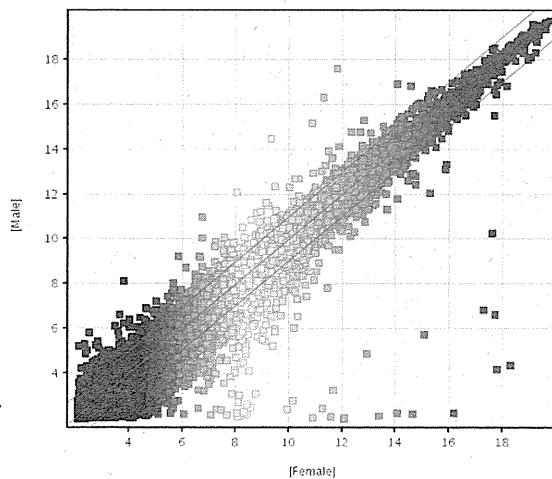


Fig. 1 全てのシグナルの各性別での平均値をプロットした散布図  
 横軸：雌、縦軸：雄、斜線は発現量の差が2倍となる位置。

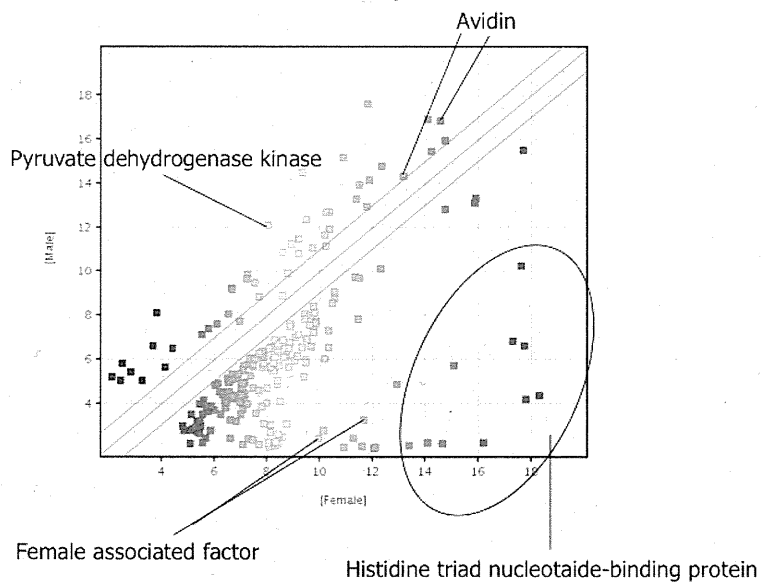


Fig. 2 全ての個体で発現量に共通して2倍以上の差がみられた遺伝子  
 横軸：雌、縦軸：雄、斜線は発現量の差が2倍となる位置。

Feature Num.	Description	Log2 Ratio
25808	Avidin	2.31 ± 0.67
32598	Avidin	2.50 ± 0.74
33888	Avidin	2.47 ± 0.73
43390	Avidin-like	2.47 ± 0.75
17089	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	2.11 ± 0.72
32037	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	4.11 ± 1.09
34000	Histidin triad nucleotide binding protein W	1.29 ± 0.16

Table 1 雄で発現が 2 倍以上上昇した遺伝子

Feature Num.	Description	Log2 Ratio
383	Female associated factor FAF	7.49 ± 0.35
13194	Female associated factor FAF	8.39 ± 0.44
32897	Male hypermethylated (MHM) region	2.40 ± 0.35
34668	Female expressed transcript 1 (FET1)	3.49 ± 0.41
18906	Histidin triad nucleotide binding protein W	10.43 ± 9.29
21580	Histidin triad nucleotide binding protein W	11.24 ± 0.14
24495	Histidin triad nucleotide binding protein W	2.71 ± 0.27
26546	Histidin triad nucleotide binding protein W	9.34 ± 0.25
98	Olfactory receptor 14J1-like	2.05 ± 0.24
5437	Olfactory receptor Olf1709	3.92 ± 1.87
10043	Olfactory receptor Olf1459	3.19 ± 0.45
25605	Fibroblast growth factor 1	1.95 ± 0.21
8144	Ovalbumin related protein Y	1.18 ± 0.10

Table 2 雌で発現が 2 倍以上上昇した遺伝子

## 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

### 分担課題 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(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）

研究協力者 小口 太一（筑波大学生命環境系・遺伝子実験センター・助教）

#### 研究要旨

近年、新しい植物育種技術（New Plant Breeding Techniques; NBT）の農作物育種への利用に注目が集まっている。遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間の接ぎ木技術も NBT の 1 つである。今後、組換え台木に接いだ非組換え穂木の野菜・果樹等の育種が進み、それらに由来する農産物の食品としても利用も想定しなくてはならない。そこで、本研究では、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。

#### A. 研究目的

地球規模の気候変動や地球人口の増大による食料需要の増大に対応するため、食料生産へのバイオテクノロジー利用の重要性は高まっている。新機能を付与した遺伝子組換え植物のみならず遺伝子組換え動物が開発され、さらに近年開発された New Plant Breeding Techniques (NBT) による新たな農作物の開発・研究が世界規模で進められている。NBT の一部は、最終産物には組換え遺伝子は含まないものの育種過程で遺伝子組換え操作を含む技術や組換え植物と非組換え植物を接ぎ木等、現在の法規制ではグレーゾーンにあたる技術が含まれる。NBT の技術開発が進めば、NBT 由来の農産物の食品としての利用も想定される。そこで、NBT 由来農作物を食品としての利用における安全性評価の基準や規制のあり方

の議論を進めていく上で科学的エビデンスの蓄積不可欠である。そこで本研究では、NBT の 1 つである組換え体と非組換え体を接ぎ木した植物に関する生物学的・栄養学的知見創出を目的とし、トマトやジャガイモ等をモデルとして組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・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に基づく科学的知見を提示し、安全性評価手法の確立を目指す。

#### B. 研究方法

植物材料は、実験用トマト品種であるマイクロトムを用いた。*GUS* 遺伝子導入マイクロトムは、筑波大学遺伝子実験センター野中助教より分与を受けた。播種後 5 週目の組換え (TG) 及び非組換え (NT) トマトを土面からおおよそ 3 cm の箇所まで主茎を切断し、