

台木には切断面の中心に垂直にカミソリ刃で2-3 mm程度の切り込みを入れ、その間にカミソリでV字型に削いだ穂木を挟み込み、内径3 mmのビニル管で固定した。その後、1-2週間、鉢を含む植物体全体をビニル袋で覆い、保湿状態で管理した。その後、1週間程度をかけてビニル袋を外し、栽培を継続し、形態・生育状況を観察するとともに、摘便、果実を採取した。

倫理面への配慮

植物材料は組換え体を含むため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」及び関連省令や地方自治体の政令や指針、筑波大学遺伝子組換え実験安全管理規程等を十分に遵守して実施している。

C. 研究結果

播種後約5週間目のマイクロトムのTG台木とNT穂木間あるいはNT台木とTG穂木間の接ぎ木の計5例を施術し、いずれも切断面が活着し、接ぎ木は成功した。組換え-非組換え接ぎ木トマトを作成・観察の結果、接ぎ木施術により、接ぎ木操作をしなかったインタクトなトマトと比べて生育への影響があるものの、生育・結実性等に大きな違いがないことを確認した(図)。



図 接ぎ木トマト

TG台木とNT穂木間の接ぎ木トマト(右)と接ぎ木施術していない非組換え穂木(左)。播種からおよそ20週目、接ぎ木トマトの接ぎ木は播種後おおよそ5週目に実施した。

D. 考察

マイクロトムは、個体サイズが小さく、閉鎖系実験環境での取扱に優れており、加えて、今回、非組換え体間の接ぎ木も比較的容易であることが確認された。今後は、接ぎ木施術による影響を評価するために、TG台木とTG穂木間、NT台木とNT穂木間での接ぎ木の実施・生育、食品成分分析への供試のため、栽培規模の拡大が必要である。現在、栽培規模拡大に向け、組換え体の種子の増殖を進めている。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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を用いて得られた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、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。

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。

A. 研究目的

近年、遺伝子改変生物を利用した食品・医薬品の開発が進んでいる。特に、穀物、野菜、家畜、家禽、微生物発酵食品などとして古くから人類に利用されてきた生物種は、既存の飼育・栽培・培養設備や流通システムをそのまま利用することができる点や、高い生産性が保証されているが、

遺伝子改変の対象生物としての開発と利用には、安全性に関わる品質や生産段階での環境保全など、多くの課題が残されている。

ニワトリは、肉と卵を食用として利用するため、世界中で飼育され、優良系統は一個体当たり年間 300 個の卵を産卵する。鶏卵は、遺伝子操作による有用物質や有用タンパク質の蓄積の場として

注目されている。鶏卵構成成分は、そのほとんどが母体から供給される。卵細胞の貯蔵栄養物である卵黄は、約半分が水分であり、残りが脂質やタンパク質である。これらの卵黄成分は、肝臓から血流によって卵細胞まで運ばれる。また卵白に大量に含まれるオボアルブミンは卵管細胞で特異的に産生され細胞外に分泌される。このように、鶏卵成分は、母体の代謝状態と密接な関係にある。すなわち、改変体の代謝状態の評価は、改変体そのものを食肉として利用する場合だけでなく、改変体から得られる鶏卵を食品（あるいは医薬品）として利用する場合の安全性評価にも適用されるべきである。

本研究では、質量分析によるメタボロミクスを実施し、改変生物における代謝物の網羅的解析によって、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。今年度は、ニワトリ改変体における代謝物プロファイリングに向け、非改変体での代謝物解析を実施した。

B. 研究方法

1. ニワトリ血漿のメタボローム解析

1-1. 供試品種

非改変体として横斑プリマスロック種を用いた。非改変体は広島大学大学院生物圏科学研究科の堀内浩幸教授より提供いただいた。

1-2. 血漿の調製

本研究では、血液の非細胞成分である血漿を解析対象とした。血液は、全身を常に循環しており、個体の代謝動態変化を把握する上で、最も良い検査試料の一つである。血液を試料とする利点として、採取が容易であること、個体に与えるストレスが比較的小さいこと、特定の個体からの経時的採取が可能であること、血液を対象としたメタボローム解析膨大な知見の蓄積があることが挙げられる。

血液を採取する個体の月齢は一ヶ月齢とした。血液の抗凝固剤は、代謝物の解析に比較的影響が少ないと考えられるエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-2Na) リン酸緩衝溶液を使用した。採血は鶏舎内で行った。予め抗凝固剤を 0.3

mL 加えた注射器を使用し、合計量が 3.0 mL となるように翼下静脈より採血した (EDTA 終濃度 7.7 mM)。採血後、注射器を上下転倒することにより血液と緩衝液を混和した。その後、注射器から針を外し、注射器の内容物を 15 mL 容のコニカルチューブに移した。血液試料は、すべての個体の採血を終えるまで室温で静置した。採血開始から終了までに要した時間は、約 45 分間であった。採血終了後、血液試料を研究室に持ち帰り、穏やかな条件で遠心分離することで上清 (血漿) と沈殿 (血球) に分離した。上清 1.5 mL を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに移し、個体毎の血漿試料とした。各種の条件検討には、6 個体由来の血漿を等量ずつ混合した血漿を使用した。

1-3. 血漿タンパク質の除去

血漿からタンパク質を除去するために、まず、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質操作を行った。その試料に対して、さらに、限外濾過法による除タンパク質操作を行い、限外濾過の有無が解析結果に与える影響を検討した。

まず、タンパク質変性沈殿法による除タンパク操作を行った。新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに 1.8 mL のメタノール/超純水 (55/45, v/v) を加え、 -40°C に設定したフリーザー内で十分に冷却した。ここに血漿 0.2 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、 -40°C に設定したフリーザー内で 30 分間静置した (メタノール終濃度 50%)。その後、 4°C , $14,000 \times g$, 3 分間遠心し、上清全量を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに回収した。

回収した上清を 2 本の新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに $850 \mu\text{L}$ ずつ分注し、その内の 1 本には、後述する溶媒分画の前に限外濾過による除タンパク操作を施した。限外濾過にはアミコンウルトラ遠心式フィルター (MWCO 10-kDa) を用い、遠心後の濾液を回収し、冷却遠心濃縮器にかけて乾固した。限外濾過による除タンパク操作を行わなかった残りの一方は、そのまま冷却遠心濃縮器にかけて乾固した。除タンパク操作後の血漿サンプルは乾固した状態で -80°C フリーザー内で保存した。

1-4. 分画・誘導体化

乾固試料に対して 2.0 mL のメタノール/クロロホルム/2% 酢酸 (5/2/1, v/v/v) を加え、ボルトックスミキサーで混合し、代謝物を再溶解させた。メタノール/クロロホルム/2% 酢酸の混合溶媒には、内部標準物質として、テストステロン (20 µg/ml) とリビトール (5 µg/mL) を予め加えた。血漿成分を溶解させた溶液から 800 µL を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに移した。その後の分画操作、誘導体化の操作は、Furuhashi et al. (2015) の方法に従った。本方法では、試料中のエステル化脂肪酸と非エステル化脂肪酸を区別して検出可能である。グリセロ脂質などを構成するエステル化脂肪酸は脂肪酸メチルエステル (fatty acid methylester; FAME) 誘導体として、非エステル化脂肪酸はトリメチルシリル (TMS) 誘導体として検出される。

1-5. GC-TOF/MS

誘導体化試料の計測には、ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置 (GC-TOF/MS) を用いた。誘導体化試料 1 µL をインジェクトした。GC 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。トランスファーライン温度は 250°C, イオン源温度は 250°C とした。イオン化は electron-ionization (EI) モード (70 eV) で行い、スキャン範囲は m/z 40-650 とした。

1-6. ピーク抽出・同定

GC-TOF/MS トータルイオンカレント (TIC) 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。ピーク同定は、インハウスのマススペクトルライブラリと市販の NIST マススペクトルライブラリを用いた。

1-7. 統計解析

個体識別番号 #111, #112, #118 の雌 3 個体を、

個体識別番号 #113, #115, #117 の雄 3 個体を用いた。採血は、雄 3 個体 (#115, #117, #113), 雌 3 個体 (#111, #112, #118) の順に行った。採血反復回数は 1 回とした。分析前処理の反復回数は 2 回とした。GC-TOF/MS へのインジェクトの反復回数は 1 回とした。

主成分分析はウェブ解析ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。雌雄それぞれの独立 3 個体間での代謝物レベル差の検定は Student's t-test により、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。

2. 乳酸菌のメタボローム解析

2-1. 供試菌株

理研バイオリソースセンター (RIKEN BRC) の微生物材料開発室 (JCM) より、*Lactobacillus casei* (JCM1134T), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (JCM1002T), *L. oris* (JCM11028T) の 3 株を入手した。また、米国の American Type Culture Collection (ATCC) より、*L. plantarum* (ATCC BAA-793) を入手した。

2-2. 凍結乾燥菌体の復元

菌体復元は、それぞれの手順書に従って実施した。所定の復元液 0.5 mL を滅菌済のパスツールピペットでアンプル内に加え、凍結乾燥菌体を懸濁した。菌体懸濁液を所定の培地に接種し、指定された条件で培養した。平板培養、液体培養を同時に行った。平板培養では汚染がないことを確認した。液体培養で菌体の増殖が確認できたため、培養液の一部を採取し以下の方法で株を維持した。

2-3. 乳酸菌の保存・維持

長期的な保存として、凍結保存法を用いた。乳酸菌が生育した液体培地を遠心して菌体を集め、これを凍結障害防止剤の媒体 (10%グリセロール) に懸濁し、小分けして -80°C のディープフリーザーに入れて保存した。中期的な保存として、寒天培地による Stab 保存法を用いた。MRS 白亜寒天培地を使い、白金線を使って穿刺接種し、至適温度で 24 から 48 時間培養した。穿刺溝に沿って乳酸菌の生育が確認できた時点で、4°C の冷蔵庫に入れて保存した。

C. 研究結果, D. 考察

1. ニワトリ血漿のメタボローム解析

1-1. 分析前処理

まず、すべての血漿試料に対して、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質処理を行った。次に、限外濾過法による除タンパク質処理を行った試験区と、行わなかった試験区を設け、両者を比較することで、限外濾過法による除タンパク質処理の有無が代謝物の解析結果に及ぼす影響を調べた (図 1)。

親水性代謝物の TIC クロマトグラムを比較したところ、限外濾過操作を行った試験区において、グリセロール (図 1A, ピーク d) や未同定の多数のピーク (図 1A, ピーク群 e) が検出された。グリセロールは、限外濾過フィルターに予め塗布されていたものが試料に混入した可能性が考えられた。多数の未同定ピークの由来は不明であった。

疎水性代謝物の TIC クロマトグラムを比較したところ、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質処理のみで限外濾過法による除タンパク質処理を行わなかった試験区において、多数のピーク (ピーク同定後、これらのピークは FAME 誘導体、脂肪酸 TMS 誘導体、ステロール TMS 誘導体などであることが分かった。) が検出されたのに対して、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質処理と限外濾過法による除タンパク質処理を組み合わせた試験区では、これらのピークがほとんど検出されなかった。一方、多数の未同定ピークが規則性のある間隔で検出された (図 1B, g)。これらの未同定ピークは、限外濾過フィルターあるいは濾液回収用のチューブ由来の可塑剤である可能性が考えられた。

限外濾過フィルターを使用して除タンパク質処理を行った場合には、多数の不純物が試料中に混入し、GC-TOF/MS による疎水性代謝物の解析に悪影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの結果を考慮して、血漿の個体間および雌雄間での比較解析には、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質処理のみを行った試料を用いることとした。

1-2. 代謝物の同定

実験操作の反復試料において再現性よく検出された代謝物ピーク数は、親水性代謝物では 43 個 (表 1)、疎水性代謝物では 54 個 (表 2) であった。このうち 70 個のピークを同定することができた。同定できたピークには、アミノ酸、有機酸、脂肪酸、糖をはじめとして、飼料に由来すると考えられる植物ステロールなど、多様な分類クラスに属する代謝物があった。同定できなかった 27 個の代謝物ピークは、それぞれを区別するために通し番号を付与した。

リン酸 (図 1A, ピーク a)、グルコース (図 1A, ピーク b)、コレステロール (図 1B, ピーク f) の代謝物ピークは、イオンカウントが飽和していたため、今回の解析からは除外したが、誘導体化試料を希釈後に計測することで、試料間の比較が可能である。また、抗凝固剤として添加した EDTA (図 1A, ピーク c) は解析から除外した。さらに、血漿を超純水に置き換えたブランク試料にて検出されたピークは解析から除外した。

1-3. 代謝物レベルの比較解析

再現性よく検出された 97 個の代謝物ピークのピーク面積値から相対蓄積量を算出し、多変量解析手法の一種である主成分分析を行った (図 2)。血漿試料ごとに、分析前処理の反復操作に由来する 2 個の測定データを得たが、それらは平均化せずにそのまま用いた。図中の各プロットには、個体識別番号と、分析前処理の反復操作番号をハイフンで繋いだ略号を付記した。雌雄の別は、プロットの形状で区別した。なお、個体識別番号 #115 の一回目の反復実験操作に由来する誘導体化試料の測定データ (#115-1) は、親水性代謝物の TIC クロマトグラムが全体的に低い強度であったことから、二回目の反復実験操作に由来する誘導体化試料の測定データ (#115-2) のみを解析に用いた。

第一主成分から第四主成分までの累積寄与率は 79.5% であった。第一主成分 (寄与率 36.3%) は、#118 の個体と他 5 個体の間でレベル差がある代謝物に関連付けることができた。第二主成分

(寄与率 15.3%) は、雌 2 個体 (#111, #112) と雄 2 個体 (#113, #117) の間でレベル差がある代謝物に関連付けることができた。第三主成分 (寄与率 14.5%) は、#115 の個体と他 5 個体の間でレベル差がある代謝物に関連付けることができた。第四主成分 (寄与率 9.8%) は、#113 と #117 の雄 2 個体間でレベル差がある代謝物に関連付けることができた。

第一主成分において、#118 の個体は他 5 個体と明確に区別された。この理由は不明であるが、#118 の個体の代謝状態に何らかの異常があった可能性や、採血後の経過時間が影響した可能性 (#118 は 6 番目に採血した) などが考えられた。また、第一主成分スコアと第二主成分スコアの二次元プロット図 (図 2A) において、不明瞭ではあるものの、雌グループと雄グループが二分された。

そこで、個々の代謝物について、雌雄間での蓄積レベル差の有無を t 検定により評価した。主成分分析の際と同様の理由で、個体識別番号 #115 の 1 回目の反復実験操作に由来する誘導体化試料の測定データ (#115-1) は解析から除外した。雌雄間での蓄積レベル差が有意であった代謝物が 16 種類あった。雄グループで蓄積レベルが高かった代謝物は、脂肪酸 (20:4 FAME 誘導体, 20:0 脂肪酸 TMS 誘導体, 22:6 FAME 誘導体) や、有機酸 (succinate, malate, isocitrate, pentanedioic acid), アミノ酸 (proline), 糖 (glucitol, myo-inositol) などの 12 種類であった (図 3A)。雌グループで蓄積レベルが有意に高かった代謝物は、4 種類 (hydroxylamine, 16:1 FAME 誘導体, serine, 5-oxoproline) であった (図 3B)。これらの代謝物は、蓄積レベルに性差があることから、改変体の評価の際に注意すべきであると考えられた。一方、これら 16 種類の代謝物の中で、雌雄間で 2 倍以上の蓄積レベル差があった代謝物は、glucitol のみであり、その差は僅かに 2.1 倍であった。

以上の結果から、血漿中の代謝物レベルは、一ヶ月齢のニワトリ個体では、性別による差が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 個体の間での違いが比

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ことが分かった。

2. 乳酸菌のメタボローム解析

ラクトバチルス属の 4 株を収集した。今後、まず、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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

2. 学会発表

該当なし。

該当なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし.

3. その他

該当なし.

2. 実用新案登録

表 1. ニワトリ血漿の親水性画分から検出された代謝物

Peak ID	RT (min)	Compound
PP-I.S.1	24.93	ribitol (5TMS)-01
PP-I.S.2	25.25	ribitol (5TMS)-02
PP01	9.29	pyruvic acid (1MEOX 1TMS)
PP02	9.63	lactic acid (2TMS)
PP03	10.77	alanine (2TMS)
PP04	11.27	unidentified-01
PP05	12.41	3-hydroxybutanoic acid (2TMS)
PP06	15.92	proline (2TMS)
PP07	16.19	glycine (2TMS)
PP08	16.36	succinic acid (2TMS)
PP09	17.62	serine (3TMS)
PP10	18.24	threonine (3TMS)
PP11	20.00	amino malonic acid (3TMS)
PP12	20.44	malic acid (3TMS)
PP13	20.68	5-oxo proline (2TMS)-01
PP14	20.94	5-oxo proline (2TMS)-02
PP15	21.07	aspartic acid (3TMS)
PP16	21.16	proline (3TMS)
PP17	21.72	cysteine (3TMS)
PP18	22.16	pentanedioic acid (1MEOX 2TMS)
PP19	22.82	unidentified-02
PP20	22.88	unidentified-03
PP21	23.01	glutamine (3TMS)
PP22	23.86	unidentified-04
PP23	23.96	asparagine (3TMS)
PP24	24.86	unidentified-05
PP25	25.80	unidentified-06
PP26	26.60	ornithine (4TMS)
PP27	26.78	isocitric acid (4TMS)
PP28*	28.27	glucose (1MEOX 5TMS)
PP29	28.60	galactose (1MEOX 5TMS)
PP30	28.81	glucitol (6TMS)

PP31	28.93	ascorbic acid (4TMS)
PP32	29.14	maltose (1MEOX 8TMS)
PP33	29.62	talose (5TMS)-01
PP34	29.80	unidentified-07
PP35	30.38	gulose (5TMS)
PP36	31.24	myo-inositol (6TMS)
PP37	31.34	uric acid (4TMS)
PP38	32.86	tryptophan (3TMS)
PP39	33.06	inositol 1-phosphate (7TMS)
PP40	34.03	cystine (4TMS)
PP41	34.37	unidentified-08
PP42	34.65	unidentified-09
PP43	34.78	unidentified-10
PP44*	35.81	EDTA (4TMS)

Note: *;解析から除外したピーク, TMS; トリメチルシリル (TMS) 誘導体, MEOX; メトキシム誘導体.

表 2. ニワトリ血漿の疎水性画分から検出された代謝物

Peak ID	RT (min)	Compound
LP-I.S .1	38.41	testosterone (1TMS)-01
LP-I.S .2	38.52	testosterone (1TMS)-02
LP01	8.49	unidentified-11
LP02	8.70	propionic acid (2TMS)
LP03	9.87	unidentified-12
LP04	10.16	hydroxylamine (3TMS)
LP05	11.03	unidentified-13
LP06	11.90	unidentified-14
LP07	13.52	unidentified-15
LP08	13.70	benzoic acid (1TMS)
LP09	14.23	unidentified-16
LP10	14.42	ethanilamine (3TMS)
LP11	14.74	phospholic acid (3TMS)
LP12	14.82	glycerol (3TMS)
LP13	18.14	unidentified-17
LP14	18.96	unidentified-18
LP15	19.43	unidentified-19
LP16	22.42	unidentified-20
LP17	25.07	phospholic acid (4TMS)
LP18	25.29	unidentified-21
LP19	25.62	15:0FAME
LP20	26.85	16:1FAME
LP21	26.93	16:1FAME
LP22	27.30	16:0FAME
LP23	27.68	unidentified-22
LP24	28.85	talose (5TMS)-02
LP25	29.24	16:0FA (1TMS)
LP26	29.95	18:2FAME
LP27	30.05	18:1FAME
LP28	30.43	18:0FAME
LP29	31.70	18:2FA (1TMS)
LP30	31.78	18:1FA (1TMS)-01
LP31	31.88	18:1FA (1TMS)-02
LP32	32.17	18:0FA (1TMS)
LP33	32.35	20:4FAME
LP34	32.44	20:3FAME-01
LP35	32.59	20:3FAME-02
LP36	32.86	20:2FAME
LP37	32.93	20:1FAME
LP38	33.29	20:0FAME
LP39	33.88	20:4FA (1TMS)-01
LP40	33.97	20:3FA (1TMS)
LP41	34.10	unidentified-23
LP42	34.16	20:4FA (1TMS)-02
LP43	34.45	20:2FA (1TMS)
LP44	34.51	20:1FA (1TMS)
LP45	34.86	20:0FA (1TMS)
LP46	34.97	22:6FAME-01
LP47	35.05	unidentified-24
LP48	36.35	22:6FAME-02
LP49	36.88	unidentified-25
LP50*	43.31	cholesterol (1TMS)
LP51	43.6	unidentified-26
LP52	44.27	campesterol (1TMS)
LP53	45.13	β -sitosterol (1TMS)
LP54	48.46	unidentified-27

Note: *; 解析から除外したピーク, TMS; トリメチルシリル (TMS) 誘導体, FAME; 脂肪酸メチルエステル誘導体.

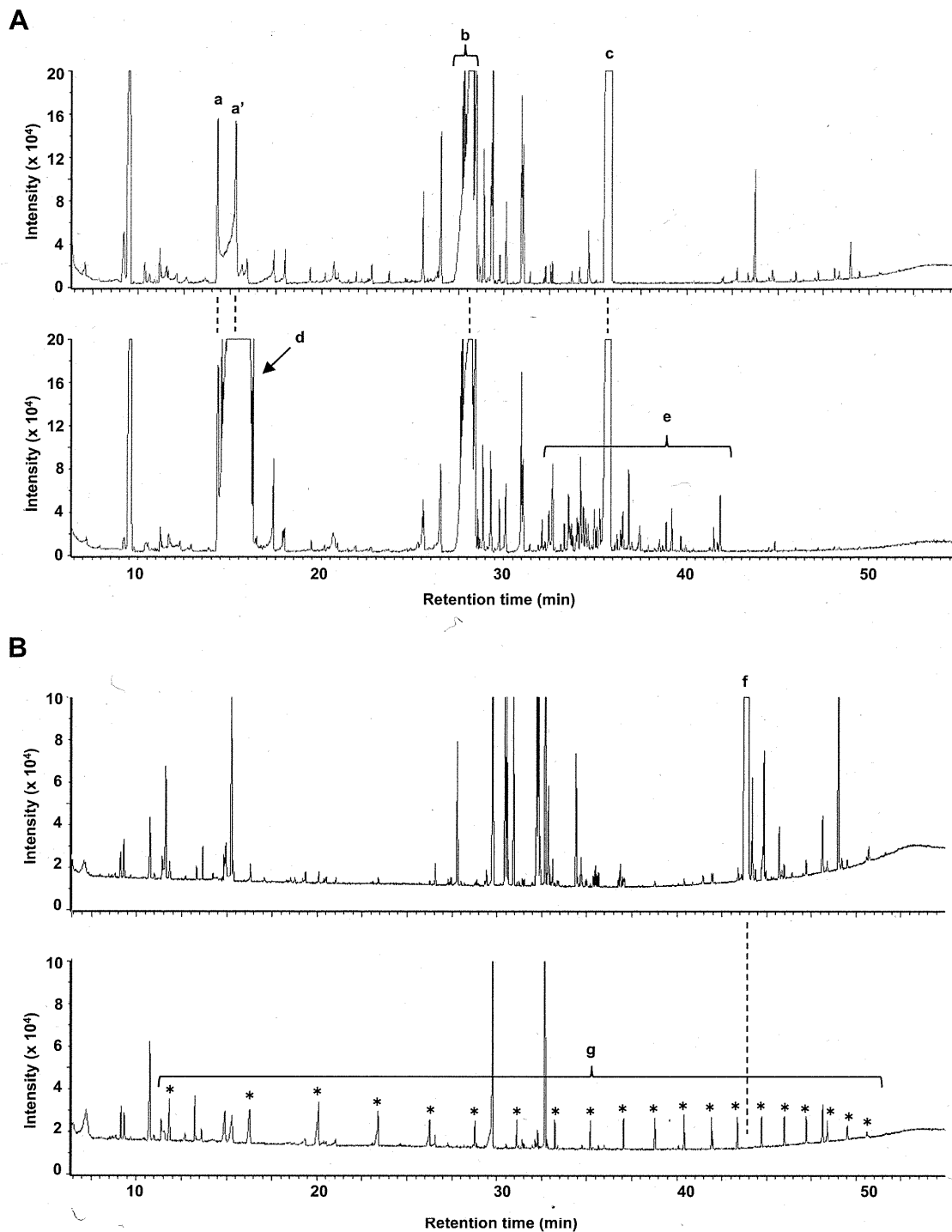


図1. 限外濾過法による除タンパク質処理の影響

A; 親水性画分の GC-TOF/MS トータルイオンカレント(TIC)クロマトグラム. 上段; 変性沈殿法のみ行った試験区, 下段; 変性沈殿法+限外濾過法を組み合わせた試験区, B; 疎水性画分の GC-TOF/MS TIC クロマトグラム. 上段; 変性沈殿法のみ行った試験区, 下段; 変性沈殿法+限外濾過法を組み合わせた試験区, a, a'; phosphoric acid (3TMS), b; glucose (5TMS)(イオンカウント飽和), c; EDTA (4TMS) (イオンカウント飽和), d; glycerol (3TMS) (イオンカウント飽和), e; 未同定ピーク群, f; cholesterol (1TMS) (イオンカウント飽和), g; 未同定ピーク群(アスタリスクで示したピーク).

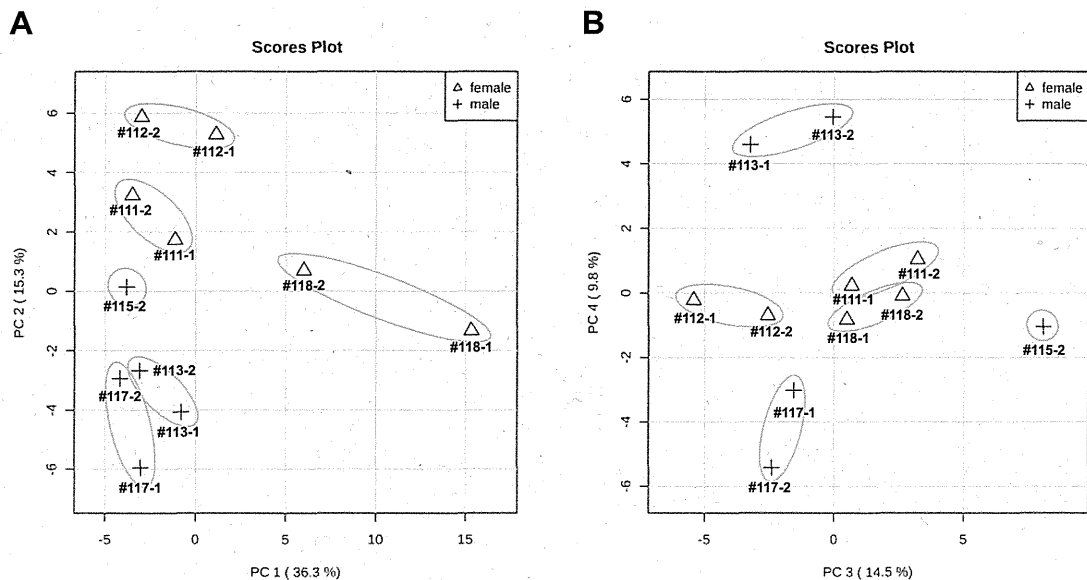


図2.#主成分分析#

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いた。データの標準化として、エクセルで個々のピーク面積値を内部標準物質のピーク面積値に対する相対値に換算し、欠損値の補填(他サンプルの平均値の 1/2 の値)、スケーリング(auto scaling)を行った。A; PC1 と PC2 の主成分スコアの二次元プロット図, B; PC3 と PC4 の主成分スコアの二次元プロット図。雌個体(#111, #112, #118)は三角で、雄個体(#113, #115, #117)は十字で示した。

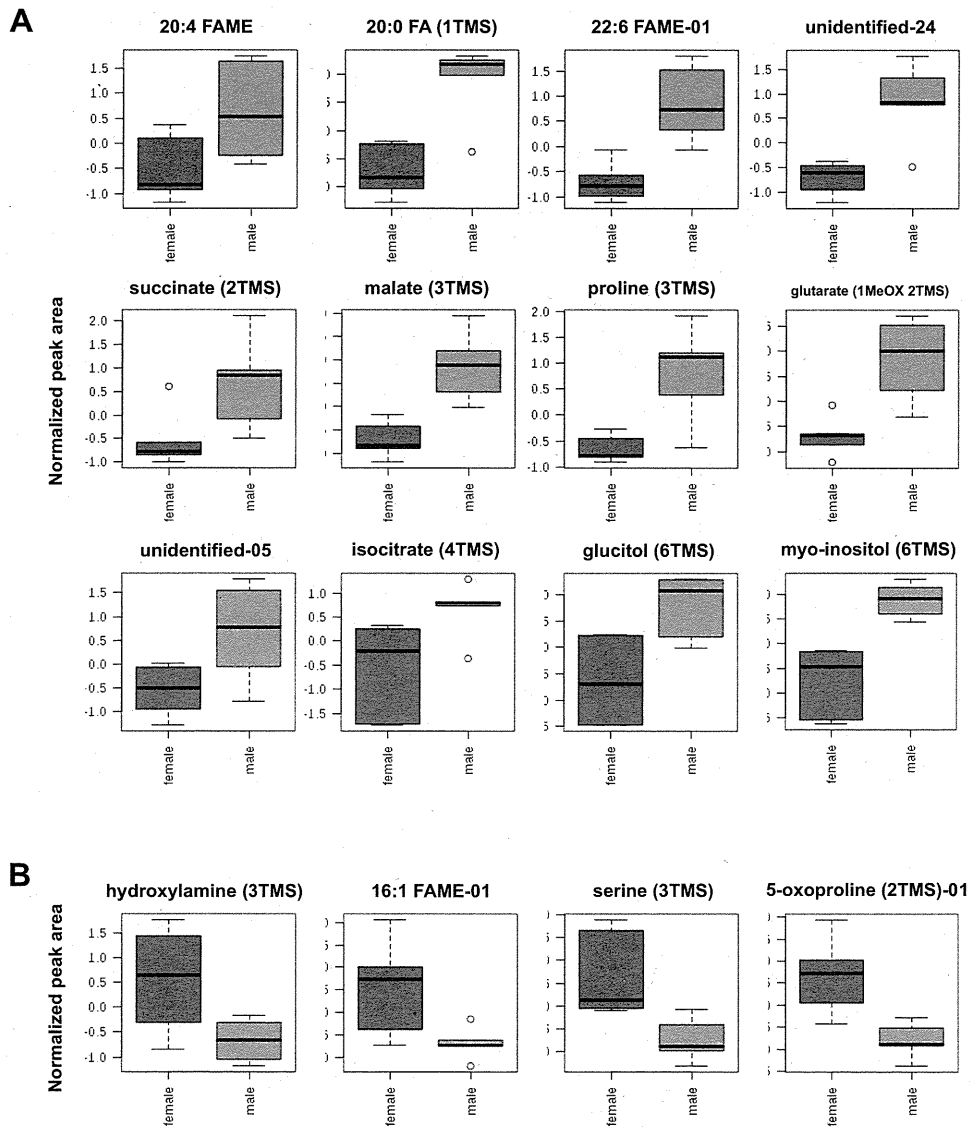


図3. 雌雄間の蓄積レベルに有意な差がみられた代謝物

A: 雄グループにおいて蓄積レベルが高かった代謝物, B: 雌グループにおいて蓄積レベルが高かった代謝物. TMS;トリメチルシリル(TMS)誘導体, FAME;脂肪酸メチルエステル誘導体.

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 ニワトリのモデル組換え体の作出

研究分担者	堀内 浩幸	(広島大学生物圏科学研究科・教授)
研究協力者	小関 良宏	(東京農工大学工学研究院・教授)
	太田 大策	(大阪府立大学生命環境学研究科・教授)
	手島 玲子	(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員 徳島文理大学香川薬学部・特任教授)

研究要旨

この研究では、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。

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方、遺伝子組換え動物では、水域における魚類においてアメリカ食品医薬品局 (FDA) の認可がおり、いよいよ流通の段階まできている。陸域の遺伝子組換え動物は、既に医薬品において組換え動物由来の医薬品が複数 FDA により認可され、日本でも遺伝子組換えニワトリの鶏卵で製造された組換え酵素製剤の認可が了承されたところである。今後は、ゲノム編集技術を中心とした遺伝子改変動物由来の食品開発が加速することも予想され、その対策が急務であると思われる。

そこで本研究では、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、遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出試験を行なうと伴に、各オミクス解析（メタボローム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析）における個体差や雌雄差を明らかにするために、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、研究協力者への試料提供を行なった。

B. 研究方法

- (1) 外来遺伝子導入ニワトリの作出
外来遺伝子導入ニワトリを作出するため

に、複製欠失レンチウイルスベクターに ZsGreen (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子を組込んだ組換えウイルスを作出した。作出した組換えウイルスは、横斑プリマスロック種の受精卵から回収した始原生殖細胞 (PGC) を *in vitro* で培養し増殖させたものに感染させた。培養 PGC で ZsGreen の蛍光を確認後、白色レグホン種由来受精卵の初期胚に ZsGreen 発現 PGC を移植した。移植した胚の一部は、孵卵 10 日目に剖検により生殖腺を取り出し、蛍光観察により ZsGreen 発現 PGC の移動能を確認した。また、残りは孵卵を続け、ZsGreen 導入生殖系列キメラニワトリを孵化させた。

(2) ゲノム編集ニワトリの作出

ゲノム編集ニワトリの作出では、アレルゲン遺伝子を標的に作出した transcription activator-like (TAL) effector nuclease (TALEN) 発現ベクターをニワトリ多能性幹細胞の候補であるエピブラスト由来幹細胞 (epiSC) に導入して行なった。TALEN 発現ベクターを導入した epiSC は、ノックアウト変異導入を確認後、限界希釈法によりクローニングを行い、アレルゲンノックアウト epiSC を樹立した。樹立したアレルゲンノックアウト epiSC は、白色レグホン種由来受精卵の初期胚に移植し、キメラニワトリを孵化させた。

(3) 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

1-2 ヶ月齢の横斑プリマスロック種ニワトリ (雄 3 羽と雌 3 羽) から、採血を行い、遠心分離によりそれぞれ血漿を回収した。また採血した血液は、37°C で一時間固化させた後、4°C で一昼夜静置し、その後遠心分離により血清を回収した。また白血球の分離では、採血した血液を PBS (-) で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque を用いた密度勾配遠心法 (740 G, 10 分) により白血球を回収した。回収した白血球は全 RNA 単離キット (RNeasy, QIAGEN) により全 RNA を単離した。

倫理面への配慮

組換え DNA 実験に関しては、カルタヘナ法のもと、広島大学が定める組換え DNA 実験安全管理規則に従い、研究計画書を提出し、広島大学長より承認を受けて行なった (承認番号: 27-69, 27-99)。

動物使用実験に関しては、広島大学動物実験実施規則も従い研究計画書を提出し、広島大学長より承認を受け (承認番号: C11-29), この規則に従い適切に行なった。

研究倫理教育は、平成 27 年 12 月 21 日に広島大学において開催された理工農系の研究者を対象とした研究倫理教育 FD により受講を済ませている。

C. 研究結果

(1) 外来遺伝子導入ニワトリの作出

外来遺伝子導入ニワトリの作出では、高力価の ZsGreen 導入組換えレンチウイルスの作出に成功した。この組換えウイルスを培養 PGC に感染させたところ、多くの PGC で ZsGreen の蛍光が観察された (図 1)。次に、この PGC を初期胚に移植し孵卵 10 日後に生殖腺を回収し、蛍光観察したところ、ZsGreen を発現する PGC が生殖腺内に定着していることがわかった (図 2)。またその確立は、全移植胚の 60-70% の割合であった。最終的に移植胚から 4 羽の ZsGreen 導入生殖系列キメラニワトリを孵化させた。

(2) ゲノム編集ニワトリの作出

TALEN による epiSC のノックアウトでは、最終的に 2 種 (1 塩基挿入と 5 塩基欠失によるフレームシフト) のアレルゲンノックアウト epiSC 株が樹立できた。樹立した株は、初期胚に移植し孵化させ、19 羽のキメラニワトリを作出した (図 3)。このうち 9 羽が性成熟したことから、人工授精により交配試験を行なった。これまでに 340 羽の子孫を孵化させたが、epiSC 由来の表現型をもつ個体は得られなかった。

(3) 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

分離した血漿は、メタボローム解析用とし、研究協力者へ分与した。また同様に、分離した血清はプロテオーム解析用とし、研究協力者へ送付した。白血球由来 RNA は、高純度の RNA が単離されたことから、トランスクリプトーム解析用に研究協力者へ送付した。

D. 考察

平成 27 年度は、当初予定していた計画をほぼ全て完了することができた。モデルニワトリの作出試験では、平成 28 年度以降に実施する遺伝子改変ニワトリのオミクス解析に利用する十分量の個体数が確保できた。さらに ZsGreen 導入ニワトリは継続して作出して行く予定である。ゲノム編集ニワトリでは、今のところヘテロノックアウト(生殖系列第 2 世代)が誕生していないが、まだ試験数が少なく、供試数を増加させることで、ゲノム編集ニワトリの作出も可能と考える。さらに、確実にゲノム編集ニワトリを作出するために、培養 PGC を標的としたゲノム編集にも着手したところである。

組換え動物をオミクス解析等により、評価する際、個体差を如何にデータに反映させ補正するかは、極めて重要であり、データの変動が個体差によるものなのか、それとも遺伝子の改変によるものなのかを明らかにする必要がある。またこれは雌雄差によっても生じるものであり、このデータの蓄積は必須である。本年度得られたデータは、平成 28 年度以降の解析に極めて有用であると考えられる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報
異常なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1) 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)

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。

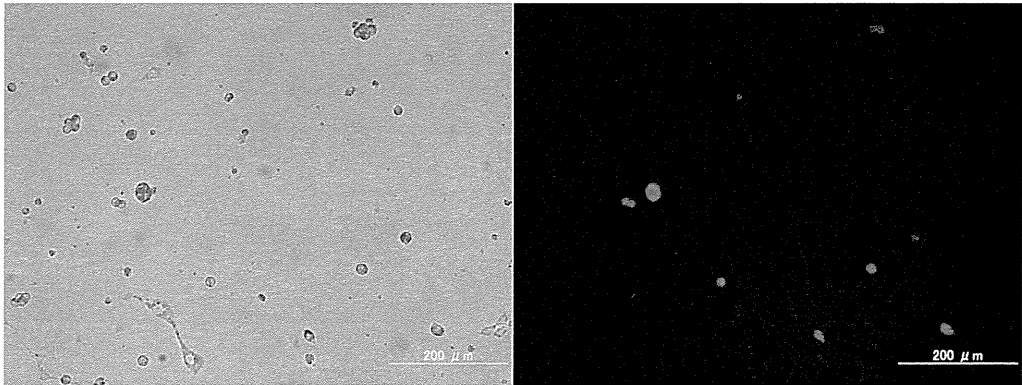


図1 組換えウイルスを感染させた培養PGC

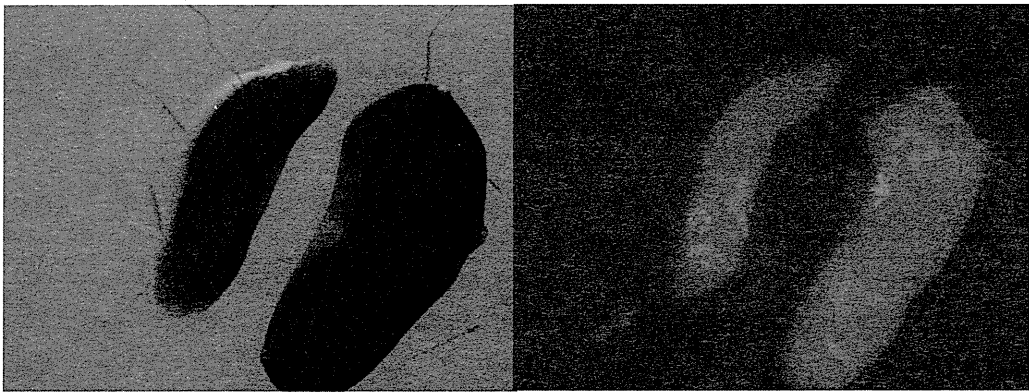


図2 ZsGreen導入PGCを移植した胚(孵卵10日)の生殖腺

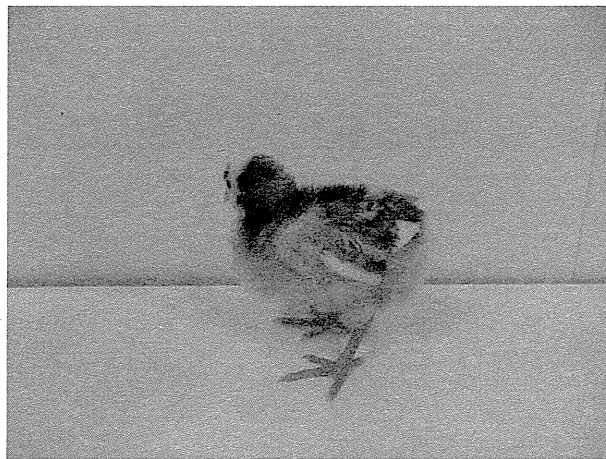


図3 アレルゲンノックアウトキメラニワトリ

平成 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）
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

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

研究分担者 今村 知明 奈良県立医科大学 教授
協力研究者 岡本 左和子 奈良県立医科大学 学内講師
宮本 麻央 神戸大学理学研究科生物学専攻 修士課程
Graduate Student,
Department of Biomedical Visualization,
University of Illinois at Chicago

研究要旨

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。

本研究では、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。

A. 研究目的

GM 食品に対する日本の消費者の意識の特徴として、実際のリスクは明確に認識していない一方で、摂食意向は低い。リスク認知と受容の乖離によって大きいねじれ現象が発生している。これは、これまでの当研究分担者による研究結果から、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る。その特殊な状況下ではリスクコミュニケーションを進めることで、改善または理解を得る一助に

なる。

また、NBT のような従来の GM とは異なる特徴を持った技術も登場してきている。リスクコミュニケーションも複雑化してきており、より一層慎重を期し、新たなコミュニケーションロジック、手法の開発が求められている。一方で、NBT の種類によっては、消費者が従来の GM 技術に対する受容性とは異質の傾向を示す技術もある。これら NBT が持つ特徴は、消費者とのコミュニケーションの突破口となる可能性もあ

る。

本研究では、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 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を開発する目的で、3 か年で以下の研究を実施することとする。(図 1)

B. 本研究の内容

I. 最先端の GM 技術の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出 (初年度)

- ・最先端の GM 技術について整理するとともに、アンケート調査により最先端の GM 技術の特徴 (外来遺伝子がない、検知が不可能等) に対する消費者の意識を把握し、コミュニケーションを行う上での問題点と解決策を探る。

II. 新たな説明ロジック及び説明ツールの開発 (初年度～二年目)

- ・最先端の GM 技術動向に合わせた説明ツールを開発する。

III. 先進国や食品以外の分野における事例調査 (初年度～最終年度)

- ・先進諸国 (EU、米国、豪州) や環境・医療等の分野における最新の GM 技術の扱いや、食品安全審査の状況について調査する。

IV. リスクコミュニケーション手法の開発 (最終年度)

- ・アンケート調査による GM 作物に対する消費者の最新の受容性や調査や、開発した説明ツールの検証を行う。

I. 最先端の GM・NBT 技術の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出

生物学の分野では、近年目覚ましいスピードで多くのことが明らかになっており、技術も日進月歩で進化している。特に、高校の生物では、この 20 年間で指導内容が急増しており、消費者のリテラシーに、生物の履修状況や教育を受けた時期による差が生じていると考えられる。

今年度は、現指導要領 (平成 21 年 3 月告示)、旧指導要領 (平成 11 年 3 月告示)、旧々指導要領 (平成元年 3 月告示) について、教科書で網羅されている項目について比較し、履修状況や年代によるリテラシーの違いによる GM 技術と GM 食品への理解と受容の可能性について整理した。

I-1. 研究方法

現指導要領 (平成 21 年 3 月告示)、旧指導要領 (平成 11 年 3 月告示)、旧々指導要領 (平成元年 3 月告示) の東京書籍の生物の教科書の遺伝子や GM に関する指導内容について、比較を行った。また参考として、現指導要領と旧指導要領については、入手できた数研出版の資料集についてもその内容を整理した。

I-2. 研究結果

(1) 年代別の違いについて

GM に関する指導内容について、年代別の比較を行った。理系で生物選択者が履修する教科書の比較で、平成元年 3 月に公示された旧々指導要領の生物 II では、24 項目であった指導内容が、平成 21 年 3 月公示の現指導要領では 61 と、ほぼ 2.5 倍に増加している。なお、項目自体は平成 11 年 3

月公示の旧指導要領の方が63と最も多くなっているが、うち9項目はバイオテクノロジーの科学技術倫理に関する問題であるため、技術的内容では最新の教科書が最も充実している。(表1、表2)

項目ごとにみると、遺伝子発現の仕組み、GMに関する記載事項が、最も増えている。遺伝子、DNAに関する基礎的知識、DNA複製の仕組み等、基本的な内容についてはあまり変わっていない。

また、項目数の差は旧々指導要領と旧指導要領の間で最も大きく、旧々指導要領の24項目から、旧指導要領では63項目となっている。バイオテクノロジーの問題に関する9項目を除く科学技術に関する内容は54項目と、2倍以上に増えている。

技術自体の是非を問うような、科学技術倫理に関する内容については、旧指導要領の教科書のみに記載があり、現指導要領では削除されている。現指導要領での教科書は、科学的事実のみの記載となっている点が特徴である。

(2)履修状況の違いについて

文系、理系等の科目選択や受験科目の選択によって、高校での生物の履修状況は異なる。受験科目の選択によっては、高校でまったく生物の授業を受けずに卒業することが可能となっている(表3)。2002年度の大阪市立大学の入学者1417名を対象とした調査¹では、特に理系の専門科目としての生物の履修率は20%余りで、地学よりは高いが、化学や物理より低くなっている。

また、現指導要領で比較すると、もっとも初歩的な教科書となっている新編生物基

礎で19項目、理系の生物選択者が使用するもっとも詳しい教科書で61項目と、3倍以上の違いがある。(表2)

I-3. 考察

平成元年以降の20年間余りで、高校の生物の授業で教えられるGM技術に関する内容は、大きく増加している。特に、旧指導要領で授業を受けた平成27年時点で20~28歳と、29歳以上の世代では、大きくその内容が異なっておりGMのメカニズムを理解するために必要な基礎的知識に差があると考えられる。(表4)

必須の理科の授業で教えられている生物では、遺伝子やGM技術に関する内容は含まれないため、遺伝子に関する授業をまったく受けずに高校を卒業することも可能である。

また、近年、大学受験において生物系の学部(医学部など)を受験する場合でも、受験科目として生物が必須でないケースは増えてきている。一般に、理系の進路を志望する学生の科目選択においては、化学と物理を選択する方が進路選択の幅が広がるため、明確に進路が定まっていない高校生の時点では、選択が広がる化学と物理を選択し、結果的に生物系の学部に進学して、大学で改めて生物学を勉強するケースも多いことが分かった。

II. 新たな説明ロジックおよび説明ツールの開発

遺伝やバイオテクノロジーに関するリテラシーに、その基礎的な知識の有無が影響を与えると考えられる。現在の高校生物の教科書では、GM技術に関してかなり高度な内容が含まれており、高校レベルの生物

¹ 大久保敦(2010)「高校大学7年間を通じた科目履修実態調査(自然科学系科目・社会科学系科目)」、『大学教育』第7巻第2号, pp.45-48, 大阪市立大学

の知識があれば、GM 技術の基礎的な理解ができると考えられる。

一方で、生物は必修科目ではなく、すべての人が履修しているわけではないため、高校までの教育課程において、学習指導要領の変化や選択科目の違いにより、GM 技術についての学習状況に差が生じ、GM 食品の受容性に影響を与えている可能性がある。また、必要な知識があっても GM 食品の理解のためには、複数の単元の知識を結び付けて考える必要がある内容もあり、個人の論理的思考能力も大きく影響する。例えば、GM 食品を摂取しても、消化吸収される過程で、DNA も含めてタンパク質や脂肪、糖、アミノ酸等に分解されるため、組み換えられた DNA はそのままの形で体内に残存しないことが理解できれば、non-GM 食品と GM 食品に安全性の差はほとんどないと判断に結び付くが、これは DNA の構造に加え、消化吸収メカニズムの知識も結び付けないと、判断できない事項である。

以上を踏まえ、本研究では、GM の単元と、消化吸収の単元の知識を組み合わせ、GM 食品の消化の仕組みを理解できるかを確認するための説明ロジックおよび説明ツールの素案を調査、検討した。今後、説明ツールの開発につなげる予定である。

本研究では、この説明ツールの検証および、前述の「1. 最先端の GM 技術・NBT の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出」における高校生物の教科書の調査で明らかになった、年代別、生物の履修状況別の国民の GM 技術に関する基礎的リテラシーの違いについて、実態を把握するため、高校までの教育課程で GM 技術の学習状況、その内容の定着状況、および GM 技術および食品の受容性に対する影響について、アンケート調査を行った。

II-1 研究方法

(1) 説明資料の作成

近年、新しい植物育種技術 (New Plant Breeding Technologies, NBT) の普及が急速に進んでいる。一方で、NBT については消費者に十分な説明はなされておらず、従来の遺伝子組換え技術である GM 技術と NBT との違いが消費者に理解されているとは言い難い。

このまま消費者に対して十分な説明がなされないまま技術が普及すると、製品化・商業化の段階で GM 食品と同じような強い抵抗にあい、実用化の阻害となる恐れがある。

平成 26 年度の研究において、NBT 及びセルフクロニング、ナチュラルオカレンスに関する消費者コミュニケーションを推進するためのツールとして、文章だけの説明文を作成していたが、文章のみでは分かりにくいとの意見を受け、イラストを試作した。

試作版のイラストについては、研究班メンバーや厚生労働省によるレビューを実施し、複数回の修正を行った。

イラストの修正履歴については、表 5 を参照されたい。

また、今年度、新たに GM 食品の消化メカニズムに関するイラストを交えた説明ツールを、一般消費者に分かりやすく作成した。消化メカニズムを踏まえ、組み換えられた遺伝子が体内に残存しないことを説明することとした。

(2) アンケート調査

今後、今回作成した説明ツールを用いて、一般消費者に対する Web アンケートを実施する。Web アンケートの実施要領は下記のとおりである。