

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
平成 28 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 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：

本研究では、バイオテクノロジーによって改変された生物のメタボローム解析を実施し、食品の安全性評価のための基礎データとすることを目的としている。平成 28 年度は、食品や医薬品への応用研究が進められているニワトリをモデルとし、外来遺伝子が導入されたニワトリの代謝プロファイル解析を実施した。分析には、緑色蛍光タンパク質（ZsGreen）遺伝子が導入された遺伝子組換えニワトリ（組換え体）、並びに非組換え体ニワトリ（非組換え体）から採取した血漿を用いた。組換え体、および非組換え体それぞれのグループから 4 個体ずつ（1 ヶ月齢の雌個体、採血前 1 日間絶食）を選び、各個体から 1 回ずつ採血した。採血後の血液を、抗凝固剤（エチレンジアミン四酢酸）存在下で遠心分離して得た血漿を分析に供した。血漿試料は、除タンパク処理後、極性画分と非極性画分に分画し、それぞれの画分に含まれる代謝物質は、ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計（GC-TOF/MS）により網羅的に測定した。質量分析データ（トータルイオンカレント）の解析によって、222 個の検出シグナルを代謝物質由来のピークとして特定した。各代謝物質ピークのマススペクトルおよびカラム保持指標情報を基にして、222 個の代謝物質由来ピークから 125 個の代謝物質名を同定した。

供試サンプルにおいて共通に検出された代謝物質由来ピーク（222 個）の相対蓄積量を基にして主成分分析を行った。第一主成分（寄与率 34.4%）と第二主成分（寄与率 11.7%）の主成分スコアの二次元プロットでは、組換え体と非組換え体を区別する明確なクラスター分離は認められなかった。組換え体と非組換え体において特定した代謝物質由来ピークの相対蓄積量を t 検定を用いて検定したが、何れの代謝物質ピークにおいても 2 倍以上の有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。本年度の実験では、組換え体と非組換え体でのグループ間の比較において、血漿中代謝物質含有量の差は認められないと結論した。

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。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、高い生産性が保証されていることや、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も可能であることなど、優れた点が挙げられる。一方、これらの生物種を遺伝子改変の対象として開発・利用する際には、安全性に関わる品質管理や生産段階での

環境保全など、多くの課題が残されている。

ニワトリの遺伝子組換えによって、鶏卵中に生理活性を持つ低分子化合物や経口ワクチンなどのタンパク質医薬品を蓄積させる試みが注目されている。鶏卵構成成分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。卵黄成分は、肝臓から血流によって卵細胞まで運ばれる。一方、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生理的な状態と密接な関係にある。すなわち、ニワトリ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には、鶏卵中の代謝物質の種類と含有量の包括的な情報が安全性評価における必須である。

本研究では、メタボロミクスを改変生物における代謝物質の網羅的解析に適用し、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、外来遺伝子が導入されたニワトリ改変体の代謝プロファイル解析を実施した。

B. 研究方法

(i) 供与試料

緑色蛍光タンパク質 (ZsGreen) 遺伝子が導入された遺伝子組換えニワトリ (組換え体)、並びに非組換え体ニワトリ (非組換え体) から血漿を調製した (広島大学大学院堀内浩幸教授)。採血個体の性別は雌、月齢は 1 ヶ月とし、組換え体の 4 個体 (個体番号: T45, T53, T54, T75)、並びに非組換え体の 4 個体 (個体番号: W43, W51, W55, W76) を用いた。採血個体は採血前 1 日間絶食させた。血液の抗凝固剤は、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。

(ii) 除タンパク質

血漿試料からの除タンパク質は、タンパク質変性沈殿法と除タンパク質フィルタを用いた方法を組み合わせて行った。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。ここに血漿試料を 0.2 mL 加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、 -40°C で 30 分間静置した (メタノール終濃度 50%)。その後、 4°C 、14,000 xg、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。回収した上清は、除タンパク質用の Captiva フィルタ (Agilent Technologies 社) を通過させ、濾液を回収し、冷却遠心濃縮器を用いて乾固した。除タンパク後の乾固試料は温度を -

80°C で保存した。

(iii) 溶媒抽出・分画・誘導体化

溶媒抽出、分画、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遊離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 methyl ester; FAME) 誘導体として、遊離脂肪酸はトリメチルシリル (TMS) 誘導体として検出される。溶媒抽出には、メタノール/クロロホルム/2% 酢酸の混合溶媒に、内部標準物質として、テストステロン ($4\ \mu\text{g/ml}$) とリビトール ($1\ \mu\text{g/mL}$) を加えたものを用いた。溶媒抽出後の抽出液は、液液分配によって分画し、水-メタノール相 (極性画分) とクロロホルム相 (非極性画分) を得た。非極性画分を乾固させた後、ナトリウムメトキシド存在下、 55°C で 90 分間反応させ、試料中のエステル化脂肪酸をメチルエステル体へと変換した。各画分に含まれる化合物のトリメチルシリル化には、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた。誘導体化反応後の試料は、直ちに分析に供した。各サンプルに対して 2 反復で誘導体化を行い、それぞれを分析に供した。

(iv) GC-TOF/MS

誘導体化試料の計測には、ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析装置 (GC-TOF/MS) を用いた。注入口温度は 230°C (cold trap splitless mode) に設定した。GC の分離には HP-5MS capillary column ($30\ \text{m} \times 0.25\ \text{mm} \times 0.25\ \mu\text{m}$) (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 $1.0\ \text{mL/min}$ 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 ($70\ \text{eV}$) で行い、質量範囲は m/z 40-650 とした。試料注入量は $1\ \mu\text{L}$ とした。

(v) ピーク抽出・同定

GC-TOF/MS を用いて取得したトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムからのイオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには

MetAlign²⁾を、ピークデコンボリューションとピーク同定には AIoutput³⁾ を使用した。ピーク同定には、標準品の実測データを格納したインハウスのマススペクトルライブラリを用いた。データ解析の手順は Fig. 3 に示した。

(vi) 統計解析

主成分分析および Student's *t*-test は、MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.Metaboanalyst.ca/>) を用いて行った。主成分分析のデータ標準化方法は auto scaling を選択した。Student's *t*-test は、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。

- 1) Furuhashi et al., *Metabolomics*, **11**, 175-183 (2015)
- 2) De Vos et al., *Nat. Protoc.*, **2**, 778-791 (2007)
- 3) Tsugawa et al., *BMC Bioinformatics*, **12**, 131 (2011)

C. 研究結果

TIC クロマトグラムをグループ間で比較したところ、極性画分 (Fig. 1), 非極性画分 (Fig. 2) ともに顕著な違いは認められなかった。MetAlign を用いて質量分析データを解析し、極性画分からは 8167 種類、非極性画分からは 3006 種類のイオンピークを検出した。続いて、AIoutput を用いてこれらのイオンピークをデコンボリュートした。極性画分と非極性画分由来のイオンピークは、それぞれ、121 種類と 106 種類に統合された (代謝物質候補ピーク)。各代謝物質候補ピークのマススペクトルおよびカラム保持指標と、インハウスのマススペクトルライブラリに格納されている標準品の実測データ (マススペクトルおよびカラム保持指標) との類似性を基にして代謝物質由来ピークを特定した。内部標準物質として抽出溶媒に加えたリビトール, テストステロン, および、血液の抗凝固剤として使用した EDTA を代謝物質候補ピークのリストから除き、残りを代謝物質ピークとした。代謝物質ピーク数は、極性画分では 118 種類、非極性画分では 104 種類であった。これらのうち、極性画分では 77 種類 (Table 1), 非極性画分では 48 種類 (Table 2) の代謝物質を

同定できた。各代謝物質ピークのピーク面積値を同一の TIC クロマトグラム中の内部標準物質 (リビトールあるいはテストステロン) のピーク面積値で割り、相対面積値を算出した。

多変量データが持つ特徴を要約するために、主成分分析を行った。主成分分析は、Table 1 と Table 2 に示した同定ピークに対して実施した。分析前処理の 2 回の反復操作に由来する 2 種類の測定データは、平均化せずにそのまま用いた。第一主成分 (寄与率 34.4%) と第二主成分 (寄与率 11.7%) の主成分スコアの二次元プロットからは、組換え体、および非組換え体の明確なクラスター分離は認められなかった (Fig. 4)。

組換え体と非組換え体の間で、各代謝物質ピークのレベル差の有無を検定したところ、全ての代謝物質ピークにおいて 2 倍以上の有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。なお、非極性画分から検出された代謝物質ピークのうち 1 種類 (ピーク番号 N102, 未同定ピーク) については、レベル差が 2 倍以下 (fold-change = 0.74, 組換え体/非組換え体) ではあるものの、有意差が認められた (Table 3; $p = 0.012$, FDR = 0.98)。

D. 考察

緑色蛍光タンパク質 (ZsGreen) 遺伝子発現ニワトリ (組換え体), 並びに組換え体の母本ニワトリ (非組換え体) の血漿を用いて、含有代謝物質レベルの網羅的比較解析を行ったところ、主成分分析では両者を明確に区別するようなクラスター分離は見られず、また、グループ間で 2 倍以上の有意差を示す代謝物質ピークは認められなかった。これらの結果から、ニワトリ血漿中の代謝物質含有量は、ZsGreen 発現によって影響されることは無かったと考えられる。

E. 結論

血漿中代謝物質含有量については、組換え体と非組換え体のグループ間の比較において、今回の標本数 ($n = 4$) で検出できる差は、認められなかった。今後、血漿に加え、ZsGreen 発現が認められる細胞を含む臓器や組織を材料とし、多検体の

プロファイリングによってさらに高い精度の代謝活性評価が可能である。

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. (2016) *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **23**, 9-19.

2. 学会発表

- 1) 小川拓水, 鹿島光司, 幸義和, 岡澤敦司, 清野宏, 太田大策, コメ型経口ワクチン MucoRice-CTB のメタボローム解析, 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会 2016 年 9 月 (上田)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

Table 1. 極性画分の同定ピーク一覧

Peak ID	RI	QuantMS	Compound name
P001	1100.2	73	Alanine
P002	1103.2	73	Alanine
P004	1183.9	75	7:0 FA
P008	1226.0	144	Valine
P009	1227.0	144	Valine
P010	1228.5	144	Valine
P011	1232.1	144	Valine
P014	1261.5	174	Beta-Alanine
P015	1265.1	174	Beta-Alanine
P016	1266.1	174	Beta-Alanine
P018	1276.8	299	Glucose-1-phosphate
P019	1277.8	174	Beta-Alanine
P020	1278.3	299	Phosphoric acid
P022	1279.9	174	Beta-Alanine
P023	1282.9	299	Glucose-1-phosphate
P024	1289.0	158	Leucine
P025	1289.5	299	Glucose-1-phosphate
P026	1294.1	299	Glucose-1-phosphate
P027	1297.1	73	Glycerol
P028	1297.6	147	Glycerol
P029	1298.6	158	Leucine
P030	1301.9	158	Isoleucine
P031	1302.5	73	Threonine
P032	1303.1	158	Isoleucine
P033	1306.5	158	Isoleucine
P034	1309.3	73	Threonine
P035	1309.9	158	Isoleucine
P036	1313.3	174	Glycine
P037	1315.0	73	Threonine
P038	1316.1	147	Succinate
P039	1319.6	174	Glycine
P040	1328.1	147	Succinate
P041	1353.8	147	Itaconate
P042	1361.1	245	Fumarate Acid
P045	1432.1	74	11:0 FAME
P054	1497.3	147	Malic Acid
P055	1499.8	73	Malic acid
P057	1512.1	73	Malic acid
P058	1514.1	156	5-Oxoproline
P059	1516.2	156	5-Oxoproline

Peak ID	RI	QuantMS	Compound name
P062	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid
P063	1528.4	156	5-Oxoproline
P066	1533.8	156	5-Oxoproline
P067	1534.5	232	Aspartic acid
P068	1542.7	232	Aspartic acid
P069	1550.2	232	Aspartic acid
P070	1576.0	73	Alpha-ketoglutaric acid
P071	1597.1	73	Alpha-ketoglutaric acid
P073	1621.0	218	Phenylalanine
P074	1630.5	218	Phenylalanine
P076	1639.3	218	Phenylalanine
P079	1771.3	147	Aconitic acid
P080	1793.6	156	Glutamine
P082	1830.7	142	Ornithine
P083	1834.7	142	Ornithine
P084	1840.5	142	Ornithine
P085	1851.9	273	Citric acid
P087	1930.4	73	Glucose
P088	1933.9	73	Glucose
P089	1936.3	319	Glucose
P091	1943.2	319	Glucose
P095	1959.3	73	Mannitol
P096	1980.5	73	Ascorbic acid
P097	1981.4	205	Ascorbic acid
P098	2040.2	313	Palmitic acid
P099	2044.7	313	Palmitic acid
P100	2051.0	117	16:0 FA
P104	2125.3	305	Myo-Inositol
P105	2130.0	73	Myo-Inositol
P106	2239.5	202	Tryptophan
P107	2249.1	117	18:0 FA
P114	2713.2	361	Sucrose
P115	2813.6	69	Squqlane
P116	2819.6	69	Squqlane
P117	2826.8	69	Squqlane
P118	2832.7	69	Squqlane
P119	2836.3	69	Squqlane

RI; リテンションインデックス, QuantMS; ピーク面積値の算出に使用したイオン, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

Table 2. 非極性画分の同定ピーク一覧

Peak ID	RI	QuantMS	Compound name	Peak ID	RI	QuantMS	Compound name
N001	1101.4	73	Alanine	N055	1941.4	319	Glucose
N006	1172.9	75	7:0 FA	N056	2000.0	71	Icosane
N012	1259.5	116	Serine	N058	2040.2	313	Palmitic acid
N013	1261.6	174	Beta-Alanine	N059	2051.9	117	16:0 FA
N014	1266.1	174	Beta-Alanine	N061	2095.6	81	18:2 FAME
N015	1270.2	174	Beta-Alanine	N062	2101.0	71	Henicosane
N018	1279.9	174	Ethanol amine	N063	2101.9	74	18:1 FAME
N019	1281.4	299	Glucose-1-phosphate	N064	2107.6	74	18:1 FAME
N021	1283.9	299	Glucose-1-phosphate	N065	2122.6	74	18:0 FAME
N022	1290.0	299	Glucose-1-phosphate	N066	2129.1	74	18:0 FAME
N023	1293.6	299	Phosphoric acid	N067	2150.7	327	17:0 FA
N024	1297.1	205	Glycerol	N068	2162.9	327	Margarate
N026	1316.2	174	Glycine	N069	2216.6	75	Linoleic acid
N027	1319.6	174	Glycine	N076	2250.9	341	18:0 FA
N031	1369.1	215	9:0 FA	N077	2260.5	79	20:4 FAME
N039	1497.3	85	Pentadecane	N078	2278.7	79	20:3 FAME
N041	1518.2	156	5-Oxoproline	N079	2347.3	117	19:0 FA
N043	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid	N083	2446.3	117	20:0 FA
N044	1533.8	156	5-Oxoproline	N084	2453.6	79	22:6 FAME
N046	1550.2	232	Aspartic acid	N085	2468.3	79	22:6 FAME
N049	1711.5	71	Heptadecane	N098	3156.2	502	α -tocopherol
N050	1799.8	71	Octadecane	N101	3164.2	329	Cholesterol
N051	1854.3	285	14:0 FA	N103	3266.0	129	Campesterol
N053	1927.0	74	16:0 FAME	N104	3355.4	129	Sitosterol

RI; リテンションインデックス, QuantMS; ピーク面積値の算出に使用したイオン, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

Table 3. 群間の比較において有意差が見られた代謝物

Peak ID	Compound_Name	<i>t</i> test		Fold-change (TG/WT)
		<i>p</i> value	FDR	
N102	Unknown	0.0120	0.98	0.74

FDR; false discovery ratio, TG; 組換え体, WT; 非組換え体

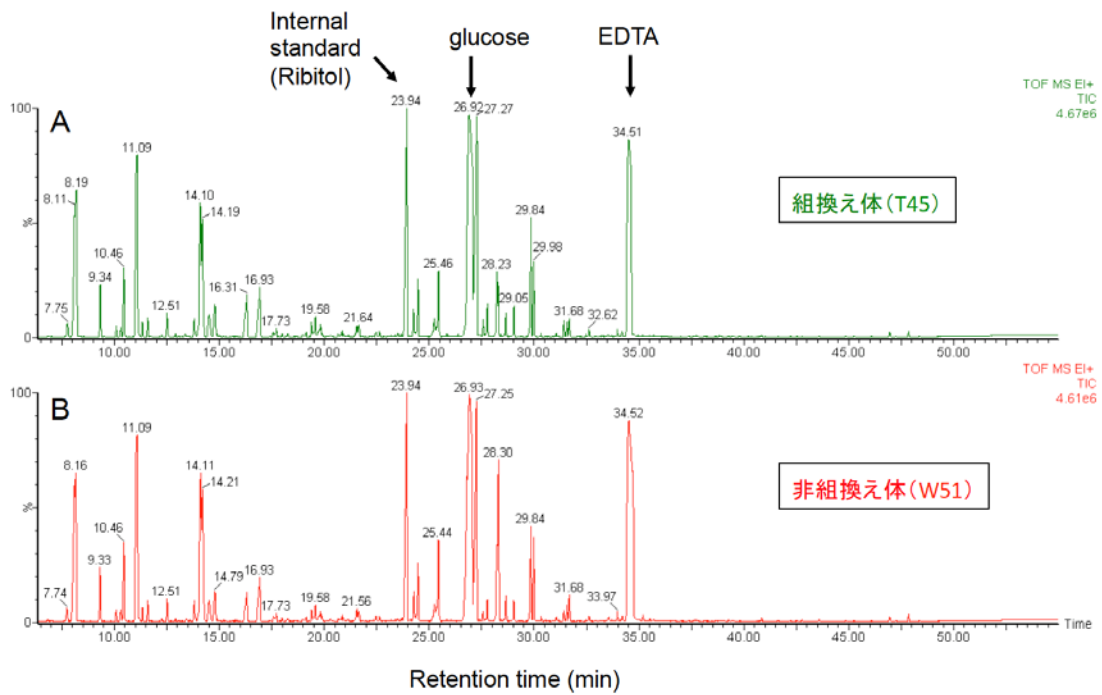


Fig. 1. ニワトリ血漿から調製した極性画分の GC-TOF/MS トータルイオンカレントクロマトグラム (A) 組換え体(個体番号 T45)。 (B) 非組換え体(個体番号 W51)。 EDTA; エチレンジアミン四酢酸。 EDTA は血液を採取するときに抗凝固剤として添加した。

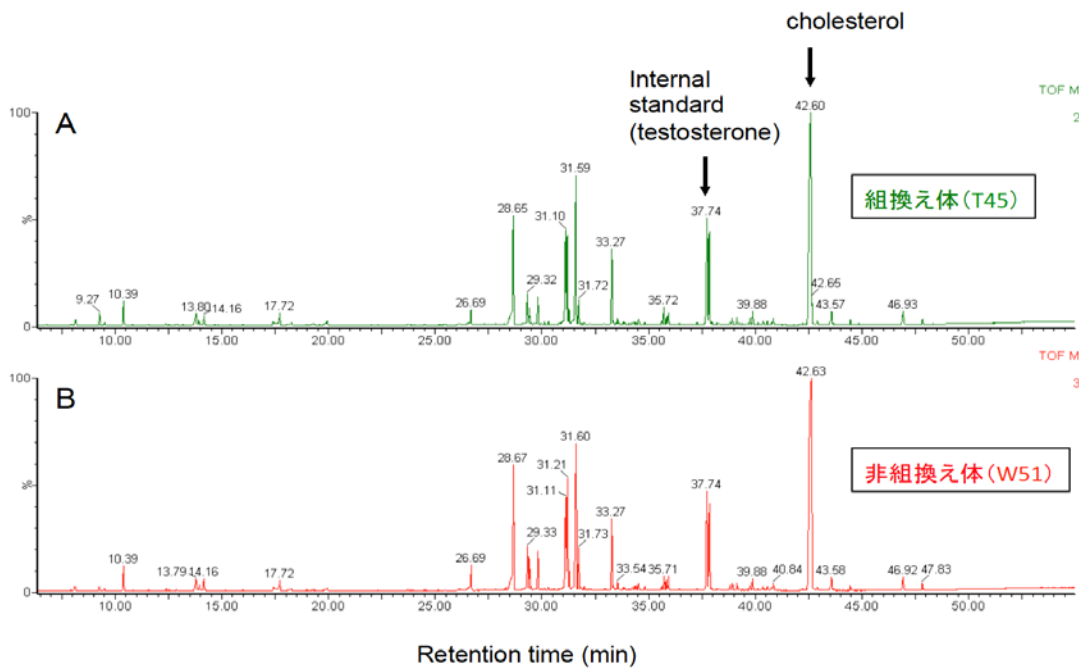


Fig. 2. ニワトリ血漿から調製した非極性画分の GC-TOF/MS トータルイオンカレントクロマトグラム (A) 組換え体(個体番号 T45)。 (B) 非組換え体(個体番号 W51)。

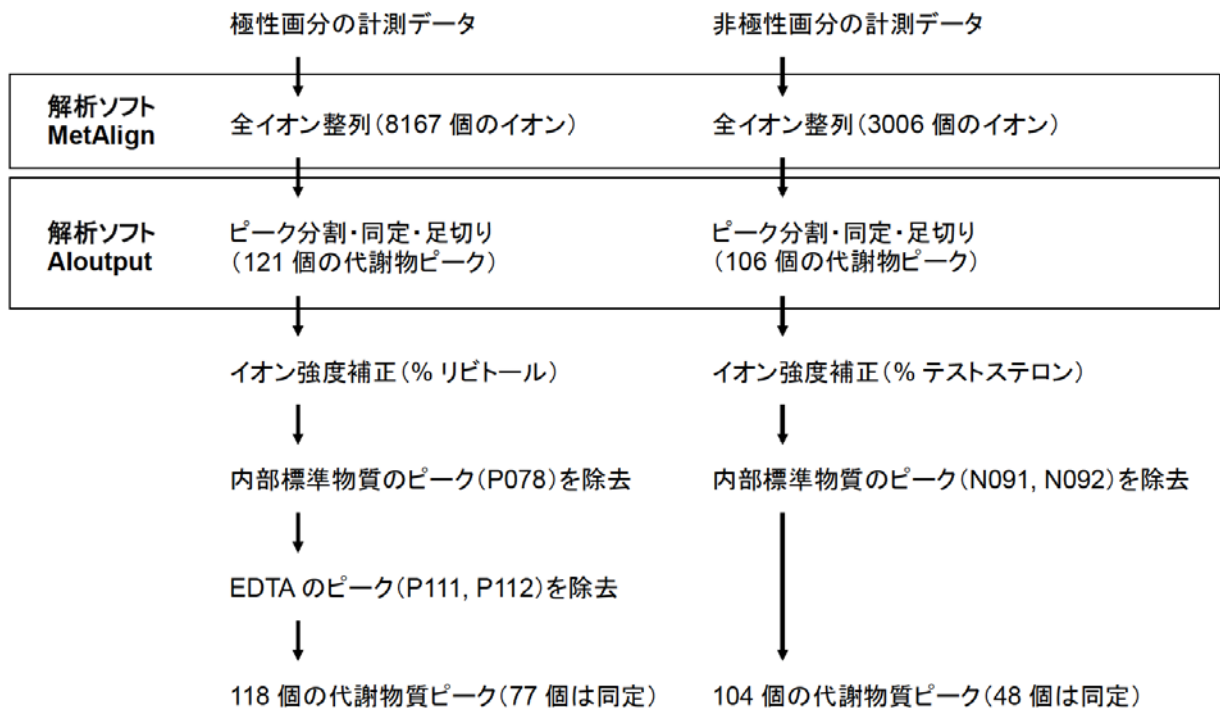


Fig. 3. 質量分析データ解析の手順

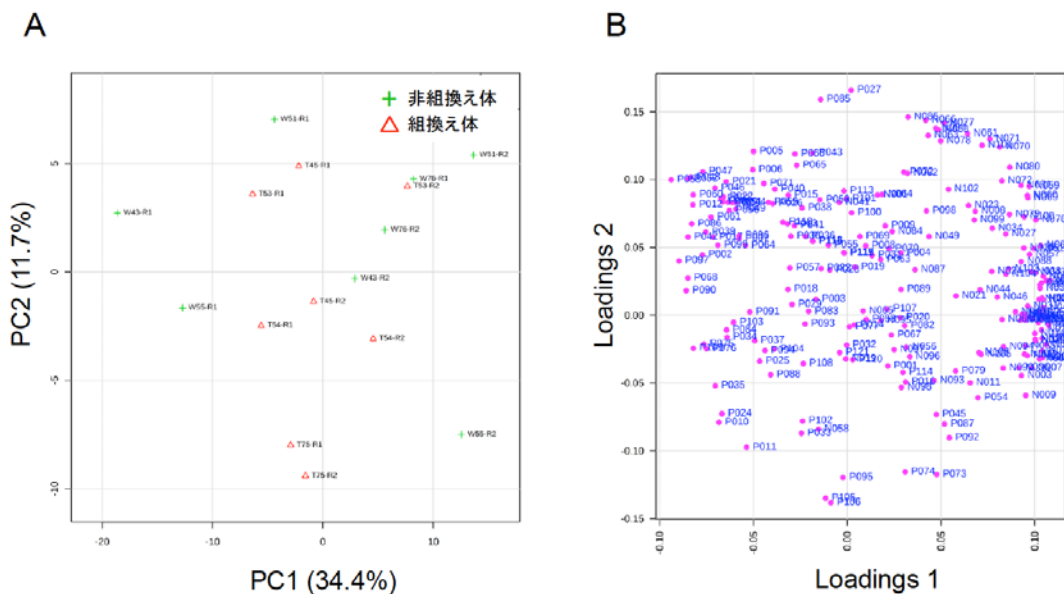


Fig. 4. 主成分分析

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。データの標準化方法は auto scaling を選択した。組換え体の 4 個体 (T45, T53, T54, T75), 非組換え体の 4 個体 (W43, W51, W55, W76) を分析に供した。(A) 第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) の主成分スコアの二次元プロット図。括弧内は各主成分の寄与率を示す。各サンプルの 2 回繰り返し分析は R1, R2 として表示。PC1 と PC2 のローディングスコアの二次元プロット。各プロットにピーク ID を付記した ID は Table 1 (極性画分), および Table 2 (非極性画分) に対応。