

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 東京農業大学 教授

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、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実証的データを蓄積すること、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、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進めた。平成 29 年度は、分担研究者らにより新たに開発されたゲノム編集ジャガイモ塊茎を対象として、各種オミクス技術を用いる解析・検討を行った。GM 微生物では腸管上皮細胞への影響を評価する手法としてトランスクリプトームによる評価系を検討した。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い、安全性未審査の遺伝子組換え並びに新育種技術により開発された作物の検知技術開発と安全性に関する知見の収集を進めた。

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。

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 |                      | 堀内浩幸    | 広島大学大学院      | 教授 |                         |
| 手島玲子  | 徳島文理大学香川薬学部<br>特任教授  | 近藤一成    | 国立医薬品食品衛生研究所 | 部長 |                         |
| 今村知明  | 奈良県立医科大学 教授          | 安達玲子    | 国立医薬品食品衛生研究所 | 室長 |                         |
| 小関良宏  | 東京農工大学大学院工学研究院<br>教授 | 中村公亮    | 国立医薬品食品衛生研究所 | 室長 |                         |
| 太田大策  | 大阪府立大学大学院 教授         | A. 研究目的 |              |    |                         |
|       |                      |         |              |    | 多様な機能を有する遺伝子組換え (GM) 食品 |

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、それらの安全性確認手法並びに規制のあり方、検知法について検討し、それらの方向性に必要な基礎的な知見と方法論を提供することを目的とした。また、GM 食品に対する消費者の意識は、リスク認知と受容性のかい離が大きいねじれ現象が発生しているため、食糧生産技術として重要な GM・NBT 技術について、消費者が正しく理解した上で判断するために有効なコミュニケーション手法を明らかにすることも目的とした。

## B. 研究方法

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の確認手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モデル GM 動物 (緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) 遺伝子を有する組換えニワトリ)、モデル植物 (グリコアルカロイド合成酵素遺伝子をゲノム編集により欠損させたジャガイモ)、M 細胞接着抗原を組み込んだモデル乳酸菌等を対象としてオミクス解析などによる網羅的技術 (トランスクリプトーム、プロテオーム及びメタボローム) による解析結果を統合することで、モデル GM 動物、モデル GM 微生物、ゲノム編集植物等を対象として安全性確認手法としての有用性について具体的な知見を検討してきた。平成 29 年度はゲノム編集ジャガイモ塊茎を対象として、それぞれの分析を担当し、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を行った。

GM 微生物の検討では、エルシニアの表層抗原を乳酸菌表層に固定発現したモデル組換え体を作成し、ヒト腸管上皮細胞のモデル評価系に頻繁に用いられる Caco-2 細胞との反応性を検討した。Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel1 細胞にモデル乳酸菌組換え体を加えたときの細胞の応答に関して評価を試みた。培地、宿主乳酸菌、組換え乳酸菌の 3 者を細胞と反応させた後、C2BBel1 細胞から全 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。培地コントロールに対し乳酸菌親株、組換え乳酸菌をヒト腸管上皮細胞に暴露させた場合の細菌の腸管上皮細胞への接着、取り込みについて定量的に評価した。

プロテオーム解析は、バイオテクノロジーを応用した形質転換体として TALEN 法でゲノム編

集されグリコアルカロイドの含量の大きく減少した系統のじゃがいも塊茎を用いて行った。具体的には、ゲノム編集 (TG-P) じゃがいもと野生型 (NT-P) じゃがいも塊茎由来の、各 3 サンプルのタンパク質抽出液につき、2D-DIGE を用い、TG-P と NT-P 群のタンパク質の発現の定量的網羅的解析を行い、差異のあったタンパク質を選択し、変動の大きかったタンパク質につき nanoLC-MS/MS にて同定を行った。

トランスクリプトーム解析は、上述のゲノム編集技術による遺伝子改変作物のモデルとしてグリコアルカロイド合成酵素遺伝子である Sterol side chain reductase 2 (SSR2) を欠損させたジャガイモを解析対象として、次世代シーケンサーを使用した RNA-seq により行った。また、平成 28 年度に引き続き、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植物体を生育し、登熟期ごとに果実を得、各種解析のための試料として調製した。組換えトマト台木に非組換えトマトの穂木を継いだ個体 (N/T) および非組換えトマト台木に組換えトマト台木を継いだ個体 (T/N) 各数個体を作成・栽培し、成熟したものを順次収穫し食品成分分析を行った。

メタボローム解析では、上述のゲノム編集技術の一種である TALEN 法によってステロール側鎖還元酵素 (SSR2) の遺伝子破壊を導入したジャガイモおよび母本品種の代謝プロファイル比較解析を行い、両者間での代謝物蓄積傾向の類似点と相違点を明らかにするとともに、蓄積代謝物の差異を同定した。詳しい分析条件等については、分担研究報告書参照。

モデル GM 動物の作出では、平成 28 年度に得られたオミクス解析データの総合評価を行なうとともに、新たなニワトリのモデル組換え体として遺伝子組換えニワトリ 2 種とゲノム編集ニワトリ 2 種を作成した。

未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集では、オランダを中心とした未承認遺伝子組換え作物検知法のプロジェクトである、Decathlon プロジェクトについて、文献情報および HP (<http://www.decathlon-project.eu>) をもとに調査を行った。ゲノム編集生物の取扱に関するアプローチ検討としては、EU が 2012 年にゲノム編集技術を含む新育種技術 (NBT) について 7 種に分類した。しかし、それから 5 年以上が経過して、ゲノム編集技術は進歩してゲノム上のあらゆる変化を誘導できるツールに

成長した。そのため、新しい技術について規制上の取扱いを考える上で分類の再検討がされてもよいと考えられる。そこで、諸外国では分類の見直しはされていないが、原理に則って分類した場合について検討した。諸外国での安全性評価に関する調査では、欧州 EFSA における遺伝子組換え生物のリスク評価に関するプロジェクトの調査を文献情報および HP (<http://www.grace-fp7.eu>) をもとに行ったゲノム編集生物の開発状況調査では、2016年に報告された、NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などを調査した。3つのデータベース (SciFinder、Pubmed、Google Scholar) を検索して、種名、用いた技術、ターゲット遺伝子、論文や特許のタイトルと誌名、要旨などの情報を一覧表にまとめた。該当する論文や特許は食用、研究用、医薬品の生産用、工業用などに分類した。

遺伝子組換え並びに新育種技術により開発された作物の検知技術開発では、LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の1粒からの検出、加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い、発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発を検討した。詳しい手法等については、分担報告書参照

アレルギー性予測解析ツールの1つであるアレルギー・エピトープ情報データベース Allergen Database for Food Safety (ADFS) の更新・充実により、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルギー性評価系に関する研究を行った。アレルギー性予測解析法の1つとして開発したアレルギー・エピトープ情報データベース (ADFS) に関して、最新の知見を取り入れてその情報内容を継続的に更新し充実させた。米国ネブラスカ大学リンカーン校が運営しているアレルギーデータベース (AllergenOnline) における登録アレルギーのアップデート内容を、ADFS に反映させた。

リスクコミュニケーションについては、ゲノム編集および GM 関連の各技術の最新動向および各国の対応状況を調査し、世界的動向の最新状況を把握し、同時に、国内消費者の調査を実施し、消費者の受容性の状況、受容性が変化するポイント (ライフイベント、年代等) を把握し、リスクコミュニケーションにおける効果的な働きかけの内容、セグメントを明らかにした。①GM サーモンに関する米国・カナダの動向については、AquaBounty 社による GM サーモン

(AquAdvantage® Salmon) の食品利用の承認を受け、食品関連企業の動向を調べるために、企業各社の Web サイトを確認し、情報収集を行った。また、メディア各社の GM サーモンに関する報道を調べるために、海外の報道記事等の収集を行った。②米国における GMO に関する動向では、米国における GMO の承認と商業化の実態について、the International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) のデータベースを用いて最新の状況を調査した。③EU をはじめとした各国の動向調査では、EU、オーストラリア・ニュージーランド、ブラジルについて、GMO や NBT に関する最新の動向を調査した。

#### 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機関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機関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漏れ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

GM 微生物については、ヒト腸管由来上皮細胞との相互作用について、トランスクリプトーム解析を行った。ヒトの腸管のパイエル板に存在する M 細胞は、腸内に生息する微生物などに対応した免疫を付与するための抗原認識に重要な働きを持った細胞である。この細胞への取り込みに係わることが知られている *Yersinia* 由来 Invasin を菌体表層に固定発現させたモデル乳酸菌を用いて、Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel1 細胞にモデル乳酸菌組換え体を加えたときの細胞の応答に関して評価を試みた。モデル GM 乳酸菌を C2BBel1 細胞と反応させた場合、ヒト上皮細胞がどのような反応をする

かについて、トランスクリプトーム解析により、評価を行った。菌の暴露を受けない場合に比較して宿主乳酸菌やモデル GM 乳酸菌を加えた場合、ヒト腸管上皮細胞はどのような反応を起こすのかについて、プロテオーム解析により評価した。培地、宿主乳酸菌、組換え乳酸菌の3者を細胞と反応させた後、C2BBel 細胞から全 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。宿主乳酸菌と組換え乳酸菌を細胞にさらした結果を比較したところ、エルシニアの表層抗原の発現により、ヒト腸管上皮細胞モデルでは、転写レベルでおよそ 40 遺伝子の発現が有意に上昇していることが示された。また、組換えによりエルシニア抗原を発現させると、乳酸菌の上皮細胞へ取り込みが増大した。細胞のトランスクリプトーム解析の結果から、組換え乳酸菌に曝されたヒト腸管上皮細胞内では分子レベルでどのような影響が起こっているかについて観察することができ、今後このような手法を用いることにより、組換え微生物がヒト腸管上皮細胞にどのような影響を与えるかの評価が可能であり、安全性評価に活用が期待される。

平成 29 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、ゲノム編集並びに野生型じゃがいも塊茎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、ゲノム編集での形質転換型 (TG-P) 並びに野生型 (NT-P) じゃがいも各 3 サンプルについて、タンパク質を抽出し、2D-DIGE を行った。約 5500 のスポットのうち、TG-P 群と NT-P 群の比較で、有意差 ( $p$  値  $< 0.05$ ) があり、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 13 個 (増加 5 個、減少 8 個) 観察され、それらのスポットのうち 10 個について MS 解析にて同定を行った。その結果、TG-P で上昇のみられたタンパク質として、Heat shock 70kDa protein, patatin-11 が同定された。なお、TG-P, NT-P 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットは 4 倍に増加のみられた 1 スポット以外にはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GT-P で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。全体として両者間の変動幅は小さく、ゲノム編集で、安全性上の問題と

なる変動は引き起こされていないものと思われた。また、形質転換体の野生株に対する変動幅は、以前プロテオーム解析を行った DREB1A 転写因子を遺伝子導入したじゃがいも塊茎の野生株に対する変動幅と比較して、同等以下であることも確認された。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も、野生型とゲノム編集群の間で統計解析に十分なサンプル (本年度の研究では 3 サンプル) 以上提供される場合の網羅的プロテオーム解析の有用性が示された。また、発現の比較的大きいタンパク質を同定することで、ターゲットを絞ったオミクス解析を行うことも可能であることが示された。

トランスクリプトーム解析では、ゲノム編集ジャガイモ塊茎の各サンプルでのすべての遺伝子での発現量 (FPKM 値) に基づくクラスター解析で、非ゲノム編集体 (NT) とゲノム編集体 (TG) で有意に異なった系統別のクレードを形成することはなかった。プロテオーム解析では有意に 3 倍以上の差異の見られるスポットはなく、安全性確認上で、問題となる変化はみられなかった。メタボローム解析では、両者の代謝プロファイル比較解析を完了した。

メタボローム解析では、植物の代謝改変を目的として実施されたゲノム編集操作が、目的以外の代謝機能に及ぼす影響をメタボロミクスによって包括的に評価することが目的である。実験には、毒性ステロイドアルカロイド (ソラニジン) 含量の減少を目的として、TALEN 法によるゲノム編集でステロール側鎖還元酵素をコードする SSR2 遺伝子を破壊し、ステロイドアルカロイド生合成を遮断したジャガイモ塊茎、および母本品種塊茎を供試し、代謝物蓄積の類似性と相違性を明らかにすることを目的とした。主成分分析および個々のピーク平均値の差の検定から、このゲノム編集による SSR2 遺伝子破壊では、目的としたステロール生合成経路以外の代謝機能に与える影響は限定的であることを明らかにした。ゲノム編集ジャガイモでは、ゲノム編集を反映して SSR2 が触媒する代謝反応の下流の代謝物 (コレステロール, ソラニジン) が減少していた。一方、植物主要ステロールの一種であるカンペステロール含量の顕著な増加を確認した。カンペステロールは作物を含む広範な植物種に普遍的に存在する化合物であり、これまでに毒性に関する報告はない。一方、極性画分の代謝物にも差異が認

められたが、ステロール生合成とアミノ酸代謝の関連は明らかではない。

ニワトリのモデル組換え体の作出では、平成 28 年度に研究球力者のもとで実施した 3 つのオミクス解析（ニワトリ血漿のメタボローム解析、ニワトリ白血球 mRNA を用いたトランスクリプトーム解析、ニワトリ血清のプロテオーム解析）のデータを全てまとめて、遺伝子組換えによる動物細胞への遺伝子から成分変化までを総合的に評価した。平成 28 年度に得られたオミクス解析データの総合評価を行なうとともに、新たなニワトリのモデル組換え体として遺伝子組換えニワトリ 2 種とゲノム編集ニワトリ 2 種を作出した。

近年のバイオテクノロジー技術の著しい進歩により、ゲノム編集技術等これまでにない正確な改変が可能なツールを用いた新品種開発が盛んに行われている。一方で、ゲノム編集技術が規制の枠組みの中でどのように扱われるべきかの議論は進んでいない。ゲノム編集技術を用いた場合は、その改変の痕跡が残りにくいことから従来の方法では検出は難しい。しかし、汎用される既知配列があればそこから未知配列の解析も可能になるため、その手法の一つとして、Genome-walking または LAM-PCR と次世代シーケンサーを組合せた解析手法が欧州で検討されている。ゲノム編集をはじめとする新育種技術（NBT）は、欧州 JRC 分類を再検討して、遺伝子操作で起きる変化による新たな分類を行い、潜在的懸念事項やリスクを考える上で有用であることが示唆された。欧州では、遺伝子組換え食品の承認に係る規則（regulation）が幾つか改定された。遺伝子組換え作物を用いた 90 日間反復投与毒性試験では、作物の実質的同等性で確認した以上の付加的な毒性・アレルギー情報は得られなかったが、小腸などのトランスクリプトーム解析を行うことで従来の毒性実験で得られない情報が得られる可能性が示された。EFSA は、遺伝子組換え作物のアレルギー性評価についてより具体的に検討行うようになった。Non-IgE 反応であるセリアック病のための配列類似性検索や新規発現タンパクの胃消化性試験の条件を実際の生理学的条件に合わせたより幅広い条件での検討、および内在性アレルギーの変化の解析が求められる。国内においてもゲノム編集技術の取扱いを考える時に考慮する必要がある。NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などの調査

の結果、食用については動物の報告が 28 報、植物については 33 報あった。用いた技術では圧倒的に CRISPR/Cas9 が多かった。開発国を見ると、食用の動物については中国が圧倒的に多く 21 報あった。植物については中国からの 17 報、米国からの 8 報が多かった。ゲノム編集技術を用いた農作物開発が活発で報告も多いが、ゲノム編集を用いることで生じるフレームシフト（読み枠のズレ）によって新規に生産されるペプチド・タンパクについて検討している報告は皆無であり、この点に開発者は注意を払っていない。

遺伝子組換え並びに新育種技術により開発された作物の検知技術開発では、①LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の 1 粒からの検出について：遺伝子組換え（GM）食品の検査には、主に食品から抽出精製した DNA を検体に用いた PCR 試験法が採用されている。しかし、食品から DNA を抽出精製するには、時間がかかると同時に、高価な DNA 抽出精製用キットを使用するなど費用がかかる。また、PCR の際に用いるサーマルサイクラーなどの特殊な機器等を必要とする。よって、試験の再現性を確保するためには、検査する人員の専門知識と技術も必要となる。このように、PCR 試験法を試験現場で実行するには、汎用性に問題がある。そこで、本研究では、DNA 抽出精製を必要としない、より簡便でシンプルな等温 DNA 増幅法（Loop-Mediated Isothermal Amplification [LAMP]）を用いた、GM コメ 1 粒検査法を開発し、感度や特異性に関する性能評価を行い、本法の厚生労働省通知試験法への実用化に向けた基盤的研究を行った。②加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：ネット上で公開されている全ゲノムシーケンズデータは、シーケンシング技術の発展に伴って、増加の一途を辿っている。しかし、そのデータを用いたバイオインフォマティクス解析手法を GM 食品検知法開発へ取り入れた際の整合性については、情報が乏しい。GM 食品の検査では、試験対象食品の存在を確認するため、特異的かつ定量的な内在性遺伝子検知法が必要となる。そこで、本研究では、全ゲノムシーケンズデータベースを用いたバイオインフォマティクス手法を用いて、迅速かつ簡便に試験対象食品に特異的な内在性遺伝子検知法を開発することを検討した。③発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発：ダイズを発芽さ

せ、発芽ダイズ食品として販売する際に、乾燥種子の状態とは異なるタンパク質組成の全体像を明らかにする手法を開発した。これまでに、発芽の際に発現する遺伝子（発芽遺伝子）の網羅的な解析は十分になされておらず、発芽 GM ダイズの安全性評価の要素に提言できる科学的なデータは示されていない。そこで、本研究では、発芽 GM ダイズのトランスクリプトーム解析手法、並びに、プロテオーム解析手法の開発を行い、発芽非 GM と GM ダイズ食品の成分の相違を分析する新しい技術開発を検討した。試験には、発芽させた Williams 品種とその GM 型ダイズ、また、異なる品種間の比較を行うため、比較対象には、Jack 品種を供した。RNA-Seq を用いた解析より得られたデータを基に、品種別の発芽遺伝子をリスト化し、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析のデータと比較することで、データ間の相違について考察を行った。

アレルギー性予測解析ツールの 1 つであるアレルギー・エピトープ情報データベース Allergen Database for Food Safety (ADFS) の更新・充実により、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルギー性評価系に関する研究を行った。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 33、及び、9 種のアレルゲンについて総数 27 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 2144 となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は 236 となった。また、これまでのユーザー登録制を廃止し、ADFS 利用に際しての利便性を向上させた。

リスクコミュニケーションについては、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、海外諸国ではすでに実用化が進んでいる。このような状況下において、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、前提となる知識や情報が変わるとどのように変化するかについて、世界での穀物栽培の現状や輸入穀物の IP ハンドリングの実態に関する情報提供によって受容性や支払い意思額がどのように変化するかについて調査を実施した。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、主に北米における GM サーモンに対する最新動向と、消費者の反応の実態を把握した。

## E. 結論

遺伝子組換えモデル乳酸菌では、エルシニアの表層抗原 Invasin を菌体表層に固定化発現させた乳酸菌を作出し、細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価系の検討を行った。ヒト腸管上皮細胞モデルとして Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞を用いた評価系では乳酸菌親株、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞の相互作用をトランスクリプトーム解析の手法にて評価した。組換え乳酸菌に曝されたヒト腸管上皮細胞内では分子レベルでどのような影響が起こっているかについて観察することができ、今後このような手法を用いることにより、組換え微生物がヒト腸管上皮細胞にどのような影響を与えるかの評価が可能であり、安全性評価への活用が期待される。

プロテオーム解析では、ゲノム編集されたじゃがいも (TG-P) 及び野生株じゃがいも (NT-P) から、タンパク質を抽出し、TG-P 及び NT-P 群のタンパク質発現の差を網羅的に調べるために 2D-PAGE を行った。各サンプルからタンパク質として約 5500 スポットが観察されたが、TG-P、NT-P 群間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは TG-P で上昇のみられた 1 スポットのみであった。全体として、じゃがいも塊茎タンパク質の発現量に TG-P、NT-P 群間でほとんど差がみられなかったため、ゲノム編集で安全性上問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。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、またバイオマーカーの探索のためにも有用な手法であることが示された。

トランスクリプトーム解析では、ゲノム編集

技術を使用した遺伝子改変作物のモデルとしてジャガイモの塊茎における遺伝子発現量を非編集体と比較した結果、当該遺伝子であるグリコアルカロイド合成酵素遺伝子の発現量に差異はなく、他の遺伝子においても発現量に変化は見られなかった。

メタボローム解析では、ゲノム編集による SSR2 遺伝子破壊では、改変によるステロール合成経路以外の代謝機能に与える影響は限定的であることを明らかにした。ゲノム編集ジャガイモでは、ゲノム編集を反映して SSR2 が触媒する代謝反応の下流の代謝物（コレステロール、ソラニジン）が減少していた。一方、植物主要ステロールの一種であるカンペステロール含量の顕著な増加を確認した。

平成 29 年度は、平成 28 年度に行った組換えニワトリと正常ニワトリのオミクス解析データの総合評価を行い、GFP 遺伝子導入では、外来遺伝子導入による変動は認められないことがわかった。また、新たに食品利用に近い複数種の組換えニワトリやゲノム編集ニワトリの作出に成功した。

次世代型育種技術（NBT）によって作出された生物由来の食品材料の代謝物蓄積の評価法の整備にも寄与する。特に、ゲノム編集ターゲット遺伝子以外のオフターゲット変異によって起こりうる代謝生化学的な影響を網羅的に解析し、ゲノムワイドな配列変異情報、トランスクリプトーム情報、プロテオミクス情報と統合解析し、NBT によって作出される食品素材の評価方の整備に結びつけることができる。新育種技術、特にゲノム編集を用いた作物及び魚類の研究開発が活発に行われている。一方で、行政的取り扱い判断のための科学的知見及び利用する国民の意識の調査は十分でない。法律的解釈に加えて、主に科学的知見の収集を行い、科学的見解をまとめる。これらの成果は、厚生労働省がゲノム編集技術を用いた作物・動物の申請時の行政的判断を行うのに重要な材料となると期待される。

NBT を利用して作成された動物、植物の開発の論文や特許などの調査を我々は数年前から継続しているが、2016 年に発表された物はそれ以前の物と比較して特別大きな変化はなかったように感じる。一方で、ゲノム編集の基礎研究は急速に進展している。近い将来にこの基礎研究の進展が新しい動植物の作成に影響を及ぼす可能性がある。したがって、今後も同様な

調査を継続する必要がある。また、ゲノム編集によって誘発されるフレームシフトによって新規に生産されるペプチドについて開発者は注意を払っていなかった。食用の新しい生物を開発するときにはこのような新規に生産されるペプチドの安全性も含めて評価することを我々は提案する。また、ゲノム編集を利用して作られた動植物を食品として認めるかについては諸国で足並みがそろわず、世界的に統一した規制はできないと予想される。

LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の 1 粒からの検出では、LAMP 反応に必要な十分なゲノム DNA は、精米一粒と HotSHOT 試薬を用いて簡便かつ迅速に抽出することが可能である。加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違いでは、加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の差は、細胞内外において観察されなかった。検出方法に用いたリアルタイム PCR は、高感度の DNA 検出法だが、DNA の分解度を観察するには、その解析手法の特徴、特にプライマー対とプローブの設計を厳密に考慮する必要性が示唆された。発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発では、発芽ダイズのトランスクリプトーム解析、並びに、プロテオーム解析を行う開発し、非 GM 型ダイズと GM 型ダイズを比較する方法を確立した。本法は、ダイズ一粒単位で解析可能であった。また、40°C 48 時間発芽させたダイズ中の転写もしくは翻訳レベルで解析した発芽遺伝子は、異なることが示唆された。

遺伝子組換え食品は、多様化するバイオテクノロジー技術を用いて開発されるため、そのリスクの 1 つであるアレルギー性を予測することが非常に重要となる。2016 年 6 月から 2017 年 5 月までの 1 年間に NCBI PubMed に掲載された 5 報の論文から 9 種のアレルゲンについて、総数 27 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。

リスクコミュニケーションについては、日本の消費者は、実際にリスクがある生レバーなどの食品や、食品の安心感に影響を与えている中国産食品について、GM 食品を食べるのを控えている。これはふぐよりも不安が高く、GM 食品は食品のリスクの一つとして捉えられていると

考えられる。安全だと思ふ食品と安心だと思ふ食品の属性にはわずかであるが差が見られ、例えば遺伝子組換えでないことや中国産食品でないことは、安全よりも安心を構成する要素としてのポイントが高く、このような乖離がある要素を分解することにより、消費者への説明ロジックをより効果的にできると考えられる。欧米の動向としては、NBT も含めた育種技術の積極的利用が経済利益の立場から望まれる一方で、消費者の抵抗感は根強く、理解促進のための教育や情報提供に力を入れる方向になりつつあると考えられる。実際に開発したツールを使用したコミュニケーションの試行のアンケートでは、現在の「遺伝子組換えでない」表示が 5%未満の意図せざる混入率を許容するものであるという情報提供により、IP ハンドリングされた穀物を non-GM だと認識する人は減少する。しかし、わが国の穀物生産に関する情報や IP ハンドリングの努力、GM 食品の安全性審査の情報提供により、GM 食品を購入しても良いと思う人も増加した。これは GM に対する安全性の評価と安心感を近づける要素となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takabatake R, Kagiya Y, Minegishi Y, Yeasmin S, Futo S, Noguchi A, Kondo K, Mano J, Kitta K. Development and evaluation of rapid screening detection methods for genetically modified crops using loop-mediated isothermal amplification. *Food Chem*, 252, 390 (2018)
2. 小川拓水, 岡澤敦司, 太田大策: インシリコ MS/MS ライブラリを利用した脂質同定ツールのリビドミクスへの貢献. *J Compute. Aided Chem.* 18. 51-57 (2017), DOI: 10.2751/jcac.18.51.
3. Nakanishi, K., Fujii, U., Ohtsuki, T., Kimata, S., Soga, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Ikeda, M., Nakamura, K., Kondo, K. Effect of sodium carboxymethyl cellulose in processed rice foods on detection of genetically modified rice-derived DNA. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 2018 (in press)
4. Nakamura, K., Ishigaki, T., Kobayashi, T., Fujii, U., Soga, K., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kawakami, H., Nishimaki-Mogami, T., Kondo, K. Identification of chickpea (*Cicer arietinum*) in foods using a novel real-time polymerase chain reaction detection method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018 (in press)
5. 田中尚人、宮崎智、鈴木智典、富田理、梶尾揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。ユーザーの求める機能性乳酸菌株のオンライン選抜システムの開発。日本微生物資源学会誌 33 (1) 31-37, 2017 年 6 月
6. 梶田和彌、角亦麻梨子、仁木敏郎、飯野久和、五十君静信。乳酸菌を用いたガレクチン 9 の発現とその生物活性評価。学苑・生活科学紀要 No.926:15-20(2017.12)
7. Mano J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome S., Hayashida S., Kawakami H., Kurimoto Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Takabatake R., Kitta K. “Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR” *Food Chemistry* 226, 149-155 (2017)
8. Tranquet O, Gaudin JC, Patil S, Steinbrecher J, Matsunaga K, Teshima R, Sakai S, Larré C, Denery-Papini S., “A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for in vitro allergenicity assessment of functionalized gluteins.” *PLoS One*. 12(11):e0187415 (2017)
9. Takumi Ogawa, Atsushi Okazawa, Daisaku Ohta: A protocol for GC-MS-based metabolomic analysis in mature seed of rice (*Oryza sativa* L.). *Protocol Exchange* (2017), DOI: 10.1038/protex.2017.151
10. Takumi Ogawa, Koji Kashima, Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Shiho Kurokawa, Masaharu Kuroda, Atsushi Okazawa, Hiroshi Kiyono, Daisaku Ohta: Seed

- Metabolome Analysis of a Transgenic Rice Line Expressing Cholera Toxin B-subunit. *Scientific Reports* 7, 5196(2017), DOI: 10.1038/s41598-017-04701-w
11. Kondo, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Sakata, K., Obitsu, S., Noguchi, A., Fukuda, N., Nagasawa, E., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Scientific Reports*, 7, 14942, 2017
  12. Sugano, Y., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Nozomi, F., Suzuki, T., Kondo, K. Rapid identification method of *Omphalotus japonicus* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 58, 113-123, 2017
  13. 安達玲子。食物アレルギーの表示制度と検査法、および多機能アレルギーデータベース ADFS について。食品衛生研究 68 巻 2 号 pp15-22 (2018)
2. 学会発表
1. 石橋諒、箕川剛、中島光一、古庄律、清水誠、五十君静信。腸管上皮モデル細胞 Caco-2 キットによる既存添加物食用色素の吸収特性評価。日本食品化学学会。2017. 6. 1-2。三重県志摩市
  2. 武田昌之、榊田和彌、梶川揚申、横田健治、五十君静信。ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価。日本乳酸菌学会。2017. 7. 10-11。福岡
  3. 武田 昌之、榊田 和彌、梶川 揚申、横田 健治、五十君 静信。ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価。日本農芸化学学会年次大会。2018. 3. 16 名古屋
  4. Ichikawa K, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Cloning and expression analyses of chicken forkhead box L3. The Fourth World Congress of Reproductive Biology. Sep 27, 2017, Okinawa, JAPAN
  5. Saheki K, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Isolation, culture and characterization of chicken amniotic mesenchymal stem cells. 第 40 回日本分子生物学学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸)
  6. 岡座悠輝, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ゲノム編集技術を用いた鳥類性決定機構に関する研究. 第 40 回日本分子生物学学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸)
  7. 正木陽登, 江崎 僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ア鳥類始原生殖細胞における DAZL の機能解析. 第 40 回日本分子生物学学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸)
  8. Okaza Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Elucidation of mechanism of avian sex determination using genome editing. The 2nd Annual Meeting of the Japanese Society for Genome Editing. Sep 29, 2017, Osaka, Japan
  9. 中村公亮、石垣拓実、権藤崇裕、菅野洋平、田中秀典、橋口正嗣、明石良、近藤一成：ダイズ品種間における発芽遺伝子の発現プロファイルの違い-第 1 報-、第 113 回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017 年 11 月
  10. 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、佐藤恵美、瀧屋俊幸、田中智樹、布藤聡、曾我慶介、中村公亮、近藤一成、高畠令王奈、橘田和美：デジタル PCR による組換えトウモロコシ定量スクリーニング法のコンスタートへの適用、第 113 回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017 年 11 月
  11. 菅野陽平、青塚圭二、坂田こずえ、中村公亮、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコの迅速判別法の構築-国内産クサウラベニタケ判別法の開発について-、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月
  12. 近藤一成、加藤怜子、中村公亮、坂田こずえ：Apoptosis inducing factor (AIF) 核内作用解明のためのミトコンドリア局在性 AIF 変異体細胞の構築、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月
  13. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築、第 54 回全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017 年 11 月
  14. 藤井宇希、中西希代子、中村公亮、大槻 崇、曾我慶介、岸根雅宏、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、亀山浩、池田恵、近藤一成：コメ加工食品中のカルボキシメチルセルロ

- ースナトリウムが DNA 抽出精製効率、並びに、遺伝子組換え食品検査へ与える影響について、第 54 回全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017 年 11 月
15. 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、栗本洋一、布藤聡、中村公亮、近藤一成、高畠令王奈、橘田和美：デジタル PCR を利用した遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の開発とその性能評価、AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 20 回記念年次大会、東京、2017 年 7 月
  16. 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、加藤怜子、高崎一人、布藤聡、近藤一成：食品中のゲノム DNA の 1 塩基変異を検知する方法の開発と性能比較、日本食品化学学会 第 23 回総会・学術大会、2017 年 6 月
  17. 石垣拓実、中村公亮、近藤一成：遺伝子組換えサケ (AquAdvantage salmon) を対象とした系統特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第 23 回総会・学術大会、2017 年 6 月
  18. 峯昌啓、岡本左和子、濱田美来、藤馬裕一、今村知明。生物リテラシーと遺伝子組換え食品の受容に関する調査。第 76 回日本公衆衛生学会。2017 年 10 月 31 日～11 月 2 日(鹿

児島県、鹿児島県文化センター)

#### 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

##### (1) 質量分析データ等の一般公開

1. Takumi Ogawa, Daisaku Ohta: ジャガイモ遺伝子改変体のメタボローム解析 (仮題). MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLSXXX>), 2018 年公開予定
2. Takumi Ogawa, Daisaku Ohta: ニワトリ遺伝子改変体のメタボローム解析 (仮題). MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS537>), 2018 年公開予定
3. Takumi Ogawa, Daisaku Ohta, Atsushi Okazawa: Seed Metabolome Analysis of a Transgenic Rice Line Expressing Cholera Toxin B-subunit. MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS437>), 2017 年 8 月公開