

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」
総合研究報告書（平成 27～29 年度：分担）

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： バイオテクノロジー応用生物体のプロテオーム解析に関する調査研究として、(1) 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)、EGFP タンパク質遺伝子組換え雌にわとり並びに非組換え雌にわたりの血清、ゲノム編集でグリコアルカロイドの含量の減少させた形質転換系統じゃがいも並びに野生株の塊茎を用いて、それぞれ n=3 で調製したサンプルからタンパク質を抽出し、2D-DIGE による網羅的解析に供し、(2) 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。E7 発現株と E7 結合株の両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析では、約 2400 のスポットのうち、2 倍以上並びに 3 倍以上の発現の差異のあるスポットが 66 個及び 20 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 依存的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。EGFP タンパク質遺伝子組換え (GM) 並びに非組換え (NGM) 雌にわたりの血清タンパク質の網羅的比較解析では、約 2000 のスポットのうち、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 18 個観察され、それらのスポットのうち 6 個についてと、発現の差異が 1.3 程度であるが $P < 0.005$ の 4 スポットについて MS 解析にて同定を行った。その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなかった。ゲノム編集 (TG-P) 並びに野生型 (NT-P) じゃがいも塊茎タンパク質の網羅的比較解析では、約 5500 のスポットのうち、両群の比較で、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、両群で 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かった。

以上、3 種のバイオテクノロジーの生産体と非組換え体の間で有意に 3 倍以上の差のみられるスポットはほとんどなく、安全性上で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、野生型と形質転換群の間で統計解析に十分なサンプル (本分担研究では 3 サンプル以上) が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、発現差の比較的大きいタンパク質の同定から、にわとり血清タンパク質では C-reactive protein, じゃがいも塊茎では、Heat shock 70kDa protein が安全性評価に有用なバイオマーカーになるものと思われた。

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代謝生化学部

佐藤里絵 (独) 農研機構 食品総合研究所

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、遺伝子組換えに

わとり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。またゲノム編集という新しい技術による動植物のバイオテクノロジー応用食品も開発され、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。バイオテクノロジー技術による安全性を考えるうえで、バイオテクノロジー技術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バイオテクノロジー技術生産品と野生型を用いて 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。

3 年間に、バイオテクノロジー応用組換え生物体として、パピローマウイルス膜抗原発現乳酸菌株、EGFP タンパク質遺伝子組換えにわとり、ゲノム編集でグリコアルカロイドの含量を減少させた形質転換系統じゃがいも及びそれらの対照体を用いてプロテオーム解析を行った。

B. 研究方法

(1) 供試試料

- a) ア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。
- b) EGFP タンパク質遺伝子組換え(GM)雌にわとり並びに非組換え(NGM)雌にわたりの血清は、広島大学大学院堀内教授より供与いただいた。具体的には、1 か月令の雌 GM, NGM それぞれ 3 匹ずつの組換えニワトリ血清約 0.5ml を供与いただいた。供与いただいたサンプルは、 -80°C ディープフリーザー内に保管した。
- c) ゲノム編集じゃがいも(TG-P)並びに野生株 (NT-P)の塊茎は、理化学研究所環境資源科学研究センター統合メタボロミクス研究グループの梅基直行先生より供与いただいた。具体的には、TG-P 及び NT-P じゃがいも塊茎それぞれ約 1g からなる乾燥した 3 サンプルを供与いただいた (サンプル TG; TG-P1, TG-P2, TG-P NT; NT-P1, NT-P2, NT-P3)。供与いただいたサンプルは、 -80°C ディープフリーザー内に保管した。

(2) 形質変換体と非変換体の 2D-DIGE によるタンパク質網羅的比較解析

a) 乳酸菌試料については、重量測定後に 10 倍容の Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、7M 尿素、2M チオ尿素、5 mM 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、8,000xg で 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)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)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 \times サンプルバッファー (8 mol/L 尿素、4%(w/v) CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL) 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。

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：一次元目電気泳動は、装置にMultiphoreII (GEヘルスケア) を、ゲルストリップにImmobilineTM DryStrip pH3-11 NL 24cmを用い、試料はカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで44.2 kWh (300 V; 4 hr, 300-3500 V; 5 hr, 3500 V; 10 hr) 行った。泳動後、平衡化溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.8、6 mol/L尿素、30vol%グリセロール、2%(w/v) SDS) に 0.25%(w/v) DTTを添加したA液及び同様に 4.5%(w/v) IAA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 バイオサイエンス) 及び12%(w/v)均一ポリアクリルアミドゲル (自作) を用いて二次元目のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動は、30 W (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22スポット(No. 417, 184, 845, 1508, 728, 1227, 1857, 893, 1436, 1592, 1830, 1784, 1351 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)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 μ 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 μ L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 μ 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 μ Lを加えた後に、50 mM炭酸水素アンモニウム10 μ Lを加えた。チューブを30°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 μ 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の、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)を用いて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。

b)組換え及び非組換えにわたりの血清
にわたり血清試料各32 μ LにBuffer A(Equiload wash, Agilent cat No. 5185-5987)368 μ Lを添加して攪拌し、Spin Filters(0.22 μ 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。

全評価用試料を等量ずつ混合したプール試料に対して200 pmolのCy2(200 μ mol/L DMF溶液、1 μ L)を添加した。また、各評価用試料に対して200 pmolのCy3及びCy5(200 μ mol/L DMF溶液、1 μ L)を添加した。添加後氷上にて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(10 mmol/L溶液、1 μ L)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 \times サンプルバッファー(8 mol/L尿素、4%(w/v)CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL)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。

二次元電気泳動は、上記a)の乳酸菌の項目で行ったと同じ方法で行った。

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10スポット(No. 279, 613, 646, 724, 1327, 1360, 1366, 1594, 1779, 1783)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の処理及びnanoLC-MS/MS分析は、上記a)の乳酸菌の項目で行ったと同じ方法で行った。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) ゲノム編集及び野生型じゃがいもの塊茎

じゃがいも塊茎試料にLysis Buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、7M尿素、2Mチオ尿素、5 mM酢酸マグネシウム、4%(w/v)CHAPS、1錠/50mL Complete Inhibitor Cocktail Tablets)2 mLを加えて混和した。混和後に超音波処理(0.2秒間ON + 0.3秒間OFFのサイクルで20秒間 \times 2回)を実施した。超音波処理後の試料をAmicon Ultra-0.5に添加して微量高速冷却遠心機を用いて20,000 \times gで10分間遠心限外ろ過した試料を評価用試料とした。

全評価用試料を等量ずつ混合したプール試料に対して200 pmolのCy2(200 μ mol/L DMF溶液、1 μ L)を添加した。また、各評価用試料に対して200 pmolのCy3及びCy5(200 μ mol/L DMF溶液、1 μ L)を添加した。添加後氷上にて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(10 mmol/L溶液、1 μ L)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 \times サンプルバッファー(8 mol/L尿素、4%(w/v)CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL)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。

二次元電気泳動は、上記a)の乳酸菌の項目で

行ったと同じ方法で行った。

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 10 スポット (No. 1845, 2566, 2618, 2630, 2657, 2901, 2054, 4851, 5401, 5648) 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の処理及び nanoLC-MS/MS 分析は、上記 a) の乳酸菌の項目で行ったと同じ方法で行った。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 NCBI nr の最新版に対して、Solanum tuberosum (Potato) 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

Dycyler 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、各サンプルあたり約 2400 であった。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、2 倍以上の増加のみ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質は 20 個であった。

発現のみられたタンパク質のうち、方法の項目で述べた 22 スポットを選択し、MS 解析を行った。E7 発現株で減少のみられたタンパク質には、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、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や細胞膜表面で働く α -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、パピローマウイルス関連では、唯一、E1 ロテイン (Lynx rufus papilloma-virus type 1) (gi 62547900) が coverage 4% と低いけれども検出された。

(2) EGFP 組換え及び非組換えにわたりの血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

GM, non-GM 雌にわたり各 3 個体、合計 6 個体はいずれも血清のアルブミン除去タンパク質としてそれぞれ約 2000 のスポットが 2D-DIGE

で検出された。6 種の定量比較画像の各スポットの蛍光強度データについて変動の大きさにつき解析を行ったところ、GM 群と non-GM 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 18 個観察された。それらのスポットのうち 6 個について、MS 解析を実施することを計画した。なお、6 個のうちの 3 個のスポットについては、平成 27 年度の non-GM のにわたりの雌雄の血清の個体差を調べる予備検討でタンパク質を同定済みであったので、平成 28 年度は残りの 3 個につき、新たに MS 解析を行った。また、発現の差異が 1.3 程度であるが $P < 0.005$ の 4 スポットについても MS 解析にて同定を行った。GM 体で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットとして、スポット 1778 が唯一該当したが、このスポットの appearance (出現率) が 6/29 と低く、再現性が低いスポットであった。従って、再現性の確認されたスポットの中で、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM 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、平成 28 年度に有意差の見られた血清タンパク質は、平成 27 年度に雌雄も含めた個体間での変動があまり大きくないことが調べられており、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にもなり得ると思われた。

なお、本分担研究に用いた GM にわたりには、EGFP タンパク質を遺伝子導入しているため、血清中で EGFP タンパク質の検出が可能ではないかと考え、EGFP タンパクの分子量及び等電点の近いスポットとして、スポット 1779, 1783 を選び、タンパク質の同定を行ったが、EGFP タンパク質を検出することはできなかった。これは、GM 動物の血清中の EGFP タンパク質の濃度上昇が他臓器に比べ低いことが一因と考えられた。

(3) ゲノム編集及び野生型じゃがいもの塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

TG-P, NT-P じゃがいも塊茎 6 サンプルから抽出されたタンパク質としてそれぞれ約 5500 のスポットが 2D-DIGE で検出された。NT-P と TG-P 各 3 サンプルにつき、群間の差を検出する目的で、比較解析した。6 種の定量比較画像の各ス

ポットの蛍光強度データについて変動の大きさにつき解析を行ったところ、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 個観察された。そのうち、5 個が TG-P 群で NT-P 群に比べ上昇がみられたスポットで、8 個が TG-P 群で NT-P 群に比べ減少がみられたスポットであった。それらのスポットのうち発現変動の大きかった 10 個のスポットについて、MS 解析を実施した。

TG で上昇のみられたタンパク質として、ヒートショック 70kDa (Hsp70) タンパク質、液胞貯蔵タンパク質である patatin -11 タンパク質が同定された。また、No. 4851 は、probable inactive patatin-3-Kuras 1 (PT3K1) と推定された。ヒートショックタンパク質、パタチンともにストレスにตอบสนองして変動するタンパク質と思われるが、変動幅は、同定されたタンパク質では 3 倍以下の発現の差のみみられたのみであった。また、TG-P 群で、発現の減少したタンパク質としては、アミノ酸代謝にかかわる glutamate-glyoxalate amino-transferase-2-like, 澱粉の代謝にかかわる Granule-bound starch synthase 1, ミトコンドリアでの ATP 合成に関与する ATP synthase subunit beta 等が同定されたが、いずれも 3 倍以下の発現の差しかみられなかった。以上より、TG-P 群において NT-P 群に比して安全性上の問題となるタンパク質の変動は引き起こされていないものと思われた。

なお、今回有意に TG 群で上昇の見られたストレスにตอบสนองと思われる Hsp70 タンパク質は、形質転換による非意図的影響を調べるためのよいマーカーにもなり得ると思われた。

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 E7 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。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) EGFP 組換え及び非組換えにわたりの血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

組換え体として、EGFP タンパク質組換え (GM) ニワトリのプロテオーム解析を行った。具体的には、1 か月令の GM 雌ニワトリ 3 匹と非組換え (NGM) ニワトリ 3 匹ずつの血清について 2D-DIGE を行い、GM と NGM 群の血清中タンパク質発現の網羅的差異について解析を行った。

その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM 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。

(3) ゲノム編集及び野生型じゃがいもの塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

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プロテオーム解析を行った。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。

その結果、TG-P で上昇のみられたタンパク質として、Hsp70 タンパク質、patatin -11 タンパク質が同定された。なお、TG-P, NT-P 間で 3 倍以上の発現の差のみみられたスポットは上昇のみみられた 1 スポットのみで、全体としての両群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 (Nakamura R et al: Biol. Pharm. Bull. 33, 1418-25 (2010)¹⁾。

E. 結論

(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 発現型並びに E7 結合型の 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、そのうち 22 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關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、組換え体の作用機序(Mode of Action)を知るうえでも有用であることが示された。

(2) にわとり血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

1 か月令の雌の組換え個体、及び非組換え個体それぞれ 3 匹ずつから、血清を採取し、GM 及び non-GM 個体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。各個体血清タンパク質として約 2000 スポットが観察されたが、そのうち、GM, non-GM 間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは観察されなかった。変動の見られたタンパク質のうち、10 個のタンパク質を MS 解析から新たに同定した。全体として、血清タンパク質の発現量に GM, non-GM 群で差もほとんどみられなかったため、GM 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。

(3) ゲノム編集及び野生型じゃがいもの塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

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) 各 3 サンプルから、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、そのうち、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。1.5 倍以上の変動の見られたスポット 13 個のうち、変動の大きかった 10 個のスポットを選択し、タンパク質の同定を MS 解析で行った。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。

F. 参考論文

1) Nakamura R., Satoh R., Nakamura R., Shimazaki T., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Kikuchi A., Watanabe K.N., Teshima R. “Immunoproteomic and two-dimensional difference gel electrophoresis analysis of *Arabidopsis dehydration response element-binding protein 1A(DREB1A)*-transgenic potato” *Biol. Pharm.Bull.* 33(8), 1418-1425 (2010)

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 学会発表

1) Teshima R, Nakamura R., Adachi R., Shindo T., Yamada A., Ohsawa A., Ozeki Y. Differential analysis of protein expression in RNA binding protein-transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress and allergenicity test of the rice extracts. 54rd Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2015. 3)

2. 論文発表

1) 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* 23, 9-19 (2016)

2) 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)

3) 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)

4) Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S, Poulsen LK, Privalle L,

Ward JM, Doerrer N, Rascle JB. “Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens” *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198–2207 (2016).

5) 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)

6) 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)

I. 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