

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研究科・教授）
研究協力者 小口 太一 （筑波大学生命環境系/つくば機能植物イノベーション
研究センター・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との接ぎ木技術も 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。本研究では、組換え体-非組換え体間の接ぎ木個体のモデルとして、*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の作成し、モデル分析試料としての供給体制を整えた。また、実際に、*GUS* 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間の接ぎ木体から得た果実の食品成分分析を実施し、組換えトマト、非組換えトマト及び組換え-非組換え接ぎトマトの間で比較したところ、いずれも有意な差は見出されることが確認された。

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>

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よそ 3 cm の箇所主茎を切断し、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、栽培室で引き続き生育させた。

<食品成分分析>

結実後、成熟した果実を順次収穫・凍結保管した。組換え体 4 個体、非組換え体 4 個体（非組換え体同士の接ぎ木体 3 個体含む）、穂木組換え体/台木非組換え体となる接ぎ木体 5 個体、および穂木非組換え体/台木組換え体 6 個体より収穫した果実は、収穫後、分析に供するため凍結保管した。凍結保管した果実は、秤量後レトルトパウチ袋に封入、オートクレーブ処理した後に再度凍結し、日本食品分析センターに送付し、五成分（水分、たんぱく質、脂質、炭水化物、灰分）およびエネルギーの分析を依頼した。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質はケルダール法、脂質は酸分解法、灰分は灰化法により評価した。エネルギーと水分は下記の計算式により求めた。

$$\text{炭水化物} = 100 - (W + P + L + A)$$

W：水分、P：たんぱく質、L：脂質

C：炭水化物、A：灰分

<網羅的分析試料の調製>

結実後、肥大した果実の表面が赤色に変化する催色(期)を基準とし、菜食期 5 日後及び 10 日後(完熟)の果実を収穫、液体窒素で凍結し、 -80°C で分析まで保管した。

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

<接ぎ木体の調製>

H27 年度は、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)。

H28 年度には、前年度に確立した方法にもとづき、非組換え体同士 3 例、穂木組換え体/台木非組換え体 10 例、穂木非組換え体/台木組換え体 9 例、合計 22 例のトマトの接ぎ木体を作成した。いずれの接ぎ木体の生育・結実性等には、個体間によるばらつきは認められるものの、接ぎ木していない植物及び穂木/台木の組み合わせの違いによって、生育・結実等に有意な違いはなかった（Tukye-HSD 検定、 $\alpha=0.05$ ）(図 1)。

<食品成分分析>

作成した接ぎ木体及び対照植物（接ぎ木無施術の組換え体及び非組換え体）から、成熟した果実を順次収穫した。収穫した果実の食品成分分析の結果は図 2 に示す。五成分は、組換え体-非組換え体間、あるいは、組換え体-非組換え体間の各接ぎ木体と組換え体、非組換え体の間に有意な違いはなかった（Tukye-HSD 検定、 $\alpha=0.05$ ）(図 2)。

<網羅的分析試料の調製>

非組換え体同士、穂木組換え体/台木非組換え体、穂木非組換え体/台木組換え体、組換え体同士の各組み合わせ 5 例ずつトマトの接ぎ木体を作成した。

接ぎ木体に結実した果実が催色したら順次標識し、彩色後 5 日目又は 10 日目に採取し、直ちに液体窒素で凍結した(図 4)。組換え体-非組換え体、接ぎ木施術の有無による果実の形体、登熟にかかる日数の違いは見られなかった。凍結した試料は分析までの間、 -80°C の冷凍庫で保管した。

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、本研究により、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。接ぎ木施術が植物の生育に与える影響は、施術直後は接ぎ木無施術の個体と比べて、接ぎ木施術による成長への影響があったが、その後栽培

を継続する過程で影響はほぼ見出されなくなった。

モデルとした組換え体は、非組換え体と比較して果実の栄養成分に有意な差はない。組換え体/非組換え体間の接ぎ木体においても、非組換え体同士の間での接ぎ木体、接ぎ木無施術の非組換え体あるいは組換え体とも果実の栄養成分に有意な差はないことから、同種間の接ぎ木体と接ぎ木無施術の植物体間で新たな栄養成分の際は生じないことが確認された（図2）。

更に、最終年度は、網羅的分析に際して、成長段階が揃った果実を供することを目的とし、彩色期を指標とした試料調製を行った。彩色期5日後及び10日後の果実を採取した。本研究でモデル材料としたマイクロトムでは、彩色期が果実の登熟段階の指標の一つとして知られる。彩色期とは、受粉から約35日後に果実表面に淡い赤色の着色が目視で確認されるステージを指し、その後2日間果実全体で淡い彩色がみられ、彩色期後10日目で完熟とされる。実際の生食トマトは、完熟前に収穫されることが多いので、完熟前の彩色後5日目と、完熟期である彩色後10日目に定めて、分析試料として調製した。

E. 結論

組換え/非組換えマイクロトムを用いた、組換え/非組換え間の接ぎ木における影響を評価するためのモデル系を構築した。また、本実験系を用いて、トマト可食部である果実の食品栄養成分は、接ぎ木による影響を受けないことが示された。さらに、今後の網羅的解析に向け、登熟段階の果実を提供する体制を整えた。

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



図1 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そそ 5 週目に実施した。

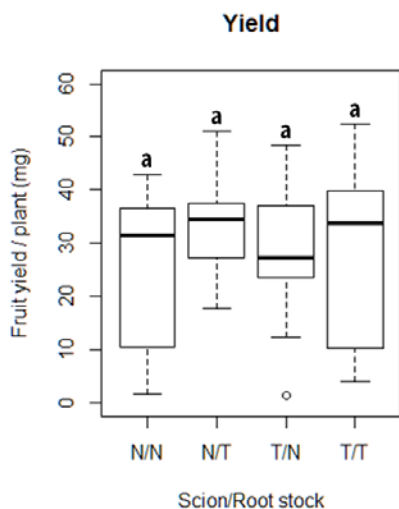


図2 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による果実収量の比較

N/N、N/T、T/N、T/T は、それぞれ非組換え体（一部は非組換え体同士の接ぎ木体）、穂木非組換え体/台木組換え体、穂木組換え体/台木非組換え体、組換え体の果実を示す。グラフ中の同じアルファベットの付記は Tukey-HSD 検定により有意な違いが検出されなかったことを示す ($\alpha=0.05$)。

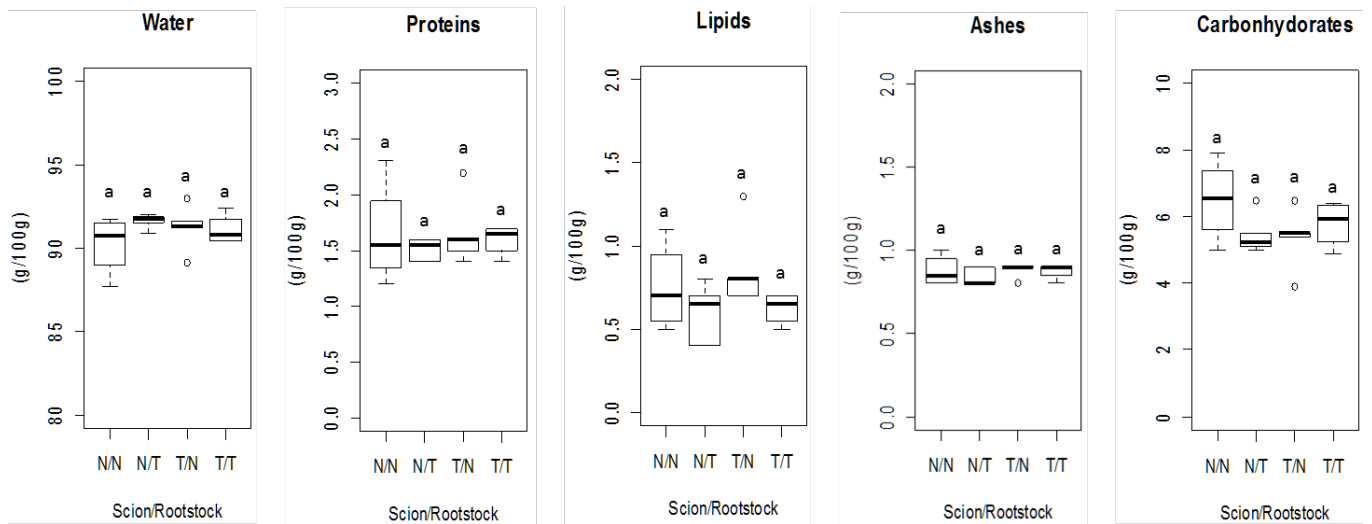


図3 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による食品成分の比較

N/N、N/T、T/N、T/T は、それぞれ非組換え体（一部は非組換え体同士の接ぎ木体）、穂木非組換え体/台木組換え体、穂木組換え体/台木非組換え体、組換え体の果実を示す。グラフ中の同じアルファベットの付記は Tukey-HSD 検定により有意な違いが検出されなかったことを示す ($\alpha=0.05$)。

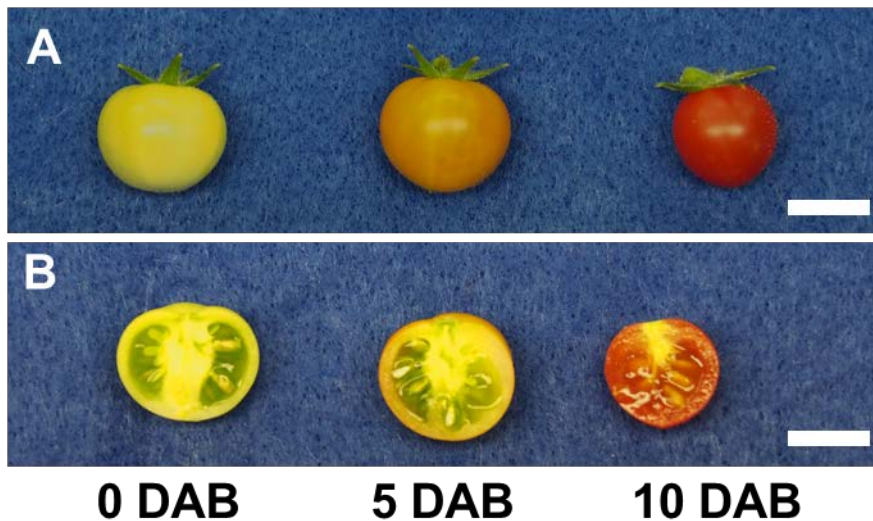


図4 網羅的解析用に採取したマイクロトムの様子

結実後、肥大した果実の表面が赤色に変化する催色期 (Breaker) を基準とし、彩色期 5 日後 (5 day after breaker; 5DAB) 及び 10 日後 (10DAB; 完熟) の果実を収穫、液体窒素で凍結し、網羅的解析の試料とした。写真 A は果皮色、B は切断面の様子を示す。写真は、接ぎ木無施術の組換え体の果実を示すが、組換え体-非組換え体、接ぎ木施術の有無による果実の形体、登熟にかかる日数の違いは見られなかった。凍結した試料は分析までの間 -80°C で保管する。バーは、1cm。