

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

発芽前後におけるGMダイズの
遺伝子発現プロファイリングに関する基盤研究

平成27～28年度 総合研究報告書
(H27 - 食品 - 若手 - 023)

研究代表者 中村公亮

平成29(2019)年5月

目 次

I. 総括研究報告書

研究要旨-----	2
A. 研究目的-----	2
B. 研究方法-----	2
C. 研究結果-----	8
D. 考察-----	16
E. 結論-----	18
F. 健康危険情報-----	19
G. 研究発表-----	19
H. 知的財産権の出願・登録状況-----	23
図表一覧-----	24 ~ 26

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 27 ~ 28

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
総合研究報告書（平成 27～28 年度）

発芽前後における GM ダイズの遺伝子発現プロファイリングに関する基盤研究

研究代表者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

研究要旨

昨今、発芽ダイズは発芽前を上回る栄養価が注目されており、おやつや健康食品などの加工食品に利用されている。種子は、発芽に伴って休眠状態にある遺伝子の発現を活発化させるため、発芽前後ではタンパク質をはじめとする代謝産物の構成が大きく異なることが予想される。食品加工への発芽ステップの導入といった食品科学技術の著しい進展に伴い、遺伝子組換え（GM）ダイズの食品としての安全性についてその視点を拡大する必要が出てきた。そこで本研究では、初年度（H27）は、RNA-Seq 解析によりダイズの全ゲノム上の遺伝子を網羅した発芽により誘導される遺伝子（発芽遺伝子）の解析を実施した。最終年度（H28）は、発芽時の外的環境因子や組換え技術による遺伝子発現プロファイルへの影響について解析した。こうして、ダイズの発芽遺伝子について、転写、及び、翻訳レベルで全ゲノム上の遺伝子を網羅し解析する新しい方法を開発し、非 GM と GM ダイズを比較する際の有用性について検証を行った。

協力研究者

石垣拓実（国立医薬品食品衛生研究所）
明石良、権藤崇裕、田中秀典、橋口正嗣（宮崎大学）
菅野陽平（北海道立衛生研究所）

A. 研究目的

本研究では、ダイズが発芽する際に発現誘導される遺伝子（発芽遺伝子）について、転写、及び、翻訳レベルで全ゲノム上の遺伝子を網羅し解析する手法を開発し、遺伝子組換え（GM）と非 GM ダイズの構

成成分の変化等を比較する際の有用性について検証を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 試料と発芽条件

試験には、非 GM ダイズ 2 品種（国内で流通しているアメリカ産 GL3494 品種とカナダ産 OAC Kent 品種）、Jack 品種、Williams 品種、及び、Green Fluorescent Protein（GFP）とダイズ由来 SYNC1 を発現するよう組換えた Williams 品種（GM ダイズ）の 5 品種を供した。種子は発芽前に

滅菌処理を行った。シャーレー一枚あたり、20粒の種子を準備し、それをデシケーター内にフタをあけて入れて、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素6%)100 mLに濃塩酸3.5 mLを入れ、デシケーターの蓋を閉じて、発生する塩素ガスでガス滅菌を行った。発芽条件は、2種類の方法(発芽ダイズ食品生産の際に使用される発芽条件「発芽ダイズ加工食品、及び、前記食品の製造方法」(特開2006-345708)を基に、24時間27又は40の滅菌水中に浸漬する、滅菌種子をそれぞれ上下2枚のキムタオルで挟み込み滅菌水で湿らせた後、24時間27又は40で発芽させる)を検討した。

2. 次世代シーケンシング解析用試料の調製

発芽ダイズ生産の発芽条件(40)と28の常温発芽条件下で24時間培養し発芽させたダイズ3品種より、粒単位でトータルRNAの抽出・精製を行った。1粒又は5粒を試料に、乳鉢・乳棒を用いて液体窒素を加えながら粉碎(粉状になるまで粉碎)し、Qiagen RNeasy Plant Mini Kitの2カラムを1試料に使用してトータルRNAを精製した。ゲノムDNAは、RNase-free DNaseを使用して、完全に分解させた。得られたRNAの精製度は、Bioanalyzer(アジレントテクノロジーズ社)を使用しRNA Integrity Number(RIN)値を測定すること

により評価した。RNA 4 µgを使用し、oligo dTによりmRNAを濃縮した。TrueSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit(イルミナ社)を使用して、RNA-Seqライブラリーを作成した。イルミナHiSeq2500によるシーケンス解析は、high output mode 100-base paired-endシーケンシングを外部委託した。

3. 次世代シーケンシング解析データの解析

得られたデータは、ダイズゲノム解析(Nature, 463, 178-183, 2010)より得られた配列データベース(V1.0.29, ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-29/plants/fasta/glycine_max/dna/)を入手しリマッピングのリファレンス配列として使用した。発現差解析は、Empirical Analysis of Digital Gene Expression解析法(*Biostatistics*, 9, 321-332, 2008, *Bioinformatics*, 26, 139-140, 2010)を使用し、得られたリード数から各遺伝子の発現を定量した。また、発現した遺伝子については、既知のアレルゲンとの比較(相同性検索)をデータベース上で行った。すなわち、80以上のアミノ酸残基で35%以上の相同性、及び、6~8アミノ酸残基の完全一致の条件(FAO/WHOガイドライン)で、アレルゲンを米国ネブラスカ大(FARRP)のAllergenOnlineデータベースより検索した。

4. リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

RNA-Seq 解析より得られたデータを基に、個々の遺伝子発現については ABI7900HT リアルタイム PCR システムを使用し定量した。遺伝子発現の定量は、RT-リアルタイム PCR 法より行った。上記同様に発芽ダイズより調製した 500 ng の精製 RNA を、逆転写酵素 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) と oligo dT20 のプライマーを使用して 20 μ L の反応液中で逆転写反応を行い、cDNA を合成した。遺伝子発現の定量は、2 μ l の cDNA を鋳型に、QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) を用いたリアルタイム PCR 法により行った。プライマーは、exon-intron 間でスプライシング標的境界領域に設定した。PCR 反応液は、2 \times QuantiTect SYBR® Green PCR master mix 10 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.2 μ L を混合し、cDNA 試料液 0.5 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 20 μ L に調製した。PCR 反応条件は、50 で 2 分間、95 で 10 分間加温し、その後、95 15 秒、60 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応とした。リファレンス遺伝子の発現解析には、ダイズ由来内在性遺伝子 *Actin* の発現を検知するプライマー対を使用した。選定したターゲットフラグメントの参照元配

列を参考にプライマー設計を行った。Feature ID を The Samuel Roberts Noble Foundation の HP 内におけるマメ科ゲノムデータベース LegumeIP で検索し、ヒットした参照配列より CDS とゲノム中の遺伝子構造の情報を得た (URL <http://plantgrn.noble.org/LegumeIPv2/index.jsp>)。次に、RT-PCR プライマーの設計元配列を得るため、イントロンを含む 500 ~ 3000 bp をターゲットとしたプライマーを作成した。プライマーの設計は、primer3 プログラムを用いた。尚、遺伝子構造に関してはデータベースのものと次世代シーケンスより得られたコンティグをもとにした遺伝子構造と食い違っているものもみられるため、両方で構造が一致している部分を標的に検知した。

各種遺伝子 (温度差のある遺伝子 no.2 ~ 6、品種間で差のある遺伝子 no.1 ~ 3 及び発現差定量のコントロール遺伝子 *Actin*) の発現量を定量するために使用したプライマー配列は、以下の通りである。

Actin (*BMC Mol Biol*, 10, 93, 2009) :

5'-ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC-3'

5'-GCTGGTCCTGGCTGTCTCC-3'

温度 no.2:

5'-CGGAAAGGAGGAGATTGTGG-3',

5'-CACCTGCCGCTTCTATCCTC-3'

温度 no.3:

5'-ACATTGCCTTGCACCCTTG-3',

5'- GATCTTTGTCCCCTTTTTCCAC-3'

温度 no.4:

5'- GGCTTCCAATCCAAGAACGA-3',

5'- TCCCATGTTGATCCCTTTGA-3'

温度 no.5:

5'- ACCGACGCCGACTGTTTTAC-3',

5'- TGCTTCGCTCTCGTCAGAAC-3'

温度 no.6:

5'- CTCGATGCTGCTGGAAACAC-3',

5'- TGTTTTGATGCCTGCTCTGC-3'

品種 no.1:

5'- GAAAAGGTGATTGGAGGGGTA-3',

5'- GCTAATTGGATTTGTGATGTCG-3'

品種 no.2:

5'-TGACTTCAAGAACCCCAACC-3',

5'-GACAAGGTCACATCATCCTCAA-3'

品種 no.3:

5'- TGACTTCAAGAACCCCAACC-3',

5'- GGTCCAGCTTCACAATATTTATCA-3'

温度 no.2~6 は、27 発芽サンプルの発現量を 1 とした場合の 40 サンプルの相対発現量を比較するために使用し、品種 no.1~3 は、アメリカ産サンプルにおける発現量をリファレンスとした場合のカナダ産サンプルの相対発現量を比較するために使用した。

5. PCR を使用したゲノム DNA 配列の検出

ダイズのゲノム DNA は、発芽ダイズ種子 10 粒ほどをボールミル (MM200 Retch)

で粉碎し、粉末状試料 20 mg を分取し、QIAGEN DNeasy plant mini kit を用いて精製したものを使用した。標的配列の増幅断片長によって 2 種類の PCR 反応を使用して行った。標的アンプリコンの長さが 500~1500 bp の場合、PCR 反応液は、25 μ L/well として、組成は以下のとおり調製した。10xExTaqBuffer (Mg^{2+}) 10 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 3 μ L、2.5 mM dNTP 5 μ L、DNA 試料液 50 ng を添加し、ExTaq 1U を加え、滅菌蒸留水で全量 25 μ L となるよう調製した。反応条件は、50 で 2 分間、95 で 10 分間加温し、その後、95 15 秒、60 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。標的アンプリコンの長さが 2000~3000 bp の場合、PCR 反応液は、25 μ L/well として、組成は以下のとおり調製した。10xLATAqBuffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 3 μ L、2.5 mM dNTP 4 μ L、DNA 試料液 50 ng を添加し、LATAq HS 1U を加え、滅菌蒸留水で全量 25 μ L となるよう調製した。反応条件は、94 で 1 分間、98 で 10 秒、50 で 30 秒、その後、72 1 分/kb を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った。

6. プロテオーム解析用の試料調製

6.1. 分析試料

発芽ダイズ（非 GM 品種 Williams と Jack、及び、GM 品種 Williams）は、解析するまでの間、-80 で保存した。

6.2. 試料粉碎と沈殿処理

ダイズの各品種より 1 粒ずつを液体窒素中で凍結し、乳鉢を用いて別々に粉碎した。粉碎物を、10%トリクロロ酢酸と 0.07% 2-メルカプトエタノールを含むアセトン溶液 8 mL に懸濁した。懸濁液を 10-mL 遠沈管に回収し、-20 で 45 分間静置した。遠心分離（35,000×g、0、15 分間）してから上清を除いた。沈殿は 0.07% 2-メルカプトエタノールを含むアセトン溶液で 3 回洗浄した。洗浄後の沈殿を凍結乾燥して粉末試料を得た。

6.3. 粉末試料からのタンパク質抽出

粉末試料から 3 mg を 1.5-mL マイクロ容器に分取した。分取した粉末に抽出溶液 [6 M 尿素、2 M チオ尿素、60 mM ジチオトレイトール (DTT)、100 mM 重炭酸アンモニウム、pH 8.8] を 100 µL 加え、攪拌しながら 37 で 1 時間保温した。その後、遠心分離（15,000×g、20、15 分間）し、タンパク質を含む上清を回収した。

6.4. タンパク質濃度測定

回収した上清の一部を、Bradford 法による総タンパク質定量に供した。定量用の

検量線は、ウシ血清アルブミンの溶液を段階希釈して作成した。

6.5. トリプシンによる試料タンパク質の加水分解

試料溶解液から総タンパク質 50 µg 分を 1.5-mL マイクロ容器に分取した。分取液に DTT を加え 37 で 30 分間保温し、続いてヨードアセトアミドを加えてから室温で 1 時間静置した（還元アルキル化処理）。処理後の溶液に 100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、溶液の尿素濃度を 2 M まで下げた。最後にトリプシン 2.5 µg を加え、37 で 16 時間保温して加水分解反応を行った。反応後のペプチド溶液には C18 STAGE Tip による脱塩処理を施した（Anal. Chem., 75, 663-70, 2003）。脱塩後の試料を減圧下で乾燥した。

6.6. LC-MS/MS

乾燥状態のペプチド試料を、水、アセトニトリル、及び、トリフルオロ酢酸からなる溶媒（体積比 98:2:0.1）に溶解した。出発総タンパク質量に換算して 200 ng 相当量を LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS システムの仕様と設定条件は、下記に示す。

LC : Ultimate3000 液体クロマトグラフ（ダイオネクス社）

・分析用 C18 カラム (Tip column): Nano HPLC Capillary Column (粒径 3 μm 、内径 75 μm 、長さ 15 cm、日京テクノス株式会社)

・移動相 A の組成 : [水] : [アセトニトリル] : [ギ酸] = 98:2:0.1 (体積比)

・移動相 B の組成 : [水] : [アセトニトリル] : [ギ酸] = 5:95:0.1 (体積比)

・アセトニトリル送液勾配 (分, %B, %アセトニトリル) : (0, 2, 3.86) \rightarrow (5, 2, 3.86) \rightarrow (120, 33, 32.69) \rightarrow (120.01, 95, 90.35) \rightarrow (130, 95, 90.35) \rightarrow (130.01, 2, 3.86) \rightarrow (145, 2, 3.86)

・流速 : 毎分 350 nL

MS/MS : Q Exactive 質量分析計 (サーマフィッシャーサイエンティフィック)

・イオンモード : 陽イオンモード

・イオントランスファーキャピラリーの設定温度 : 250

・FullScan の m/z 走査範囲 (Scan range) : 300 ~ 1,500

・質量分解能 (Resolution) : 70000 (MS), 17500 (MS/MS)

・Lock Mass : Or(Reference m/z = 391.28429, 445.12003)

・測定条件ファイル : 「 Top 10 Method 」を用いた。すなわち、FullScan (m/z 300 ~ 1500) の質量スペクトルの上で、検出強度の高いピークから順に 10 個の MS/MS デー

タを取得した。この FullScan と MS/MS データの取得を交互に実施するよう測定変数を設定した。前の試料由来のペプチドの検出 (キャリーオーバー) を抑えるため、各試料の測定の間それぞれ 3 回分の空測定を挿入した。

6.7. 配列データベース検索によるペプチド/タンパク質の同定

MS/MS データを配列データベース検索に供した。検索ソフトウェアとして Matrix Science 社の Mascot (ver. 2.5; <http://www.matrixscience.com/>) を用いた。検索用配列データセットは下記のとおり 4 種類作成しアノテーションに用いた。

CDS (Glycine max) : ダイズ CDS の配列データセット (計 73,319 件) に、3 種類の配列 [Bialaphos resistant gene (bar) Enhanced green-fluorescent protein (eGFP) 及び、lysyl-tRNA synthetase (SYNC1)] を加えて構築した。

Uniprot (Glycine max) : Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) から出力したダイズ (Glycine max) のアミノ酸配列データベース (reference proteome set) 計 66,206 件 (<http://www.uniprot.org/proteomes/UP000008827>) に、上記と同様 3 種類の配列 (bar、

eGFP、及び、SYNC1)を加えて構築した。

Uniprot/SwissProt (Green Plants):

Uniprot/SwissProt (http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/)2016_01 版(計 550,299 件)から Green Plants に分類されるタンパク質配列を抜粋した (計 37,228 件)

NCBI/Genome (*Glycine max*): NCBI Genome データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) から出力したダイズ (*Glycine max*) のアミノ酸配列データベース (計 71,526 件) に、上記と同様 3 種類の配列 (bar、eGFP、及び、SYNC1) を加えて構築した。

データベース検索の条件は次の通り :

Enzyme, Semi Trypsin

Maximum missed cleavage, 2

Peptide tolerance, ± 5 ppm

MS/MS tolerance, ± 0.02 Da

Mass, monoisotopic mass

Fixed Modification, Carbamidomethyl (C, +57.021)

Variable Modification, Oxidation (M, +15.995)

有意なペプチド同定は、False discovery rate (FDR) を指標にして選定した。すな

わち、FDR が 1% になるようにペプチド同定のスコア閾値を調整した。

6.8. ペプチドの同定情報と検出強度値の連結

各試料から得られた LC-MS/MS のデータを Nonlinear Dynamics 社の Progenesis QI for proteomics (ver. 2.0; <http://www.nonlinear.com>) に入力し、各検出ピークの強度値を取得した。続いて、ペプチドの同定情報を各検出ピークに連結し、連結された検出ピークの強度を当該ペプチドの検出強度とした。また、タンパク質の計量値は、各タンパク質に帰属するユニークペプチドの検出強度の積算値とした。

C. 研究結果

1. 発芽ダイズと RNA-Seq 解析用サンプルの調製

初年度では、発芽の条件を検討した。発芽ダイズ食品生産の際に使用される発芽条件「発芽ダイズ加工食品及び前記食品の製造方法」(特開 2006-345708) 下で発芽させた場合、27、又は、40 で培養することで腐敗が進行することが判った。滅菌シャーレ 中で無菌環境で培養したダイズは、腐敗することなく発芽した。次に、トータル RNA の抽出精製法について検討を行った。発芽ダイズ 1 粒、又は、5 粒よ

りトータル RNA を抽出し、精製された RNA の評価を行った。その結果、発芽サイズ 1 粒より 10~75 μg 、5 粒より 140~411 μg が精製された。精製度は、いずれのサンプルも $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ は 2.10~2.18、 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ は 1.32~2.26 であり、高い精製度であることが示唆された。また、バイオアナライザーのエレクトロフェログラムより、RNA サンプルのクオリティーを示す RIN 値を算出した。その結果、いずれのサンプルも 7 であったため、RNA の分解は進んでいないものであることが示唆された。得られたトータル RNA から mRNA を oligo dT により mRNA を精製し、RNA-Seq ライブラリー (5 plex) のサンプルを作成後、RNA-Seq 解析を行った。まず、次世代シーケンサーより得られたリードのトリミングを行った。次世代シーケンシングデータ解析用ソフト Genomic Workbench ver.8.5.1 を使用し、得られたデータ (ペアエンド・リード) のトリミングを行った。その結果、アメリカ産 GL3494 (珠美人) 品種では、78,843,604 リード (27 発芽条件) と 72,260,274 リード (40 発芽条件)、カナダ産 一般白目大豆 OAC Kent 品種では、76,550,425 リード (27 発芽条件) と 71,928,417 リード (40 発芽条件)、Williams 品種では、71,209,645 リード (40 発芽条件) のデータセットが得られた。平均 101 base の全リード数の 99.6% 以上 (7 千万以

上のリード数) の配列がトリミング後に残り、リード長も 99.7 base が得られた。この結果から、RNA-Seq 解析を行うための十分なクオリティーを有したリード数をデータとして得ることができたと判断された。

最終年度では、初年度に検討した発芽条件、及び、トータル RNA の抽出・精製法を用いて、非 GM、及び、GM 品種のサイズの試料調製を行った。5 品種 (カナダ産、アメリカ産、Jack 品種、Williams 品種、GM Williams 品種) を発芽させ、発芽させた各品種 2 粒ずつを選択し、それぞれ 1 粒からトータル RNA を抽出精製した。その結果、2.29~37.69 μg のトータル RNA を得た。得られたトータル RNA の吸光度比は、 A_{260}/A_{280} 2.06~2.24 と A_{260}/A_{230} 0.37~2.06、及び、RIN 値は、7.1~8.4 であった。この結果より、トータル RNA は、非常に高い回収量と精製度で、得られたことが確認された。抽出精製を行ったトータル RNA を試料に、RNA-Seq 用サンプルの調製を行った。Oligo (dT) を使用して、トータル RNA より mRNA を単離後、逆転写させ cDNA を合成し、両末端側にアダプター配列とインデックスタグを付加した後、Illumina HiSeq2500 を使用してシーケンシング解析を行った。その結果、Raw read のクオリティー値の閾値を Q20 として設定した結果、全リード中の塩基数として 97.64~98.38%、又は、全リード中のリー

ド数として 98.62 ~ 98.89% (44,034,849 ~ 60,574,989 リード) 使用することが可能であった。この結果から、本研究で開発した発芽ダイズの試料調製法(**Scheme 1**、及び、**Scheme 2**) に従って調製したサンプルは、RNA-Seq へ十分に実用可能であることが確認された。

2. ダイズゲノム塩基配列へのマッピング

得られたリードは、ダイズゲノム塩基配列(V1.0.28) をリファレンスにマッピングした。5種類のサンプル(アメリカ産 27 /40 、カナダ産 27 /40 、Williams 品種 40) より得られたリードをゲノムに最も高いアラインメントスコアを示す場所にマッピングすると同時に、マッピング後のデータを local realignment した。その結果、全ゲノムを網羅して、発現した遺伝子を同定することができた。

3. RNA-Seq 解析

RNA-Seq 解析より、発現した遺伝子のゲノム中に存在する位置(染色体別) と発現量を示すデータを得た。また、得られたリード配列は、データベース上に登録されている遺伝子情報を付加することでアノテーションした。データ情報をまとめた結果、アメリカ産の 27 発芽条件下では 2,115,935 リード、アメリカ産の 40 発芽条件下では 2,123,999 リード、カナダ産の

27 発芽条件下では 1,998,598 リード、カナダ産の 40 発芽条件下では 2,057,249 リード、Williams の 40 発芽条件下では 2,146,500 リードがダイズゲノム塩基配列へマッピングされた。マッピング結果より、発芽温度、及び、品種別において、発現パターンの違う遺伝子群が確認された。例として、16 番染色体上の GLYMA16G04770.3 遺伝子は、27 で発芽させた際にアメリカ産とカナダ産種子で発現するが、40 では発現しなかった。一方、同じく 16 番染色体上の GLYMA16G08570.1 遺伝子は、27 発芽条件下では発現しないが、40 発芽条件下では品種にかかわらず発現が検出された。また、品種、及び、発芽温度の違いに関係なく、一定の発現量を検出した遺伝子群も特定した。

4. サンプル間の発現差解析

4.1. 非 GM 品種間の発現差解析

サンプル間の遺伝子発現差解析では、得られたリードのカウントデータを使用し、データが負の二項分布に従うと仮定して平均値と dispersion を推定し、検定を行った。Genomic Workbench ソフトに搭載されている Empirical Analysis of DGE (proportional test) プログラムを使用して 2 群の比較検定を行った。また、27 と 40 で発芽させたカナダ産とアメリカ産の 2 種類の種子が同等のものと仮定して解析を

行った。条件の設定は、発現量があると仮定したカウント数を5リード数以上とした。27 で発芽させたサンプルをリファレンスに2倍量以上の差 ($p < 0.05$) のある遺伝子をリスト化した。その結果、12,722 遺伝子を特定することができた。最大の差は、染色体7番(5,415,828 ~ 5,421,767)に存在する遺伝子(GLYMA07G06750.2)で1,174倍の差(p 値 9.42×10^{-44})であった。遺伝子配列をBLASTn検索したところ、BAG family molecular chaperone regulator 6 (BAG6A), mRNA (GenBank accession no. XM_006583196.2)と100%相同性を示した。当該遺伝子の解析に関する報告は、植物では皆無であることが判った。またアメリカ産40発芽サンプルをリファレンスにカナダ産40発芽サンプルと比較し2倍量以上の差 ($p < 0.05$) のある8,418 遺伝子を特定した。最大の差は、染色体9番(19,201,064 ~ 19,203,101)に存在する遺伝子(GLYMA09G16090.1)で6,852倍の差(p 値 2.41×10^{-228})であった。遺伝子配列をBLASTn検索したところ、F-box/LRR-repeat protein 3-like (LOC100820469) (GenBank accession no. XR_415935)と100%相同性を示した。当該遺伝子の解析に関する報告は、植物では皆無であることが判った。

最終年度では、さらに品種間の発芽遺伝子発現量差について解析を行った。非GM品種間における発芽遺伝子の発現量の

差を解析するため、アメリカ品種、カナダ品種、Williams品種、及び、Jack品種の非GM4品種を試料に供した。その結果、アメリカ産をリファレンスにした場合、発現量の差600倍以上($p < 0.05$)ある遺伝子は、アメリカ産 vs カナダ産の場合、32 遺伝子(発現量差の最高値=15,220.93 倍、 p 値 9.58×10^{-23})、アメリカ産 vs Williams品種の場合、14 遺伝子(発現量差の最高値=6,920.15 倍、 p 値 3.72×10^{-27})、アメリカ産 vs Jack品種の場合、24 遺伝子(発現量差の最高値=8,765.89 倍、 p 値 5.24×10^{-25})検出された。また、Williams品種をリファレンスに、発現量差600倍以上($p < 0.05$)ある遺伝子は、Williams品種 vs アメリカ産の場合、11 遺伝子(発現量差の最高値=9,818.73 倍、 p 値 2.93×10^{-30})、Williams品種 vs カナダ産の場合、15 遺伝子(発現量差の最高値=12,060.30 倍、 p 値 1.68×10^{-32})、Williams品種 vs Jack品種の場合、16 遺伝子(発現量差の最高値=21,151.66 倍、 p 値 7.72×10^{-32})検出された。この結果から、転写レベルにおける発芽遺伝子発現パターンは、品種間で異なることが確認された。

4.2. 非GMとGM品種間の発現差解析

GMダイズは、ダイズ由来Lys-tRNA遺伝子(Sync1)、ピアラホス耐性遺伝子(BAR)及び、ever green fluorescent protein

遺伝子 (*EGFP*) を高発現させるよう構築したトランスジェニックベクターを非 GM Williams 品種 (非 GM ダイズ) ヘトランスフェクションしたものである。GM ダイズのトランスジェニック構造配列は、ホモ型でゲノム中に1か所のみ導入されたことを確認した。開発した GM ダイズと非 GM ダイズに発現する発芽遺伝子を比較するため、RNA-Seq は、それぞれ2粒ずつを試料に供した。その結果、トリミング後に得られたリード数は、非 GM ダイズで (種子 G, 43,843,369 リード、種子 H, 53,372,808) GM ダイズで (種子 I, 56,974,554 リード、種子 J, 49,153,651 リード) であった。それぞれのリードは、ダイズリファレンスゲノム v.1.01 にマッピングし、リアラインメント後のデータを得た。そのデータより、品種間で2倍以上の差 ($p < 0.05$) のある発芽遺伝子を検出した。非 GM ダイズの種子間で発現量の差の高い上位20位の遺伝子と、非 GM ダイズと GM ダイズの種子間で発現量差の高い上位20位の遺伝子をそれぞれ選抜した。その結果、染色体6番 (配列番号 47071378 ~ 47075313) に存在する遺伝子 GLYMA06G44091.1 は、非 GM ダイズ間で最も発現量の差が高く 613.48 倍 (p 値 $= 1.76 \times 10^{-46}$) の差を検出した。また、非 GM

ダイズと GM ダイズを比較して最も発現量の差が高かった染色体11番 (10078670 ~ 10082298) に存在する遺伝子 GLYMA11G14040.2 は、519.19 倍 (p 値 $= 9.72 \times 10^{-12}$) の差を検出した。種子間の発現量差として最も高い遺伝子は、最大613.48倍であった。以上の結果より、種子間で変動が見られる発芽遺伝子の発現量差は、edgeR ソフトウェアで算出した場合、約600倍以下で検出されることが示唆された。

5. RT-リアルタイム PCR による遺伝子発現差解析の確認

初年度では、RNA-Seq 解析の結果より、27 と 40 で発現させた際の発現量の差のある遺伝子リストから、遺伝子をランダムに選択し、数十倍の差の遺伝子 (GLYMA01G43460.2 [温度 No.2] と GLYMA15G08420.1 [温度 No.3]) と数百倍の差の遺伝子 (GLYMA19G34031.1 [温度 No.5]) の発現量の定量を RT-リアルタイム PCR より行った。まず、アメリカ産品種ゲノム中の No.2、No.3、No.5 遺伝子のゲノム配列をシーケンシングした結果、すべての遺伝子において配列はリファレンス配列と完全に一致した。シーケンシングした配列を基に、リアルタイム PCR 定量用のプライマー配列を設計した。RNA-Seq 解析

の結果、温度 No.2、No.3、No.5 遺伝子の発現量はそれぞれ 75.16 倍、92.98 倍、363.66 倍の差が検出された。RT-リアルタイム PCR により、発現量比を定量したところ、温度 No.2、No.3、No.5 遺伝子の発現量はそれぞれ 26.21 ± 5.35 倍、 556.42 ± 364.59 倍、 666.37 ± 880.91 倍の差が検出された。RT-PCR より算出された発現量の差は RNA-Seq 解析の No.2 遺伝子で 35%、No.3 遺伝子で 598%、No.5 遺伝子で 183%であった。

RNA-Seq 解析の結果より、アメリカ産品種と比較し、カナダ産品種において発現量に 637.96 倍の違いのある遺伝子 GLYMA17G18930.1 の RT-リアルタイム PCR 定量を行った。まず、アメリカ産及びカナダ産品種においてゲノム配列をシーケンシングしたところ、データベース上のリファレンス配列と完全一致した。遺伝子発現定量を行った結果、アメリカ産品種の遺伝子発現量は、カナダ産品種では 55327.40 倍、Williams 品種では 28452.20 倍の発現量の差が検出された。

最終年度では、品種間における発芽遺伝子量の差を、RT-PCR を用いて確認した。まず、RT-PCR 用のプライマー対は、アノテーション情報を基にスプライシングサイトを同定し、イントロン配列を挟んだエキソン領域の塩基配列を標的とした。発芽ダイズより調製した cDNA を鋳型に、PCR

を行いダイレクトシーケンシングしたところ、アノテーション情報通りのスプライシング位置と成熟 mRNA 配列を確認した。各品種より調製した cDNA サンプルは、設計したプライマー対を使用して RT-PCR 試験に供した。すべての cDNA サンプルは、リファレンス陽性コントロールとして Act1 遺伝子の発現を検出した。遺伝子 GLYMA17G18930.1 (品種 No5) の発現量は、アメリカ産のみ定性的に確認されなかった。また、この結果は、RNA-Seq のリード配列をゲノム上にマッピングし、トラッキングで示した結果と合致した。

また、RNA-Seq の結果より、遺伝子 GLYMA12G09400.1 は、Williams 品種をリファレンスとした場合、アメリカ産は 1403.12 倍、カナダ産は 3565.85 倍、Jack 品種は 2070.67 倍の差を検出した。遺伝子 GLYMA12G09400.1 の発現を特異的に検知する RT-PCR 用プライマー対を使用して、RT-PCR 試験に供したところ、Williams 品種のみ発現が確認されなかった。この結果は、RNA-Seq で得られた結果と合致した。

6. アレルゲンデータベースなどの既存のデータベースとバッチ解析を行う方法の検討

遺伝子発現量の差のある遺伝子の配列リストを基に、その遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列リストを得た。

ダイズ cDNA 配列 (V1.0.30) の FASTA フォーマットデータは、「EnsemblPlants」

(http://plants.ensembl.org/Glycine_max/Info/Index) よりダイズ cds 配列

(ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-30/fasta/glycine_max) の取得を行った。cds 配列は、タンパク質への翻訳をソフト上で行い、配列を得た。(ファイル名: Glycine_max.V1.0.30.cds.all_translations) 得られたファイルは、「Sequence CSV」フォーマットで export した。保存したアミノ酸配列リストは、エクセル上で遺伝子発現量の変化のあった遺伝子リストと照合を行った。データ照合の無い遺伝子に関しては、「EnsemblPlants」のデータベースを参照して、アミノ酸配列を取得した。得られたすべての遺伝子翻訳後のアミノ酸配列は、データベース上に登録されているアレルゲン配列との照合を行った。発現量差のある遺伝子については既知のアレルゲンとの比較(相同性検索)をデータベース上で行った。すなわち、80以上のアミノ酸残基で35%以上の相同性、及び、6~8アミノ酸残基の完全一致の条件(FAO/WHOガイドライン)でアレルゲン性を検索した。アレルゲンの検索サイトには、University of Nebraska-Lincoln が運営する「AllergenOnline」と国立衛研が運営する「ADFS」を使用した。「AllergenOnline」では、FASTA format よりアレルゲンデータベ

ースを検索可能であることが確認された。

7. アノテーションされていない新規遺伝子のリスト化

RNA-Seq で遺伝子領域にマッピングされてなかったリードのリスト化を行った。まず、ダイズゲノムにマッピングされたリードの除去を行った。アメリカ産40発芽種子より得られたデータ(CTTGTA タグ配列)を例に用いて、RNA-Seq Analysis ツールにて、遺伝子の領域のみマッピングを行い、その際に作成される Un-mapped reads データを作成した。Unmapped リードの中から再度ゲノムへマッピングされた配列を得た。RNA-Seq Analysis ツールで「Also map to inter-genic regions」を選択して、再度、マッピングを行った。遺伝子アノテーションされていない領域の配列をFASTA フォーマットで得ることができた。

次に得られた配列の reading frame (+1 ~ +3 または -1 ~ -3) を選択して、ペプチドのアミノ酸配列を得た。その配列を、Genomic Workbench より Sequence CSV フォーマットで Export して、テキストもしくはエクセル上で表示させた。その結果、リーディングフレームを 5' 及び 3' 側から両方に翻訳されるアミノ酸を全て推測したペプチド配列のリストが得られた。

8 LC-MS/MS を使用したプロテオームデー

タとの比較

8.1. LC-MS/MS

各試料の LC-MS/MS データから抜き出した Total ion current (TIC) クロマトグラムについては、各試料ともに類似の TIC クロマトグラムが得られた。この結果から、試料調製から LC-MS/MS までの各工程が一樣に行われたと判断した。

8.2. ペプチドおよびタンパク質の同定

各試料から取得した MS/MS データを 4 種類の配列データベースと照合した。照合以降の解析は、配列データセットごとにまとめて行った。ペプチドの同定情報に連結されたピークの数、同定タンパク質の数および計量値を算出したタンパク質の数をデータベース毎に列挙した。同定数は、CDS (*Glycine max*)、Uniprot (*Glycine max*) および NCBI (*Glycine max*) の間に大差はなかったが、Uniprot (*Green plants*) では他の 2 つよりも少なかった。そこで、以降の解析には、各タンパク質名の情報が含まれる Uniprot (*Glycine max*) のデータベースセットを用いた。また、GM で過剰発現していることがわかっている 3 種類のタンパク質 [Bialaphos resistant gene (Bar), Enhanced green-fluorescent protein (eGFP) および lysyl-tRNA synthetase (SYNC1)] のうち、今回の分析では eGFP、及び、SYNC1 が同定された。また、RNAseq 解

析で変動を示した 16 種類の遺伝子

(GLYMA_02G03250.1, GLYMA_0892S50.1, GLYMA_03G07121.1, GLYMA_02_G10320.1, GLYMA_12G13090.1, GLYMA_01G30060.1, GLYMA_11G15310.1, GLYMA_12G09400.1, GLYMA_02G03230.1, GLYMA_18G08015.1, GLYMA_03G05730.2, GLYMA_13G37101.1, GLYMA_16G24590.1, GLYMA_08G03381.2, GLYMA_20G27410.1, GLYMA_03G06976.1) のうち、GLYMA_02G10320.1 のみが同定された。

5.3. タンパク質の計量値の比較

「帰属ユニークペプチドの検出強度を足し合わせて各タンパク質の計量値を算出した。同定されたタンパク質のうち、ユニークペプチドが同定されなかったタンパク質については計量値を算出しなかった。この計量値情報をもとにして、Jack/Williams 間、および Jack/GM 間におけるタンパク質倍数値 (Fold) - 計量値の散布図を作成した。両グラフを比較すると Jack/Williams 間の変動は、より小さい傾向にあった。

Jack/Williams と GM/Williams の各々について、倍数値が 4 倍以上、1/4 以下のタンパク質をそれぞれ抜粋した。このうち、GM/Williams における SYNK1 の倍数値は 300.11 倍、eGFP の倍数値は 54.61 倍であった。RNA-Seq 解析で変動を示した 16 種類の遺伝子のひとつ、GLYMA02G10320.1 にタンパク質レベルで有意な差は認められなかった (倍数値 1.06 倍)。

D. 考察

初年度は、GM サイズと非 GM サイズの発芽遺伝子の発現に関する比較を行うための発芽条件の検討、リファレンスデータの構築、並びに、RNA-Seq 解析法の開発を行った。

サンプル間の遺伝子発現量を統計学的に解析するためには、RNA-Seq による出力データ量を増やす必要がある。本研究では、1 サンプルあたり 7,000 万リードを出力データ量の目標とした。出力データ中の非特異的なリード数を極力抑える解析プロトコルを作成する必要がある。これまでの結果から、種子を発芽させる際に細菌が増殖することが判った。よって、細菌由来のゲノム DNA、又は、RNA は、サイズ由来の RNA を抽出・精製する際にサンプル中に濃縮されてしまうことが考えられた。そのため本研究では、ガス滅菌した種子と滅菌水を使用して発芽させ、発芽ダイ

ズサンプル中の細菌の増殖を抑え、細菌由来のゲノム DNA 又は RNA の混入を防ぐ発芽プロトコルを構築した。

RNA-Seq より出力されるリードの数は、各遺伝子の発現量に比例すると仮定して、サンプル間の発現量を定量する際のデータとして使用する。そのため、mRNA の分解によりシーケンスリードの重複やゲノム配列へのマッピングができない様な問題を避けるため、発芽サイズの粉碎は、乳鉢・乳棒を使用して均一に粉碎し (液体窒素を利用して種子と器具を冷却する) 精製 RNA の分解を防ぐプロトコルを構築する必要がある。また、RNA 精製時に、DNaseI を使用してゲノム DNA を完全に分解し、ゲノム DNA の RNA サンプルへの混入を防ぐ必要がある。本研究では、以上を踏まえた RNA-Seq 用の試料調製プロトコルを開発した。

RNA-Seq 解析の結果、27 と 40 で発芽させた際の温度差によって 2 倍以上 ($p < 0.05$) 発現量の差のある 12,722 遺伝子を検出した。最大の発現量の差のある遺伝子 (GLYMA07G06750.2) は、1,174 倍 (p 値 9.42×10^{-44}) であった。75 ~ 364 倍の差のあった 3 種類の遺伝子を RT-リアルタイム PCR より定量した結果、RNA-Seq 解析で得られた発現の差が確認された。また、発芽温度も含め一定の環境下で発芽させたサイズの品種間においても 2 倍以上の差

($p < 0.05$)のある 8,418 遺伝子が検出され、RT-リアルタイム PCR において発現の差が確認された。

本研究で検出された、発現量の差のある遺伝子については、発現するタンパク質のアミノ酸配列を既存のアレルゲンデータベースとバッチ比較した。「AllergenOnline」を使用することで、RNA-Seq 解析から得られる FASTA format のデータよりアレルゲンデータベースで相同性のある既知アレルゲンを検索可能であった。アノテーションされていないリード配列から、新規遺伝子の発現に関する新しい知見が得られた。また、サンプル間の遺伝子発現量の比較情報を基に、リアルタイム PCR 定量用プライマー対の設計が可能であることが示された。

最終年度では、RNA-Seq、並びに、LC-MS/MS 解析を行い、様々な非 GM サイズ品種と比較する際の基盤となるデータを構築した。まず、発芽条件の検討を行った。発芽条件を一定に保つよう設定したが、サイズ品種間、又は、粒間における遺伝子発現量の差 (edgeR ソフトウェア算出値で 600 倍程度) を検出した。これは、発芽サイズの解析には、品種を揃え、複数粒の発芽サイズをサンプルに用いる必要性を示唆した。よって、非 GM と GM 品種間の遺伝子発現量を解析する際には、同一品種を使用したデータを構築する必要がある。

なお、600 倍以下の発現差のある遺伝子については、非 GM と GM 種子間の遺伝子発現差を検出した際にも検出された。本研究では、RNA-Seq と RT-PCR のデータは定性的に合致した。GM 品種において、非 GM 品種と比較し、発現差のある遺伝子の検出を試みる場合、遺伝子発現量差の閾値 (>600 倍) を設定し、それ以上の差のある遺伝子については、個々に RT-PCR 法等を用いて精査する必要がある。

RNA-Seq は、得られたリード配列から発芽遺伝子の特定と定量が可能であるが、発芽遺伝子の場合、種子粒、及び、品種間の発現量の違いを検出する必要がある。また、各遺伝子の発現量比を算出する場合、スプライシングバリエーションや、サイズのアノテーション情報の不完全性から、RNA-Seq を使用し全ゲノムを網羅した遺伝子の発現量の定量は、現時点では不可能であると考えられた。よって、RNA-Seq は、発芽遺伝子の「スクリーニング」に適していると考えられた。また、RNA-Seq より得られるデータは、遺伝子のスプライシング位置を、ゲノム配列上で特定することが可能であることから、RNA-Seq は、RT-PCR 用の特異的プライマーを設計する有効なツールであることも示唆された。

本研究では、発芽サイズのプロテオーム解析を実施するため、LC-MS/MS 解析を行った。eGFP は GM サイズ品種のみ組換

えタンパク質として発現させているが、他の非 GM2 品種でも GM の 100 分の 1 程度の検出強度が得られていた。これは、タンパク質分離に使用した HPLC カラムに吸着したタンパクの洗浄が不足「キャリアオーバー」として検出されていたと考えられた。よって、測定系の検討では、測定試料の「キャリアオーバー」が無視できる程度であることを確かめる必要があった（データ非開示）。また、1 回目の試料は各系統とも複数の発芽ダイズ粒を一つの容器内で凍結保存したため、保存・輸送中に根、又は、芽がダイズ本体から脱落する可能性があった。そのため、発芽ダイズは、1 粒ずつ容器に入れて、試料調製の際には脱落した芽と根をともに破碎できるようにした。LC-MS/MS を使用したプロテオーム解析の結果、GM 品種は Williams 品種の遺伝子を改変して作成された系統なので、両者のタンパク質発現が類似していることが予想されたが、倍数值-検出強度の分布図はむしろ Jack と Williams との類似を示していた。また、RNA-Seq と LC-MS/MS にて検出された発現量差のある発芽遺伝子群の相関性は確認されなかった。これは、転写レベルと翻訳レベルの発芽遺伝子のプロセッシングの違い、又は、発芽ダイズ中に存在するタンパク質を検出する機器等の性能の違いを示唆した。

E. 結論

RNA-Seq は、各発芽遺伝子の発現量や発芽遺伝子の特定をスクリーニングする方法として有効なツールの一つであることが確認された。しかし、発芽ダイズの RNA-Seq を行う場合は、同じ品種間で発芽時の環境を揃える必要があり、発現量の再現性の検証、及び、統計学的なデータの処理のため、1 サンプルにつき 2 粒以上からトータル RNA を抽出精製し分析する必要があった。Scheme 3 は、発芽ダイズの RNA-Seq 解析を行う際の工程を示す。発現量の確実な定量値の算出に関しては、各遺伝子に特異的な RT-PCR を行う必要があった。発芽遺伝子から発現すると予想されるタンパク質のアミノ酸配列は、アレルゲンデータベースなどのデータと照合し、既知アレルゲンとの相関性検索に使用する事が可能であった。また、ダイズの未知の発芽遺伝子を複数特定し、発現するタンパク質のアミノ酸配列予測を行うことができた。RNA-Seq を用いたトランスクリプトームデータと LC-MS/MS を用いたプロテオームデータの、定性・定量的な相関性は確認されなかった。これは、転写レベルと翻訳レベルの発芽遺伝子のプロセッシングの違い、又は、発芽ダイズ中に存在するタンパク質を検出する機器等の性能の違いを示唆した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

- 1) Miyahara, T., Miyake, N., Sawahuji, K., Kitta, K., Nakamura, K., Kondo, K., Ozeki, Y. Wheat DNA fragmentation of commercial processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 23, 141-148, 2016.
- 2) Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., & Nishimaki-Mogami, T. Interlaboratory validation data on real-time polymerase chain reaction detection for unauthorized genetically modified papaya line PRSV-YK. *Data in Brief*, 7, 1165-1170, 2016.
- 3) Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T. Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya

for development of a specific detection method. *Food Chemistry*, 205, 272-279, 2016.

- 4) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Sato-Fukuda, N., Ishigaki, T., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. Development and interlaboratory validation of a simple screening method for genetically modified maize using $\Delta\Delta Cq$ -based multiplex real-time PCR. *Analytical Chemistry*, 88, 4285-4293, 2016.
- 5) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H. Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via down-regulation of T helper 17 (Th17) cell responses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 1406-1410, 2015.

2. 学会発表

- 1) 中村公亮、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、加藤怜子、高畠令王奈、岸根、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子、近藤一成 : アクリルアミド産生低減並びに打撲黒班低減を目的に開発された遺伝子組換えジャガイモ (J3,

- F10, E12 系統)の検知法開発(第1報)、第53回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016年11月
- 2) 坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、石垣拓実、加藤怜子、近藤一成:ITS-RPB2領域を用いたクサウラベニタケ系統分類と中毒事例検体の分析、第53回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016年11月
 - 3) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、石垣拓実、加藤怜子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子、近藤一成:遺伝子組換えトウモロコシ粒検査法の簡易化、第53回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016年11月
 - 4) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、石垣拓実、加藤怜子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子、近藤一成:遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発(続報)、第112回日本食品衛生学会学術講演会、函館、2016年10月
 - 5) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、高畠令王奈、橘田和美:リアルタイムPCRを用いたDNA断片化測定法の開発と性能評価、AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2016年7月
 - 6) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、勝又啓史、高崎一人、布藤聡、坂田こずえ、福田のぞみ、真野潤一、橘田和美、田中秀典、明石良、最上(西巻)知子:安全性未審査の遺伝子組換えパパイア検知に向けた全ゲノムシーケンシング技術応用の検討について、日本食品化学学会 第22回 総会・学術大会、高知、2016年6月
 - 7) 石垣拓実、中村公亮、布施谷実聡、川上浩、近藤一成:ドライフルーツ食品を例とした、標的遺伝子コピー数の差に伴う内在性遺伝子の検出感度の違いについて、日本食品化学学会 第22回 総会・学術大会、高知、2016年6月
 - 8) 三宅奈穂、宮原平、沢藤ことは、中村公亮、近藤一成、小関良宏:小麦加工食品におけるゲノムDNA断片化の評価、日本食品化学学会 第22回 総会・学術大会、高知、2016年6月
 - 9) 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、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、最上(西巻)知子、高畠令王奈、橘田和美：デジタル PCR を用いた遺伝子組換えトウモロコシ簡易定量スクリーニング法の開発、第 111 回日本食品衛生学会 学術講演会、東京、2016 年 5 月
- 10) Nakamura, K., Ishigaki, T., Hanada, K., Akimoto, S., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. DNA methylation pattern analysis of common plant virus promoter used to develop genetically modified crops, PacifiChem2015, Hawaii, USA, 2015 年 12 月.
- 11) Kondo, K., Sakata, K., Noguchi, A., Nakamura, K., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. A new analytical methodology for unknown genetically modified organisms using linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR), 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015 年 11 月.
- 12) Kondo, K., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. Rapid identification of poisonous *Entoloma rhodopolium* and edible *E. sarcopum* mushrooms using PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR, 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015 年 11 月.
- 13) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：汎用性ウィルスプロモーター導入によるクロマチンループ内の内在性遺伝子発現への影響、日本薬学会 第 136 年会、横浜、2016 年 3 月
- 14) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、布施谷実聡、川上浩、田中秀典、明石良、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：我が国における未承認遺伝子組換えパパイアの食品への混入に関する事例と検知法開発の現状、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015 年 12 月
- 15) 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スク 52 回全国衛生化学技術協

- 議会年会、静岡、2015年12月
- 16) 福田(佐藤)のぞみ、近藤一成、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、最上(西巻)知子：遺伝毒性試験および全ゲノム解析を用いたCRISPR/Cas9のDNA二本鎖切断ポテンシャル、第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月
- 17) 坂田こずえ、近藤一成、野口秋雄、中村公亮、福田のぞみ、石垣拓実、最上(西巻)知子、LAM-PCRを用いた組換え作物中の未知領域解析法の検討、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 18) 野口秋雄、町井香苗、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 19) 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、青塚圭二、鈴木智宏、最上知子、手島玲子、近藤一成：ツキヨタケのPCR-RFLPを用いた迅速同定法の検討(第2法)：加熱、消化処理サンプルへの適用、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 20) 中村公亮、近藤一成、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-HN系統)の検出と検知法開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 21) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穠山浩、近藤一成、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：未承認遺伝子組換え食品検知法の開発：未承認遺伝子組換えジャガイモ検知を例に、第1回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、千葉、2015年9月
- 22) 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：食品遺伝子検査を簡易化するダイレクトリアルタイムPCR、2015年度AOAC International日本セクション年次大会、東京、2015年6月
- 23) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：次世代ゲノム編集技術による遺伝子組換え食品の内在性遺

伝子発現への影響、日本食品化学学会
第 21 回総会・学術大会、東京、2015
年 5 月

- 24) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上
(西巻) 知子: 遺伝子組換えヒヨコマ
メ検査法確立に向けたヒヨコマメ内
在性遺伝子 (CaNCED) 特異的検知法
の開発、日本食品化学学会 第 21 回
総会・学術大会、東京、2015 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

中村公亮、小林友子、近藤一成: 遺伝子組
換え植物の判定法、特開 2016-019480、公
開日: 2016 年 2 月 4 日.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

次世代シーケンサーを使用したゲノム解
析データのデータベースへの登録:

Nakamura, K., Takasaki, K. Genetically
modified papaya PRSV-YK genomic sequence
data, DDBJ Sequenced Read Archive
accession no. PRJDB3976 (Registration date:
8-Mar-2016).

平成27～28年度 研究成果の刊行に関する一覧表

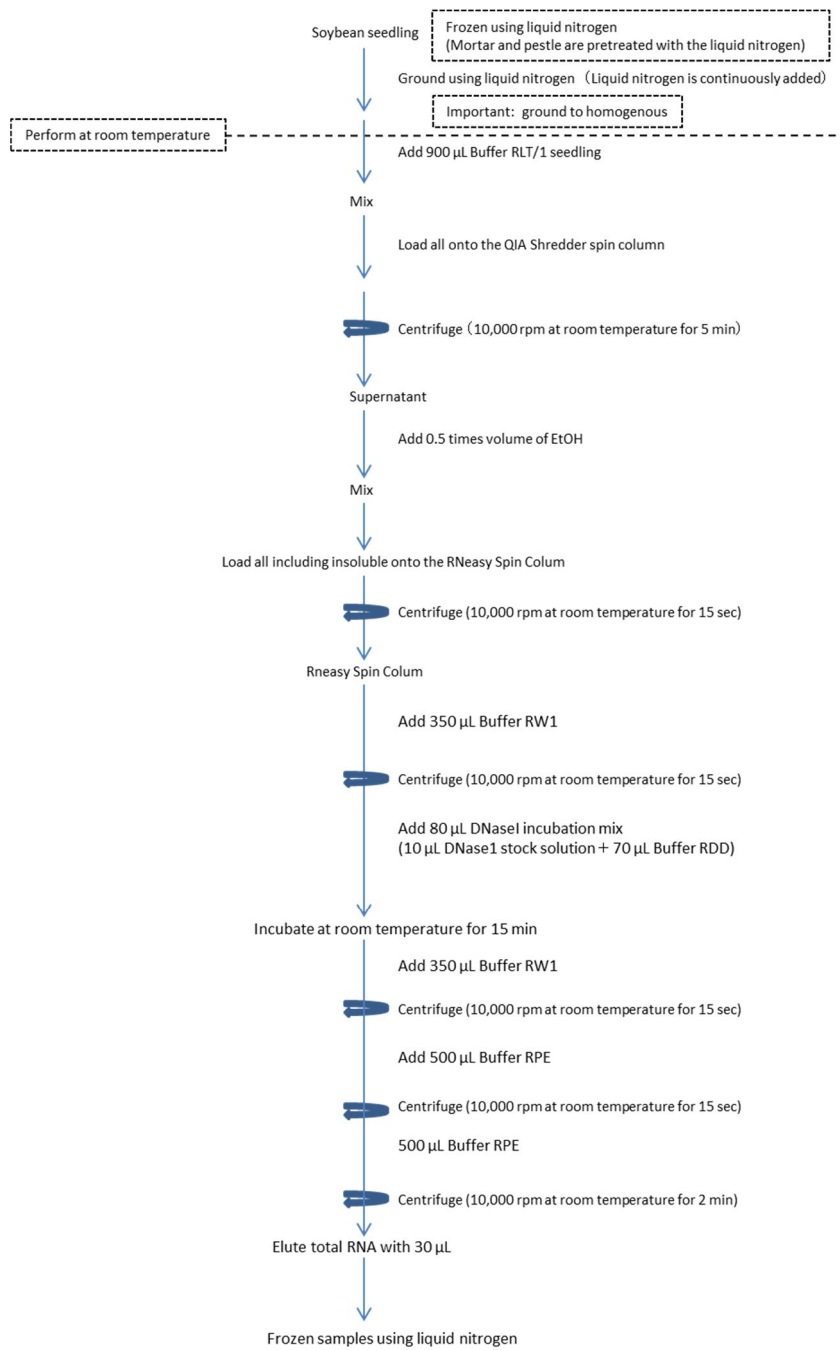
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

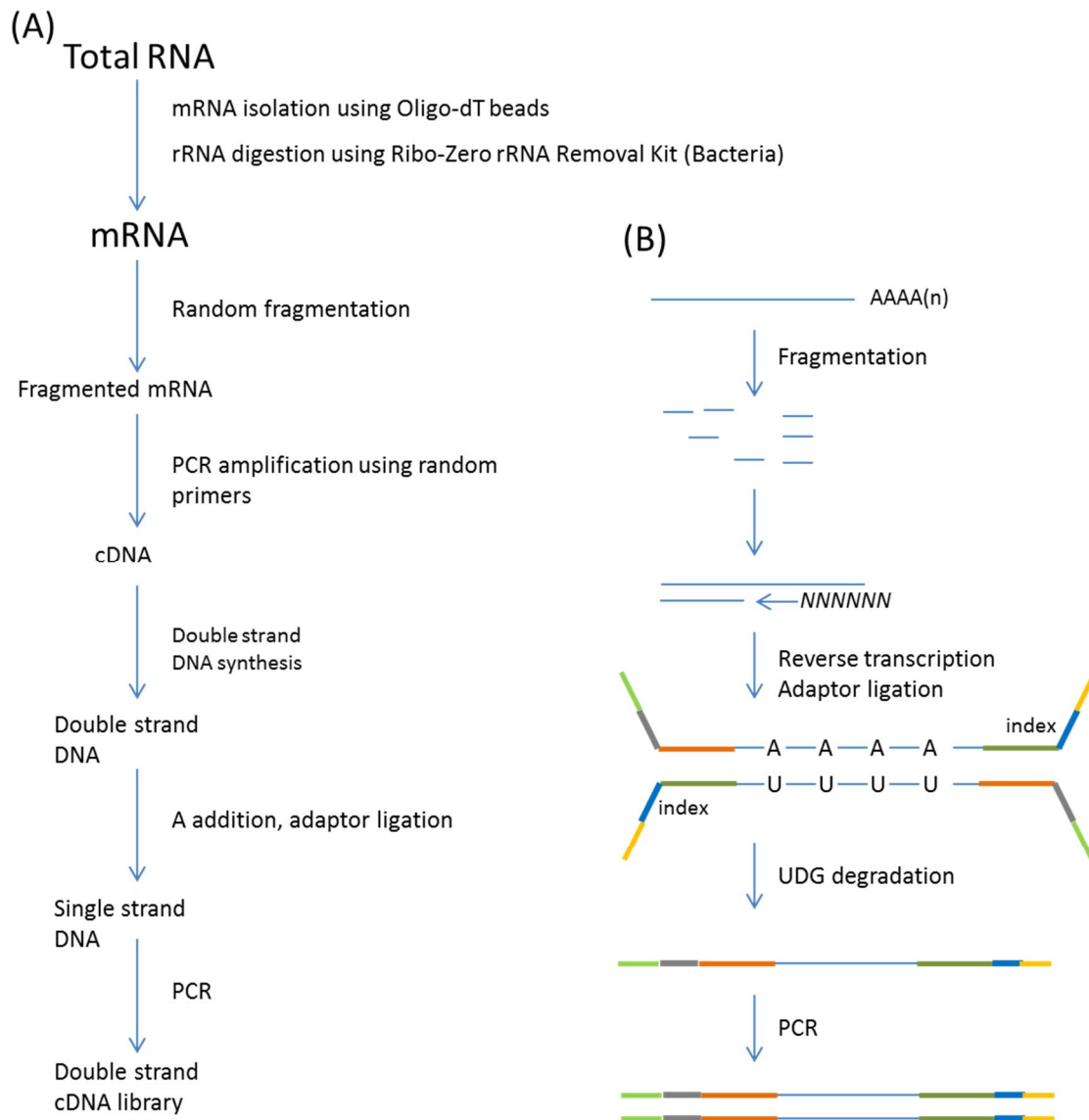
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H.	Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via down-regulation of T helper 17 (Th17) cell responses	Molecular Nutrition & Food Research	59	1406-1410	2015
Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T.	Interlaboratory study on unauthorized genetically modified papaya PRSV-YK real-time PCR detection method	Data in Brief	7	1165-1170	2016
Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T.	Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method	Food Chemistry	205	272-279	2016

Miyahara, T., Miyake, N., Sawahuji, K., Kitta, K., Nakamura, K., Kondo, K., Ozeki, Y.	Wheat DNA fragmentation of commercial processed foods	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	23	141-148	2016
Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Sato-Fukuda, N., Ishigaki, T., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T.	Development and interlaboratory validation of a simple screening method for genetically modified maize using $\Delta\Delta Cq$ -based multiplex real-time PCR	Analytical Chemistry	88	4285-4293	2016



Scheme1. Purification scheme for the total RNAs



Scheme 2. RNA-Seq sample preparation

(A) Experimental steps for double strand cDNA library preparation

(B) Schematic diagram for the double strand DNA preparation

- ・野生型品種、及び、種子粒間の発現差解析を行う
- ↓
- ・得られる最大上限fold値を閾値に設定する
- ↓
- ・閾値を超えた遺伝子については、RNA-Seq(リファレンスゲノムへのマッピング)データを参照し、差を定性的に確認する
- ↓
- ・検出エラーでないものは、RT-PCRにて、定性的・定量的に確認する

Scheme 3. The flow of the gene expression analysis using RNA-Seq data for germinated non-GM and GM soybeans