

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

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

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

(H27-食品-一般-004)

研究代表者 五十君 静信

東京農業大学

平成 30 (2018) 年 5 月

目 次

I. 平成 29 年度総括研究報告書	
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・・・・・・・・・・・・・・・・	1
研究代表者 五十君 静信	
II. 分担研究報告書	
1. バイオテクノロジー応用微生物の安全性・・・・・・・・	11
五十君 静信	
2. バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析・・・・・・・・	25
手島 玲子	
3. 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（1）（2）・・・・・・・・	33
小関 良宏	
4. 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・・・・・・・・	39
太田 大策	
5. ニワトリのモデル組換え体の作出・・・・・・・・	59
堀内 浩幸	
6. バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション・	63
今村 知明	
7. 新育種法を用いた作物の検出のための未知領域解析手法の検討と情報収集	85
近藤 一成	
8. 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・	107
検知技術開発と安全性に関する知見の取集 中村 公亮	
8. アレルゲンデータベースによるアレルゲン性評価に関する研究・・・・・・・・	133
安達 玲子	

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 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 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 C2BBE1 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、C2BBE1 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の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。安全だと思える食品と安心だと思える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、橋田和美：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

バイオテクノロジー応用微生物の安全性

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 教授

研究要旨

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物のヒトや動物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え細菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を試みる。

平成27年度に、モデル乳酸菌組換え体に関するオミクス(トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム)による網羅的の解析が終了したので、平成28年度からは遺伝子組換え微生物の安全性評価に用いる為の組換え体とヒト腸管上皮細胞の相互作用に関する評価手法について検討を行った。

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りに用いられる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C2BBel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、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。

協力研究者

梶田 和彌 昭和女子大学
梶川 揚申 東京農業大学
檜木 真吾 東京農業大学
武田 昌之 東京農業大学
若山 水歩 東京農業大学

A. 研究目的

モデル組換え体を作成し組換え微生物で特に重要と思われる安全性に関する知見を集積し、これらの検討により得られた有用な安全性評価手法を提供する。これまでの研究により、遺伝子組換え乳酸菌の免疫系への影響は、組み

込む遺伝子産物単独の性質を必ずしも反映しないことが示されており、用いた宿主乳酸菌と挿入遺伝子産物の組合せにより多様な免疫影響が起こることが明らかとなっている。組換え微生物では挿入遺伝子産物単独の示す免疫影響とは異なった免疫影響が観察されることがあることを示すことができた。先行する研究成果により、サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現したモデル乳酸菌組換え体に対しオミクス解析を行い、組換え体と非組換え体の網羅的な比較を行った。また用いた組換え体と元株のゲノム解析の結果、組換え体においてゲノムの一部が欠損しているという知見が得られた。

平成 27 年度に、モデル乳酸菌組換え体に関するオミクス（トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム）による網羅的な比較解析が終了したので、平成 28 年度からは遺伝子組換え微生物の安全性評価に用いる為の組換え体とヒト腸管上皮細胞の相互作用に関する評価手法について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

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モデル組換え体とした。乳酸菌は、*Lactobacillus casei* 394 を用いた。また、平成 28 年度に引き続き、ノサシバエ由来の遺伝子を用いたランダムミュートーション法によりエリスロマイシン耐性を付与した乳酸菌変異株を約 300 株、追加で作出し、得られた変異株の表現型について検討を行った。

(2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価

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 C2BBE1 細胞を用いた。定法にしたがい培養・継代し、以下の実験に用いた。C2BBE1 細胞を培養・継代し、MOI:

100 となるように宿主乳酸菌、エルシニア抗原発現モデル組換え乳酸菌を接種し、37°C で 1 時間培養後、細胞から全 RNA を回収し、細胞のメッセンジャー RNA を回収した後、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。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影響について、腸管上皮細胞のトランスクリプトーム解析の手法にて評価した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニア表層抗原 Invasin を乳酸菌菌体表層に固定化発現させた組換え体を作成し、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用を評価するモデル組換え体とした（図 1）。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミュートーション法で変異株を作成すると、ゲノムのリアレンジメントをおこし、導入遺伝子を単純に挿入した変異株を作成することが困難であるため、新規のノサシバエ由来の遺伝子によるランダムミュートーション法を確立し、エリスロマイシン耐性を付与した変異株を新たに約 300 株作出した。新しい手法によるランダムミュートーション法により得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、ゲノムのアレンジメントらしき現象は観察されず、エリスロマイシン耐性遺伝子が単独で挿入されていた。得られた変異株の免疫への刺激活性は、親株に比べほぼ同等な株、2 分の 1 以下に明らかに低下した株等が得られた。以前のランダムミュートーションにおいては、変異株に免疫増強性が観察されたがこのような増強株は観察されなかった。

(2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価（トランスクリプトーム解析）

培地コントロール、宿主乳酸菌、モデル乳酸菌組換え体をヒト腸管由来 C2BBel 細胞に 1 時間暴露させた後、元株 (LCN) 組換え乳酸菌 (LCI497) がそれぞれ C2BBel 細胞と接着、取り込みを起すかを評価したところ、図 2 に示すように、組換えにより接着、取り込み菌数共に増大した。

C2BBel 細胞からトータル RNA を回収し、メッセージ RNA について次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。シーケンス結果の概要、マッピング統計データは、平成 28 年度の報告書に示した。トランスクリプト毎のリード数は、図 3 に示した。

尤度比検定による発現量差の検定結果 MA プロットの結果は、図 4 に示した。プロットヒートマップおよび各遺伝子発現量の解析結果は図 5 に示した。図 6 には PCR 産物の融解曲線を示した。これにより副産物がないことを確認した。図 7 には、PCR 産物の増殖曲線を示した。これにより評価系には DNA の混入がないことを確認した。Log₂ FC を、1.6 とした場合、培地コントロールに比べ、宿主乳酸菌では 53 遺伝子の発現が、モデル組換え乳酸菌では 94 遺伝子の発現が 3 倍以上に上昇していることがわかった。

トランスクリプトーム解析の結果から、元株と遺伝子組換え株で遺伝子の発現の増強の観察された遺伝子の中から、その機能が推定可能な 4 種類の遺伝子 (*NFKB1A*, *CXCL8*, *CXCL1*, *CCL20*) に着目して、qPCR による相対定量による遺伝子発現量の比較を行った結果を図 8 に示した。

D. 考察

(1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニア表層抗原 Invasin を乳酸菌菌体表層に固定化発現させた組換え乳酸菌では、乳酸菌菌

体表層に固定化して発現している *invasin* が、ヒト腸管上皮細胞とどのような相互作用を示すのかが興味深い。エルシニアの当該抗原はヒト腸管細胞 M 細胞の腸管腔側に発現する $\beta 1$ -integrin と相互作用することが知られている。モデル組換え乳酸菌に、この抗原を菌体表層に固定化し発現させることにより、ヒト腸管上皮細胞との相互作用がどのように反応するのかについて評価するためにモデル組換え体の作成を行った。図 1 で確認されたように、エルシニア表層抗原 *Invasin* は乳酸菌で良好に発現し、菌体表層に安定的に固定化されていることが確認された。これをモデル組換え体としてヒト腸管上皮細胞との相互作用を検討することは、今後の組換え微生物と腸管上皮細胞との間でどのようなやりとりが行われているかを明らかにすることが可能であり、安全性評価の評価系として大変有効な手法と思われる。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミューテーション法で変異株を作成すると、ゲノムのレアレンジメントをおこし、導入遺伝子を単純に挿入した変異株を作成することが困難であった。そこで、新規のランダムミューテーション法として、ノサシバエ由来の遺伝子によるランダムミューテーション法の確立を試みた。エリスロマイシン耐性を付与した変異株を 300 株ほど追加作成し、得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、以前観察されたゲノムのレアレンジメントらしき現象は観察されず、エリスロマイシン耐性遺伝子が単純に挿入されていることが確認された。これらの変異株は、免疫活性を評価したところ、元株に対してほぼ同等か、明らかな低下を示した。これらの変異株は今後のモデル乳酸菌組換え体として用いることが可能と思われる。

(2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価

(トランスクリプトーム解析)

培地コントロール、宿主乳酸菌、モデル乳酸菌組換え体をヒト腸管由来細胞に4℃あるいは37℃1時間暴露させた後、C2BBel細胞への接着、取り込みを評価した。図2に示されるように、元株に比べ組換え体は、接着、取り込み共に増大した。組換え体に発現させている *Yersinia* 由来の Invasin は、 β 1-integrin 受容体との相互作用を介して細胞への接着および侵入に関与することが報告されている。通常、M細胞を除く腸管上皮細胞において β 1-integrinは基底膜側のみに局在している。しかし、本実験において乳酸菌の接着効率および取り込み効率が Invasin の発現により向上したことから、この結果には β 1-integrin と Invasin の相互作用が関与している可能性が高いと考えられる。過去の研究では、MDCK-1細胞(イヌ腎臓尿管上皮細胞由来)や、Caco-2細胞を用いた *in vitro* の試験において、*Y. pseudotuberculosis* の Invasin が細胞表面に接着することで β 1-integrinの局在が基底膜側から管腔側に変化し、*Y. pseudotuberculosis* の取り込みに関与することが報告されている。このことから、本実験においても乳酸菌に発現させた Invasin によって同様の現象が起こった可能性が示唆された。

C2BBel細胞のメッセンジャーRNAについて回収し、次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行った。培地コントロールに比べ、宿主乳酸菌では53遺伝子の発現が、モデル組換え乳酸菌では94遺伝子の発現が3倍以上に上昇していることから、エルシニアの抗原が乳酸菌に加わることにより、およそ40の遺伝子が有意にその発現が増強していることが示された。コントロール群と比較して発現量が約3倍以上変動した67個の遺伝子のうち、元株添加群と、組換え体添加群との間で

発現量に顕著な差が見られた遺伝子は、*TNFAIP3*, *NFKBIA*, *BIRC3*, *FNDC9*, *CXCL8*, *LOC102723727*, *TRHDE*, *CXCL3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CCL20*, *PSMB9*, *TSPAN11*, *C18orf63*, *PLA2G2F*, *OR7A5*であった。図5に示した主な遺伝子に関するヒートマップで、乳酸菌元株による細胞への影響、また、エルシニアの抗原が乳酸菌に加わることにより起こる反応が示された。

CXCL1, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CCL20*は、免疫反応において樹状細胞やT細胞、B細胞などの誘因物質として機能するケモカインに関連する遺伝子である。その中で、*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CCL20*は、免疫反応において樹状細胞やT細胞、B細胞などの誘因物質として機能するケモカインに関連する遺伝子である。その中で、*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*は元株添加群でも発現量が増加していたことから、乳酸菌の接着菌数および取り込み菌数が増加した組換え体添加群ではこれらの遺伝子発現がさらに増加したと考えられる。また、*CXCL8*, *CCL20*は組換え体添加群でのみ顕著に発現量が増加していた。過去の研究では Invasin の由来であるエルシニアが細胞内への侵入を介して *CXCL8* や *CCL20* を強く誘導することが報告されている。このことから組換え体添加群における *CXCL8*, *CCL20* 発現量の増加は Invasin 依存的である可能性が示唆された。

TNFAIP3, *NFKBIA*, *BIRC3*は、組換え体添加群において発現量が増加しており、これらの遺伝子は炎症性の反応に広く関与する転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)によるシグナルを抑制する機能を持つ遺伝子であることがわかっている。組換え体添加群では、ケモカイン関連遺伝子の発現が強く誘導されていたことから、それに伴い *TNFAIP3*, *NFKBIA*, *BIRC3* が誘導され、過剰な炎症

応答を防ぐ機構が働いた可能性が考えられる。

FNDC9, *TSPAN11*はそれぞれフィブロネクチンおよびテトラスパニン関連遺伝子である。フィブロネクチンは細胞接着分子であり、テトラスパニンや、*Invasin*の受容体である $\beta 1$ -integrinなどと結合することが知られており、 $\beta 1$ -integrinを介したシグナル伝達に関与することも報告されている。また、テトラスパニンも $\beta 1$ -integrinと関わる深い物質である。テトラスパニンは膜貫通タンパク質の一種であり、細胞膜上で $\beta 1$ -integrinと複合体を形成し細胞同士の接着に関与することが報告されている。以上のことより、これらの遺伝子発現の差は*Invasin*発現乳酸菌における細胞への接着能力の向上および、細胞から取り込まれる能力が向上したことに関与している可能性が示唆された。

上記以外で発現に差が見られた遺伝子については、その機能がほとんど解明されていない、あるいは、本実験との関連性を見出すことができなかったため、考察は割愛する。

E. 結論

遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出では、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モデル組換え体とした。また、ノサンバエ由来の遺伝子を用いたランダムミューテーション法によりエリスロマイシン耐性を付与した乳酸菌変異株 300 株を追加作成し、今後モデル組換え体として用いる菌株の準備が整った。

細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価系の開発では、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を検討した。培地コントロールに対

し乳酸菌親株、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ところ、親株に比べモデル組換え体で、約 40 の遺伝子が有意に発現を増強していることが確認された。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

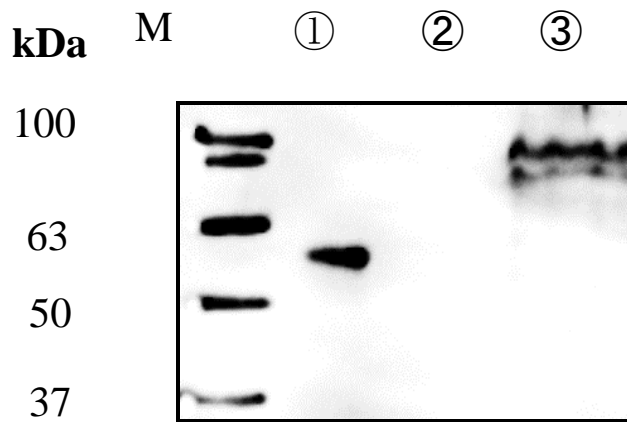
1. 論文発表

- ① Kajikawa A, Midorikawa E, Masuda K, Kondo K, Irisawa T, Igimi S, Okada S. Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. *BMC Microbiol.* 2016 Mar 22;16:49. doi: 10.1186/s12866-016-0667-x.
- ② 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06月
- ③ 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)

2. 学会発表

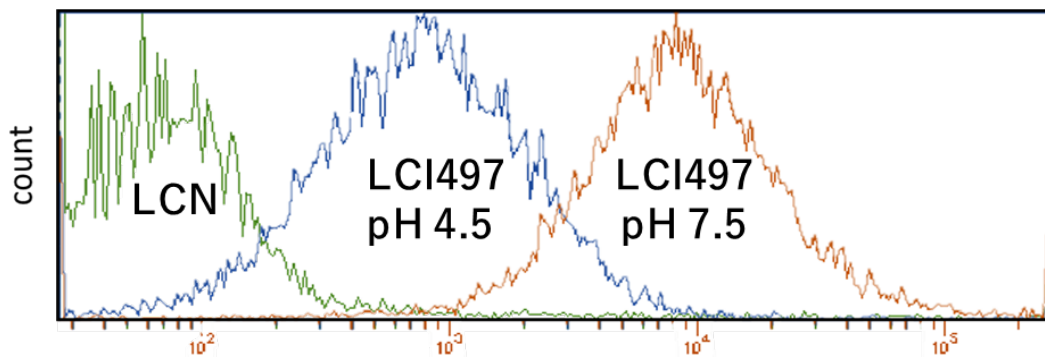
- ① 石橋諒、箕川剛、中島光一、古庄律、清水誠、五十君静信。腸管上皮モデル細胞 Caco-2 キットによる既存添加物食用色素の吸収特性評価。日本食品化学学会。2017.6.1-2。三重県志摩市
- ② 武田昌之、榊田和彌、梶川揚申、横田健治、五十君静信。ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価。日本乳酸菌学会。2017.7.10-11。福岡
- ③ 武田 昌之、榊田 和彌、梶川 揚申、横田 健治、五十君 静信。ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価。日本農芸化学学会年次大会。2018.3.16 名古屋

3. その他発表



[Fig.1] Western blot による Invasin の発現確認

- ① His-Inv497 (Positive control)
- ② LCN
- ③ LCI497



[Fig.2] Flow cytometer による Invasin の菌体表面発現量の確認

図 1 . Invasin 発現乳酸菌の western blot による発現確認と Flow cytometer による菌体表面発現の確認

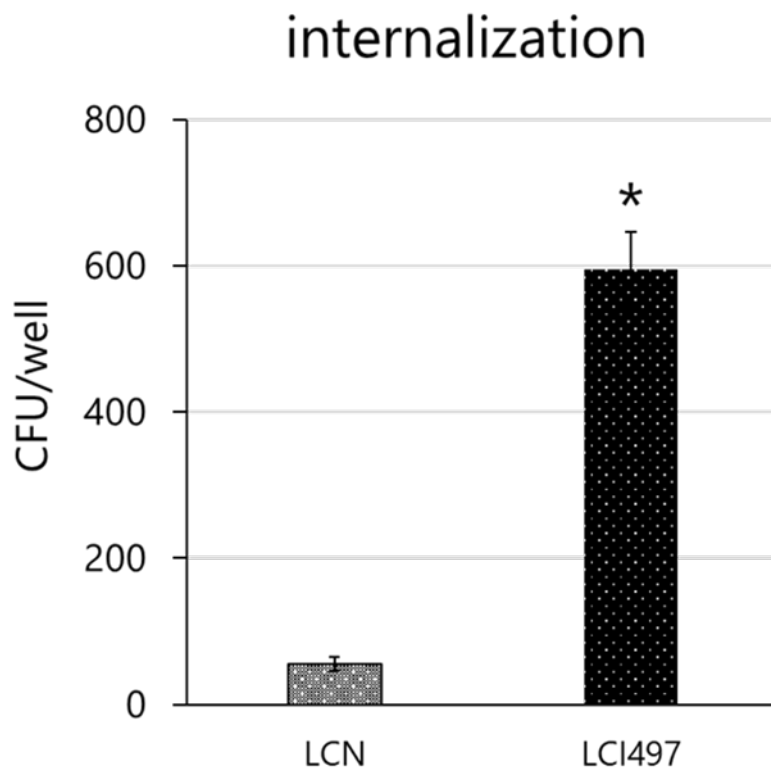
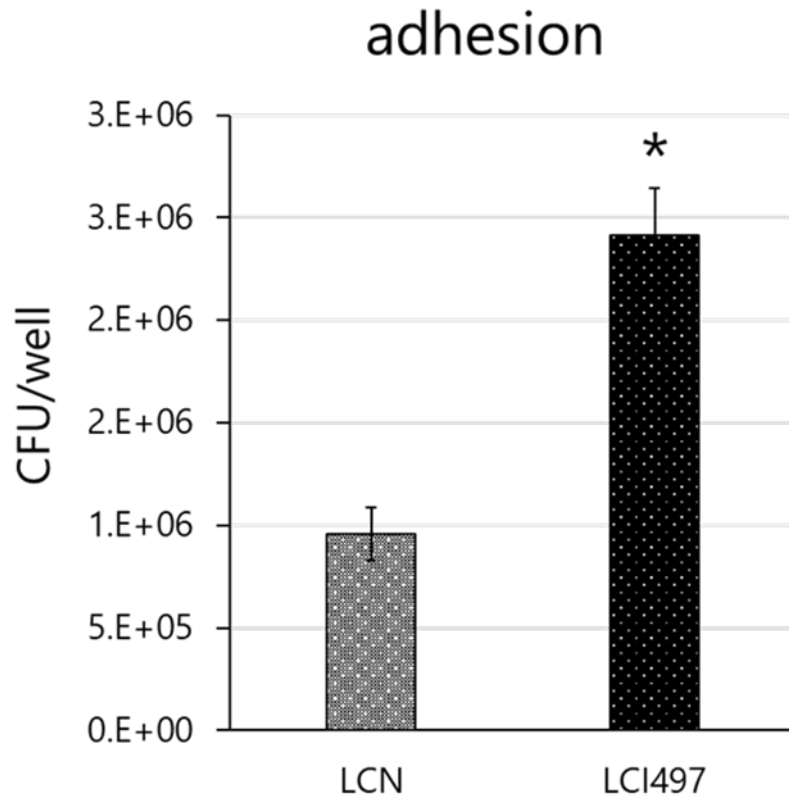


図2. C2BBel 細胞への接着菌数および取り込み菌数

n=6, Student's t-test, *P < 0.01, mean±SE

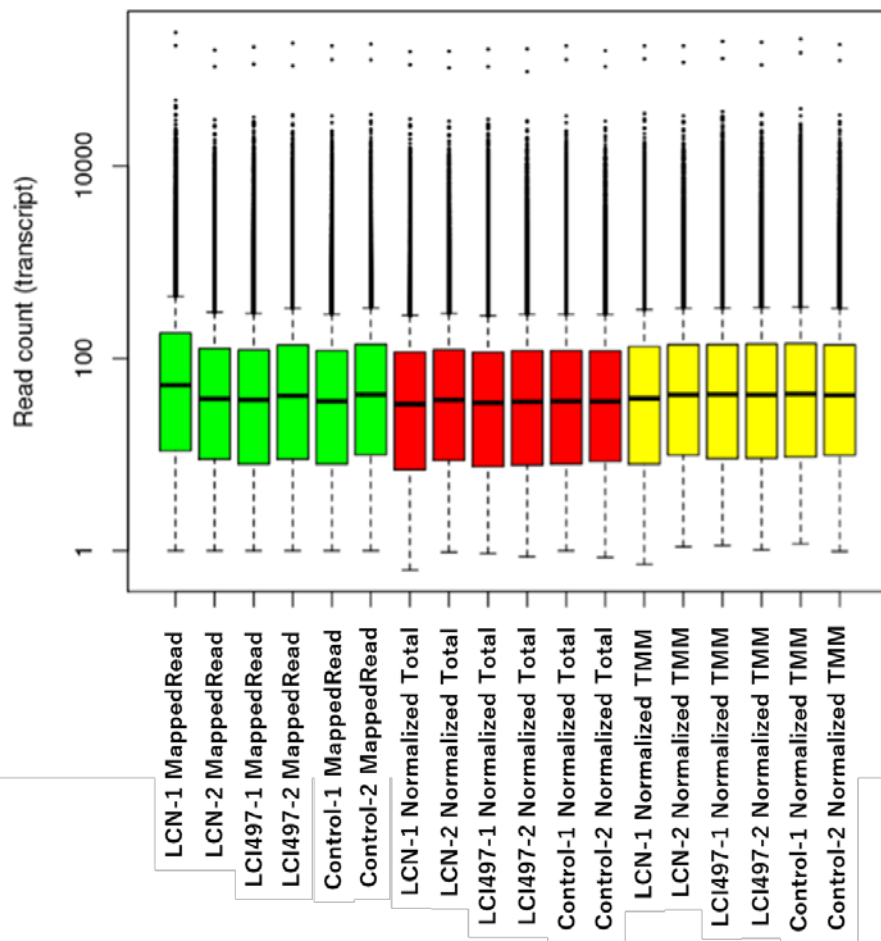


図3. トランスクリプトごとのリード数 分布図

生データ(緑), 総リード数による補正後(赤), TMM 法による正規化後(黄)

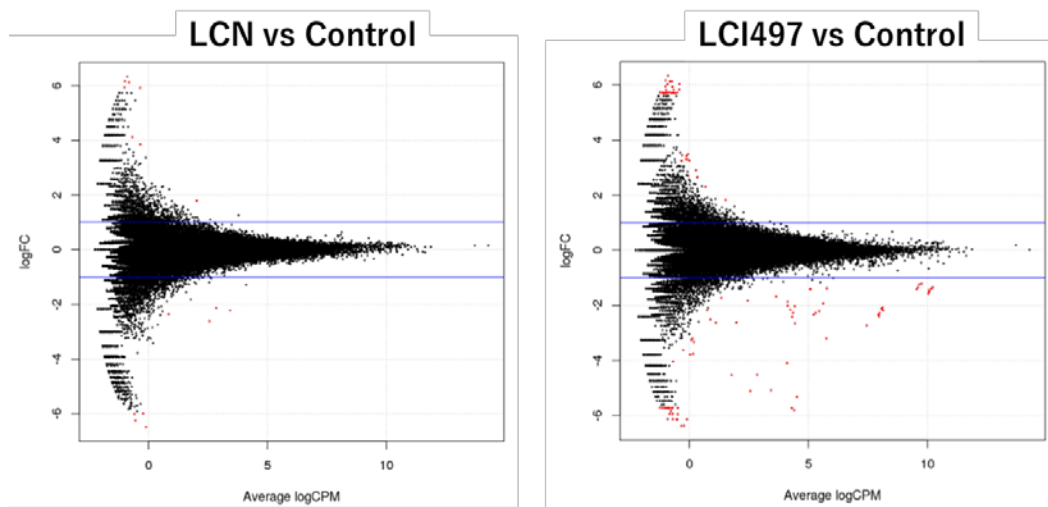


図4. 尤度比検定による発現量差の検定結果 MAプロット
 横軸は2群間の平均発現量、縦軸は2群間の発現量比を表している。

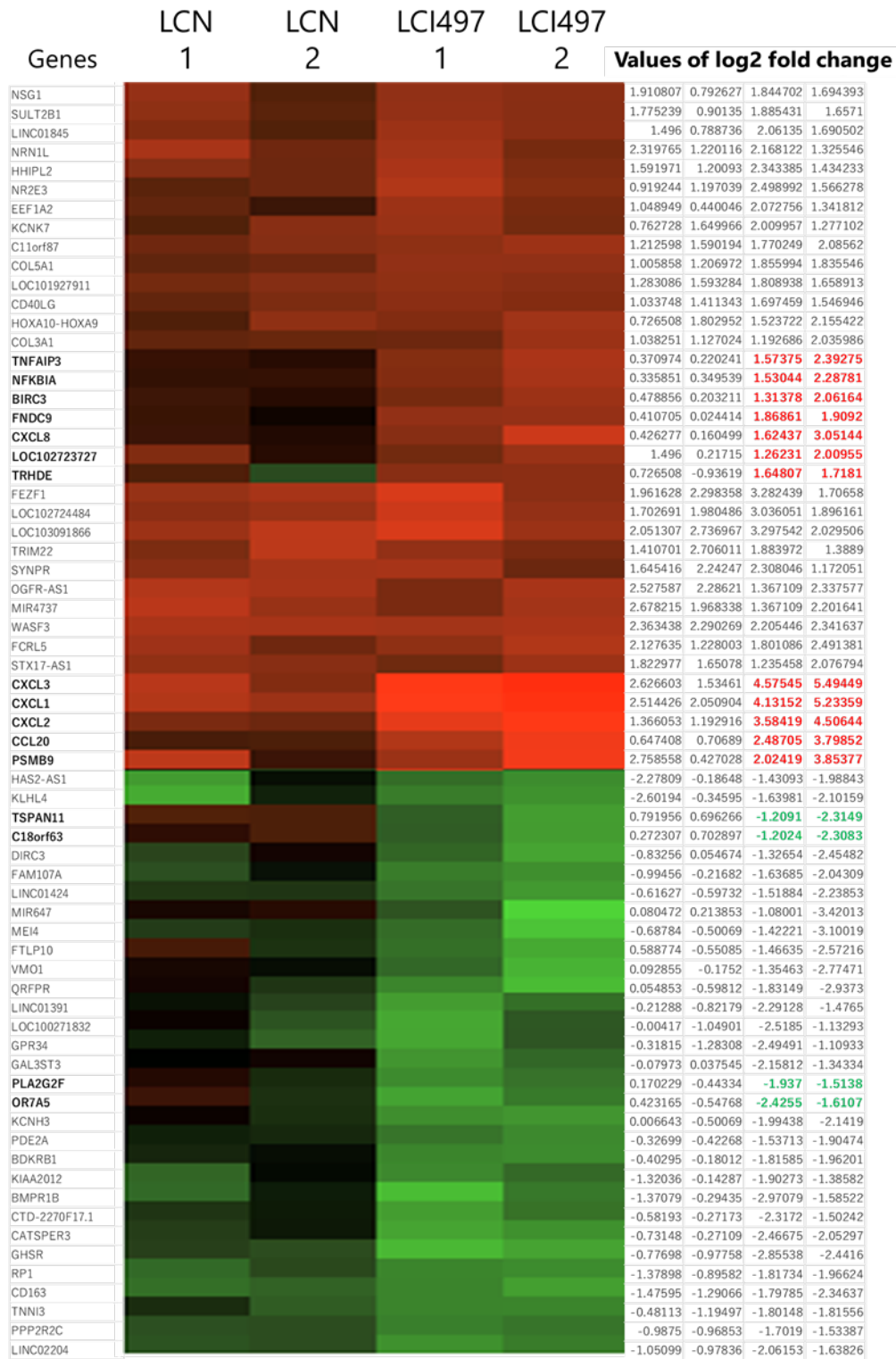
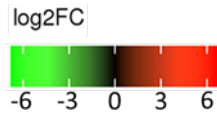


図5. ヒートマップおよび各遺伝子発現量の値
培地コントロールの値を黒(0)として、供試菌添加時の

遺伝子発現量の増加を赤、減少を緑で表している。

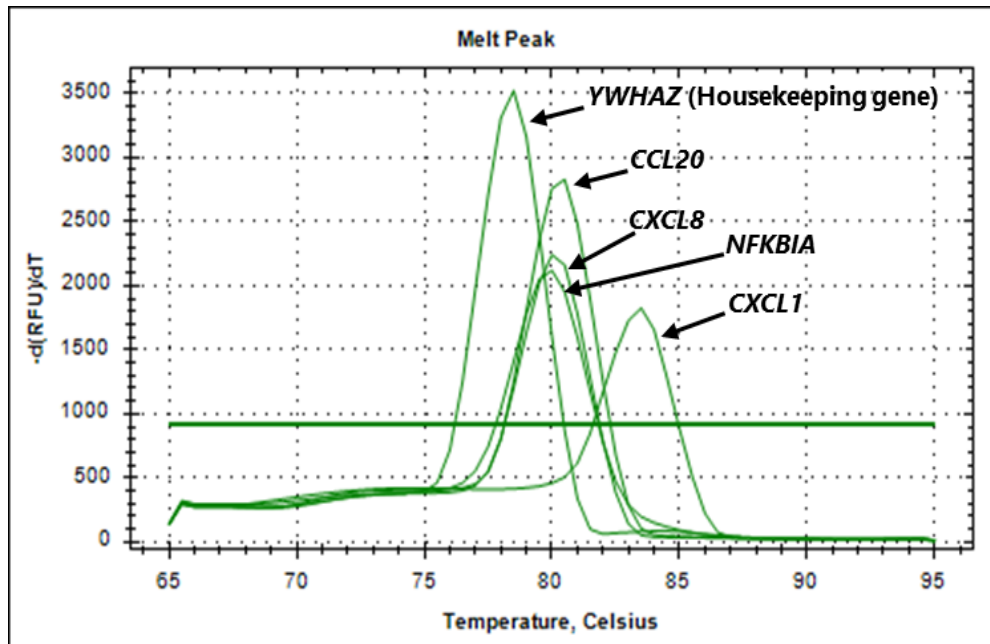


図6. PCR産物の融解曲線（副産物がないことを確認）

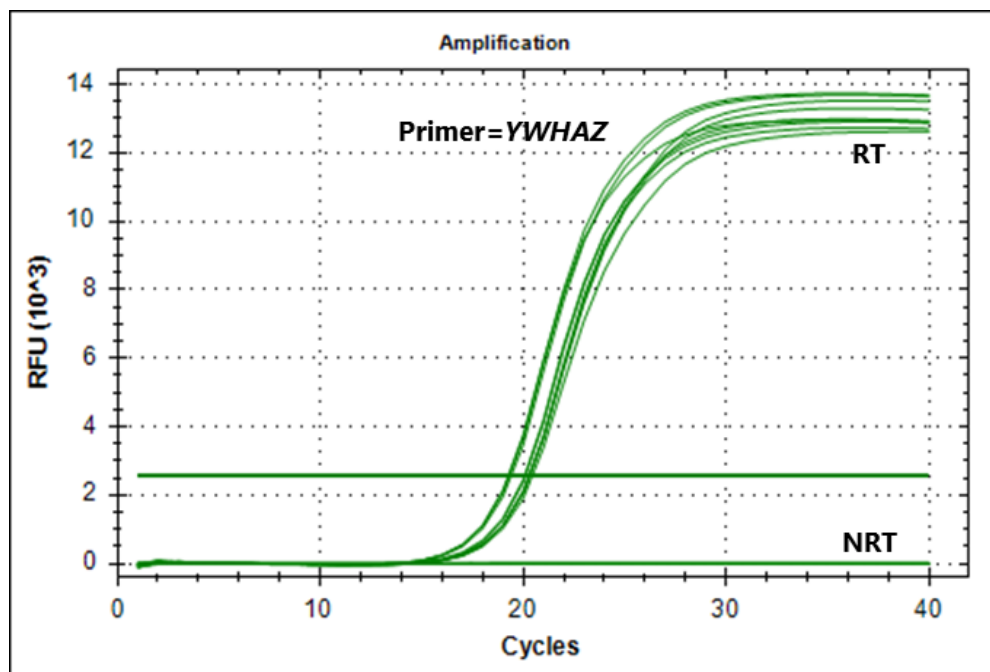


図7. PCR産物の増幅曲線 (DNAの混入がないことを確認)

Relative expression (Target gene/YWHAZ, Control=1)

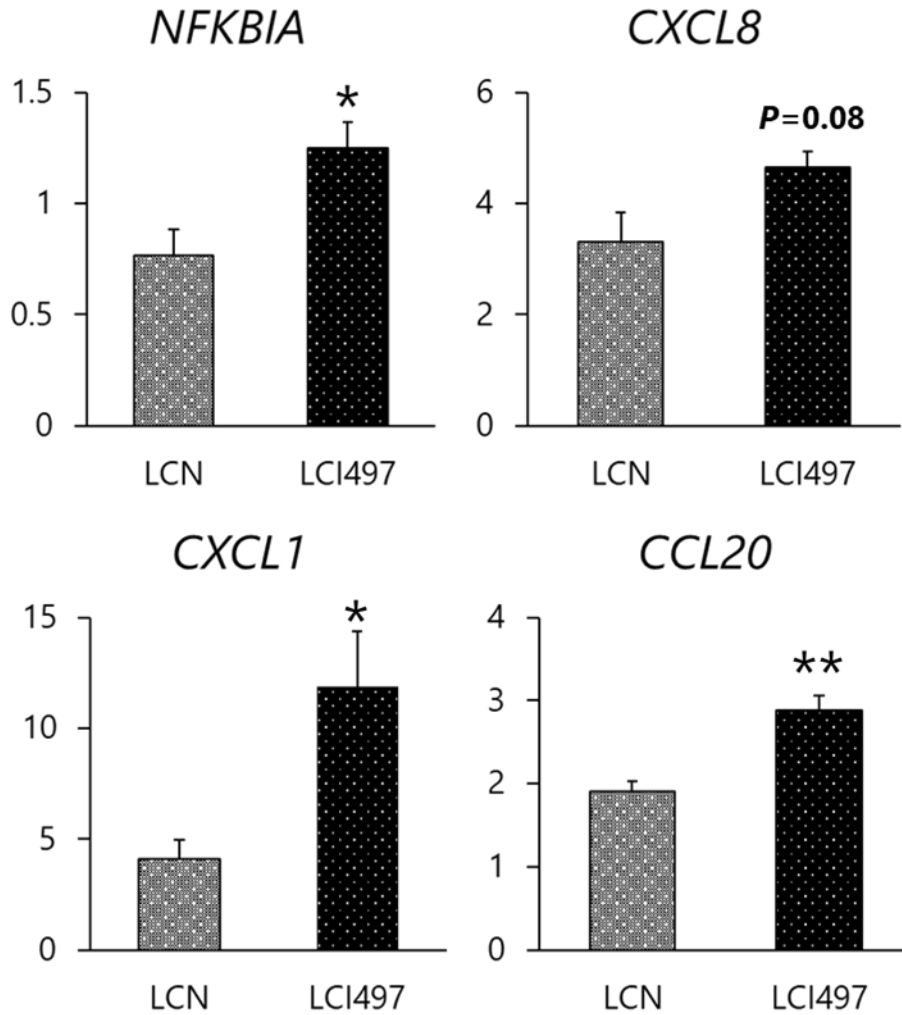


図8. qPCR結果 相対定量による遺伝子発現量の比較

n=3, Student's t-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, mean+SE

Housekeeping gene=YWHAZ

平成 29 年度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」
分担研究報告書（平成 29 年度）

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：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。

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。

研究協力者

佐藤里絵（独）農研機構 食品総合研究所
酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部

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、遺伝子組換えニワトリ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。以下、今年度の概要を記す。

今年度は、バイオテクノロジー技術応用生物として、TALEN 法でゲノム編集 (TG-P) されグリコアルカロイドの含量の大きく減少した形質転換系統じゃがいも塊茎を用い、野生型 (NT-P) (品種サッシー) 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、プロテオーム解析を行った。具体的には、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。

B. 研究方法

(1) じゃがいも塊茎タンパク質のプロテオーム解析

(i) 供与試料

ゲノム編集(TG-P)及び野生型(NT-P)じゃがいも塊茎それぞれ約1gからなる3サンプルを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(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℃ディープフリーザー内に保管した。

(ii) じゃがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

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) 2mL 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 x2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 20,000xg 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表3 に従って200 pmol のCy3 及びCy5 (200 μ mol/LDMF 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Immobiline™ 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 kVh (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℃) 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。

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。ピックアップした各ゲルプラグを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℃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℃に設定したドライバス上で一晚インキュベートして消化した。消化後のゲルから消化ペプチドを抽出液(50%アセトニトリル、5%ぎ酸)で10分間超音波処理して抽出した液を遠心濃縮機で、乾燥後、LC-MS/MS測定用の溶媒(0.1%蟻酸)30 μ Lに溶解しLC-MS/MS分析試料とし、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NCBI Inr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) ジャがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

TG-P, NT-P ジャがいも塊茎 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、 $n=3$ で比較解析した。図 1 に NT-P と TG-P の画像を重ね合わせて表示した例を示す。9 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。結果を表 1 に示す。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 解析を実施することを計画した。スポット解析したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置を図 2 に、MS 解析によるタンパク質の同定結果を表 2 に、また、MS 解析により同定したタンパク質の名前を記した同定結果を二次元電気泳動ゲルイメージ上に記したものを図 3 に示す。

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 (表 1(a))。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応答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 倍以下の発現の差がみられたのみであった。また、発現の減少したタンパク質として、表 1(b) に示すように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応答すると思われる 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

ジャがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

今年度は、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ジャ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) ジャがいもと野生型 (NT-P) ジャがいも塊茎由来の、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られたスポットは上昇のみられた 1 スポット以外になく、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ジャ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¹⁾。

E. 結論

ジャがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

ゲノム編集されたジャがいも (TG-P) 及び野生株ジャがいも (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。

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。

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

なし

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) 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)

4) 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 glutens.” *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

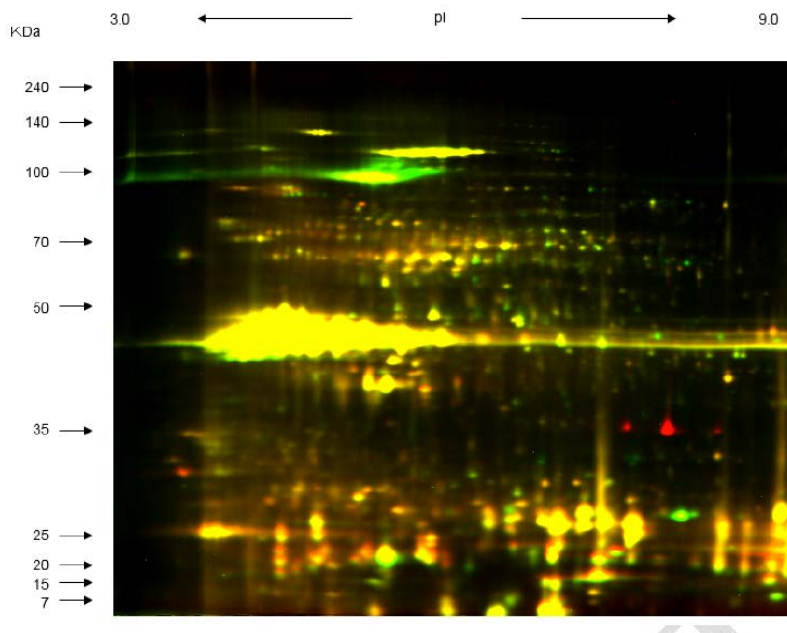


図1 NT-P-1 と TG-P-1 の重ね合わせ 2D-DIGE-gel イメージ
Cy3: 緑- NT-P-1 , Cy5: 赤-TG-P-1 (両サンプルに同程度含まれるスポットは黄色で表示される.)

表1 NT-P 試料に対して TG-P 試料で、1.5倍以上の上昇 (a) または 1.5倍以下の減少 (b) が検出されたスポット

(a) TG で増加したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio (TG / NT)	1-ANOVA
1	2054	0.0094	1.90	0.0094
2	4136	0.0082	2.87	0.0082
3	4851	0.011	4.06	0.011
4	5401	0.023	1.62	0.023
5	5648	0.042	1.66	0.042

(b) TG で減少したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio (TG / NT)	1-ANOVA
1	1845	0.049	-1.53	0.049
2	2566	0.0038	-1.72	0.0038
3	2618	0.015	-1.65	0.015
4	2630	0.014	-1.58	0.014
5	2657	0.042	-1.57	0.042
6	2901	0.031	-1.83	0.031
7	3854	0.00099	-1.61	0.00099
8	5828	0.043	-1.95	0.043

MS 解析を行ったスポットは、マスターNo. の部分を赤で示した。

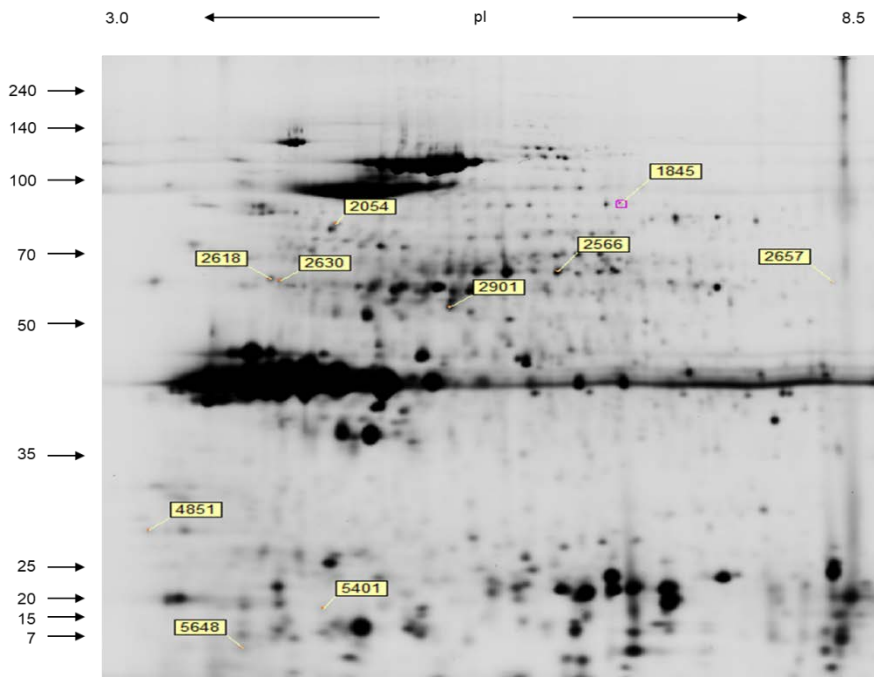


図2 ジャがいも塊茎のMS解析を実施したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

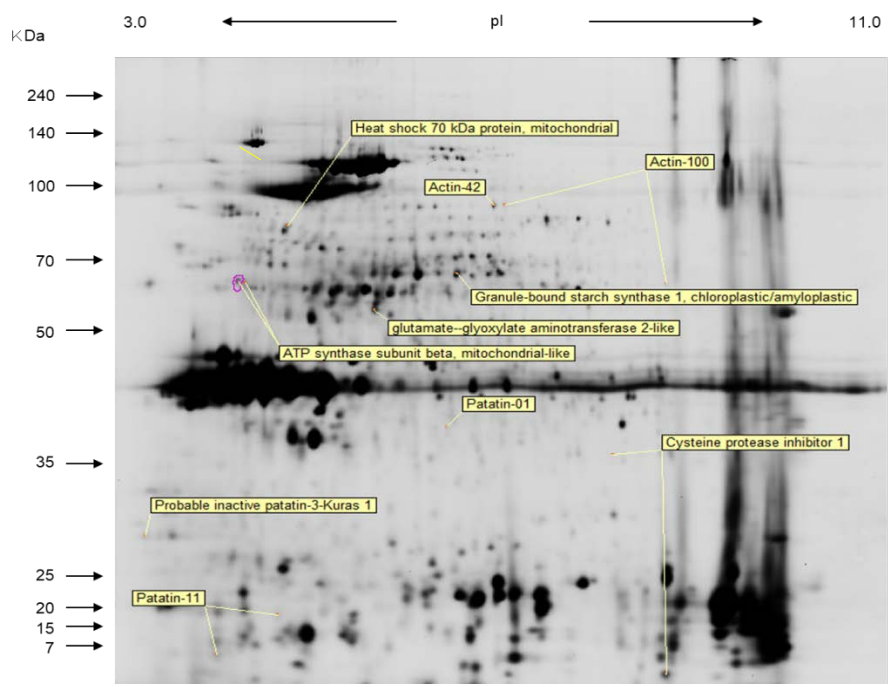


図3. ジャがいも塊茎のMS解析を実施したスポットの同定結果並びに二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

表2 ジャがいも塊茎のMS解析を実施したスポットの同定結果

(a) 発現の上昇したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio	Protein Name	Mw	Score
1	4851	0.011	4.06	Probable inactive patatin-3-Kuras 1	41224	538
2	2054	0.0094	1.9	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	73317	4708
3	5648	0.042	1.66	Patatin-11	42528	432
4	5401	0.023	1.62	Patatin-11	42528	521

(b) 発現の減少したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio	Protein Name	Mw	Score
1	2901	0.031	-1.83	glutamate--glyoxylate aminotransferase 2-like	53058	847
2	2566	0.0038	-1.72	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	67160	869
3	2618	0.015	-1.65	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	59646	1123
4	2630	0.014	-1.58	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	59646	607
5	2657	0.042	-1.57	Actin-100	39756	257
6	1845	0.049	-1.53	Actin-100	39756	210

Av.Ratio: TG / NT

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（1）

研究分担者 小関 良宏 （東京農工大学大学院工学研究院・教授）
研究協力者 宮原 平 （東京農工大学大学院工学研究院・助教）

研究要旨

近年のゲノム編集技術の発展により、様々な生物種での遺伝子改変生物の開発が進められている。ゲノム編集技術では従来の外来遺伝子の導入による遺伝子組換え生物の作出とは異なる技法で遺伝子改変が行われることから、これまででない遺伝子改変がなされた生物由来の食品の安全性を評価する必要がある。

本研究では新規の遺伝子改変技術であるゲノム編集技術により作出された遺伝子改変ジャガイモを遺伝子改変作物のモデルとし、遺伝子改変生物由来の食品の新たな安全性評価系の構築を目的としている。ジャガイモの有毒成分であるグリコアルカロイドを合成する酵素遺伝子 *SSR2* を欠損させたゲノム編集体と非ゲノム編集体での次世代シーケンサーを使用した RNA-seq によりトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、非ゲノム編集体とゲノム編集体で遺伝子の発現に差は見られなかった。

A. 研究目的

ゲノム編集技術と呼ばれる宿主生物のゲノム内に外来遺伝子導入の痕跡がほとんど残らない遺伝子改変技術の開発が進められており、様々な生物種において、遺伝子改変生物が作出されている。この技術は従来の遺伝子組み換え技術とは手法が異なることから、研究者が意図した目的の形質以外にどのような影響がその生物の代謝フローに出るのか経験に乏しい。しかし、外来遺伝子が組み込まれていなければ遺伝子組み換え生物にはあたらないため、近い将来に多くの遺伝子改変生物の食品およびその加工原料としての使用が考えられる。したがって、遺伝子改変生物に対するバイオテクノロジー応用食品としての安全性評価系の構築が急務とされている。食品の安全性評価の点では、遺伝子改変生物の生体内での変化を網羅的に把握する必要があるため、遺伝子改変生物のオミクス解析を行い、評価系構築のための基礎データの集積を目的としている。

本研究では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、バイオテクノロジー応用食品の安全性評

価基準のための基礎データの集積を目的に研究を行った。

B. 研究方法

理化学研究所の梅基先生より分与されたジャガイモ品種サッシーのゲノム編集体 (TG) と対照として非編集体 (NT) をそれぞれ 3 個体ずつ計 6 個体をサンプルとした。ゲノム編集体は *SSR2* 遺伝子を TALEN により欠損させたものを使用した (Sawai et al., 2014)。なお、使用したゲノム編集体は事前に *SSR2* 遺伝子が欠損していること、およびグリコアルカロイドの蓄積量が非編集体に比べて少ないことを確認してある。

塊茎の皮を厚めに剥いたものを 100 mg 程度使用し、RNA 抽出用前処理試薬 Fruit-Mate (タカラバイオ) と RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用して total RNA を抽出した。定量し各サンプルの total RNA 10 µg 程度をユーロフィンジェノミクス株式会社の mRNA-seq 解析に委託した。基本条件は HiSeq2500、HiSeq Control Software 2.2.58、RTA 1.18.64、bcl2fastq 1.8.4、HiSeq SBS Kit v4 を使用してシーケンスモード 2 × 125 bp のペアエンドリードとして行われた。納品されたデータ

はフィルタリングによりパラメータ $q20p80$ を満たす 105 bp のペア配列のみを残した。精製した配列データはジャガイモゲノム解読の際のトランスクリプトームデータとして公開され、`PGSC_DM_v3.4_transcript-update.fasta` に Bowtie2 ver. 2.2.9 によりマッピングを行った。次に eXpress ver. 1.5.1 によりカウントデータとして FPKM 値を取得した。この発現量データを基にクラスター解析および散布図を作成した。また、それぞれの個体での遺伝子配列を確認するためアセンブリングを Trinity ver. 2.1.1 を使用して行った。

倫理面への配慮

該当しない

C. 研究結果

ジャガイモの塊茎からの total RNA 抽出では多糖類やポリフェノールを多く含むサンプルから RNA の抽出を行う際の前処理試薬として Fruit-Mate と RNA 抽出キット RNeasy Plant Mini Kit 使用することで、100 mg から 20 μ g 程度の純度の高い total RNA を得ることができた。

次世代シーケンサーによる委託解析から納品されたシーケンスデータはすでにある程度の質の高いデータのみにはフィルタリングされてあるものであったが、さらにトリミングとフィルタリングにより、納品データの 92.3% のデータをトランスクリプトーム解析に使用することとした。すでにネット上で公開されているジャガイモのトランスクリプトームデータ (`PGSC_DM_v3.4_transcript-update.fasta`) には構造遺伝子として 56,218 遺伝子が記されており、今回のシーケンスデータではそのうちの 45,576 遺伝子の配列を検出できた。これは全体の 81% 程度をカバーするものであった。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は非ゲノム編集体 (NT) とゲノム編集体 (TG) で個別のクレードを形成することはなかった (Fig. 1)。また同様に各 NT と TG の 3 個体での遺伝子の発現量の平均値をプロットした散布図ではほとんどの遺伝子で発現量に大きな差は見られなかった。一部発現量が高く検出された遺伝子はプロテアーゼ阻害に関連するものであった (Fig. 2)。

ゲノム編集体のそれぞれの遺伝子配列をア

センブリングにより得たデータから *SSR2* 遺伝子の配列を確認したところ、すべて正常な配列であった。また、*SSR2* の遺伝子配列はトランスクリプトームデータには 3 種類 (`PGSC0003DMT400054476-78`) の配列が存在していたが NT と TG で有意な発現量の差は見られなかった。さらに、各 TG 個体には TAL エフェクターの 400-700 アミノ酸領域が導入されていることを確認した。

D. 考察

ゲノム編集により遺伝子改変を行った作物のモデルとして、グリコアルカロイドの合成を抑制させる形質をもつジャガイモの塊茎におけるトランスクリプトーム解析を行った。

提供を受けたジャガイモサンプルはゲノム配列の解析から当該遺伝子である *SSR2* 遺伝子が欠損していること、およびグリコアルカロイドの蓄積量が非編集体と比較して大きく低下することが示されている (梅基先生より)。一方で、今回の RNA シーケンスデータでは *SSR2* 遺伝子の正常な配列のみがゲノム編集体 3 個体すべてから獲得され、その発現量は非編集体とは有意差が得られなかった。この結果より、今回のサンプルでは *SSR2* 欠損配列は転写されておらず、ごくわずかに存在する正常な配列が転写されていることが考えられた。これは、ゲノム編集により一部の遺伝子を欠損させた個体であってもわずかに正常な遺伝子も存在していることを示唆している。また、*SSR2* の発現量が非編集体と有意差がなかったのは、サンプリングを行った時期がそもそも非編集体でも *SSR2* 遺伝子の発現が低い状態であったためと考えられる。発現量が高い遺伝子には Protease inhibitor や Metallothionein などが確認され、これらは NT、TG の区別なくどちらの系統においても高い発現量を示していた。このことからこれらの遺伝子はサンプリングによるストレス誘導により発現が促進されたものと考えられた。これら以外には、クラスター解析や散布図からも有意に発現が変動した遺伝子は確認されなかった。

今後は *SSR2* 遺伝子の発現が活発になる時期での発現変動の比較など特定の条件下でのトランスクリプトーム解析も行う必要があると考えられる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
1. 論文発表
1)なし

2)なし

2. 学会発表

1)なし

2)なし

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 なし

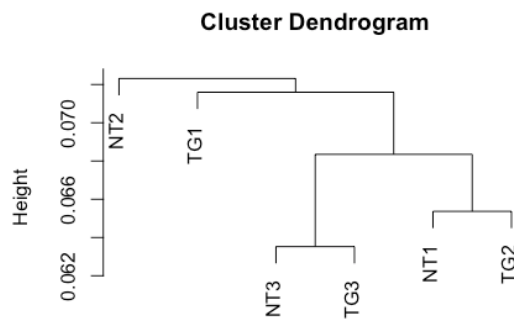


Fig. 1 クラスタ解析
NT: Non-transformant、TG: Transgenics

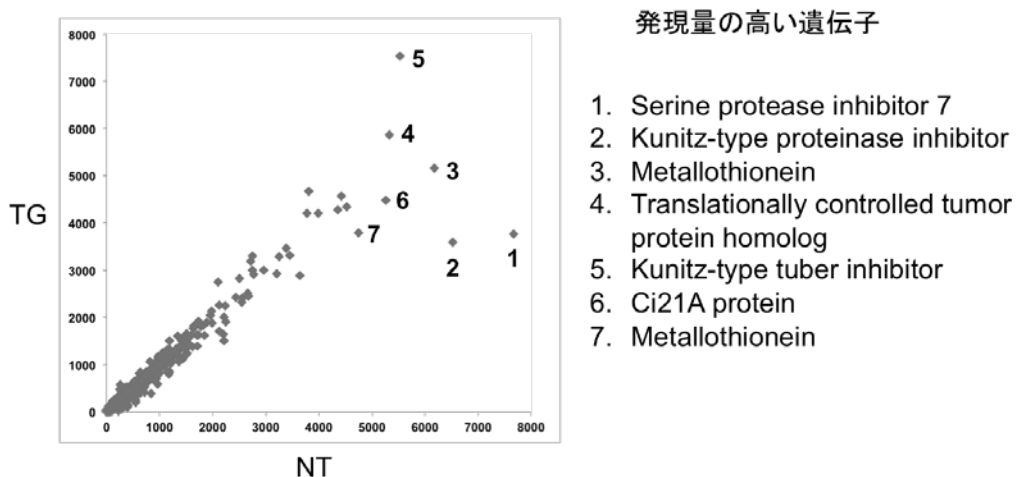


Fig.2 各系統3個体での FPKM 値の平均値をプロットした散布図

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。本年度は前年度に引き続き、*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。

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。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℃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

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）。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 の冷凍庫で保管する。

D. 考察

彩色期を指標とし、果実の成熟段階を揃えることで分析値の安定化を目指した。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（図 0DAB）、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（図）。

E. 結論

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、各種解析のため2種類の登熟段階の果実を試料として調製した。

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

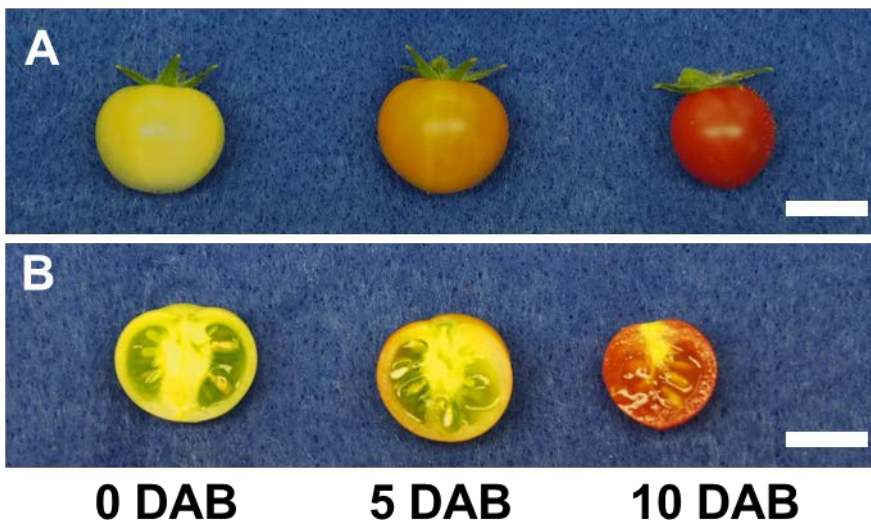


図 網羅的解析用に採取したマイクロトムの様子

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℃で保管する。バーは、1cm。

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 29 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	(大阪府立大学生命環境学研究科・教授)
研究協力者	小川 拓水	(大阪府立大学生命環境学研究科・助教)
	小関 良宏	(東京農工大学工学研究院・教授)
	手島 玲子	(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員 徳島文理大学香川薬学部・特任教授)

研究要旨

本研究は、食品や医薬品開発を目的として、ゲノム編集技術によって内生代謝活性を改変したジャガイモ塊茎モデルに、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスによる統合オミクス解析を実施し、安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことが目的である。本分担課題では、メタボロミクスによって、ゲノム編集によって代謝機能が改変された作物の代謝プロファイル解析を実施し、安全性評価のための基礎データを取得・公開することを最終目的としている。今年度は、ゲノム編集技術の一種である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法によってステロール側鎖還元酵素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。

A. 研究目的

食品安全は利用可能な科学技術の進歩に合わせて時代とともに変化が求められる分野である。バイオテクノロジーによる生物機能の改変技術は急激な進歩を続けており、現在では、動物、植物、微生物といったあ

らゆる生物の遺伝子機能を多面的に改変することが可能となりつつある。特に、ゲノム編集による生物機能改変が農作物や家畜などにも適用され、急速に実用化されつつある。一方で、人為的に遺伝子機能を改変した生物を食用に利用する際には、安全性

に関わる品質管理や、生産段階での環境保全、社会受容の問題など、依然として多くの課題が残されている。生体成分の総体を解析対象とするオミクス解析は、遺伝子改変体を食用利用する上で懸念される生体成分の含量変化を調査するための強力なアプローチである。世界的にも、オミクス解析は食用利用を想定して開発された遺伝子改変体の安全性評価の第一歩として位置づけられており、各種の遺伝子改変体を対象とした実証データの蓄積が求められている。本研究は、メタボロミクスによって、ゲノム編集によって代謝機能が改変された作物の代謝プロファイル解析を実施し、安全性評価のための基礎データを取得・公開することを目的としている。

今年度は、ゲノム編集技術の一種である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法によってステロール側鎖還元酵素 (sterol side chain reductase 2; 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することを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試試料

ジャガイモ試料は理化学研究所環境資源科学研究センター（梅基直行博士）から提供された。実験デザインは、ゲノム編集試料 (GE) と対照試料 (Cont) の 2 群間での比較とした。GE 群は、栽培品種サッシ

ーを pYS026_SSR2-TALEN-C で形質転換した系統 (#71) の独立 3 個体とした (GE-1, GE-2, および GE-3)。Cont 群は、栽培品種サッシーの独立 3 個体とした (Cont-1, Cont-2, および Cont-3)。

試料の調整、輸送、および保存は以下のようにした。各個体から成熟した塊茎を採取し、2-3 mm の厚さで剥皮し、皮の部分を回収して速やかに液体窒素中で急速凍結させた。凍結試料をドライアイスで冷凍保存し、理化学研究所から大阪府立大学へと輸送した。試料を凍結乾燥させ、液体窒素で十分に冷却した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素で冷却しながら磨砕した。磨砕した凍結乾燥試料は超低温フリーザー (-80°C) で保存した。

2. 溶媒抽出

凍結乾燥試料からの低分子化合物の抽出は Shepherd et al. (2007) の方法¹⁾ に準じて行なった。抽出の試行回数は 1 試料につき 3 回とした。磨砕試料 50 mg を硬質ガラス製のねじ口試験管に移し、メタノール (1.5 mL) を加え、蓋をしてボルテックスミキサーを用いて内容物を混合した後、30°C で 30 分間保温しながら震盪抽出した。そこに超純水 (375 µL) とクロロホルム (3 mL) を加え、同様にして震盪抽出した。さらに超純水 (750 µL) を加え、蓋をして手で試験管を激しく振ることで内容物を混合し、室温で 10 分間遠心し (3000 rpm; RT3S3 スイングローターを使用), 2 層に分離した。上層 (2 mL) をガラス製パスツールピペッ

トでポリプロピレン製のセーフロック付きチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、これを極性フラクションとした。下層（3 mL）を同様にして別のチューブに移し、これを非極性フラクションとした。

非極性フラクションに含まれる不飽和脂肪酸の酸化を防ぐため、以下のようにして抗酸化剤ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）を加えた。非極性フラクション全量を遠心濃縮機で乾固させた後、そこに BHT を含有するヘキサン（100 mg/L）1 mL を加え、再溶解させた。

極性フラクションおよび BHT を含む非極性フラクションは低温フリーザー（-30°C）で保存した。

3. 誘導体化

各フラクションに含まれる低分子化合物の誘導体化は Shepherd et al. (2007) の方法りに準じて行なった。

非極性フラクションの誘導体化は次のように進めた。BHT を含む非極性フラクション全量を遠心濃縮機で乾固させ、そこに 1% (v/v) 硫酸メタノール溶液 1 mL を加え、攪拌しながら（1,000 rpm）、50°C で 16 時間反応させ、脂肪酸をメチルエステル体に誘導体化した。別の試験管に反応液全量に移し、そこに 5% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液 2.5 mL とクロロホルム 1.5 mL を加え、蓋をして手で試験管を激しく振り内容を混合し、静置して 2 層に分離した。下層（1.5 mL）をガラス製パストゥールピペットで別の試験管に移し、そこに 2% (w/v)

炭酸水素カリウム水溶液 1.5 mL を加え、蓋をして手で試験管を激しく振ることで内容を混合し、静置して 2 層に分離した。下層（1.5 mL）を同様にして新しいチューブに移し、遠心濃縮機で乾固させた。乾固試料にクロロホルム 50 μ L とピリジン 10 μ L を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌することで再溶解させた。続いて、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（MSTFA）80 μ L を加え、トリメチルシリル化を行った。反応液を室温で 3 分間遠心し（14,000 rpm）、上清をポリテトラフルオロエチレン製のメンブレンフィルターで濾過し、回収した濾液を分析用試料とした。

極性フラクションの誘導体化は次のように進めた。極性フラクション 50 μ L をチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、遠心濃縮機で乾固させ、そこにピリジンに溶解させたメトキシアミン塩酸塩（20 mg/mL）80 μ L を加え、攪拌しながら（1,000 rpm）、50°C で 4 時間反応させオキシム化を行なった。続いて、非極性フラクションと同様にしてトリメチルシリル化および反応液の濾過を行い、分析用試料を調製した。

5. 機器分析

分析用試料をガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計（GC-TOF/MS）に注入し、GC 部では試料中化合物の分離を行い、MS 部では分離した化合物のイオン化と質量情報の取得を行なった。GC の試料注入口の温度は 230°C（cold trap splitless mode）に設

定した。GC カラムは HP-5ms キャピラリーカラム（長さ 30 m× 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm ）を使用した。GC キャリアガスはヘリウムを用いた（流量 1.0 mL/min）。GC オープンの昇温条件は, 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の温度は 250°C, イオン源の温度は 250°C とした。イオン化は electron-ionization (EI) モード (70 eV) で行った。検出器の電圧は 2850 V とした。スキャン範囲は m/z 40-650 とした。試料注入量は 1 μL とした。

6. データ処理

データ処理は既報の手順²⁾に従った。

GC-TOF/MS トータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムからの全イオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには MetAlign³⁾ を, ピークデコンボリューションとピーク自動同定には AIoutput⁴⁾ を使用した。AIoutput によるピーク自動同定のためのマススペクトルライブラリは, 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。また, Shepherd et al. (2007) に記載されている化合物の保持指標と主要イオンピーク情報¹⁾を基にしてピーク自動同定結果のキュレーションを行なった。

7. 統計解析

主成分分析および Student's *t*-test は, MetaboAnalyst(ver. 3.5)⁵⁾ 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。GE と Cont の群間で, 個々のピークについて, 主要イオンの相対ピーク強度値の平均値の差の有無を検定した。検定の多重性に起因する問題を考慮して, Benjamini-Hochberg 法⁶⁾により有意差が認められたピーク群の偽陽性率 (False Discovery Rate; FDR) を推定した。

C. 研究結果

1. 検出ピーク数

非極性フラクションでは 92 個の代謝物候補ピークを得た。このうち 27 個は代謝物として同定することができた。残り 65 個のうち 16 個には注釈情報を付記することができた。

極性フラクションでは 126 個の代謝物候補ピークを得た。このうち 31 個は代謝物として同定することができた。残り 95 個のうち 45 個には注釈情報を付記することができた。

2. 主成分分析

非極性フラクションの 92 個のピークについて, 主要イオンの相対ピーク強度値を変数にして主成分分析を実施した (Fig. 1A)。第一主成分 (寄与率 29.4%) と第二主成分 (寄与率 25.1%) の主成分スコアを基にして二次元プロット図を作成した。第一主成分軸に沿ってゲノム編集 (GE) 試料の 1 個体 (GE-2) が他の 5 個体と明確に区別された。第二主成分軸に沿って, GE 群と Cont

群の間での不明確なクラスター分離が認められた。

極性フラクションの 126 個のピークについて、同様にして主成分分析を実施した (Fig. 1B)。第一主成分 (寄与率 24.0%) と第二主成分 (寄与率 18.9%) の主成分スコアを基にして二次元プロット図を作成した。第二主成分軸に沿って、GE 群と Cont 群の間でのクラスター分離の傾向が認められた。特に、GE 群の 2 個体 (GE1, GE-3) が他の 4 個体と明確に区別された。

3. 平均値の差の検定

非極性フラクションでは、7 個のピークにおいて群間での有意差が認められた

(Table 1)。7 個目のピークの q 値より、これらのうち偽陽性の割合は 31.4% (2.2 個) と見積もられた。これら 7 個のピークのうち、ピーク強度比が群間で 2 倍以上のピークは 3 個あった。これらのうち、GE 群で高いレベルであったのは、カンペステロール ($p = 0.0003$, $GE/Cont = 10.1$) のみであった。一方、GE 群で低いレベルであったのは、コレステロール ($p = 0.0006$, $Cont/GE = 4.1$)、およびソラニジン ($p = 0.0016$, $Cont/GE = 52.3$) であった。なお、q 値より、これら 3 個のピークのうち偽陽性の割合は 5% (0.15 個) と見積もられた。非極性フラクション誘導体化試料の TIC クロマトグラムを群間で比較したところ、これら 3 個のピークについて、明確なレベル差を確認できた (Fig. 2)。ピーク強度比が群間で 2 倍未満の 4 個のピーク (N079, N085,

N086, N087) は、いずれも GE 群で低いレベルであった ($Cont/GE = 1.4-1.5$)。

一方、極性フラクションでは、16 個のピークにおいて群間での有意差が認められた (Table 2)。16 個目のピークの q 値より、これらのうち偽陽性の割合は 35.8% (5.7 個) と見積もられた。これら 16 個のピークのうち、ピーク強度比が群間で 2 倍以上のピークは 4 個あり (イソロイシン, フェニルアラニン, トリプトファン, およびチロシン様化合物 1), いずれも GE 群で高いレベルであった ($GE/Cont = 2.0-2.7$)。ピーク強度比が群間で 2 倍未満であった 12 個のピークのうち 10 個 (P056, グリシン, ロイシン, P036, P026, P055, バリン, P060, コハク酸様化合物 1, P059) は GE 群で高いレベルであった ($GE/Cont = 1.2-1.8$)。残りの 2 個 (1-ケストース様化合物 1, キナ酸) は GE 群で低いレベルであった ($Cont/GE = 1.4-1.9$)。

D. 考察

GE ジャガイモを特徴付ける 3 種類の代謝物 (カンペステロール, コレステロール, およびソラニジン) のうち、コレステロールとソラニジンについては、ともに遺伝子操作と蓄積量減少との因果関係を代謝生化学の視点から説明できる。一方、カンペステロールの増加については、原因として考えられるいくつかの可能性を列挙する。

コレステロールとソラニジンは、標的遺伝子 (SSR2) がコードする酵素が触媒する代謝反応の下流で生合成される代謝物であ

る⁷⁾。SSR2 を欠損させた GE ジャガイモにおいて、コレステロールとソラニジンの蓄積レベルが低いという結果は、ジャガイモの SGA 生合成経路に関する知識と矛盾しない。

GE ジャガイモにおけるカンペステロール増加の原因として複数の要因が考えられる。一つ目は、遺伝子改変により SGAs 生合成経路が遮断されたことによって植物ステロール生合成経路への前駆体物質供給量が増加した可能性である (Fig. 3)。二つ目は、SSR2 の欠損がそのパラログ遺伝子 SSR1 の機能発現に影響を及ぼした可能性である。GE ジャガイモでは SSR1 が触媒する代謝反応の基質であるイソフコステロールが減少しており、その反応産物であるβ-シトステロールが増加傾向にあった (Fig. 3)。上記の 2 つの可能性については、並行して進められているトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析の結果と合わせて総合的に考察する必要がある。三つ目は、野生型 SSR2 とは異なる触媒活性を持つ変異型 SSR2 が発現している可能性がある。GE ジャガイモの母本品種サッシーは 4 倍体であるため、4 個の SSR2 対立遺伝子が存在する。TALEN 法を適用してこれらの対立遺伝子の同時編集を試みた場合、個々の対立遺伝子が独立したイベントによって編集を受けるため、変異には多様性が生じる可能性がある。一方、編集を受けた遺伝子の発現制御を司るプロモーター領域は保存されるため、本来の SSR2 発現条件下で、変異型 SSR2 が発現する可能性があ

る。現在、#71 系統における SSR2 遺伝子の欠失状況の解析が進められている (梅基ら)。

引用・参考文献リスト

¹⁾ Shepherd et al. *Metabolomics* **3**, 475 (2007).

DOI: 10.1007/s11306-007-0058-2

²⁾ Ogawa et al. *Protoc. Exch.* (2017). DOI:

10.1038/protex.2017.151

³⁾ De Vos et al. *Nat. Protoc.* **2**, 778–91 (2007).

DOI: 10.1038/nprot.2007.95

⁴⁾ Tsugawa et al. *BMC Bioinform.* **12**, 131

(2011). DOI: 10.1186/1471-2105-12-131

⁵⁾ Xia et al. *Nucleic Acids Res.* **43**, W251–7

(2015). DOI: 10.1093/nar/gkv380

⁶⁾ Benjamini & Hochberg *J. R. Stat. Soc. Series*

B Stat. Methodol. **57**, 289–300 (1995). DOI:

doi:10.2307/2346101

⁷⁾ Sawai and Ohshima et al. *Plant Cell* **26**, 3763

–74 (2014). DOI: 10.1105/tpc.114.130096

E. 結論

本研究では、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 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

2. 学会発表

なし

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

なし

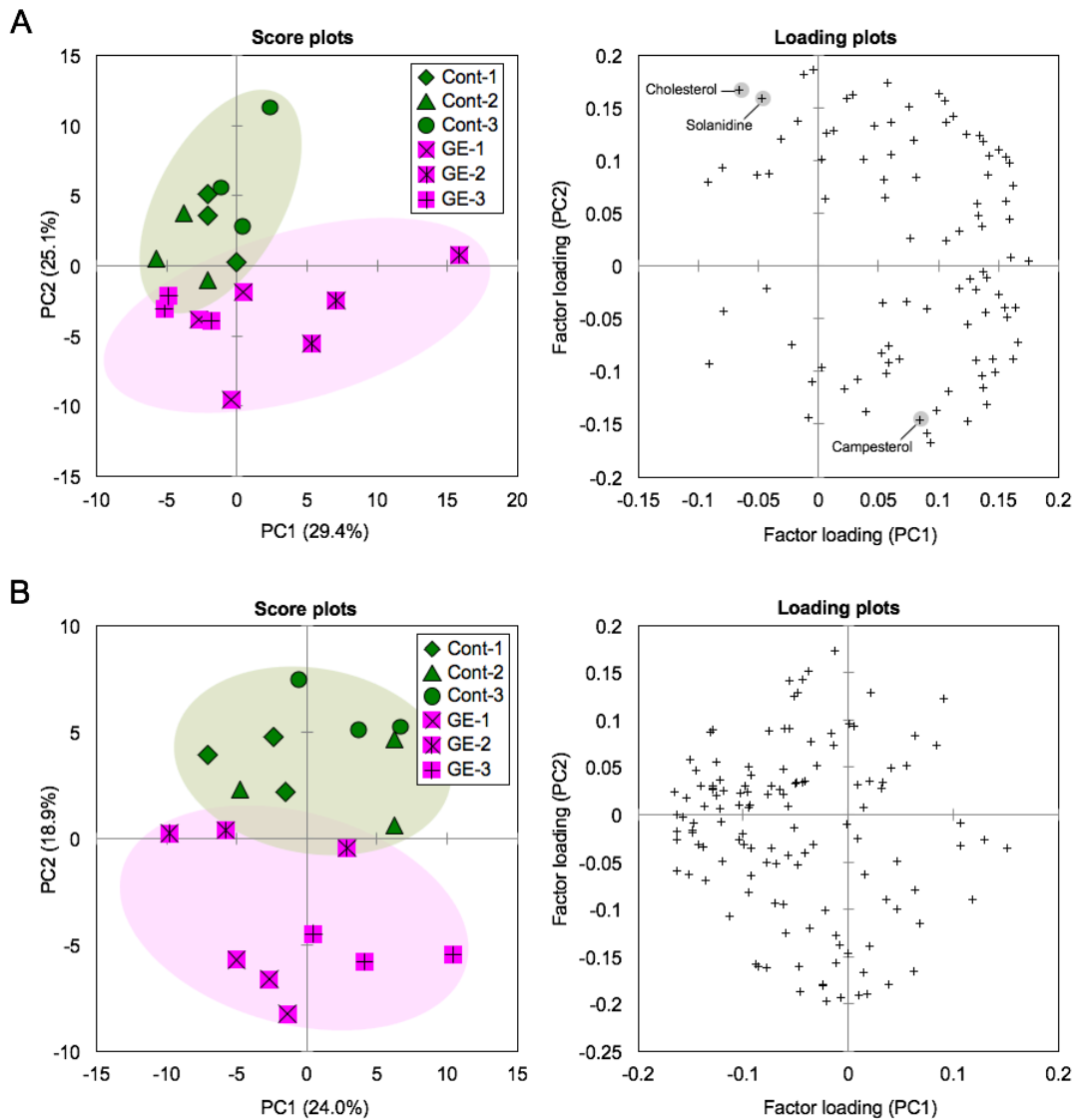


Fig. 1. 主成分分析

ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1, GE-2, GE-3) と対照ジャガイモ試料 (Cont-1, Cont-2, Cont-3) の分析結果の主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いた。データ標準化方法は auto scaling を選択した。A および B にはそれぞれ非極性フラクションおよび極性フラクション由来の代謝物候補ピークの検出強度値をもとにした主成分分析の結果を示した。左側パネル：第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) の主成分スコアをもとにして作成した二次元プロット図。各主成分の寄与率は図中の括弧内に記し、個々のプロットの注釈を図中に記した。右側のパネル：PC1 と PC2 のローディングスコアをもとにして作成した二次元プロット図。個々のプロットは検出された代謝物候補ピークに対応する。

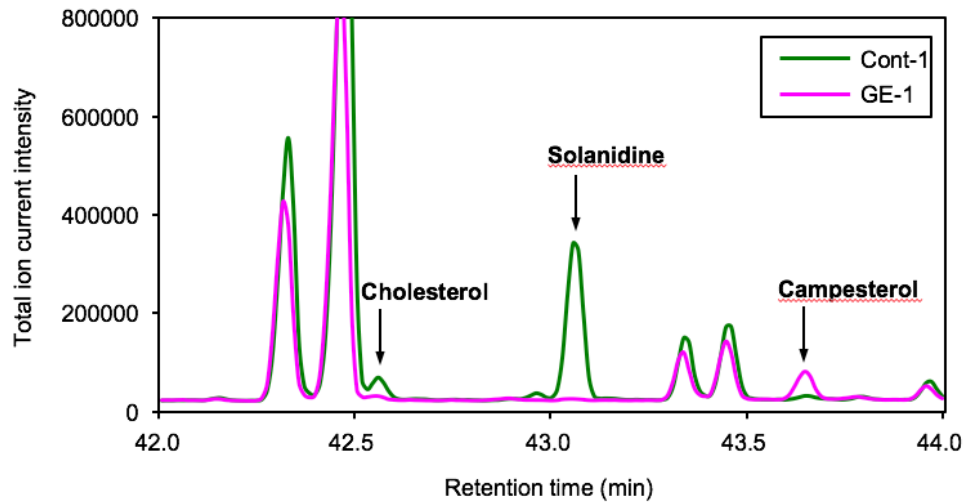


Fig. 2. GC-MS トータルイオンカレントクロマトグラムの群間比較

対照試料およびゲノム編集ジャガイモの各群の特徴を反映する平均的なクロマトグラムを重ね、カラム保持時間 42 分から 44 分の部分を拡大して表示した。対照ジャガイモ試料 (Cont-1) および ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1) のクロマトグラムはそれぞれ緑色およびマゼンダで示した。ゲノム編集ジャガイモを特徴付けるコレステロール、ソラニジン、およびカンペステロールを矢印で示した。

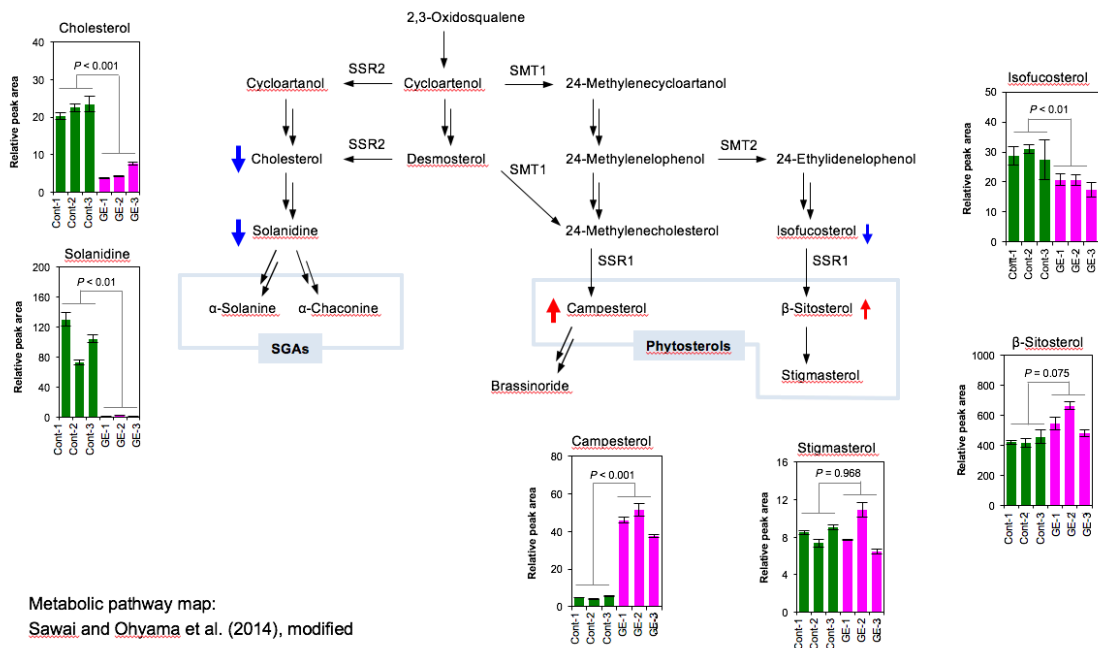


Fig. 3. ジャガイモのステロイドグリコアルカロイド生合成および植物ステロール生合成に関わる代謝経路地図。代謝経路地図は、Sawai and Ohyama et al. (2014)⁷⁾を参考にして一部を改変して作成した。Shepherd et al. (2007)に記載されていたカラム保持指標情報および検出 m/z 情報⁹⁾をもとにして同定した各成分について、内部標準物質との比較により得られた相対ピーク面積値の平均値を棒グラフで示した（エラーバーは3回の独立した抽出実験の標準偏差を示す）。群間の平均値の差の検定は Student's t-test を用い、検定結果は図中に記入した。ゲノム編集ジャガイモ試料（GE-1, GE-2, GE-3）と対照ジャガイモ試料（Cont-1, Cont-2, Cont-3）を比較し、5%水準で有意差がみられた場合は、代謝経路地図中の成分名の脇に上向きの赤矢印（ゲノム編集ジャガイモ > 対照ジャガイモ試料）あるいは下向きの青矢印（ゲノム編集ジャガイモ < 対照ジャガイモ試料）を記入した。SGAs；ステロイドグリコアルカロイド。

Supplementary Table S1. List of the metabolite-candidate peaks detected from non-polar fractions.

Notes:

^{a)} N; non-polar fraction

^{b)} RI; retention index, these values are obtained by normalizing the retention time of the peak to those of *n*-alkanes.

^{c)} QuantMS; the representative *m/z* value used for peak quantification.

^{d)} The approach used for peak identification is described in the Methods section.

^{e)} The accuracy scores returned by Aloutput2 peak identification process are shown. Identification score; calculated by Delta-RI and PPMCC values, Delta-RI; calculated by subtracting the retention index value of each peak from that of a library compound, PPMCC; Pearson's product-moment correlation coefficient.

^{f)} HMDB; The Human Metabolome Database (version 4.0) , KEGG COMPOUND; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) COMPOUND database

Peak ID ^{a)}	Peak detection		Peak identification ^{d)}		Aloutput2 score ^{e)}			Database ID ^{f)}	
	RI ^{b)}	Quant MS ^{c)}	Metabolite name	Method	Identificati on score	Delta-RI	PPMCC	HMDB	KEGG
N001	1230.8	228	N001	-	-	-	-	-	-
N002	1291.3	299	Glucose-1-phosphate	Aloutput	0.974	0.3	0.961	HMDB0001586	C00103
N003	1312.0	199	N003	-	-	-	-	-	-
N004	1499.8	73	Malate-like 1	Aloutput	0.714	7.2	0.623	-	-
N005	1725.6	74	C14:0FAME-like 1	Aloutput	0.798	0.6	0.713	-	-
N006	1800.9	71	Octadecane-like 1	Aloutput	0.727	0.9	0.621	-	-
N007	1926.3	74	C16:0FAME-like 1	Aloutput	0.783	0.8	0.693	-	-
N008	2010.5	74	C17:0FAME-like 1	Aloutput	0.711	16.5	0.712	-	-
N009	2026.6	74	C17:0FAME	Aloutput	0.937	0.4	0.908	No entry found	No entry found
N010	2050.7	313	C16:0FA	Aloutput	0.993	1.7	0.991	HMDB0000220	C00249
N011	2096.3	69	N011	-	-	-	-	-	-
N012	2097.2	81	C18:2FAME	Aloutput	0.981	2.2	0.975	No entry found	No entry found
N013	2098.0	151	N013	-	-	-	-	-	-
N014	2102.6	79	C18:2FAME-like 1	Aloutput	0.785	7.6	0.722	-	-
N015	2107.3	97	C18:1FAME-like 1	Aloutput	0.799	5.3	0.726	-	-
N016	2127.7	87	N016	-	-	-	-	-	-
N017	2128.7	74	C18:0FAME-like 1	Aloutput	0.872	1.7	0.816	-	-
N018	2135.1	299	N018	-	-	-	-	-	-
N019	2153.7	91	N019	-	-	-	-	-	-
N020	2162.1	327	C17:0FA-like 1	Aloutput	0.796	14.1	0.805	-	-
N021	2214.8	337	C18:2FA-like 1	Aloutput	0.890	0.2	0.839	-	-
N022	2247.8	341	C18:0FA	Aloutput	0.951	1.2	0.928	HMDB0000827	C01530
N023	2260.4	341	N023	-	-	-	-	-	-
N024	2295.3	81	C20:2FAME-like 1	Aloutput	0.73	2.7	0.626	-	-
N025	2300.1	71	Tricosane-like 1	Aloutput	0.858	0.1	0.795	-	-
N026	2328.3	74	C20:0FAME	Aloutput	0.992	0.7	0.988	No entry found	No entry found
N027	2358.5	355	C19:0FA-like 1	Aloutput	0.729	10.5	0.666	-	-
N028	2428.3	74	C21:0FAME	Aloutput	0.966	1.7	0.951	No entry found	No entry found
N029	2457.9	369	C21:0FAlc	Manually cu	-	-	-	No entry found	No entry found
N030	2483.3	259	N030	-	-	-	-	-	-
N031	2488.6	173	N031	-	-	-	-	-	-
N032	2490.7	88	N032	-	-	-	-	-	-
N033	2492.9	259	N033	-	-	-	-	-	-
N034	2500.3	71	Pentacosane-like 1	Aloutput	0.793	0.3	0.706	-	-
N035	2502.5	173	N035	-	-	-	-	-	-
N036	2503.6	320	C22:1FAME-like 1	Aloutput	0.746	1.4	0.645	-	-
N037	2530.7	74	C22:0FAME	Aloutput	0.979	0.3	0.969	No entry found	No entry found
N038	2537.2	259	N038	-	-	-	-	-	-
N039	2542.6	259	N039	-	-	-	-	-	-
N040	2545.9	149	N040	-	-	-	-	-	-
N041	2555.7	385	N041	-	-	-	-	-	-
N042	2556.7	383	C22:0FAlc	Manually cu	-	-	-	HMDB0014770	No entry found
N043	2630.3	74	C23:0FAME	Aloutput	0.982	0.7	0.974	No entry found	No entry found
N044	2653.8	397	N044	-	-	-	-	-	-
N045	2698.8	71	Heptacosane-like 1	Aloutput	0.856	1.2	0.793	-	-
N046	2730.5	74	C24:0FAME	Manually cu	-	-	-	No entry found	No entry found
N047	2752.9	411	C24:0FAlc	Manually cu	-	-	-	No entry found	No entry found
N048	2803.5	433	N048	-	-	-	-	-	-

N049	2841.2	460	N049	-	-	-	-	-	-	-
N050	2852.1	425	C25:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N051	2882.3	395	N051	-	-	-	-	-	-	-
N052	2915.3	283	N052	-	-	-	-	-	-	-
N053	2921.5	411	N053	-	-	-	-	-	-	-
N054	2932.7	74	C26:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N055	2950.2	439	C26:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	C08381
N056	2978.6	239	N056	-	-	-	-	-	-	-
N057	2998.6	193	N057	-	-	-	-	-	-	-
N058	3021.5	239	N058	-	-	-	-	-	-	-
N059	3043.3	239	N059	-	-	-	-	-	-	-
N060	3048.4	453	C27:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N061	3053.4	239	N061	-	-	-	-	-	-	-
N062	3080.4	423	N062	-	-	-	-	-	-	-
N063	3091.7	239	N063	-	-	-	-	-	-	-
N064	3102.1	239	N064	-	-	-	-	-	-	-
N065	3136.9	438	C28:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N066	3150.3	470	N066	-	-	-	-	-	-	-
N067	3151.8	467	C28:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	HMDB0034380	C08387
N068	3153.1	468	N068	-	-	-	-	-	-	-
N069	3157.0	329	Cholesterol	Aloutput, M	0.783	16.0	0.813	HMDB0000067	C00187	
N070	3190.5	239	N070	-	-	-	-	-	-	-
N071	3206.8	150	Solanidine	Manually cu	-	-	-	-	HMDB0003236	C06543
N072	3236.8	452	C29:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N073	3245.0	239	C29:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N074	3247.8	75	N074	-	-	-	-	-	-	-
N075	3249.2	481	N075	-	-	-	-	-	-	-
N076	3267.0	343	Campesterol	Aloutput, M	0.879	16.0	0.967	HMDB0002869	C01789	
N077	3280.7	452	N077	-	-	-	-	-	-	-
N078	3282.0	451	N078	-	-	-	-	-	-	-
N079	3334.7	283	N079	-	-	-	-	-	-	-
N080	3338.8	466	C30:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N081	3345.7	495	C30:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	C08392
N082	3359.7	357	β -Sitosterol	Aloutput	0.928	12.3	0.982	HMDB0000852	C01753	
N083	3361.1	133	N083	-	-	-	-	-	-	-
N084	3369.6	215	N084	-	-	-	-	-	-	-
N085	3373.6	296	N085	-	-	-	-	-	-	-
N086	3375.0	386	N086	-	-	-	-	-	-	-
N087	3398.8	386	N087	-	-	-	-	-	-	-
N088	3426.1	209	N088	-	-	-	-	-	-	-
N089	3434.7	441	N089	-	-	-	-	-	-	-
N090	3477.9	479	N090	-	-	-	-	-	-	-
N091	3603.1	189	N091	-	-	-	-	-	-	-
N092	3616.9	647	N092	-	-	-	-	-	-	-

Supplementary Table S2. List of the metabolite-candidate peaks detected from polar fractions.

a) P; polar fraction

b) RI; retention index, these values are obtained by normalizing the retention time of the peak to those of *n*-alkanesc) QuantMS; the representative *m/z* value used for peak quantification

d) The approach used for peak identification is described in the Methods section.

e) The accuracy scores returned by Aloutput2 peak identification process are shown. Identification score; calculated by Delta-RI and PPMCC values, Delta-RI; calculated by subtracting the retention index value of each peak from that of a library compound, PPMCC; Pearson's product-moment correlation coefficient.

f) HMDB; The Human Metabolome Database (version 4.0) , KEGG COMPOUND; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) COMPOUND database

Peak ID ^{a)}	Peak detection		Peak identification ^{d)}		Aloutput2 score ^{e)}			Database ID ^{f)}	
	RI ^{b)}	QuantMS ^{c)}	Metabolite name	Method	Identification score	Delta-RI	PPMCC	HMDB	KEGG
P001	1111.6	85	Undecane-like 1	Aloutput	0.730	11.6	0.679	-	-
P002	1155.2	147	P002	-	-	-	-	-	-
P003	1194.9	281	P003	-	-	-	-	-	-
P004	1230.6	228	P004	-	-	-	-	-	-
P005	1231.1	144	Valine	Aloutput	0.998	0.1	0.996	HMDB0000883	C00183
P006	1279.7	299	Glucose-1-phosphate-like 2	Aloutput	0.942	11.3	0.990	-	-
P007	1287.8	158	Leucine	Aloutput	0.999	0.2	0.999	HMDB0000687	C00123
P008	1288.8	299	Glucose-1-phosphate-like 1	Aloutput	0.993	2.2	0.992	-	-
P009	1292.8	299	Glucose-1-phosphate	Aloutput	0.998	1.8	1.000	HMDB0001586	C00103
P010	1294.4	180	Nicotinate-like 1	Aloutput	0.895	1.6	0.848	-	-
P011	1296.4	147	Glycerol-like 1	Aloutput	0.814	2.4	0.737	-	-
P012	1296.9	73	Threonine-like 1	Aloutput	0.738	10.1	0.676	-	-
P013	1306.2	142	P013	-	-	-	-	-	-
P014	1308.5	158	Isoleucine	Aloutput	0.980	1.5	0.972	HMDB0000172	C00407
P015	1312.5	199	P015	-	-	-	-	-	-
P016	1318.2	147	Succinate-like 1	Aloutput	0.822	6.8	0.768	-	-
P017	1318.8	174	Glycine	Aloutput	0.970	0.2	0.955	HMDB0000123	C00037
P018	1326.2	147	Succinate	Aloutput	0.962	1.2	0.944	HMDB0000254	C00042
P019	1340.0	147	Succinate-like 2	Aloutput	0.807	15.0	0.834	-	-
P020	1345.1	245	Fumarate-like 2	Aloutput	0.904	11.9	0.940	-	-
P021	1353.1	147	Itaconate	Aloutput	0.967	1.9	0.952	HMDB0002092	C00490
P022	1355.4	245	Fumarate-like 1	Aloutput	0.958	1.6	0.940	-	-
P023	1357.1	147	Itaconate-like 2	Aloutput	0.936	2.1	0.908	-	-
P024	1359.4	147	Itaconate-like 1	Aloutput	0.962	4.4	0.955	-	-
P025	1360.0	245	Fumarate	Aloutput	0.963	3.0	0.951	HMDB0000134	C00122
P026	1381.7	204	P026	-	-	-	-	-	-
P027	1385.7	141	β -Cyanoolanine	Aloutput	0.972	0.7	0.958	HMDB0060245	C02512
P028	1401.3	71	Tetradecane-like 1	Aloutput	0.870	1.3	0.813	-	-
P029	1408.3	218	P029	-	-	-	-	-	-
P030	1470.3	174	P030	-	-	-	-	-	-
P031	1489.3	73	Malate-like 2	Aloutput	0.838	17.7	0.933	-	-
P032	1493.1	147	Malate-like 4	Aloutput	0.732	12.9	0.695	-	-
P033	1496.8	147	Malate-like 3	Aloutput	0.763	9.2	0.702	-	-
P034	1497.5	73	Malate-like 5	Aloutput	0.708	9.5	0.631	-	-
P035	1507.5	73	Malate-like 1	Aloutput	0.922	0.5	0.886	-	-
P036	1509.5	243	P036	-	-	-	-	-	-
P037	1510.9	75	P037	-	-	-	-	-	-
P038	1511.6	73	Malate	Aloutput	0.987	4.6	0.993	HMDB0000156	C00149
P039	1519.1	156	5-Oxoproline-like 2	Aloutput	0.876	13.9	0.926	-	-
P040	1521.1	232	Aspartic acid-like 2	Aloutput	0.809	17.9	0.887	-	-
P041	1522.5	174	γ -Aminobutyrate-like 2	Aloutput	0.737	19.5	0.803	-	-
P042	1525.2	156	5-Oxoproline-like 1	Aloutput	0.952	7.8	0.964	-	-
P043	1532.0	176	P043	-	-	-	-	-	-
P044	1532.7	156	5-Oxoproline	Aloutput	0.998	0.3	0.997	HMDB0000267	C01879
P045	1535.4	232	Aspartic acid-like 1	Aloutput	0.927	3.6	0.900	-	-
P046	1537.4	174	γ -Aminobutyrate-like 1	Aloutput	0.955	4.6	0.946	-	-
P047	1541.5	234	P047	-	-	-	-	-	-
P048	1542.2	232	Aspartate	Aloutput	0.984	3.2	0.983	HMDB0000191	C00049
P049	1542.9	147	P049	-	-	-	-	-	-
P050	1543.5	174	γ -Aminobutyrate	Aloutput	0.964	1.5	0.948	HMDB0000112	C00334
P051	1583.0	73	α -Ketoglutaric acid-like 2	Aloutput	0.726	9.0	0.651	-	-
P052	1592.5	218	P052	-	-	-	-	-	-
P053	1600.0	71	Hexadecane	Aloutput	0.962	0.0	0.944	HMDB0033792	No entry found
P054	1606.6	73	α -Ketoglutaric acid-like 1	Aloutput	0.758	14.6	0.754	-	-
P055	1612.4	218	P055	-	-	-	-	-	-
P056	1613.2	262	P056	-	-	-	-	-	-

P057	1627.8	75	C13:0FAME-like 1	Aloutput	0.724	2.8	0.619	-	-
P058	1629.2	218	Phenylalanine-like 1	Aloutput	0.714	9.8	0.640	-	-
P059	1632.2	189	P059	-	-	-	-	-	-
P060	1632.9	73	P060	-	-	-	-	-	-
P061	1638.1	218	Phenylalanine	Aloutput	0.953	0.9	0.931	HMDB0000159	C00079
P062	1640.2	246	P062	-	-	-	-	-	-
P063	1649.7	230	P063	-	-	-	-	-	-
P064	1650.4	229	P064	-	-	-	-	-	-
P065	1693.6	73	P065	-	-	-	-	-	-
P066	1694.3	231	P066	-	-	-	-	-	-
P067	1711.8	85	Heptadecane-like 1	Aloutput	0.707	11.8	0.648	-	-
P068	1751.9	174	Putrescine	Aloutput	0.968	0.9	0.953	HMDB0001414	C00134
P069	1764.2	217	Ribitol	Aloutput	0.984	5.2	0.993	HMDB0000508	C00474
P070	1770.4	147	Aconitic acid-like 1	Aloutput	0.735	4.4	0.638	-	-
P071	1777.4	216	P071	-	-	-	-	-	-
P072	1792.1	156	Glutamine	Aloutput	0.969	1.1	0.954	HMDB0000641	C00064
P073	1840.2	142	Ornithine-like 1	Aloutput	0.896	1.2	0.849	-	-
P074	1847.5	461	P074	-	-	-	-	-	-
P075	1852.4	273	Citrate-like 1	Aloutput	0.859	2.4	0.799	-	-
P076	1853.2	350	P076	-	-	-	-	-	-
P077	1893.6	345	Quinate-like 1	Aloutput	0.884	3.4	0.837	-	-
P078	1900.1	345	Quinate	Aloutput	0.991	3.1	0.993	HMDB0003072	C00296
P079	1913.8	331	P079	-	-	-	-	-	-
P080	1916.4	217	Fructose	Aloutput	0.990	3.4	0.992	HMDB0000660	C00095
P081	1917.2	129	P081	-	-	-	-	-	-
P082	1927.4	217	Fructose-like 1	Aloutput	0.911	14.4	0.990	-	-
P083	1935.1	319	Glucose-like 1	Aloutput	0.915	3.9	0.884	-	-
P084	1939.4	154	P084	-	-	-	-	-	-
P085	1942.0	518	P085	-	-	-	-	-	-
P086	1942.8	319	Glucose	Aloutput	0.989	3.8	0.992	HMDB0000122	C00031
P087	1943.6	230	P087	-	-	-	-	-	-
P088	1944.5	317	Lysine	Aloutput	0.955	2.5	0.938	HMDB0000182	C00047
P089	1950.5	218	Tyrosine	Aloutput	0.953	7.5	0.964	HMDB0000158	C00082
P090	1959.1	218	Tyrosine-like 1	Aloutput	0.812	1.1	0.732	-	-
P091	1974.4	319	Mannitol	Aloutput	0.989	3.4	0.990	HMDB0000765	C00392
P092	1999.2	396	P092	-	-	-	-	-	-
P093	2042.9	313	C16:0FA-like1	Aloutput	0.812	6.1	0.749	-	-
P094	2051.0	313	C16:0FA	Aloutput	0.996	2.0	0.997	HMDB0000220	C00249
P095	2077.8	204	P095	-	-	-	-	-	-
P096	2096.5	259	P096	-	-	-	-	-	-
P097	2130.6	305	myo-Inositol	Aloutput	0.985	1.6	0.979	HMDB0000211	C00137
P098	2131.5	306	P098	-	-	-	-	-	-
P099	2152.7	396	P099	-	-	-	-	-	-
P100	2161.0	245	P100	-	-	-	-	-	-
P101	2225.1	202	Tryptophan-like 1	Aloutput	0.864	15.9	0.941	-	-
P102	2236.6	202	Tryptophan	Aloutput	0.988	4.4	0.994	HMDB0000929	C00078
P103	2247.4	341	C18:0FA	Aloutput	0.960	1.6	0.942	HMDB0000827	C01530
P104	2367.5	387	Glucose-6-phosphate-like 1	Aloutput	0.841	10.5	0.826	-	-
P105	2368.5	315	Fructose 6-phosphate-like 1	Aloutput	0.875	2.5	0.822	-	-
P106	2379.8	387	Glucose-6-phosphate	Aloutput	0.980	1.8	0.972	HMDB0001401	C00092
P107	2395.9	387	Glucose-6-phosphate-like 2	Aloutput	0.755	17.9	0.802	-	-
P108	2431.5	204	P108	-	-	-	-	-	-
P109	2497.7	73	P109	-	-	-	-	-	-
P110	2703.7	361	Sucrose-like 2	Aloutput	0.862	7.3	0.827	-	-
P111	2713.2	131	P111	-	-	-	-	-	-
P112	2714.4	361	Sucrose	Aloutput	0.932	3.4	0.906	HMDB0000258	C00089
P113	2715.5	437	P113	-	-	-	-	-	-
P114	2718.0	73	P114	-	-	-	-	-	-
P115	2719.1	361	Sucrose-like 1	Aloutput	0.876	8.1	0.854	-	-
P116	2817.3	361	Maltose	Aloutput	0.900	0.3	0.854	HMDB0000163	C00208
P117	3057.8	345	P117	-	-	-	-	-	-
P118	3071.8	204	P118	-	-	-	-	-	-
P119	3075.7	307	P119	-	-	-	-	-	-
P120	3180.4	345	P120	-	-	-	-	-	-
P121	3240.0	307	P121	-	-	-	-	-	-
P122	3413.0	267	P122	-	-	-	-	-	-
P123	3434.4	441	P123	-	-	-	-	-	-
P124	3504.4	361	1-Kestose-like 1	Aloutput	0.865	10.6	0.863	-	-

Supplementary Table S3. Comparison of non-polar metabolite levels between GE and Cont samples.

Notes:

a) N; non-polar fraction

b) GE; Gene edited samples, Cont; Control samples, SD; standard deviation

c) The ratios of relative peak intensities in GE against those in Cont are calculated. When the GE/ Cont ratio was below 1, Cont/GE ratio was calculated and the value is shown with - (minus). Bold letter; >2 or <-2

d) Significant differences of relative peak intensities in GE against those of Cont are analyzed by Student's t-test using MetaboAnalyst (version 3.5), a web-based statistical analysis tool of metabolomics data. Bold letter; <0.05

Peak ID ^{a)}	Metabolite name	Relative peak intensity ^{b)}				Ratio ^{c)} (GE/Cont)	Student's t-test ^{d)}	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
N076	Campesterol	11286	1469	1123	152	10.1	0.0003	0.0258
N069	Cholesterol	1292	469	5357	564	-4.1	0.0006	0.0258
N071	Solanidine	1950	657	102032	20199	-52.3	0.0016	0.0500
N079	N079	4579	601	6649	356	-1.5	0.0044	0.1021
N087	N087	5347	627	7577	409	-1.4	0.0063	0.1158
N086	N086	20508	2812	28354	2341	-1.4	0.0183	0.2805
N085	N085	17527	2530	23979	1903	-1.4	0.0244	0.3144
N045	Heptacosane-like 1	2655	619	1947	348	1.4	0.0515	0.3144
N090	N090	6040	1087	4325	645	1.4	0.0522	0.3144
N020	C17:0FA-like 1	6203	1338	9028	1112	-1.5	0.0529	0.3144
N077	N077	4028	556	3193	259	1.3	0.0535	0.3144
N058	N058	3971	480	5066	864	-1.3	0.0577	0.3144
N007	C16:0FAME-like 1	72594	10026	57418	8911	1.3	0.0599	0.3144
N056	N056	5184	702	6667	1342	-1.3	0.0599	0.3144
N082	β -Sitosterol	112932	14688	90025	7438	1.3	0.0619	0.3144
N060	C27:0FAlc	31645	3281	37244	2319	-1.2	0.0635	0.3144
N026	C20:0FAME	19864	1283	22692	1772	-1.1	0.0659	0.3144
N015	C18:1FAME-like 1	1327	262	873	404	1.5	0.0664	0.3144
N084	N084	3801	928	2426	179	1.6	0.0682	0.3144
N075	N075	237900	21314	208841	14512	1.1	0.0684	0.3144
N053	N053	8489	1429	11331	1265	-1.3	0.0736	0.3223
N044	N044	27757	5849	19719	1365	1.4	0.0944	0.3592
N050	C25:0FAlc	13941	3097	9554	823	1.5	0.0955	0.3592
N081	C30:0FAlc	142878	21120	113447	13845	1.3	0.0977	0.3592
N089	N089	14971	3590	13055	2389	1.1	0.1016	0.3592
N016	N016	43674	3057	47749	3340	-1.1	0.1041	0.3592
N078	N078	11587	1595	9381	634	1.2	0.1054	0.3592
N040	N040	3343	336	3581	351	-1.1	0.1128	0.3705
N017	C18:0FAME-like 1	51058	3616	55754	4542	-1.1	0.1313	0.4166
N029	C21:0FAlc	91383	14524	75177	4243	1.2	0.1529	0.4688
N080	C30:0FAME	101667	13469	89491	9404	1.1	0.1616	0.4796
N057	N057	3933	1240	3301	555	1.2	0.1755	0.5046
N009	C17:0FAME	1473	388	1092	137	1.3	0.1835	0.5117
N027	C19:0FA-like 1	5725	961	6739	582	-1.2	0.1981	0.5260
N021	C18:2FA-like 1	1563	349	1287	159	1.2	0.2001	0.5260
N074	N074	18088	1764	16606	733	1.1	0.2219	0.5670
N065	C28:0FAME	107275	13958	119715	6613	-1.1	0.2389	0.5845
N022	C18:0FA	9650	1216	10130	1024	-1.0	0.2495	0.5845
N008	C17:0FAME-like 1	650	207	514	132	1.3	0.2512	0.5845
N036	C22:1FAME-like 1	562	149	680	370	-1.2	0.2541	0.5845
N083	N083	12497	1481	11641	1097	1.1	0.2967	0.6501
N034	Pentacosane-like 1	4455	999	3772	1042	1.2	0.3008	0.6501
N054	C26:0FAME	16464	1992	17408	1196	-1.1	0.3038	0.6501
N037	C22:0FAME	9099	1673	10236	1562	-1.1	0.3247	0.6698
N025	Tricosane-like 1	2957	478	2556	579	1.2	0.3276	0.6698
N061	N061	4172	1153	4449	946	-1.1	0.3441	0.6807
N047	C24:0FAlc	42560	5941	38879	2025	1.1	0.3488	0.6807
N011	N011	12200	1893	10929	4135	1.1	0.3603	0.6807
N038	N038	17716	1887	20018	3253	-1.1	0.3640	0.6807
N010	C16:0FA	28852	5367	27593	3131	1.0	0.3699	0.6807
N046	C24:0FAME	15607	2099	17022	2015	-1.1	0.3963	0.7085

N039	N039	18297	1533	20893	4126	-1.1	0.4053	0.7085
N052	N052	32154	1292	31679	862	1.0	0.4155	0.7085
N001	N001	22514	6271	20817	4751	1.1	0.4158	0.7085
N019	N019	3532	817	3920	475	-1.1	0.4336	0.7252
N063	N063	6029	1415	6811	1625	-1.1	0.4853	0.7568
N002	Glucose-1-phosphate	859	524	731	336	1.2	0.4880	0.7568
N070	N070	10904	1428	10091	1813	1.1	0.4926	0.7568
N088	N088	62588	19255	52677	9428	1.2	0.4932	0.7568
N051	N051	12127	1998	13036	1053	-1.1	0.4936	0.7568
N030	N030	3752	1107	4417	937	-1.2	0.5045	0.7609
N033	N033	4933	1494	5785	1161	-1.2	0.5175	0.7679
N048	N048	3777	1429	3292	853	1.1	0.5270	0.7696
N062	N062	18548	2957	17317	874	1.1	0.5370	0.7719
N049	N049	4729	1147	4534	623	1.0	0.5631	0.7929
N003	N003	6997	1972	6590	1931	1.1	0.5695	0.7929
N073	C29:0FAIc	6516	1314	6095	1038	1.1	0.5774	0.7929
N031	N031	3184	1081	3559	498	-1.1	0.6293	0.8414
N035	N035	3434	1140	3847	629	-1.1	0.6311	0.8414
N059	N059	8854	2331	9605	2340	-1.1	0.6527	0.8458
N041	N041	2955	512	3107	259	-1.1	0.6617	0.8458
N068	N068	267175	28972	274459	19263	-1.0	0.6619	0.8458
N091	N091	5516	2971	4642	1415	1.2	0.6996	0.8817
N064	N064	4482	934	4614	654	-1.0	0.7177	0.8898
N005	C14:0FAME-like 1	556	112	535	121	1.0	0.7354	0.8898
N028	C21:0FAME	2336	482	2430	359	-1.0	0.7470	0.8898
N014	C18:2FAME-like 1	42452	4511	43549	3648	-1.0	0.7542	0.8898
N043	C23:0FAME	4806	1490	5113	1123	-1.1	0.7544	0.8898
N004	Malate-like 1	538	123	519	144	1.0	0.8166	0.9488
N042	C22:0FAIc	36759	5374	37428	2269	-1.0	0.8539	0.9488
N072	C29:0FAME	38917	2426	38638	3227	1.0	0.8647	0.9488
N066	N066	7544	1173	7616	1085	-1.0	0.8655	0.9488
N023	N023	3767	539	3726	268	1.0	0.8842	0.9488
N006	Octadecane-like 1	514	132	509	130	1.0	0.8944	0.9488
N055	C26:0FAIc	141264	19493	139660	6388	1.0	0.8960	0.9488
N012	C18:2FAME	55165	6385	55524	5593	-1.0	0.9000	0.9488
N013	N013	7026	1593	7128	1828	-1.0	0.9037	0.9488
N018	N018	25912	6905	25492	3421	1.0	0.9189	0.9488
N032	N032	3534	1357	3432	953	1.0	0.9251	0.9488
N067	C28:0FAIc	671457	105905	668179	89049	1.0	0.9310	0.9488
N092	N092	26507	7119	26199	6207	1.0	0.9469	0.9488
N024	C20:2FAME-like 1	548	131	546	144	1.0	0.9488	0.9488

Supplementary Table S4. Comparison of non-polar metabolite levels between GE and Cont samples.

Notes:

a) P; polar fraction

b) GE; Gene edited samples, Cont; Control samples, SD; standard deviation

c) The ratios of relative peak intensities in GE against those in Cont are calculated. When the GE/Cont ratio was below 1, Cont/GE ratio was calculated and the value is shown with - (minus). Bold letter; >2 or <-2

d) Significant differences of relative peak intensities in GE against those of Cont are analyzed by Student's t-test using MetaboAnalyst (version 3.5), a web-based statistical analysis tool of metabolomics data. Bold letter; <0.05

Peak ID ^{a)}	Metabolite name	Relative peak intensity ^{b)}				Ratio ^{c)} (GE/Cont)	Student's t-test ^{d)}	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P056	P056	19015	3660	12365	2715	1.5	0.0029	0.2438
P017	Glycine	4593	312	3643	506	1.3	0.0050	0.2438
P007	Leucine	41845	6171	23013	4755	1.8	0.0070	0.2438
P125	1-Kestose-like 2	486	132	681	93	-1.4	0.0090	0.2438
P036	P036	107781	23150	77126	19468	1.4	0.0128	0.2438
P026	P026	31968	5677	21755	3261	1.5	0.0144	0.2438
P055	P055	124600	21890	83068	20978	1.5	0.0145	0.2438
P005	Valine	91723	17793	50893	7553	1.8	0.0168	0.2438
P014	Isoleucine	66301	14917	33400	5492	2.0	0.0200	0.2438
P060	P060	55534	11598	40300	8407	1.4	0.0214	0.2438
P016	Succinate-like 1	1197	44	1006	124	1.2	0.0216	0.2438
P059	P059	10797	2641	7131	1625	1.5	0.0239	0.2438
P061	Phenylalanine	41073	10375	15873	3936	2.6	0.0252	0.2438
P102	Tryptophan	32954	10250	12456	4115	2.6	0.0337	0.3037
P078	Quinate	135156	21638	251428	56039	-1.9	0.0404	0.3390
P090	Tyrosine-like 1	76671	28297	28534	9449	2.7	0.0455	0.3580
P088	Lysine	23223	2827	16488	2822	1.4	0.0523	0.3604
P069	Ribitol	60352	1220	59821	1525	1.0	0.0524	0.3604
P118	P118	13604	3935	25741	6700	-1.9	0.0543	0.3604
P010	Nicotinate-like 1	823	92	1032	144	-1.3	0.0634	0.3995
P063	P063	20359	4654	13368	2401	1.5	0.0798	0.4424
P050	γ-Aminobutyrate	69847	4668	77028	5112	-1.1	0.0803	0.4424
P052	P052	87936	28608	48359	3241	1.8	0.0855	0.4424
P084	P084	22416	6696	12835	2722	1.7	0.0901	0.4424
P029	P029	6591	1295	5385	743	1.2	0.0909	0.4424
P064	P064	103139	25866	66928	12352	1.5	0.0913	0.4424
P076	P076	3270	387	3682	196	-1.1	0.1158	0.5222
P075	Citrate-like 1	358618	42057	407053	25504	-1.1	0.1166	0.5222
P077	Quinate-like 1	6805	12631	486	132	14.0	0.1243	0.5222
P046	γ-Aminobutyrate-like 1	486	132	5206	9486	-10.7	0.1287	0.5222
P066	P066	165106	29922	132908	23838	1.2	0.1294	0.5222
P043	P043	13736	2717	9386	2811	1.5	0.1326	0.5222
P027	β-Cyanoalanine	2536	738	1831	615	1.4	0.1533	0.5854
P085	P085	6220	947	5130	1179	1.2	0.1733	0.6423
P111	P111	3573	1285	4327	983	-1.2	0.1925	0.6929
P024	Itaconate-like 1	737	302	998	266	-1.4	0.2047	0.7164
P072	Glutamine	1012	222	1354	571	-1.3	0.2146	0.7184
P109	P109	4749	884	5486	1128	-1.2	0.2167	0.7184
P091	Mannitol	6106	634	7462	1483	-1.2	0.2274	0.7307
P089	Tyrosine	3100	1633	1674	1309	1.9	0.2320	0.7307
P079	P079	24658	5415	20388	3643	1.2	0.2435	0.7482
P022	Fumarate-like 1	582	126	516	133	1.1	0.2505	0.7508
P053	Hexadecane	542	178	665	207	-1.2	0.2562	0.7508
P106	Glucose-6-phosphate	2400	644	2939	714	-1.2	0.2987	0.8338
P087	P087	5985	2043	4247	1212	1.4	0.3103	0.8338
P013	P013	83037	19061	58812	29714	1.4	0.3180	0.8338
P018	Succinate	528	147	623	105	-1.2	0.3282	0.8338
P012	Threonine-like 1	919	736	1422	1173	-1.5	0.3343	0.8338
P119	P119	3844	1313	3059	873	1.3	0.3433	0.8338
P105	Fructose 6-phosphate-like 1	970	256	1154	285	-1.2	0.3461	0.8338
P124	1-Kestose-like 1	737	333	1101	444	-1.5	0.3522	0.8338
P104	Glucose-6-phosphate-like 1	826	198	964	247	-1.2	0.3585	0.8338
P108	P108	9063	1943	7632	1977	1.2	0.3689	0.8338
P065	P065	89406	11279	82862	11168	1.1	0.3788	0.8338

P073	Ornithine-like 1	5270	1107	4515	1307	1.2	0.3803	0.8338
P058	Phenylalanine-like 1	2372	3835	514	132	4.6	0.3866	0.8338
P054	α -Ketoglutaric acid-like 1	9865	11192	4381	6658	2.3	0.3877	0.8338
P030	P030	3940	105	3887	193	1.0	0.3965	0.8338
P051	α -Ketoglutaric acid-like 2	19162	15742	9463	10899	2.0	0.4048	0.8338
P096	P096	7002	1565	5845	1547	1.2	0.4091	0.8338
P040	Aspartic acid-like 2	5280	2600	3864	2307	1.4	0.4194	0.8338
P057	C13:0FAME-like 1	2179	1681	1355	1570	1.6	0.4199	0.8338
P068	Putrescine	555	106	523	116	1.1	0.4222	0.8338
P070	Aconitic acid-like 1	486	132	526	147	-1.1	0.4280	0.8338
P098	P098	4054	829	4918	1421	-1.2	0.4322	0.8338
P009	Glucose-1-phosphate	485323	48154	508970	54985	-1.0	0.4368	0.8338
P071	P071	3263	1478	4940	2620	-1.5	0.4470	0.8407
P002	P002	21592	6549	19406	6766	1.1	0.4606	0.8534
P121	P121	3798	1066	3068	1140	1.2	0.4923	0.8685
P011	Glycerol-like 1	2273	579	1965	549	1.2	0.4963	0.8685
P097	myo-Inositol	14208	3009	16898	5170	-1.2	0.4981	0.8685
P001	Undecane-like 1	1080	309	956	394	1.1	0.5038	0.8685
P074	P074	4441	2056	6176	2925	-1.4	0.5045	0.8685
P110	Sucrose-like 2	552	135	526	147	1.0	0.5203	0.8685
P100	P100	4025	816	4415	801	-1.1	0.5206	0.8685
P083	Glucose-like 1	9387	20845	4384	7082	2.1	0.5284	0.8685
P080	Fructose	96948	91164	59595	21372	1.6	0.5590	0.8685
P037	P037	8315	1520	7744	753	1.1	0.5608	0.8685
P095	P095	4805	4499	2929	924	1.6	0.5660	0.8685
P019	Succinate-like 2	523	143	545	132	-1.0	0.5663	0.8685
P031	Malate-like 2	7157	9483	4321	4542	1.7	0.5685	0.8685
P107	Glucose-6-phosphate-like 2	536	122	567	119	-1.1	0.5726	0.8685
P033	Malate-like 3	3195	5145	1863	1984	1.7	0.5788	0.8685
P116	Maltose	602	251	514	132	1.2	0.5790	0.8685
P047	P047	7732	936	7301	866	1.1	0.5894	0.8713
P122	P122	4079	2333	3229	980	1.3	0.5947	0.8713
P035	Malate-like 1	19183	19659	14436	19291	1.3	0.6131	0.8880
P094	C16:0FA	23525	2151	22994	2530	1.0	0.6264	0.8969
P086	Glucose	133491	108935	95923	31550	1.4	0.6410	0.9007
P003	P003	3880	1008	4205	1272	-1.1	0.6474	0.9007
P115	Sucrose-like 1	374962	363038	302488	375314	1.2	0.6505	0.9007
P081	P081	3935	3369	2851	1029	1.4	0.6626	0.9069
P082	Fructose-like 1	53192	40145	40439	14744	1.3	0.6724	0.9069
P062	P062	74690	11659	78158	18673	-1.0	0.6766	0.9069
P067	Heptadecane-like 1	578	117	546	128	1.1	0.6942	0.9101
P004	P004	4459	1461	4179	965	1.1	0.7068	0.9101
P126	P126	6314	796	6576	1323	-1.0	0.7085	0.9101
P123	P123	10946	1741	10460	2722	1.0	0.7132	0.9101
P034	Malate-like 5	3409	5226	2589	2448	1.3	0.7151	0.9101
P093	C16:0FA-like 1	857	612	961	719	-1.1	0.7291	0.9187
P113	P113	98723	17584	103154	24401	-1.0	0.7422	0.9259
P044	5-Oxoproline	196279	27893	206076	35896	-1.0	0.7521	0.9290
P048	Aspartate	88729	11133	85756	12196	1.0	0.7747	0.9331
P101	Tryptophan-like 1	503	125	514	132	-1.0	0.7781	0.9331
P015	P015	4305	843	4178	665	1.0	0.7811	0.9331
P008	Glucose-1-phosphate-like 1	68141	31523	73430	37177	-1.1	0.7850	0.9331
P049	P049	27453	1872	27792	1366	-1.0	0.8000	0.9420
P103	C18:0FA	17644	2922	17188	3836	1.0	0.8224	0.9552
P028	Tetradecane-like 1	758	92	749	134	1.0	0.8380	0.9552
P025	Fumarate	2902	757	3060	988	-1.1	0.8424	0.9552
P041	γ -Aminobutyrate-like 2	1094	434	1036	388	1.1	0.8520	0.9552
P020	Fumarate-like 2	583	261	560	161	1.0	0.8540	0.9552
P117	P117	19587	5998	20413	6023	-1.0	0.8567	0.9552
P039	5-Oxoproline-like 2	5950	5013	5427	5238	1.1	0.8756	0.9678
P032	Malate-like 4	4895	5954	4331	4800	1.1	0.8922	0.9735
P092	P092	14197	2887	13977	2358	1.0	0.9025	0.9735
P023	Itaconate-like 2	538	123	531	156	1.0	0.9206	0.9735
P038	Malate	66311	19812	65146	6874	1.0	0.9358	0.9735
P045	Aspartic acid-like 1	10290	8013	9833	6744	1.0	0.9387	0.9735
P021	Itaconate	541	125	547	129	-1.0	0.9418	0.9735
P120	P120	24581	6506	25088	9490	-1.0	0.9453	0.9735
P042	5-Oxoproline-like 1	14807	6716	15079	8549	-1.0	0.9458	0.9735
P112	Sucrose	608138	250718	618184	276920	-1.0	0.9503	0.9735

P099	P099	17164	2261	17240	2945	-1.0	0.9698	0.9854
P006	Glucose-1-phosphate-like 2	339567	158098	337371	207440	1.0	0.9813	0.9885
P114	P114	66320	15979	66417	15469	-1.0	0.9885	0.9885

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 ニワトリのモデル組換え体の作出

研究分担者	堀内 浩幸	(広島大学生物圏科学研究科・教授)
研究協力者	小関 良宏	(東京農工大学工学研究院・教授)
	太田 大策	(大阪府立大学生命環境学研究所・教授)
	手島 玲子	(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員 徳島文理大学香川薬学部・特任教授)

研究要旨

本研究は、食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変（TG）ニワトリをモデルに、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と整備を行い、その検討を行なうことが目的である。平成 29 年度は、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 種を作出した。

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方、遺伝子組換え動物では、水域における魚類においてアメリカ食品医薬品局（FDA）の認可があり、いよいよ流通の段階までできている。陸域の遺伝子組換え動物は、既に医薬品において組換え動物由来の医薬品が複数 FDA により認可され、日本でも遺伝子組換えニワトリの鶏卵で製造された組換え酵素製剤の認可が了承されたところである。今後は、ゲノム編集技術を中心とした遺伝子改変動物由来の食品開発が加速することも予想され、その対策が急務であると思われる。

そこで本研究の目的は、食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変ニワトリをモデルに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と整備を行い、その検討を行なうことである。平成 29 年度は、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の作出を行なった。

B. 研究方法

(1) オミクス解析データの総合評価

研究協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。

(2) 遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出・維持

これまでのニワトリ epiSC を用いた遺伝子改変技術に代え、培養始原生殖細胞（PGC）を用いる方法で、遺伝子組換えニワトリとしてセンサー遺伝子導入ニワトリと ZsGreen 導入ニワトリの作出試験と維持を行なった。センサー遺伝子導入ニワトリは、ウイルスベクター法を用いて、また、ZsGreen 導入ニワトリは、プラスミドベクターを用いる方法で行なった。さらに、同培養 PGC を用いる手法で、ゲノム編集ニワトリとしてアレルゲンノックアウトニワトリと 2 種の雄化遺伝子のノックアウトニワトリの作出試験と維持を行なった。アレルゲンノックアウトには、TALEN 法を、雄化遺伝子のノ

ックアウトには、CRISPR/Cas9法を使用した。

倫理面への配慮

組換え DNA 実験に関しては、カルタヘナ法のもと、広島大学が定める組換え DNA 実験安全管理規則に従い、研究計画書を提出し、機関承認実験として広島大学長から承認を得て実施した（承認番号：28-103-2, 29-14-2）。

動物使用実験に関しては、広島大学動物実験実施規則に従い研究計画を提出し、広島大学長からの承認（承認番号：C16-23）を受け、この規則に従い研究を実施した。

研究倫理教育は、平成 27 年 12 月 21 日（月）に広島大学において開催された理工農系の研究者を対象とした研究倫理教育 FD を受講するとともに、CITI JAPAN の基本コース B を e-learning により受講し、平成 28 年 10 月 29 日に全てのカリキュラムを修了した。

C. 研究結果

（1）オミクス解析データの総合評価

研究球力者のもとで実施した 3 つのオミクス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。その結果、すべての解析データにおいて、平成 27 年度に実施した正常ニワトリを用いて得られた個体差を示す変動以外に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。今回、解析した遺伝子改変ニワトリに導入された遺伝子は GFP であり、細胞内でのみ発現するため、生体の代謝や恒常性の維持に関わる変動が認められないことが示唆された。

（2）遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出・維持

平成 29 年度は、培養始原生殖細胞（PGC）を用いる方法で、遺伝子組換えニワトリとしてセンサー遺伝子導入ニワトリと ZsGreen 導入ニワトリ生殖系列第 2 世代（G1）の作出試験に成功した。センサー遺伝子導入ニワトリは、さらに G1 世代が性成熟したことから、これらを戻し交配することで系統の維持と染色体上での導入遺伝子の数と位置を特定した。また、同培養 PGC を用いる手法で、ゲノム編集ニワトリとしてアレルゲンノックアウトニワトリと 2 種の雄化遺伝子のノックアウトニワトリの作出試験を行いそれぞれ G1 世代の作出に成功した。平成

29 年度に作出したモデル遺伝子改変ニワトリは今後、食品利用に近い個体であることから系統の維持と安全性評価としてオミクス解析が必要であると考えられた。

D. 考察

オミクス解析データの総合評価では、解析した遺伝子改変ニワトリに導入された遺伝子は GFP であり、細胞内でのみ発現するため、生体の代謝や恒常性の維持に関わる変動が認められないことが示唆された。今後は、生体の代謝や機能に影響を及ぼす可能性があり、また食品への利用が推察されるような遺伝子改変ニワトリ（例えばノックアウトニワトリや新機能付加ニワトリ）での解析が必要である

新たなモデル組換え体の作出試験では、今後、食品利用に近い複数種の組換え体の作出に成功した。今後は、本研究成果で得られた知見をもとに、オミクス解析等による安全性評価試験を行なう必要がある。

E. 結論

平成 29 年度は、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。

F. 健康危険情報

異常なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Saheki K, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Isolation, culture and characterization of chicken amniotic mesenchymal stem cells. 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日（神戸）.
- 3) 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 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸).

- 4) 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 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸).
- 5) 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.

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
なし。

平成 29 年度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）
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

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション

研究分担者	今村 知明	奈良県立医科大学	教授
協力研究者	岡本 左和子	奈良県立医科大学	学内講師
	宮本 麻央	メディカル・イラストレーター	理学修士・Biomedical Visualization 修士

研究要旨

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。

本研究では、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。

A. 研究目的

これまでの当研究分担者による研究結果から、GM 食品に対する日本の消費者の意識は、実際のリスクは明確に認識していない一方で、摂食意向は低いことが特徴といえる。リスク認知と受容のかい離によって大きいねじれ現象が発生している。これは、他の食品リスク（添加物、食中毒、放射能等）と比較しても特殊な状況であることが、これまでの当研究分担者による研究結果から考えられた。昨年と一昨年の研究において、食のリスクに関する意識や GM

食品の受容には高校の教育で得た生物に対するリテラシーはあまり影響しないこと、また、結婚や出産といったライフイベントが影響していることが明らかになった。これらの消費者の感度が変わるライフイベントや感度が変わる理由などを明らかにすることで、コミュニケーションの一助となる可能性がある。

また、GM サーモンの登場により、これまで植物のみであった GMO の実用化が動物にも拡大し、2015 年に FDA で承認された GM りんごが 2018 年に市販されるな

ど、GM 技術を採用した食品は確実に増えている。一方で、GM サーモンの登場を受けて従来 GMO の表示義務が無かった米国においても GM サーモンに対しては表示が必要であるといった議論が発生するなど、GM やゲノム編集をめぐる社会的状況が変化してきている。

本研究では、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 技術やゲノム編集技術について、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を開発することを目的としている。3 か年の計画は下記 B. に示す通りであるが、本年は III. と IV. について研究を実施した。(図 1)

B. 本研究の内容

I. 最先端の GM 技術の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出 (初年度)

- ・昨今の市場において「不分別」という表示の商品がでてきていることから、数年前に行った GM 食品に対する消費者の意識と平成 28 年の意識に変化があるのかを確認した。
- ・平成 27 年度の研究成果より、生物に対するリテラシーよりも年代の方が GM への受容性に影響が高いことが明らかになった。

II. 新たな説明ロジック及び説明ツールの開発 (初年度～二年目)

- ・最先端の GM 技術動向に合わせた説明ツールを開発し、アンケート調査により実効性を確認した。
- ・結婚や出産等のライフイベントが GM 食品に対する受容性や食の安全性に対する感度に影響を与えていることが明らか

になった。これらは、年代による GM への受容性の違いの要因であると考えられる。

III. 先進国や食品以外の分野における事例調査 (初年度～最終年度)

- ・各国における GM 食品および NBT の安全性審査の状況等と GM サーモンの最新動向について、情報収集を実施した。

IV. リスクコミュニケーション手法の開発 (最終年度)

- ・アンケート調査による GM 作物に対する消費者の最新の受容性や調査、開発した説明ツールの検証を行った。
- ・厚生労働省のパンフレットについて、改善点を検討した。

III. 先進国や食品以外の分野における事例調査(GM サーモンの報道調査)

過年度の研究より、昨今の GM 食品に関する行政の注目すべき動向として、GM 動物の評価・管理体制に関する欧米の動きが考えられる。特に米国では、GM サーモンが及ぼす環境影響について、重大な影響はないと評価され、FDA (米国食品医薬品局) によって食品利用が承認されたと、2015 年 11 月 19 日に発表された。この GM サーモンは世界で食品として初めて承認された GM 動物であり、我が国においても早急に対応を検討する必要があるものと考えられる。

そこで、昨年度に引き続き、GM サーモンの食品利用に係る動向についてレビューを行った。米国では 2018 年 1 月に GM リンゴが販売されるなど、トウモロコシや大

豆といった穀物以外の GMO も承認、販売されており、現時点で承認されている GMO と販売動向について整理した。

また、EU をはじめとする各国の GM に関する動向について文献調査を実施した。

III-1. 研究方法

(1) GM サーモンに関する米国・カナダの動向

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

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)¹のデータベースを用いて最新の状況を調査した。

(3) EU をはじめとした各国の動向調査

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。

III-2. 研究結果

(1) GM サーモンに関する米国・カナダの動向

2017 年 8 月 4 日、AquaBounty 社のプレスリリースで 2017 年 4 月から 6 月にかけての第 2 四半期で、カナダにおいて GM サーモンを 4.5 トン、5 万ドルを販売したことが発表された²。このニュースについては各メディアでも取り上げられており、ネイチャーの記事によると米国では実質的な表示方法が決まるまで遺伝子組み換えサーモンの販売ができない状態であるため、カナダで販売されたとのことである³。ほか、AFP 通信⁴、ワシントンポスト⁵、トロント・サン⁶で関係する報道が確認できた。

なお、その後、AquaBounty 社では GM サーモンに関係する新たな情報は発表されていない。

また、カナダ議会下院において、前述の AquaBounty 社のプレスリリース以前の 2017 年 5 月 17 日に民間から提案された GM 食品の表示義務化に関する法案 (C-291) が賛成 67、反対 216 の反対多数で

¹ <http://www.isaaa.org/default.asp>

² AquaBounty 社プレスリリース (2018 年 3 月 6 日閲覧)

(<http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=197553&p=irol-newsArticle&ID=2292046>)

³³ Nature ウェブサイト (2018 年 3 月 6 日閲覧) (<http://www.nature.com/news/first-genetically-engineered-salmon-sold-in-canada-1.22116>)

⁴ AFP 通信ウェブサイト (2018 年 3 月 6 日閲覧) <http://www.afpbb.com/articles/-/3138468>

⁵The Washingtonpost ウェブサイト (2018 年 3 月 6 日閲覧)

https://www.washingtonpost.com/news/speaking-of-science/wp/2017/08/04/gmo-salmon-caught-in-u-s-regulatory-net-but-canadians-have-eaten-5-tons/?utm_term=.bd19cda7cc49)

⁶ Tront Sun ウェブサイト (2018 年 3 月 6 日閲覧)

(<http://torontosun.com/2017/08/10/45-tonnes-of-unmarked-gmo-salmon-fillets-sold-in-canada/wcm/612ec013-8c48-4828-8327-836178ea169a>)

否決されている⁷。しかし、カナダにおける GM 表示の義務化や GM サーモン拒否の動きは継続している。例えば、新民主党の Thomas 党首がインタビューで表示義務化を推進したいと述べており⁸、また、市民団体が署名運動を呼びかける⁹などの動きが見られる。

(2) 米国における GMO に関する動向

米国国立科学・工学・医学アカデミー委員会(NAS)は、2017年3月9日に「遺伝子組み換えによって将来生まれる製品についての暫定的な報告書」を公表した。全体の意見は「遺伝子組み換えの規制システムによる、今後の GMO 利用製品が持つべき消費者安全性・環境保護をより維持することが必要」というもので、これはさらに三つの意見に細分されている。その概要は以下の通りである。

- ①規制にかかわる各機関(EPA,FDA など)は、遺伝子組み換えによって成長が期待される分野について、知識を深めるべき
- ②各機関は外部のピアレビューや市民参加型のリスク分析手法を新しく考えるべき
- ③遺伝子組み換えの研究に資金提供する機関は、GMO 規制に関わる研究にも投資を行い、研究-教育間をつなげる規制活動を推進すべき

また、国としても遺伝子組み換え技術教育の予算を増額し、誤まった理解を減らすことを目標としている。これに賛同する機関も複数存在する¹⁰。

商業化においては、2018年1月に GM リンゴが試験販売されることがニュースになるなど¹¹、GMO の品目は増えてきている。

現在、FDA で承認されている GMO は 18 品目 186 件になる。トマト、チョコレート、リンゴ、メロン、キュウリ、プラムなど、穀物以外の品目も増えてきている。

(表 1)

(3) EU をはじめとした各国の動向調査

① EU

新技術に関するワーキンググループ (NTWG) が作られ、2012 年に最終報告書が発表されて以降、2016 年に提出予定だった既成案は延期され、法規制はいまだ成立していない。NTWG の主張を要約すると、「確実に導入遺伝子がないと証明できるような植物 (Null Segregant) から得られる後代の植物は GMO ではない。したがって新規に導入された遺伝子が最終的に残り続けるものが規制対象となるべき」というプロダクトベースでの規制が望ましいとするものである。

その後、2017年4月28日に欧州食品衛生委員会(EHFSC)から依頼を受けて、

⁷ PARLIAMENT OF CANADA (2018年3月6日閲覧)
(<http://www.ourcommons.ca/Parliamentarians/en/votes/42/1/283>)

⁸ GlobalNews (2018年3月6日閲覧)
(<http://globalnews.ca/video/3675168/mulc-air-calls-on-trudeau-to-address-gmo-labeling-canadians-deserve-to-know-whats-on-their-plate>)

⁹ CANADIAN BIOTECHNOLOGY

ACTION NETWORK (2018年3月6日閲覧) (<https://cban.ca/take-action/ge-fish/>)

¹⁰ BIO tech Now (2018年3月6日閲覧)
(<http://www.biotech-now.org/food-and-agriculture/2016/04/food-ag-groups-urge-support-for-biotech-education-provision>)

¹¹ CBC (2018年3月6日閲覧)
(<http://www.cbc.ca/news/technology/gmo-apple-canada-1.3943058>)

Scientific Advice Mechanism(SAM)による報告書¹²が出された。内容の概要は以下の通りである。

- i NBT といっても、それぞれの技術内容は大きく異なり、NBT として一括的に管理するのは最適ではない。
例) ゲノム編集と RNA 干渉は起こる結果は似ていても原理が大きく異なる
- ii NBT は正確性が高いため、意図しない変異による害はむしろ減らすことができる
- iii アセスメントにおいてもケースバイケースのアプローチが求められる

EU 委員会は、2017 年 9 月 28 日にこの内容を踏まえた「農業における現代バイオテクノロジー - 責任あるイノベーションのための道を拓く」というハイレベル会議を開催し、すべてのステークホルダー間でのオープンで積極的な議論を促した。

ISAAA はバイオテクノロジーの悪印象を払拭するため、児童向けのボードゲームを開発した¹³。アグロバクテリウムやパルティクルガンなどの GM の手法、さらにそれを利用して GMO ができるまでについて理解を深める内容になっているとのことである。

②オーストラリア・ニュージーランド

FSANZ (Food Standards Australia New Zealand) では、NBT の手法ごとに GM とみなすか否かを考えるという立場である。例えば、シス・ジェネシスやイントラジェネシス、SDN3 による遺伝子組み換えは、新しい遺伝子を導入するために使用されるのであれば GM であるとしている。ODM や SDN1,2 など突然変異を誘発する技術については、従来の育種と変わらないため、GM とすべきではないという立場である。また、種子生産など育種を便利にするために使う技術に利用される技術については、最終製品に痕跡が残らないので GM ではないとしている。¹⁴

③ブラジル

国立バイオセーフティ委員会が、2017 年 6 月 8 日に国内では初の遺伝子組み換えサトウキビを商業利用承認した¹⁵。

バイオテクノロジー情報評議会は農業者に対し「使われている技術の理解と実用状況」のアンケートを行った。この結果から、バイオテクノロジー系の技術保全に大きな懸念はないと述べた。

9 割の農業者は害虫や除草剤抵抗に関して、組み換えの重要性を認識し、これらが失われることに問題意識を持っていた。¹⁶

III-3. 考察

GM サーモンについて、米国では消費者への情報提供の方法が未確定であることが

¹² New techniques in Agricultural Biotechnology

¹³ ISAAA (2018 年 3 月 6 日閲覧)
(<http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=15201>)

¹⁴ New Plant Breeding Techniques (2018 年 3 月 6 日閲覧)
(<http://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/New%20Plant%20Breeding%20Techniques%20Workshop%20Report.pdf>)

[ng%20Techniques%20Workshop%20Report.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/New%20Plant%20Breeding%20Techniques%20Workshop%20Report.pdf))

¹⁵ 日経バイオテク (2018 年 3 月 6 日閲覧)
(<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/082400010/071200011/>)

¹⁶ 日経バイオテク (2018 年 3 月 6 日閲覧)
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/082400010/051000009/>

規制となって未販売となっているが、カナダでは現状では規制がなくすでに一部が販売された。GM サーモンの商業化が進展する中、消費者の抵抗感は強いが法規制が追いついていない状況である。GM を忌避する消費者のために選択するための情報提供の方法が検討されている一方で、誤解や理解不足に基づくコミュニケーションミスを避けるために技術教育の重要性が指摘され、実施されようとしている。

また、米国では FDA が承認・実用化する GMO は確実に増加しており、新たに GM リンゴが試験販売されるなど、食用の GMO の商業化は確実に進展している状況である。

EU では昨年と状況は換わらず、NBT について科学的な検討結果についての結論は提出されており、それを受けてどのような枠組みで管理・規制を行っていくかという政治的な結論がまだ明確になっていない。こうした中、産業側からは科学的な見解に基づく利用を求める動きと、慎重な対応を求める消費者側との対立でこう着状態にある。ステークホルダーコミュニケーション等が進められている動きはあるが、方針は明確になっていない。米国と同様に技術教育促進の動きが見られる。

オーストラリア・ニュージーランドでも NBT の規制については具体的な動きはないが、FSANZ では手法ごとに判断すべきという姿勢が示されている。

GM の作付けも多い南米にあるブラジルでは、サトウキビが新たに承認されるなど、利用は進んでおり、農業者の意識調査でも組換えの重要性が認識されている。

世界中でも、GM の実用化・商業化が進む一方で、抵抗を持っている国や消費者も

多く、経済的便益と社会的理解を両立させる方向が各国の対応の流れとなっている。

IV. リスクコミュニケーション手法の開発

H27 年度と 28 年度の調査結果から、高校までの生物の履修内容よりも社会人になってからの情報やライスステージの変化（結婚、子育て、子ども独立等）が GM 食品の受容に影響を与えていることが明らかになった。これらの結果を踏まえ、今年度は食品に対する安心感を構成する要素や GM を取り巻く現状の知識で、消費者の行動がどのように変化するか、試行のためのアンケート調査を実施した。

IV-1. 研究方法

i アンケート調査

一般消費者に対して、Web アンケートを実施した。Web アンケートの実施要領は、下記の通りである。

- 調査実施日：2018 年 1 月 23 日～2 月 12 日
- 有効回答数：1000 人
- 回収率：93.7%（回答画面アクセス数に対する有効回答割合）¹⁷
- 方法：Web アンケート
- 調査項目：
 - 食の安全性に対する意識
 - 食品の購買動機
 - 食品に対する安全意識の構成要素
 - GM 食品（作物）の受容性
 - GM 食品の購買判断

¹⁷ 回答画面アクセス数 1067 件、アンケート

依頼メール配信数 7427 通

- ▶ GM を取り巻く状況に関する情報提供と行動変容 等

なお、サンプルの構成は、性別・年齢構成（20代、30代、40代、50代、60代以上の5分類）で各50人になるように均等に割付を行った。

ii コミュニケーションツールの検討

現行の厚生労働省の消費者向けパンフレット「遺伝子組換えの安全性について」について、平成24年3月の改定から6年が経過しており、改善の余地があると考えられるため、本研究によって明らかになった点を踏まえ、パンフレットの改訂に関する提言を行った。

IV-2. 研究結果

i アンケート調査

(1) 食の安全性に対する意識

研究分担者は2007年以降、継続的に消費者意識について調査を実施してきており、昨年度に引き続いて本調査結果との比較を行い、消費者意識の変化を把握した。食品の安全性に関心があるかという設問について、「大変関心がある」、「関心がある」という回答の合計は、2008年3月から減少傾向にあった（図2）。また、食品の安全性に不安を感じるかという設問について、「大変不安を感じる」、「不安を感じる」という回答の合計も同様に、2008年3月から減少傾向にあった（図3）。

食品への不安から食べるのを控えている食品については、「必ず控えている」「控えている」「少し控えている」の合計値で中国産や中国加工の食品（78.6%）、生レバー（73.1%）、きのこ狩りで採ってきたきのこ（66.5%）、遺伝子組み換え食品（57.8%）の順に高い。これはふぐの44.8%よりも高

かった。（図4）。

(2) 食品の安全性、不安に対する意識の構成要素

安全だと思える食品について、上位3つをたずねたところ、1位を選んだ人の順では、新鮮（鮮度・賞味期限）を選んだ人が最も多く（26.6%）、ついで国産（日本産）（21.3%）、農薬が少ない（有機・無農薬・減農薬）（9.6%）であった（図5）。1位を選んだ人の回答を3ポイント、2位を選んだ人の回答を2ポイント、3位を選んだ人の回答を1ポイントとして換算した場合も同様の結果となった（図6）。

一方で、どのような食品を安心だと思えるかについて、同じく上位3つを尋ねたところ、1位を選んだ人の順では新鮮（鮮度・賞味期限）を選んだ人が最も多く（25.0%）、ついで国産（日本産）（23.7%）、中国産ではないと添加物が含まれていない（7.5%）の順であった（図7）。ポイント換算した結果では、国産（日本産）、新鮮（鮮度・賞味期限）、添加物が含まれていないの順となった（図8）。遺伝子組換えでないことは、順位自体は変わらないが、安心だと思える要素としてのほうが安全だと思える要素としてよりも若干ポイントが高くなる。

どのような情報を信頼して食品を選ぶかについては、店頭での表示やお店の人の意見（29.4%）、専門家の意見（21.6%）、家族の意見（20.6%）の順に多かった（図9）。

どのような場所で販売されている食品が安全だと思えるかについては、スーパー（49.5%）、デパート・高級スーパー（34.1%）、その他（8.1%）、惣菜専門店（4.1%）の順に多かった（図10）。

(3) GM食品に対する受容性

GM食品に不安を感じるかについては、

「大変不安を感じる」「不安を感じる」「少し不安を感じる」の合計が 70.3%となっている (図 11)。

また、GM 食品を食べるかどうかについては、「絶対食べない」「食べない」「どちらかといえば食べない」の合計で野菜、肉、魚ともおおむね 8 割近くの人が食べたくないと回答しており、その差はわずかであるが、肉がもっとも食べたくないと回答した人が多い (図 12)。

(4) GM 食品の現状に対する意識と行動変容

遺伝子組換えの原料を使った食品を買うかどうかについては、豆腐、とうもろこしの缶詰とも買わないと回答した人が 8 割近くと高い (図 13、図 14)。

そこで、世界における栽培の現状や IP ハンドリングについて情報提供した (図 15、図 16、表 2)。IP ハンドリングされた農産物を non-GM といっても良いかについては、情報提供前は「どちらかといえばそう思わない」「そう思わない」「まったくそう思わない」を合計すると 38.9%であったが、遺伝子組換えに関する規制の情報提供 (表 2) 後は 48.5%に増加した (図 17、図 18)。

GMO を使用した食品に対する購買については、上記のような情報提供の後、わずかに買うと回答した人が増加した (図 19、図 20)。支払意思額については、豆腐は情報提供前が 72.3 円、情報提供後が 73.0 円であり、とうもろこしの缶詰は情報提供前が 75.2 円、情報提供後が 73.4 円であった (表 3)。しかし、情報提供の前後で GM 食品(豆腐、とうもろこしの缶詰)を買わないとしていた人が買うに転じた数は、豆腐が 42 名 (表 4)、とうもろこしの缶詰が 41 名 (表 5) であった。また買う

としていた人が買わないに転じた数は、豆腐が 23 名 (表 4)、とうもろこしの缶詰が 21 名 (表 5) であった。この情報提供前後の行動変化は、McNemar 検定によりいずれも 5%水準で有意であった。

安全性審査を受けた GM は安全と思うかについては、「どちらかといえばそう思う」「そう思う」「とてもそう思う」を合計すると 53.5%の人が安全だと思っていた (図 21)。

ii コミュニケーションツールの検討

厚生労働省のパンフレット「遺伝子組換え食品の安全性について」について、以下のような点に改善の余地があると考えられる。

(1) 全体について

- 文字と絵と合わせてバランスを検討したほうがいい。
- 一文が長く複雑なので、できるだけ短く、可能であれば箇条書きにする。
- 安全対策として何を実施しているかより、語りかけるような書き方が望ましい。(例「・・・の可能性がないことが確認されていますので、食べ続けても問題はありません」→「・・・の可能性を心配する声がありますね。しかし、長年の研究とデータによって有害物質を作る可能性がないことが分かりました。日常的に食べるのに問題はありません」等。)

(2) 個々のコンテンツに対する指摘

- p4、遺伝子組換え作物の作付面積の数値は最新のものに修正したほうが良い。

- p9、名称、性質列挙の最後に「など」をつけるか、タイトルに「(一例)」と加えた方がより正確である。
- p10～11、「②組み込まれた遺伝子はどのように働くか」を表す事柄が漠然としているので、もう少し説明を追加したほうが良い。
- p12、胃液での分解例の画像について「陽性コントロール」と「陰性コントロール」の意味が一般には分かりづらいのではないか。
- p14、「日本で安全性審査が終了していないもの」は更新する必要がある。
- p15、IP ハンドリングの図が流通経路の図になっているので、分別流通管理をしていることが分かるような図に改める。

IV-3 考察

食の安全性に対する意識については、昨年度の調査と大きく変化はなく、10年単位で比較すると食の安全性に対する意識や関心は低下傾向にある。実際にリスクがある生レバーやきのこ狩りで採ってきたきのこなどの食品と並んで、中国産食品や遺伝子組換え食品はリスクが高いとして避けられている。これは実際に死亡事故が発生する恐れがあるふぐよりも高く、科学的に評価されたリスクと、消費者の安心はイコールではないと考えられる。

安全だと思ふ食品と安心だと思ふ食品については、新鮮さや国産（日本産）であることは、安全であり安心であると認識されていた。3位以下の要素にもほとんど違いがないが、若干順位の変化が見られた。中国産食品でないことは、国産であると同

に安全と安心の上位の構成要素となっている。遺伝子組換えでないことは中国産でないことと同様、安全よりも安心を構成する要素としての性質が強いと考えられる。

GM 食品に対する受容性は依然として低く、7割以上の方が不安に思っており、約8割の人が食べたくないと思っている(図12)。

遺伝子組換え食品の購買についてはほとんどの人が買いたくないと思っており、non-GM と比較すると支払い意思額も低下する。

IP ハンドリングされた穀物を遺伝子組換えでないと思えるかどうかについては、GM 食品の規制に関する情報提供の前後で差が見られた。情報提供後に IP ハンドリングされた穀物を non-GM といってもいいと思う人が約1割減少する。これは、「意図せざる混入が5%未満なら認められている」という情報の影響によると考えられる。

一方、IP ハンドリングについて知識を得ることで、GM 食品(豆腐、とうもろこしの缶詰)を買わないとしていた人が買うに転じた数は、豆腐が42名、とうもろこしの缶詰が41名であった。また買うとしていた人が買わないに転じた数は、豆腐が23名、とうもろこしの缶詰が21名であり、行動の変化に影響を与えていた。

説明のイラストや文言の提示後に消費者の行動には変化が見られ、これらのツールやロジックを使ったコミュニケーションに効果があると考えられる。

現在の厚生労働省の消費者向けパンフレットは、最終の改定から6年が経過しており、情報を更新する必要がある。また、文章とイラストのバランスや、それぞれで何をメッセージとして示すかについて、再度整理し、再構成する必要がある。

C. 結論

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（図 15、図 16、表 2）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。

D. 健康危険情報

なし

F. 研究発表：

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・講演

2017年10月31日～11月2日（鹿児島県、鹿児島県文化センター）。第76回日本公衆衛生学会、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。峯昌啓、岡本左和子、濱田美来、藤馬裕一、今村知明。

D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I 図表

A 研究目的

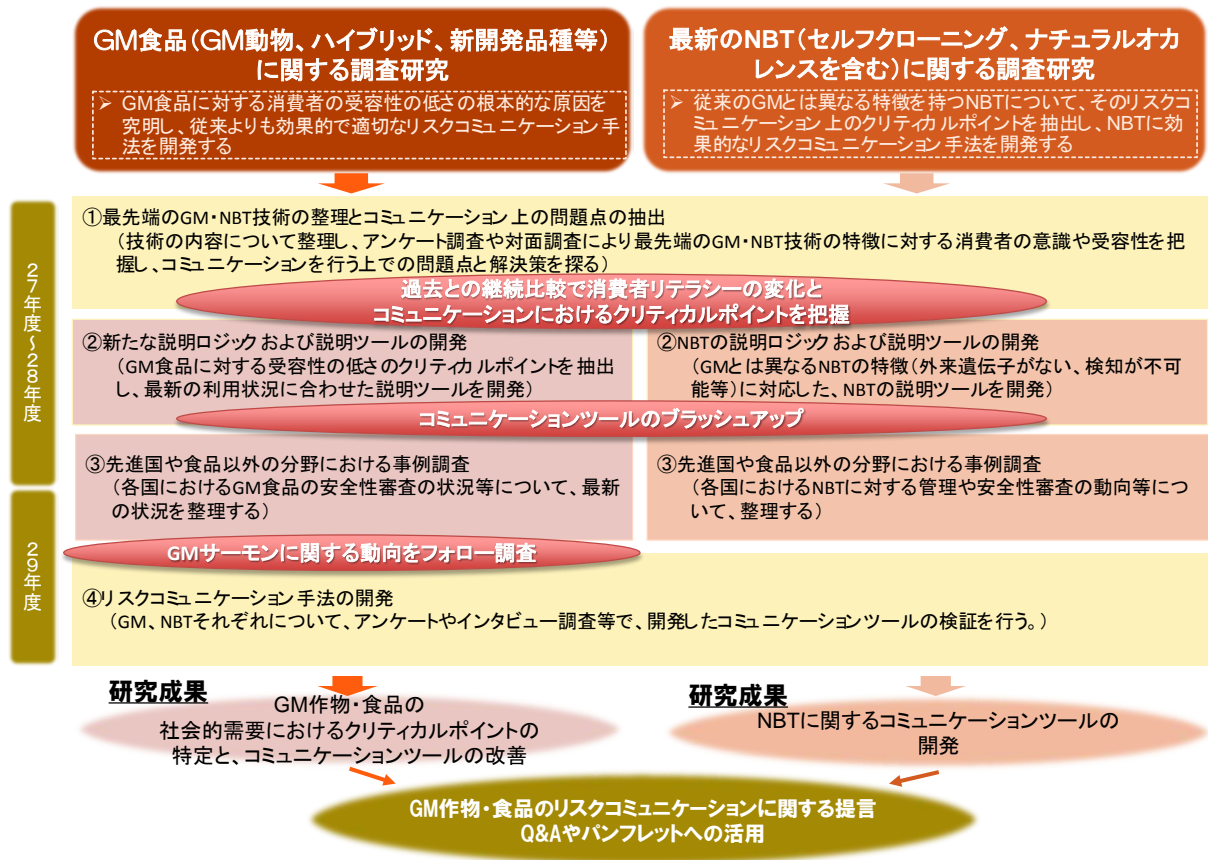


図 1 研究の全体像

B. 本研究の内容

表 1 FDA で食品として承認されている GMO (2018 年 3 月現在)

No.	品目	合計数
1	じゃがいも	43
2	トウモロコシ	41
3	綿	27
4	大豆	21
5	キャノーラ	20
6	トマト	8
7	米	4
8	アルファルファ	3
9	チコリー	3
10	てんさい	3
11	リンゴ	3
12	キュウリ・ヘチマ	2
13	パパイヤ	2
14	メロン	2
15	プラム	1
16	亜麻	1
17	小麦	1
18	コヌカグサ	1
	合計	186

(出所) the International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)

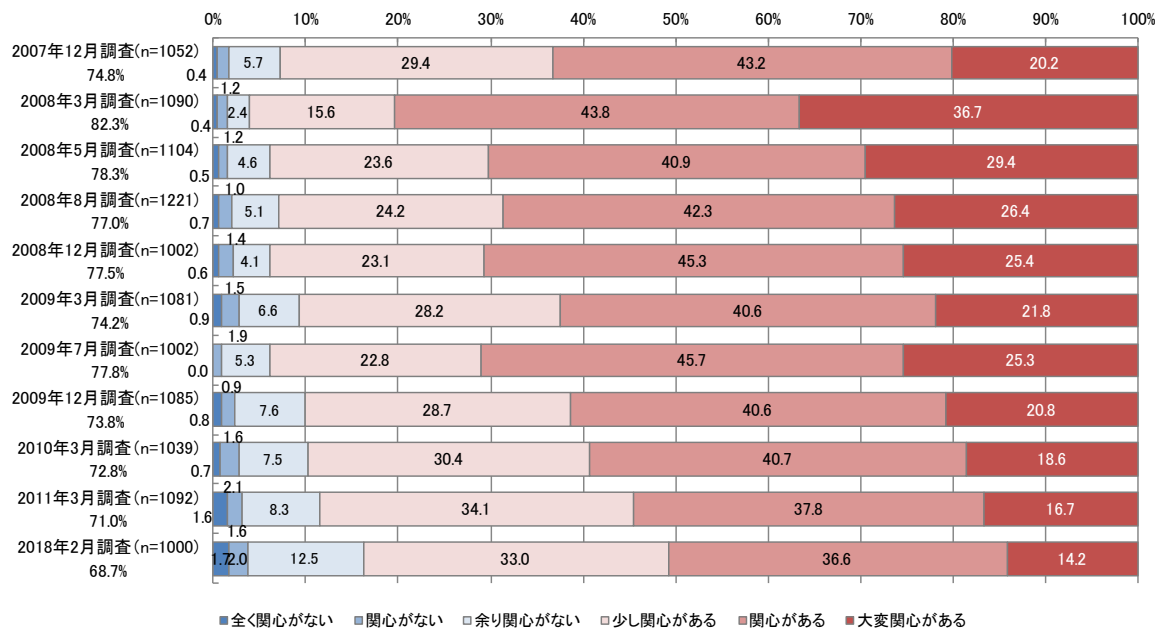


図 2 食品の安全性に関心があるか

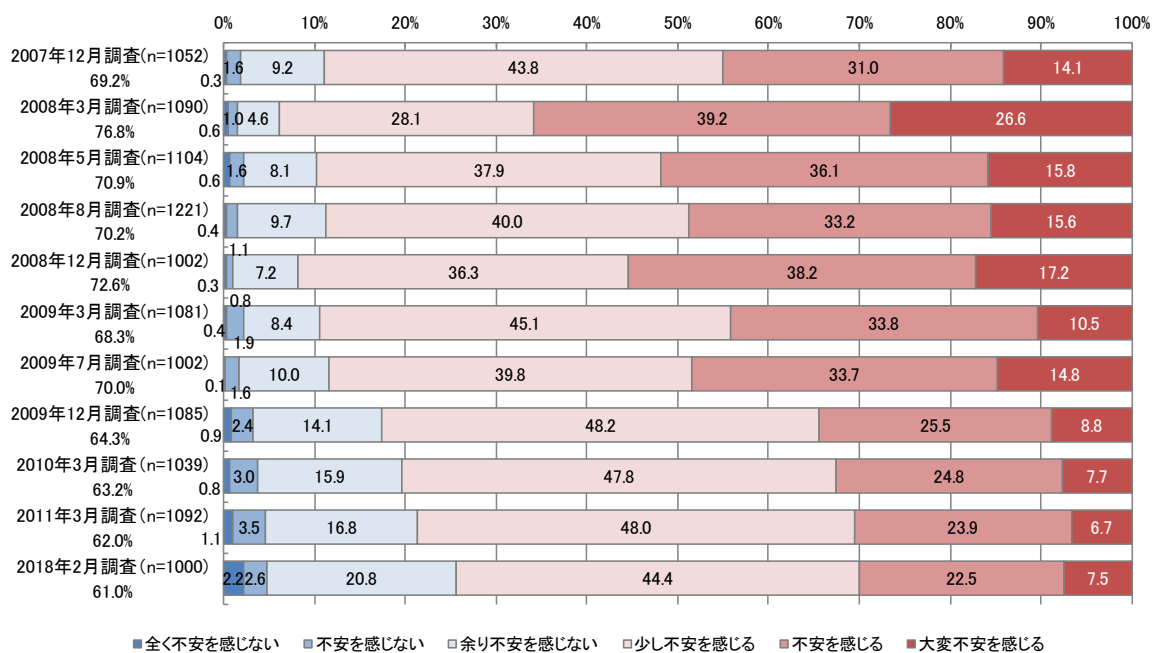


図 3 食品の安全性に不安を感じるか

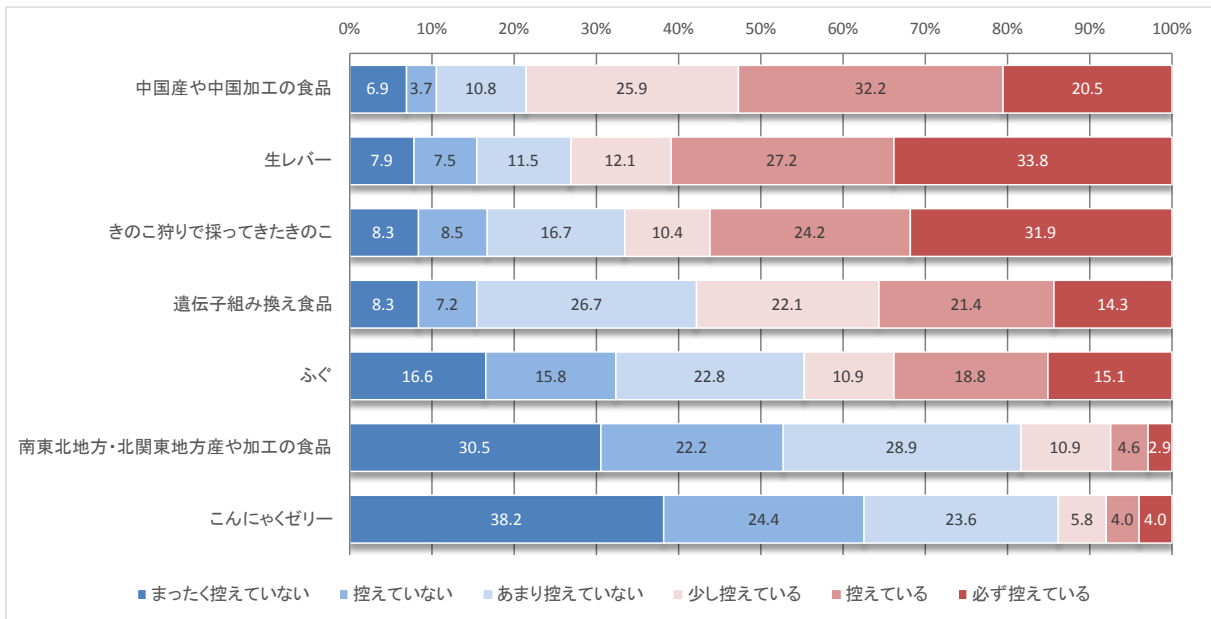


図 4 食品への不安から食べるのを控えている食品

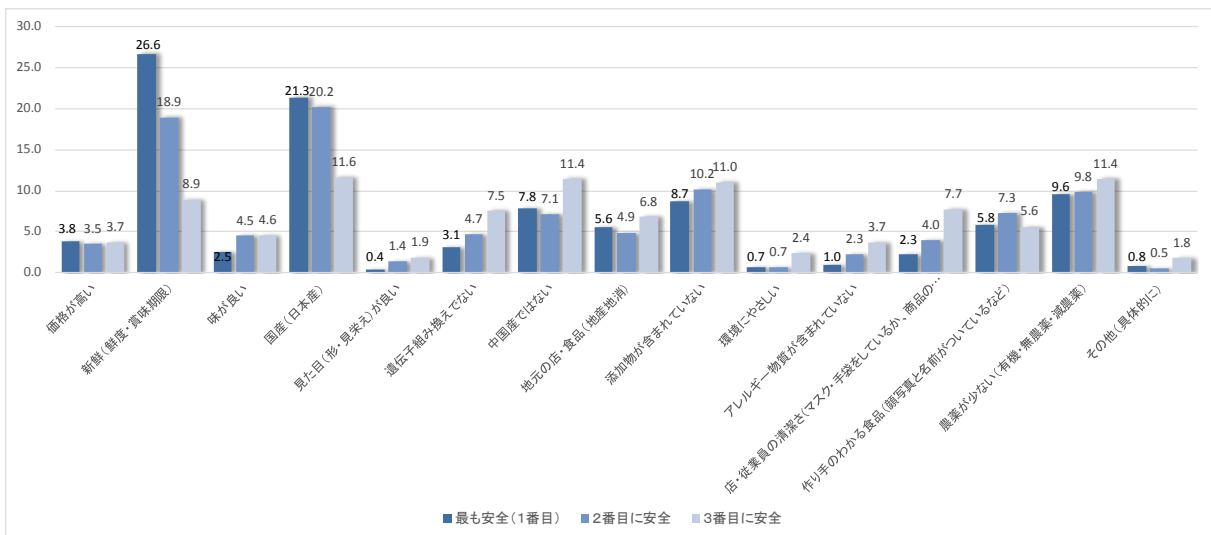


図 5 どのような食品を安全だと思うか(割合)

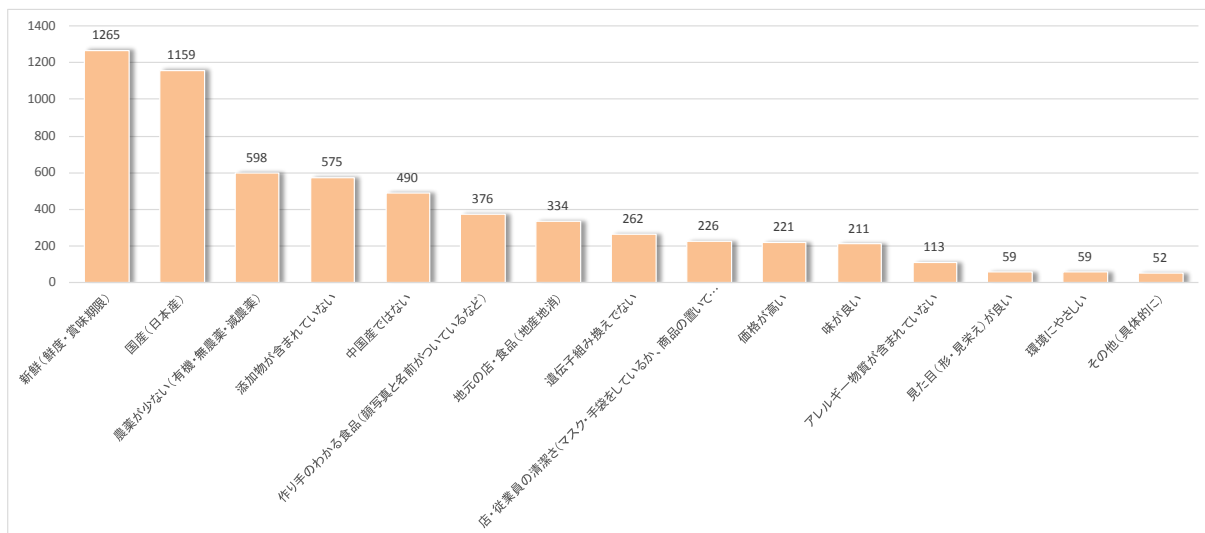


図 6 どのような食品を安全だと思うか(ポイント換算)

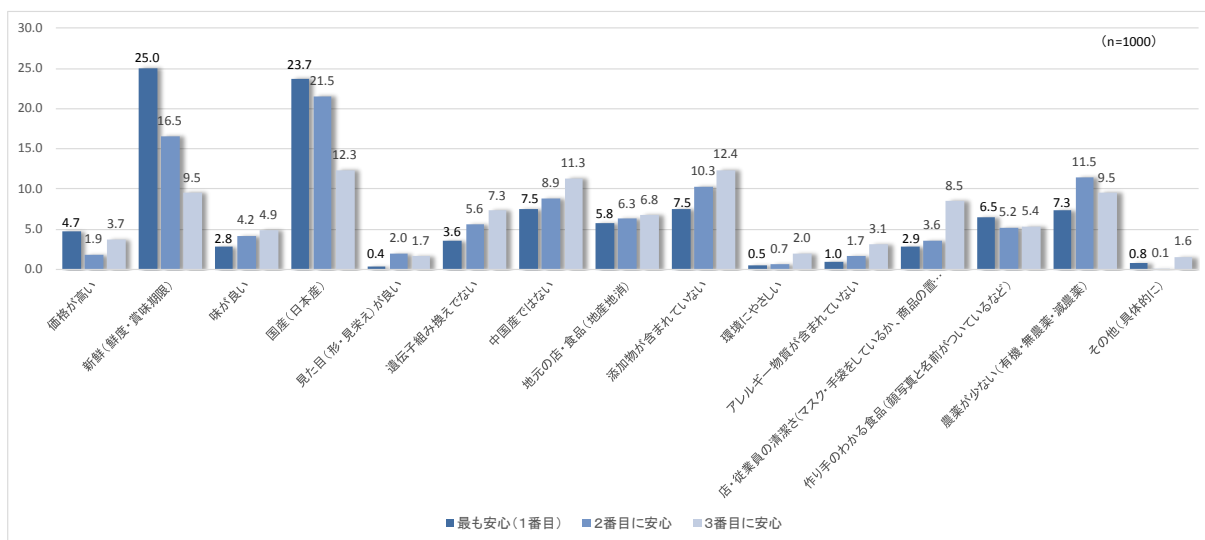


図 7 どのような食品を安心だと思うか(割合)

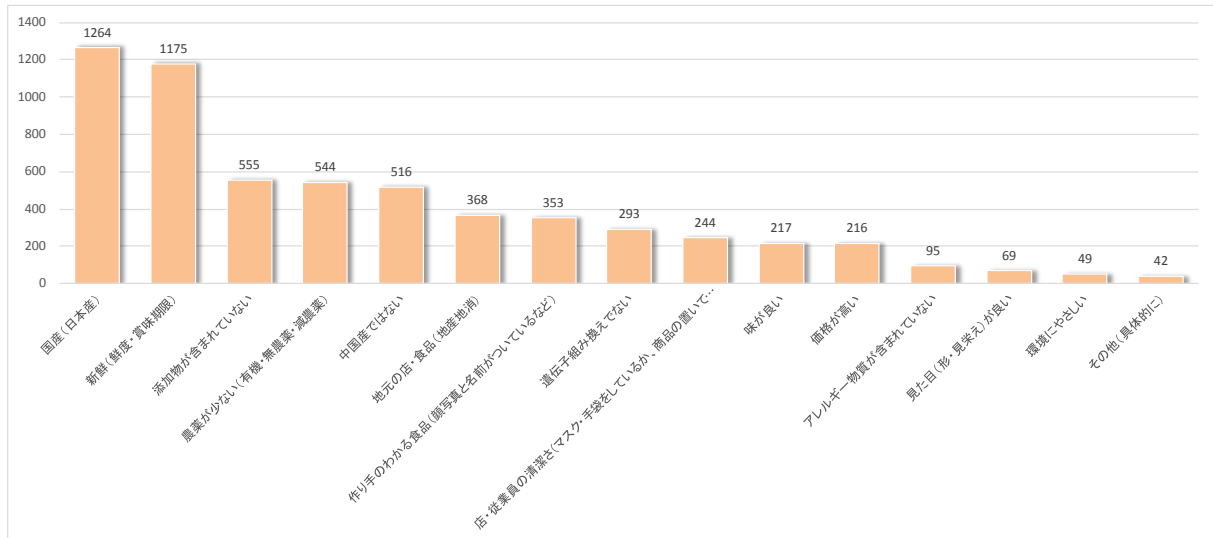


図 8 どのような食品を安心だと思うか (ポイント換算)

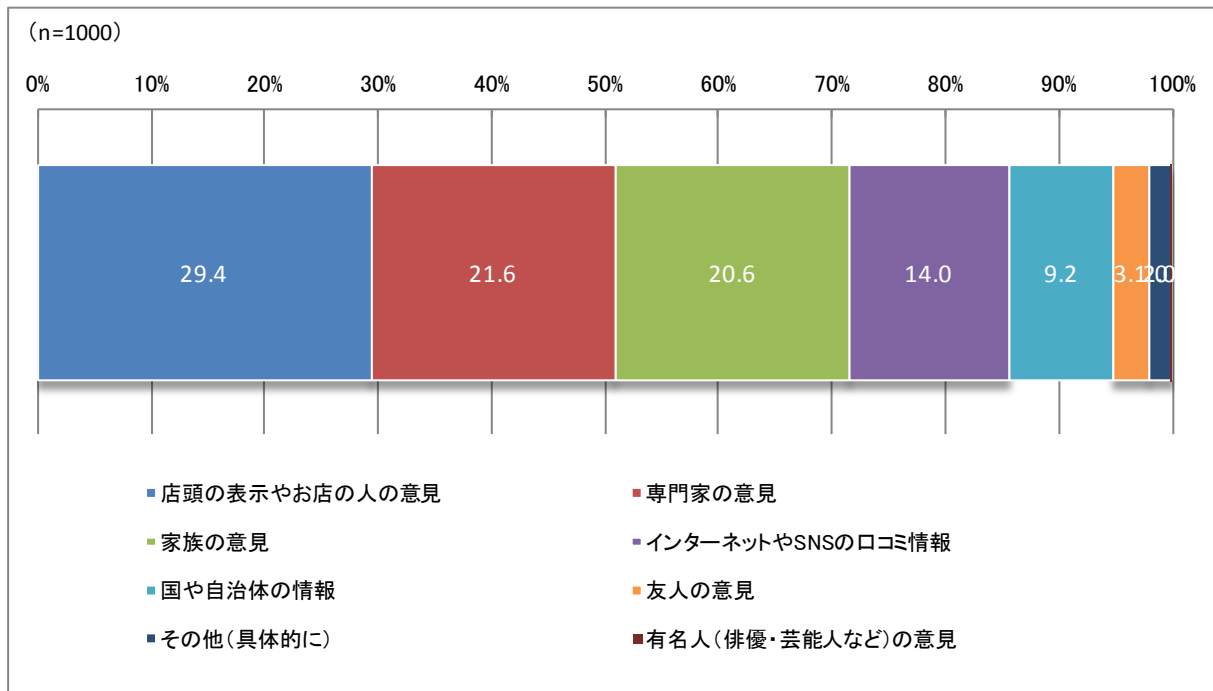


図 9 どのような情報を信頼して食品を選ぶか

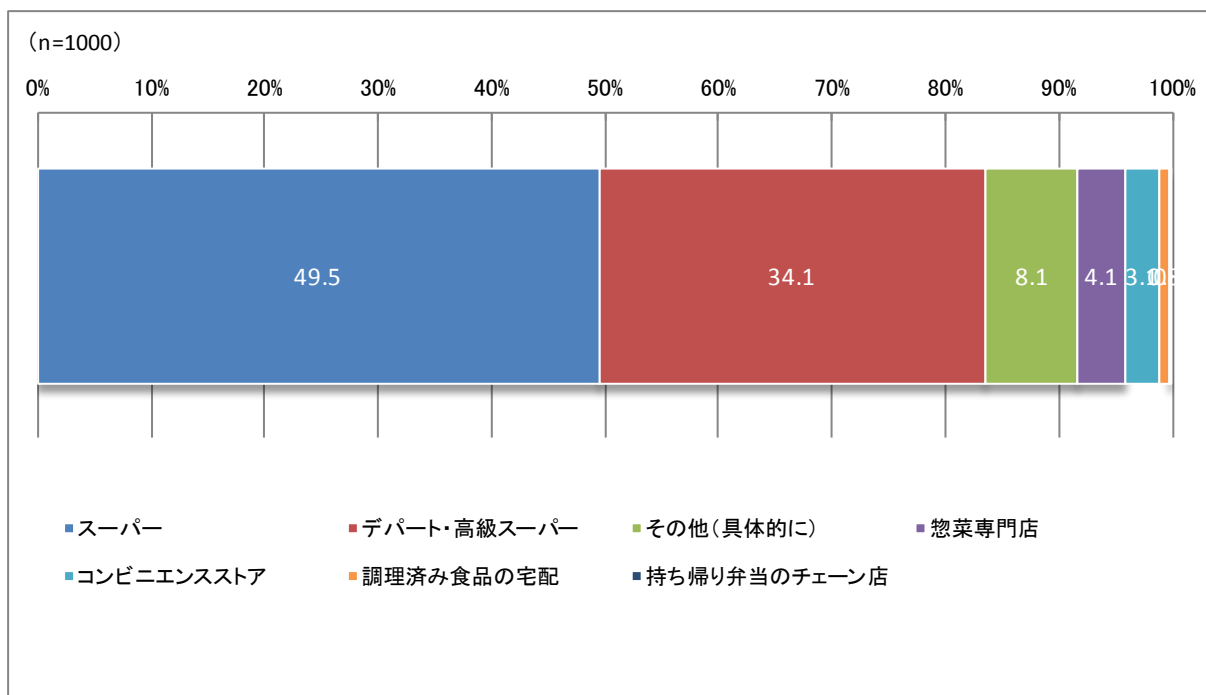


図 10 どのような場所で販売されている食品が安全だと思うか

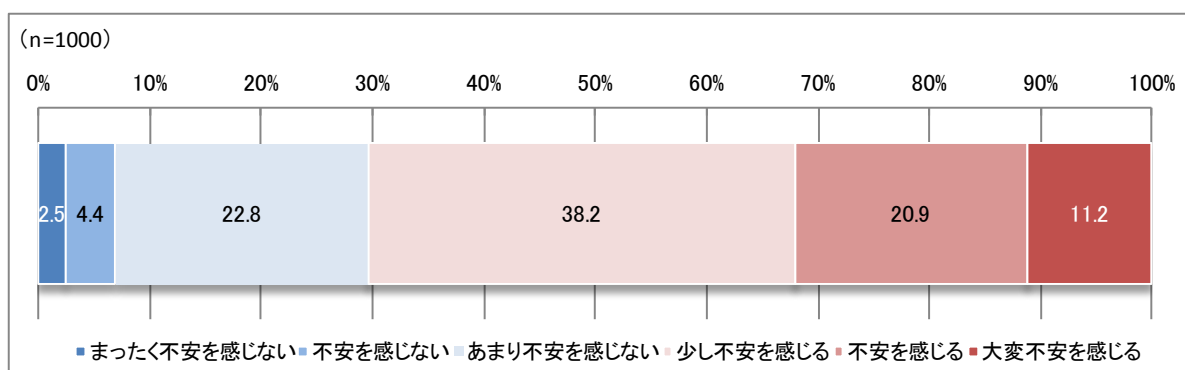


図 11 遺伝子組換え食品に不安を感じるか

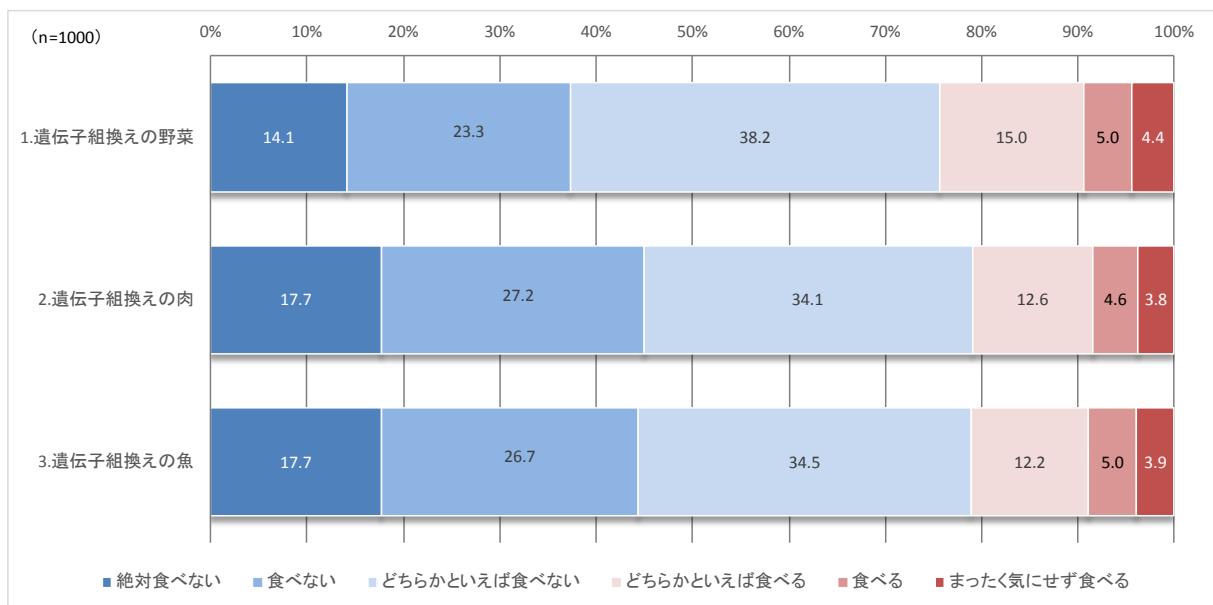


図 12 遺伝子組み換え食品を食べるか

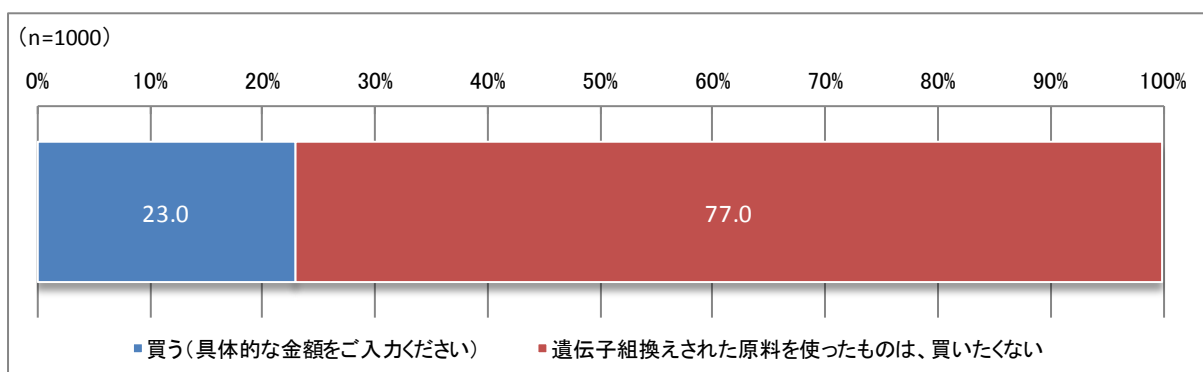


図 13 遺伝子組換え大豆を使った豆腐を買うか (情報提供前)

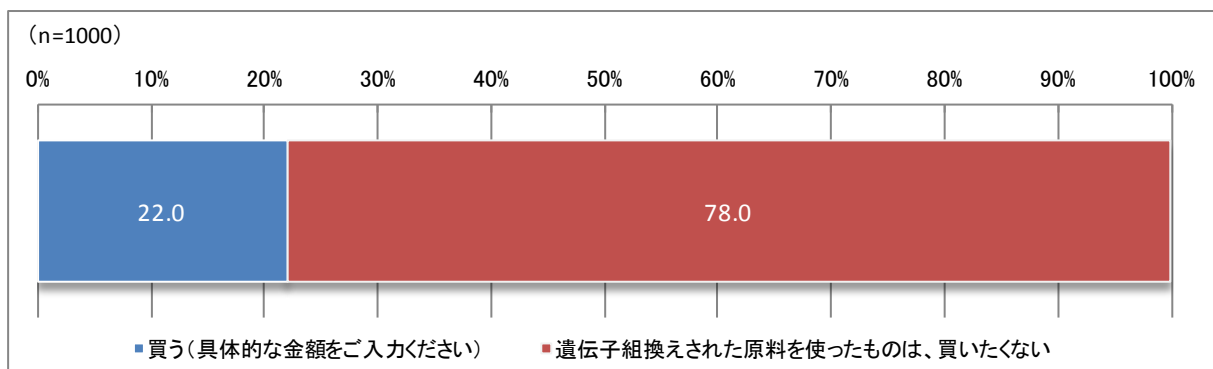


図 14 遺伝子組換えとうもろこしを使ったとうもろこしの缶詰を買うか (情報提供前)

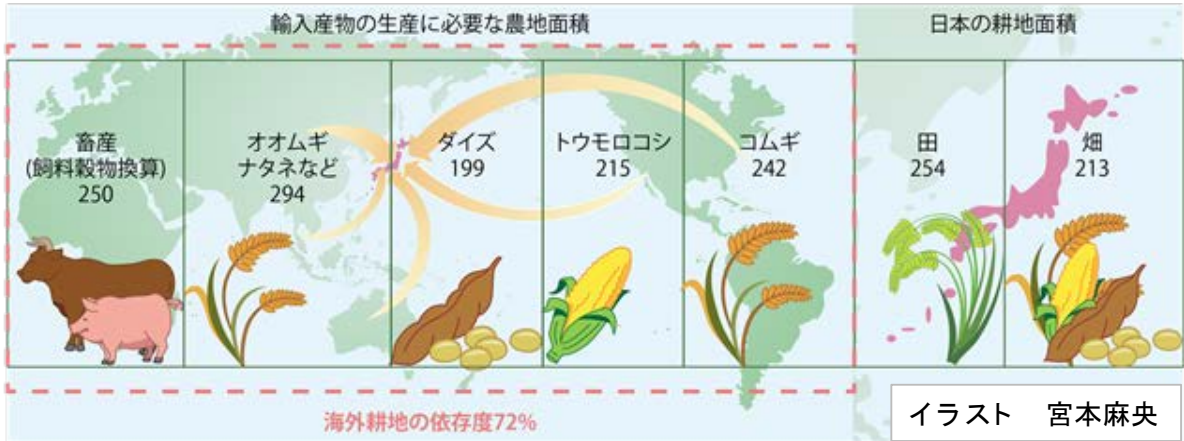


図 15 穀物生産に関する情報提供

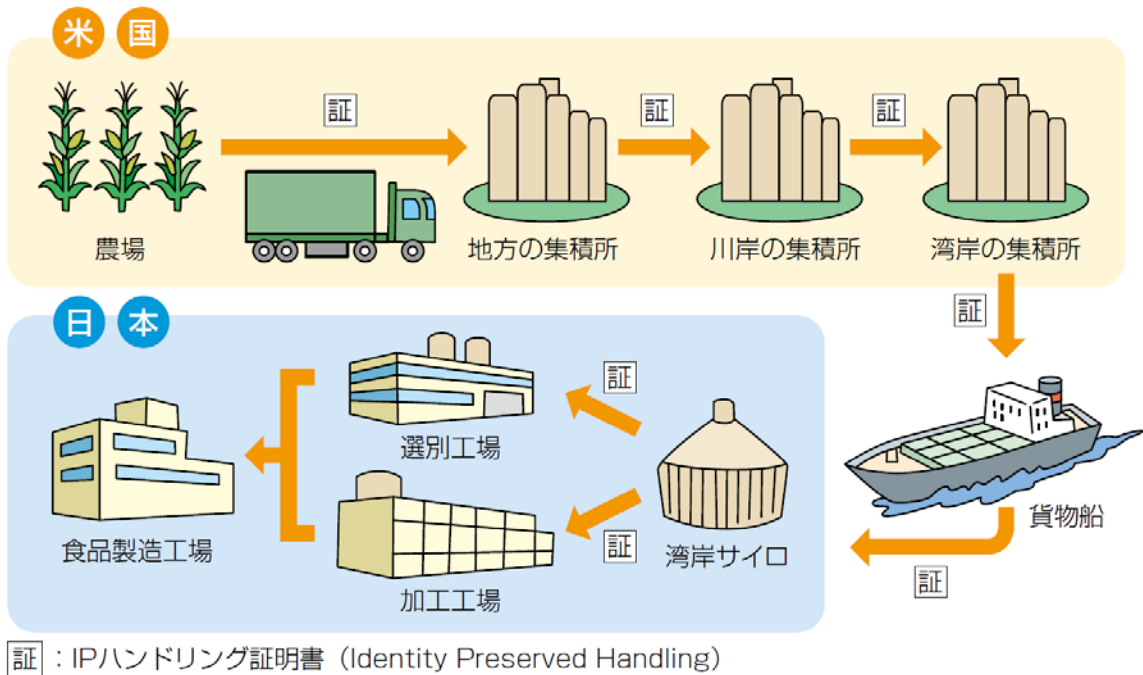


図 16 IP ハンドリングに関する情報提供

(出所) 遺伝子組換え食品の安全性について p.15 より (厚生労働省医薬食品局食品安全部)

表 2 GM 食品の規制に関する情報提供

- 遺伝子組換え作物は食品として安全性が審査され、承認されたもののみが流通を許可されています。
- 現在の表示制度では、IPハンドリングされた上で、輸入が承認されている遺伝子組換え作物の意図しない混入率が5%未満であれば「遺伝子組換えでない」と表示して良いことになっています。
- 未承認の遺伝子組換え作物はいかなるものであっても流通は許可されていません。

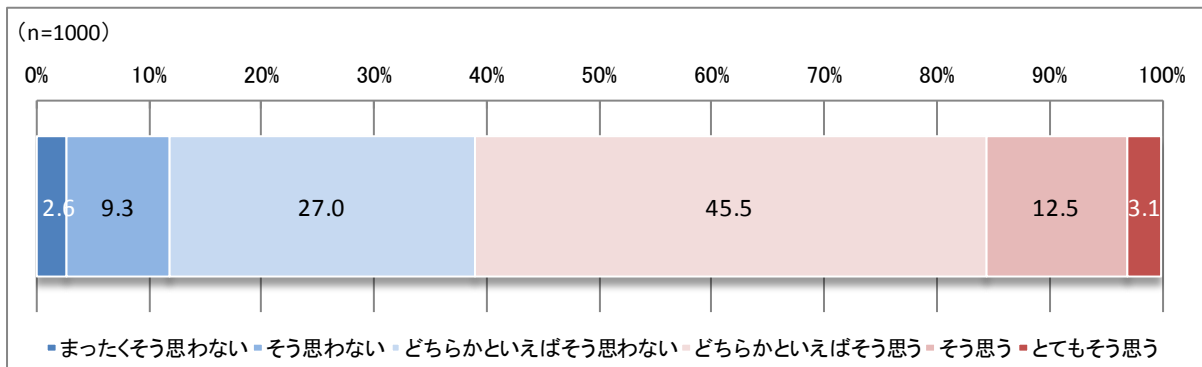


図 17 IP ハンドリングされた農産物は non-GM といっても良いか (情報提供前)

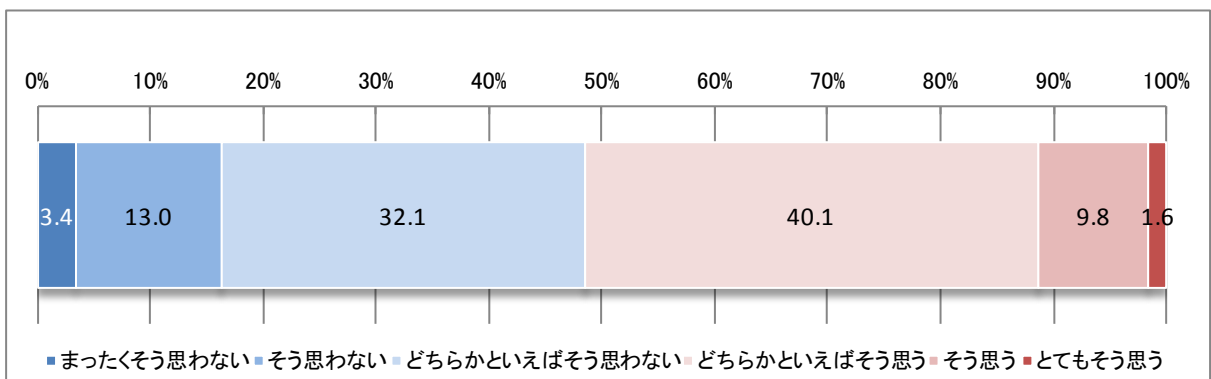


図 18 IP ハンドリングされた農産物は non-GM といっても良いか (情報提供後)

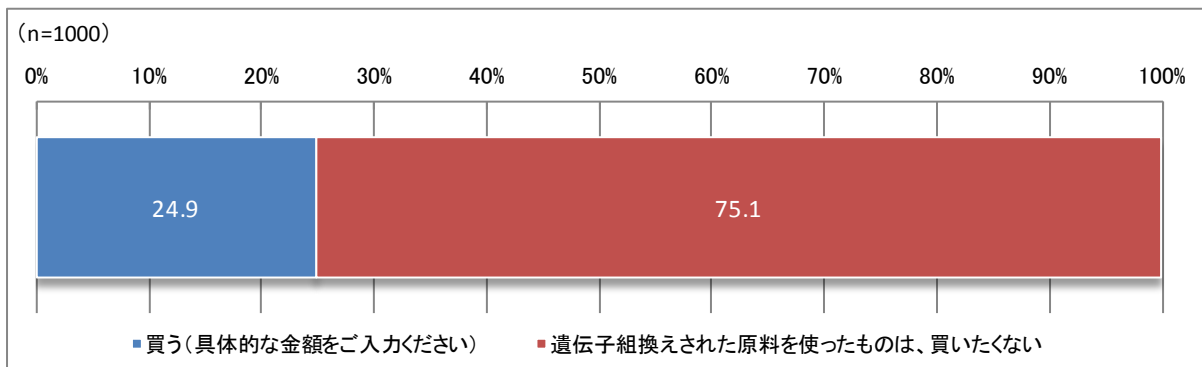


図 19 遺伝子組換え大豆を使った豆腐を買うか (情報提供後)

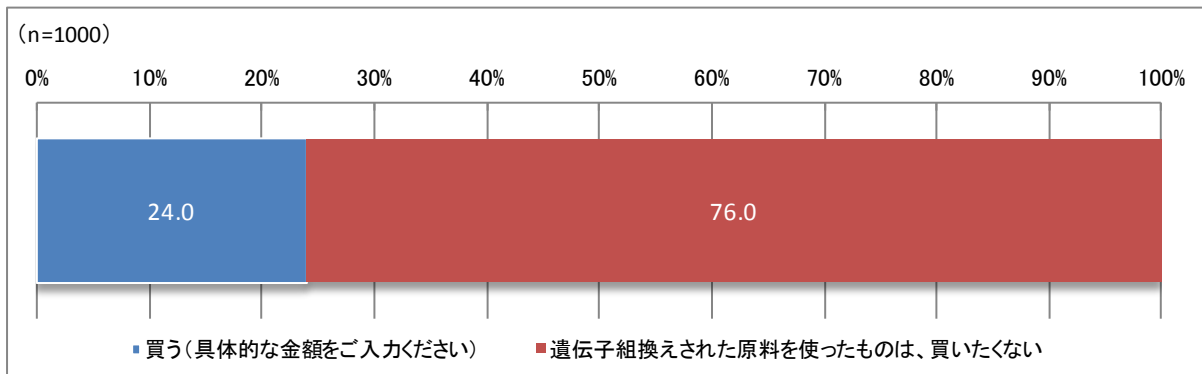


図 20 遺伝子組換えとうもろこしを使ったとうもろこしの缶詰を買うか（情報提供後）

表 3 GM 食品に対する支払い意思額平均値

品目	non-GM 価格	GM に対する支払い意思額平均値*	
		情報提供前	情報提供後
豆腐	100 円	72.3 円	73.0 円
とうもろこしの缶詰	100 円	75.2 円	73.4 円

*回答の下位・上位それぞれ 5%をカットして平均を算出した

表 4 情報提供による行動変容（豆腐）

情報提供前の回答	情報提供後の回答	
	買う	買わない
買う	207 人	23 人
買わない	42 人	728 人

McNemar 検定結果：カイ 2 乗値=4.985、p 値=0.026

表 5 情報提供による行動変容（とうもろこしの缶詰）

情報提供前の回答	情報提供後の回答	
	買う	買わない
買う	199 人	21 人
買わない	41 人	739 人

McNemar 検定結果：カイ 2 乗値=5.823、p 値=0.016

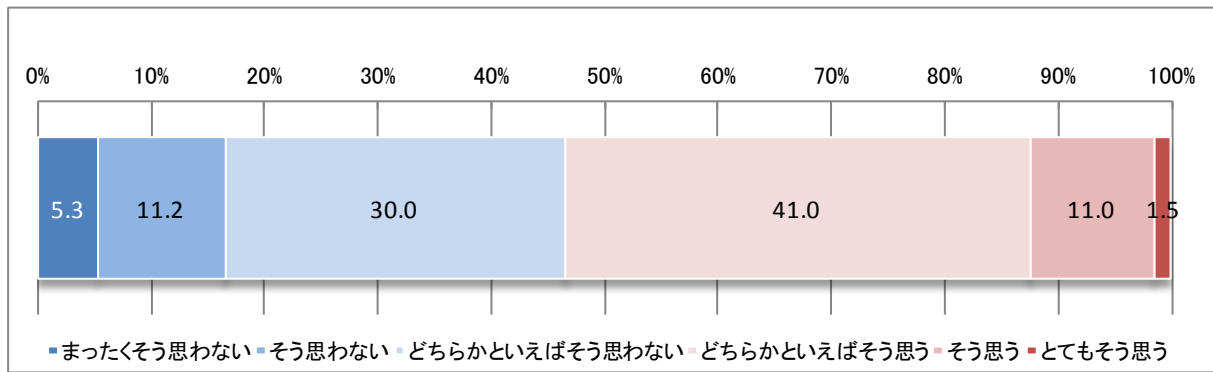


図 21 安全性審査を受けて承認された GM は安全だと思うか

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）
「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」
分担研究報告書（平成 29 年度）

未承認遺伝子組換え作物検知法、規制および安全性に関する情報収集

研究分担者 近藤 一成（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 中島 治（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：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・アレルゲン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ゲン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ゲン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。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。

A. 研究目的

今年度は、研究に関することも併せて情報調査を中心に行った。

(1) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

安全性が確認されていない、いわゆる未承認遺伝子組換え作物に対する検査は、日本の他に EU 諸国やアジアの国々で、同定された特定の品目に対して行われている。また、今後ゲノム編集技術を用いた農作物の開発、商業化が始まると意図しない環境中、食品中への拡散が懸念される。このような状況で、諸外国、特に EU の検知法に関する取り組みを調査した。

(2) ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

新育種技術（NBT）として欧州 JRC が 2012 年に行った分類をもとに、その区分で行ったときと、現象という区分で分類した時の問題点などを検討した。

(3) 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

欧州 EFSA では GRACE プロジェクトにおいて、アレルゲン性評価法についての新たなガイドラインの報告、90 日間動物実験および 1 年間動物実験の有用性、動物実験後に採取した小腸組織のトラン

スクリプトーム解析の有用性に関する科学的意見書が報告されたのでレビューした。

(4)ゲノム編集生物の開発状況調査

本研究は以下の4点を目的とする。

1. NBT を利用して最近開発された動物、植物を把握する。
2. NBT を利用して作成された動物や植物の規制に関する世界の国々の状況を調べる。
3. NBT を利用して最近開発された食用の動物、植物の問題点を考える。
4. 将来の新しい食品の開発に影響を及ぼす可能性のあるゲノム編集の基礎研究について情報収集を行なう。

B. 研究方法

(1)未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

オランダを中心に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。

(2)ゲノム編集生物の取扱いに関するアプローチ検討

EU は、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。

(3)諸外国での安全性評価に関する調査

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

文献情報および HP (<http://www.grace-fp7.eu>) をもとに行った。

(4)ゲノム編集生物の開発状況調査

1) 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。植物の研究ではタバコとアラビドプシスはモデル植物として他の植物に先駆けて新しい研究が行なわれてきたので、特にこれらの植物における報告は研究用を含めた。

2) NBT を利用して作成された動物や植物の規制に関する世界の国々の状況を論文を読んで調査した。

3) ゲノム編集を利用して作成された食用の動物、植物においてフレームシフトによって新たに生産される可能性のあるペプチドの研究状況を調べた。特許は省略して、論文を調査の対象とした。論文に記載されているターゲット遺伝子における塩基の挿入または欠失とデータベース、DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html) の配列を基にして新規なペプチドの配列を推定した。このペプチドが食物アレルギーと相関性があるかを Allergen Online Org (www.allergenonline.org) を利用して 8 amino acid exact match と sliding 80 mer 35% homology search を基準にして調べた。また、この新規ペプチドが電気泳動やオミックスの手法によって研究されているかを調べた。

4) 2017 年に発表されたゲノム編集の基礎研究の論文を読んで、研究の発展状況を調査した。

C. 研究結果および考察

(1)未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

安全性承認済遺伝子組換え作物の場合は、ゲノム中の挿入部分 (ジャンクション領域) を含む導入遺伝子配列が既知であるために、唯一の系統を特定できるいわゆる「系統特異的」検知法を作製可能である。本法をもとに、トレーサビリティや意図しない混入割合の定量コントロールが可能となる (図1)。一方、安全性未承認遺伝子組換えではほとんどの場合配列情報はなく、唯一共通で汎用されるプロモーター (p35S) やターミネーター (tNOS) の情報のみが入手可能である (図1)。従来は、その限られた情報から周辺配列を PCR 法を繰り返して解析していた。本研究班でも、1,2 年目において既知配列情報をもとに周辺配列情報を得るために LAM-PCR 法の検討を行い、その有用性を示してきた。ハイスループットのためには次世代シー

クエンサー (NGS) の活用が必要とされていたが、EUにおいて類似の方法でNGSを活用する手法が報告されたのでこれをまず精査した。すなわち、論文ではLAM-PCR法の代わりにDNA walking法を用いて僅かな既知配列からその両側未知配列を増幅したのち(図2)、それぞれにタグ標識を結合した試料を調製する。同様に調整した多検体を同時にNGS解析し、データ解析時にタグ情報をもとにそれぞれの試料ごとに結果を分離するものである(図3)。本手法は、未承認遺伝子作物に対する検知法を作製する上で極めて強力な方法と考えられた。今後は、最初に如何に既知情報を取得できるかが重要であると考えられた。

(2)ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

EUのJRCが2012年に示した分類では、その分け方があるものは技術(ゲノム編集)で、あるものは現象であり(RdDM、RNA依存性DNAメチル化)で統一されていない(表1)。さらに、CRISPR/Casの利用範囲の拡大も相まって、接ぎ木のなかにRdDMがあり、ODMの中にゲノム編集があり、ゲノム編集の中にODMやRdDMが存在するという矛盾が生じている(図4)。JRCの分類の問題点などを整理したものを表1に示す。そこで、「起きる現象」で分類するとどうなるのか整理を行った(表1、2)。

まず、DNA2本鎖を切断するかどうかで区別する。DNA2本鎖切断される場合は、標的配列と類似したゲノム上の配列(類似配列)でのオフターゲット切断のほかに、標的配列と全く類似性のない配列でのオフターゲット切断を考慮しなくてはならない。前者は、事前に各種データベースを参考に予測可能であるが後者は事前に予測できないため、それを解析する手段が必要である。一方、DNAメチル化や非活性化Cas9を用いた塩基置換などDNA2本鎖切断しない場合は、類似配列での置換、メチル化の可能性をデータベースから予測して解析することで対応が可能と考えられる。

つまり、

DNA切断起きる場合=全ゲノム領域の解析

DNA切断起きない時=類似配列の解析

が必要である。

ODMは、この区分けでは表2の項目1に該当する。用いるオリゴヌクレオチドがDNA2本鎖の場合は、両末端が保護されていなければゲノムへの

挿入が懸念される。2本鎖や1本鎖で両末端保護されている場合は、ゲノムへの挿入の可能性は非常に低いため、ゲノム上での類似配列箇所でのオフターゲット置換を考慮する必要があると考えられる。

接ぎ木では、リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)を用いた開花促進遺伝子(FT)の一過的導入による果樹品種改良期間の短縮や特定遺伝子の抑制などある。想定される懸念事項は、植物ウイルスの残存や開花促進でできた果実の特性・安定性および果樹における幼若期間の長さの生理学的意味などの基礎的理解も安全性を考える上で必要である。接ぎ木では、低分子RNAを台木から穂木または穂木から台木に移行させて、移行先で形質誘導(例えば、顆粒デンプン合成酵素遺伝子抑制によるもち性向上)が行われる。懸念事項は、移行先の台木又は穂木、最終果実への低分子RNANの残存性があるが、接ぎ木を切り離した後は移行しないため低分子RNAは速やかに分解され残存しないことが報告されている例もある(厚労科研費「次世代バイオ研究班27年度報告書」参照)。

(3)諸外国での安全性評価に関する調査

欧州食品安全局EFSAの遺伝子組換え生物の安全性に関する科学的意見書、規則および毒性に関する研究報告に関する最近の情報を整理した。The GRACE (GMO Risk Assessment and Communication of Evidence; www.grace-fp7.eu, Arch Toxicol (2016) 90:2531-2562, Arch Toxicol (2014) 88:2289-2314) projectでは、モンサント社の害虫抵抗性遺伝子組換えトウモロコシMON810(承認済)を用いて、90日反復投与試験および1年間反復投与試験を行い、既にトウモロコシMON810と組換え前のトウモロコシとの間について同等性が確認された製品を用いた動物実験で毒性に関わる付加的情報が得られるか検討した。その結果、動物実験では、比較解析から得られた製品の同等性に追加される毒性情報は得られないことが報告された。除草剤耐性や害虫抵抗性などの遺伝子組換え体では、組換え前後の同等性確認が得られたものについて、動物実験を行う重要性があるかどうかの判断が難しい。また、製品の組換え前後の比較による同等性の確認については、その方法、これまで通りに既知有害成分、栄養成分等を確認することで十分なのか、オミックス解析必要であるかどうかは、さらに議論が必要

と考えられる。

遺伝子組換え体のアレルゲン性評価について EFSA の科学的意見書 (EFSA J, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4862) を検討した。内容は3点から構成される— (1) non-IgE 型の免疫反応、 (2) タンパク消化性、 (3) 内在性アレルゲンの変化、である。Non-IgE 型の好ましくない免疫反応は、小麦グルテンなどが原因となるセリアック病に対するもので、新規に発現するタンパクについて原因となる E/Q-X1-P-X2 モチーフの存在や類似性を確認して、一致又は類似性が認められた場合は HLA 結合実験を行っていくものである。タンパク消化性は、現在胃酸モデルとして pH1 前後の強酸性条件で胃消化性試験を行っているが、空腹時ではそうであるものの、満腹時や胃に食物が入っている場合は、胃酸 pH は 4 程度まで上昇することが知られている。これまでの、胃および腸での消化性試験の例を見てみると腸での消化性はよくないものも多くあることから、胃の酸性度が下がった場合、難分解性となり腸でも分解されない可能性もある。そのため、胃酸中の消化酵素であるトリプシンおよび酸性度 pH の条件を振ってタンパク消化性試験を行うことが望ましいとしている。内在性タンパクについては、組換えられた作物がアレルゲン性を持つものと考えられる場合は、組換え前との比較からアレルゲン性の変化について試験することが求められる。また、内在性アレルゲンについて、ダイズではアレルゲンとして記載されているものに加えて、多くの潜在的アレルゲン候補があるためそれらも考慮する必要がある。OECD consensus report on compositional consideration (soybean) に記載されているアレルゲンだけではなく、最新の科学的文献を調査して考慮することが重要であるとしている。

(4) ゲノム編集生物の開発状況調査

1) 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の調査の結果を表 3, 4 にまとめた。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。

2) NBT を利用して作成された動物や植物の食品としての利用についての規制に関する世界の国々

の状況を述べる。米国は容認する方向であると思われるが、EU はまだ結論が出ない。また、世界全体ではそれらを規制する国、地域と規制から外す国、地域に分かれると予想される。

3) フレームシフトを起こしたペプチドを生産する動植物の調査の結果を表 5 にまとめた。問題点を以下に記す。i) 植物の文献 ID, 6 (コメ、ターゲット遺伝子 OsMT7) においては新規ペプチドの 1 つがウシコラーゲン α -2(I) 鎖前駆体と相同性があることが明らかになった。しかし、論文中ではそれに対する言及はなかった。ii) ターゲット遺伝子がコードする元のタンパク質の N 末端が食物アレルゲンと相同性がある、新規ペプチドも同じくその食物アレルゲンと相同性があるケースがあった。新規ペプチドが元のタンパク質よりもアップレギュレートされると食物アレルギーを起こす可能性がある。iii) 動物、文献 ID, 14 におけるウシの PRNP 遺伝子に EGFP 遺伝子を挿入したケースについて。ウシ PRNP は食物アレルゲンであるコムギグルテニンやウシコラーゲン α -2(I) 鎖前駆体と相同性がある。本研究で作成されたウシにおいては PRNP と EGFP が融合タンパク質として生産される可能性がある。この融合タンパク質も上記の食物アレルゲンと相同性を有する。したがって、この融合タンパク質が元の PRNP タンパク質よりもアップレギュレートされると、食物アレルギーを起こす可能性がある。iv) 論文に記載されているターゲット遺伝子の配列がデータベースの配列と一致しないことがあった。このケースはターゲット遺伝子についての情報が十分にそろっていないことを意味する。このような場合には、ターゲット遺伝子についての情報をさらに充実させる必要がある。以上をまとめると、フレームシフトの結果得られる新規ペプチドについては論文中で言及がなかった。これらの新規ペプチドが電気泳動やオミックスの手法によって実験的に調べられている例は皆無だった。

4) ゲノム編集の基礎研究の進展について述べる。i) SpCas9 と gRNA 複合体が DNA に結合して切断する様子が高速原子間顕微鏡を用いてリアルタイムで観測された 2)。ii) 今までの報告よりも小型の Cas9 である CjCas9 が報告された (遺伝子 2952bp、984 アミノ酸残基) 3)。この CjCas9 について X 線結晶回折による構造決定が行われた。以前から報告があった Cas9 オルソログとの構造の比較から、Cas9 ファミリーの構造の詳細な情報が得られ

た4)。iii) RNAを切断するCRISPR/Casシステムが以前から知られていたが、Cas13が哺乳類と植物の細胞内でRNAを切断することが報告された5)。以上に述べたように2017年にはゲノム編集に関する基礎研究が急速に進展した。

D. 結論

(1) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

欧州では、配列情報が未知な未承認遺伝子組換え作物の検査で、次世代シーケンサーNGSを活用した手法を開発している。日本国内では、現在、相手国で商業化されているが日本ではされていない作物を中心に未承認遺伝子組換え食品検査を行っている。今後、ゲノム編集などが普及するに連れて、その拡散防止の観点から農作物を特定するための手法の一つにNGSを用いた検査体制を整備していく必要があると考えられた。

2) ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

ゲノム編集を含む新育種法(NBT)について、最初に分類を行った欧州JRC分類を見直し、変化の種類で分類して、潜在的リスクやそのためのアプローチの検討を行った結果、分類を再検討して整理することが、規制を考える上で必要と考えられた。

(3) 諸外国での安全性評価に関する調査

欧州プロジェクトでは、遺伝子組換え作物の実質的同等性に加えて、動物実験で付加的な毒性関連情報が得られるか90日あるいは1年間投与試験で検討した結果、付加的な情報は与えないが、組織トランスクリプトーム解析などで追加の情報が得られる可能性を示した。ゲノム編集農作物などでは、その製品の実質的同等性を判断するための情報が不足する。そのため、毒性実験が最終的な判断材料として重要になる可能性がある。オミックス解析などの可能性を検討しておく必要があると考えられた。

(4) ゲノム編集生物の開発状況調査

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。

D. 業績

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. 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 (Submitted)
3. 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 (Submitted)
4. 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
5. Sugano, Y., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Nozomi, F., Suzuki, T., Kondo, K. Rapid identification method of *Omphalotus japonicas* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 58, 113-123, 2017
 6. 邦文 (PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法: 菅野洋平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成)
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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
2. 学会発表
 - 1) 中村公亮、石垣拓実、榎藤崇裕、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
 - 2) 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ーンスターチへの適用、第113回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017年11月
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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斑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

13) 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

14) 菅野陽平、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、近藤一成：Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたツキヨタケの迅速判別法の検討、第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会、函館、2016 年 10 月

15) 高畠令王奈、大西真理、布藤聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2016 年 7 月

16) 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 3、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

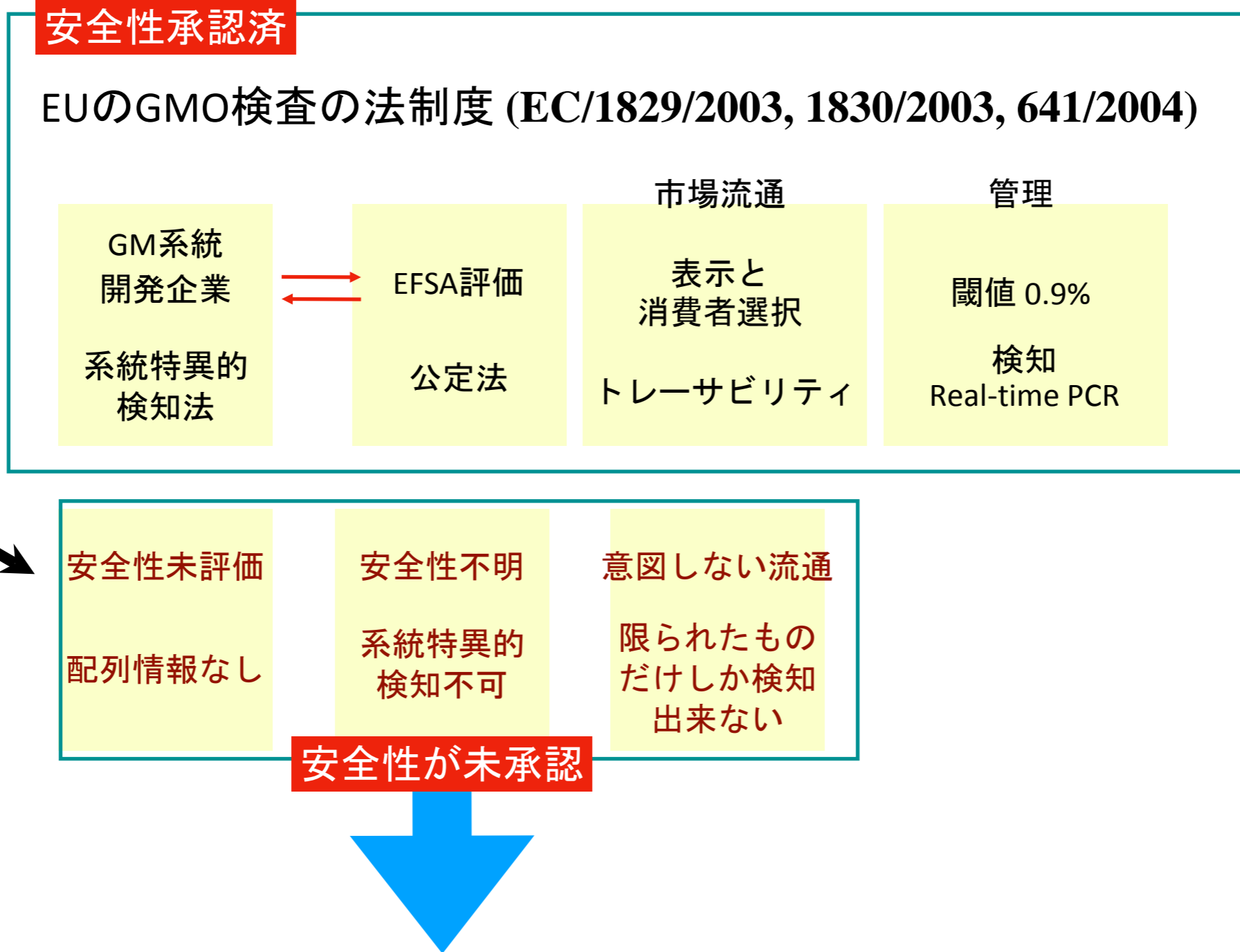
17) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、勝又啓史、高崎一人、布藤聡、坂田こずえ、福田のぞみ、真野潤一、橘田和美、田中秀典、明石良、最上 (西巻) 知子：安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ検知に向けた全ゲノムシーケンシング技術応用の検討について、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月

18) 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

19) 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

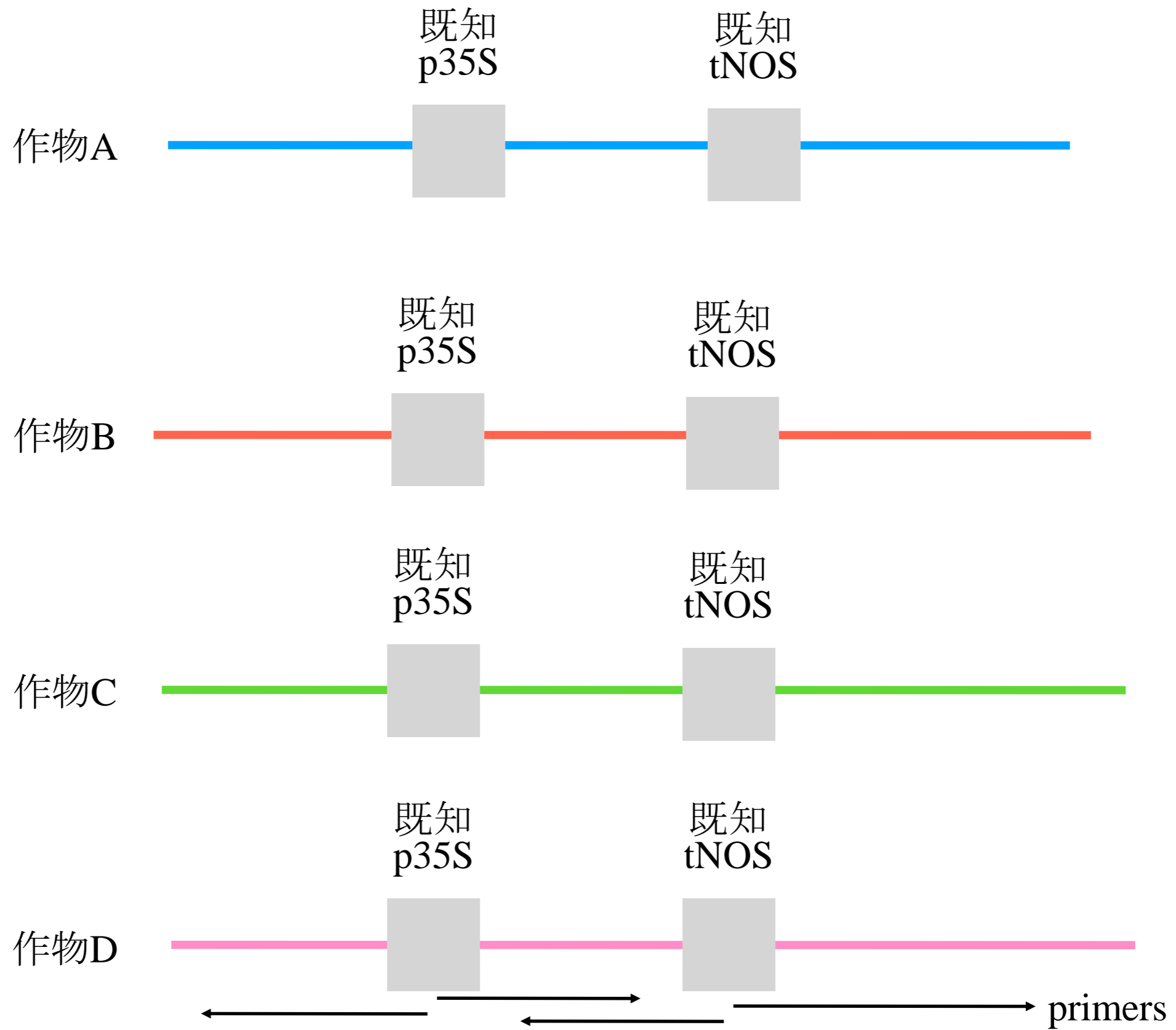
20) 三宅奈穂、宮原平、沢藤ことは、中村公亮、近藤一成、小関良宏：小麦加工食品におけるゲノム DNA 断片化の評価、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月

図 1



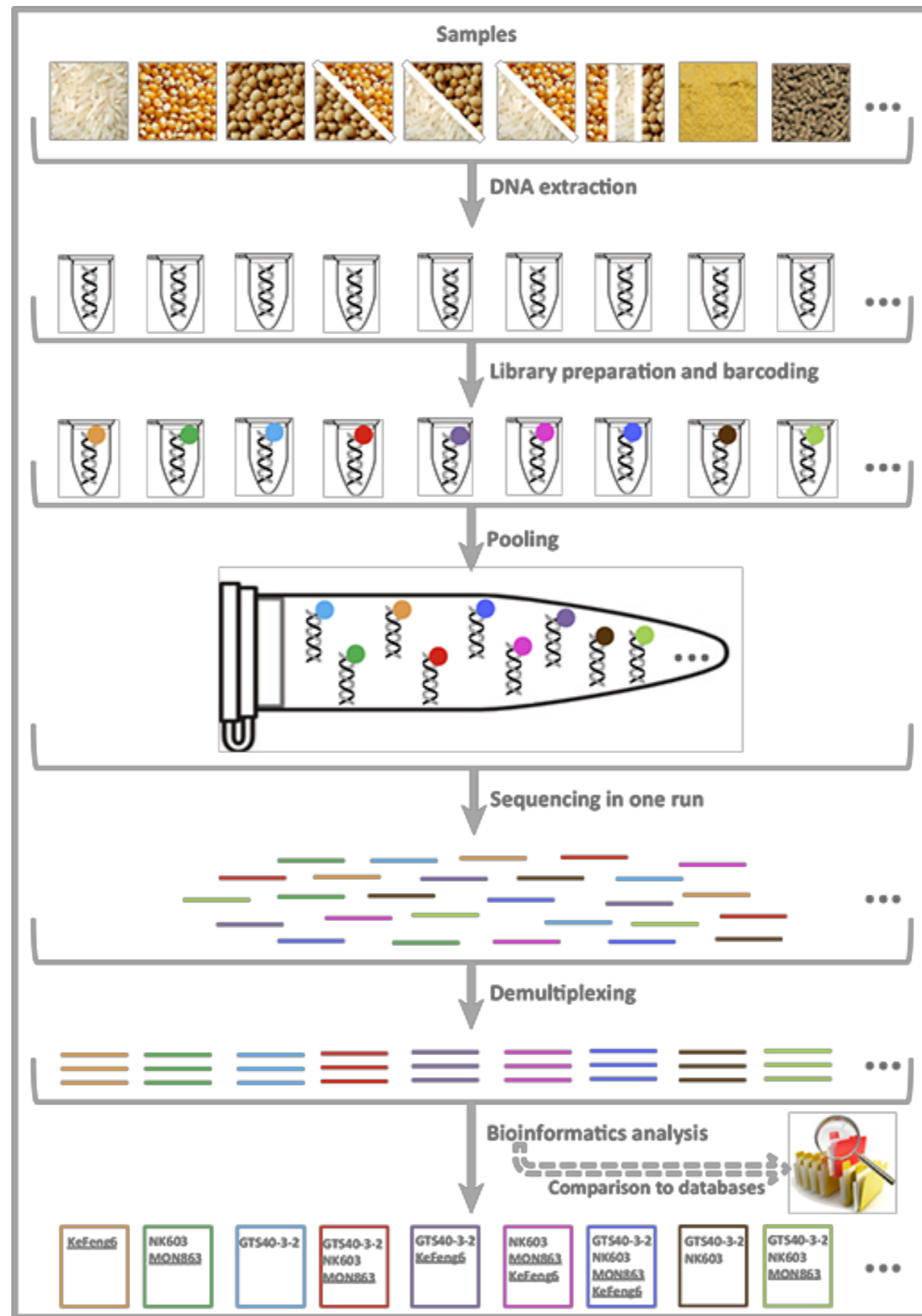
安全性承認済のような制度が確立できないため
未承認遺伝子組換え食品検知には新たな手法・アプローチが必要

図 2



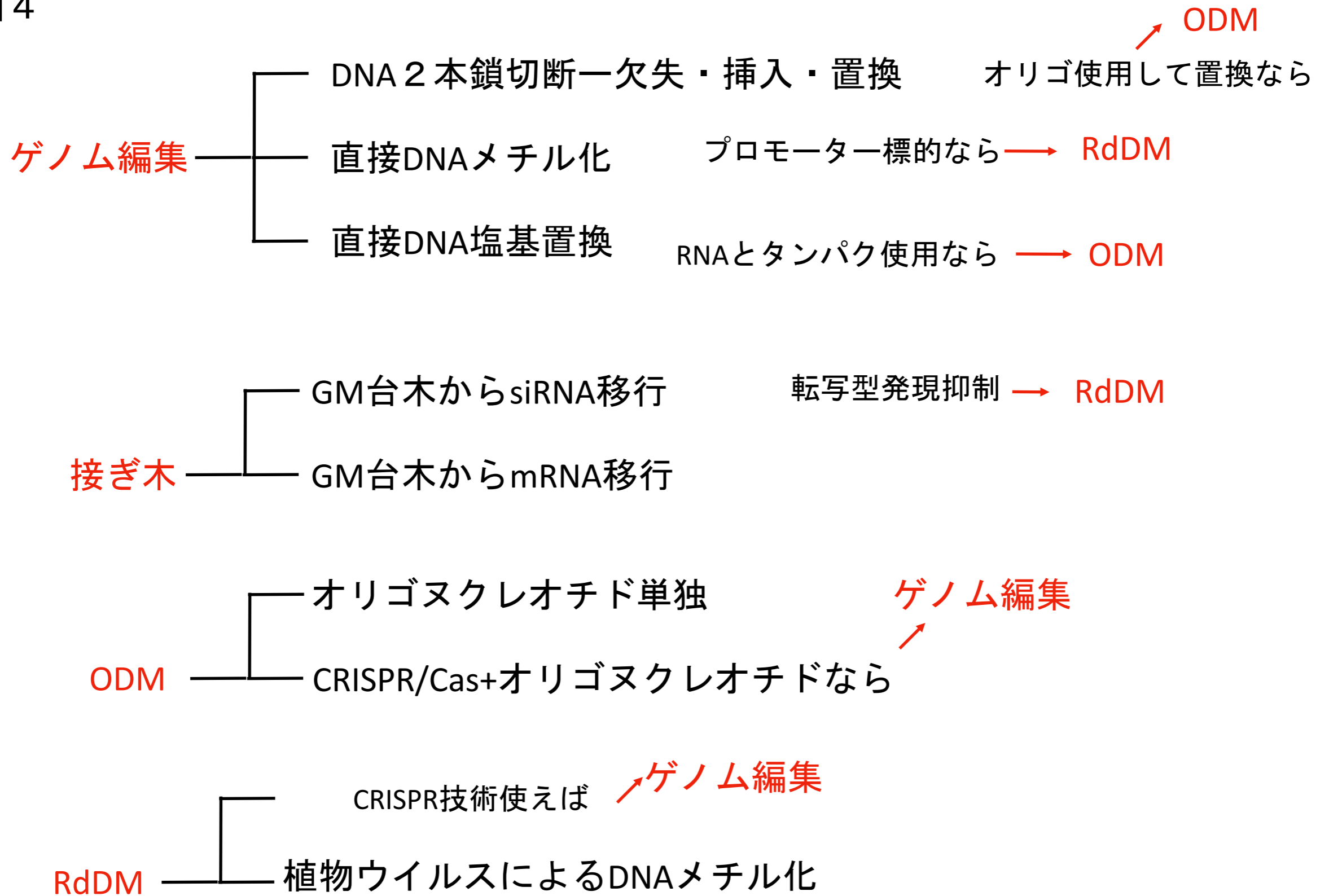
已知配列からDNA watingで増幅後
複数サンプルまとめて次世代シーケンサーで解析

图 3



Trends in Biotech (2017)

図 4



2012年JRCの分類でNBTを整理すると一つの技術の中に他の技術があることになる

表 1

表1

EUの 2012年分類	(日本名)	(区分)	(英名)	(技術概要)	(この分類で整理することの問題点)
1	シス・トランスジェネシス	現象	Cisgenesis/Intragenesis	シスジェネシスは、交配可能な品種間で、かつ、その組合せを変更しない遺伝子導入。 トランスジェネシスは、組合せを変更した内在性遺伝子または異種遺伝子の導入	シスジェネシスでも、導入方法がアグロバクテリウムであれば、既存の内在性遺伝子をそのまま改変なく導入したものと同等で、既存の遺伝子組換え食品として扱うことができる。組合せを変えたイントラジェネシスは、現在のSimplotジャガイモと同じで、現行の考えで対応でき、新たな分類として必ずしも必要でない。シスジェネシスの要件が明確でない。
2	オリゴヌクレオチド指向変異導入	手法	Oligo-directed mutagenesis (ODM)	一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチドを導入して1塩基または数塩基置換。 DNA、DNA/RNAハイブリッド、RNAを用いる。 Cibusでは40塩基で両端保護された1本鎖DNAであるためゲノムへの挿入はない。 効率は非常に低いため、自然変異との区別もできない。	ODMは単独使用での効率が非常に低い (<0.02%) ため、今後も普及は難しくCibus以外では出てこない。 CRISPR/Casとの併用で効率が大きく改善されるため、DNA 2本鎖切断をするゲノム編集との併用が主流になり、ゲノム編集に含めるべき。一定の長さのDNA2本鎖であれば単純に相同組換えになる。
3	RNA依存性DNAメチル化	現象	RNA-dependent DNA methylation (RdDM)	低分子RNAによるプロモーター領域メチル化は植物で見られる現象。 接ぎ木でこれが利用されている。台木(穂木)への低分子RNA産生遺伝子の導入で、これ自身は遺伝子組換え体。そこから移動する接ぎ木先の穂木(台木)でのプロモーター領域DNAメチル化による遺伝子発現抑制。移動先での低分子RNAは最終的に分解されて残らない。	RdDMは、1例では接ぎ木を介して用いられる。(台木(穂木))への低分子RNA産生遺伝子の導入で、これ自身は遺伝子組換え体。そこから移動する接ぎ木先の穂木(台木)でのプロモーター領域DNAメチル化による遺伝子発現抑制させる。低分子RNAを産生するDNAがゲノムに残っていない場合は、ゲノム編集でのCas9産生コンストラクトをその後の組換えや交配で削除したものと同等 (null segregant) に考えられて現行の考え方で対応可能。接ぎ木との分類をどうする。ウイルスを用いた一過的遺伝子発現の場合も同様で、ウイルス(植物ウイルス)とその由来配列の残存の有無を考慮。ゲノム編集CRISPR/Casでも可能である。
4	ゲノム編集	手法	Genome editing	ZFN,TALEN, CRISPR/Cas9を用いてDNAメチル化、塩基置換、2本鎖切断誘導する。 DNAメチル化、塩基置換では、2本鎖切断しない。DNAだけでなくRNAも標的にできる。 CRISPR/Cas9では、Cas9はタンパク、ガイドRNAは合成RNAを使用すれば、組換えDNA実験に該当しないと解釈もできる。	ゲノム編集は、現在では、欠失、挿入、置換、DNAメチル化、転写制御と広範囲な遺伝子発現制御が可能な技術になった。また、DNA 2本鎖切断するものとしがないものがあり、リスクの考え方(特にオフターゲット)が異なるため同一に扱えない。
5	接ぎ木	手法 現象	(Trans) Grafting	遺伝子組換え (GM)台木または穂木を用いて、低分子RNAなどが移行することで接ぎ木した穂木や台木の新たな形質を付与。接ぎ木は従来からある一つの育種技術で新技術ではない。移行先(台木や穂木)でタンパク発現させる場合は、mRNAの移行が必要。一部のmRNAと多くのsiRNAは師管を介して双方向に移動できる。	遺伝子抑制では低分子RNAの移行が行われる。遺伝子プロモーター領域を標的にDNAメチル化を行う低分子RNAを師管経由で移行させることで、移行先で転写型遺伝子抑制。接ぎ木中は移行して残存、切り離すと低分子RNAは分解されて残らないnull segregant。 最終産物で見れば、ゲノムに遺伝子が残らないもので、他のゲノム編集で外来遺伝子のないものと同列。 植物ウイルスを用いて遺伝子発現制御することもある(FT遺伝子導入による早期開花促進)が良く研究されているが、ウイルスベクター使用の一過的遺伝子発現で既存の考えで対応可能であるが、この分類に入れるべきか明確でない。

表 2

表1

起きる変化 で整理	(区分)	(該当する技術)	(潜在的リスク)	(その他)
外来遺伝子なし	DNA塩基置換する方法 (DNA切断なし)	1塩基または数塩基置換技術的には、相同組換え、オリゴヌクレオチド指向変異導入法(ODM)、置換誘導型ゲCRISPR/Casを用いる方法がある	リスクは技術で異なる可能性 オリゴヌクレオチド指向形変異導入 (ODM) はDNA切断しないため、懸念事項は用いるオリゴヌクレオチドの種類と末端保護の有無に依存。ゲノム編集を併用するとDNA切断する(項目2で整理)。ODMで用いるオリゴがDNA 2本鎖の場合、ゲノムへの挿入。DNA切断せずに直接塩基置換するCRISPR/Cas法がある。標的配列との類似配列での置換の可能性。	オリゴヌクレオチドでは、DNAかRNAなのか、1本鎖か2本鎖なのか、末端が保護されているかを考慮。CRISPR/Cas法による置換では、unbiasオフターゲットは起こりにくいため、標的配列との類似配列での置換を調査する必要。1塩基置換で新たな形質が獲得できるため、得た形質の影響を考慮。ただし、今の遺伝子組換え食品の審査でunbiasオフターゲットまで求めていない状況がある。
外来遺伝子なし	DNAメチル化する方法 (DNA切断なし)	メチル化誘導型CRISPR/Cas、プロモーター配列標的低分子RNA (RdDM)	DNA切断せずにDNAメチル化するCRISPR/Cas法があり、標的配列との類似配列箇所でのDNAメチル化の可能性。植物ウイルスを用いたRNAによるDNAメチル化、接ぎ木で台木または穂木でのsiRNA導入を用いたDNAメチル化誘導があり、用いられる低分子RNAのヒトゲノム上への影響を考慮。	ウイルスを用いる場合は、その残存や配列断片の残存の確認。unbiasオフターゲットは起こりにくいため、標的配列との類似配列での置換を考慮。低分子RNA (siRNAなど) のヒトへのオフターゲット影響があるが、作用機構が異なるなどヒト影響は低い想定外の遺伝子発現変化がないか。
外来遺伝子なし	DNA 2本鎖切断する方法	ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, MegaNuclease (I-SceIなど) PiggyBac, SleepingBeauty	DNA 2本鎖切断修復で起こるのは、欠失、挿入、置換の3種類がある。 DNA切断する場合は、オフターゲット切断を考慮する必要がある。中でも、本来の標的配列と類似性のない領域でのオフターゲット切断を考慮する。 DNA 2本鎖を誘導して置換を行う場合は、分類「1」と違い、同時に用いるオリゴヌクレオチドのゲノムへの挿入の可能性。 欠失では、その後の読み枠、翻訳開始位置のズレによる新たなタンパク質出現に注意。	標的配列との類似配列の検索だけでは十分でない。Unbiasなオフターゲット評価、読み枠のズレによる新たなタンパクの毒性・アレルゲン性評価を考慮。通常、遺伝子欠失のために欠失の後ろに終始コドンが来るものを想定するが、第一エクソン破壊の場合は、一つのmRNA上でのエクソンスキップ等で終止コドン以降で翻訳が開始されてタンパクが合成されることがある。この場合は、新たに産生されるタンパクがあればその毒性・アレルゲン性評価が必要。機能ドメイン破壊と第一エクソン破壊を区別して考える。
外来遺伝子あり	外来遺伝子を導入する方法	シス・トランスジェネシス、ゲノム編集いずれの場合も現行の枠組みで対応可能	技術ごとに再度整理する必要ない	既存の遺伝子組換えに従う
外来遺伝子あり	合成生物学	微生物を用いる微生物ゲノムの改変、最適化	酵母など微生物を用いて、生合成経路まるごと遺伝子セットの導入、酵素合成に関わる遺伝子の導入と改変など	使用した微生物の残存の有無、人工遺伝子を用いての遺伝子セット(一つ以上の生合成回路など)導入による微生物自身の生合成経路による影響、有害成分の増減、有無 、生産物がタンパク質であれば毒性・アレルゲン性評価。比較対象はない場合もある。
外来遺伝子の一過的発現	植物ウイルスALSVなどを用いる方法、接ぎ木で一過的にmRNA移行で発現するが、最終的には残存しない。	遺伝子発現と遺伝子抑制	AVSVを用いたものでは、FT遺伝子の一過的発現での開花促進とMdTFL1-1の一過敵遺伝子抑制幼若期間の短縮がある。接ぎ木では、一過的タンパク発現。	ウイルスを用いた一過的遺伝子導入で分類可能。一過的タンパク発現で、残存しなければ他と同様null segregantと考える。

* この分類の仕方だと、現象で分けているが、これが最終産物に残る現象でもあるためProductベースの考え方へ展開可能

表 3

文献ID	生物種	種名	用いた技術	ターゲット遺伝子	誌名	タイトル	年	ページ	要旨	所属
1	動物	ブタ	ZFN	RELA	Sci. Rep.	Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing	2016	6, 21645.	農学のプロタイプの正確で効率的な置換を記す。RELA遺伝子は免疫を調節する。ZFNによって胚のRELA座を編集してアフリカ豚コレラへの回復力に関連するイボイノシシのRELAオルソログを持つブタが生きて生まれた。一世代で種間で対立遺伝子を移入する効率のよい能力は今までになかった農業と基礎研究の機会を作る。	[Lilico SG et al.] The Roslin Institute and R(D)SVS, Easter Bush Campus University of Edinburgh Edinburgh イギリス
2	動物	ブタ	ZFN	ミオスタチン	PLoS One	A 90-Day Feeding Study in Rats to Assess the Safety of Genetically Engineered Pork	2016	11(11), e0165843.	私たちは最近ZFNを利用してミオスタチンの機能を喪失させたGEブタを作成した。このGEブタは野生型のブタと同じく正常に成長するが、赤身肉の収量が多く、脂肪の塊が少ない肉を生産する。このGEブタ肉の潜在的な垂慢性の毒性を評価するために、ラットにおいて90日間の摂取の研究を行なった。ラットを無作為に5つのグループに分けて、90日間基礎的な食事とそれに野生型ブタとGEブタから調製した低容量と高容量のブタ肉を加えた食事を与えた。動物の行動と臨床的な徴候を観察して、体重と食事の消費を1週間単位で記録した。45, 90日目に血液検査を行なった。成長速度、食事の消費、血液検査の数値はGEブタ肉と野生型ブタ肉を食べさせたラットのグループの間で有意差がなかった。高容量のGEブタ肉と基礎的な食事を食べさせたグループの間では肝機能のパラメーターと白血球数で差があったが、GEブタ肉を食べさせたグループの結果はすべて正常の範囲内だった。45, 90日目にすべてのグループから単離した臓器に障害はなかった。GEブタ肉をラットに食べさせたときに長期間の悪い効果はなかった。	[Xiao GJ et al.] Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 中国
3	動物	ブタ	?	aminopeptidase N	Faming Zhuanli Shenqing	Pig with site-directed modification of porcine aminopeptidase N (pAPN) gene	2016	CN 10554 3257 A 20160504.	本発明はブタのアミノペプチダーゼN (pAPN) 遺伝子の部位特異的な修飾を持ったブタに関連する。pAPN遺伝子のクローニングとシーケンシング分析、pAPN編集ベクターの構築と活性の分析、ドナーベクターの構築、pAPN遺伝子に部位特異的な修飾を持つST細胞系列の構築、伝染性胃腸炎コロナウイルスの病原性の研究、pAPN遺伝子に部位特異的な修飾を持つトランスジェニック繊維芽細胞の構築、再構築された胚の獲得、pAPN遺伝子の部位特異的な修飾の同定によってこのブタは構築される。本発明はブタのウイルス性の下痢とK88の感染を遺伝的な観点から絶滅させて、ブタの育種における伝染病を制御するための費用を削減して、環境汚染を低減し、抗生物質の乱用を減らして健康的な育種の方法を提供する。また、ヒトのガンや他の関連した病気の病原性の研究と関連する治療のスクリーニングと前臨床的なテストの基礎を提供する。	[Chen J et al.] Anhui Agricultural Univ. 中国
4	動物	ブタ	TALEN	ミオスタチン	Mol. Reprod. Dev.	Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets	2016	83(1), 61-70.	ゲノム編集技術と体細胞核移植 (SCNT) を使ってミオスタチンをノックアウトしたブタを作った。Platinum TALENはブタの体細胞において遺伝子を修飾することにおいて効率が高かった。修飾した体細胞をSCNTに持ってミオスタチンをノックアウトしたブタを作った。これらの子ブタは筋肉が2倍になる表現型を示し、体重は増えており、最長筋の塊は野生型の170%になっており、筋肉繊維の数は倍になった。ブタにおけるミオスタチンの喪失は筋肉の塊を増やし、将来ブタ肉の生産を増加させるかもしれない。	[Rao S et al.] Research and Development Center NH Foods Ltd. Tsukuba 日本
5	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao	Generation of porcine MSTN knockout cell line using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination	2016	32(10), 1161-1167.	ミオスタチン (MSTN) は大型の家畜で肉の性質を改善するための重要な遺伝子の候補である。2種類のベクターMSTN Cas9とドナーDNAはブタPK15細胞系列へエレクトロポレーションによって導入された。G418耐性の選抜と蛍光顕微鏡の観察によってNeo-EGFP陽性の細胞を単離した。MSTNのエクソン3において部位特異的で相同的な組換えを検出するために、crossover PCR、long-distance PCR、ウエスタンブロット、サザンブロット、DNAシーケンシングを使った。CRISPR/Cas9発現ベクターの効率的な標的部位はMSTN遺伝子のエクソン3に見出され、複数のスクリーニングによってMSTN遺伝子に変異を持つ細胞系列を得た。本研究はMSTNの機能の研究のための実験材料を提供する。	[Qi S et al.] Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Plateau Mountainous Region, Ministry of Education Guiyang 中国
6	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Sci. Rep.	Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP	2016	6, 31729.	CRISPR/Cas9とCre/LoxPによって選択マーカー遺伝子 (SMG) を含まない、機能的にミオスタチン (MSTN) をノックアウトしたクローンブタの作成を報告する。CRISPR/Cas9による相同組換えを利用してブタの初代細胞でMSTNの1つの対立遺伝子をノックアウトした。次に、Creリコンビナーゼを使って82.7%の効率でSMGを削除した。フローサイトメトリーによってSMGとEGFPを含まない細胞を単離して核移植のためのドナーの核として使った。685個の再構築された胚は3頭の代理母に移されて、1頭が2匹の雄の生きた子ブタを出産した。これらのクローンブタでは1つの対立遺伝子でMSTNがノックアウトされてSMGを欠失していることが確認された。筋肉においてMSTNの発現はおよそ50%減少し、筋原性の遺伝子の発現は増加していた。組織学的検査では筋原線維の量は増加していたが、その大きさは変化がないことが明らかになった。本研究は優れた家畜の生産のための信頼できる方法であり、潜在的な生物学的リスクを最小にする戦略である。	[Bi Y et al.] Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding, Hubei Institute of Animal Science and Veterinary Medicine Hubei Academy of AgroSciences Wuhan 中国

表3つづき

7	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	CD163	PCT Int. Appl.	Preparation method for anti-porcine reproductive and respiratory syndrome cloned pig	2016	WO 2016/10214 A1 20160714.	本発明は豚繁殖・呼吸障害症候群に抵抗性のあるクローンブタの作成方法を提供する。本方法は以下の段階から構成される。CRISPR/Cas9ターゲティングベクターとCD163遺伝子相同組換え修飾ベクターをブタの線維芽細胞へ入れて陽性のクローン細胞を得る。その細胞ではブタの内在性CD163遺伝子の第7エクソンがヒトのCD163-L1遺伝子の第10エクソンと置換されて、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの侵入を媒介できない。ドナー細胞と受容細胞としてこの陽性細胞と卵母細胞を使い、体細胞核移植の技術を利用してクローン化した胚を得る。その胚を子宮へ移してブタを妊娠させてクローンブタを得る。	[Li N et al.] China Agricultural University 中国
8	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	細胞表面のウイルスが侵入するときに利用するタンパク質	Sci. Am.	You Can Edit a Pig, but It Will Still Be a Pig	2016	314(3), 22.	ブタの感染症を防ぐためにCRISPRを利用する	[Brouillette M]
9	動物	ブタを含む哺乳類	CRISPR/Cas9	MC3R	Faming Zhuanli Shenqing	A method for producing MC3R gene knock-out pig by CRISPR/CAS9 system	2016	CN 10619113 A 20161207	本発明はCRISPR/Cas9システムによってMC3R遺伝子をノックアウトしたブタを作る方法を開示する。本方法は、MC3R遺伝子をノックアウトした動物の細胞を得るために、gRNA1および/またはgRNA2をコードする遺伝子を動物の細胞へ導入することを含む。動物の細胞は哺乳類の細胞であり、たとえばブタの細胞である。MC3R遺伝子をノックアウトする効率は29.16%である。本発明は標的MC3R遺伝子の大きな断片を迅速に効率良くノックアウトして、外来遺伝子を残さない。本発明はMC3Rの機能を解明するための研究と動物の育種に使える。	[Li Q et al.] China Agricultural Univ. 中国
10	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	MC4R	Faming Zhuanli Shenqing	Method for preparation of pigs with MC4R gene knocked out	2016	CN 106191064 A 20161207.	本発明はCRISPR/Cas9システムと体細胞核移植を使ってMC4R遺伝子を編集することでノックアウトしたブタを作ることに関する。本方法では、MC4R遺伝子の大きな断片を欠失させてその欠失を持ったブタを作るためにブタのMC4R遺伝子のコード領域内で2ヶ所の部位に対するsgRNAを設計することで特徴付けられる。本発明はブタMC4R遺伝子を研究するための実行可能な研究である。	[Li Q et al.] China Agricultural Univ. 中国
11	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Faming Zhuanli Shenqing	Swine myostatin gene editing site, and application thereof	2016	CN 106086031 A 20161109.	本発明はブタのミオスタチン遺伝子の編集部位とその応用を開示する。その編集部位はミオスタチン遺伝子のコード領域内、第1エクソン中に存在する。その部位はCas9によって特異的に認識されて、ターゲティングベクターと相同組換えを行い変異した遺伝子または選択マーカー遺伝子を受容細胞のゲノムの決まった部位に取り込まれるようにする。統計的な結果ではターゲティングの効率は80.5%である。この方法によって高い肉係数を持った新しい品種のブタが開発できて、ミオスタチンの研究のための材料を提供できる。	[Bi Y et al.] Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences 中国
12	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン遺伝子のプロモーター	Faming Zhuanli Shenqing	sgRNA set for specific identification of swine MSTN gene promoter and its encoding DNA set and application in gene editing of MEF3M factor binding site of MSTN gene promoter	2016	CN 105950625 A 20160921.	本発明はブタのゲノム中のミオスタチン (MSTN) 遺伝子のプロモーターのMEF3M因子結合部位を遺伝子編集するためのsgRNAの組み合わせとその応用を提供する。sgRNAは特異性が高く、MEF3M因子の結合部位をノックアウトするために使える。本発明によりブタの筋細胞の発達を促進して筋肉量を増やせる。	[Li K et al.] Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
13	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Sci. Adv.	Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs.	2016	2(9):e1600803.	医療に応用するためのGMブタは主に体細胞核移植を使って作られる。しかし、この方法は複雑な細かい技術を必要とし、ドナーの体細胞の核の不完全なエピジェネティックのリプログラミングのために出産前および出産後に死ぬリスクをしばしば大きくする。その結果、GMブタの生産は広く行なわれなかった。体外受精させた受精卵へエレクトロポレーションによってCas9とsgRNAを導入させることを含むブタにおけるCRISPR/Cas9による遺伝子編集のための簡単な方法を提供する。Cas9のエレクトロポレーションによる遺伝子編集は高い効率で標的遺伝子の破壊を起こし、ミオスタチンに変異のあるブタの作成によって確認した。この方法はGMブタの生産を促進する潜在的能力がある。	[Tanihara F et al.] Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Bioscience and Bioindustry, Tokushima Univ. Tokushima 日本
14	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	PRNP	Theriogenology	Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system	2016	86(8), 1886-1896.e1.	CRISPRをウシに適用した報告は少ない。本研究ではウシPRNP遺伝子をCRISPR/Cas9システムでノックアウトとノックインした。ウシ胎児の線維芽細胞と体外受精の胚を使った。PRNP遺伝子エクソン3を標的にするために5つのsgRNAを設計してCas9と一緒に細胞へ導入した。相同組換えの効率はEGFP遺伝子の両側に1kbpのPRNP遺伝子を連結させたレポーターベクターを使って評価した。体細胞についてはCas9とsgRNAをコードするプラスミドを2つの条件下でトランスフェクトした。体外受精の受精卵にはプラスミドまたはmRNAを使って顕微授精を行なった。体細胞と胚において標的部位に挿入、欠失と大きな欠失が起きた。胚では相同組換えも検出された。CRISPR/Cas9システムはウシのゲノムで部位特異的に編集ができて、重要な人獣共通伝染病に耐性な大きな動物の開発につながるだろう。	[Bevacqua RJ et al.] Animal Biotechnology Laboratory Buenos Aires アルゼンチン

表 3 つづき

15	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン遺伝子のプロモーター	Reprod. Fertil. Dev.	EFFICIENT GENERATION OF MYOSTATIN PROMOTER MUTATIONS IN BOVINE EMBRYOS USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM	2016	29(1), 212.	ミオスタチンを不活性化させると、肉を増やせるが、難産や生殖能力の低下などの悪影響もある。ミオスタチンの発現を低下させて、これらの悪影響を出さないために、ミオスタチンのプロモーターの異なる因子の欠失をCRISPR/Cas9システムを使って作った。ミオスタチンのプロモーター中の-1577、-689、-555、-116の位置を標的とする4つのsgRNAを設計した。ウシの胎児線維芽細胞で試した後に、ウシの受精卵でミオスタチンのプロモーターを修飾した。Cas9 mRNAとそのタンパク質を導入したときに94.12%と64.17%で編集が起きた。得られるプロモーターはヘテロになることが多かった。ウシの胚でCRISPR/Cas9システムを利用するにはさらなる改良が必要である。	[Pinzon CA et al.] Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station 米国
16	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	オボアルブミン、オボムコイド	Sci. Rep.	Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system	2016	6, 23980.	受精卵にアクセスすることが難しいために、ニワトリではCRISPR/Cas9システムは利用されていなかった。私たちはニワトリにおいてCRISPR/Cas9システムによる遺伝子ターゲティングを報告する。Cas9、sgRNA、薬剤耐性マーカーをコードする遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションすることによって、ニワトリの培養した始原生殖細胞 (PGCs) において2つの卵白の遺伝子であるオボアルブミンとオボムコイドを効率良く変異させた。CRISPRによってオボムコイド遺伝子に変異を持つPGCsをニワトリの胚へ移植して、3匹の生殖細胞系列のキメラな雄鶏 (GO) を確立した。すべての雄鶏はドナーに由来する変異型のオボムコイド遺伝子を持った精子を作った。2匹については高い効率でその変異型の遺伝子を次世代 (G1) に伝達してヘテロな遺伝子型のニワトリが得られた。G1変異型のニワトリを交配してオボムコイド遺伝子がホモな変異型の子孫 (G2) を作った。これらの結果からCRISPR/Cas9システムはニワトリで利用できることが証明された。	[Oishi I et al.] Biomedical Research Institute National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Osaka 日本
17	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	peroxisome proliferator-activated receptor-γ, ATP synthase epsilon subunit, オボアルブミン	G3 (Bethesda, Md.)	Efficient Genome Editing in Chicken DF-1 Cells Using the CRISPR/Cas9 System	2016	6(4), 917-23.	CRISPR/Cas9のニワトリにおける利用は情報が少ない。私たちはニワトリのDF-1細胞において peroxisome proliferator-activated receptor-γ、ATP synthase epsilon subunit、オボアルブミン遺伝子に変異を導入するためにCRISPR/Cas9システムを使った。T7E1アッセイの結果では3つの遺伝子座における変異の率は、0.75%、0.5%、3%だった。変異の効率を高めるために、代理のレポーターシステムと一緒にGM細胞を効率良く濃縮するために私たちはPuro(R)遺伝子を使った。T7E1アッセイでは変異の効率は上昇して、60.7%、61.3%、47.3%となった。後のシーケンシングによる分析では変異の効率は上昇して、94.7%、95%、95%だった。T7E1アッセイによって3ヶ所の潜在的なオフターゲット部位を調べたところ、オフターゲット変異は検出されなかった。このように、CRISPR/Cas9システムはニワトリのゲノム編集に利用できる。	[Bai Y et al.] College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 中国
18	動物	ヤギ	TALEN	β-ラクトグロブリン、ヒトα-ラクトアルブミン	PLoS One	Targeting human α-lactalbumin gene insertion into the goat β-lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination	2016	11(6), e0156636/1-14.	人間に対する栄養としてのヤギのミルクの価値は、β-ラクトグロブリン (BLG) のようなミルクのタンパク質によって引き起こされる食物アレルギーの問題に関連している。本研究では、ヤギのBLG遺伝子座へヒトα-ラクトアルブミン (hLA) 遺伝子を導入するためにヤギの線維芽細胞においてTALENを利用した相同組換えを行なった。1つ、2つの対立遺伝子に外来遺伝子が導入されたコロニーが選抜の後に単離される率は10.1%、1.1%だった。1つ、2つの対立遺伝子に外来遺伝子が導入されたヤギの乳房上皮細胞においてBLG mRNAの濃度は徐々に低下して、hLAの発現が確認された。遺伝子ターゲティングされた線維芽細胞は効率良く体細胞核移植に使用した。ミルク中にBLGが少なく、hLAを豊富に含むhLAをノックインしたヤギが作れた。私たちの研究は動物のミルクの最適化の基礎となり、農業と生態臨床医学の発展を促進する。	[Zhu H et al.] College of Veterinary Medicine Northwest A&F University Yangling, Shaanxi 中国
19	動物	ヤギ	TALEN	β-ラクトグロブリン、ヒトラクトフェリン	Faming Zhuanli Shengqing	Goat blg gene targeted-deletion modification system for constructing blg-/hlf+ fetal fibroblast	2016	CN 105734032 A 20160706.	本発明はヤギのBLG遺伝子をターゲティングによって欠失させる方法とその応用に関連する。本発明ではTALENを使ってBLGの標的配列を切断する。ヤギのBLG遺伝子をターゲティングによって欠失させて、ヒトのラクトフェリン (hLF) 遺伝子をノックインして、BLG/hLF+トランスジェニック胎児線維芽細胞を得る。この細胞をドナーとして体細胞核移植を行なってBLG/hLF+トランスジェニックヤギを作る。本発明はターゲティングによって欠失させたトランスジェニック哺乳類を作るための優れた技術である。	[Cheng Y et al.] Yangzhou University 中国
20	動物	ヤギ	TALEN	β-ラクトグロブリン	Transgenic Res.	The growth and reproduction performance of TALEN-mediated β-lactoglobulin-knockout bucks	2016	25(5), 721-729.	本研究の目的は、設計されたヌクレアーゼを利用して遺伝子ターゲティングされた雄のヤギの生殖能力に遺伝子ターゲティングとリクローニングが影響しているかを調べることである。TALENによってβ-ラクトグロブリン (BLG) 遺伝子の1つの対立遺伝子をノックアウトした (BLG ^{-/-}) ヤギと、BLG ^{+/-} の雄ヤギの線維芽細胞において遺伝子ターゲティングとリクローニングによって作られた2つの対立遺伝子がノックアウトされた (BLG ^{-/-}) 雄のヤギを使って健康状態と生殖能力を調べた。BLG ^{+/-} の雄ヤギの出生のときの体重と出産後の成長は野生型のヤギと同等だった。BLG ^{-/-} またはBLG ^{+/-} の雄ヤギから得た新鮮なまたは凍結融解した精子の質のための指標は対照の物との間で有意差がなかった。体外受精によって得られた受精卵の中で胚盤胞まで育つ割合はBLG ^{+/-} 、BLG ^{-/-} 、野生型の間で同じだった。BLG ^{+/-} 、BLG ^{-/-} 、野生型の雄ヤギから得た凍結融解した精子を使ったときの人工授精の受胎率は42.3%、38.0%、42.6%だった。ターゲティングしたBLGの修飾の生殖細胞系伝達はメンデルの法則と一致した。解析した成長と生殖の性質はBLG遺伝子をターゲティングしたことで影響を受けておらず、BLG ^{+/-} およびBLG ^{-/-} の雄ヤギの育種の可能性を示唆する。	[Ge H et al.] College of Veterinary Medicine Northwest A&F University Shaanxi 中国

表3つづき

21	動物	ヤギ	TALEN	ミオスタチン	BMC Dev. Biol.	Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats	2016	16(1), 26.	TALENによるミオスタチン (MSTN) の編集がヤギにおいて可能であることを調べた。ヤギのMSTNを認識する一対のTALEN (MTAL-2) を作った。ヤギの線維芽細胞をMTAL-2でトランスフェクトして272個のモノクローナルな細胞がMSTNの1つまたは2つの対立遺伝子において変異を持つことが確認された。異なる遺伝子型を持つ10種類の細胞をドナー細胞として体細胞核移植を行なって、3頭の子ヤギ (K179/MSTN(-/-), K52-2/MSTN (+/-), K52-1/MSTN (+/+)) が得られた。MTAL-2はヤギのゲノムの中のMSTNを効率良く破壊できた。得られた体細胞からは発生に異常のないMSTNに変異を持つヤギが作れた。TALENを使ってヤギにおいて正確なゲノム編集ができた。	[Yu B et al.] College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 中国
22	動物	ヤギ	TALEN	β-ラクトグロブリン、ヒトラクトフェリン	Sheng wu cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology	BLG gene knockout and hLF gene knock-in at BLG locus in goat by TALENs	2016	32(3), 329-38.	ヤギの胎児の線維芽細胞においてβ-ラクトグロブリン (BLG) 遺伝子をノックアウトして、BLG遺伝子座へヒトのラクトフェリン (hLF) 遺伝子のコード領域を挿入するためにTALENを利用して組換えを行なった。それをドナー細胞として体細胞核移植を行なった。ヤギBLGのエクソン3を認識するTALENをコードするプラスミドTALEN-3-L/Rと、hLF遺伝子をノックインするための陰性選択遺伝子HSV-TKを含むベクター-BLC14-TKを設計した。BLC14-TKとTALEN-3-L/Rと一緒にヤギの胎児線維芽細胞へトランスフェクトして薬剤によって細胞を選抜した。TALEN-3-L/Rによる変異導入効率は25-30%だった。6個のBLG/hLFの細胞系列に由来する335個の再構築された胚を16匹の代理ヤギに移植した。9匹のヤギが妊娠して50日生きたBLG/hLFの胎児が得られた。この研究はアレルゲンが少なくhLFを豊富に含むヤギのミルクを得る研究の基礎となる。	[Song S et al.] 中国
23	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Sci. Rep.	Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system.	2016	6:29855.	ミオスタチン (MSTN) を正確に破壊することで安全に肉の生産性を改善できるかは証明されていない。この問いに答えるために、私たちはCRISPR/Cas9システムを応用してMstnをノックアウトしたウサギとヤギを作って表現型の変化を解析した。4頭のヤギの中で1頭はMstn遺伝子座に編集が起きた。このヤギの早い段階での成長速度は対照を上回った。しかし、Mstnノックアウトは重大な健康上の問題を引き起こし、他の生物種でも同様な効果があるかもしれない。この安全性の問題はさらに研究する必要がある。	[Guo R et al.] Jiangsu Livestock Embryo Engineering Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 中国
24	動物	ヒツジ	ZFN	ミオスタチン	Asian-Australas. J. Anim. Sci.	Knockout of Myostatin by Zinc-finger Nuclease in Sheep Fibroblasts and Embryos	2016	29(10), 1500-7.	ヒツジのミオスタチン (MSTN) 遺伝子を標的とするZFNを培養線維芽細胞へ導入した。2つのコロニーは1つの対立遺伝子に変異があって、1つのコロニーは2つの対立遺伝子に欠失があった。さらに、MSTN-ZFN mRNAをヒツジの胚へマイクロインジェクションによって導入した。37個の単為生殖の胚の中で13個がZFNによってターゲティングされて効率は35%だった。本研究はマイクロインジェクションと体細胞核移植によってMSTN遺伝子を編集したヒツジを作るための基礎となる。	[Zhang X et al.] Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 中国
25	動物	ヒツジ	TALEN	ミオスタチン	Asian-Australas. J. Anim. Sci.	Targeted editing of myostatin gene in sheep by transcription activator-like effector nucleases	2016	29(3), 413-418.	本研究の目的は、一本鎖DNAオリゴヌクレオチド (ssODN) とTALENを使ってヒツジのミオスタチン (MSTN) 遺伝子が編集できるかを調べることである。私たちはヒツジMSTN遺伝子のコード領域の中で高度に保存された配列を標的とする一対のTALENを設計した。ヒツジの初代線維芽細胞へTALENとssODNと一緒にトランスフェクトしてMSTN遺伝子の正確な遺伝子編集を誘導した。MSTN遺伝子を編集された細胞は核ドナーとして使われてクローン胚が作られた。TALENとssODNを組み合わせて使うと家畜で正確な遺伝子の修飾ができる。	[Zhao X et al.] College of Animal Science and Technology, College of Life Sciences Shihezi University Shihezi 中国
26	動物	ヒツジ	TALEN	ミオスタチン	Sci. Rep.	Generation of biallelic knock-out sheep via gene-editing and somatic cell nuclear transfer	2016	6, 33675.	私たちはヒツジのミオスタチン (MSTN) に特異的なTALENプラスミドを作ってSTHヒツジの胎児の線維芽細胞へトランスフェクトした。2つの対立遺伝子がノックアウトされた細胞を体細胞核移植のためのドナー細胞として選んだ。クローン胚を37頭の代理ブタに移植して、28頭 (75.7%) が妊娠して、15頭が出産した。23頭の子ヒツジが生まれて12頭は生きていた。子ヒツジの遺伝子変異はドナー細胞の物と一致した。オフターゲット変異は検出されなかった。MSTNノックアウトはMSTN関連遺伝子のmRNAの発現に影響していた。MSTNノックアウトによって体重が顕著に増加し、筋肉繊維の肥大が起きた。これらのMSTNに変異を持つヒツジは正常に発生と成長した。	[Li H et al.] State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan Yunnan Agricultural University Kunming 中国
27	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	MSTN, ASIP, BCO2	Faming Zhuanli Shenqing	Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep	2016	CN 105950656 A 20160921.	1細胞の胚へCas9 mRNAと3つの遺伝子 (MSTN, ASIP, BCO2) を標的とするgRNAをマイクロインジェクションすることによってヒツジにおいて正確な遺伝子ターゲティングを行なった。sgRNA: Cas9によるターゲティングの効果をクローニングとシーケンシングによって注入した胚、体細胞組織、生殖腺において調べた。子ヒツジにおけるこれら3つの遺伝子のターゲティングの効率は27-33%で、3つの遺伝子が同時にターゲティングされた効率は5.6%だった。受精卵へのマイクロインジェクションは遺伝子修飾されたヒツジを作るための効率的な方法であることが証明された。MSTN遺伝子の破壊では筋原線維が大きくなって筋肉の肥大が起きた。これは遺伝子修飾が遺伝子と形態学の両方のレベルで起きたことを支持する最初の詳細な証拠である。CRISPR/Cas9システムを利用して、商業的に重要な性質に関連する複数の遺伝子を同時にターゲティングすることによって家畜の改良ができることを本研究は示唆する。	[Zhao J et al.] Qingdao Agricultural University 中国 Shihezi University Shihezi 中国
28	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Faming Zhuanli Shenqing	Detection method of MSTN gene targeted knockout and the effects on muscle differentiation in sheep thereof	2016	CN 105821116 A 20160803.	ヒツジのMSTN遺伝子をターゲティングによってノックアウトして筋肉の分化への影響を調べる方法は以下の段階から構成される。標的遺伝子のクローニング、gRNAの設計と合成、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの構築、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの外因性の活性の検出、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの内因性の活性の検出、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターのノックアウト効果の検出。本発明は実験の期間が短く、操作が簡単で、再現性が高く、ノックアウトの効率が低いという利点がある。	[Li B et al.] Yangzhou University 中国

表 4

文献ID	生物種	種名	用いた技術	ターゲット遺伝子	誌名	タイトル	年	ページ	要旨	所属
1	植物	キュウリ	CRISPR/Cas9	elF4E	Mol. Plant Pathol.	Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology.	2016	17(7), 1140-53	キュウリを材料とし、ウイルス耐性の付与を目的としてCRISPR/Cas9により、elF4E遺伝子の破壊を行った。ElF4E遺伝子のN末端及びC末端を標的としたCas9/sgRNAを導入したT1世代においては、標的部位において小規模の遺伝子欠損またはSNPsが認められた。非組換え (T-DNA脱落の意味か?) の系統を用い、ホモ変異体を取得した。T3世代ホモ系統は、cucumber vein yellowing virus (ipomovirus)、potyviruses Zucchini yellow mosaic virus、Papaya ring spot mosaic virus-WIに抵抗性を示したが、ヘテロ及び非変異体はこれらのウイルスに高い感受性を示した。このように初めて非遺伝子組換えで、生育に影響を与えることなく、また長期間の戻し交配を必要とせず、ウイルス抵抗性のキュウリを作出することに成功した。	[Chandrasekaran J et al.] Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, Volcani Center イスラエル
2	植物	コメ	CRISPR/Cas9	acetolactate synthase (ALS1)	Mol. Plant	Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase.	2016	9(4), 628-31	コメのALS1遺伝子に変異を導入するために種々の実験を行った。①トウモロコシで成功している、一本鎖オリゴDNAを用いる手法: Cas9-gRNAとW548LまたはS627I変異を導入するための一本鎖オリゴDNAをparticle bombardmentにより導入したが、ALS遺伝子に変異が導入された系統は取得できなかった。②ALS遺伝子上2カ所の変異を導入するための2カ所を認識し切断するためのgRNAをCas9と共に発現し、さらに、2カ所のアミノ酸変異導入のためのドナー断片となる配列を組み込んだベクターを構築した。このドナー断片の両端にはgRNAで切断される認識部位が置かれていることを特徴とする。このベクターを、相同組換えにおいてドナー断片となる本鎖DNAとともに、コメカルス (日本晴) にparticle bombardmentにより導入したところ、T0世代で48/52の高効率でホモ変異体を取得することに成功した。③②で用いたベクターをアグロバクテリウム法で導入したところ、ヘテロ変異体を取得された。ホモ変異体についてbispyribac sodiumを散布したところ、変異体は耐性を示したが、非変異体は枯死した。このように、2つのgRNAと修復用の鋳型をプラスミドと二本鎖DNAの形で同時に供すること、効率よく点変異導入ができることが示された。また、植物種において変異導入方法を最適化する必要があることが示唆された。	[Sun Y et al.] Institute of Crop Sciences (ICS), Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) 中国
3	植物	アマ	TALEN, CRISPR/Cas9	BFP transgenic model (Arabidopsis thaliana), EPSPS (グリホサート耐性) (亜麻)	Plant Physiol.	Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants.	2016	1917-28	標的配列の改変配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)とTALENまたはCRISPR-Cas9を同時に導入することで正確なゲノム編集を行う方法を示す。シロイヌナズナでは、PhleomycinまたはTALENによる変異導入 (BFP(H66:Blue)がGFP(Y66:Green)への変換) 効率が、ssODNとの同時導入により導入量依存的に上昇することが示された。TALENとssODNを併用することで、ssODNの長さ依存的にBFPからGFPへの変換効率が上がることが示された。なお、TALENまたはCRISPR/Cas9単体では、TALENと比較してCRISPR/Cas9の方が変異導入活性 (NHEI活性) が高い。アマにおいて、グリホサート耐性に関わるEPSPS遺伝子 (2遺伝子) を標的とするssODN(2配列)をCRISPR/Cas9と同時に導入し、得られたカルスに目的の変異が導入された割合は、0.15%または0.08%であった。変異導入に成功した系統のひとつA23のカルスおよびその再生植物体はGlyphosate耐性を示した。	[Sauer NJ et al.] Cibus, San Diego 米国
4	植物	コメ	TALEN	WAXY	Faming Zhuanni Shengqing	TALEN recognition targeting site for efficient editing rice WAXY gene.	2016	CN 105367628 A 20160302.	本発明は、コメのWAXY遺伝子を効率良く編集するためのTALEN用の一対のターゲッティング部位とその応用を提供する。TALENの遺伝子を含むプラスミドを使う方法を提供する。TALENのアミノ酸配列とヌクレオチド配列を設計して、TALEN遺伝子を含むプラスミドを構築する。そして、ターゲッティングの効率を改善する。	[Lei W et al.] BGI Shenzhen Technology Co., Ltd. 中国
5	植物	ジャガイモ	TALEN	vacuolar invertase	Plant Biotechnol. J.	Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout.	2016	14(1), 169-176	ジャガイモを低温保存することは、発芽を抑制して保存期間を延長するために広く行なわれる。しかし、低温保存によって還元糖の蓄積を促進してしまう。高温で加工すると、これらの還元糖から茶色の苦味の製品ができてしまい、潜在的な発がん物質であるアクリルアミドの含有量が高くなってしまふ。本研究では、還元糖の蓄積を抑制するためにTALENを利用してvacuolar invertase遺伝子(Vinv) をノックアウトした。少なくとも1つのVinv対立遺伝子に変異がある18個の植物を得た。これらの植物の中で5つは全てのVinv対立遺伝子に変異があった。Vinv遺伝子をノックアウトした植物から得られたイモには還元糖が検出されず、加工されたチップスはアクリルアミドの含有量が減少し、色が薄かった。7つの植物はゲノム中にTALEN DNAの挿入がなかった。本研究は同質4倍体であるジャガイモの品種改良にTALENを利用する基礎となる。	[Benjamin CM et al.] Collectis plant sciences Inc. New Brighton 米国
6	植物	コメ	TALEN	OsCSA1, OsDERF1, OsGN1a, OsMST7, OsMST8, OsPMS3, OsTAD1	Plant Biotechnol. J.	TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice.	2016	14(1), 186-194	コメのゲノム編集にN287C230 TALEN骨格を使うと低い変異効率 (0-6.6%) だった。しかし、TALEN骨格のC末端を除去すると変異効率が25%まで大きく上昇した。多くのトランスジェニックT0植物では1つの頻りに現れる変異と多くの低頻度の変異があった。独立のT0植物において1つのひこばえの中の大部分の組織において頻りに現れる変異が存在した。また、調べたすべてのひこばえにもそれは存在し、TALENによって誘導される変異は芽の頂点の分裂組織の発生においてかなり早く起きることを示唆する。数世代の解析はTALENによって誘導される変異は安定に標準的なメンデル型でT1とT2世代に伝達されることを示した。TALENによって誘導される変異の大部分 (約81%) は複数の塩基に影響して、それらの約70%は欠失だった。この結果は、コメにおけるCRISPR/Cas9システムの報告とは対照的であり、そこでは一塩基が影響を受けることが多く、欠失は全体の変異のわずか3.3%だった。	[Hui Z et al.] Shanghai Center for Plant Stress Biology Chinese Academy of Sciences 上海、中国
7	植物	コメ	TALEN	WAXY	Plant Physiol.	A Defect in DNA Ligase4 Enhances the Frequency of TALEN-Mediated Targeted Mutagenesis in Rice.	2016	170(2), 653-66	植物でのTALENに誘導される変異においてclassical nonhomologous end joining (cNHEJ) と alternative nonhomologous end joining (altNHEJ) の役割を分析するために、DNA Ligase 4 (Lig 4) 欠損がコメ細胞においてTALENに誘導される二本鎖切断の修復の反応速度論へ影響するかを調べた。Deep-sequencing分析から、すべてのタイプの変異の頻度はlig 4ヘテロ接合の変異体または野生型よりもlig 4を完全に欠損した変異型のカルスにおいて高いことが示された。すべての欠失の変異に対する大きな欠失 (10 bp以上) またはマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEI) によって修復される欠失の割合はlig 4ヘテロ接合の変異体または野生型よりもlig 4を完全に欠損する変異体のカルスにおいて高かった。さらに、ほぼすべての挿入 (2 bp以上) は、遺伝的背景に関係なく、TALEN切断部位の周辺の1つ以上の領域のコピーアンドペーストによって加工されてMMEIによって結合されることが示された。cNHEJの機能不全はcNHEJからaltNHEJまたは合成に依存したストランドアニーリングへと修復経路が変わることを本研究は示している。	[Nishizawa-Yokoi A. et al.] Plant Genome Engineering Research Unit National Institute of Agrobiological Sciences 日本
8	植物	?	TALEN, CRISPR/Cas9	AIP10	U.S. Pat. Appl. Publ.	Method for promoting an increase in plant biomass, productivity and drought resistance.	2016	US 20160177327 A1 20160623.	植物のバイオマスと収量の増加を促進する方法を記載する。この増加は葉、幹、根および果実と実の生産において効果が見られる。さらに干ばつへの耐性が増加して環境への変化への適応が向上し、成長、バイオマス、収量が改善する。	[Silva HA et al.] Universidade Federal do Rio de Janeiro ブラジル
9	植物	?	ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9	?	Curr. Genomics	Genomics Approaches for Improving Salinity Stress Tolerance in Crop Plants.	2016	17(4), 343-357.	世界的に塩分は穀物の生産を減らす大きな要因の1つである。塩分への植物の反応は複雑で多くの遺伝子を含む。植物がどのように塩分に反応するかを完全に理解することは難しい。私たちはゲノミクスを通じて塩分ストレス応答に関連する遺伝子を同定して、特徴を調べ、シグナル経路を地図にして精密に示し、穀物の塩分耐性を改善するためにこの情報を利用することができた。Gene pyramidingのような新しい手法を遺伝子工学とマーカーに支援された育種に利用してストレス耐性の穀物を作る能力を大きく増強した。ゲノム編集技術も正確な育種に利用できる。	[Nongpiur RC et al.] Jawaharlal Nehru Univ. New Delhi インド

表 4 つづき

10	植物	?	CRISPR/Cas9	TRV配列	PCT Int. Appl.	Nucleic acid constructs for plant genome editing	2016	WO 2016084084 A1 20160602.	核酸コンストラクトを提供する。このコンストラクトはタバコ萎えそウイルス (TRV) 配列と興味のあるゲノムの標的配列において配列特異的な切断を媒介するsgRNAをコードする核酸配列から構成されて、その場所でTRV配列は機能的な2b配列を欠損している。このコンストラクトを含む植物細胞とゲノム編集におけるこのコンストラクトの使用も提供する。	[Alexander V et al.] Danziger Innovations Ltd. イスラエル
11	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Badh2	Faming Zhuanli Shenqing	A method and CRISPR/Cas system for rapidly transforming rice into scented rice by Badh2 gene knockout.	2016	CN 105543228 A 20160504.	本発明は、コメを香りのするコメに迅速に形質転換するための方法とCRISPR/Casシステムを開示する。この方法は、コメの香りを代謝する過程の関連遺伝子の配列に対するベクターを設計して、香りのする物質が代謝されずに大量に蓄積するように遺伝子の特定の部位で欠失やサイレンシングを誘導するためにアグロバクテリウムで媒介する形質転換によって香りのしないコメニベクターをトランスフェクトする。標準的なコメが香りのするコメに形質転換された後に、改変された遺伝子を分離するために自殖または交配が行なわれて、他の遺伝子の構造や性質に影響を与えずに安定的に遺伝するホモ接合性の香りのするコメが得られる。	[Wang J et al.] Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences 中国
12	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Badh2	Faming Zhuanli Shenqing	Method for obtaining fragrant rice line through targeting Badh2 gene with CRISPR/Cas9 gene editing technology.	2016	CN 105505979 A 20160420.	本方法はCas9によって認識される香りの遺伝子のエクソンとイントロンから配列を選び、ゲノミックDNAを切りDNA修復を誘導して欠失変異を作り、機能しないBadh2遺伝子を得ることから構成される。形質転換を行なうのはOryza sativa. ssp. indica, Oryza sativa. ssp. Japonica ともち米のカルスを使い、二倍体のカルスを誘導するための外植片として成熟した胚、若い穂と子房を使う。アグロバクテリウムの媒介でカルス細胞へターゲティングベクターを移して、スクリーニングして、陽性の植物を同定して、T1グループから香りのするコメ系列を分離して、半数体のカルスを誘導するための外植片として薬、花粉、不受精の子房を使う。アグロバクテリウムの媒介でカルス細胞にターゲティングベクターを移して、陽性カルスをスクリーニングして、コルヒチンで処理して、苗に分化させて、陽性の形質転換植物を同定して、香りのするコメ系統を得る。	[Ju C et al.] Hubei Univ. 中国
13	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Acetate Synthase	Mol. Plant	Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase.	2016	9(4), 628-631	CRISPR/Casに媒介される相同組み換えによってコメにおけるacetolactate synthaseの除草剤への耐性を導入する方法を記載する。本方法は、二本鎖切断を作り、1つ以上の変異を含むcDNAと宿主の遺伝子を置換するために2つのgRNAを使う。この方法はコメにおいて1つのgRNAを使うよりも効率が高い。	[Sun Y et al.] Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 中国
14	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Gn1a, DEP1, GS3, IPA1	Front. Plant Sci.	Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System.	2016	7, 377.	コメの栽培品種Zhonghua11においてGn1a、DEP1、GS3とIPA1遺伝子に変異を導入するためにCRISPR/Cas9システムを使った。これらの遺伝子は粒の数、円すい花序の構造、粒の大きさ、植物の構造を制御すると報告されている。形質転換した植物の第一世代 (T0) における表現型と編集された遺伝子の頻度の分析は、CRISPR/Cas9システムはゲノム編集を誘導する効率が高いことが示された。形質転換された植物においてゲノム編集された割合は42.5% (Gn1a)、67.5% (DEP1)、57.5% (GS3)、27.5% (IPA1) だった。gn1a、dep1、gs3変異体のT2世代の特徴はそれぞれ粒の数の増加、高濃度の直生の円すい花序、大きな粒だった。さらに、dep1とgs3変異体ではそれぞれやや矮小植物で、長い芒を持つ粒の表現型が見られた。ipa1変異体は2つの対照的な表現型を示し、OsmiR156標的領域において誘導される変化に依存して、少ないまたは多いひこばえができた。さらに、以前の報告よりも欠失の変異の頻度が高いことが明らかになった。オフターゲットは高度に類似の配列で起きていた。この結果は、CRISPR/Cas9によって単一の栽培品種において重要な性質の複数の制御因子を修飾できることを証明した。そして、これらの結果は同じ遺伝的背景における複雑な遺伝子制御のネットワークと栽培品種における重要な性質の重なりを調査を促進する。	[Li M et al] Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of SciencesGuangzhou 中国
15	植物	トマト	ZFN	LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (L1L4)	Plant Cell Rep.	A novel arrangement of zinc finger nuclease system for in vivo targeted genome engineering: the tomato LEC1-LIKE4 gene case.	2016	35(11), 2241-2255.	植物において、特に穀物において正確な遺伝子ターゲティングを行なうことは遺伝子機能の解明や分子育種の前進のために長年求められてきた。この問題に取り組むために、トマトの種に対してZFNに基づく技術を開発した。2つのDNA認識配列の間のイントロンの配列とともにZFNの設計をターゲティングした遺伝子の変異導入に関して評価した。核因子Yのβサブユニットをコードする発生の制御因子LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (L1L4) に対して特別に作成したZFNはトマトの種で一過性に発現させると、標的部位を切断して、非相同末端結合による不完全な修復を刺激して、内在性の標的部位に変異を導入した。ZFNの技術を植物に適用できて、発生の段階でヘテロクローナな表現型をもたらすL1L4変異が得られた。L1L4のDNA結合ドメインの上流での配列の変化は果実の組織を含めて表現型の多様性につながる可能性がある。これらの結果は、トマトでのターゲティングによる変異導入のためにZFNの方法が使用できることを明確に示しており、トランスレシヨナルリサーチとトマトの育種を加速するかもしれない。	[Hiloti Z et al.] Institute of Applied Biosciences Centre for Research and Technology Hellas Thessaloniki ギリシャ
16	植物	コメ	CRISPR/Cas9	thermo-sensitive genic male sterility (TGMS)	Sci. Rep.	Development of Commercial Thermo-sensitive Genic Male Sterile Rice Accelerates Hybrid Rice Breeding Using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 Editing System.	2016	6, 37395.	ハイブリッド米はコメの生産の改善のための重要な戦略を提供する。その中で不妊の雄の系列の栽培は交雑育種の成功のための鍵である。CRISPR/Cas9システムが穀物の遺伝的改良のために応用された報告は少ない。本研究ではCRISPR/Cas9システムを使ってTMS5に特異的な変異を導入した。TMS5は中国において最も広く応用される熱に感受性な遺伝子の雄の不妊の遺伝子である。そして私たちは「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を作成した。私たちはCRISPR/Cas9システムを使ったターゲティングの変異導入のためにTMS5のコード領域において10個の標的配列を設計して、オンターゲットとオフターゲットの効果的な割合を評価した。最後に、私たちは潜在的に应用可能な「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を育種するために最も効率の良いコンストラクトであるTMS5abコンストラクトを作成した。私たちは異なる標的配列の特徴にしたがって編集に影響する因子も議論した。注目すべきは、TMS5abコンストラクトを使って私たちは11個の新しい「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を作成した。この方法は2つのコメの亜種においてわずか1年以内に雑種育種の潜在的な応用が可能である。私たちの方法の応用は不妊の系列の育種を大きく加速するだけでなく、雑種強勢の開発を促進するだろう。	[Zhou H et al.] State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources Guangzhou 中国
17	植物	コメ	CRISPR/Cas9	?	Faming Zhuanli Shenqing	Targeting vector and method for modifying non-glutinous rice line into glutinous line using CRISPR/Cas9 technology.	2016	CN 106119275 A 20161116.	本発明はCRISPR/Cas9技術に基づいてモチゴメではないコメの系統をモチゴメの系統に変えるためのターゲティングベクターに関連する。ターゲティングベクターは、sgRNA発現カセット、Cas9発現カセットとスクリーニングマーカーから構成される。sgRNAは第一のプロモーターと第一のプロモーターの制御下で転写される配列をコードするsgRNAから構成される。Cas9発現カセットは第二のプロモーターと第二のプロモーターの制御下で転写される配列をコードするCas9から構成される。第一のプロモーターと第二のプロモーターはコメにおいて恒常的に発現する強い同じまたは異なるプロモーターである。本発明はこのターゲティングベクターを使ってモチゴメではないコメの系統をモチゴメの系統に変えるための方法も提供する。本発明によって育種の時間を大幅に短縮できる。	[Ju C et al.] Hubei Univ. 中国
18	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsARF4	Faming Zhuanli Shenqing	Application of gene OsARF4 for controlling rice grain length and grain weight.	2016	CN 105950633 A 20160921.	本発明は分子生物学と遺伝子工学技術の分野、特にコメの粒の長さや重さを制御するOsARF4遺伝子への応用に関連する。本発明はコメにおいて発現する、オーキシン反応因子をコードするOsARF4を狙っている。コメの粒の長さや重さを改善して収量を改善するためにOsARF4をノックアウトする。本発明はOsARF4遺伝子のコード領域に特異的なsgRNAを利用してCRISPR-Cas9技術を使い、OsARF4遺伝子のコード領域に損傷を与えて、T-DNAを除去して非トランスジェニックコメを得る。遺伝子組換えコメは粒の長さや重さにおいてのみ明らかな改善があり、他の農学の性質には大きな変化がない。本発明の遺伝子と操作技術は実用的な価値があり、植物の収量を改善するうえで大きな役割を果たす。	[Liu J et al.] Fudan Univ. 中国
19	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsLCT1	Faming Zhuanli Shenqing	Breeding method for decreasing cadmium content of rice grain by gene LCT1 knockout with CRISPR/Cas9 system.	2016	CN 105936907 A 20160914.	本方法は、コメのLCT1エクソンのクローニング、CRISPR/Cas9システムの利用、エクソンの配列にしたがって標的配列を選び、pCRISPR/Cas9組換えベクターを構築し、それをコメのカルスに導入する。トランスジェニック苗を得て、トランスジェニックな陽性の植物をスクリーニングする。本発明は、CRISPR/Cas9技術を使ってターゲティングによってコメのOsLCT1をノックアウトして、カドミウムトランスポーターOsLCT1を完全に不活性化させる。外来遺伝子を含まない利点とコメの粒のカドミウム含量が大幅に減少して、包括的な農学的特徴は大きく変わらないようなコメの育種を行なう。本発明は安全で、時間がかからず、コストが安いという利点がある。	[Tang L et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国

表 4 つづき

20	植物	ブドウ	CRISPR/Cas9	IdnDH	Sci. Rep.	CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L.).	2016	6, 32289	CRISPR/Cas9システムは多くの植物に適用されてきたが、ブドウにおいてゲノム編集のために利用できるかは不明である。本研究では「シャルドネ」懸濁細胞と植物においてCRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集とターゲティングした遺伝子の変異を述べる。L-Idonate dehydrogenase遺伝子 (IdnDH) の異なる部位を標的として2つのsgRNAを設計した。CEL1エンドヌクレアーゼアッセイとシーケンシングの結果から標的部位において予想される挿入と欠失があることが明らかになった。sgRNA1/Cas9を発現させたトランスジェニックな細胞集団とそれに対応する再生させた植物においては100%の変異の頻度が得られた。トランスジェニックな細胞集団において検出される変異の中で大多数は1 bpの挿入であり、それに続いて1-3 bpの欠失が見られた。オフターゲット活性は、潜在的なオフターゲット部位をシーケンシングすることによって評価したその結果、明らかなオフターゲット変異は検出されなかった。私たちの結果はブドウにおいて正確なゲノム編集のためにCRISPR/Cas9システムが利用できることを証明した。	[Ren C et al.] Beijing Key Laboratory of Grape Science and Enology and Key Laboratory of Plant Resource, Institute of Botany the Chinese Academy of Sciences Beijing 中国
21	植物	グレープフルーツ	CRISPR/Cas9	GfPT	U.S. Pat. Appl. Publ.	Method for inhibiting production of furanocoumarins in plants by inhibiting grapefruit prenyltransferase.	2016	US 20160244771 A1 20160825.	本発明は、グレープフルーツのクマリンに特異的なプレニルトランスフェラーゼ (GfPT) を阻害することによって、植物においてフラノクマリンの生産を阻害する方法を提供する。植物においてフラノクマリンの発現を阻害する方法は、部位特異的突然変異誘発法、EMS突然変異生成、TILLING、ノックアウト技術、CRISPR/Cas9、TALEN、ZFNを使う遺伝子編集技術、またはRNA干渉によって誘導される遺伝子サイレンシングによってGfPTを不活性化することを含む。	[Bourgauud F. et al.] Universite de Lorraine フランス
22	植物	トマト	CRISPR/Cas9	DMR6オルソログ	bioRxiv	CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance	2016	64824/1-64824/23	病原菌による穀物の生産への被害は世界的に大きい。病原菌に対して耐性な穀物の品種の使用は世界の増加する人口の食料需要に合致した持続可能な方法になりうる。私たちは病気耐性に関連した特異的な遺伝子を修飾することによってトマトにおいてゲノム編集を行い持続できる病気耐性な性質を獲得した。最近、アラビドプシスにおいてDMR6 (downy mildew resistance 6) と呼ばれる1つの遺伝子の不活性化によっていくつかの病原菌に耐性を与えることが示された。この遺伝子は病原菌の感染中は特異的に発現が上昇して、dmr6遺伝子における変異はサリチル酸濃度の上昇が起きた。トマトのSIDMR6-1オルソログであるSolyC O 3 g O 8 O 1 9 OもPseudomonas syringae pv. tomatoとPhytophthora capsiciの感染中に発現が上昇する。私たちはCRISPR/Cas9システムを使ってトマトにおいてSIDMR6-1遺伝子に小さな欠失を作り、フレームシフトを起こして未成熟な先の欠けたタンパク質を作るようにした。これらの変異は温室の条件下では成長や発生について大きな有害な効果はなく、P. syringae、P. capsici、Xanthomonas spp.を含む異なる病原菌に対して耐性を示した。	[Thomazella DPT et al.] Univ. California Berkeley 米国
23	植物	コメ	CRISPR/Cas9	CSA	Faming Zhuanli Shengqing	Application of rice CSA gene and method for site-directed knocking out by CRISPR/Cas9 system.	2016	CN 105671075 A 20160615	コメの雄性不稔遺伝子CSAのタンパク質の配列とヌクレオチド配列を開示する。CRISPR/Cas9システムに基づいてCSA遺伝子をノックアウトする、変える、または抑制することによって通常のコメの品種におけるCSA遺伝子の発現量が減少して、コメの雄性不稔系統を得る。部位特異的ノックアウトの方法は、CH-CRISPR/Cas9システムに基づいたCC-CSA-1ベクターとGateway-CRISPR/Cas9システムに基づいたGC-CSA-1ベクターによる雄性不稔遺伝子CSAの遺伝子編集を含む。本発明は、コメの雄性不稔遺伝子CSAに基づいた雄性不稔系列の生産資源とコメの二系統の交配による種子の生産のために効率の良いノックアウトの方法と育種の様式を提供する。	[Zhang D et al.] Shanghai Jiao Tong Univ. 中国
24	植物	ブドウ、リンゴ	CRISPR/Cas9	MLO-7, DIPM-1, 2, 4	Front. Plant Sci.	DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins.	2016	7, 1904.	全ゲノムシーケンスとゲノム編集を組み合わせて利用することによって、初めて得られる表現型を獲得するため、新しい機能を導入するために、以前にはできなかった制御と正確さで標的とした部位での遺伝子の変化を導入することが可能となり果物のバイオテクノロジー分野に革命が起きた。プラスミドによってゲノム編集の成分を導入するとともに効率が良く宿主のゲノムにプラスミドの配列がランダムに取り込まれてしまう可能性があるなど、いくつかの欠点もある。さらには、現在のプロセスベースのGMOの規制に阻まれて、改良した品種の商品化が難しくなるかもしれない。私たちは、効率の良い標的部位への変異誘導のために、ブドウの栽培品種シャルドネとリンゴの栽培品種Golden delicious fruitの穀物植物のプロトプラストへ精製したCRISPR/Cas9リボヌクレオプロテイン (RPNs) を直接導入することを試みた。ブドウの栽培品種においてうどん粉病への耐性を強化させるために、影響を受けやすい遺伝子である、MLO-7を標的とした。リンゴにおいては火傷病への耐性を強化させるためにDIPM-1、DIPM-2、DIPM-4を標的にした。さらに、各々のブドウとリンゴの栽培品種に対して、効率の良いプロトプラストの形質転換、Cas9とsgRNAのモル比を最適化した。標的部位のディーブシーケンシングを使って、標的部位の挿入と欠失の割合を解析した。CRISPR/Cas9 RPNsをプロトプラスト系へ直接導入することで遺伝子編集は可能であり、DNAを使わないゲノム編集でブドウとリンゴの植物を作ることへ可能性を開いたことを私たちの結果は証明する。	[Malony M] Research and Innovation Centre, Genomics and Biology of Fruit Crop Department, Fondazione Edmund Mach Trento イタリア、韓国
25	植物	コメ	CRISPR/Cas9	qSH1	Faming Zhuanli Shengqing	Molecular improvement method for reducing shattering performance of rice seed.	2016	CN 106191107 A 20161207.	本発明は、CRISPR/Cas9システムを使ってコメの種子が砕け散ることに関連した遺伝子qSH1のターゲティングによる修飾によってコメが砕け散る性質を低下させるための分子遺伝学的な方法を提供する。本方法は、qSH1またはLOC_Os01g62920またはOs01g0848400のコード領域と5'末端の開始コドンの付近に適切な標的を選ぶこと、標的配列を含むベクター-pYLgRNA-U3とpYLgRNA-U6aを構築すること、ベクター-pYLgRNA-U3とpYLgRNA-U6aと標的配列を含む組換えベクター-pCRISPR/Cas9を構築すること、コメに組換えベクター-pCRISPR/Cas9を導入すること、トランスジェニック陽性植物を得ること、トランスジェニック陽性植物とともに標的部位で変異を持つ植物を得ること、変異体の植物を数世代栽培することによって遺伝子組換え実験の成分を含まないホモ接合性の変異体植物を得ること、砕け散る性質が大きく低下した植物を得るためにホモ接合性の変異体の植物の砕け散る性質の試験を行うことを含む。この方法は高い指向性があり、遺伝的背景の変化はほとんどなく遺伝子組換えのリスクを避けることができ、遺伝子組換え実験の成分を含まず、砕け散る性質が大きく低下した新しいコメの品種と新しい組み合わせを得ることができる。	[Sheng X et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国
26	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsERF922	PLoS One	Enhanced rice blast resistance by CRISPR/cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922.	2016	11(4), e0154027/1-e0154027/18.	コメのイモチ病は世界的にコメに影響を与えるもっとも破壊的な病気である。宿主の耐性の獲得はそれを制御するためのもっとも経済的で効率の良い方法であることが証明されている。私たちは、コメのOsERF922遺伝子を標的にするCRISPR/Cas9配列特異的ヌクレアーゼ (C-ERF922) を利用することでコメのイモチ病への耐性を改善したことを報告する。50個のトランスジェニック植物から21個のC-ERF922によって誘導される変異植物 (42.0%) が同定された。サンガーシーケンシングによってこれらの植物は標的部位に様々な挿入と欠失の変異を持っていることが明らかになった。C-ERF922によって誘導される対立遺伝子の変異のすべてが次世代に伝達されることを私たちは示した。望ましい遺伝子修飾を持っているが、導入されたDNAを含まない変異植物がT1とT2世代の分離によって得られた。6個のT2ホモ接合性の変異系統はイモチ病に対する耐性の表現型と様々な農学的な性質についてさらに調べた。病原菌の感染後に形成されるイモチ病の損傷の数は野生型の植物と比較して苗と分けつの両方の段階で大きく減少した。さらには、6個のT2変異体系統と野生型の植物の間には調べた農学的な性質について大きな違いはなかった。2、3個の部位に変異を持つ植物を得るために、Cas9/Multi-target-sgRNAs (C-ERF922S1S2およびC-ERF922S1S2S3) を使うことによってOsERF922の中に複数の部位を標的にした。CRISPR/Cas9による遺伝子修飾はコメにおけるイモチ病への耐性を強化するための有用な方法であることを私たちの結果は示している。	[Wang F et al] College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Agriculture Sciences (CAAS), Beijing 中国
27	植物	コメ	TALEN	OSALS	J. Genet. Genomics.	TALEN-Mediated Homologous Recombination Produces Site-Directed DNA Base Change and Herbicide-Resistant Rice.	2016	43(5), 297-305.	DNA二本鎖切断に対する相同組換え (HR) による修復を通じた部位特異的な置換または本物のゲノム編集は課題である。コメにおけるTALENに基づいたHRIによる遺伝子置換として、TALENと希望する変異を含むドナーDNAを使って、私たちはコメのacetolactate synthase遺伝子 (OsALS) へ2つの点突然変異を作り、除草剤に耐性なコメの系統を作った。3回の実験でTALEN遺伝子を含むDNAとドナーDNAをコメのカルスへ導入した後に、1.4 - 6.3%の効率でT0世代においてOsALSの異なる遺伝子型を持つ9個の植物を得た。HRIによって媒介される遺伝子編集はT1世代の子孫へ遺伝する。編集されたT1植物は強い除草剤への耐性を示し、対照の植物と同じくらい形態学的に正常だった。この結果は、コメにおいてTALENによって媒介されるゲノム編集の実現可能性を証明し、他のヌクレアーゼに基づいたゲノム編集に有用な情報を提供する。	[Li T et al.] Department of Genetics, Development and Cell Biology, Iowa State University, Ames 米国

表 4 つづき

28	植物	ジャガイモ	TALEN, CRISPR/Cas9	ALS1	Front. Plant. Sci.	Geminivirus-Mediated Genome Editing in Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Using Sequence-Specific Nucleases.	2016	7, 1045	相同組換え (HR) による遺伝子ターゲティングは理解しにくい、DNA修復のための強力な方法かもしれない。遺伝子ターゲティングに関連した障壁を克服するために、ジャガイモのacetolactate synthase 1 (ALS1) 遺伝子を標的とする配列特異的なヌクレアーゼ (SSNs) と ALS1 遺伝子座の中に除草剤を阻害するための点突然変異を導入するために設計された修復の鋳型を導入するためにジミニウイルスのレプリコン (GVR) を使った。GVRs を使って得られた形質転換体の植物は、除草剤への感受性が弱くなる表現型を支えることのできる点突然変異を持っていた。一方で、古典的なT-DNAを使って形質転換した植物は検出可能な変異を持っておらず、野生型と同じだった。形質転換した植物の再生は、除草剤への感受性をより大きく低下させた表現型を支える点突然変異の検出を改善した。これらの結果は、植物ゲノム編集のための試薬を導入するためのジミニウイルスの使用の有効性を証明し、栄養繁殖する種における遺伝子ターゲティングのための新しい方法を示した。	[Butler NM et al.] Department of Plant, Soils and Microbial Sciences, Michigan State Univ., East Lansing 米国
29	植物	ダイズ	TALEN	FAD2-1A, FAD2-1B, FAD3A	BMC Plant Biol.	Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil.	2016	16(1), 225.	ダイズ油の中の個々の脂肪酸の量を調節できれば、保存可能期間と炒めるときの安定性を増加させて、栄養的特徴を改善できる可能性がある。ダイズ油は高濃度の多価不飽和リノール酸とリノレン酸を含んでいて、それが酸化的な不安定につながる。この問題は部分的な水素化によって取り組まれてきた。しかし、部分的な水素化はトランス脂肪酸の量を増加させてしまい、それが心臓血管の病気に関連していた。以前に私たちは脂肪酸デサチュラーゼ2-1A (FAD2-1A) と FAD2-1B 遺伝子にノックアウト変異を持つダイズ系統を作成した。そのダイズ系統では一価不飽和オレイン酸 (18:1) の量が上昇してリノール酸 (18:2) とリノレン酸 (18:3) の量が減少した油が得られた。本研究では、リノレン酸の量をさらに低下させるために、FAD2-1A と FAD2-1B の中の変異に脂肪酸デサチュラーゼ3A (FAD3A) の変異を積み重ねた。fad2-1a fad2-1b fad3a ダイズ植物へTALENを直接導入することによってFAD3Aの中に変異を導入した。fad2-1a fad2-1b fad3a ダイズの油はfad2-1a fad2-1b ダイズと比較すると、リノレン酸の濃度が有意に低かった (4.7%に対して2.5%)。さらに、油はリノール酸の量が有意に低く (5.1%に対して2.7%)、オレイン酸の量は有意に高かった (77.5%に対して82.5%)。外来遺伝子を含まないfad2-1a fad2-1b fad3a ダイズ系統が同定された。本方法はダイズにおいて性質を積み重ねるために配列に特異的なヌクレアーゼを使うための効率的な方法を提供する。得られた生産品は80%以上のオレイン酸と3%以下のリノール酸とリノレン酸から構成される。	[Demorest ZL et al.] Calyxt, Inc., New Brighton 米国
30	植物	コメ	CRISPR/Cas9	QTL遺伝子群	J. Integr. Plant Biol.	QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties.	2016	Sep 15, doi:10.1111/jipb.12501. [Epub ahead of print]	粒子の収量は穀物において遺伝的改良をするためのもっとも重要で複雑な性質である。それは量の性質の遺伝子座 (quantitative trait loci, QTLs) として知られる多くの遺伝子によって制御されていることが知られている。過去10年で穀物において収量に貢献している多くのQTLsが同定された。しかし、これらのQTLsは異なる遺伝的背景において同じ収量をもたらすかは不明である。本研究では私たちは5つの広く栽培されているコメの品種においてCRISPR/Cas9によってQTLを編集した。そして、同じQTLが異なる遺伝的背景において粒子の収量に対して多用途、ときには逆の効果を与えることを示した。	[Shen L et al.] Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 中国
31	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsEPSPS	Nat. Plants.	Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9.	2016	Sep 12, doi:10.1038/nplants.2016.139.	植物のゲノムの特定の遺伝子座において、遺伝子の断片を置換することと遺伝子の挿入を行なうことはとても難しい。本研究ではNHX経路とCRISPR/Cas9システムを使って変異を作る効率の良いイントロンによって媒介される部位特異的な遺伝子の置換と挿入の方法を報告する。近接するイントロンを標的とする一対のsgRNAと、そのsgRNAの標的部位を含むドナーのDNAの鋳型を使って、コメの内在性遺伝子5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 遺伝子において2%の頻度で遺伝子置換を達成した。1つのイントロンを標的とした1つのsgRNAとそのsgRNAの標的部位を含むドナーのDNAの鋳型を使って2.2%の頻度でターゲティングによる遺伝子の挿入も行った。意図した置換を持つOsEPSPS遺伝子を含むコメの植物はグリホサートに耐性だった。さらに、部位特異的な遺伝子の置換と挿入は正確に次世代へ伝達された。これらの新しく開発された方法は、コメと他の植物においてターゲティングによる遺伝子の断片の置換と外来DNA配列を挿入するために一般的に使える。	[Jun L et al.] State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 中国
32	植物	マッシュルーム	CRISPR/Cas9	polyphenol oxidase	Nature	Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation.	2016	532 (7599) 293	マッシュルームの6つあるpolyphenol oxidase遺伝子の1つに数塩基の欠失を起こさせた。酵素活性が30%減少した。マッシュルームが茶色くなるのが遅くなり、保存可能期間が長くなる。CRISPR/Cas9を利用したケースで米国の規制から外れる結論になった最初の例。米国はGMOを規制するための規則を改革している。	[Waltz E] Freelance writer based in New York 米国
33	植物	ダンカングレープフルーツ	CRISPR/Cas9	T1CsLOBP遺伝子のプロモーター	Plant Biotechnol. J.	Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccApthA4:dCsLOB1.3 infection.	2016	14, 1291-1301	Xanthomonas citri 亜種 citri (Xcc) が引き起こすかんきつ類潰瘍病は大部分の商業的なかんきつ類の栽培品種に対して深刻な病気であり、世界的に大きな経済的な被害をもたらしている。潰瘍病に耐性なかんきつ類の品種を作ることは、かんきつ類潰瘍病の効率的で持続的な解決策を提供するだろう。本研究では、CsLOB1 (Citrus sinensis Lateral Organ Boundaries) 遺伝子のCsLOB1プロモーター (EBE _{PthA4} -CsLOBP) の中のPthA4エフェクター結合成分 (EBEs) を修飾することによって潰瘍病に耐性なグレープフルーツを作ることにおける進歩を報告する。CsLOB1はかんきつ類潰瘍病によって影響を受けやすい遺伝子であり、病原因子PthA4によって誘導される。PthA4はCsLOB1遺伝子の発現を誘導するためにEBE _{PthA4} -CsLOBPへ結合する。ダンカングレープフルーツにはCsLOB1の中に2つの対立遺伝子タイプI、IIがある。本研究では、ダンカングレープフルーツの上胚軸の形質転換によってタイプI CsLOB1プロモーター (T1 CsLOBP) のPthA4EBEsを破壊するためにバイナリーベクターを設計した。EBE _{PthA4} -T1 CsLOBPの標的部位に修飾を持つ4つのトランスジェニックダンカン植物が作られた。タイプI CsLOB1プロモーターについては、変異の率は15.63% (#D13)、14.29% (#D17)、54.54% (#D18) と81.25% (#D22) だった。野生型のXccの存在下ではトランスジェニックダンカングレープフルーツは野生型と同じように潰瘍病の症状が現れた。人工的に設計したgTALE dCsLOB1.3は特異的にタイプI CsLOBPを認識して、変異型のタイプI CsLOBPまたはタイプII CsLOBPを認識しない。これをダンカンの形質転換体に感染させるために開発した。結果はXccApthA4:dCsLOB1.3の存在下で#D18は弱い潰瘍病の症状を示し、#D22は目に見える潰瘍病の症状はなかった。PthA4による影響を受けやすい遺伝子CsLOB1の1つの対立遺伝子の活性化はかんきつ類潰瘍病の誘導に十分であり、かんきつ類潰瘍病に耐性な植物を作るためにはCsLOB1の両方の対立遺伝子のプロモーターの変異がたぶん必要であることを私たちのデータは示唆する。本研究は、将来Cas9/sgRNAによって潰瘍病に耐性なかんきつ類の品種を作るための基礎となるだろう。	[Jia H et al.] Citrus Research and Education Center, Department of Microbiology and Cell Science, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), University of Florida, Lake Alfred 米国

表 5

文献ID	特記事項	植物、動物	生物種	標的遺伝子	indelのパターン	標的部位 (エクソン?)	フレームシフトしたペプチドの性質について論文での記載	フレームシフト後の配列の性質	電気泳動などの解析	オミックスなどの解析
1	点突然変異、該当せず							フレームシフトは起きない		
2	論文中で遺伝子修飾していない、割愛									
3	中国特許 割愛									
4		動物	ブタ	ミオスタチン	-10, -3.4 kb, -3.6 kb, -7 kb, +2, +5	第2, 3エクソン、イントロン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
5	中国語雑誌 割愛	動物								
6		動物	ブタ	ミオスタチン	配列情報なし					
7	国際特許 割愛									
8		動物	ブタ	不明						
9	中国特許 割愛									
10	中国特許 割愛									
11	中国特許 割愛									
12	中国特許 割愛									
13		動物	ブタ	ミオスタチン	-6, -17, +1	第1エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
14		動物	ウシ	PRNP	大小のindelあり、EGFPを挿入	第3エクソン	なし	EGFPはアレルゲンとホモロジーなし。ウシPRNPは小麦グルテニン、ウシコラーゲンα-2(I)鎖前駆体と元々ホモロジーあり。PRNPの第1, 2エクソンは発現する?もし、発現して、アップレギュレーションされれば、問題あり。		
15	プロモーターの修飾 割愛							タンパク質の配列に変化なし	なし	なし
16		動物	ニワトリ	オボムコイド	-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, -12, -19, -21, -22, -31		なし	データベースの配列と一致しない。解析できない。	なし	なし
17	細胞の実験 割愛									
18		動物	ヤギ	β-ラクトグロブリン	ヒトα-lactalbuminを挿入		なし	ヤギβ-ラクトグロブリン、ヒトα-lactalbuminはウシの物とホモロジーがある。ウシの物はアレルゲンである。β-ラクトグロブリンについてはアレルゲンとして論文で言及があって問題視している。β-ラクトグロブリン遺伝子の5'末端は残らない。β-ラクトグロブリン遺伝子のエクソン2-7は残るが、発現しないことを確認している?もし、発現すれば、問題かも。	なし	なし
19	中国特許 割愛									
20		動物	ヤギ	β-ラクトグロブリン	BLG ^{neo} : -20, neo遺伝子を挿入		なし	β-lactamase (neo) はアレルゲンとホモロジーなし。	なし	なし
					BLG ^{neo} : 開始コドンを含む80bpを puroと置換			β-ラクトグロブリンの5'末端の配列は残らない。Puromycin resistance protein はアレルゲンとホモロジーなし。	なし	なし
21		動物	ヤギ	ミオスタチン	-3, -13	第1エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
22	中国語雑誌 割愛									
23		動物	ヤギ	ミオスタチン	-1, -3, +1	第3エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
24		動物	ヒツジ	ミオスタチン	-95, -113	第3エクソン	なし	データベースの配列と一致しない。解析できない。	なし	なし
25		動物	ヒツジ	ミオスタチン	-2, -3, -6, -7, +3	第2エクソン	なし	データベースの配列と一致しない。解析できない。	なし	なし
26		動物	ヒツジ	ミオスタチン	-3, -4	第1エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
27	中国特許 割愛									
28	中国特許 割愛									

フレームシフトを起こしたペプチドを生産する動物の調査
文献IDは、NBTを利用して作成された遺伝子組換え動物 (2016年、食用) の表の文献IDに対応する。

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）
平成 29 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

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取集法に関する検討

研究分担者 中村公亮（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部第二室）

研究要旨

本研究では、以下の3つの研究課題に関して研究を行った。1. LAMP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。

協力研究者

木俣慎弥（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

1. LAMP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：世界では、安全性未審査の遺伝子組換え（GM）コメの食品への混入が頻繁に報告されている。これまでに、コメを港やスーパーなどの現場で検査する汎用性に優れた方法は開発されずにいた。試料を採取する現場で、GM

コメを検査するには、特殊な機器や試薬を必要とせず、迅速に判定する簡便な方法が求められる。そこで本研究では、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて、スーパーなどで一般に市販されている、精米、無洗米、玄米などを穀粒1粒単位で検査する方法の開発を行った。

2. 加熱によるダイズ染色体DNAの分解度の違い：GM食品検査は、社会的、経済的な影響が大きいと見られるため、誤判定を避ける必要がある。そのため、

GM 食品の検査には、高い特異性、感度及び精度が求められる。GM 食品由来のタンパク質を検査標的とした場合、加工されていない生鮮であれば、感度並びに精度よく検査は可能であるが、タンパク質は熱、加圧、pH などの物理的な影響を受け、分解又は変性しやすい。それ故、検査のための標的分子には向いていない。一方、GM 食品由来の DNA は、食品による加工の影響を比較的受けにくく、高い特異性、感度及び精度を担保した様々な加工食品の検査のための標的分子となり得るとされる。高い精度と感度を有する GM 食品検査法として、リアルタイム PCR を用いた DNA 増幅試験が用いられる。GM 食品検査を行う際には、内在性遺伝子を検知する方法が陽性コントロールとして用いられる。陽性コントロールの標的遺伝子には、組換えで挿入された有用遺伝子の最低コピー数を想定し、ゲノム中に 1 コピーのみ存在する GM 作物に特異的な内在性遺伝子の配列を標的とすることが理想とされる。本研究では、GM 食品検査用の内在性遺伝子検知法を作成する上で、ゲノム中に 1 コピーであること、リアルタイム PCR 標的配列が特異的であることを、バイオインフォマティクスを取り入れた手法の確認を行った。また、ゲノム DNA の分解速度について、作物種子中のゲノムの状態と、ゲノム精製を行った後との違いについて、解析を行ったので報告する。

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：発芽ダイズは発芽前を上回る栄養価が注目されており、菓子や健康食品などの加工食品に多く利用されている。しかし、これまで、ダイズ品種別に発芽前後の代謝産物の変化や遺伝子発現に関する網羅的研究が行われた報告はない。そこで、本研究テーマでは、発芽 GM ダイズのトランスクリプトーム解析、並びに、プロテオーム解析する方法の開発を行い、転写並びに翻訳レベルで発芽ダイズ品種別に、非 GM と GM ダイズ間の成分の相違を分析し、考察することとした。

B. 研究方法

1. LAMP 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：

試料

あきたこまち、ひとめぼれ、こしひかり、ゆめぴりか、つや姫の精米は、アイリスオーヤマの通信販売サイトを介して購入した。無洗米のこしひかりは、東京都内のスーパーで購入した。もち米は、山形・高島/東京農大 有機農業ネットワークで栽培されたものを使用した。LAMP 法の特異性

試験には、24 種類の作物から抽出されたゲノム DNA 溶液 (10 ng/μL) を使用した。

試薬

ゲノム DNA の抽出には、HotSHOT 試薬 Sol. A (25 mM NaOH + 0.2 mM EDTA) と Sol. B (40 mM Tris-HCl, pH 5) を使用した。コメの陽性コントロールには、ニッポンジーン社 より GM Rice Detection (IR) Rice Positive control plasmid (250 K copies/2.5 μL) を供した。LAMP 法の反応試薬は、栄研化学製の Loopamp DNA 増幅試薬キット (Reaction mixture, RM; *Bst* DNA polymerase; 蒸留水, DW を含む) と蛍光目視検出試薬 (Fluorescent detection reagent, FD) を使用した。LAMP 法で用いたプライマーは、PrimerExplorer V5 (<http://primerexplorer.jp/>) で設計し、その合成はユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。

機器

LAMP 法による核酸増幅には、カネカ製の温調機能付き吸光度計 MyAbscope® を使用した。核酸増幅の観察は、付属のタブレット端末 (Nexus) にインストールされた専用アプリケーションを介して行い、生データも同端末に保存した。LAMP 法で用いる試料の加熱には、タイテック製 Dry Thermo Unit DTU-1B (ヒートブロックインキュベーター) を使用した。

コメ一粒からのゲノム DNA 抽出

コメ一粒を 1.5 mL 容エッペンチューブに入れ、500 μL の超純水で 3 回洗浄した。コメについた水気をペーパータオルで拭き取り、それを新しい 1.5 mL 容エッペンチューブに移した。そこに HotSHOT 試薬 Sol. A を 100 μL 添加し、98°C のブロックインキュベーター内で 10 分間加熱した。その後、チューブを水中に移し試料を冷却させた。次いで、HotSHOT 試薬 Sol. B を 100 μL 添加し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した。試料を 20,000 xg, 4°C の条件で 5 分間遠心し、透明な上清 50 μL をゲノム DNA 溶液として回収した。その溶液は LAMP 反応に使用するまで、4°C チャンバーに保管した。

コメ内在性遺伝子 *phospholipase D (PLD)* を標的とした LAMP 反応 (分光的検出)

PLD 遺伝子を増幅する LAMP プライマーには、以下のものを使用した。

F3: 5'-GACCTCCTCCTAGACCTCAA-3'

B3: 5'-TGACAAGGCCTGATCTTG-3'

FIP:

5'-AACACTCCAGGCCTCACCGTGGCCGACCTCATTATTCCG-3'

BIP:
5'-GTTCCGGTCCATCGATGGCTGCAGCCTCTGG
AGTGCTA-3'
LF: 5'-GGAACATCACCGGAGACGG-3'
LB: 5'-GCGGCCTGCTTTGGCTT-3'

まず、12.5 μL の 2 x RM (40 mM Tris, pH 8.8; 20 mM KCl; 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 16 mM MgSO_4 ; 0.2% Tween 20; 1.6 M betaine; 2.8 mM each dNTPs を含む)、0.1 μL の 50 μM F3 (0.2 μM)、0.1 μL の 50 μM F3 (0.2 μM)、0.8 μL の 50 μM FIP (1.6 μM)、0.8 μL の 50 μM BIP (1.6 μM)、0.4 μL の 50 μM LF (0.8 μM)、0.4 μL の 50 μM LB (0.8 μM)、1 μL の FD、1 μL の *Bst* DNA polymerase と 2.9 μL の DW を混合した。この反応液 20 μL を予め 8 連 PCR チューブに分注した 5 μL の各作物由来ゲノム DNA 溶液 (50 ng)、または、4. で抽出したゲノム DNA (濃度未知) とよく混合し、25 μL の反応液系を調製した。特異性試験においては、高純度に精製された各ゲノム DNA (10 ng/ μL) を用い、ポジティブコントロールとしてコメ由来 (日本晴) の DNA、ネガティブコントロールとして超純水 (NTC) を同時に解析した。

次に、MyAbscope® の測定プログラムを設定した。この設定は付属のタブレット端末を介して行った。測定波長は「B」、Delay は 180 sec に設定した。そして、Step1 (核酸増幅) の HeatLid を 80°C、Well を 63°C、Set time を 60 min、Step2 (酵素失活) の HeatLid を 80°C、Well を 80°C、Set time を 5 min に設定した。超純水を 25 μL ずつ分注した 8 連チューブを用いて補正を行い、チューブを取り出した後、加熱前処理を行った。こうして、測定機械のコンディションが整った後、測定用の 8 連チューブをセットし、Run をタップして測定を開始した。測定終了後、タブレット端末に保存されたデータファイル (エクセル) を別のパソコンに移行させ、測定時間を横軸、吸光度を縦軸としたグラフを作成した。

目的遺伝子の検出可否の判定は、遺伝子の増幅に対応する吸光度の明確な上昇を基とした。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い:

試料、試薬および機器

(1) 試料

試験には、農業生物資源ジーンバンク NARO より入手したダイズ品種 Williams82、Jack と Emerge、北海道立衛生研究所より入手した珠美人品種を供した。

(2) 試薬

ゲノム DNA の抽出・精製には、QIAGEN 製のイオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tip

100/G) と Genomic DNA Buffer Set を用いた。その試料前処理には、ニッポンジーン社製 α -amylase (Cat. No. 316-04751)、和光純正工業社製 Proteinase K (Cat. No. 160-22752)、ニッポンジーン社製 100 mg/mL RNase A (Cat. No. 318-06391)、シグマアルドリッチジャパン社製 Cellulase (Cat. No. C2730) を用いた。イソプロパノールとエタノールは、和光純正工業社製の特級グレードを使用した。定性 PCR 反応には、東洋紡社製の 2x KOD FX buffer、KOD FX (Cat. No. KFX-201) とタカラバイオ製の dNTP Mixture を使用した。PCR 用のプライマーは、ユーロフィンジェノミクス社に合成を依頼した。DNA の電気泳動に使用したアガロースは、タカラバイオ社製 LO3「TAKARA」(Cat. No. 5003) を用い、DNA の染色には、Biotium 社製 GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Cat. No. 41003) を用いた。Loading buffer は、タカラバイオ社製 (Cat. No. A6310A) を用いた。標準 DNA サイズマーカーは、タカラバイオ社製 100 bp ラダー (Cat. No. 3407A) と Invitrogen 社製 1 kbp ラダー (Cat. No. 15615-016) を用いた。PCR 産物の精製には、プロメガ社製 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9282) を用いた。プラスミド DNA の抽出・精製には、プロメガ社製 Wizard® SV Midipreps Purification System を使用した。プラスミド DNA の宿主には、東洋紡製 *E. coli* competent cell DH5 α を用いた。組換えプラスミドの作製には、クロンテック製 In-Fusion HD Cloning kit を使用した。そのプラスミドには、プロメガ社製 pGEM®-T Easy Vector を用いた。ベクターの一本鎖化には、New England BioLabs 社製の制限酵素 *EcoRI*-HF と *EcoRI* NEBuffer (x10) を使用した。リアルタイム PCR の反応溶液には、Roche 社製の FastStart universal probe master (ROX) を使用した。超純水は、ミリポア製 Milli-Q Integral 3 から採水した。

(3) 機器

粉碎機は、イワタニ社製ミルサー720G-Y を使用した。試料の加熱には、イワタニ社製カセットフーとガスボンベ、シュウ酸アルマイト鍋を用いた。または、タイテック社製 Dry Thermo Unit DTU-1B (ヒートブロックインキュベーター) もしくは Bio-Rad 社製サーマルサイクラー iCycler を使用した。定性 PCR の際のサーマルサイクラーは、Applied Biosystems 社製 Applied Biosystems Veriti®96-Well を使用した。リアルタイム PCR には、Applied Biosystems 社製 7900HT Fast Real Time PCR System を使用した。

1. 標的遺伝子配列の選定

National Center for Biotechnology Information

(NCBI) に登録されるダイズ (*Glycine max*) のゲノムデータベースより、全 20 本の染色体 DNA の配列を取得した。各番号の染色体からランダムに 1 遺伝子ずつ標的として選択した。標的の選択条件は、その遺伝子がダイズゲノム中に 1 コピーのみ存在することとし、これは NCBI の BLAST 検索を用いて推定した。標的遺伝子を検知するプライマープローブの特異性検索には、NCBI の Primer-BLAST を使用した。本研究では、いくつかの候補の内、1 番染色体上の microtubule-associated protein SPIRAL2-like 遺伝子、2 番染色体上の lectin 遺伝子、3 番染色体上の delta-Delta-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial-like 遺伝子と、8 番染色体上の HMGI/Y like protein 遺伝子の合計 4 遺伝子を標的とし、以下ではそれぞれの遺伝子を ch1, ch2, ch3, ch8 と呼称する。

3. 標的遺伝子を含むコントロールプラスミドベクターの作製

ch1, ch2, ch3 と ch8 遺伝子の各標的増幅領域は、In-Fusion 反応 (Clontech 社) を利用して pGEM[®]-T Easy Vector (Promega 社) に導入した。In-Fusion 反応に要求される各 DNA 断片を増幅するために、融合箇所である末端 15 塩基には互いに相同配列を付加するよう以下の通りプライマーを設計した。

Insert ch1-F:

5'-GCGGCCGCGGGAATTTCTCAAAGTTATCAG TGGGAGGA-3'

Insert ch1-R:

5'-CATCGGAGAGAGCAGCCATTAGAAACAATGAG-3'

Insert ch2-F:

5'-AATGGCTGCTCTCTCCGATGTGGTCGATTT-3'

Insert ch2-R:

5'-ATTCCGCGCGGCAAATTGGAAGCAAAAGA-3'

Insert ch3-F:

5'-CCAATTTGCCGCGGCGGAATTGATATAGTG-3'

Insert ch3-R:

5'-CATGGAGGAGTGCCGAACCCTACAATAAGC-3'

Insert ch8-F:

5'-GGGTTCGGCACTCCTCCATGGACCCAACT-3'

Insert ch8-R:

5'-AGGCGGCCGCGAATTTGCTCGAACCATCTT TCTCC-3'

まず、ベクターに組み込む目的の DNA 断片は、上記プライマーを用い PCR で増幅した。12.5 μ L の 2 x KOD FX PCR buffer (東洋紡)、0.75 μ L の

50 μ M primer-F、0.75 μ L の 50 μ M primer-R、5 μ L の 2.5 mM dNTP mix、0.5 μ L の KOD FX、2.5 μ L の 10 ng/ μ L ダイズゲノム DNA と 3 μ L の滅菌水を混合した試薬を反応液として、次の条件で PCR を行った。95°C, 2 分のプレヒーティング後、[98°C, 10 秒; 60°C, 30 秒; 72°C, 30 秒]の反応を 30 サイクル繰り返した。その後、72°C で 7 分インキュベートした。増幅された各 DNA 断片は、1% アガロースゲル内で分離し、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲルから精製した。次に、これら 4 遺伝子を導入するベクターを制限酵素を用いて一本鎖にした。500 ng の pGEM[®]-T Easy Vector、1 x NEBuffer (for EcoRI)、EcoRI-HF を含む 50 μ L 溶液を 37°C で 1 時間インキュベートし、反応液を電気泳動後、目的の一本鎖ベクターを上記と同様の手法でゲルから精製した。以上、調製した 4 つの DNA 断片とベクターを次の条件で融合させた。増幅 DNA 断片 (各 5 ng)、2 μ L の In-Fusion HD Enzyme Premix (5x) と滅菌水を混合し、合計 10 μ L に調製した。この反応液を 50°C で 15 分間インキュベートし、氷冷した。この組換えベクターは、*E. coli* competent cell DH5 α (東洋紡) に導入し、多量の組換えプラスミドベクターは、その培養菌体から Wizard[®] SV Midipreps Purification System (Promega) を用いて抽出精製した。ベクター内に挿入された目的 DNA の塩基配列の正確性は、サンガー法を用いたシーケンシングにより確認した。

4. リアルタイム PCR 用のプライマー対プローブの設計

各標的遺伝子 ch1, ch2, ch3 と ch8 とコントロール遺伝子 AquAdvantage (AquAd, 遺伝子組換えサケ) をリアルタイム PCR で増幅し、検出するためのプライマー対と Taq-Man プローブは、Primer Express ver.3.0.1 を用いて設計した。設計したオリゴヌクレオチド配列は、株式会社ユーロフィンに合成を依頼した。以下に設計した配列を示す。

Ch1 遺伝子

Ch1-forward:

5'-GGGAGGATTAGAGACAGAAGAACAC-3'

Ch1-reverse:

5'-CATGCAGGATGTTGGTTATGAA-3'

Ch1-probe:

5'-[FAM]CCTGCTTGTTCATCCATGGGCACA-[TAMRA]-3'

Ch2 遺伝子

Ch2-forward: 5'-TCCCGAGTGGGTGAGGATAG-3'

Ch2-reverse: 5'-TCATGCGATTCCCCAGGTAT-3'

Ch2-probe:

5'-[FAM]TTCTCTGCTGCCACGGGACTCGA[TAMRA]-3'

Ch3 遺伝子

Ch3-forward:

5'-TCGGTGAAGGAAGTGGATTTG-3'

Ch3-reverse:

5'-ACAATAAGCGGCAACCTCTGA-3'

Ch3-probe:

5'-[FAM]CTTGCCGCTGACCTTGGCACTC[TAMRA]-3'

Ch8 遺伝子

Ch8-forward:

5'-CTTCACTGTGCAACCCAGCAA-3'

Ch8-reverse: 5'-ATCGTAAGGAGGGTGGTTGGT-3'

Ch8-probe:

5'-[FAM]CACGTGACCCCGCCGACA[TAMRA]-3'

AquAd 遺伝子

AquAd-F: 5'-TGCTGATGCCTCTGATACCAC-3'

AquAd-R:

5'-ATGCCTCTAGTGCAAGTTCAGTC-3'

AquAd-P:

5'-[FAM]CAGTAGTACAACGTTGGCAGATGTATGAGAACT[BHQ]-3'

合成した各プライマーとプローブは、それぞれ蒸留水で 50 μ M と 10 μ M に調製した。

5. 標的遺伝子の PCR 増幅効率

ch1, ch2, ch3 と ch8 遺伝子の増幅効率は、様々な DNA 鋳型濃度存在下で目的遺伝子を増加させ、そのリアルタイム PCR のデータ (Ct 値) を基に算出した。方法 4 で作成したコントロールプラスミド (3572 bp) を鋳型 DNA として用い、 $10^3 \sim 10^7$ コピー/ 5μ L の 10 倍希釈系列の範囲で検討した。12.5 μ L Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4 μ L 各 primer-forward (50 μ M)、0.4 μ L 各 primer-reverse (50 μ M)、0.25 μ L probe (10 μ M)、6.45 μ L の蒸留水、5 μ L の各コピー数を含む鋳型 DNA が混合された 25 μ L の反応液を 96 ウェルプレートに分注した。これを 7900HT real time PCR system (Applied Biosystems) 内で 50°C, 2分、95°C, 10分でインキュベートした後、[95°C, 15秒; 60°C, 1分] の反応を 50 サイクル繰り返し目的遺伝子を増幅させた。得られた各増幅曲線の Ct 値は、SDS システムソフトウェア (Applied Biosystems) を用い、threshold を 0.2 に設定し定義した。次に、Microsoft 社のエクセルを用いて、鋳型 DNA 濃度を横軸 (x 軸)、Ct 値を縦軸 (y 軸) とした一次関数直線 $y=ax+b$ ($R^2 > 0.99$) を作成した。各遺伝子の PCR 増幅効率 E は、直線の傾き値 slope (a) を式: $[E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ に代入して見積もった。

6. ダイズゲノム DNA の抽出精製

ダイズ Williams82 品種の乾燥種子 6 g を超純水

で 2 回洗浄し、ペーパータオルで水気をふき取った。その種子を粉砕機ミルサー (Iwatani) を用い 30 秒間破碎した。得られたダイズ粉末 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取り、これを 10 本用意した。このうち 1 本をこのゲノム抽出に用い、残りは後の実験に使用するまで -30°C に保管した。ゲノム DNA の抽出精製には、QIAGEN の Genomic tip 100/G と Genomic tip buffer set を用いた。まず、0.5 g の粉砕物に G2 緩衝液 15 mL, 500 μ L cellulase, 10 μ L RNase A (100 mg/mL)、5 μ L α -amylase (4 units/ μ L) を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。その間、数回チューブを上下し溶液を混ぜた。その後、100 μ L の proteinase K (20 mg/mL) を添加し、攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。この抽出溶液を 10,000 \times g, 4°C で 5 分間遠心分離し、上清 14 mL を回収した。この溶液全量を 10 秒間ボルテックスミキサーで緩やかに攪拌した後、4 mL の QBT 緩衝液で平衡化した Genomic-tip 100/G カラムにロードした。カラムを 6 mL の QC 緩衝液で 3 回洗浄した後、ゲノム DNA は 50°C の QF 緩衝液 2 mL で溶出させた。そこに 2 mL のイソプロパノールを添加し、よく混和させた後、20,000 \times g, 4°C, 15 分間の遠心分離で DNA を沈殿させた。上清を破棄した後、冷却 70% エタノールで沈殿をリンスし、再度 20,000 \times g, 4°C で 10 分間遠心した。上清を破棄した後、数分の間 DNA を風乾し 50-100 μ L の超純水で溶解させた。DNA 溶液の濃度は、Nanodrop ND1000 (Thermo) で測定し、使用するまで -20°C に保管した。

7. ダイズゲノム DNA の加熱処理

上記で抽出したダイズ Williams82 品種由来のゲノム DNA を、超純水で 10 ng/ μ L の濃度に調製した。これを 0.2 mL 容シングル PCR チューブ に 100 μ L ずつ分注し、しっかりとキャップを閉めた。これと同じものを 6 本準備し、それぞれを 50, 70, 80, 90 または 100°C に設定したサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad 製) を用いて、0 (未処理)、2, 4, 6, 8, 10 分間加熱処理した。加熱直後、DNA 溶液を氷中で冷却した。これら試料を軽くボルテックス攪拌し、均質な溶液を次のリアルタイム PCR の鋳型 DNA に用いた。

8. コントロールプラスミド DNA の加熱処理

コントロールプラスミド DNA を超純水で 2×10^4 copy/ μ L となるように調製した。また、疑似ゲノム (ダイズ以外) として、じゃがいも (Atlantic 品種) から抽出したゲノム DNA を 20 ng/ μ L となるように調製した。両溶液を等量混合し、 10^4 copy

プラスミド DNA/μL 10 ng ゲノム DNA 溶液を得た。これを 0.2 mL 容シングル PCR チューブ に 100 μL ずつ分注した。これと同じものを 4 本準備し、それぞれを 100°C に設定したサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad 製) を用いて、0 (未処理)、5、10、20 分間加熱処理した。加熱直後、DNA 溶液を水中で冷却した。これら試料を軽くボルテックス攪拌し、均質な溶液を次のリアルタイム PCR の鋳型 DNA に用いた。

9. ダイズゲノム DNA またはプラスミド DNA の加熱処理による標的遺伝子の分解

加熱による標的遺伝子の DNA 分解は、リアルタイム PCR を用い、得られた Ct 値を基に相対的に評価した。96 ウェルプレートに、加熱ゲノム DNA またはコントロールプラスミド DNA を処理時間ごとに 3 ウェルずつ、4 標的分、5 μL ずつ分注した (1 ウェルあたり 50 ng DNA)。そこに予め調製した 12.5 μL Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4 μL 各 primer-forward (50 μM)、0.4 μL 各 primer-reverse (50 μM)、0.25 μL probe (10 μM) と 6.45 μL 超純水を含む反応混合液 (20 μL) を添加し、ゲノム DNA とよく混合した。このプレートを 7900HT fast real time PCR system (Applied Biosystems) 内で 50°C、2分、95°C、10分 でインキュベートした後、[95°C、15秒; 60°C、1分] の反応を 50 サイクル繰り返し目的遺伝子を増幅させた。得られた増幅曲線の Ct 値は、SDS システムソフトウェア (Applied Biosystems) を用い、auto threshold に設定し定義した。各標的遺伝子について、各処理時間サンプル (0~10 分加熱) の Ct 値から未処理 (0 分加熱) の Ct 値を減じ、 ΔCt 値を算出した。これら ΔCt 値の相対値を、PCR で増幅される鋳型 DNA の残存量、すなわち分解度として表した。 ΔCt 値の相対値への変換は、[式: $2^{-\Delta Ct}$] に代入して行った。

10. ダイズ種子粉砕物の加熱処理 (ボイル)

方法 6 で調製したダイズ Williams82 品種の種子粉砕物 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取った。そこに超純水 1 mL を添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。加熱の際の圧力上昇と蒸発を防ぐために、チューブのキャップを半開させ、その上からアルミホイルを被せた。これをカセットコンロで沸かした 99°C の湯内で 0~60 分間加熱した。加熱処理後は、試料を直ちに水中に移し冷却した。

11. ダイズ種子粉砕物の加熱処理 (様々な温度)

上記加熱方法 (9) は直火によるため、特定の温度に設定することは難しい。そのため、ダイズ

粉砕物試料を 70~100°C の温度で加熱する際は、別法としてブロックインキュベーター (TAITEC 製) を使用した。また、熱の伝導をより均一になるように、加える水の量を増加させた。方法 6 で調製したダイズ Williams82 品種の種子粉砕物 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取った。そこに超純水 5 mL を添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。加熱の際の圧力上昇と蒸発を防ぐために、チューブのキャップを半開させ、その上からアルミホイルを被せた。これを 70、80、90 または 100°C に設定したブロックインキュベーター内で、0~60 分間加熱した。加熱処理後は、試料は直ちに水中で冷却した。

12. ダイズ粉砕物の加熱処理 (オートクレーブ)

方法 6 で調製したダイズ Williams82 品種の種子粉砕物 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取った。そこに超純水 1 mL を添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。チューブをメジュームビンの口で倒れないように固定し、キャップの代わりに綿栓でフタをした。これを 121°C、20 分の条件でオートクレーブ処理した。処理後は、試料は直ちに水中で冷却した。処理時間に、管内の温度上昇にかかる時間は考慮しなかった。

13. 加熱処理したダイズ種子粉砕物からのゲノム DNA 抽出精製

方法 9 で得られた試料に G2 緩衝液 15 mL、500 μL cellulase、10 μL RNase A (100 mg/mL)、5 μL α-amylase (4 units/μL) と 5 μL のプラスミドベクター (1 ng/μL) を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。その後、100 μL の proteinase K (20 mg/mL) を添加し、攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。この抽出溶液を 10,000 xg、4°C で 5 分間遠心分離し、上清 14 mL を回収した。この溶液全量を 10 秒間ボルテックスミキサーで緩やかに攪拌した後、4 mL の QBT 緩衝液で平衡化した Genomic-tip 100/G カラムにロードした。カラムを 6 mL の QC 緩衝液で 3 回洗浄した後、ゲノム DNA は 50°C の QF 緩衝液 2 mL で溶出させた。これ以降の DNA の高純度化の工程 (イソプロパノール沈殿) は、各試料 DNA 濃度のばらつきを大きくする可能性が考えられたため、QF 画分を次のリアルタイム PCR の鋳型 DNA として保存した。抽出の際に添加したプラスミドベクターは、遺伝子組換えサケ (AquAdvantage) にユニークな塩基配列が組み込まれた pEX-A2J1 ベクターを使用した。本研究では、外来性の遺伝子を抽出時に添加し、ダイズ由来の遺伝子と同時に検出することで、抽出効率の

補正を試みた。

14. 加熱処理したダイズ粉砕物から抽出した DNA の分解

加熱処理したダイズ粉砕物から抽出した DNA の分解は、4つの標的遺伝子 ch1, ch2, ch3 と ch8、1つのコントロール遺伝子 AquAd を対象とし、それらのリアルタイム PCR で得られた各 Ct 値を基に相対的に評価した。まず、方法 12 で溶出した QF 画分を超純水で 100 倍希釈し、鋳型 DNA 溶液を調製した（希釈された QF 緩衝液が PCR に影響しないことは予め確認した）。96 ウェルプレートに、この DNA 溶液を処理時間ごとに 3 ウェルずつ、5 標的分、5 μL ずつ分注した（1 ウェルあたり 50 ng DNA）。そこに予め調製した 12.5 μL Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4 μL 各 primer-forward (50 μM)、0.4 μL 各 primer-reverse (50 μM)、0.25 μL probe (10 μM) と 6.45 μL 超純水を含む反応混合液 (20 μL) を添加し、ゲノム DNA とよく混合した。このプレートを 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystems) 内で 50°C, 2分、95°C, 10分でインキュベートした後、[95°C, 15秒; 60°C, 1分] の反応を 50 サイクル繰り返し目的遺伝子を増幅させた。得られた増幅曲線の Ct 値は、SDS システムソフトウェア (Applied Biosystems) を用い、auto threshold に設定し定義した。各標的遺伝子について、各処理時間サンプル (0~60 分加熱とオートクレーブ処理) の Ct 値から対応する AquAd 遺伝子の Ct 値を減じ、 ΔCt 値を算出した。さらに、各 ΔCt から未処理 (0 分加熱) の Ct 値を減じ $\Delta\Delta\text{Ct}$ 値を算出した。これら $\Delta\Delta\text{Ct}$ 値の相対値を、PCR で増幅される鋳型 DNA の残存量、すなわち分解度として表した。 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 値の相対値への変換は、[式: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$] に代入して行った。

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 :

1. RNA-Seq 解析

1.1 試料の調製

発芽ダイズの調製は、宮崎大学フロンティア科学実験総合センターの隔離実験施設内で行った。発芽条件は、発芽ダイズ生産の条件下 (40°C、48 時間培養) とした。ダイズは実験に使用する量のみ発芽させ、発芽させたダイズは全て以下の実験に供した。発芽ダイズは、粒単位でトータル RNA の抽出・精製を行った。すなわち、1 粒を 1 試料に用い、乳鉢・乳棒を用いて液体窒素を加えながら粉状になるまで粉砕し、Qiagen RNeasy Plant Mini Kit の 2 カラム分を 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 の品質は、Agilent Bioanalyzer 2100 system (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 の濃度と精製度は、NanoDrop 2100 spectrophotometer (サーモサイエンティフィック社) を使用して推定した。得られたトータル RNA 1.5 μg を試料に次世代シーケンシング用のライブラリの調製に供した。ライブラリの調製には、NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB 社) を使用し、各試料にはタグ配列を付加した。以下にその概要を記す。mRNA 精製は、poly-T oligo を付加した磁石ビーズで行った。得られた mRNA は、NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X) 中で加熱し、二価カチオン存在下で断片化させた。断片化させた mRNA は、ランダムヘキサマープライマーを使用し、M-MuLV Reverse Transcriptase (RNaseH-) により逆転写させた。cDNA の相補鎖は、dTTP の代わりに dUTP を含む dNTP を使用して DNA polymerase I により合成し RNase H を使用して mRNA を分解させて行った。3'末をアデニル化した後、NEBNext Adaptor を付加した。合成した cDNA は、150~200 bp の鎖長を AMPure XP system (ベックマンコルター社) を使用して単離した。USER Enzyme (NEB 社) を使用して、ウラシルを含む DNA 鎖を断片化した。次に、Phusion High-Fidelity DNA polymerase、Universal PCR プライマー、Index タグプライマーを使用して PCR を行った。得られた PCR 産物は、AMPure XP system を使用して精製を行い、Agilent Bioanalyzer 2100 system を使用してクオリティチェックを行った。Index タグを付加したサンプルは、cBot Cluster Generation System (イルミナ社) を使用して、TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS キット (イルミナ社) によるフローセルへのクラスター化を行った。シーケンシングは、100-base paired-end でフローセルの 5 plex /1 レーンを用いてイルミナ HiSeq2500 により行った。

1.2. データの解析

シーケンサーより得られた Fastq ファイルは、Genomic Workbench ver.9.0.1 を使用して、リード配列のトリミングを行った。トリミングは、アダプター配列の除去すること、10%以上の未読塩基配列を含むリードであること、50%以上の塩基配列でクオリティスコア (Q値 \leq 5) を有するリードの除去することを条件に行った。本試験に使用したアダプター配列は、以下の通りである。

5'アダプター :

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

3'アダプター :

5'-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGT
CACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-
3' (アンダーラインした6塩基は、タグ配列)

トリミングを行ったリードは、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/) をリファレンス配列に使用し、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 (リマッピング) した。各サンプルに関して、RNA-Seqを行いサンプル間の遺伝子発現差解析を行った。発現差解析の条件は、各品種のデータをTwo-group comparison (paired) で解析した。発現差解析では、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。Empirical Analysis of Digital Gene Expression (edgeRソフトウェア, *Biostatistics*, 9, 321-332, 2008; *Bioinformatics*, 26, 139-140, 2010) を使用して2群の比較検定を行った。条件の設定は、発現量があるとするための最初のカウント数を5リード数とした。リファレンス配列と比較し、遺伝子発現量が2倍量以上の差 ($p < 0.05$) のある遺伝子を選抜した。

2. プロテオーム解析用の試料調製

2.1. 分析試料

発芽ダイズは、解析するまでの間、 -80°C で保存した。

2.2. 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°C で45分間静置した。遠心分離 ($35,000\times g$, 0°C , 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。

2.3. 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°C で1時間保温した。その後、遠心分離 ($15,000\times g$, 20°C , 15分間) し、タンパク質を含む上清を回収した。

2.4. 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。

2.5. 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°C 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°C 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。

2.6. 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 (サーモ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°C

・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 : On (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 (キャリアオーバー) 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。

2.7. 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。

①CDS (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。

②Uniprot (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、および SYNC1) を加えて構築した。

③Uniprot/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)。

④NCBI/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。

2.8. 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。

倫理面への配慮

(1) 人権保護について

該当なし。

(2) 法令遵守項目について

組換え DNA 実験にあたっては、平成 16 年 2 月に施行された、GM 生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (平成 15 年法律第 97 号) と所属研究機関の倫理規定、及び、GM 実験安全管理規則を遵守して実施した。

C. 研究結果

1. LAMP 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 : ループプライマーは、通常の LAMP 法による遺伝子増幅をより迅速化する。そこで、本研究で設計した PLD 遺伝子を標的とする通常の LAMP プライマーセット (FIP, BIP, F3 & B3) の性能を評価するために、コメから抽出精製したゲノム DNA (50 ng) を鋳型とした LAMP 反応をループプライマー (LF と LB) 存在下と非存在下で検討した。反応を 63°C で行ったところ、ループプライマー非存在下において、PLD 遺伝子の増幅曲線は反応開始から約 42 分以降に観察された。一方、ループプライマーを同反応液に添加すると、PLD 遺伝子の増幅曲線は約 20 分以降より観察され、PLD 遺伝子の増幅が顕著に加速した (図①-1)。

このループプライマーを利用した LAMP 法の特異性を検討するために、コメと他 24 品種の作物から抽出したゲノム DNA (50 ng) を鋳型とした LAMP 反応を上記と同様にして行った。その結果、PLD 遺伝子の増加はコメ由来のゲノム DNA

に対してのみ観察され、他の作物に対する非特異的な増幅は観察されなかった (図①-2)。以上のことから、このループプライマー含有 LAMP 法はコメの特異的検出に有効であることが示唆され、以降、この方法を迅速 LAMP 法として PLD 遺伝子の検出に用いた。

リアルタイム PCR の場合とは異なり、LAMP 法による核酸の増幅では高度に精製された鋳型 DNA を必要としない。従って、LAMP 法においては、DNA 抽出工程を簡略化しやすい。そこで本研究では、LAMP 法に用いるゲノム DNA を簡便かつ迅速に抽出するために、試料の粉碎をすることなく、コメの最小単位である穀粒一粒から DNA を抽出した。この抽出は Hot SHOT 法を基盤とした。水洗した精米をアルカリ溶液に浸し、98°C で 5 分間熱した後、その溶液を中和することでゲノム DNA を粗抽出した (図①-3)。このゲノム DNA 溶液を LAMP 法の鋳型に用いると、PLD 遺伝子の増幅が観察された (図①-4)。この PLD 遺伝子の増幅は、様々な品種の精米、無洗米やもち米から簡易抽出されたゲノム DNA でも観察された (図①-4)。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：ダイズは 20 本の異なる染色体を有する。各染色体上の DNA の分解度の違いを検討するために、まず、20 本の染色体それぞれで唯一存在する遺伝子、すなわちゲノム上に 1 コピーのみ保存される遺伝子を NCBI のデータベースを用いて検索した。マニュアル操作でランダムに遺伝子を検索した結果、8 つの遺伝子が標的候補として見出された (表②-1)。本研究では、標的 DNA の分解度はリアルタイム PCR で検討するため、各候補遺伝子を増幅・検出するプライマー対とプローブを設計した (表②-1)。設計したプライマー対が標的遺伝子の特異的に増幅可能かどうかは NCBI の primer-BLAST ツールを用いて予め検証した (図②-1~3)。4 番染色体の遺伝子を除くすべての遺伝子に対する特異性が推定されたため、本研究では、7 つの内、1 番染色体、2 番染色体、3 番染色体と 8 番染色体上の遺伝子を分解の指標遺伝子に決定し、以下ではそれぞれを ch1, ch2, ch3, ch8 と呼称した。

遺伝子 ch1, ch2, ch3 と ch8 の標的配列の PCR 増幅効率を検討するために、各 DNA 断片が挿入されたコントロールプラスミド (図②-4) を鋳型に用いたリアルタイム PCR を行った。設計した各プライマー対プローブは、ch1, ch2, ch3 と ch8 の標的配列をそれぞれ 0.94, 0.87, 0.96 と 0.96 の増幅効率で増幅した (図②-5)。遺伝子 ch1, ch3 と ch8 は、同様の効率で増幅することが示され、これら

3 遺伝子間においては、リアルタイム PCR による対等な DNA 分解度の比較が可能であることが示唆された。一方、遺伝子 ch2 はこれら 3 つよりもやや低い増幅効率だった。標的とする ch2 の lectin 遺伝子は、ダイズに特異的な内在性遺伝子としてその特定によく用いられるため、以下の DNA 分解の標的に含めることとした。

各標的遺伝子配列の潜在的な分解度の違いを観察するために、まず裸のゲノム DNA 水溶液を 100°C で 10 分間加熱した。そして、その加熱したゲノム DNA を鋳型としたリアルタイム PCR を行い、得られた Ct 値をもとにその試料中にどれだけ増幅可能な鋳型 DNA が残っているのかを相対的に数値化し、これを見かけ上の DNA 分解度として表した (図②-6)。4 つの標的 DNA 配列は、いずれも加熱後 10 分までに初期鋳型量の 90% 以上が分解された。そこに至るまでに、遺伝子 ch1, ch2 と ch3 は、同程度の経時的な DNA 分解を示した。一方、遺伝子 ch8 においては、各タイムポイント (2, 4, 6, 8 分) で上 3 つよりやや分解されにくい傾向が観察された。これと同様の傾向は、コントロールプラスミド DNA を加熱した場合でも観察された (図②-7)。

次に、種子内の DNA を加熱処理した場合の DNA 分解度を観察するために、水でペースト状にしたダイズ粉砕物を 99°C の熱湯で 0 から 60 分間加熱した。そして、そこから抽出した DNA を鋳型に用いてリアルタイム PCR による DNA 分解度を検討した。その結果、4 つの標的配列は加熱後 5 分以内に急激に分解し、その後は、緩やかに分解した (図②-8)。60 分間の加熱処理の間に、遺伝子 ch1, ch2 と ch3 は、各タイムポイントで同程度の分解度を示したが、遺伝子 ch8 はこれらよりもやや分解されやすい傾向が観察され、この分解パターンは、裸の DNA を加熱した場合とは真逆だった。一方、121°C, 20 分間のオートクレーブで処理すると、それら分解度は同程度に収束した。

以上の結果から、ゲノム DNA の一部においては、その加熱による分解度が異なる可能性が示唆されるため、今度は 50°C から 100°C の様々な加熱温度にて種子内外のゲノム DNA を加熱し、その標的遺伝子の分解度を再検討した。種子外に出た裸のゲノムは、加熱温度の増加に伴いその分解度も増加した (図②-9)。同様のことは種子内のゲノム DNA においても観察された。しかし、先の結果とは異なり、種子内の各標的遺伝子の分解度に差は観察されなかった (図②-10)。

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：RNA-Seq 法を用いて、Jack 品種と Williams 品種で発現する発芽

遺伝子を、網羅的に解析した (**Supplement Table ③-1**)。edgeR プログラムを用いて、Williams 品種をリファレンスに 600 倍以上発現差のある遺伝子をリスト化した結果、660.36~21151.66 倍発現量の異なる発芽遺伝子は、16 遺伝子検出した。LC-MS/MS 法より、タンパク質計量値 [計 451 件]から変動の大きかった 20 種類のタンパク質を選択し、発現量差を検出した結果を **Table③-1** に示した。当該タンパク質に計量値を与えているペプチドの検出ピークは、それぞれ確認し、計量値の妥当性を検証した。その結果、RNA-Seq より得られた、発現量の違うトップ 16 遺伝子と LC-MS/MS 解析より得られた発現量差の違うトップ 20 タンパク質を比較した場合、GLYMA12G09400.1 遺伝子のみ一致し、その他の遺伝子は合致しない結果を得た。また、LC-MS/MS 解析より、GLYMA12G09400.1 遺伝子として認識したペプチドは、GLYMA11G14950.1 遺伝子と GLYMA18G52610.1 遺伝子がコードする共通ペプチドのアミノ酸配列であることが判った。

D. 考察

1. LAMP 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：本研究では、精米一粒をアルカリ溶液でボイルするだけで、LAMP 反応に必要な分量のゲノム DNA が抽出されることを示した。この方法は、粉碎や酵素処理等の前処理、DNA 精製の工程が省かれているため、簡便で短時間かつ安価な DNA 抽出法と考えられる。

コメ内在性の PLD 遺伝子は、コメにユニークな遺伝子であり、そのゲノム中に 1 コピーのみ存在する。今回の一粒抽出法で得られた DNA を鋳型とした LAMP 反応は、この PLD 遺伝子を効果的に増幅した。この観察から、この方法は、GM コメのトランスジェニック配列の増幅にも応用できると考えられる。本実験では、うるち米のみを材料に用いたが、GM コメはタイ米に外来遺伝子を導入して作成されている。そのため、今後はタイ米一粒から PLD 遺伝子を検出できるか検討する必要がある。また、GM コメの簡便な検出に発展させるために、CpTi 遺伝子などの GM コメを検知する LAMP プライマーセットを用いて、GM コメまたは GM コメが混入している試料から目的のトランスジェニック配列を検出できるかを検討する必要がある。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：核内の DNA は裸の状態ではなく、ヒストンタンパク質に巻きつきヌクレオソームを形成し、さらにこれらがいくつも凝集してクロマチン構

造をとっている。クロマチンは、その凝集度の違いによって二種類に分けられ、低密度領域はユークロマチン、高密度領域はヘテロクロマチンと呼ばれる。したがって、ユークロマチンはヘテロクロマチンよりも DNA が露出された状態にあると考えられる。その DNA の構造の違いは転写制御、すなわち転写因子や化学反応の DNA へのアクセサビリティと関連するため、DNA の熱や圧力といった外部刺激に対する安定性とも関連すると予想した。そこで、本研究では、ダイズ種子内外のゲノム DNA を加熱し、そのゲノム上の特定の遺伝子の分解度を観察することでその仮説を検証した。

まず、ダイズ乾燥種子を沸騰した湯 (99°C) で加熱し、遺伝子 ch8 は遺伝子 ch1, ch2, ch3 よりもやや分解されやすいことを観察した。このことから、遺伝子 ch1, 2, 3 は核内で分解を受けにくい DNA 構造 (ヘテロクロマチン) 内に存在し、ch8 は分解されやすい構造 (ユークロマチン) 内に存在すると推察した。この分解の差がタンパク質 (ヒストン) と関係するならば、その失活具合を調節した場合、その分解度をより明確に観察できると考え、加熱の強度を変えながら同様の検討を行った。加熱温度 80~90°Cの間では 100°Cと比べて緩やかな DNA の分解が観察されたが、4 標的配列の分解度の差は観察されず、先の再現は得られなかった。前の結果は、加熱方法にガスコンロで沸かした湯を用いた場合に得られ、後の結果はヒートブロックを使用して得られた。これらのことから、DNA の分解は、加熱方法で変わるほど繊細であるかもしれない。または、インタクトな DNA 分解を遺伝子ごとで観察するにはその差が小さすぎるのかもしれない。上記の結果はすべて Williams82 で得られたが、他の品種 (Emerge, Jack, 珠美人) の場合でも各遺伝子の分解度の違いを見出すのは困難であった (**図②-10**)。

ダイズから抽出したゲノム DNA を様々な温度で加熱した場合、4 つの標的遺伝子は温度依存的に分解度が増加した (**図②-9**)。この実験では、プロテアーゼで処理した裸の DNA が用いられたことから、観察された DNA 分解は、自身の塩基間の水素結合強度といった物理化学的性質、例えば GC 含量、に依存すると考えられる。遺伝子 ch1, ch2 と ch3 は、各加熱条件で同程度の分解度を示した一方、ch8 はこれらよりもやや分解されにくかった点について、標的とした各アンプリコン全体の GC 含量を比較したが、ch1 を除く他 3 つはほぼ同値で分解との相関性は見出せなかった。一方、分解度の指標とした各増幅領域に着目すると、それぞれのプライマー対において GC 含量や Tm 値に差はなかったが、ch8 遺伝子に対するプロ

ブの GC 含量は他と比べて 10°C以上高かった (表②-2)。このことから、増幅領域 (指標) の塩基組成の違いが、直接、その分解度の違いに反映した可能性が示唆され、リアルタイム PCR による DNA の分解度の公平な評価には、標的増幅領域の塩基組成をできるだけ一致させる必要性が示された。

さらに、リアルタイム PCR による DNA 分解度の評価では、分解の標的とする遺伝子はゲノム上に 1 コピーのみ存在することが必須の条件であった。Lectin 遺伝子 (*Le1*) はダイズ特有の遺伝子で、かつそのゲノム上には 1 コピーのみ存在すると考えられる (Vodkin, et al., Cell, 34, 1023-1031, 1983; Jofuku, et al., Nature, 328, 734-737, 1987) ため、GM 検査のリファレンス遺伝子として汎用されてきた。そのため、私たちも *Le1* を本研究の標的 (ch2) として使用した。しかし、4 遺伝子 ch1, 2, 3, 8 に対する PCR 増幅効率を比較すると、ch2 だけが他 3 つよりも低い値だった (図②-5)。再度、*Le1* の DNA 配列を BLAST 検索すると、図②-2 に示すように、その配列と相同性の高い配列 Lectin 2 (*Le2*; identity: 81%) が 10 番染色体にも存在することがわかり、PCR 増幅効率の低値は、*Le1* と *Le2* の DNA 配列の競合的な増幅が原因と推定された。従って、GM 食品検査におけるダイズのリファレンス遺伝子は *Le1* でなく、他の遺伝子、例えば、1 コピーでかつ検出個所によっては分解されにくい *HMG1* (ch8) の方が適切だと考えられた。

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：本研究結果より、発芽ダイズ 1 粒より、RNA-Seq 解析並びに LC-MS/MS 解析によって、トランスクリプトーム並びにプロテオーム解析が可能であることが示唆された。発芽ダイズをサンプルに RNA-Seq 並びに LC-MS/MS を行った結果、両解析法で得られた発芽ダイズ中に含有するであろう発現タンパク質リストは、完全に一致しなかった。この結果は、40°C48 時間の発芽条件下における、発芽ダイズ中に含有するタンパク質は、発芽の際に新たに発現する遺伝子の種類と完全に一致しないことを示唆するデータを得た。

E. 結論

1. LAMP 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：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。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：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。

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：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°C48 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

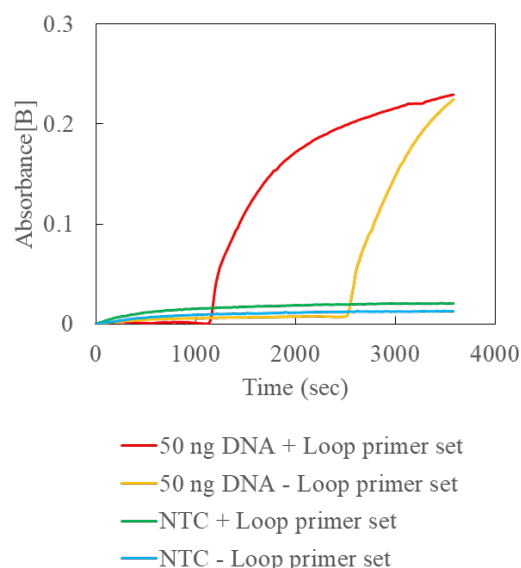
- 1) Nakanishi, K., Fujii, U., Ohtsuki, T., Kimata, S., Soga, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Ikeda, M., Nakamura, K., Kondo, K. Effect of sodium carboxymethyl cellulose in processed rice foods on detection of genetically modified rice-derived DNA. Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 2018 (Submitted)
- 2) 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 (Submitted)
- 3) 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
- 4) 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
邦文 (菅野洋平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成：PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法)

2. 学会発表
- 1) 中村公亮、石垣拓実、榑藤崇裕、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
 - 2) 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ーンスターチへの適用、第113回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017年11月
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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、穂山浩、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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成：遺伝子組換

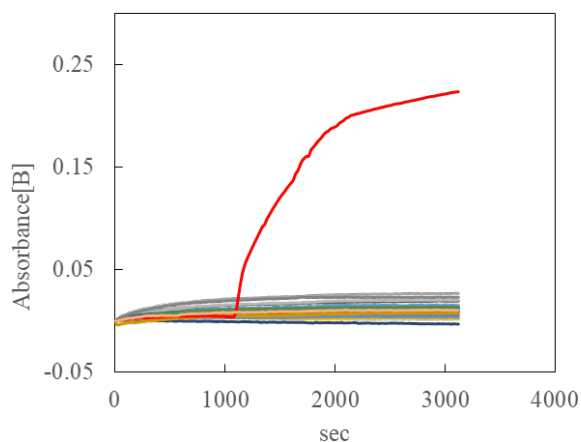
えサケ (AquAdvantage salmon) を対象とした系統特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第23回総会・学術大会、2017年6月

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
なし



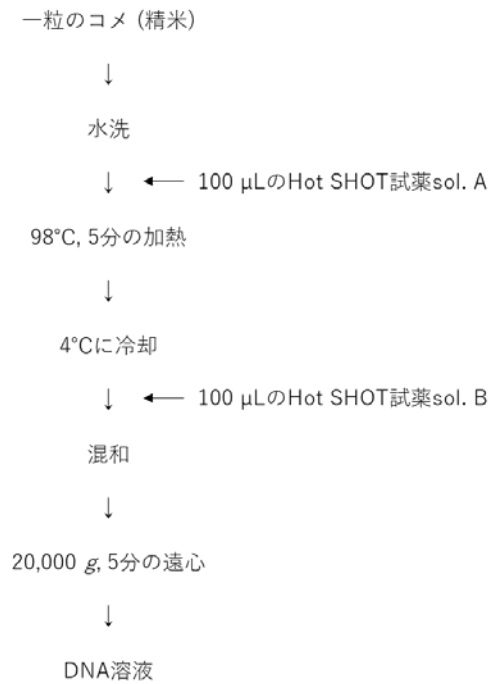
図①- 1. ループプライマー存在下と非存在下におけるコメ内在性遺伝子PLDの増幅
 コメ（日本晴）から抽出精製したゲノムDNA溶液（50 ng DNA）または蒸留水（NTC）を
 鋳型として、そのPLD遺伝子をループプライマー存在下または非存在下のLAMP反応
 で増幅させた。遺伝子配列の増幅は、MyAbscope®の波長 [B] で検出した。



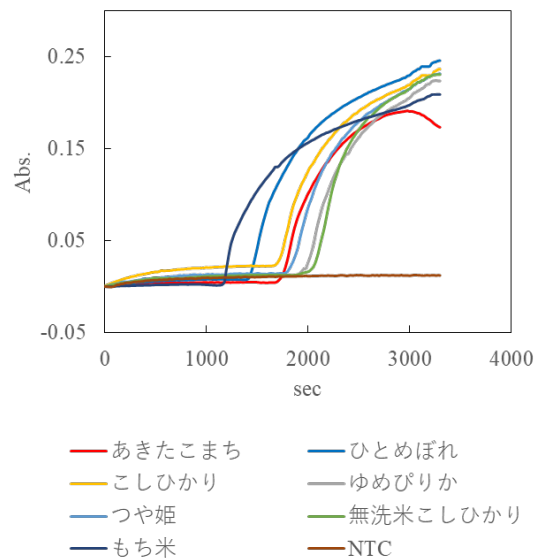
供試作物

- | | | |
|-----------|----------|------------|
| 1. ひよこまめ | 9. カラスムギ | 17. ピーマン |
| 2. ささげ | 10. 小麦 | 18. ワタ |
| 3. スタイロ | 11. ナタネ | 19. パパイヤ |
| 4. エンドウ豆 | 12. 小松菜 | 20. パイナップル |
| 5. 落花生 | 13. てん菜 | 21. ジャガイモ |
| 6. 大豆 | 14. 亜麻 | 22. ニンジン |
| 7. トウモロコシ | 15. トマト | 23. カボチャ |
| 8. 大麦 | 16. ナス | 24. コメ |

図①- 2. PLD遺伝子を検出するLAMP反応条件の各種作物に対する特異性
 コメ（日本晴）から抽出精製したゲノムDNA溶液（50 ng DNA, 赤線）または24品種の
 作物から抽出精製したゲノムDNA（50 ng DNA, 赤線以外の線）を鋳型として、その
 PLD遺伝子をLAMP反応で増幅させた。遺伝子配列の増幅は、MyAbscope®の波長
 [B] で検出した。



図①-3. 一粒のコメからゲノムDNAを抽出する方法の概略図



図①-4. コメ一粒から抽出したDNAを鋳型に用いたLAMP法によるPLD遺伝子の検出

HotSHOT法を用いて各品種の精米からゲノムDNAを抽出し、これらを鋳型にPLD遺伝子をLAMP反応で増幅させた。遺伝子配列の増幅は、MyAbscope®の波長 [B] で検出した。

表②-1. 標的遺伝子の候補と検知に用いたリアルタイムPCR用プライマー対プローブ

Chromosome no.	Gene name	Name of oligos	Sequences of oligos (5'-3')	Tm (°C)	GC content (%)	Amplicon size (bp)
1	Microtubule-associated protein SPIRAL2-like	ch1-forward	GGGAGGATTAGAGACAGAAGAACAC	58	48	73
		ch1-reverse	CATGCAGGATGTTGGTTATGAA	57	41	
		ch1-probe	CCTGCTTGTCCATCCATGGGCACA	68	57	
2	Lectin	ch2-forward	TCCCGAGTGGGTGAGGATAG	59	60	66
		ch2-reverse	TCATGCGATTCCCAGGTAT	59	50	
		ch2-probe	TTCTCTGCTGCCACGGGACTCGA	69	61	
3	Delta-Delta-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial-like	ch3-forward	TCGGTGAAGGAAGTGGATTTG	59	48	68
		ch3-reverse	ACAATAAGCGGCAACCTCTGA	58	48	
		ch3-probe	CTTGCCGCTGACCTTGGCACTC	70	64	
8	HMGl/Y-like protein	ch8-forward	CTTCACTGTGCAACCCAGCAA	60	52	70
		ch8-reverse	ATCGTAAGGAGGGTGGTTGGT	58	52	
		ch8-probe	CACGTGACCCCGCCGACA	69	74	
4	Pentatric opeptide repeat -containing protein At4g 39952	ch4-forward	AAGCACATCAGAACCCTAGATTCC	58	63	66
		ch4-reverse	GGAGTGGCCGCTTGTAAACC	59	61	
		ch4-probe	CCTCCGCTTCCACGCGCTGA	70	70	
5	Leucine-rich repeat receptor-like tyrosine-protein kinase PXC3	ch5-forward	GGAAGACAAAACGGAACGGTTA	59	45	75
		ch5-reverse	TTTATCGACAAGTTGGAGGTGTTG	59	42	
		ch5-probe	AACACAAGTCCCATTCCCACCCACC	69	54	
10	Myb-related protein Myb4-like	ch10-forward	TGATTTCTCACATTCAACGATATGG	59	58	69
		ch10-reverse	AGCACGCACCAGCTTGTGTT	58	61	
		ch10-probe	CATGGAATCTGGCGTGCCCTTCC	69	61	
15	Clavamate synthase -like protein At3g21360-like	ch15-forward	GTGGTGGGTGCGCTCTTC	59	67	65
		ch15-reverse	TCGTGGTGGAAAGGGATCTTC	60	52	
		ch15-probe	CGCCAATGAGTCCCCACCCGAT	70	64	

表②-2. 増幅断片長の配列と特性一覧

Chromosome target	Amplicon sequence	Size (bp)	Tm (°C)	GC (%)
ch1	GGGAGGATTAGAGACAGAAGAACACTCCTGCTTGTCCATCCATGGGCACATATTCATAACCAACATCCTGCATG	73	88	47
ch2	TCCCGAGTGGGTGAGGATAGGGTTCTCTGCTGCCACGGGACTCGACATACCTGGGGAATCGCATGA	66	94	59
ch3	TCGGTGAAGGAAGTGGATTTGGCCCTTGCCGCTGACCTTGGCACTCTTCAGAGGTTGCCGCTTATTGT	68	93	54
ch8	CTTCACTGTGCAACCCAGCAATCAGCTGACCCCGCGGACAACACCAACACCAACCACCTCCTTACGAT	70	94	57
ch4	AAGCACATCAGAACCCTAGATTCCCTCCTCCGCTTCCACGCGCTGACGGTTACAAGCGGCCACTCC	66	93	59
ch5	GGAAGACAAAACGGAACGGTTATAACACAAGTCCATTCCACCCACCTTCAACACCTCCAACCTTGTGCGATAAA	75	88	45
ch10	TGATTTCTCACATTCAACGATATGGCCATGGAATCTGGCGTGCCCTTCCAAAACAAGCTGGTGGCTGCT	69	92	49
ch15	GTGGTGGGTGCGCTCTTCCACCGCAATGAGTCCCCACCCGATCAGAAGATCCCTTCCACCACGA	65	95	60

表②-3. データベース情報で推測されたプライマー・プローブの特性

Chromosome No.	Name of oligos	Specificity		Estimated target copy no.
		BLAST	Primer BLAST	
1	ch1 forward			1
	ch1 reverse	✓	✓	
	ch1 probe			
2	ch2 forward			2
	ch2 reverse	✓	✓	
	ch2 probe			
3	ch3 forward			1
	ch3 reverse	✓	✓	
	ch3 probe			
8	ch8 forward			1
	ch8 reverse	✓	✓	
	ch8 probe			
4	ch4 forward			1
	ch4 reverse	×	×	
	ch4 probe			
5	ch5 forward			1
	ch5 reverse	✓	✓	
	ch5 probe			
10	ch10 forward			1
	ch10 reverse	×	×	
	ch10 probe			
15	ch15 forward			1
	ch15 reverse	✓	✓	
	ch15 probe			

target no1

BLAST

Distribution of the top 2 Blast Hits on 2 subject sequences

Color key for alignment scores

- <40
- 40-50
- 50-80
- 80-200
- >=200

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 1, Glycine_max_v2.0, whole genome shotgun sequence	135	135	100%	1e-30	100%	NC_016088.2
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 1 genomic scaffold, Glycine_max_v2.0 Chr01, whole genome	135	135	100%	1e-30	100%	NW_014573383.1

Primer-BLAST

Query: 1: 0..3.6K (3.6kb) -

Seq-entry: 1: seq_1401_1001...

Primer 1

Warning

Detailed primer reports

Primer pair 1

Forward primer	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGAGGATTAGACAGAGAAGACAC	Plus	25	73	97	60.39	48.00	2.00	0.00
Reverse primer	CATGCAGGATGTTGGTTATGAA	Minus	22	145	124	57.01	40.91	5.00	2.00
Product length	73								

Products on potentially unintended templates

>XM_003517564.3 PREDICTED: Glycine max microtubule-associated protein SPIRAL2-like (LOC100763065), mRNA

product length = 73

Forward primer 1 GGGAGGATTAGACAGAGAAGACAC 25

Template 1452 1428

Reverse primer 1 CATGCAGGATGTTGGTTATGAA 22

Template 1380 1401

図②-1. microtubule-associated protein SPIRAL2-like遺伝子（染色体番号1）のゲノム中のコピー数解析
 標的配列がダイズゲノム中に1コピーであることが確認された。また、プライマーの特異性が確認された。

target no2

BLAST

Distribution of the top 4 Blast Hits on 4 subject sequences

Color key for alignment scores

- <40
- 40-50
- 50-80
- 80-200
- >=200

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 2, Glycine_max_v2.0, whole genome shotgun sequence	122	122	100%	7e-27	100%	NC_016089.2
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 2 genomic scaffold, Glycine_max_v2.0 Chr02, whole genome shotgun sequence	122	122	100%	7e-27	100%	NW_014573384.1
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 10, Glycine_max_v2.0, whole genome shotgun sequence	73.1	73.1	100%	7e-12	86%	NC_016097.2
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 10 genomic scaffold, Glycine_max_v2.0 Chr10, whole genome shotgun sequence	73.1	73.1	100%	7e-12	86%	NW_014573392.1

Primer-BLAST

Query: 1: 0..3.6K (3.6kb) -

Seq-entry: 1: seq_1401_1001...

Primer 1

Warning

Detailed primer reports

Primer pair 1

Forward primer	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCCAGTGGGTGAGGATAG	Plus	20	215	234	60.11	60.00	3.00	0.00
Reverse primer	TCATGCCATTCCCAGGAT	Minus	20	260	261	58.57	50.00	4.00	3.00
Product length	66								

Products on potentially unintended templates

>XM_003518752.3 PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100816710), mRNA

product length = 66

Forward primer 1 TCCCAGTGGGTGAGGATAG 20

Template 732 753

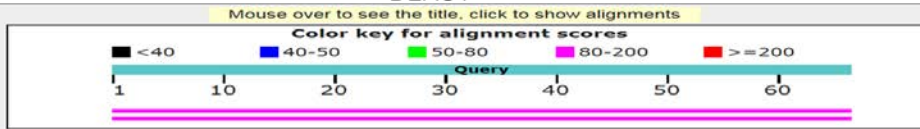
Reverse primer 1 TCATGCCATTCCCAGGAT 20

Template 797 778

図②-2. lectin遺伝子（染色体番号2）のゲノム中のコピー数解析
 標的配列がダイズゲノム中に1コピーではないことが確認された。また、プライマーの特異性が確認された。

target no4

BLAST



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance trees of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 4_Glycine_max_v2.0_whole genome shotgun sequence	122	122	100%	7e-27	100%	NC_016091.2
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Williams 82 chromosome 4 genomic scaffold_Glycine_max_v2.0_Ch04_whole genome	122	122	100%	7e-27	100%	NW_014573386.1

Primer-BLAST

Primer pair 1	Sequence (5'-3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGCACATCAGAACCCCTAGATTC	Plus	24	607	626	60.38	45.83	4.00	2.00
Reverse primer	GGAGTGGCCGCTTGTAAAC	Minus	19	607	649	61.04	63.16	6.00	2.00

Products on potentially unintended templates

>NM_026512050.2 PREDICTED: Glycine max pentatrincopptide repeat-containing protein At4g39952, mitochondrial (LOC100750090), transcript variant X7, mRNA

product length = 66
 Forward primer 1 AAGCACATCAGAACCCCTAGATTC 24
 Reverse primer 2 GGAGTGGCCGCTTGTAAAC 19
 Template 586

>NM_026522276.2 PREDICTED: Glycine max pentatrincopptide repeat-containing protein At4g39952, mitochondrial (LOC100750090), transcript variant X6, mRNA

product length = 66
 Forward primer 1 AAGCACATCAGAACCCCTAGATTC 24
 Reverse primer 2 GGAGTGGCCGCTTGTAAAC 19
 Template 586

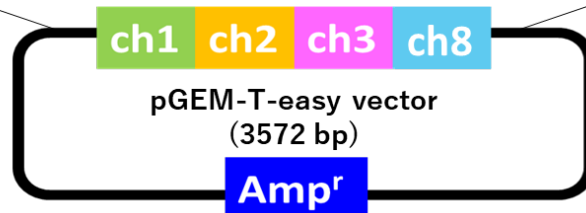
>NM_014771480.1 PREDICTED: Glycine max pentatrincopptide repeat-containing protein At4g39952, mitochondrial (LOC100750090), transcript variant X5, mRNA

product length = 66
 Forward primer 1 AAGCACATCAGAACCCCTAGATTC 24
 Reverse primer 2 GGAGTGGCCGCTTGTAAAC 19
 Template 586

>NM_014222486.1 PREDICTED: Glycine max pentatrincopptide repeat-containing protein At4g39952, mitochondrial (LOC100750090), transcript variant X4, mRNA

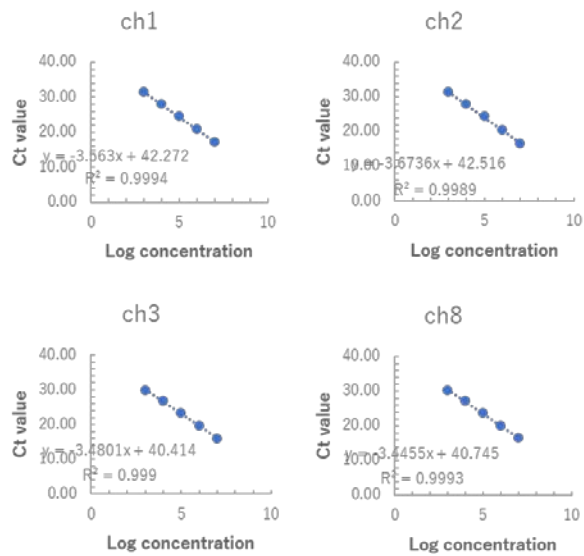
product length = 66
 Forward primer 1 AAGCACATCAGAACCCCTAGATTC 24
 Reverse primer 2 GGAGTGGCCGCTTGTAAAC 19
 Template 586

図②-3. lectin遺伝子（染色体番号4）のゲノム中のコピー数解析
 標的配列がダイズゲノム中に1コピーではないことが確認された。また、
 primerBLASTではtarget遺伝子の転写変異体が7種類ヒットした。



図②-4. コントロールプラスミドの概略図

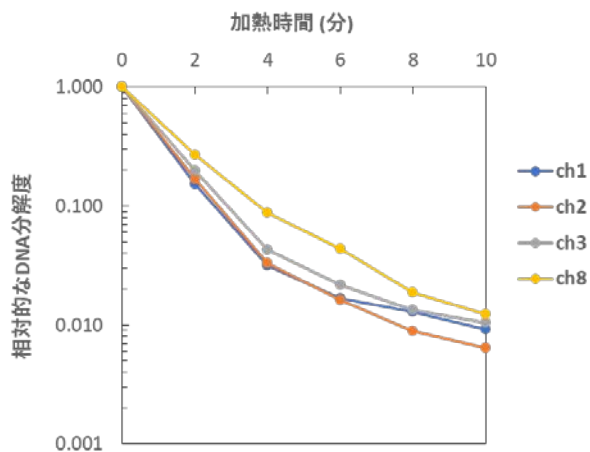
In-Fusion反応を介して、4つの標的遺伝子のDNA断片ch1, ch2, ch3とch8を連続的にプラスミドDNAのpGEM T-easy vectorへ挿入した（全長3572 bp）。各挿入DNAには、標的増幅配列が含まれ、その増幅に関与するプライマーとプローブを塩基配列上に示した。



	ch1	ch2	ch3	ch8
Trial 1	0.96	0.87	0.97	0.97
Trial 2	0.91	0.87	0.94	0.95
Ave	0.94	0.87	0.96	0.96

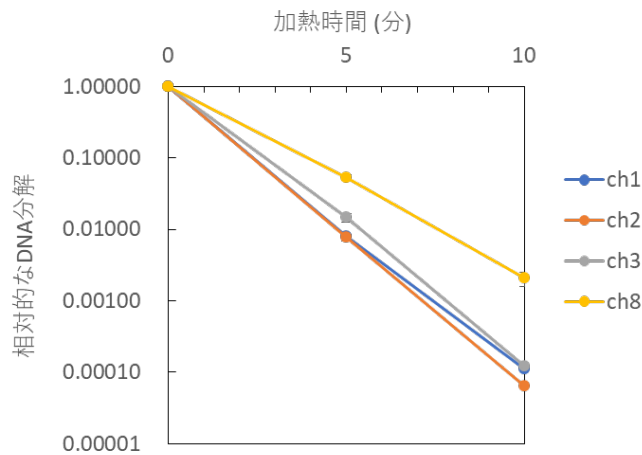
図②-5. 各標的DNA配列のPCR増幅効率

様々なコピー数のコントロールプラスミドDNA（鋳型）と各プライマー対プローブを用いたリアルタイムPCRを行い、各標的DNA配列ch1, ch2, ch3とch8のPCR増幅効率（E）を算出した。図には、各コピー数に対するCt値をプロットして得られた一次関数を示しており、Eはその傾きslope値を式： $E = 10^{-(1/-slope)} - 1$ に代入して求めた。

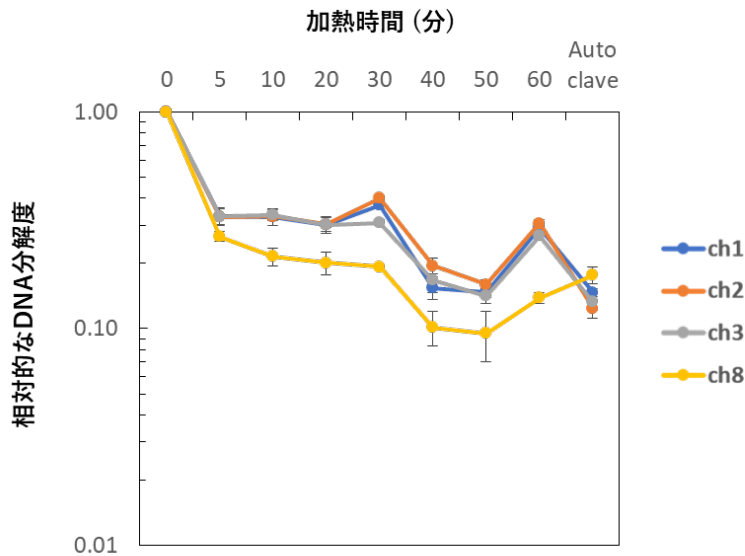


図②-6. ゲノムDNA溶液の加熱による各標的遺伝子の分解度

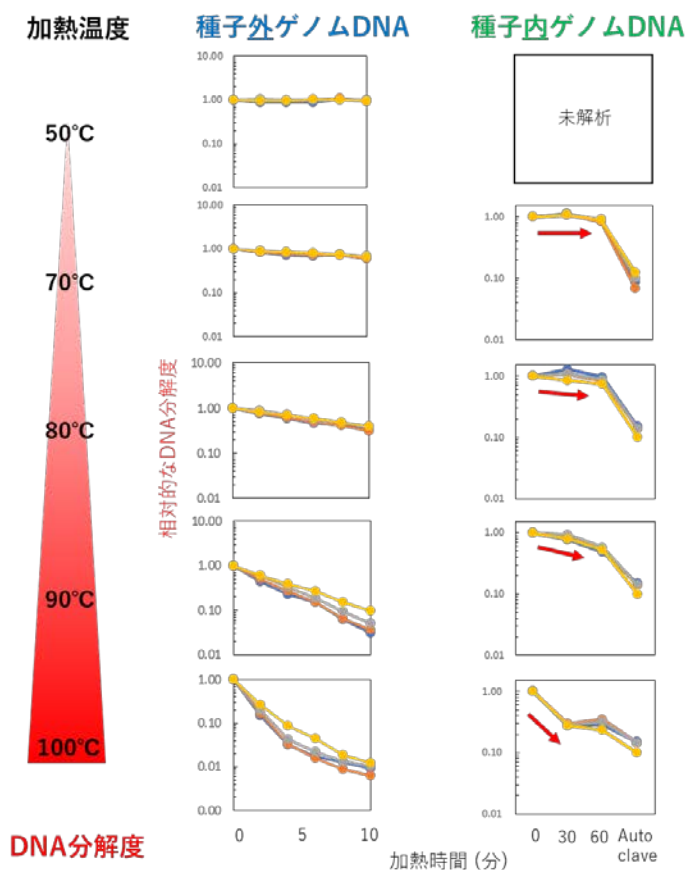
大豆Williams82品種から抽出したゲノムDNA（10 ng/μL）を100°Cで0-10分間加熱し、各加熱時間におけるch1, ch2, ch3とch8のDNA分解度を比較した。DNA分解度は、加熱処理したゲノムDNAを鋳型としたリアルタイムPCRから得られるCt値を基にして相対的に評価した。



図②-7. プラスミドDNA溶液の加熱による各標的遺伝子の分解度
 10,000コピーのコントロールプラスミドDNAを含むゲノム溶液 (じゃがいも由来) を100°Cで0-10分間加熱し、各加熱時間におけるch1, ch2, ch3とch8のDNA分解度を比較した。DNA分解度は、加熱処理したゲノムDNAを鋳型としたリアルタイムPCRから得られるCt値を基にして相対的に評価した。

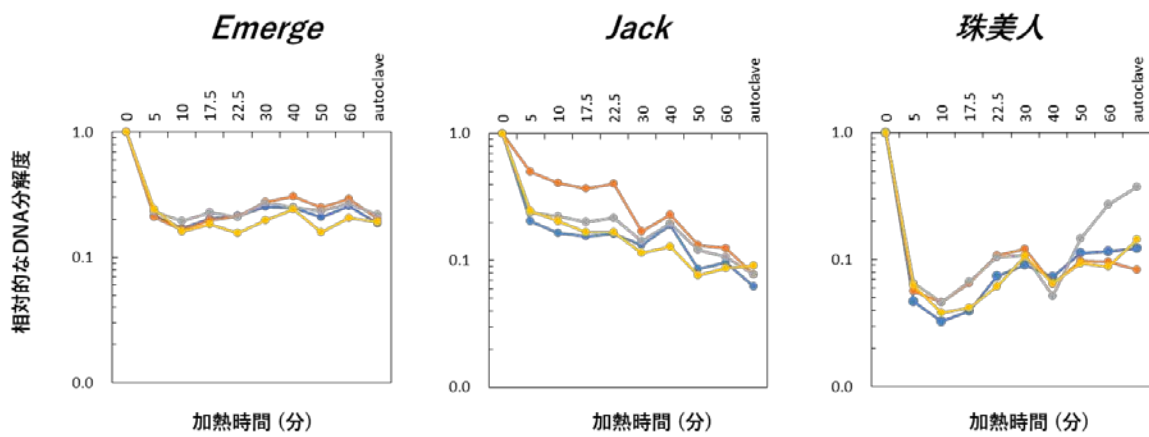


図②-8. 加熱処理した大豆粉砕物から抽出した各標的遺伝子の分解度
 大豆Williams82の粉砕物を99°Cの熱湯で0-60分間、または121°C, 20分間のオートクレーブで加熱し、それぞれから抽出される各標的DNA配列ch1, ch2, ch3とch8の分解度を比較した。DNA分解度は、抽出したゲノムDNAを鋳型としたリアルタイムPCRから得られるCt値を基にして相対的に評価した。データは3回測定の平均値±標準誤差で表した。



図②-9. 様々な加熱処理温度における種子内外の各標的遺伝子の分解度

大豆Williams82のゲノムDNA (種子外ゲノム) または粉碎物 (種子内ゲノム) をそれぞれ0-10分間の加熱または、0-60分間の加熱もしくは121°C, 20分間のオートクレーブ処理に供した後、ゲノム中の各標的DNA配列ch1, ch2, ch3とch8の分解度をリアルタイムPCRで検討した。DNA分解度は、抽出したゲノムDNAを鋳型としたリアルタイムPCRから得られるCt値を基にして相対的に評価した。



図②-10. 大豆品種間における各標的遺伝子の分解度の比較

3つの大豆品種, Emerge, Jackと珠美人の粉碎物をそれぞれ99°Cの熱湯で0-60分間加熱、または121°C, 20分間のオートクレーブ処理で加熱し、それらから抽出された標的DNA配列ch1, ch2, ch3とch8の分解度を比較した。DNA分解度は、抽出したゲノムDNAを鋳型としたリアルタイムPCRから得られるCt値を基にして相対的に評価した。

Supplement Table ③—1. Gene lists having >600 times differential gene expression level between Williams and Jack cultivars using Williams cultivar as a reference

Feature ID	Chromosome	Region	P-value	Fold change
GLYMA02G03250.1	2	2518997..2520592	7.72E-32	21,151.66
GLYMA0892S50.1	scaffold_892	2250..3229	6.22E-28	18,414.07
GLYMA03G07121.1	3	7458627..7491220	4.34E-34	7,673.40
GLYMA02G10320.1	2	8186068..8188789	1.74E-20	5,717.26
GLYMA12G13090.1	12	11449237..11449791	4.04E-22	3,568.04
GLYMA01G30060.1	1	40769687..40771162	4.43E-27	2,907.23
GLYMA11G15310.1	11	10952617..10954051	4.80E-24	2,846.41
GLYMA12G09400.1	12	7168483..7172381	2.49E-22	2,070.67
GLYMA02G03230.1	2	2494913..2496466	3.60E-22	1,546.78
GLYMA18G08015.1	18	6758624..6760903	4.96E-20	1,541.70
GLYMA03G05730.2	3	6051893..6063501	2.72E-08	1,372.22
GLYMA13G37101.1	13	38277892..38278797	7.53E-12	1,305.76
GLYMA16G24590.1	16	28569677..28572015	1.10E-19	1,278.84
GLYMA08G03381.2	8	2382841..2385344	2.16E-15	842.83
GLYMA20G27410.1	20	36585232..36588760	1.78E-35	746.13
GLYMA03G06976.1	3	7275123..7298068	2.18E-13	660.36

(平成28年度 総括研究報告書 (H27-食品-若手-023、研究代表者 中村公亮)から抜粋)

Table ③—1 タンパク質の計量値の検証

Description	Normalized abundance			Fold change		
	Jack	Williams	GM	Jack/ Williams	GM/ Jack	GM/ Williams
① GLYMA20G03310.1 (+1)	55,840	0	59,882	Infinity	1.1	Infinity
② XXX00003_Sync1 Soybean;GLYMA08G03500.1 (+1);GLYMA05G04660.1 (+1)	141,779	49,680	14,909,520	2.9	105.2	300.1
③ GLYMA13G17150.1 (+1)	303,090	8,134	481,321	37.3	1.6	59.2
④ XXX00001_enhanced green-fluorescent protein (eGFP)	6,997,637	8,473,101	462,686,460	0.8	66.1	54.6
⑤ GLYMA20G33850.2 (+1)	0	10,655	189,604	0.0	Infinity	17.8
⑥ GLYMA16G32740.1 (+1);GLYMA09G27870.1 (+1)	1,593,327	350,671	3,558,002	4.5	2.2	10.1
⑦ GLYMA15G13740.1 (+1)	2,906,869	28,809	287,122	100.9	0.1	10.0
⑧ GLYMA09G14870.1 (+1)	175,677	36,737	275,245	4.8	1.6	7.5
⑨ GLYMA04G39475.1 (+1)	3,236,300	393,577	2,753,076	8.2	0.9	7.0
⑩ GLYMA18G45420.1 (+1);GLYMA09G40420.1 (+1)	2,930,016	615,022	4,233,763	4.8	1.4	6.9
⑪ GLYMA09G28706.1 (+1);GLYMA09G28713.1 (+1)	283,449,042	4,098,609	26,178,334	69.2	0.1	6.4
⑫ GLYMA07G32050.1 (+1);GLYMA06G16490.1 (+1);GLYMA08G07340.1 (+1)	340,947	116,136	630,523	2.9	1.8	5.4
⑬ GLYMA09G03780.1 (+1)	175,092	291,650	1,497,587	0.6	8.6	5.1
⑭ GLYMA02G02350.1 (+1);GLYMA01G05150.1 (+1)	2,178,831	578,708	2,910,093	3.8	1.3	5.0
⑮ GLYMA03G39860.1 (+1)	5,683,054	1,283,949	6,432,535	4.4	1.1	5.0
⑯ GLYMA17G03350.1 (+1)	145,678	686,801	3,008,123	0.2	20.6	4.4
⑰ GLYMA01G42010.1 (+1);GLYMA11G03330.1 (+1)	503,898	969,636	2,656,762	0.5	5.3	2.7
⑱ GLYMA07G15960.1 (+1)	0	53,895	121,254	0.0	Infinity	2.2
⑲ GLYMA12G10390.1 (+1)	5,112,728	424,319	1,909,809	12.0	0.4	4.5
⑳ GLYMA11G14950.1 (+1);GLYMA02G10320.1 (+1);GLYMA18G52610.1 (+1)	1,525,278	1,102,552	1,172,684	1.4	0.8	1.1

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 アレルゲンデータベースによるアレルゲン性評価に関する研究

研究分担者 安達 玲子 （国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長）
研究協力者 為広 紀正 （国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官）

研究要旨

本研究では、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、アレルゲン性予測解析法の1つとして運用・公開しているアレルゲンデータベース(ADFS; Allergen Database for Food Safety)について、新たに発表されたアレルゲン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、アレルゲン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、アレルゲン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。

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、植物だけでなく、遺伝子組換え動物も開発が進んでいる。また最近では、遺伝子組換え植物同士を交配して得られるスタック品種も開発されている。これは、遺伝子を組み換えて付与された機能をスタックすることにより、生産性の向上等を図っているものであるが、このような品種について形質にどのような変化が現れるかについて研究されている例は少ない。これらのようなこれまで存在していなかった遺伝子組換え生物については、非意図的な影響等を考慮し、安全性評価の方法等について検討する必要がある。

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遺伝子組換え食品に関して

は、そのリスクの1つとしてアレルゲン性増大の可能性が考えられる。本研究では、アレルゲン性解析法の1つとして開発した、アレルゲン性の予測機能を装備したアレルゲン・エピトープ情報データベース(ADFS; Allergen Database for Food Safety)に関して、その情報内容を更新し充実させることにより、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ゲン性評価系に関する研究を行う。

B. 研究方法

登録アレルゲン（アミノ酸配列情報）のアップデート

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ゲンデータベース(AllergenOnline)における登録アレルゲンのアップデート内容を、ADFS に反映させ

た。

エピトープ情報の追加

2016年6月から2017年5月までの1年間にNCBI PubMedに収載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。キーワードとしては、IgE、epitope、linear、conformational、sequence、recognition等々のワードを使用し、これらを複数組み合わせ合わせて6通りの検索式を作成して検索を行った。この検索により抽出されてきた論文についてピアレビューを行った。その結果エピトープ情報を報告していると判断された論文について、そのエピトープ情報を整理し、アレルゲンデータベース(ADFS)のデータに追加した。

C. 研究結果

登録アレルゲン (アミノ酸配列情報) のアップデート

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ゲンデータベースであるAllergenOnlineは、登録アレルゲンの全てが国際的なアレルギーの専門家チームによるピアレビューを経ており、登録タンパク質がアレルゲンであるというエビデンスの信頼性が非常に高いデータベースである(但しエピトープ情報は含まない)。ADFSにおける登録アレルゲンは平成20年度にAllergenOnlineの登録アレルゲンと統合し、その後もAllergenOnlineのアップデートに伴ってADFS登録アレルゲンのアップデートを行っている。29年度においても引き続きこのアップデート作業を実施した。

エピトープ情報の追加

エピトープ配列に関しては、キーワード検索により抽出された論文は24報であった。その中からアレルゲン・エピトープ情報が記載されていると思われる14報を選択し、ピアレビューを行った。その結果、5報の論文(Table 1)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

に追加した (Table 2)。

上記のアレルゲン及びエピトープ情報更新作業により、ADFSのアレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は2144、エピトープ既知のアレルゲン数は236、構造既知のアレルゲン数は163、糖鎖付加アレルゲン数は131となった。

付加アレルゲン数は131となった。

ユーザー登録制の廃止

ADFSの運用においては、これまでユーザーにメールアドレス及びパスワードを登録してもらい、登録ユーザーの人数を把握できるようにしていた。しかし、実際にはユーザーがパスワードを失念した場合等の管理者側への問い合わせが頻繁に生じており、また、ユーザー登録というステップが、トップページへのアクセス者の具体的なADFS利用を妨げる可能性も考えられた。そこで、このような状況を改善するため、また、ADFSへのアクセスや利用における利便性を向上させるため、ユーザー登録制を廃止し、トップページにアクセスカウント数を表示することとした。この変更により、ADFSの全てのウェブページへの容易なアクセスを可能とし、利用に際しての利便性を向上させ、より使いやすいデータベースとすることができた。システム変更後約1ヶ月経過した段階で、アクセス数は順調に増加している。

D. 考察

29年度においては、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報を33種追加、また、9種のアレルゲンについて総数27のエピトープ情報をADFSに追加した。本研究により、遺伝子組換え食品のアレルゲン性に関する評価・予測系を充実させることができ、現在までに既に開発されている遺伝子組み換え食品、及び多様化するバイオテクノロジー技術により今後作製されるであろう新規遺伝子組換え食品のアレルゲン性を、より高い精度で評価・予測する

ことが可能となった。また、ユーザー登録制度の廃止により、ADFS 利用に際しての利便性を向上させることができた。

E. 結論

2016 年 6 月から 2017 年 5 月までの 1 年間に NCBI PubMed に収載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。これらの論文についてピアレビューを行い、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。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

安達玲子
食物アレルゲンの表示制度と検査法、および多機能アレルゲンデータベース ADFS について
食品衛生研究 68 巻 2 号 pp15-22 (2018)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 29 年度ピアレビューによりエピトープ情報を収集した論文

-
1. Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J.
The Sensitivity of Endodontic Enterococcus spp. Strains to Geranium Essential Oil.
Molecules. 2015 Dec 21;20(12):22881-9.
PMID: 26703546
 2. Sircar G, Jana K, Dasgupta A, Saha S, Gupta Bhattacharya S.
Epitope Mapping of Rhi o 1 and Generation of a Hypoallergenic Variant: A CANDIDATE MOLECULE FOR FUNGAL ALLERGY VACCINES.
J Biol Chem. 2016 Aug 19;291(34):18016-29.
PMID: 27358405
 3. Cui Y, Teng F, Yu L, Zhou Y, Wang N, Zhang C, Yang L.
Sequential epitopes of Dermatophagoides farinae allergens identified using peptide microarray-based immunoassay.
IUBMB Life. 2016 Oct;68(10):792-8.
PMID: 27481284
 4. Havenith H, Kern K, Rautenberger P, Spiegel H, Szardenings M, Ueberham E, Lehmann J, Buntru M, Vogel S, Treudler R, Fischer R, Schillberg S.
Combination of two epitope identification techniques enables the rational design of soy allergen Gly m 4 mutants.
Biotechnol J. 2017 Feb;12(2).
PMID: 27906504
 5. Yang Y, Zhang YX, Liu M, Maleki SJ, Zhang ML, Liu QM, Cao MJ, Su WJ, Liu GM.
Triosephosphate Isomerase and Filamin C Share Common Epitopes as Novel Allergens of Procambarus clarkii.
J Agric Food Chem. 2017 Feb 1;65(4):950-963...
PMID: 28072528



Table 2 29年度新たに ADFS に追加したエピトープ情報

	Name	start	end	Sequence	Method	CTYPE	Reference	UniProt acc.No
001	Bos d 4	20	34	EQLTKCEVFRELKDL	ELISA	L	PMID 26703546	P00711
	Bos d 4	120	134	INYWLAKKALCSEKL	ELISA	L	PMID 26703546	P00711
002	Gly m 4	43	46	NEVG	IgE-specific linear peptide microarray / random phage peptide display	L	PMID 27906504	C6T1G1
	Gly m 4	74	83	IDEANLGYSY	IgE-specific linear peptide microarray / random phage peptide display	L	PMID 27906504	C6T1G1
	Gly m 4	121	125	ETKGD	IgE-specific linear peptide microarray / random phage peptide display	L	PMID 27906504	C6T1G1
003	Pro c ?	16	30	NGDRAGIDSIISFMK	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
	Pro c ?	166	180	PVWAIGTGKTATPEQ	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
	Pro c ?	205	219	RIIYGGSVTPGNCKE	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
004	Pro c ?	478	492	FKDRKDGSCYVSYKV	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	E0VB57
005	Rhi o 1	44	59	TGEYLTQKYFNQRNN	ELISA	L	PMID 27358405	A0A097CKB4
	Rhi o 1	311	326	GAEKNWAGQYVVDCKNK	ELISA	L	PMID 27358405	A0A097CKB4
006	Der f 1	46	53	SAYLAYRN	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	71	78	GCHGD TIP	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	99	110	AREQQCRRPNSQ	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	179	186	GSTQGVDY	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
007	Der f 2	32	39	KVMVDGCH	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
	Der f 2	97	106	LVKGQQYDIK	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
	Der f 2	123	130	VTVKLIGD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
008	Der f 4	92	105	DIHTRSGDEQQFRR	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	130	139	QSGGLGTNGHH	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	248	255	SHPIIYHE	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	284	291	ITNVFRNN	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	378	388	VGPPTDQHGNI	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	506	519	VGHDEFDAFVAYHI	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
009	Der f 7	49	56	MKVPDHAD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456
	Der f 7	69	81	GELAMRNIEARGL	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456
	Der f 7	117	124	DLAYKLGD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456

注) start, end: エピトープ配列の始点及び終点アミノ酸の番号
Ctype: エピトープのタイプ. L: linear, C: conformational

研究成果の刊行に関する一覧表

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. 榊田和彌、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 glutens.” *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 japonicas* 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)