

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 27-29 年度 総合・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 27-29 年度総合研究報告書	
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・・・・・・・・	13
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・・・・・・・・	23
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) ・・・・・・・・	31
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・・・・・・・・	47
太田 大策	
5. ニワトリのモデル組換え体の作出・・・・・・・・	77
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・	81
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	145
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・	151
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・・・・・・・・	173
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。

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）、GM 微生物（ウイルス抗原を組み込んだモデル GM 乳酸菌、GM 大腸菌から得られた抗原を表層に結合した乳酸菌、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た。分担研究者が、平成 27 年度はモデル乳酸菌、平成 28 年度はにわとり血清、平成 29 年度は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。

新規育種技術を用いて得られた食品の新しい検知法と評価法の開発では、新規育種技術の一つである Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM) を用いて、セイヨウアブラナ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子に 1 塩基のみ変異させて得られたとされる除草剤耐性のセイヨウアブラナについて、検討した。①従来の方法 (Cel-1 アッセイ法、制限酵素アッセイ法)、及び、②次世代シーケンサーを使用した新しい方法 (PCR-NGS 法) の検出感度に関する検証を行った。既知部分配列から未知配列を明らかにする手法として LAM-PCR (lear-amplification-mediated PCR) 法を検討した。GM コメ (CpTI) を特異的に検知する LAMP 法を開発した。また、ゲノム編集に関連する論文等を調査し、ゲノム編集生物 (植物と動物) の開発状況と CRISPR/Cas9 に関する技術情報を文献およびデータベースから調査した。

アレルギー性予測解析ツールの一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。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、そのリスクの一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。

本研究は、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るものであり、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の評価に大きく貢献するものと考えます。

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、リスクコミュニケーション手法を開発することが期待される。

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

手島玲子	徳島文理大学香川薬学部 特任教授
今村知明	奈良県立医科大学 教授
小関良宏	東京農工大学大学院工学研究院 教授
太田大策	大阪府立大学大学院 教授
堀内浩幸	広島大学大学院 教授
近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所 部長
安達玲子	国立医薬品食品衛生研究所 室長
中村公亮	国立医薬品食品衛生研究所 室長

物(ウイルス抗原を組み込んだモデルGM乳酸菌、GM大腸菌から得られた抗原を表層に結合した乳酸菌、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た。分担研究者が、平成27年度はモデル乳酸菌、平成28年度はにわとり血清、平成29年度は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。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モデル組換え体とした。このGM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C2BBel1細胞を用いた評価系を検討した。

新規育種技術を用いて得られた食品の新しい検知法と評価法の開発では、新規育種技術の一つであるOligonucleotide Directed Mutagenesis(ODM)を用いて、セイヨウアブラナ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子に1塩基のみ変異させて得られたとされる除草剤耐性のセイヨウアブラナについて、検討した。

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。

リスクコミュニケーションについては、ゲノ

#### 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)、GM微生物

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。

#### 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所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所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出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

ウイルス抗原を組み込んだモデル乳酸菌の解析では、ウイルス抗原発現型 GM 乳酸菌（発現型乳酸菌）と GM 大腸菌で作らせた抗原を菌体表面層に結合させる乳酸菌（結合型乳酸菌）を用いて、両者の比較を行った。トランスクリプトーム解析により、発現型乳酸菌では、膜輸送体の一群タンパク質の転写が亢進しており細胞膜の変化が起こっていることが示唆された。GM 乳酸菌のプロテオーム解析では、抗原発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等に関係する細胞内エネルギー産生に関与するタンパク質であった。発現型乳酸菌で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し ATP 依存性に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質等があった。外界との物質の交換が盛んになっていて、細胞間コミュニケーションが行われやすい状況になっている一方で、細胞内の糖を介するエネルギー代謝能が、低下傾向にあるものと思われた。メタボローム解析では、両者の差はほとんど観察されなかった。

GFP 導入 GM 動物（ニワトリ）については、

雌のニワトリの野生種および GM から血液を採取し、白血球を得、発現している遺伝子についてマイクロアレイによりトランスクリプトーム解析を行った。明確にシグナルを検出できた遺伝子群 25,714 遺伝子を解析対象として、非組換え体と組換え体で発現変動遺伝子 1,883 遺伝子が得られた。このうち組換え体で非組み換え体の発現量の半分以下であった遺伝子が 299 遺伝子、組換え体で 2 倍以上の発現量を示したものが 27 遺伝子得られた。プロテオーム解析では、GM 並びに非 GM にわとりを用いて、それぞれ雌 3 個体の血清よりタンパク質を抽出し、2D-DIGE を行い、GM、NGM 間で発現に有意差のみられた 7 スポットにつき、タンパク質の同定を nanoLC-MS/MS 分析で行ったが、安全性の確認で、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、分析には、GFP タンパク質遺伝子組換え並びに非組換えにわとりから採取した血液を用いた。血漿サンプルの分析前処理法の最適化後、親水性画分と疎水性画分に分画した。それぞれの画分に含まれる代謝物をガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析装置によって計測し、222 個の代謝物ピークを再現性良く観測した。このうち 121 個の代謝物を同定し、統計解析を行った。

ゲノム編集ジャガイモ塊茎のトランスクリプトーム解析では、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。

オミクス解析では、比較個体が統計解析に十分な個体（本研究班で使用した検体では 3 個体）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、ターゲットを絞ったオミクス解析の安全性確認のためには、発現の比較的大きいタンパク質につき解析を行うことも可能であることが示され、にわとり血清タンパク質やジャガイモ塊茎タンパク質では、安全性確認に有用なバイオマーカーも探索することができた。

遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出では、エルシニアの表面層抗原 Invasin を菌体表面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。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 C2BBel1 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。

新規育種技術を用いて得られた食品の新しい検知法と評価法の開発では、新規育種技術の一つである Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM) を用いて、セイヨウアブラナ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子に 1 塩基のみ変異させて得られたとされる除草剤耐性のセイヨウアブラナについて、検討した。①従来の方法 (Cel-1 アッセイ法、制限酵素アッセイ法)、及び、②次世代シーケンサーを使用した新しい方法 (PCR-NGS 法) の検出感度に関する検証を行った。既知部分配列から未知配列を明らかにする手法として LAM-PCR (learn-amplification-mediated PCR) 法を検討した。GM コメ (CpTI) を特異的に検知する LAMP 法を開発した。また、ゲノム編集に関連する論文等を調査し、ゲノム編集生物 (植物と動物) の開発状況と CRISPR/Cas9 に関する技術情報を文献およびデータベースから調査した。

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。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。本研究は、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るも

のであり、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の評価に大きく貢献するものとする。

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、リスクコミュニケーション手法を開発することが期待される。

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ている。このような状況下で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、消費者の年代別による生物の基礎的知識やリテラシーの違いを把握し、年代によるコミュニケーション手法の検討、および円滑なリスクコミュニケーションに必要な要因の抽出を実施した。

①新たな説明ロジック及び説明ツールの開発として、平成 27 年度の研究成果を踏まえ、年代別の説明ロジックについて、ライフステージの変化に着目した消費者アンケートを設計し、実施した。また、食品安全に対する消費者意識の変化について、過去と同じ質問でのアンケート調査を実施し、消費者の食品安全に対する感度の変化を調べた。②先進国や食品以外の分野における事例調査として、GM サーモンについて、定期的に海外の報道状況に対する調査を行った。ゲノム編集に関する欧州の政策および研究開発の最新動向については、2017 年 2 月に開催される国際シンポジウムに参加して情報収集を実施した。

## E. 結論

GM 及び non-GM ニワトリのオミクス解析から、外来遺伝子が導入された TG ニワトリにおいて、代謝系、遺伝子の転写系及び翻訳されるタンパク質で non-TG ニワトリと比較して大きく変動

する因子が特定された。これは組換え体由来の産物ベース（いわゆるプロダクトベース）での安全性評価項目として、GMの有無、食品としてヒトが摂取した際の安全性の基準として利用できることが予想される。

プロテオミクス解析は、遺伝子組換え食品の安全性評価において、非組換え食品との定量的比較解析により有用な情報を与えることが示された。また、ターゲットを絞ったオミクス解析の安全性評価への応用も可能と思われ、安全性評価に有用なバイオマーカーの探索にも道を開くものと思われる。さらに、遺伝子組換えにより宿主に引き起こされる現象の作用機作を知る観点からも有用であることが示された。GM微生物とヒト腸管上皮細胞との相互作用の検討では、安全性評価に用いる実験系としての知見の集積を行うことができた。

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。

新規育種技術の一つであるODMを利用して開発され、海外では商業栽培が計画されている除草剤耐性セイヨウアブラナ 5722 系統の検知が可能かを検証すること、また、ゲノム編集部位とその周辺の状態を評価する新しい方法の開発が期待できる。

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、そのリスクの一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。本研究は、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るものであり、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の評価に大きく貢献するものと考えられる。

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、リスクコミュニケーション手法を開発することが期待される。

## F. 健康危険情報

## 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 (in press)
- 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 (in press)
- 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) 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
- 5) 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
  - 6) 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.
  - 7) Komoto K., Okamoto S., Hamada M., Obana N., Samori M., and Imamura T. Japanese consumer perceptions of genetically modified food: Findings from an international comparative study. *Interactive Journal of Medical Research*, 2016, vol. 5, iss. 3, e23, p.1-19.
  - 8) 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. *Japanese J. Food Chem. Safety* 23, 9-19, 2016
  - 9) 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)
  - 10) Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. “Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272” *Food Hyg. Saf. Sci.* 57, 1-6 (2016)
  - 11) Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S, Poulsen LK, Privalle L, Ward JM, Doerrner N, Rascle JB. “Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens” *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198-2207 (2016)
  - 12) 今村知明、高谷幸、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、森川恵介、長谷川専、山口健太郎、池田佳代子. 食品防御の考え方とその進め方～よくわかるフードディフェンス～. 今村知明 編著. 2015 Apr;p.1-243 全文.
  - 13) 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.
  - 14) Satoh R., Teshima R. “Genetically modified organisms in food” 40. *Allergen Analysis in plants and use in the assessment of genetically modified plants.* ed., Watson RR and Preedy VR, Academic Press, pp453-463 (2015)
  - 15) 今村知明. 【第2版】食品の安全とはなにか-食品安全の基礎知識と食品防御-. 2015; p.1-237
  - 16) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H. Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via

down-regulation of T helper 17 (Th17) cell responses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 1406-1410, 2015.

- 17) Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015.
- 18) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 240, 413-422, 2015.

## 2. 学会発表

- 2) 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。乳酸菌学会セミナー（2015.5、サンライズ淡路）
- 3) 康原夏子、岡本左和子、和田千津子、植原慶太、濱田未来、尾花尚弥、今村知明。医療における国民のリスク認知と意思決定に関する研究。第54回近畿公衆衛生学会。2015.5.
- 4) 岡本左和子。医療の質向上を目指して～患者と医療者を守るため医療コミュニケーション～。第114回日本皮膚科学会総会。2015.5.
- 5) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上（西巻）知子：次世代ゲノム編集技術による遺伝子組換え食品の内在性遺伝子発現への影響、日本食品化学学会 第21回総会・学術大会、2015.5.
- 6) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えヒヨコマメ検査法確立に向けたヒヨコマメ内在性遺伝子(CaNCED)特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第21回総会・学術大会、2015.5.
- 7) 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：食品遺伝子検査を簡易化するダイレクトリアルタイム PCR、2015年度 AOAC International 日本セッション年次大会、2015.6.
- 8) 梶川 揚申、緑川 恵美子、近藤 和穂、入澤 友啓、榊田 和彌、五十君 静信、田中 尚人、岡田 早苗。Lactobacillus agilis BKN88 のべん毛におけるフラジェリンの構成。日本乳酸菌学会 2015 年度大会。2015.7. 和洋女子大
- 9) 赤間一望、田中健一、石浜峻、榊田和彌、佐々木泰子、川名敬、五十君静信。Lactobacillus casei IGM394 を用いた HPV 16 E7 ワクチンの開発。日本乳酸菌学会 2015 年度大会。2015.7. 和洋女子大
- 10) 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。日本乳酸菌学会 2015 年度大会・セミナー。2015.7. 和洋女子大
- 11) 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。有用乳酸菌株の情報公開。日本微生物資源学会。2015.9.
- 12) 高倉麻菜美、田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。東京農大菌株保存室に保存されている菌株の機能～Micrococcus luteus に対する抗菌性について～。食香粧研究会。2015.9
- 13) 岡本左和子、尾花尚哉、濱田未来、今村知明。がん患者の治療前後の状況の変容に伴った支援に関する研究。日本ヘルスコミュニケーション学会第7回学術集会。2015.9.
- 14) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穂山浩、近藤一成、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、最上（西巻）知子：未承認遺伝子組換え食品検知法の開発：未承認遺伝子組換えジャガイモ検知を例に、第1回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2015.9.
- 15) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上（西巻）知子、高島令王奈、橘田和美：リアルタイム PCR による DNA 断片化測定法の改良と市販加工食品の分析、第110回日

- 本食品衛生学会学術講演会, 2015. 10.
- 16) 高畠令王奈, 鍵屋ゆかり, 峯岸恭孝, Sabina Yeasmin, 布籐聡, 野口秋雄, 近藤一成, 最上 (西巻) 知子, 真野潤一, 橘田和美: LAMP 法による安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの網羅的簡易迅速検知法の開発, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会, 2015. 10.
  - 17) 野口秋雄, 近藤一成, 最上 (西巻) 知子: LAMP 法を用いた遺伝子組換え作物の簡易検査法の開発, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015. 10.
  - 18) 坂田こずえ, 近藤一成, 野口秋雄, 中村公亮, 福田のぞみ, 石垣拓実, 最上 (西巻) 知子, LAM-PCR を用いた組換え作物中の未知領域解析法の検討, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会, 2015. 10.
  - 19) 野口秋雄, 町井香苗, 中村公亮, 真野潤一, 高畠令王奈, 橘田和美, 川上浩, 近藤一成, 最上 (西巻) 知子: 遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会, 2015. 10.
  - 20) 菅野陽平, 坂田こずえ, 野口秋雄, 中村公亮, 小林友子, 福田のぞみ, 佐藤正幸, 青塚圭二, 鈴木智宏, 最上知子, 手島玲子, 近藤一成: ツキヨタケの PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討 (第 2 法): 加熱, 消化処理サンプルへの適用, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会, 2015. 10.
  - 21) 中村公亮, 近藤一成, 石垣拓実, 野口秋雄, 坂田こずえ, 福田のぞみ, 大森清美, 真野潤一, 橘田和美, 最上 (西巻) 知子: 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN 系統) の検出と検知法開発, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会, 2015. 10.
  - 22) 岡本左和子, 野田龍也, 濱田美来, 尾花尚哉, 今村知明. 治療に伴うリスクの受容と決断のための患者のニーズと医師からの支援. 第 74 回日本公衆衛生学会総会, 2015. 11.
  - 23) 康原夏子, 岡本左和子, 濱田美来, 尾花尚弥, 今村知明. 国民の受療意思へのリスク情報の影響に関する研究. 第 74 回日本公衆衛生学会総会, 2015. 11.
  - 24) 康原夏子, 岡本左和子, 今村知明. 糖尿病の発症・治療状況と社会性の関連に関する考察. 第 36 回奈良県公衆衛生学会, 2015. 11.
  - 25) Kondo, K., Sakata, K., Noguchi, A., Nakamura, K., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. A new analytical methodology for unknown genetically modified organisms using linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR), 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015. 11.
  - 26) Kondo, K., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. Rapid identification of poisonous *Entoloma rhodopolium* and edible *E. sarcopum* mushrooms using PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR, 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015. 11.
  - 27) Nakamura, K., Ishigaki, T., Hanada, K., Akimoto, S., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. DNA methylation pattern analysis of common plant virus promoter used to develop genetically modified crops, PacifiChem2015, Hawaii, USA, 2015. 12.
  - 28) 中川祐樹, 江崎僚, 佐久間哲史, 黒岩麻里, 山本卓, 堀内浩幸, ゲノム編集技術を用いた鳥類の性決定関連遺伝子の解析, 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 (神戸) 江崎僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 堀内浩幸. アポトーシス阻害剤を活用したニワトリ始原生殖細胞の新規培養方法. 第 39 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日 (横浜)
  - 29) 平野朝子, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリエピブラスト幹細胞はナイーブ型かプライム型か. 第 39 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日 (横浜)
  - 30) 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 石垣拓実, 野口秋雄, 坂田こずえ, 福田のぞみ, 大森清美, 布施谷実聡, 川上浩, 田中秀典, 明石良, 真野潤一, 橘田和美, 最上 (西巻) 知子: 我が国における未承認遺伝子組換えパパイヤの食品への混入に関する事例と検知法開発の現状, 第 5 2 回全国衛生化学技術協議会年会, 2015. 12.
  - 31) 野口秋雄, 中村公亮, 真野潤一, 高畠令王

- 奈、橘田和美、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の妥当性評価、第52回全国衛生化学技術協議会年会、2015.12.
- 32) 福田（佐藤）のぞみ、近藤一成、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、最上（西巻）知子：遺伝毒性試験および全ゲノム解析を用いたCRISPR/Cas9のDNA2本鎖切断ポテンシャル、第38回日本分子生物学会年会、2015.12.
- 33) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上（西巻）知子：汎用性ウィルスプロモーター導入によるクロマチンループ内の内在性遺伝子発現への影響、日本薬学会 第136年会、2016.3.
- 34) 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、高島令王奈、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
- 35) 高島令王奈、鍵屋ゆかり、峯岸恭孝、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上（西巻）知子、真野潤一、橘田和美：LAMP法を用いた安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシのスクリーニング的定性検知法開発、日本食品化学学会 第22回総会・学術大会、高知、2016年6月
- 36) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、勝又啓史、高崎一人、布藤聡、坂田こずえ、福田のぞみ、真野潤一、橘田和美、田中秀典、明石良、最上（西巻）知子：安全性未審査の遺伝子組換えパパイア検知に向けた全ゲノムシーケンシング技術応用の検討について、日本食品化学学会 第22回総会・学術大会、高知、2016年6月
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 高島令王奈、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、2016年度AOAC日本セクション年次大会、東京、2016年7月
- 40) 高島令王奈、増渕友子、布藤聡、峯岸恭孝、野口秋雄、近藤一成、手島玲子、倉嶋たけ代、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えトウモロコシMIR162の系統特異的定量検知法の開発および妥当性確認、2016年度AOAC日本セクション年次大会、東京、2016年7月
- 41) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、高島令王奈、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、2016年度AOAC日本セクション年次大会、東京、2016年7月
- 42) 小川拓水、鹿島光司、幸義和、岡澤敦司、清野宏、太田大策、コメ型経口ワクチンMucoRice-CTBのメタボローム解析、第34回日本植物細胞分子生物学会大会 2016年9月（上田）
- 43) Ezaki R, Hirose F, Furusawa S, Horiuchi H. Stable and simple culture protocol for chicken primordial germ cells using apoptosis inhibitor. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22, 2016, Fukuoka
- 44) Nakagawa Y, Ezaki R, Sakuma T, Kuroiwa A, Yamamoto T, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken primordial germ cells using genome editing tools. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima
- 45) Kameyama F, Nakagawa Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken epiblast derived stem cells using CRISPR/Cas9. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima.6.
- 46) 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、高島令王奈、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 10 月
- 47) 中村公亮, 石垣拓実, 野口秋雄, 坂田こずえ, 加藤怜子, 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 10 月
- 48) 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 10 月
- 49) 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
- 50) 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, 高島令王奈, 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
- 51) 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
- 52) 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
- 53) 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
- 54) 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)
- 55) 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)
- 56) 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)
- 57) 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
- 58) 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
- 59) 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, 高島令王奈, 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
- 60) 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
- 61) 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
- 62) 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
- 63) 藤井宇希, 中西希代子, 中村公亮, 大槻 崇, 曾我慶介, 岸根雅宏, 高島令王奈, 橘田和美, 川上浩, 龜山浩, 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

- 64) 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
- 65) 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
- 66) 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
- 67) 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)
- 68) 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。日本農芸化学会年次大会。2018. 3. 16 名古屋

#### 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

質量分析データ等の一般公開 3 件

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、サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌と、非組換え乳酸菌(宿主菌)について、網羅的オミクス解析を行い両者の違いについて検討を行った。オミクス解析は、プロテオーム解析(手島博士)、メタボローム解析(太田博士)、トランスクリプトーム解析(小関博士)が分担した。プロテオーム解析については、大腸菌で鞭毛抗原—アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、非組換え乳酸菌にふりかけアンカーにより菌体表層に結合させた組換え遺伝子を含まない乳酸菌についても解析し、遺伝子組換え乳酸菌、宿主菌との比較を行った。平成28年度からは遺伝子組換え微生物の安全性評価に有用と思われる評価法の検討として、組換え体とヒト腸管上皮細胞への影響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として頻りに用いられる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行った。培地、宿主乳酸菌、組換え乳酸菌の三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、安全性評価に活用可能と思われる。

手島玲子 徳島文理大学香川薬学部

協力研究者

梶田和彌 東京農業大学/昭和女子大学

小関良宏、宮原平 東京農工大学大学院

太田大策 大阪府立大学大学院  
梶川揚申、檜木真吾、武田昌之、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を行った。平成 28 年度からは遺伝子組換え微生物の安全性評価に有用な評価法として、組換え体のヒト腸管上皮細胞への影響に関する検討を行った。

## B. 研究方法

### (1) 網羅的オミクス解析

遺伝子組換えモデル乳酸菌としては、サルモネラ鞭毛抗原（フラジェリン）の遺伝子を乳酸菌用ベクタープラスミドに組み込み、菌体表層に固定化して発現させた。比較には元

株である *Lactobacillus casei* IGM393 株を用いた。手法の詳細については、当該年度 of 分担報告書を参照。それぞれのオミクス解析に湿重量 1g を調整。（1g 湿重量あたりのタンパク質含量 10 数%, RNA 含量 1-2mg）。プロテオーム- 2D-DIGE（LC-MS/MS）（手島）2D-DIGE 並びにショットガン LC-MS によるプロテオーム解析及びアレゲノーム解析を行った。詳しい分析方法等は、手島博士分担報告書を参照。

メタボローム --- LC-MS, GC-MS etc.  
（太田）乳酸菌のメタボローム解析には、集菌後クエンチ溶液として、0.85% (w/v) 炭酸アンモニウムを含む 60% メタノール溶液を用いた。

菌体の処理方法、分析方法等は、平成 27 年度太田博士分担報告書参照。

トランスクリプトーム - DNA tip（小関）乳酸菌のトランスクリプトーム解析には適したアレイチップを用意できなかったため次世代シーケンサーによる mRNA 網羅的解析（RNA-seq）によって組換え体とベクターコントロールでの遺伝子発現解析を行った。解析は、rRNA 枯渇処理の後、次世代シーケンサー HiSeq2000 によって 2000 万リードでユーロフィン社に委託した。

プロテオーム解析用追加試料として、以下の検体を作成した。GM 乳酸菌の比較対象として、フラジェリン抗原を菌株表層固定化された組換えにならない乳酸菌を使用：具体的には、大腸菌にフラジェリン抗原-アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、精製タンパク質を non-GM 乳酸菌死菌に混ぜて、アンカーの電氣的チャージにより菌体表層に結合させて作成した。

解析方法：元株、遺伝子組換え体、人工固定乳酸菌（非組換え体）の 3 種の乳酸菌のたんぱく質発現の差を 2D-DIGE で解析した。

### (2) 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、ノサン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。

### (3)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 C2BBel 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。C2BBel 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℃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) 網羅的オミクス解析

#### ①プロテオーム解析

2D-DIGE による、a)GM、b)non-GM の比較では、菌体の処理を行った a)に対して b)が、1.5 倍以上減少したスポットが 6 スポット、同増加したスポットは 6 スポットであった。培養上清では、同減少が 11 スポット、同増加が 4 スポットであった。GM で増加した菌体抽出から 3 スポット、non-GM で増加したスポット 1 について、培養上清では GM で増加したスポット 2

つを選び、MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。図など詳しいデータは “新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究” 平成 27 年度総括・分担研究報告書の手島博士の分担報告書に示した。

#### ②メタボローム解析

生菌数及び細胞ペレット湿重量の菌株間の比較では、サルモネラ鞭毛発現株 (GM) は、非発現株(non-GM)よりも増殖が遅いことが推定された。

GM 株と non-GM 株で、GC-MS 分析で、それぞれ 289 個、235 個の代謝物ピークを特定した。極性画分の誘導体化試料では 69 個 (同定率 23.9%)、非極性画分の誘導体化試料では 52 個 (同定率 23.1%) の代謝物ピークを同定した。

GM と non-GM を区別するような明確なクラスター分離、および代謝物蓄積の相違は認められなかった。図など詳しいデータは “新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究” 平成 27 年度総括・分担研究報告書の太田博士分担報告書に示した。

#### ③トランスクリプトーム解析

次世代シーケンスの結果、タンパク質をコードしている 2,997 遺伝子の配列を獲得し、この獲得配列の 8 割程度を今回使用した IGM393 株と同系統の *Lactobacillus casei* BL23 株のゲノム配列にマッピングすることができた。*L. casei* BL23 は 3,044 種のタンパク質をコードする遺伝子の存在が報告されていることから

今回の次世代シーケンスの結果はほぼ全ての遺伝子の配列を網羅できた結果となった。ベクターコントロールとの遺伝子発現量を比較した結果、フラジェリン遺伝子組換え体では 20 種類の遺伝子で発現が上昇していることが示された。特にゲノム領域の LCABL\_03590 ~ 03730 の遺伝子の発現がフラジェリン遺伝子組換え体において特異的であることが示された。また、トランスポゼースをコードする 1 遺伝子のみがフラジェリン遺伝子組換え体で発現が低下していた。図など詳しいデータは“新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究”平成 27 年度総括・分担研究報告書の五十君分担報告書に示した。

この結果を受けて、元株及び GM 株の全ゲノム解析を行い、観察されたゲノムの一部の大幅な欠損が生じているかどうかの検証を行ったところ、GM 株では、ゲノムが欠損していることが検証された。この結果を受けて、遺伝子欠損部分のトランスクリプトームの評価を除き、再度 GM と non-GM 株におけるトランスクリプトーム評価を行った結果を表に示した。

## (2) 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。

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テ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テ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テ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。

## (3) 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 C2BBe1 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 C2BBe1 細胞と接着、取り込みを起こすかを評価したところ、組換えにより接着、取り込み菌数共に増大した。

C2BBe1 細胞からトータル RNA を回収し、メッセンジャー 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。

尤度比検定による発現量差の検定結果 MA 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平成 29 年度報告書に示した。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 (*NFKBIA*, *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。

## D. 考察

### (1) 網羅的オミクス解析

#### ①プロテオーム解析

挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GMでnon-GMと比べ増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。この事実は、以前この乳酸菌モデル組換え体を培養細胞で評価したところ、GMはnon-GMに比べ細胞からのTNF誘導活性が低下しており、その理由として細胞壁のプロテアーゼに対する抵抗性が低下しているという知見との関連が示唆された。GMでは、異種由来のタンパク質であるサルモネラの鞭毛抗原の発現により、その対応として細胞壁の融解酵素を誘導しているものと思われる。

#### ②メタボローム解析

GMとnon-GMでは、増殖性がやや異なっていた。代謝物蓄積量を定量的に比較したが、遺伝子組換えが原因であると判定すべき代謝物プロファイルの差は認められなかった。

#### ③トランスクリプトーム解析

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌では、フラジェリン遺伝子組換え体の株において特徴的にゲノムの特定の領域の遺伝子に発現が見られた。使用したベクターコントロール株において組換え時または培養変異などの要因によりこのゲノム領域が欠落していることが今回の全ゲノム解析の結果、確認された。この領域以外の遺伝子で発現が変動している遺伝子は、プロテ

オーム解析で得られたGMとnon-GMの間に認められた細胞壁の分解酵素について、トランスクリプトーム解析でも同様な結果が得られた。

### (2) 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。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°Cあるいは 37°C 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。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、 $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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(イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来)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  $\beta$ 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。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- $\kappa$ 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 と関わりの深い物質である。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

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌のプロテオーム解析では、GM で、挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、細胞壁の分解酵素の増加が確認された。メタボローム解析では、代謝物蓄積量を定量的に比較したが、遺伝子組換えが原因であると判定すべき代謝物プロファイルの差は認められなかった。トランスクリプトーム解析ではコントロール株の一群の遺伝子の脱落が示唆され、全ゲノム解析を行ったところ、GM 株の一部の遺伝子群の欠損が確認された。欠損部分を除いた、両者の差は、プロテオーム解析と同様に細胞壁の分解酵素の増加が示された。

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、ノサシ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 C2BBel1 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。それぞれの遺伝子の動きを評価することが可能であり、この手法は組換え体とヒト腸管上皮細胞との反応に関する評価系として非常に有用な評価系であると思われた。

## 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)
- ④ 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.

### 2. 学会発表

- ① 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。乳酸菌学会セミナー(2015.5、サンライズ淡路)
- ② 梶川揚申、緑川恵美子、近藤和穂、入澤

友啓、梶田和彌、五十君静信、田中尚人、岡田早苗。*Lactobacillus agilis* BKN88のべん毛におけるフラジェリンの構成。日本乳酸菌学会2015年度大会。2015.7。和洋女子大

- ③ 赤間一望、田中健一、石浜峻、梶田和彌、佐々木泰子、川名敬、五十君静信。*Lactobacillus casei* IGM394を用いたHPV 16 E7ワクチンの開発。日本乳酸菌学会2015年度大会。2015.7。和洋女子大
- ④ 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。日本乳酸菌学会2015年度大会・セミナー。2015.7
- ⑤ 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。有用乳酸菌株の情報公開。日本微生物資源学会。2015.9。和洋女子大
- ⑥ 高倉麻菜美、田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。東京農大菌株保存室に保存されている菌株の機能～*Micrococcus luteus*に対する抗菌性について～。食香粧研究会。2015.9
- ⑦ 檜木真吾、永井貴久、佐々木泰子、五十君静信。抗がん剤の宿主として利用するための酸素感受性 *Lactobacillus casei* IGM394の作出。日本乳酸菌学会。2016.7.9-10。北里大学白金
- ⑧ 関根侑、野口実莉、石浜峻、梶田和彌、梶川揚申、横田健治、五十君静信。*Lactobacillus casei*が有する免疫誘導分子の探索系の構築。日本農芸化学会2017年度大会。2017.3.18-20。京都
- ⑨ 藤原公紀、横田健治、五十君静信、梶川揚申。遺伝子検出法を用いた動物腸管由来運動性 *Lactobacillus* 属細菌の検索。日本農芸化学会2017年度大会。2017.3.18-20。京都
- ⑩ 近藤和穂、横田健治、五十君静信、梶川揚

申。 *Lactobacillus agilis* BKN88 における走化性の解析。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京都

- ⑪ 辻光倭、鈴木俊也、横田健治、五十君静信、梶川揚申。IL-1 ファミリーサイトカイン分泌乳酸菌の構築と評価。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京都
- ⑫ 五日市悠、柴崎泰基、横田健治、五十君静信、梶川揚申。酢酸菌の免疫刺激作用に与する菌体構成成分の探索。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京都
- ⑬ 鈴木俊也、横田健治、五十君静信、梶川揚申。乳酸菌由来 S-layer タンパク質の免疫学的特性。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京都
- ⑭ 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
- ⑮ 檜木真吾、永井貴久、佐々木泰子、五十君静信。抗がん剤の宿主として利用するための酸素感受性 *Lactobacillus casei* IGM394 の作出。日本乳酸菌学会。2016.7.9-10。北里大学白金。
- ⑯ 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
- ⑰ 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。日本農芸化学会年次大会。2018.3.16 名古屋

### 3. その他発表

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究」  
総合研究報告書（平成 27～29 年度：分担）

### バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析

研究分担者 手島玲子 徳島文理大学香川薬学部 特任教授

研究要旨： バイオテクノロジー応用生物体のプロテオーム解析に関する調査研究として、(1) E7 パピローマウイルス膜抗原発現乳酸菌株(E7 発現株)並びに E7 結合乳酸菌株(E7 結合株)、EGFP タンパク質遺伝子組換え雌にわとり並びに非組換え雌にわたりの血清、ゲノム編集でグリコアルカロイドの含量の減少させた形質転換系統じゃがいも並びに野生株の塊茎を用いて、それぞれ n=3 で調製したサンプルからタンパク質を抽出し、2D-DIGE による網羅的解析に供し、(2) 蛍光画像は Typhoon に取り込み比較定量解析し、差のみられたスポットにつき、タンパク質の同定を nanoLC-MS/MS 分析で行った。E7 発現株と E7 結合株の両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析では、約 2400 のスポットのうち、2 倍以上並びに 3 倍以上の発現の差異のあるスポットが 66 個及び 20 個確認された。E7 発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等の細胞内エネルギー産生に關与するタンパク質が多く、一方、E7 発現株で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し ATP 依存的に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質等があった。EGFP タンパク質遺伝子組換え (GM) 並びに非組換え (NGM) 雌にわたりの血清タンパク質の網羅的比較解析では、約 2000 のスポットのうち、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 18 個観察され、それらのスポットのうち 6 個についてと、発現の差異が 1.3 程度であるが  $P < 0.005$  の 4 スポットについて MS 解析にて同定を行った。その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなかった。ゲノム編集 (TG-P) 並びに野生型 (NT-P) じゃがいも塊茎タンパク質の網羅的比較解析では、約 5500 のスポットのうち、両群の比較で、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 13 個 (増加 5 個、減少 8 個) 観察され、それらのスポットのうち 10 個について MS 解析にて同定を行った。その結果、TG-P で上昇のみられたタンパク質として、Heat shock 70kDa protein, patatin-11 が同定された。なお、両群で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットは 4 倍に増加のみられた 1 スポット以外にはなかった。

以上、3 種のバイオテクノロジーの生産体と非組換え体の間で有意に 3 倍以上の差のみられるスポットはほとんどなく、安全性上で問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。プロテオミクス解析は、作用機作を知る観点から有用であるとともに、安全性評価への応用に関しても、野生型と形質転換群の間で統計解析に十分なサンプル (本分担研究では 3 サンプル以上) が提供される場合の網羅的プロテオーム解析の有用性が示された。また、発現差の比較的大きいタンパク質の同定から、にわとり血清タンパク質では C-reactive protein, じゃがいも塊茎では、Heat shock 70kDa protein が安全性評価に有用なバイオマーカーになるものと思われた。

#### 研究協力者

西島正弘 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員

酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部

佐藤里絵 (独) 農研機構 食品総合研究所

#### A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物に限らず、遺伝子組換えに

わとりやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実用化されつつある。またゲノム編集という新しい技術による動植物のバイオテクノロジー応用食品も開発され、実用化されつつある。これらはこれまで存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討しておく必要があると考えられる。バイオテクノロジー技術による安全性を考えるうえで、バイオテクノロジー技術による非意図的な影響を明らかにすることが必要であり、プロテオミクス等の網

羅的解析法も一つの有用な方法になると考えられる。そこで本分担研究ではバイオテクノロジー技術生産品と野生型を用いて 2D-DIGE を用いてプロテオミクスによる網羅的解析を行い、両者の比較を行うこと及び発現に差違のあったタンパク質の同定を行って、Mode of action (MOA)を知ること、また安全性評価への応用について検討することを目的とする。

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

## B. 研究方法

### (1) 供試試料

- a) アパピローマウイルス膜抗原発現乳酸菌株 (E7 発現株)並びに E7 結合乳酸菌株(E7 結合株)は、国立医薬品食品衛生研究所五十君博士より供与いただいた。菌体は、培養後遠心して回収し、PBS で洗浄し、破碎後液体窒素で急速凍結し、-80℃で保管した。
- b) EGFP タンパク質遺伝子組換え(GM)雌にわとり並びに非組換え(NGM)雌にわたりの血清は、広島大学大学院堀内教授より供与いただいた。具体的には、1 か月令の雌 GM, NGM それぞれ 3 匹ずつの組換えニワトリ血清約 0.5ml を供与いただいた。供与いただいたサンプルは、-80℃ディープフリーザー内に保管した。
- c) ゲノム編集じゃがいも(TG-P)並びに野生株 (NT-P)の塊茎は、理化学研究所環境資源科学研究センター統合メタボロミクス研究グループの梅基直行先生より供与いただいた。具体的には、TG-P 及び NT-P じゃがいも塊茎それぞれ約 1g からなる乾燥した 3 サンプルを供与いただいた (サンプル TG; TG-P1, TG-P2, TG-P NT; NT-P1, NT-P2, NT-P3)。供与いただいたサンプルは、-80℃ディープフリーザー内に保管した。

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

- a) 乳酸菌試料については、重量測定後に 10 倍容の Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、7M 尿素、2M チオ尿素、5 mM 酢酸マグネシウム、4%(w/v) CHAPS、4mM Pefabloc SC PLUS)を加えた後に超音波処理(20 秒間 ON + 30 秒間 OFF のサ

イクルを 3 回繰り返した)を実施した。超音波処理後に、8,000xg で 10 分間遠心した後の上清を評価用試料とした。

処理後のタンパク質溶液に対して、200 pmol のCy3(DMF溶液、1 $\mu$ l)はCy5(DMF溶液、1 $\mu$ l)を添加した。N=3でサンプルを調製した。また、評価用試料を全て混合したものをプール試料とし、プール試料に対して200 pmolのCy2(DMF溶液、1 $\mu$ l)添加後に氷上にて30分間静置してラベリング反応を実施した。反応液に過剰量のリジン溶液 (10mM溶液、2 $\mu$ 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<sup>TM</sup> DryStrip pH3-11 NL 24cmを用い、試料はカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで44.2 kWh (300 V; 4 hr, 300-3500 V; 5 hr, 3500 V; 10 hr) 行った。泳動後、平衡化溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.8、6 mol/L尿素、30vol%グリセロール、2%(w/v) SDS) に 0.25%(w/v) DTTを添加したA液及び同様に 4.5%(w/v) IAAを添加したB液に対して各々10分間ずつ平衡化を行った。
- (b) 二次元目電気泳動条件：平衡化終了後、Ettan DALT IIシステム (GEヘルスケア バイオサイエンス) 及び12%(w/v)均一ポリアクリルアミドゲル (自作)を用いて二次元目のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動は、30 W (15℃) 一定で泳動先端が完全に溶出するまで (約15時間) 行った。

ゲル画像取り込みは、Typhoon9400 (GEヘルスケア社) を使用して行い、二次元電気泳動ゲルイメージは、Dycyber Ver7.0 (GE ヘルスケア社) を用い、画像品質確認及び定量比較解析を行った。

次いで、発現量の変動のみられたタンパク質については、質量分析用の Ruby 染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析 (2D-DIGE) のゲルイメージをDecyber BVA ソフトを用いてマッチングして、2D-DIGE の解析結果

に基づいて22スポット(No. 417, 184, 845, 1508, 728, 1227, 1857, 893, 1436, 1592, 1830, 1784, 1351 800, 451, 1637, 448, 827, 2494, 976, 499, 474)を指定し、スポットピッカー (GEヘルスケア)を用いてゲルプラグをピックアップした。ピックアップしたゲルプラグを50%メタノール溶液で洗浄した後に、100  $\mu$ 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  $\mu$ Lを添加して57°Cで30分間静置した。さらに、アルキル化処理液(10 mgのヨードアセトアミドを1 mlの100 mM炭酸水素アンモニウムに溶解)10  $\mu$ 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  $\mu$ Lを加えた後に、50 mM炭酸水素アンモニウム10  $\mu$ Lを加えた。チューブを30°Cに設定したドライバス上で一晩インキュベートして消化した。消化後の液を含むチューブを遠心乾燥機に入れて乾燥した。乾燥後にLC-MS/MS測定用の溶媒(1%蟻酸)20  $\mu$ Lを加えた。チューブをVortexした後にMS解析用Total recovery tube(ウォーターズ社)に移した。

回収したペプチド溶液の、nanoLC-MS/MS分析は、LC部分にUltiMateR 3000 HPLC(ダイオネクス社)、質量分析装置にQ-Exactive Plus(サーモサイエンティフィック社)を用いてXcalibur(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)でLC及びMSを制御して測定を実施した。LC、MSの分析条件を以下に示した。データベースは検索はMascot(マトリックスサイエンス社)を使用しSwiss-Prot及びNCBIInrの最新版に対して、Lactobacillus(*Taxonomy ID:1578*)を指定もしくは、指定せずに検索を行った。

**b)組換え及び非組換えにわたりの血清**  
にわたり血清試料各32  $\mu$ LにBuffer A(Equiload wash, Agilent cat No. 5185-5987)368  $\mu$ Lを添加して攪拌し、Spin Filters(0.22  $\mu$ m)でろ過した後、Multi Affinity Removal Spin Cartridge MARS Hu-6HCで試料中のアルブミン等を除去した。除去後の試料をAmicon Ultra-0.5により濃縮した試料を評価用試料とした。

全評価用試料を等量ずつ混合したプール試料に対して200 pmolのCy2(200  $\mu$ mol/L DMF溶液、1  $\mu$ L)を添加した。また、各評価用試料に対して200 pmolのCy3及びCy5(200  $\mu$ mol/LDMF溶液、1  $\mu$ 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  $\mu$ L)を添加して10分間保持し反応を終了した。反応終了後に反応液総量と等量の2 $\times$ サンプルバッファー(8 mol/L尿素、4%(w/v)CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL)を添加してさらに10分間氷上に保持したものを2D-DIGE解析用の試料とした。

二次元電気泳動は、上記a)の乳酸菌の項目で行ったと同じ方法で行った。

発現量の変動のみられたタンパク質については、質量分析用のRuby染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析のゲルイメージをDecyder BVAソフトを用いてマッチングして、個体間で発現変動の大きかった10スポット(No. 279, 613, 646, 724, 1327, 1360, 1366, 1594, 1779, 1783)をスポットピッカー(GEヘルスケア)を用いてピックアップした。ピックアップしたゲルプラグの処理及びnanoLC-MS/MS分析は、上記a)の乳酸菌の項目で行ったと同じ方法で行った。データベースは検索はMascot(マトリックスサイエンス社)を使用しNCBIInrの最新版に対して、Gallus gallusを指定して検索を行った。

#### **c) ゲノム編集及び野生型じゃがいもの塊茎**

じゃがいも塊茎試料にLysis Buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、7M尿素、2Mチオ尿素、5 mM酢酸マグネシウム、4%(w/v)CHAPS、1錠/50mL Complete Inhibitor Cocktail Tablets)2 mLを加えて混和した。混和後に超音波処理(0.2秒間ON + 0.3秒間OFFのサイクルで20秒間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  $\mu$ mol/L DMF溶液、1  $\mu$ L)を添加した。また、各評価用試料に対して200 pmolのCy3及びCy5(200  $\mu$ mol/LDMF溶液、1  $\mu$ 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  $\mu$ L)を添加して10分間保持し反応を終了した。反応終了後に反応液総量と等量の2 $\times$ サンプルバッファー(8 mol/L尿素、4%(w/v)CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL)を添加してさらに10分間氷上に保持したものを2D-DIGE解析用の試料とした。

二次元電気泳動は、上記a)の乳酸菌の項目で

行ったと同じ方法で行った。

発現量の変動のみられたタンパク質については、質量分析用の Ruby 染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析のゲルイメージを Decyder BVA ソフトを用いてマッチングして、個体間で発現変動の大きかった 10 スポット (No. 1845, 2566, 2618, 2630, 2657, 2901, 2054, 4851, 5401, 5648) をスポットピッカー (GE ヘルスケア) を用いてピックアップした。ピックアップしたゲルプラグの処理及び nanoLC-MS/MS 分析は、上記 a) の乳酸菌の項目で行ったと同じ方法で行った。データベースは検索は Mascot (マトリックスサイエンス社) を使用し NCBI nr の最新版に対して、Solanum tuberosum (Potato) を指定して検索を行った。

### C. 研究結果

#### (1) E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

Dycyler DIA ソフトを使用して自動検出されたタンパク質のスポット数は、各サンプルあたり約 2400 であった。E7 発現株タンパク質で、E7 結合株タンパク質に対して 2 倍以下の減少が検出されたスポットは 36 個で、2 倍以上の増加のみられたスポット数は 30 個であった。なお、3 倍以上の変動のみられたタンパク質に限定すると、変動のみられたタンパク質は 20 個であった。

発現のみられたタンパク質のうち、方法の項目で述べた 22 スポットを選択し、MS 解析を行った。E7 発現株で減少のみられたタンパク質には、グルコース、ガラクトース、マンニトール等の糖代謝等に関係する細胞内エネルギー産生に関与するタンパク質が多く、一方、E7 発現株で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し ATP 依存性に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質や細胞膜表面で働く  $\alpha$ -アミラーゼ等があり、外界との物質の交換が盛んになっていることが示唆された。なお、パピローマウイルス関連では、唯一、E1 ロテイン (Lynx rufus papilloma-virus type 1) (gi 62547900) が coverage 4% と低いけれども検出された。

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

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

で検出された。6 種の定量比較画像の各スポットの蛍光強度データについて変動の大きさにつき解析を行ったところ、GM 群と non-GM 群の比較で、有意差 ( $p$  値  $< 0.05$ ) があり、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 18 個観察された。それらのスポットのうち 6 個について、MS 解析を実施することを計画した。なお、6 個のうち 3 個のスポットについては、平成 27 年度の non-GM のにわたりの雌雄の血清の個体差を調べる予備検討でタンパク質を同定済みであったので、平成 28 年度は残りの 3 個につき、新たに MS 解析を行った。また、発現の差異が 1.3 程度であるが  $P < 0.005$  の 4 スポットについても MS 解析にて同定を行った。GM 体で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットとして、スポット 1778 が唯一該当したが、このスポットの appearance (出現率) が 6/29 と低く、再現性が低いスポットであった。従って、再現性の確認されたスポットの中で、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

また、平成 28 年度に有意差の見られた血清タンパク質は、平成 27 年度に雌雄も含めた個体間での変動があまり大きくないことが調べられており、遺伝子組換えによる非意図的影響を調べるためのよいマーカーにもなり得ると思われた。

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

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

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

ポットの蛍光強度データについて変動の大きさにつき解析を行ったところ、TG-P 群と NT-P 群の比較で、有意差 (p 値 < 0.05) があり、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 13 個観察された。そのうち、5 個が TG-P 群で NT-P 群に比べ上昇がみられたスポットで、8 個が TG-P 群で NT-P 群に比べ減少がみられたスポットであった。それらのスポットのうち発現変動の大きかった 10 個のスポットについて、MS 解析を実施した。

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

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

#### D. 考察

##### (1) E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いて、2D-DIGE で、両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析を行ったところ、E7 発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等に関係する細胞内エネルギー産生に関与するタンパク質が多く、一方、E7 発現株で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し ATP 依存性に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質等があった。これは、E7 発現株では、外界との物質の交換が盛んになっていて、細胞間コミュニケーションが行われやすい状況になっている一方で、細胞内

の糖を介するエネルギー代謝能が、E7 結合体に比べ幾分低下傾向にあるものと思われた。

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

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

その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

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

バイオテクノロジーを応用した形質転換体として TALEN 法でゲノム編集されグリコアルカロイドの含量の大きく減少した系統のじゃがいも塊茎を用いてプロテオーム解析を行った。具体的には、ゲノム編集 (TG-P) じゃがいもと野生型 (NT-P) じゃがいも塊茎由来の、各 3 サンプルのタンパク質抽出液につき、2D-DIGE を用い、TG-P と NT-P 群のタンパク質の発現の定量的網羅的解析を行い、差異のあったタンパク質を選択し、変動の大きかったタンパク質につき nanoLC-MS/MS にて同定を行った。

その結果、TG-P で上昇のみられたタンパク質として、Hsp70 タンパク質、patatin -11 タンパク質が同定された。なお、TG-P, NT-P 間で 3 倍以上の発現の差のみみられたスポットは上昇のみみられた 1 スポットのみで、全体としての両群間の変動幅は小さく、ゲノム編集で、安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。また、形質転換体の野生株に対する変動幅は、以前プロテオーム解析を行った DREB1A 転写因子を遺伝子導入したじゃがいも塊茎の野生株に対する変動幅と比較して、同等以下であることも確認された (Nakamura R et al: Biol. Pharm. Bull. 33, 1418-25 (2010)<sup>1)</sup>。

#### E. 結論

##### (1) E7 発現型及び E7 結合型乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

E7 発現型並びに E7 結合型の 2D-DIGE で、両者のタンパク質の発現の網羅的比較解析を行い、約 2400 のスポットのうち、2 倍以上の発現の差異のあるスポットが 66 個確認され、そのうち 22 スポットにつきタンパク質の同定を行った。E7 発現株で減少のみられたタンパク質は、糖代謝等の細胞内エネルギー産生に関与するタンパク質が多く、一方、E7 発現株で増加のみられたタンパク質には、細胞膜に存在し、ATP 依存性に物質の輸送を行う膜輸送体の一群タンパク質等があり、外界との物質の交換が盛んになっていることが示唆された。プロテオーム解析は、安全性評価ばかりでなく、組換え体の作用機序(Mode of Action)を知るうえでも有用であることが示された。

## (2) にわとり血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

1 か月令の雌の組換え個体、及び非組換え個体それぞれ 3 匹ずつから、血清を採取し、GM 及び non-GM 個体のタンパク質発現の差を網羅的に調べるために 2D-PAGE を行った。各個体血清タンパク質として約 2000 スポットが観察されたが、そのうち、GM, non-GM 間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは観察されなかった。変動の見られたタンパク質のうち、10 個のタンパク質を MS 解析から新たに同定した。全体として、血清タンパク質の発現量に GM, non-GM 群で差もほとんどみられなかったため、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

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

ゲノム編集されたじゃがいも (TG-P) 及び野生株じゃがいも (NT-P) 各 3 サンプルから、タンパク質を抽出し、TG-P 及び NT-P 群のタンパク質発現の差を網羅的に調べるために 2D-PAGE を行った。各サンプルからタンパク質として約 5500 スポットが観察されたが、そのうち、TG-P, NT-P 群間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは TG-P で上昇のみられた 1 スポットのみであった。1.5 倍以上の変動の見られたスポット 13 個のうち、変動の大きかった 10 個のスポットを選択し、タンパク質の同定を MS 解析で行った。全体として、じゃがいも塊茎タンパク質の発現量に TG-P, NT-P 群間でほとんど差がみられ

なかったため、ゲノム編集で安全性上問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

## F. 参考論文

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

## G. 健康危険情報

なし

## H. 研究発表

### 1. 学会発表

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

### 2. 論文発表

1) Ogawa T., Sasaki T., Okazawa A., Teshima R., Misawa N., Ohta D.” Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives” *Jap.J.Food Chem. Safety* 23, 9-19 (2016)

2) Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, Kiyono H. “Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody”. *Regul Toxicol Pharmacol.* 76, 128-136 (2016)

3) Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. “Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272” *Food Hyg.Saf.Sci.* 57, 1-6 (2016)

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

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

5) Mano J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome S., Hayashida S., Kawakami H., Kurimoto Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Takabatake R., Kitta K. “Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR” *Food Chemistry* 226, 149-155 (2017)

6) Tranquet O, Gaudin JC, Patil S, Steinbrecher J, Matsunaga K, Teshima R, Sakai S, Larré C, Denery-Papini S., “A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for in vitro allergenicity assessment of functionalized gluteins.” *PLoS One.* 12(11):e0187415 (2017)

## I. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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27-29年度)

(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

研究要旨 近年の遺伝子組換え技術の発展により、ゲノム編集技術の研究が盛んに進められている。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、これまでに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。本研究ではゲノム編集技術により作出された遺伝子改変ニワトリおよびジャガイモをモデルとし、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た。ニワトリではゲノム編集体の解析の前の基礎データの収集として雌雄、および外来遺伝子を導入した遺伝子組換え体での遺伝子発現量の比較を行った。ジャガイモでは実際にゲノム編集技術によりグリコアルカロイドを低減させた個体を使用してトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、ニワトリの雌雄では顕著な遺伝子発現の差は確認されず、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体では発現の変動はみられるものの、発現が変動する遺伝子に共通する代謝経路などは確認されなかった。ジャガイモでは、ゲノム編集体と非ゲノム編集体で発現の差は確認されなかった。

協力研究者

宮原平 (東京農工大学大学院工学研究院)

A. 研究目的

技術の発展により、現在、遺伝子組換え植物のみならず、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、またさらには新しい技術としてゲノム編集技術による遺伝子組換えを伴わない遺伝子改変生物も開発され実用化されつつある。近年では、遺伝子組換えを伴わない遺伝子改変技術としてゲノム編集技術が急速に進展しており、ゲノム編集生物の評価系構築の必要性が高

まっている。今後、ゲノム編集生物由来の食品の安全性を評価する上で、ゲノム編集生物において意図しない遺伝子、およびタンパク質の発現による栄養成分の変化を調査するべく網羅的なオーム解析の必要がある。本研究事業では昨年度までにゲノム編集生物のモデルとして人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたアレルゲンノックアウトニワトリが作出されている。そこで本研究ではゲノム編集ニワトリのトランスクリプトーム解析を行う準備段階として、ゲノム編集ニワトリをモデルとしたトランスクリプトーム解析での評価のために必要な基礎データの収集を目的として、アレルゲンノックアウトニワトリ作出に使用し

たニワトリ品種の非遺伝子組換え体での雌雄およびヘテロ GFP 遺伝子組換え体でのトランスクリプトーム解析を行った。また、同様にゲノム編集体の代謝経路の網羅的な解析として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の塊茎におけるトランスクリプトーム解析を行った。

## B. 研究方法

### B-1 実験材料

広島大学の堀内教授より分与していただいた、ニワトリ 1-2 ヶ月齢の非遺伝子組換え体の雄 3 個体、非遺伝子組換え体の雌 3 個体、雌のヘテロ GFP 遺伝子組換え体 3 個体の全部で 9 検体の白血球の total RNA をサンプルとした。

ジャガイモは理化学研究所の梅基先生より分与していただいたジャガイモ品種サッシーのゲノム編集体と非ゲノム編集体それぞれ 3 個体ずつをサンプルとした。

### B-2 RNA 抽出方法

ニワトリの血液は翼の静脈より採取し、EDTA-PBS バッファー pH 7.4 に混合した。採取した血液は Ficoll-Paque density gradient (Pharmacia Biotech) に積層し、740×g, 10 分間遠心分離を行った。表層の細胞を回収し、PBS バッファーで洗浄したものをニワトリの白血球細胞として使用した。白血球からの total RNA 抽出は RNeasy kit (QIAGEN) を使用して行った (広島大学、堀内教授)。

ジャガイモは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。

### B-3 ニワトリのマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析は アジレント・テクノロジー社の Agilent Expression Array に委託した。解析内容は、ラベリング方法 1 色法、DNA チップは Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color、Gene Expression Hybridization Kit、Gene Expression Wash Buffers Pack を使用し、方法はマニュアルに従い行われた。検出シグナルは専用解析ソフトウェア Agilent Feature Extraction により数値化された。

委託解析の結果により得られたデータにつき、正規化を行った各遺伝子の発現データから転写産物が検出されたことを示すシグナル強度 2 に該当する遺伝子を本研究での解析対象遺伝子とした。以降のデータ解析は、R を使用し、Bioconductor および CRAN から提供されているパッケージを用いた。データ描写には R studio を使用した。

まず、データの全体像の把握および外れサンプルの有無を確認するため階層クラスター解析を行った。クラスターリングは (1-Pearson 相関係数) を距離として、平均連結法により行った。散布図は、各遺伝子の発現量を対数変換後に非組換え体と組換え体それぞれの平均値を算出しプロットした。解析対象遺伝子群から有意水準 1% ( $p < 0.01$ ) としてサンプル間での発現変動遺伝子を抽出した。その後、同一サンプル内で共通して発現変動が 2 倍以上あった遺伝子について The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID: <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) によりクラスター解析を行った。

### B-4 ジャガイモの次世代シーケンスによるトラ

## ンスクリプトーム解析

ジャガイモ各サンプルの 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ている 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。

## C. 研究結果

### C-1 非遺伝子組換えニワトリの雌雄のトランスクリプトーム解析

使用した Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 には 43,803 個のプロープが搭載されており、全てのサンプルにおいて全プロープの 8 割程度で十分な強度のシグナルが検出された。しかしながら、検出された十分なシグナル強度の全ての遺伝子群について、雌雄間での遺伝子の発現変動の有意水準を 1% ( $p < 0.01$ ) とした場合に、発現変動したと考えられる遺伝子の数が、FDR (false discovery rate: 偽陽性と判断される割合) から推定される偽陽性の遺伝子の数よりも少なかったため、今回、雌雄間で発現に変動がみられた遺伝

子については偽陽性の可能性が存在した。発現量に基づくクラスター解析においても雌雄が混在するクラスターが形成された (Fig. 1)。また、雄 3 個体での発現量の平均値と雌 3 個体での平均値を算出し、散布図にプロットしたところほとんどの遺伝子では雌雄間で 2 倍以上の発現変動はないことが分かった。念のため今回は雌雄間で遺伝子発現に差があると仮定して、発現に 2 倍以上の変動が確認された遺伝子のみを抽出し、さらに解析を進めた。雄で発現が 2 倍以上上昇していた遺伝子は 49 あり、Avidin、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの複数のプロープで発現の上昇が確認された (Table 1)。雌で発現が 2 倍以上上昇している遺伝子は 186 あり、性決定関連遺伝子、Histidin triad nucleotide binding protein W、Olfactory receptor などの複数のプロープで発現の上昇が確認された (Table 2)。今後の解析において内部標準となることが考えられる、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH は 2 遺伝子が検出されており、どちらも雌雄間で発現に変動は確認されなかった。また鶏卵アレルギーであるオボムコイド関連遺伝子は 1 遺伝子が検出されており、こちらも雌雄間で発現に変動は見られなかった。

### C-2 雌のニワトリの GFP ヘテロ導入体のトランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析には先の解析と同様に Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 を使用し、すべてのサンプルで 6 割程度で十分なシグナル強度が検出される結果となった。このため、すべてのサンプルで共通して十分なシグナル強度を得られた 25,714 遺伝子を解析対象とした。クラスター解析では非組換え体 3 個体、組換え体 3 個体がそれぞれのクレードを形成したことから外れサンプルはないと判断し、発現変動遺伝子の抽出には非組換え体 3 個体、組換え体 3 個体の計 6 サンプルをすべて使用するこ

ととした (Fig. 2)。解析対象遺伝子について各サンプル間で発現量の平均値を算出し、散布図を描画した結果、非遺伝子組換え体において組換え体よりも発現が上昇する遺伝子が多いことが示されたが、ほとんどの遺伝子については発現量の差は 2 倍以下に収まる結果となった。発現変動遺伝子の抽出では、解析対象とした 25,714 遺伝子のうち有意水準 1% とした場合 1,883 遺伝子が発現変動遺伝子として抽出された。このうち各サンプル間で共通して発現量の差が 2 倍以上あった遺伝子数は 326 遺伝子であり、非組換え体で発現量が 2 倍以上高くなる遺伝子が 299 遺伝子、組換え体で発現量が 2 倍以上高くなる遺伝子が 27 遺伝子抽出された (Table 3)。さらに発現変動遺伝子群とした 1,883 遺伝子について The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID) で各遺伝子の機能同定および翻訳産物の推定機能からクラスター解析を行ったところ、Enrichment score (サンプル間での遺伝子の偏りを数値化したもの) が高いクラスターはアミノ酸配列のドメインによる分類であり、代謝経路や免疫系など特定の機能に共通するクラスターは確認されなかった。

### C-3 ゲノム編集ジャガイモのトランスクリプトーム解析

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、塊茎 100 mg から 20 µg 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より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) で系統別のクレードを形成することはなかった (Fig. 3)。また同様に各非ゲノム編集体とゲノム編集体の 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. 4)。

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して得られたデータから *SSR2* 遺伝子の配列を確認したところ、アミノ酸変異はみられるものの、すべてタンパク質として翻訳可能な配列であった (Fig. 5)。また、*SSR2* の遺伝子配列はトランスクリプトデータには 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、ゲノム編集体の 3 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 (Fig. 6)。

## D. 考察

### D-1. ニワトリのトランスクリプトーム解析

ゲノム編集技術により作出されたアレルゲノックアウトニワトリの評価系を構築するために、初年度は事前準備としてゲノム編集に使用するものと同品種の非遺伝子組換えニワトリにおける雌雄間でのトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、発現が検出された遺伝子のう

ち発現変動遺伝子として有意水準 1% を満たすものは存在せず、雌雄間ではほとんど遺伝子発現に差がないことが考えられた。今後は解析する個体数を増やすなどすることで発現に差がある遺伝子の絞り込みが可能になると考えられた。今回は雌雄間で遺伝子発現に差があると仮定した場合として、各雌雄の 3 個体で同様に発現に差がみられた遺伝子について着目して解析を行った。その結果、雄では主に卵白中に含まれる糖タンパク質である *Avidin* 遺伝子と、解糖系からクエン酸回路への反応を調整するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ遺伝子の上昇が見られた。雌では性決定関連遺伝子の発現に上昇に加え、ヒスチジン三連構造ヌクレオチドタンパク質、嗅覚受容体遺伝子 (*Olfactory receptor*) の発現上昇、また、2 倍程度の発現量の差ではあるが、卵アレルギーの原因物質であるオボアルブミン関連遺伝子においても上昇が見られた。また、内部標準であるハウスキーピング遺伝子として報告されている *GAPDH* 遺伝子については性差で変動がないことも確認できた。

ニワトリの雌雄間によるトランスクリプトーム解析に引き続き、遺伝子組換えニワトリと非組換えのニワトリでのトランスクリプトーム解析を行った。こちらの結果では、一部の遺伝子については発現に変動が認められるものの共通した代謝経路に関与するようなクラスターは確認されなかった。これは、導入されている遺伝子が *GFP* であり、本来ニワトリには存在しない遺伝子およびニワトリの代謝経路に関わらないタンパク質であることから、ニワトリ由来の遺伝子発現系にはあまり影響を与えなかった可能性が考えられた。また、ヘテロ導入体であることも影響が少ない一因として考えられた。ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* は今回の結果においても非組換え体、組換え体ともに発現量に差がないことが確認されており、クラスター解析においては非組換え体のクレードと組換え体のクレード

が分離されることも確認した。このため、非遺伝子組換え体と組換え体では遺伝子の発現に変動は確認されるものの、影響を受ける代謝経路などの特定には至らなかったことから、今回発現が変動していた遺伝子は *GFP* が導入されたことによる特異的な影響であるのか、または、遺伝子組換え方法による影響なのか、変動の原因は不明であった。

今後はゲノム編集技術により作出された遺伝子改変ニワトリのトランスクリプトーム解析を行う予定である。予定されているサンプルはアレルゲンノックアウトニワトリであり、ニワトリ由来の代謝経路に影響を与える改変であることから、これまでの解析よりも発現変動が著しく起こる可能性が高い。膨大な発現変動遺伝子群から真に変動のある遺伝子群を抽出する際に、今回の発現変動遺伝子群を基礎データとして参照し考察に役立てたい。

## D-2. ジャガイモのトランスクリプトーム解析

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ゲノム編集体と比較して大きく低下することが示されている（理化学研究所、梅基先生）。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である 3 個体すべてから獲得され、その遺伝子の発現量は非ゲノム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、これらは非ゲノム編集体、ゲノム編集体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た。

#### E. 結論

ニワトリの雌雄の違いによる遺伝子の発現には顕著な違いはみられなかった。また雌における非遺伝子組換え体とヘテロ *GFP* 遺伝子組換え体での遺伝子の発現には、いくつかの遺伝子について発現に変動はみられるものの、変動した遺伝子に共通した代謝経路や免疫系などはなく、全体として大きな違いはみられなかった。また、ジャガイモにおけるグリコアルカロイド合成酵素遺伝子のゲノム編集による欠損体と非ゲノム編集体での遺伝子の発現に差はみられなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 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

Feature Num.	Description	Log2 Ratio
25808	Avidin	2.31 ± 0.67
32598	Avidin	2.50 ± 0.74
33888	Avidin	2.47 ± 0.73
43390	Avidin-like	2.47 ± 0.75
17089	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	2.11 ± 0.72
32037	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	4.11 ± 1.09
34000	Histidin triad nucleotide binding protein W	1.29 ± 0.16

Table 1 ニワトリの雄で発現が2倍以上上昇した遺伝子のリスト

Feature Num.	Description	Log2 Ratio
383	Female associated factor FAF	7.49 ± 0.35
13194	Female associated factor FAF	8.39 ± 0.44
32897	Male hypermethylated (MHM) region	2.40 ± 0.35
34668	Female expressed transcript 1 (FET1)	3.49 ± 0.41
18906	Histidin triad nucleotide binding protein W	10.43 ± 9.29
21580	Histidin triad nucleotide binding protein W	11.24 ± 0.14
24495	Histidin triad nucleotide binding protein W	2.71 ± 0.27
26546	Histidin triad nucleotide binding protein W	9.34 ± 0.25
98	Olfactory receptor 14J1-ike	2.05 ± 0.24
5437	Olfactory receptor Olf1709	3.92 ± 1.87
10043	Olfactory receptor Olf1459	3.19 ± 0.45
25605	Fibroblast growth factor 1	1.95 ± 0.21
8144	Ovalbmin related protein Y	1.18 ± 0.10

Table 2 ニワトリの雌で発現が2倍以上上昇した遺伝子のリスト

Gene Annotation	logFC
WT > TF	
Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1	3.48
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	3.10
Adaptor related protein complex 2 mu 1 subunit	2.95
MHC class I glycoprotein	2.89
B-L beta chain mRNA	2.63
WT < TF	
Uncharacterized	-1.63
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor	-1.51
Lymphocyte antigen 6 complex	-1.50
Ankyrin repeat domain 42	-1.48
Uncharacterized	-1.38

Table 3 ニワトリの遺伝子組換え体における発現変動遺伝子のリスト

WT: 非遺伝子組換え体、TF: 遺伝子組換え体

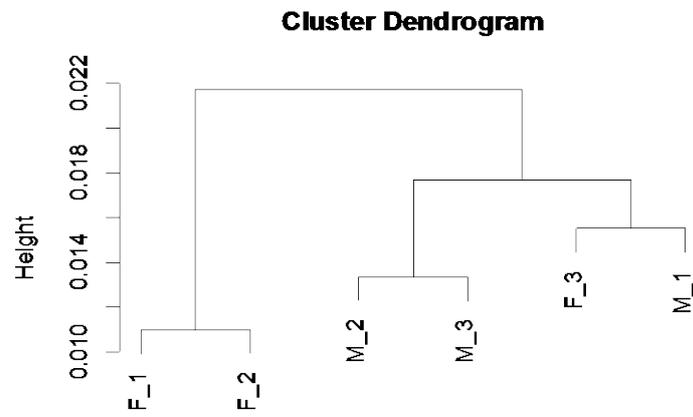


Fig. 1 ニワトリの雌雄間におけるクラスター解析  
F: 雌、M: 雄

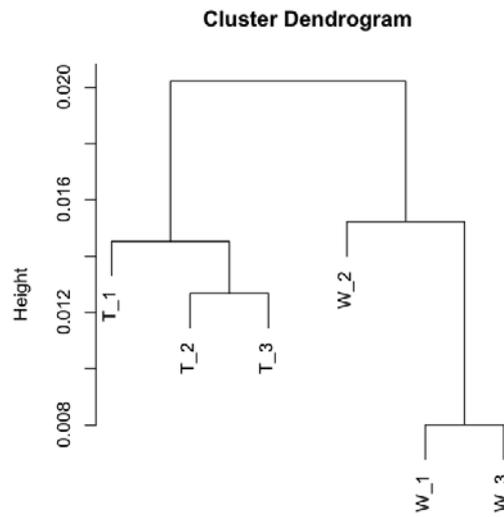


Fig. 2 ニワトリの遺伝子組換え体と非組換え体のクラスター解析  
data.dist  
hclust (\*, "average")  
T: 遺伝子組換え体、W: 非遺伝子組換え体

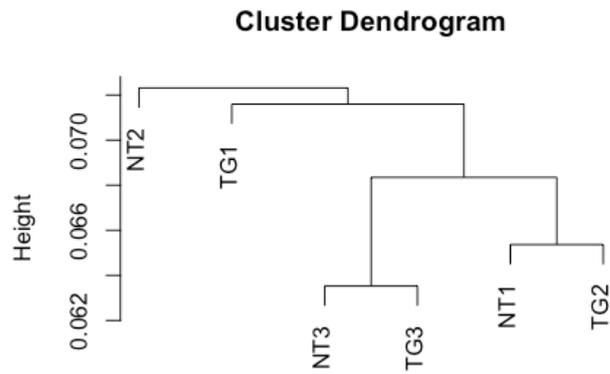


Fig. 3 ジャガイモにおけるゲノム編集個体と非遺伝子組換え体のクラスター解析  
 NT: 非遺伝子組換え体、TG: ゲノム編集個体

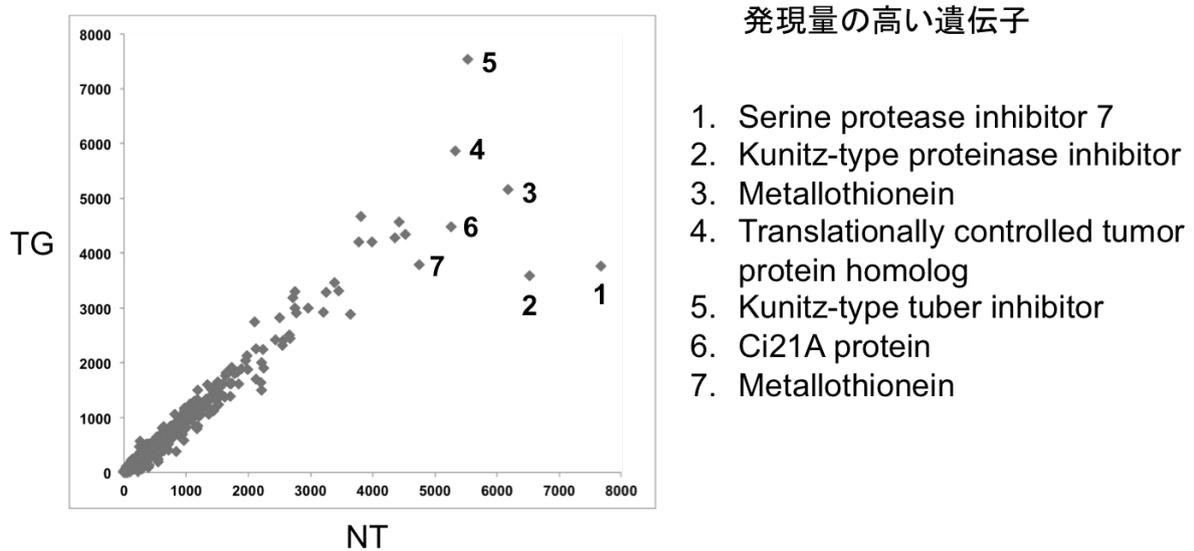


Fig. 4 ジャガイモにおけるゲノム編集個体と非組換え体での遺伝子発現量の散布図  
 NT: 非遺伝子組換え体、TG: ゲノム編集個体



Fig. 5 各ゲノム編集個体における SSR2 編集部位のアライメント結果  
 TG1-3: ゲノム編集個体各ライン。A: ゲノム配列のアライメント結果、B: アミノ酸配列のアライメント結果。ゲノム編集箇所は黒枠の部分。

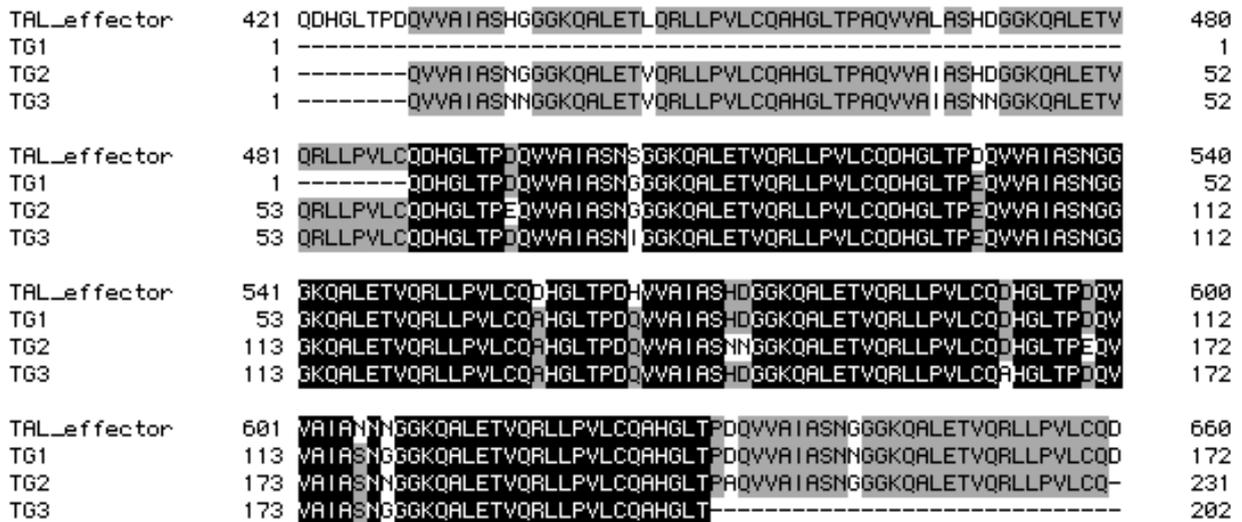


Fig. 6 各ゲノム編集個体から得られた TAL エフェクターの配列のアライメント結果  
 TG1-3: ゲノム編集個体各ライン

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究

分担課題 バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析(2)

研究分担者 小関 良宏 （東京農工大学大学院工学研究院研究科・教授）  
研究協力者 小口 太一 （筑波大学生命環境系/つくば機能植物イノベーション  
研究センター・助教）

## 研究要旨

近年、新しい植物育種技術（New Plant Breeding Techniques; NBT）の農作物育種への利用に注目が集まっている。遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体との接ぎ木技術も NBT の 1 つである。今後、組換え台木に接いだ非組換え穂木の野菜・果樹等の育種が進み、それらに由来する農産物の食品としても利用も想定しなくてはならない。そこで、本研究では、トマトやジャガイモ等をモデルとし、組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析を実施し、食品としての利用に際する安全性評価基準や規制のあり方の議論を進めていく上での科学的知見の提供を目的とする。本研究では、組換え体-非組換え体間の接ぎ木個体のモデルとして、*GUS* 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間で接ぎ木植物の作成し、モデル分析試料としての供給体制を整えた。また、実際に、*GUS* 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間の接ぎ木体から得た果実の食品成分分析を実施し、組換えトマト、非組換えトマト及び組換え-非組換え接ぎトマトの間で比較したところ、いずれも有意な差は見出されることが確認された。

### A. 研究目的

地球規模の気候変動や地球人口の増大による食料需要の増大に対応するため、食料生産へのバイオテクノロジー利用の重要性は高まっている。新機能を付与した遺伝子組換え植物のみならず遺伝子組換え動物が開発され、さらに近年開発された New Plant Breeding Techniques (NBT) による新たな農作物の開発・研究が世界規模で進められている。NBT の一部は、最終産物には組換え遺伝子は含まないものの育種過程で遺伝子組換え操作を含む技術や組換え植物と非組換え植物を接ぎ木等、現在の法規制ではグレーゾーンにあたる技術が含まれる。NBT の技術開発が進めば、NBT 由来の農産物の食品としての利用も想定される。そこで、NBT 由来農作物を食品としての利用における安全性評価の基準や規制のあり方の議論を進めていく上で科学的エビデンスの蓄積不可欠である。そこで本研究では、NBT の 1 つで

ある組換え体と非組換え体を接ぎ木した植物に関する生物学的・栄養学的知見創出を目的とし、トマトやジャガイモ等をモデルとして組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析に基づく科学的知見を提示し、安全性評価手法の確立を目指す。

### B. 研究方法

#### <植物材料>

植物材料は、実験用トマト品種であるマイクロトムを用いた。*GUS* 遺伝子導入マイクロトムは、筑波大学遺伝子実験センター野中助教より分与を受けた。播種後 5 週目の組換え (TG) 及び非組換え (NT) トマトを土面からおよそ 3 cm の箇所主茎を切断し、台木には切断面の中心に垂直にカミソリ刃で 2-3 mm 程度の切り込みを入れ、その間にカミソリで V 字型に削いだ穂木を挟み込み、内径 3 mm のビニル管で固定し

た。その後、1-2 週間、鉢を含む植物体全体をビニル袋で覆い、保湿状態で管理した。その後、1 週間程度をかけてビニル袋を外し、栽培室で引き続き生育させた。

#### <食品成分分析>

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

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

W：水分、P：たんぱく質、L：脂質

C：炭水化物、A：灰分

#### <網羅的分析試料の調製>

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

#### 倫理面への配慮

植物材料は組換え体を含むため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」及び関連省令や地方自治体の政令や指針、筑波大学遺伝子組換え実験安全管理規程等を十分に遵守して実施している。

### C. 研究結果

#### <接ぎ木体の調製>

H27 年度は、播種後約 5 週間目のマイクロトムの TG 台木と NT 穂木間あるいは NT 台木と TG 穂木間の接ぎ木の計 5 例を施術し、いずれも切断面が活着し、接ぎ木は成功した。組換え-非組換え接ぎ木トマトを作成・観察の結果、接ぎ木施術により、接ぎ木操作を

しなかったインタクトなトマトと比べて生育への影響があるものの、生育・結実性等に大きな違いがないことを確認した(図)。

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

#### <食品成分分析>

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

#### <網羅的分析試料の調製>

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

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

### D. 考察

マイクロトムは、個体サイズが小さく、閉鎖系実験環境での取扱に優れており、加えて、本研究により、非組換え体間の接ぎ木も比較的容易であることが確認された。接ぎ木施術が植物の生育に与える影響は、施術直後は接ぎ木無施術の個体と比べて、接ぎ木施術による成長への影響があったが、その後栽培

を継続する過程で影響はほぼ見出されなくなった。

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

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

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図1 接ぎ木トマト

TG 台木と NT 穂木間の接ぎ木トマト(右)と接ぎ木施術していない非組換え穂木(左)。播種からおよそ 20 週目、接ぎ木トマトの接ぎ木は播種後おそそ 5 週目に実施した。

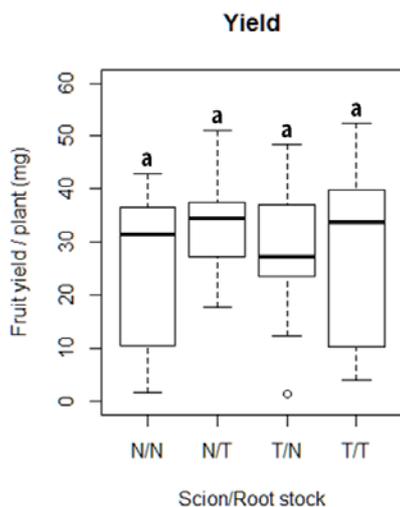


図2 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による果実収量の比較

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

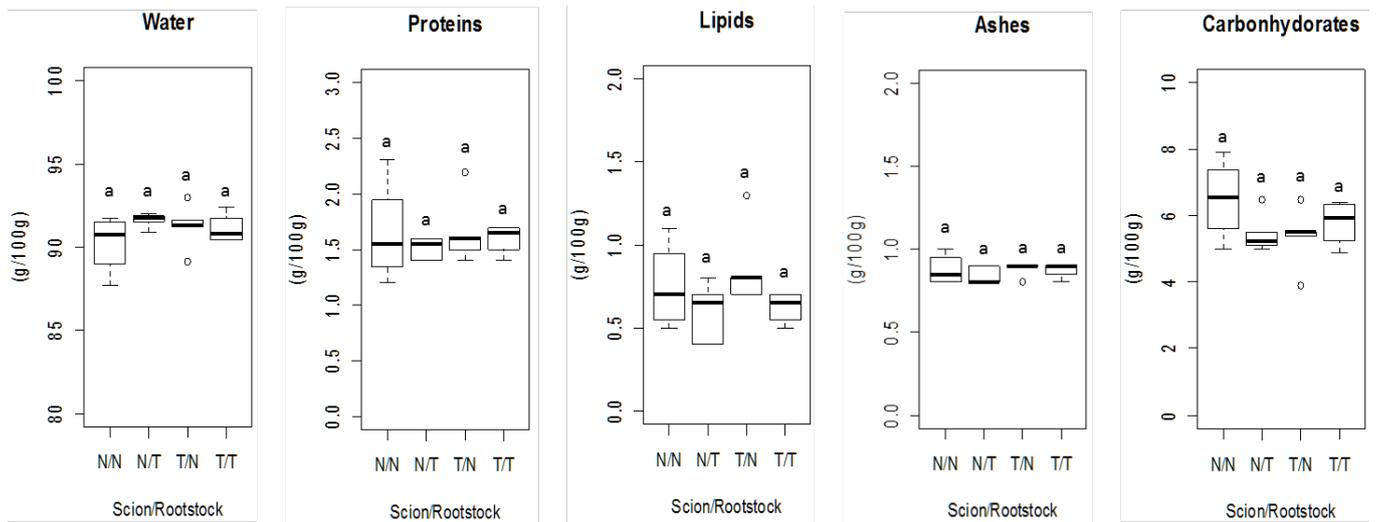


図3 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による食品成分の比較

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

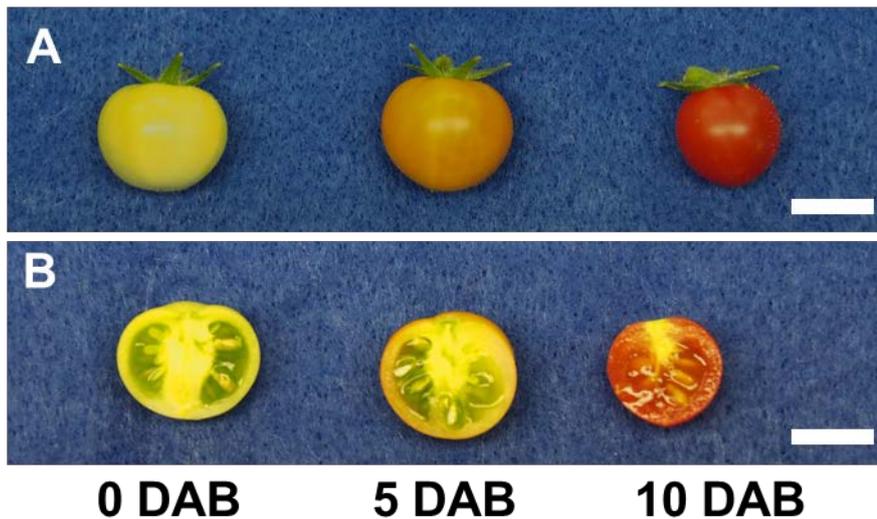


図4 網羅的解析用に採取したマイクロトムの様子

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

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  
総合研究報告書（平成 27～29 年度：分担）

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（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・教授）

### 研究要旨

本研究は、メタボロミクスによって、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術によって生物機能が改変された家畜や農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。平成 27 年度および平成 28 年度は、モデル実験として遺伝子組換え技術を用いて外来タンパク質（緑色蛍光タンパク質）を発現させたニワトリ遺伝子組換え体の評価を実施した。まず平成 27 年度は、雄個体および雌個体から採取した血漿中代謝物質の比較解析を実施し、遺伝子組換え体の評価のための基礎データを取得した。続いて平成 28 年度は、遺伝子組換え体と母本品種の代謝プロファイル比較解析を実施し、血漿中代謝産物の蓄積状況に大きな差異は認められないことを確認した。平成 29 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実施し、両者間での代謝物蓄積傾向の類似点と相違点を評価した。

### 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、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術によって生物機能が改変された家畜や農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。

## B. 研究方法

### (1) メタボローム解析プラットフォームの整備

高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS), ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用い、生体組織由来の全成分を解析対象とするノンターゲットメタボローム解析のための実験プラットフォームを整備した。使用機器は、UHPLC-MS (Shimadzu LC-MS-8040), GC-TOF/MS (Waters GCT Premier MS), 極性脂質プロファイリングと極性化合物の分析は、LC-LIT-TOF/MS を用いた (Ion Trap TOF/MS; HITACHI NanoFrontier)。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 MetAlign<sup>1)</sup> (<https://www.wur.nl/en/show/MetAlign-1.htm>) を、ピークデコンボリューションとピーク自動同定には AIoutput<sup>2)</sup> ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/AIoutput/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/AIoutput/index.html)) 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。主成分分析および Student's t-test は、MetaboAnalyst 3.0 および 3.5<sup>3)</sup> (<http://www.Metaboanalyst.ca/>) を用いて行った。Student's t-test は、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。LC-MS で取得したデータ処理には Nano Frontier Data processing を用い、独自に整備した代謝物質データベース (標準化合物のカラム保持時間, 検出イオン種,  $m/z$  値のデータ, 開裂情報) を基にして同定・定量のプラットフォームとした。また、本 LC-LIT-TOF/MS システムには、質量分析装置に PDA 検出器 (photo diode array detector) を前置し、抽出液中の化合物は LC 分離後に吸収スペクトルを計測することを可能にした。極性脂質プロファイリングでは、極性脂質の開裂フラグメント情報に対する注釈付けのために LipidBlast ライブラリ<sup>4)</sup> (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast>) を用いた。LipidBlast ライブラリはインシリコで予測された脂質分子の開裂フラグメント情報のデータベースであり、極性脂質を中心として約 12 万の脂質分子の開裂フラグメント情報が格納されている。

### (2) 供試試料

a) ニワトリ雌個体および雄個体の血漿試料

ニワトリ横斑プリマスロック種の雌個体および雄個体由来の血漿試料を供試した(広島大学大学院生物圏科学研究科の堀内浩幸教授から提供)。実験デザインは、雌個体と雄個体の2群間での比較とした。雌の3個体(個体番号 #111, #112, および #118), ならびに雄の3個体(個体番号 #113, #115, および #117)を用いた。各個体の月齢は一ヶ月齢に統一した。採血は、雄3個体(#115, #117, #113), 雌3個体(#111, #112, #118)の順に行った。採血反復回数は1回とした。血液の抗凝固剤は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)リン酸緩衝溶液を使用した。まず、注射器に抗凝固剤0.3 mLを加え、その注射器を使って、翼下静脈から2.7 mLの血液を採取した(EDTA 終濃度 7.7 mM)。血液試料を穏やかな条件で遠心分離することで上清(血漿)と沈殿(血球)に分離させ、上清1.5 mLを新しい2 mL容のサンプリングチューブに移し、これを血漿試料とした。

b) ニワトリ遺伝子組換え体の血漿試料

緑色蛍光タンパク質遺伝子をニワトリ横斑プリマスロック種に導入した遺伝子組換え体および対照個体(非遺伝子組換え体)由来の血漿試料を供試した(広島大学大学院生物圏科学研究科の堀内浩幸教授から提供)。実験デザインは、遺伝子組換え体由来の血漿試料と対照個体由来の血漿試料の2群間での比較とした。各個体の性別は雌、月齢は一ヶ月齢に統一した。遺伝子組換え体の4個体(個体番号: T45, T53, T54, および T75), ならびに対照の4個体(個体番号: W43, W51, W55, および W76)を用いた。採血前の1日間は絶食させた。採血および血漿調整の操作手順は平成27年度の実施内容に従った。

c) ジャガイモゲノム編集個体の塊茎試料

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遺伝子を破壊したジャガイモゲノム編集個体および対照個体(非ゲノム編集個体)由来の塊茎試料を供試した(理化学研究所環境資源科学研究センターの梅基直行博士から提供)。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)。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。

### (3) GC-MS によるメタボローム比較解析

#### a) ニワトリ雌雄個体間でのメタボローム比較解析

血漿試料に含まれるタンパク質を除去するために、まず、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質操作を行った。その試料に対して、さらに、限外濾過法による除タンパク質操作を行い、限外濾過の有無が解析結果に与える影響を検討した。まず、タンパク質変性沈殿法による除タンパク操作を行った。新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに 1.8 mL のメタノール/超純水混合液 (55/45, v/v) を加え、-40°C に設定したフリーザー内で十分に冷却した。ここに血漿試料 0.2 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、-40°C に設定したフリーザー内で 30 分間静置した。その後、4°C, 14,000 ×g, 3 分間遠心し、上清を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに回収した。回収した上清を 2 本の新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに 850 μL ずつ分注し、その内の 1 本には、限外濾過による除タンパク操作を施した。限外濾過にはアミコンウルトラ遠心式フィルター (分画分子量 10,000) を用いた。遠心後の濾液を回収し、冷却遠心濃縮器にかけて乾固させた。限外濾過操作を行わなかった残りの一方は、そのまま冷却遠心濃縮器にかけて乾固させた。除タンパク操作後の血漿試料は乾固させ、-80°C フリーザー内で保存した。

乾固試料に対して 2.0 mL のメタノール/クロロホルム/2% 酢酸混合液 (5/2/1, v/v/v) を加え、ボルテックスミキサーで混合し再溶解させた。メタノール/クロロホルム/2% 酢酸の混合液には、内部標準物質として、テストステロン (20 μg/ml) とリビトール (5 μg/mL) を予め加えた。血漿溶液 800 μL を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに移した。分画操作、誘導体化の操作は、Furuhashi et al. (2015) の方法<sup>5)</sup>に従った。本方法では、試料中のエステル化脂肪酸と非エステル化脂肪酸を区別して検出可能である。グリセロ脂質などを構成するエステル化脂肪酸は脂肪酸メチルエステル誘導体として、非エステル化脂肪酸はトリメチルシリル誘導体として検出される。分析前処理の反復回数は 2 回とした。

分析用試料をガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析装置 (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

オーブンの昇温条件は、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 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  $\mu$ L とした。

GC-TOF/MS を用いて取得したトータルイオンカレントクロマトグラムからのイオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには MetAlign<sup>1)</sup> を、ピークデコンボリューションとピーク同定には AIoutput<sup>2)</sup> を使用した。ピーク同定には、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。血漿を超純水に置き換えたブランク試料から検出されたピークは解析から除外した。

血漿試料の除タンパク質操作法を検討した。まず、限外濾過法による除タンパク質処理の有無が分析データの品質に及ぼす影響を調べた (図 1)。極性画分の TIC クロマトグラムを試験区間で比較したところ、限外濾過した試験区において、グリセロールや多数の未同定ピークが検出された。限外濾過フィルターに塗布されていたグリセロールが試料に混入したと考えられた。これらの多数の未同定ピークの由来は不明であった。非極性画分の TIC クロマトグラム比較では、タンパク質変性沈殿法のみ (限外濾過法なし) の試験区では、多数の生体成分由来のピークが検出されたのに対して、タンパク質変性沈殿法と限外濾過法を組み合わせた試験区では、これらの生体成分由来ピークがほとんど検出されなかった。一方、多数の未同定ピークがほぼ等間隔で検出された (図 1)。これらの未同定ピークは、限外濾過フィルターあるいは濾液回収用のチューブ由来の可塑剤である可能性が考えられた。そこで、以降の実験はタンパク質変性沈殿法による除タンパク質処理を行った試料を用いて進めた。リン酸、グルコース、コレステロールについては、検出シグナル強度が飽和していたため、今回の解析からは除外した。また、抗凝固剤として添加した EDTA は解析から除外した。個体番号 #115 の 1 回目の反復実験操作に由来する誘導体化試料の測定データ (#115-1) は、内部標準物質由来ピークの検出シグナル強度が著しく低かったため、解析から除外した。

主成分分析および Student's t-test は、MetaboAnalyst<sup>3)</sup> (ver. 3.0) 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。

#### b) ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

血漿試料からの除タンパク質は、タンパク質変性沈殿法を用いた。溶媒抽出、分画、誘導体化、誘導体化試料の計測、ピーク処理、ピーク同定、および統計解析の手順は平成 27 年度の実施内容に従った。

c) ジャガイモゲノム編集個体および非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

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<sup>6)</sup> 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、蓋をして試験管の内容物を激しく振り混ぜ、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、これを極性画分とした。下層 (3 mL) を同様にして別のチューブに移し、これを非極性画分とした。非極性画分に含まれる不飽和脂肪酸の酸化を防ぐため、抗酸化剤ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) を加えた。非極性画分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。極性画分および BHT を含む非極性画分は低温フリーザー (-30°C) で保存した。

各画分に含まれる低分子化合物の誘導体化は Shepherd et al. (2007) の方法<sup>6)</sup> に準じて行なった。非極性画分に含まれる化合物の誘導体化は次のように進めた。BHT を含む非極性画分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を移し、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、蓋をして試験管の内容物を激しく振り混ぜ、静置して 2 層に分離した。下層 (1.5 mL) をガラス製パスツ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、蓋をして試験管の内容物を激しく振り混ぜ、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 µL とピリジン 10 µL 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 µL 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。極性画分に含まれる化合物の誘導体化は次のように進めた。極性画分 50 µL をチューブに移し、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 µL 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、非極性画分と同様にしてトリメチルシリル化および反応液を濾過し、回収した濾液を分析用試料とした。

GC-TOF/MS による計測、ピーク処理、ピーク同定、および統計解析は基本的には平成 27 および 28 年度の実施内容を踏襲した。さらに、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<sup>6)</sup> 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。

主成分分析および Student's t-test は、MetaboAnalyst<sup>5)</sup> (ver. 3.5) 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<sup>7)</sup> 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。

#### (4) 質量分析関連データの一般公開

質量分析データおよび関連する実験メタデータをメタボロミクスデータリポジトリ MetaboLights<sup>8)</sup> (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/>) に登録し、データ再利用および解析結果の再検証が可能な形式で一般公開する。

### C. 結果

#### (1) ニワトリの雌雄個体間でのメタボローム比較解析

ニワトリの雌雄個体由来の血漿試料から再現性よく検出されたピーク数は、極性画分では 43 個 (表 1)、非極性画分では 54 個 (表 2) であった。このうち 70 個のピークを同定することができた。同定できたピークには、アミノ酸、有機酸、脂肪酸、糖をはじめとして、飼料に由来すると考えられる植物ステロールなど、多様な分類クラスに属する代謝物質が含まれていた。同定できなかった 27 個のピークは、それぞれを区別するために通し番号を付与した。

極性画分および非極性画分から検出された 97 個のピークのピーク面積値から相対蓄積量を算出し、多変量解析手法の一種である主成分分析を行った (図 2)。第一主成分から第四主成分までの累積寄与率は 79.5% であった。第一主成分 (寄与率 36.3%) では、#118 の個体は他 5 個体と明確に区別された。この理由としては、#118 の個体の代謝状態に何らかの異常があった可能性や、採血後の経過時間が影響した可能性 (#118 は 6 番目に採血した) などが考えられた。また、第一主成分スコアと第二主成分スコアの二次元プロット図 (図 2A) において、雌雄グループ間でのクラスター分離

の傾向が認められた。第三主成分（寄与率 14.5%）では、#115 の個体が他 5 個体と明確に区別された。第四主成分（寄与率 9.8%）では、#113 の個体と #117 の個体が明確に区別された。

次に、極性画分および非極性画分から検出された 97 個のピークについて、各グループ間での検出シグナル強度差の有無を t 検定により評価した。雌雄グループ間での検出シグナル強度差が有意なピークが 16 個あった。雄グループでは、脂肪酸 (20:4 FAME 誘導体, 20:0 脂肪酸 TMS 誘導体, 22:6 FAME 誘導体) や、有機酸 (succinate, malate, isocitrate, pentanedioic acid), アミノ酸 (proline), 糖 (glucitol, myo-inositol) を含む 14 個のピークの検出シグナル強度が雌グループと比較して高かった (図 3A)。雌グループでは、4 個のピーク (hydroxylamine, 16:1 FAME 誘導体, serine, 5-oxoproline) の検出シグナル強度が雄グループと比較して高かった (図 3B)。これら 16 種類のピークの中で、雌雄間で 2 倍以上の検出シグナル強度差があった代謝物質は、glucitol のみであり、その差は 2.1 倍であった。

## (2) ニワトリ遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

取得した GC-MS TIC クロマトグラムを遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体のグループ間で比較したところ、極性画分 (図 4)、非極性画分 (図 5) とともに主要なピークについて顕著な差異は認められなかった。MetAlign を用いて質量分析データを解析し、極性画分からは 8167 種類、非極性画分からは 3006 種類のイオンピークを抽出した。続いて、Aloutput を用いてこれらのイオンピークをデコンボリュートした。極性画分と非極性画分由来のイオンピークは、それぞれ、121 種類と 106 種類に統合された (代謝物質候補ピーク)。各代謝物質候補ピークのマススペクトルおよびカラム保持指標と、インハウスのマススペクトルライブラリに格納されている標準品の実測データ (マススペクトルおよびカラム保持指標) との類似性を基にして代謝物質由来ピークを特定した。内部標準物質として抽出溶媒に加えたリビトール、テストステロン、および、血液の抗凝固剤として使用した EDTA を代謝物質候補ピークのリストから除き、残りを代謝物質ピークとした。代謝物質ピーク数は、極性画分では 118 種類、非極性画分では 104 種類であった。これらのうち、極性画分では 77 種類 (表 3)、非極性画分では 48 種類 (表 4) の代謝物質を同定できた。各代謝物質ピークのピーク面積値を同一の TIC クロマトグラム中の内部標準物質 (リビトールあるいはテストステロン) のピーク面積値で割り、相対面積値を算出した。

多変量データが持つ特徴を要約するために、主成分分析を行った。主成分分析は、表 3 と表 4 に示した同定ピークに対して実施した。分析前処理の 2 回の反復操作に由来

する 2 種類の測定データは、平均化せずにそのまま用いた。第一主成分(寄与率 34.4%)と第二主成分(寄与率 11.7%)の主成分スコアの二次元プロットからは、群間での明確なクラスター分離は認められなかった(図 6)。

各代謝物質ピークの群間でのレベル差の有無を検定したところ、全ての代謝物質ピークにおいて 2 倍以上の有意差( $p < 0.05$ )は認められなかった。なお、非極性画分から検出された代謝物質ピークのうち 1 種類(ピーク番号 N102, 未同定ピーク)については、レベル差が 2 倍以下(ratio = 0.74, 遺伝子組換え体/非遺伝子組換え体)の有意差が認められた(表 5)。

### (3) ジャガイモゲノム編集個体と非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

非極性画分では 92 個の代謝物質候補ピークを得た。このうち 27 個は代謝物質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。極性画分では 126 個の代謝物質候補ピークを得た。このうち 31 個は代謝物質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。

非極性画分の 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(図 7A)。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)は他の 5 個体とクラスター分離の傾向が認められた。第二主成分軸に沿って、GE 群と Cont 群の間でクラスター分離の傾向が認められた。極性画分の 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(図 7B)。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。

非極性画分では、7 個のピークにおいて群間での有意差が認められた(表 6)。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。非極性画分の誘導体化試料の 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 (図 8)。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、極性画分では、16 個のピークにおいて群間での有意差が認められた (表 7)。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 Cont 群で低いレベルであった (Cont/GE = 0.37–0.50)。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 Cont 群で低いレベルであった (Cont/GE = 0.55–0.83)。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

##### (1) ニワトリの雌雄個体間でのメタボローム比較解析

一ヶ月齢のニワトリ個体由来の血漿中代謝物質レベルは、性別による差が比較的小さいと考えられた。また、性別による差と比較して、同性内の独立 3 個体の間での違いが比較的大きいことが明らかとなった。すなわち、遺伝子組換え体における代謝動態変化を評価する際に、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体のそれぞれについて、独立した複数個体を確保することで、再現性よく信頼性の高い分析結果が得られることが分かった。

##### (2) ニワトリ遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の一ヶ月齢の雌個体由来の血漿試料を用いて、含有代謝物質レベルの網羅的比較解析を行った。主成分分析では両グループを明確に区別するようなクラスター分離は見られず、また、グループ間で 2 倍以上の有意差を示す代謝物質ピークは認められなかった。これらの結果から、緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入する遺伝子組換え操作が一ヶ月齢の雌個体の血漿中の代謝物質含有量に与える影響は限定的であることが分かった。

##### (3) ジャガイモゲノム編集個体と非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

ゲノム編集技術の一種である TALEN 法の適用によりステロール側鎖還元酵素遺伝子 (*SSR2*) に変異を導入し有毒グリコアルカロイド含量を低減させた GE ジャガイモ

の評価を実施した。GE ジャガイモ試料では、3 種類の代謝物質（カンペステロール、コレステロール、およびソラニジン）において対照試料との差別的な蓄積が見られた。

GE ジャガイモにおけるコレステロールとソラニジンの減少については、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。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質である<sup>7)</sup>。*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。

一方、GE ジャガイモにおけるカンペステロールの増加の原因については、複数の可能性が考えられる。一つ目は、標的遺伝子 *SSR2* の欠損によりステロイドグリコアルカロイド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（図 9）。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  $\beta$ -シトステロールが増加傾向にあった（図 9）。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、変異導入に伴うフレームシフトやアミノ酸置換・欠損によって内生 *SSR2* とは異なる機能を獲得した変異タンパク質が発現している可能性である。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、導入変異には多様性が生じることが予想される。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）。

## E. 結論

### (1) ニワトリ雌雄個体間でのメタボローム比較解析

本研究は、遺伝子組換え技術を用いて外来タンパク質を発現させたニワトリの代謝状態をメタボロミクスによって包括的に評価するための基礎的な知見を得ることが目的である。まず、雌雄個体間での平常時の代謝状態の差異を把握するために、一ヶ月齢の雌個体および雄個体の血漿試料を用い、試料間でのメタボローム比較解析を実施した。雌雄間で含有レベルに差がある代謝物質をリスト化した。得られた結果は、ニワトリ遺

伝子組換え体における代謝解析のための基礎データとして使用する。

### (2) ニワトリ遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

本研究は、外来タンパク質の発現がニワトリの血漿中代謝産物の蓄積状況に及ぼす影響を評価することが目的である。外来タンパク質発現ニワトリのモデルとして遺伝子組換え技術により緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入したニワトリを評価対象とした。緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の一ヶ月齢の雌個体由来の血漿試料を用いて、含有代謝物質レベルの網羅的比較解析を行った。その結果、血漿中代謝物質含有量については、今回の標本数 ( $n=4$ ) で検出できる差は認められなかった。今後、血漿に加え、細胞が含まれる臓器や組織を材料とし、多検体のプロファイリングによってさらに高い精度の代謝活性評価が可能である。

### (3) ジャガイモゲノム編集個体と非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

本研究は、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、代謝物質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質 (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代謝物質であり、これまでに毒性に関する報告はない。一方、極性画分の代謝物質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。

#### 引用・参考文献リスト

- <sup>1)</sup> De Vos et al. *Nat. Protoc.* **2**, 778–91 (2007). DOI:10.1038/nprot.2007.95
- <sup>2)</sup> Tsugawa et al. *BMC Bioinform.* **12**, 131 (2011). DOI:10.1186/1471-2105-12-131
- <sup>3)</sup> Xia et al. *Nucl. Acids Res.* **43**, W251–7 (2015). DOI:10.1093/nar/gkv380
- <sup>4)</sup> Kind et al. *Nat. Methods* **10**, 755–758 (2013). DOI:10.1038/nmeth.2551

- <sup>5)</sup> Furuhashi et al. *Metabolomics* **11**, 175–183 (2015). DOI:10.1007/s11306-014-0687-1
- <sup>6)</sup> Shepherd et al. *Metabolomics* **3**, 475–488 (2007). DOI:10.1007/s11306-007-0058-2
- <sup>7)</sup> Benjamini & Hochberg *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **57**, 289–300 (1995). DOI: doi:10.2307/2346101
- <sup>8)</sup> Haug et al. *Nucl. Acids Res.* **41**, D781–786 (2013). DOI:10.1093/nar/gks1004
- <sup>9)</sup> Sawai and Ohshima et al. *Plant Cell* **26**, 3763–74 (2014). DOI:10.1105/tpc.114.130096

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

- 1) Takumi Ogawa, Takako Sasaki, Atsushi Okazawa, Reiko Teshima, Norihiko Misawa, Daisaku Ohta: Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **23**, 9 – 19, 2016, DOI: 10.18891/jjfc.23.1\_9.
- 2) 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.
- 3) 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

- 1) 小川拓水, 鹿島光司, 幸義和, 岡澤敦司, 清野宏, 太田大策, コメ型経口ワクチン MucoRice-CTB のメタボローム解析, 第34回日本植物細胞分子生物学会大会 2016年9月(上田)

## H. 知的所有権の出願・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

表 1. ニワトリ血漿抽出物の極性画分から検出されたピークリスト

Peak ID	カラム保持時間 (min)	Compound name
PP-I.S.1	24.93	ribitol (5TMS)-01
PP-I.S.2	25.25	ribitol (5TMS)-02
PP01	9.29	pyruvic acid (1MEOX 1TMS)
PP02	9.63	lactic acid (2TMS)
PP03	10.77	alanine (2TMS)
PP04	11.27	unidentified-01
PP05	12.41	3-hydroxybutanoic acid (2TMS)
PP06	15.92	proline (2TMS)
PP07	16.19	glycine (2TMS)
PP08	16.36	succinic acid (2TMS)
PP09	17.62	serine (3TMS)
PP10	18.24	threonine (3TMS)
PP11	20.00	amino malonic acid (3TMS)
PP12	20.44	malic acid (3TMS)
PP13	20.68	5-oxo proline (2TMS)-01
PP14	20.94	5-oxo proline (2TMS)-02
PP15	21.07	aspartic acid (3TMS)
PP16	21.16	proline (3TMS)
PP17	21.72	cysteine (3TMS)
PP18	22.16	pentanedioic acid (1MEOX 2TMS)
PP19	22.82	unidentified-02
PP20	22.88	unidentified-03
PP21	23.01	glutamine (3TMS)
PP22	23.86	unidentified-04
PP23	23.96	asparagine (3TMS)
PP24	24.86	unidentified-05
PP25	25.80	unidentified-06
PP26	26.60	ornithine (4TMS)
PP27	26.78	isocitric acid (4TMS)
PP28*	28.27	glucose (1MeOX 5TMS)
PP29	28.60	galactose (1MEOX 5TMS)
PP30	28.81	glucitol (6TMS)
PP31	28.93	ascorbic acid (4TMS)
PP32	29.14	maltose (1MEOX 8TMS)
PP33	29.62	talose (5TMS)-01
PP34	29.80	unidentified-07
PP35	30.38	gulose (5TMS)
PP36	31.24	myo-inositol (6TMS)
PP37	31.34	uric acid (4TMS)
PP38	32.86	tryptophan (3TMS)
PP39	33.06	inositol 1-phosphate (7TMS)
PP40	34.03	cystine (4TMS)
PP41	34.37	unidentified-08
PP42	34.65	unidentified-09
PP43	34.78	unidentified-10
PP44*	35.81	EDTA (4TMS)

\*: 解析から除外したピーク, PP: 極性画分, TMS: トリメチルシリル誘導体, MEOX: メトキシアミンによるオキシム化体

表 2. ニワトリ血漿抽出物の非極性画分から検出されたピークリスト

Peak ID	カラム保持時間 (min)	Compound name
LP-I.S.1	38.41	testosterone (1TMS)-01
LP-I.S.2	38.52	testosterone (1TMS)-02
LP01	8.49	unidentified-11
LP02	8.70	propionic acid (2TMS)
LP03	9.87	unidentified-12
LP04	10.16	hydroxylamine (3TMS)
LP05	11.03	unidentified-13
LP06	11.90	unidentified-14
LP07	13.52	unidentified-15
LP08	13.70	benzoic acid (1TMS)
LP09	14.23	unidentified-16
LP10	14.42	ethanilamine (3TMS)
LP11	14.74	phosphoric acid (3TMS)
LP12	14.82	glycerol (3TMS)
LP13	18.14	unidentified-17
LP14	18.96	unidentified-18
LP15	19.43	unidentified-19
LP16	22.42	unidentified-20
LP17	25.07	phosphoric acid (4TMS)
LP18	25.29	unidentified-21
LP19	25.62	15:0FAME
LP20	26.85	16:1FAME
LP21	26.93	16:1FAME
LP22	27.30	16:0FAME
LP23	27.68	unidentified-22
LP24	28.85	talose (5TMS)-02
LP25	29.24	16:0FA (1TMS)
LP26	29.95	18:2FAME
LP27	30.05	18:1FAME
LP28	30.43	18:0FAME
LP29	31.70	18:2FA (1TMS)
LP30	31.78	18:1FA (1TMS)-01
LP31	31.88	18:1FA (1TMS)-02
LP32	32.17	18:0FA (1TMS)
LP33	32.35	20:4FAME
LP34	32.44	20:3FAME-01
LP35	32.59	20:3FAME-02
LP36	32.86	20:2FAME
LP37	32.93	20:1FAME
LP38	33.29	20:0FAME
LP39	33.88	20:4FA (1TMS)-01
LP40	33.97	20:3FA (1TMS)
LP41	34.10	unidentified-23
LP42	34.16	20:4FA (1TMS)-02
LP43	34.45	20:2FA (1TMS)
LP44	34.51	20:1FA (1TMS)
LP45	34.86	20:0FA (1TMS)
LP46	34.97	22:6FAME-01
LP47	35.05	unidentified-24
LP48	36.35	22:6FAME-02
LP49	36.88	unidentified-25
LP50*	43.31	cholesterol (1TMS)
LP51	43.6	unidentified-26
LP52	44.27	campesterol (1TMS)
LP53	45.13	$\beta$ -sitosterol (1TMS)
LP54	48.46	unidentified-27

\*: 解析から除外したピーク。LP: 非極性画分, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester, TMS; トリメチルシリル誘導体

表 3. ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体の血漿抽出物の極性画分から検出されたピークの同定結果

Peak ID	カラム保持指標	主要イオンピークの $m/z$ 値	Compound name
P001	1100.2	73	Alanine
P002	1103.2	73	Alanine
P004	1183.9	75	7:0 FA
P008	1226.0	144	Valine
P009	1227.0	144	Valine
P010	1228.5	144	Valine
P011	1232.1	144	Valine
P014	1261.5	174	Beta-Alanine
P015	1265.1	174	Beta-Alanine
P016	1266.1	174	Beta-Alanine
P018	1276.8	299	Glucose-1-phosphate
P019	1277.8	174	Beta-Alanine
P020	1278.3	299	Phosphoric acid
P022	1279.9	174	Beta-Alanine
P023	1282.9	299	Glucose-1-phosphate
P024	1289.0	158	Leucine
P025	1289.5	299	Glucose-1-phosphate
P026	1294.1	299	Glucose-1-phosphate
P027	1297.1	73	Glycerol
P028	1297.6	147	Glycerol
P029	1298.6	158	Leucine
P030	1301.9	158	Isoleucine
P031	1302.5	73	Threonine
P032	1303.1	158	Isoleucine
P033	1306.5	158	Isoleucine
P034	1309.3	73	Threonine
P035	1309.9	158	Isoleucine
P036	1313.3	174	Glycine
P037	1315.0	73	Threonine
P038	1316.1	147	Succinate
P039	1319.6	174	Glycine
P040	1328.1	147	Succinate
P041	1353.8	147	Itaconate
P042	1361.1	245	Fumarate Acid
P045	1432.1	74	11:0 FAME
P054	1497.3	147	Malic Acid
P055	1499.8	73	Malic acid
P057	1512.1	73	Malic acid
P058	1514.1	156	5-Oxoproline
P059	1516.2	156	5-Oxoproline
P062	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid
P063	1528.4	156	5-Oxoproline
P066	1533.8	156	5-Oxoproline
P067	1534.5	232	Aspartic acid
P068	1542.7	232	Aspartic acid
P069	1550.2	232	Aspartic acid
P070	1576.0	73	Alpha-ketoglutaric acid
P071	1597.1	73	Alpha-ketoglutaric acid
P073	1621.0	218	Phenylalanine
P074	1630.5	218	Phenylalanine
P076	1639.3	218	Phenylalanine
P079	1771.3	147	Aconitic acid
P080	1793.6	156	Glutamine
P082	1830.7	142	Ornithine
P083	1834.7	142	Ornithine
P084	1840.5	142	Ornithine
P085	1851.9	273	Citric acid
P087	1930.4	73	Glucose
P088	1933.9	73	Glucose
P089	1936.3	319	Glucose
P091	1943.2	319	Glucose
P095	1959.3	73	Mannitol
P096	1980.5	73	Ascorbic acid
P097	1981.4	205	Ascorbic acid
P098	2040.2	313	Palmitic acid
P099	2044.7	313	Palmitic acid
P100	2051.0	117	16:0 FA
P104	2125.3	305	Myo-Inositol
P105	2130.0	73	Myo-Inositol
P106	2239.5	202	Tryptophan
P107	2249.1	117	18:0 FA
P114	2713.2	361	Sucrose
P115	2813.6	69	Squqlane
P116	2819.6	69	Squqlane
P117	2826.8	69	Squqlane
P118	2832.7	69	Squqlane
P119	2836.3	69	Squqlane

P; 極性画分, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

表 4. ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体の血漿抽出物の非極性画分から検出されたピークの同定結果

Peak ID	カラム保持指標	主要イオンピークの $m/z$ 値	Compound name
N001	1101.4	73	Alanine
N006	1172.9	75	7:0 FA
N012	1259.5	116	Serine
N013	1261.6	174	Beta-Alanine
N014	1266.1	174	Beta-Alanine
N015	1270.2	174	Beta-Alanine
N018	1279.9	174	Ethanol amine
N019	1281.4	299	Glucose-1-phosphate
N021	1283.9	299	Glucose-1-phosphate
N022	1290.0	299	Glucose-1-phosphate
N023	1293.6	299	Phosphoric acid
N024	1297.1	205	Glycerol
N026	1316.2	174	Glycine
N027	1319.6	174	Glycine
N031	1369.1	215	9:0 FA
N039	1497.3	85	Pentadecane
N041	1518.2	156	5-Oxoproline
N043	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid
N044	1533.8	156	5-Oxoproline
N046	1550.2	232	Aspartic acid
N049	1711.5	71	Heptadecane
N050	1799.8	71	Octadecane
N051	1854.3	285	14:0 FA
N053	1927.0	74	16:0 FAME
N055	1941.4	319	Glucose
N056	2000.0	71	Icosane
N058	2040.2	313	Palmitic acid
N059	2051.9	117	16:0 FA
N061	2095.6	81	18:2 FAME
N062	2101.0	71	Henicosane
N063	2101.9	74	18:1 FAME
N064	2107.6	74	18:1 FAME
N065	2122.6	74	18:0 FAME
N066	2129.1	74	18:0 FAME
N067	2150.7	327	17:0 FA
N068	2162.9	327	Margarate
N069	2216.6	75	Linoleic acid
N076	2250.9	341	18:0 FA
N077	2260.5	79	20:4 FAME
N078	2278.7	79	20:3 FAME
N079	2347.3	117	19:0 FA
N083	2446.3	117	20:0 FA
N084	2453.6	79	22:6 FAME
N085	2468.3	79	22:6 FAME
N098	3156.2	502	$\alpha$ -tocopherol
N101	3164.2	329	Cholesterol
N103	3266.0	129	Campesterol
N104	3355.4	129	Sitosterol

N; 非極性画分. FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

表 5. ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体の群間比較において蓄積レベルに有意差が見られたピーク

Peak ID	Compound name	Student's t test (組換え体 vs 非組換え体)		ピーク強度比 (組換え体/非組換え体)
		p value	FDR	
N102	Unknown	0.0120	0.98	0.74

N; 非極性画分. FDR; false discovery rate

表 6. ジャガイモ GE 試料と Cont 試料から検出された非極性代謝物の群間比較の結果

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
N076	Campesterol	11286	1469	1123	152	<b>10.1</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0258</b>
N069	Cholesterol	1292	469	5357	564	<b>-4.1</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0258</b>
N071	Solanidine	1950	657	102032	20199	<b>-52.3</b>	<b>0.0016</b>	<b>0.0500</b>
N079	N079	4579	601	6649	356	-1.5	<b>0.0044</b>	0.1021
N087	N087	5347	627	7577	409	-1.4	<b>0.0063</b>	0.1158
N086	N086	20508	2812	28354	2341	-1.4	<b>0.0183</b>	0.2805
N085	N085	17527	2530	23979	1903	-1.4	<b>0.0244</b>	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	$\beta$ -Sitosterol	112932	14688	90025	7438	1.3	0.0619	0.3144
N060	C27:0FAIc	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	C25:0FAIc	13941	3097	9554	823	1.5	0.0955	0.3592
N081	C30:0FAIc	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	C21:0FAIc	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	C24:0FAIc	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

(Continued)

表 6. (Continued)

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
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

<sup>a)</sup> N; 非極性画分。<sup>b)</sup> FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester。<sup>c)</sup> GE; ゲノム編集試料, Cont; 対照試料, SD; 標準偏差。<sup>d)</sup> GE と Cont 間でのピーク強度比 (GE/Cont) を示した。GE/Cont 比が 1 以下の場合は Cont/GE 比を計算し、その値に「-(マイナス)」を付した。値の絶対値が 2 以上の場合は太字で示した。<sup>e)</sup> 値が 0.05 より小さい場合は太字で示した。

表 7. ジャガイモ GE 試料と Cont 試料から検出された極性代謝物の群間比較の結果

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P056	P056	19015	3660	12365	2715	1.5	<b>0.0029</b>	0.2438
P017	Glycine	4593	312	3643	506	1.3	<b>0.0050</b>	0.2438
P007	Leucine	41845	6171	23013	4755	1.8	<b>0.0070</b>	0.2438
P125	1-Kestose-like 2	486	132	681	93	-1.4	<b>0.0090</b>	0.2438
P036	P036	107781	23150	77126	19468	1.4	<b>0.0128</b>	0.2438
P026	P026	31968	5677	21755	3261	1.5	<b>0.0144</b>	0.2438
P055	P055	124600	21890	83068	20978	1.5	<b>0.0145</b>	0.2438
P005	Valine	91723	17793	50893	7553	1.8	<b>0.0168</b>	0.2438
P014	Isoleucine	66301	14917	33400	5492	<b>2.0</b>	<b>0.0200</b>	0.2438
P060	P060	55534	11598	40300	8407	1.4	<b>0.0214</b>	0.2438
P016	Succinate-like 1	1197	44	1006	124	1.2	<b>0.0216</b>	0.2438
P059	P059	10797	2641	7131	1625	1.5	<b>0.0239</b>	0.2438
P061	Phenylalanine	41073	10375	15873	3936	<b>2.6</b>	<b>0.0252</b>	0.2438
P102	Tryptophan	32954	10250	12456	4115	<b>2.6</b>	<b>0.0337</b>	0.3037
P078	Quinate	135156	21638	251428	56039	-1.9	<b>0.0404</b>	0.3390
P090	Tyrosine-like 1	76671	28297	28534	9449	<b>2.7</b>	<b>0.0455</b>	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	<b>14.0</b>	0.1243	0.5222
P046	γ-Aminobutyrate-like 1	486	132	5206	9486	<b>-10.7</b>	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

(Continued)

表 7. (Continued)

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P058	Phenylalanine-like 1	2372	3835	514	132	<b>4.6</b>	0.3866	0.8338
P054	$\alpha$ -Ketoglutaric acid-like 1	9865	11192	4381	6658	<b>2.3</b>	0.3877	0.8338
P030	P030	3940	105	3887	193	1.0	0.3965	0.8338
P051	$\alpha$ -Ketoglutaric acid-like 2	19162	15742	9463	10899	<b>2.0</b>	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	<b>2.1</b>	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-like1	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	$\gamma$ -Aminobutyrate-like 2	1094	434	1036	388	1.1	0.8520	0.9552

(Continued)

表 7. (Continued)

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
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

<sup>a)</sup> P; 極性画分。 <sup>b)</sup> FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester。 <sup>c)</sup> GE; ゲノム編集試料, Cont; 対照試料, SD; 標準偏差。 <sup>d)</sup> GE と Cont 間でのピーク強度比 (GE/Cont) を示した。 GE/Cont 比が 1 以下の場合は Cont/GE 比を計算し, その値に「-(マイナス)」を付した。 値の絶対値が 2 以上の場合は太字で示した。 <sup>e)</sup> 値が 0.05 より小さい場合は太字で示した。

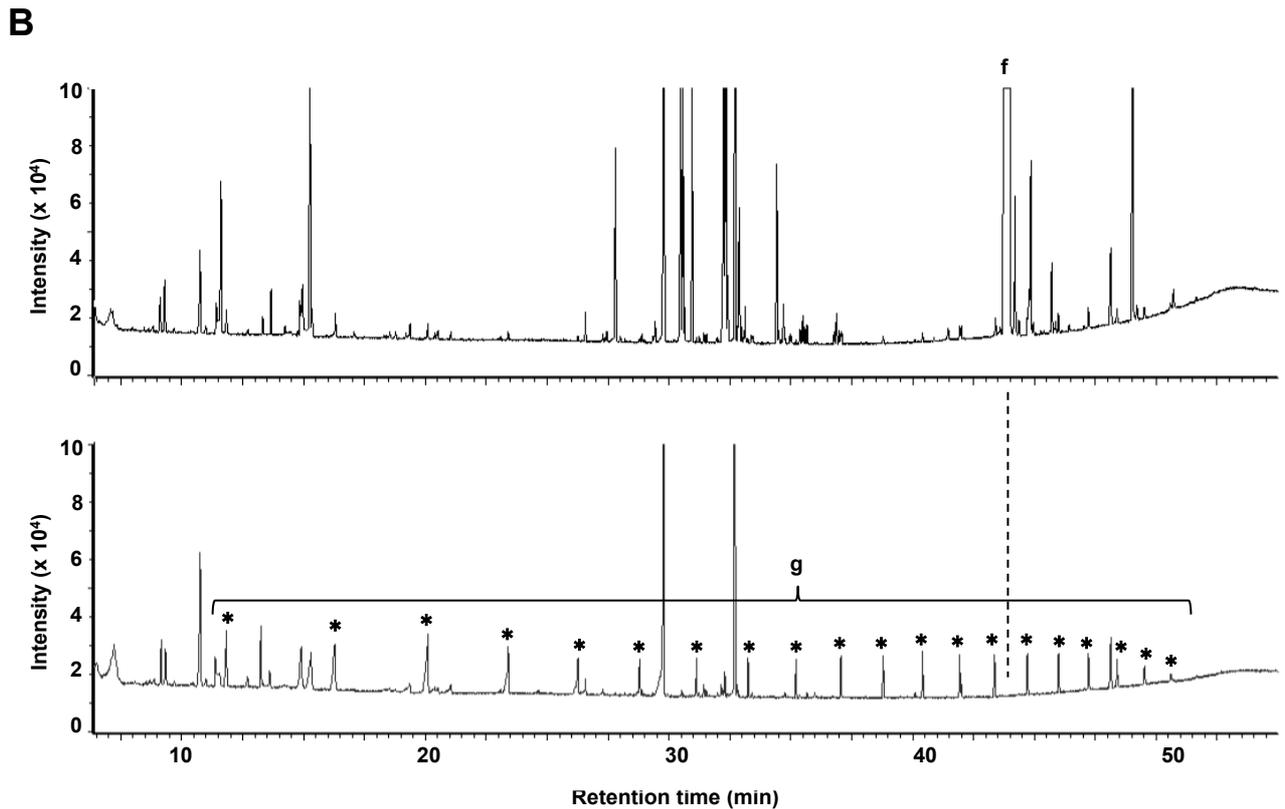
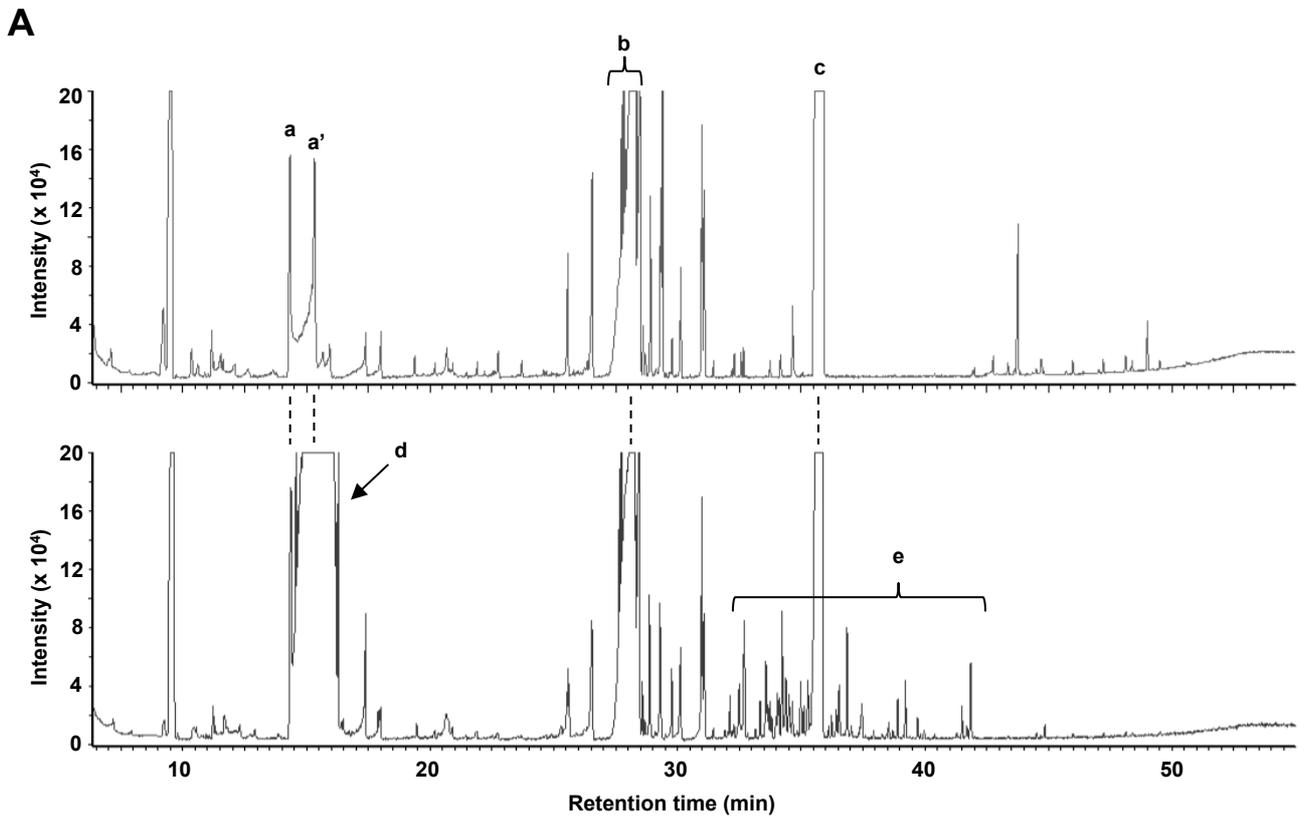
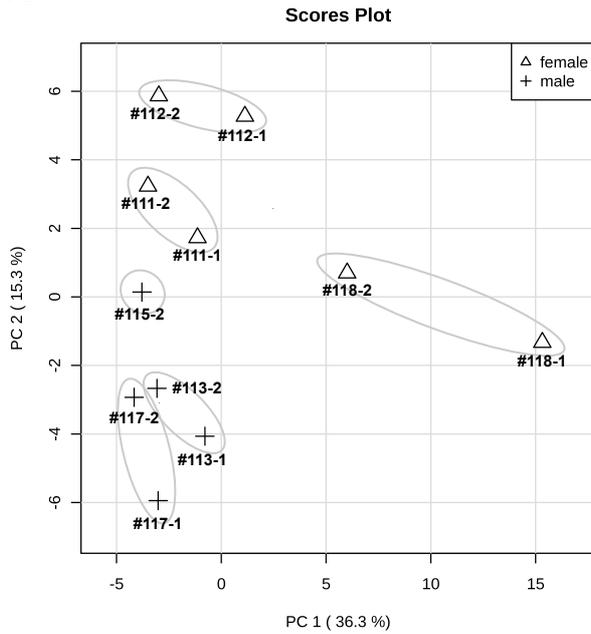
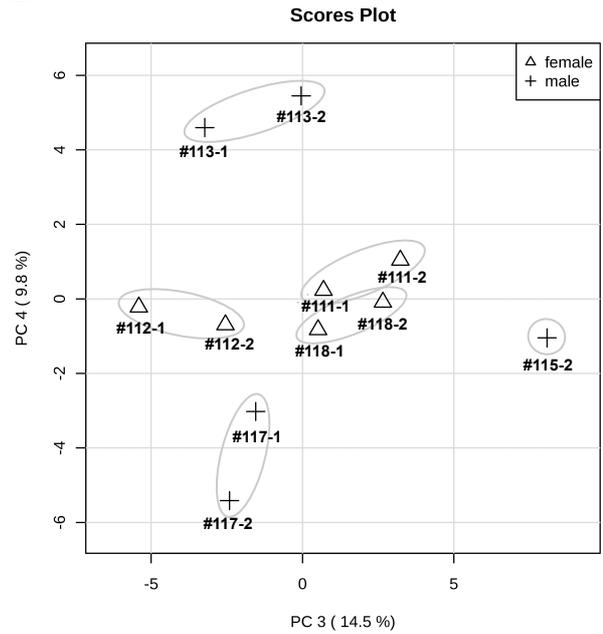


図 1. 限外濾過法による除タンパク質処理の適用が分析結果に及ぼす影響  
 (A)極性画分の GC-MS トータルイオンカレント(TIC)クロマトグラム。上段; 変性沈殿法のみ行った試験区, 下段; 変性沈殿法+限外濾過法を組み合わせた試験区。(B) 非極性画分の GC-MS TIC クロマトグラム。上段; 変性沈殿法のみ行った試験区, 下段; 変性沈殿法+限外濾過法を組み合わせた試験区。a, a'; phosphoric acid (3TMS), b; glucose (5TMS), c; EDTA (4TMS), d; glycerol (3TMS), e; 未同定ピーク群, f; cholesterol (1TMS), g; 未同定ピーク群(アスタリスクで示したピーク)。

**A****B**

## 図 2. 主成分分析

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。データの標準化として、エクセルで個々のピーク面積値を内部標準物質のピーク面積値に対する相対値に換算し、欠損値の補填(他サンプルの平均値の 1/2 の値)、スケーリング(auto scaling)を行った。(A)PC1 と PC2 の主成分スコアの二次元プロット図。(B)PC3 と PC4 の主成分スコアの二次元プロット図。雌個体(#111, #112, #118)は三角, 雄個体(#113, #115, #117)は十字で示した。

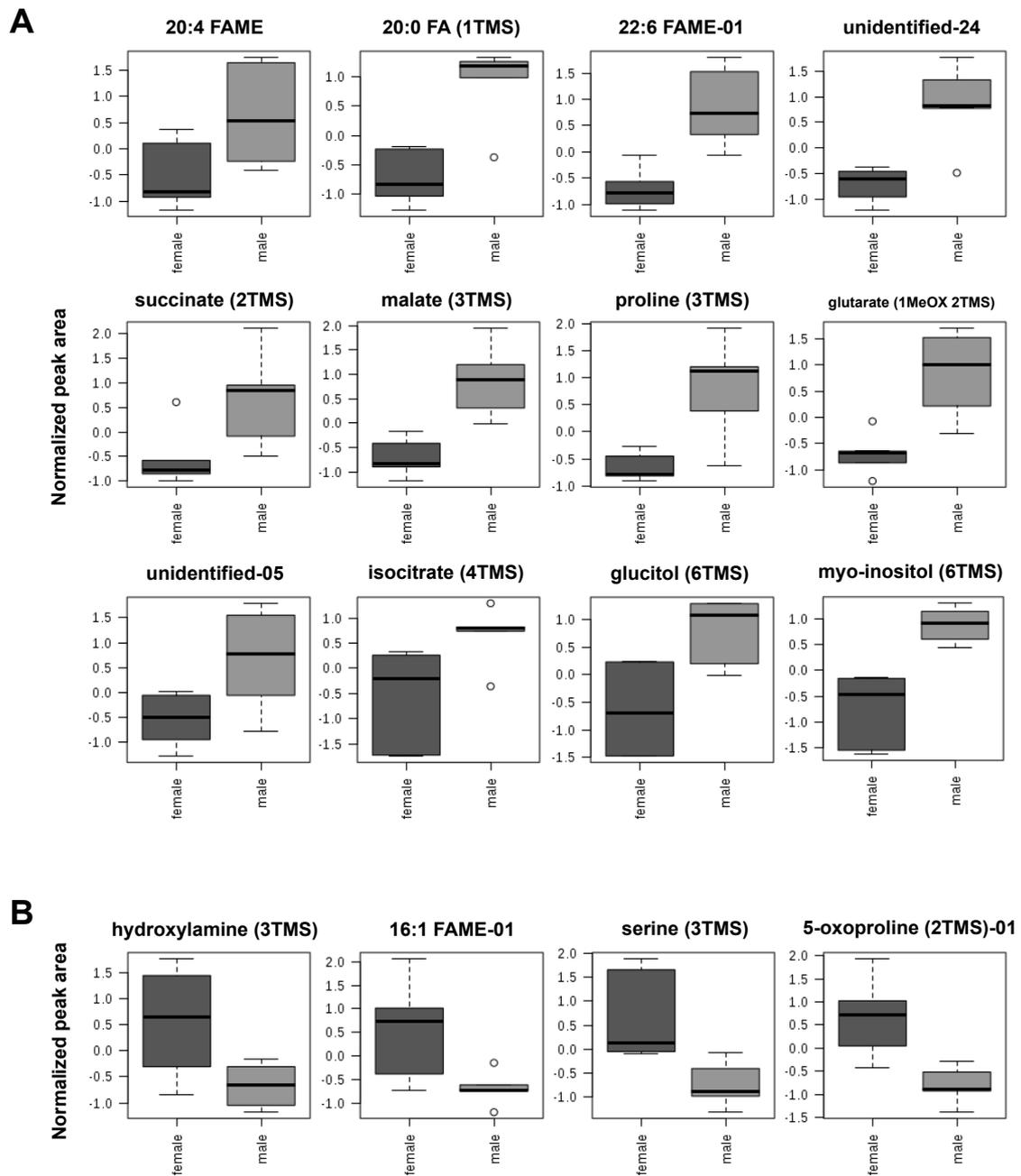


図 3. 雌雄間の比較において蓄積レベルに有意差がみられた代謝産物

(A) 雄グループにおいて蓄積レベルが高かった代謝物。(B) 雌グループにおいて蓄積レベルが高かった代謝物。

TMS; トリメチルシリル (TMS) 誘導体, FAME; 脂肪酸メチルエステル誘導体。

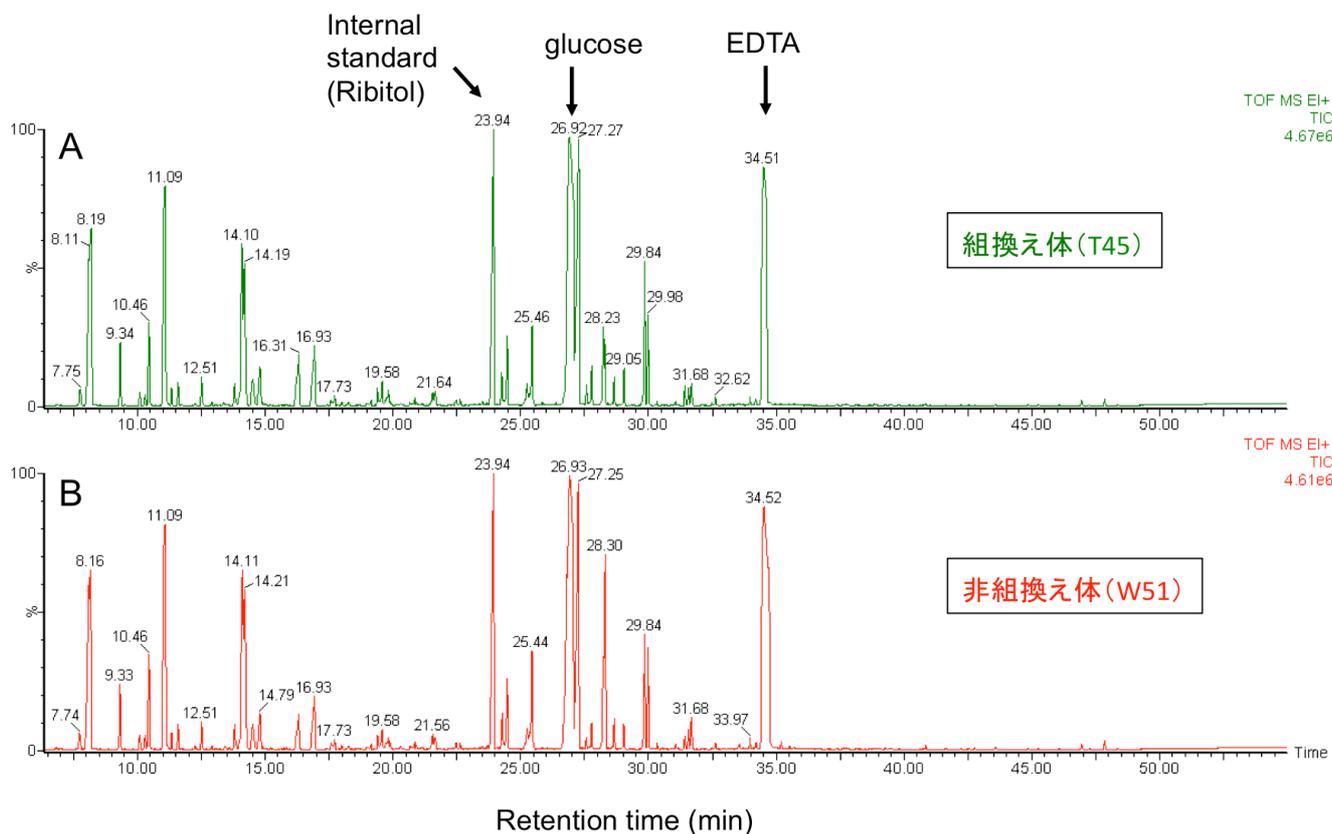


図 4. ニワトリ血漿から調製した極性画分の GC-MS TIC クロマトグラム

(A) 遺伝子組換え体(個体番号 T45)。(B) 非遺伝子組換え体(個体番号 W51)。EDTA; エチレンジアミン四酢酸。

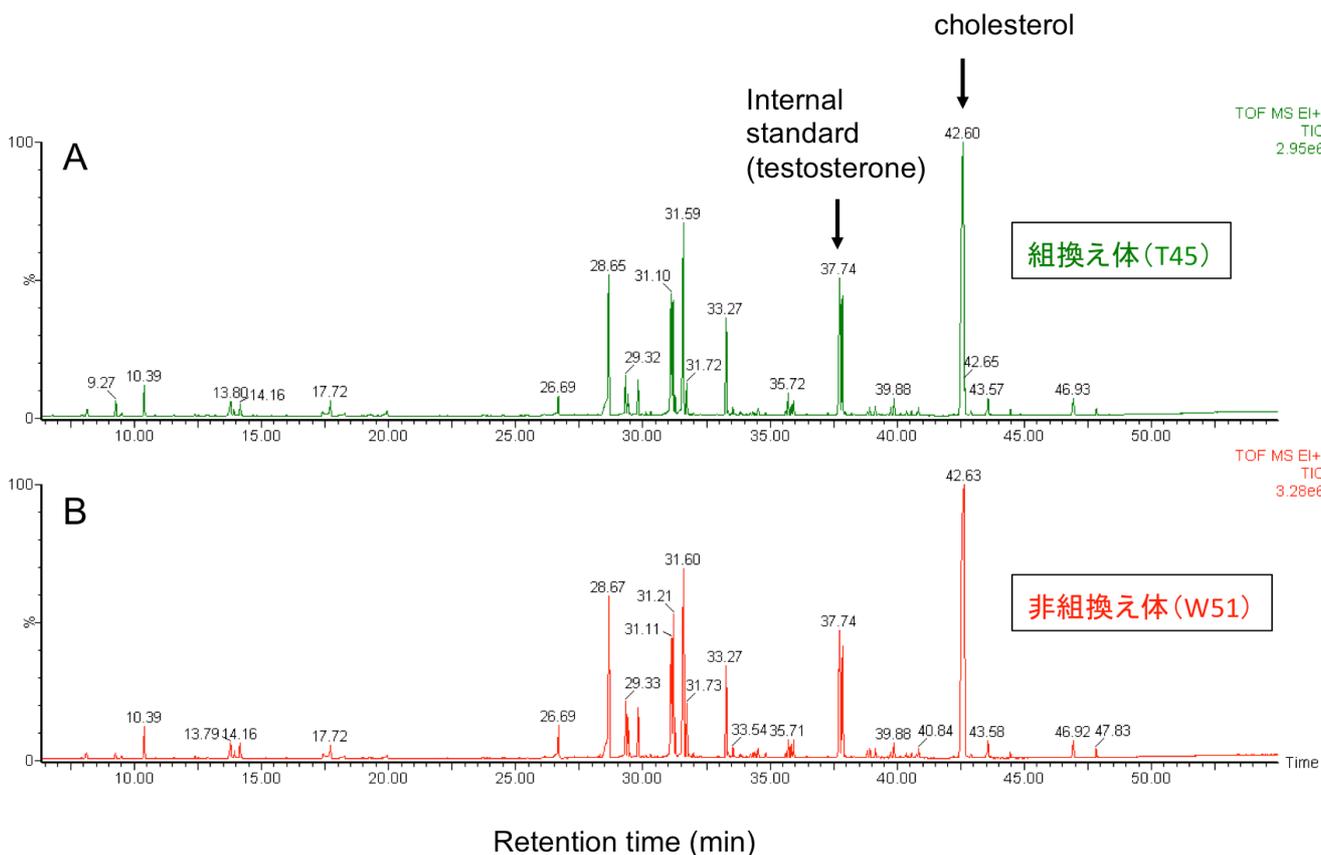


図 5. ニワトリ血漿から調製した非極性画分の GC-MS TIC クロマトグラム

(A) 遺伝子組換え体(個体番号 T45)。(B) 非遺伝子組換え体(個体番号 W51)。

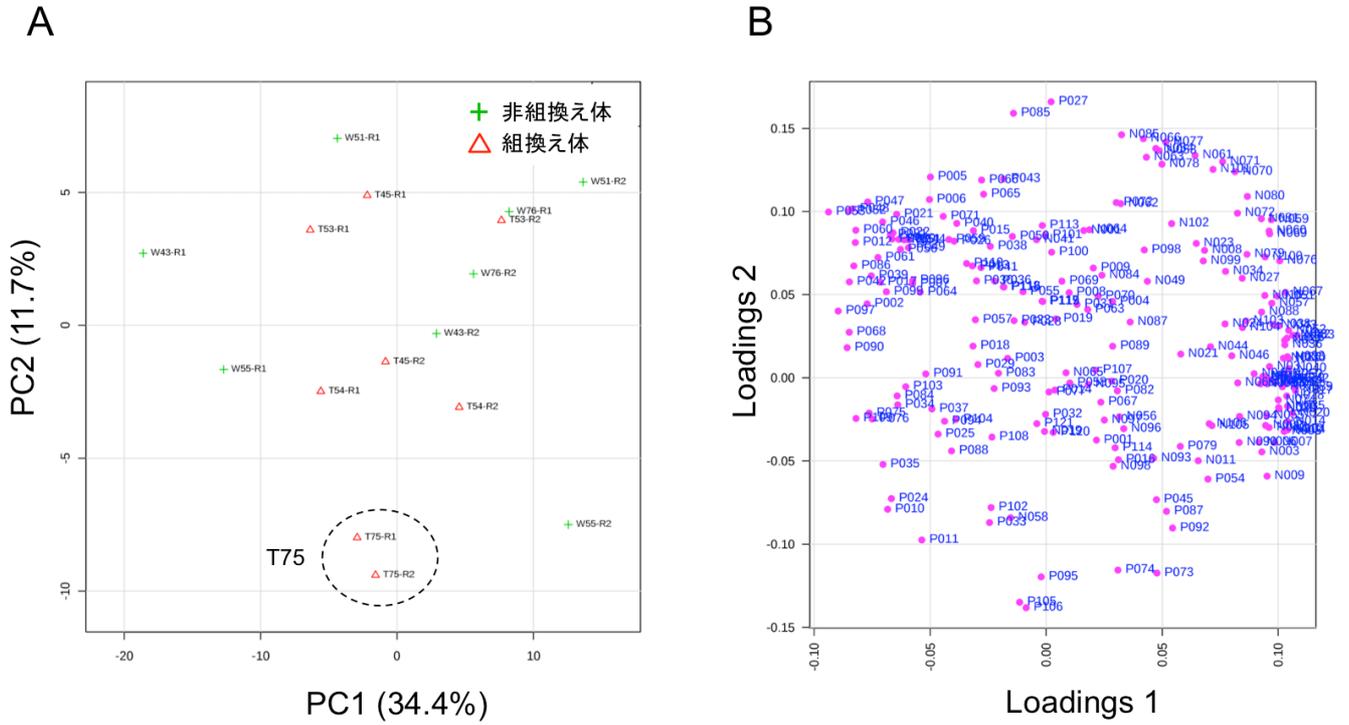


図 6. 主成分分析

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。データの標準化方法は auto scaling を選択した。(A) 第一主成分(PC1)と第二主成分(PC2)の主成分スコアの二次元プロット図。括弧内に各主成分の寄与率を示した。個体番号 T75 のプロットを点線で囲んだ。(B) PC1 と PC2 のローディングスコアの二次元プロット図。各プロットにピーク ID を付記した。P; 極性画分。N; 非極性画分。

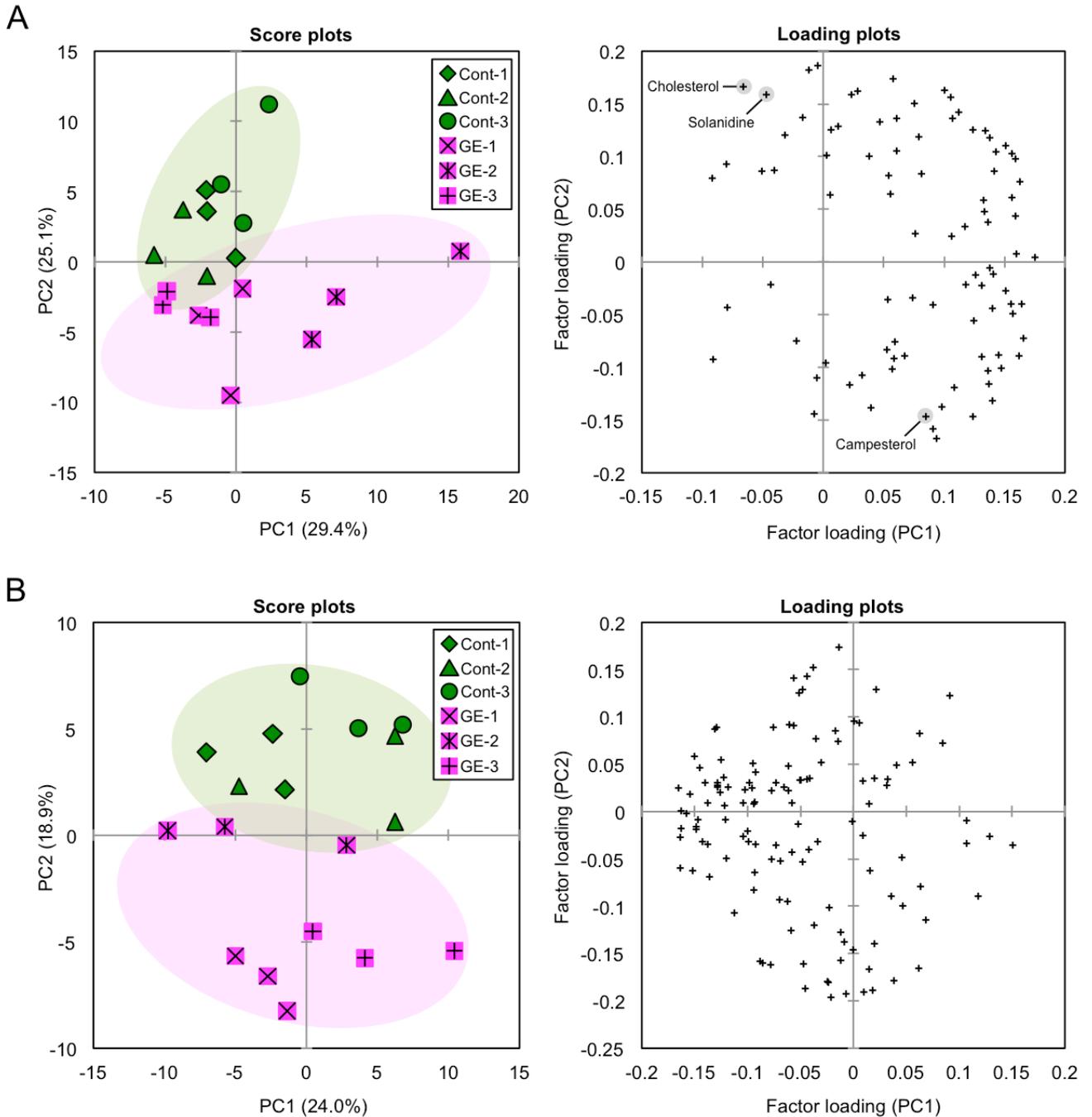


図 7. 主成分分析

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。

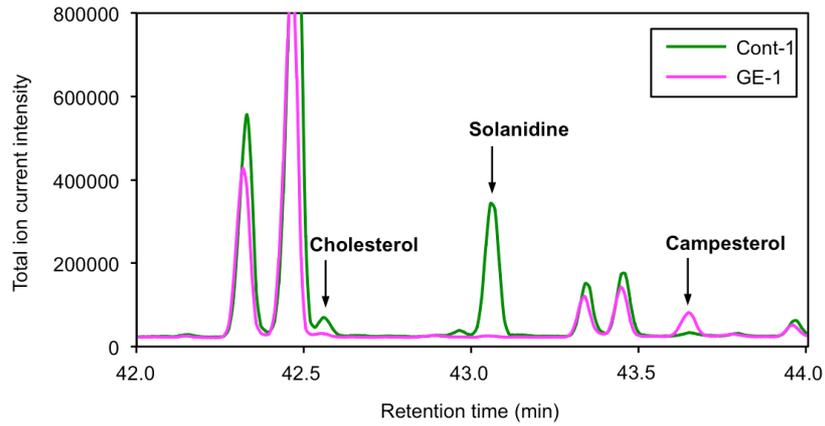


図 8. GC-MS TIC クロマトグラムの群間比較

対照ジャガイモ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 TIC 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。

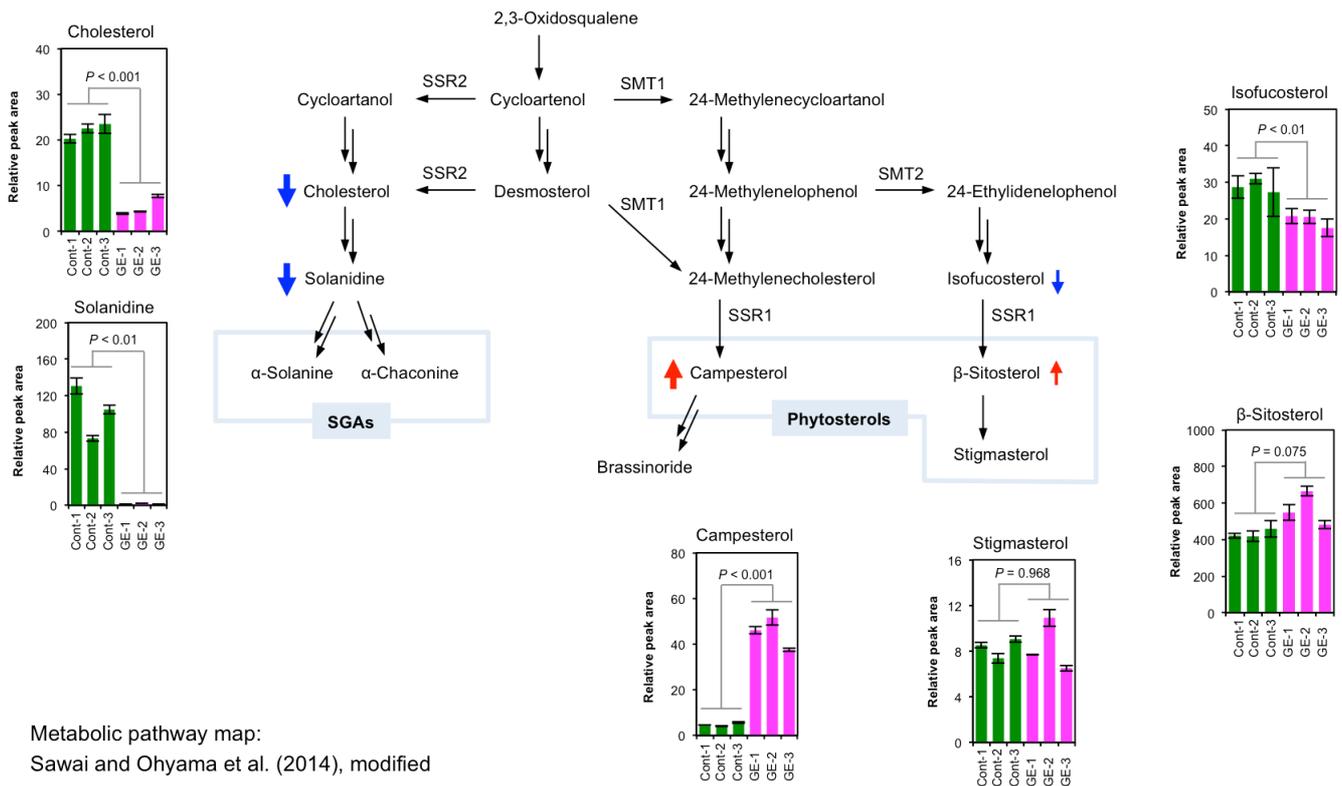


図 9. ジャガイモのステロイドグリコアルカロイド合成および植物ステロール合成に関わる代謝経路地図  
代謝経路地図は、Sawai and Ohyama et al. (2014) を参考にして一部を改変して作成した。Shepherd et al. (2007) に記載されていたカラム保持指標情報および検出 m/z 情報をもとにして同定した各成分について、内部標準物質との比較により得られた相対ピーク面積値の平均値を棒グラフで示した (エラーバーは 3 回の独立した抽出実験の標準偏差を示す)。群間の平均値の差の検定は Student's t-test を用い、検定結果は図中に記入した。ゲノム編集ジャガイモ試料 (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。

## 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科・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27年度は、遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出試験を行なうと共に、各オミクス解析（メタボローム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析）における個体差や雌雄差を明らかにするために、非組換えニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者への試料提供を行なった。平成28年度は、遺伝子改変ニワトリ（GFP ニワトリ）の各オミクス解析（メタボローム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析）を行なうために、GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者への試料提供を行なった。平成29年度は、今後の解析に利用可能な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・維持を行なうとともに各オミクス解析データの総合解析を実施した。

#### 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。

そこで本研究では、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が目的である。平成27年度は、遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出試験を行なうと共に、各オミクス解析（メタボローム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析）における個体差や雌雄差を明らかにするために、非組換えニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者への試料提供を行なった。平成28年度は、遺伝子改変ニワトリ（GFP ニワトリ）の各オミクス解析（メタボローム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析）を行なうために、GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者への試料提供を行なった。平成29年度は、今後の解析に利用可能な遺伝子改変ニ

ワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出・維持を行なうとともに各オミクス解析データの総合解析を実施した。

## B. 研究方法と結果

### （1）GFP 遺伝子導入ニワトリの選抜と育成

GFP ニワトリは、国立大学法人名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センターで維持されている LSi/ $\Delta$ AeGFP-TG ニワトリの受精卵を導入した。この GFP ニワトリは、片方のアレルに GFP 遺伝子が導入されたもので GFP<sup>+/+</sup>で維持されている。導入した受精卵は、分担者の研究室で孵化させたのち、血液を試料に GFP 遺伝子の有無と雌雄判定を PCR によって行なった。雌雄判定には、chicken dead end homologue (CDH) 遺伝子を標的とした。CDH 遺伝子は、ニワトリの性染色体にコードされた遺伝子であり、Z 染色体と W 染色体上で塩基に違いがある。そのためこの領域を PCR で増幅すると、ZZ（雄）では 1 本、ZW（雌）では 2 本のバンドが増幅され、電気泳動により雌雄を判定することができる。GFP 遺伝子が検出されたヒナは GFP ニワトリとして、また検出されなかったヒナは正常ニワトリとして、分担者が管理する TG ニワトリ飼育施設で育成した。

### （2）GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出

1-2 ヶ月齢の雌の GFP 及び正常ニワトリそれぞれ 3 羽を選抜し、採血を行い、遠心分離によりそれぞれ血漿を回収した。また採血した血液は、37°C で一時間固化させた後、4°C で一昼夜静置し、その後、遠心分離により血清を回収し、-80°C で保存した。また白血球の分離では、採血した血液を PBS(-) で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque を用いた密度勾配遠心法（740 G, 10 分）により白血球を回収した。回収した白血球は全 RNA 単離キット (RNeasy, QIAGEN) により全 RNA を単離した。単離した全 RNA は分光光度計により、230, 260, 280 nm の吸光度を測定し、全 RNA の量と純度を計算した。それぞれの試料は、研究協力者へオミクス解析のため送付した。

### （3）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。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。

### （4）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

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。その結果、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。

### 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：27-69, 27-99, 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：C11-29, 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. 考察

モデルニワトリの作出試験では、国立大学法人名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センターから GFP 遺伝子が導入されたニワトリの受精卵から育成した。このニワトリは、GFP<sup>+/+</sup>では胚性致死となるため、GFP<sup>+/+</sup>で維持されている。そのためメンデルの法則に従うと、組換え体と正常ニワトリが 1:1 の割合で孵化する。本作出試験では、約 3:2 の割合で孵化しており、ほぼメンデルの法則に準じているものと思われる。このモデルニワトリを用いたオミクス解析では、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。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考えられた。

組換え動物をオミクス解析等により評価する際、個体差を如何にデータに反映させ補正するかは、極めて重要であり、データの変動が個体差によるものなのか、それとも遺伝子の改変によるものなのかを明らかにする必要がある。またこれは雌雄差によっても生じるものであり、このデータの蓄積は必須である。本研究成果をもとに、今後は鶏卵や鶏肉など実際の可食部での解析も必要であろう。

新たなモデルニワトリの作出試験では、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. 結論

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. 健康危険情報

異常なし。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

2. 学会発表

1) 中川祐樹, 江崎僚, 佐久間哲史, 黒岩麻里, 山本卓, 堀内浩幸, ゲノム編集技術を用いた鳥類の性決定関連遺伝子の解析, 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 (神戸)

2) Ezaki R, Hirose F, Furusawa S, Horiuchi H. Stable and simple culture protocol for chicken primordial germ cells using apoptosis inhibitor. The 17th Asian- Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22, 2016, Fukuoka, JAPAN.

3) Nakagawa Y, Ezaki R, Sakuma T, Kuroiwa A, Yamamoto T, Furusawa S, Horiuchi H.

Genome editing in chicken primordial germ cells using genome editing tools. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima, JAPAN.

- 4) Kameyama F, Nakagawa Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken epiblast derived stem cells using CRISPR/Cas9. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima, JAPAN.
- 5) 江崎僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 堀内浩幸. アポトーシス阻害剤を活用したニワトリ始原生殖細胞の新規培養方法. 第 39 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日 (横浜)
- 6) 平野朝子, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリエピブラスト幹細胞はナイーブ型かプライム型か. 第 39 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日 (横浜)
- 7) 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.
- 8) 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).

- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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.

G. 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、消費者の年代別による生物の基礎的知識やリテラシーの違いを把握し、年代によるコミュニケーション手法の検討、および円滑なリスクコミュニケーションに必要な要因の抽出を実施した。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、日米の GM サーモンに対する報道状況を整理し、消費者の反応の実態を把握した。

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、消費者の年代別の受容性の差異の要因を解明すべく、ライフイベントによる受容性の変化と食品の安全性の感度の変化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、米国とカナダにおける GM サーモンに対する報道状況を整理し、消費者の反応の実態を把握した。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。

#### A. 研究目的

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乖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。

その特殊な状況下ではリスクコミュニケーションを進めることで、改善または理解を得る一助になる。

また、NBTのような従来のGMとは異なる特徴を持った技術も登場してきている。リスクコミュニケーションも複雑化してきており、より一層慎重を期し、新たなコミュニケーションロジック、手法の開発が求められている。一方で、NBTの種類によっては、消費者が従来のGM技術に対する受容性とは異質の傾向を示す技術もある。これらNBTが持つ特徴は、消費者とのコミュニケーションの突破口となる可能性もある。

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んだ。さらに、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目的で、3か年で以下の研究を実施した。(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)

- 最先端のGM技術について整理するとともに、アンケート調査により最先端のGM技術の特徴(外来遺伝子がない、検知が不可能等)に対する消費者の意識を把握し、コミュニケーションを行う上で問題点と解決策を検討した。

### 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。

### 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。

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

生物学の分野では、近年目覚ましいスピードで多くのことが明らかになっており、技術も日進月歩で進化している。特に、高校の生物では、この20年間で指導内容が急増しており、消費者のリテラシーに、生物の履修状況や教育を受けた時期による差が生じていると考えられる。高校生物の履修内容(リテラシー)、年代やライフステージの変化(結婚、子育て、子ども独立等)による食生活・食への意識がどのように変容し、GMへの受容に影響を与えているかを調査した。

### i. 高校生物の履修内容の変化

#### I-i-1. 研究方法

現指導要領(平成21年3月告示)、旧指導要領(平成11年3月告示)、旧々指導要領(平成元年3月告示)について、東京書籍の生物の教科書の遺伝子やGMに関

する指導内容の比較を行った。また参考として、現指導要領と旧指導要領については、入手できた数研出版の資料集についてもその内容を整理した。

## I-i-2. 研究結果

### (1)年代別の違いについて

GMに関する指導内容について、年代別の比較を行った。理系で生物選択者が履修する教科書の比較で、平成元年3月に公示された旧々指導要領の生物Ⅱでは、24項目であったGMに関する指導内容が、平成11年3月公示の旧指導要領の教科書では63項目、平成21年3月公示の現指導要領では61項目と、ほぼ2.5倍に増加している。項目ごとにみると、遺伝子発現の仕組み、GMに関する記載事項が、最も増えている。遺伝子、DNAに関する基礎的知識、DNA複製の仕組み等、基本的な内容についてはあまり変わっていない。

なお、GMに関する指導内容の項目自体は平成11年3月公示の旧指導要領の教科書が最も多くなっているが、うち9項目はバイオテクノロジーの科学技術倫理に関する問題であるため、技術的内容では最新の教科書が最も充実している。(表1、表2)

技術自体の是非を問うような、科学技術倫理に関する内容については、旧指導要領の教科書だけに記載があり、現指導要領では削除されている。現指導要領での教科書は、科学的事実のみの記載となっている点の特徴である。

### (2)履修状況の違いについて

文系、理系等の科目選択や受験科目の選択によって、高校での生物の履修状況は異なる。受験科目の選択によっては、高校でまったく生物の授業を受けずに卒業することが可能となっている(表3)。2002年度の大阪市立大学の入学者1417名を対象とした調査<sup>1</sup>では、特に理系の専門科目としての生物の履修率は20%余りで、地学よりは高いが、化学や物理より低くなっている。

また、現指導要領で比較すると、もっとも初歩的な教科書となっている新編生物基礎で19項目、理系の生物選択者が使用するもっとも詳しい教科書で61項目と、3倍以上の違いがある。(表2)

### I-i-3. 考察

平成元年以降の20年間余りで、高校の生物の授業で教えられるGM技術に関する内容は、大きく増加している。特に、旧指導要領で授業を受けた平成27年時点で20~28歳と、29歳以上の世代では、大きくその内容が異なっておりGMのメカニズムを理解するために必要な基礎的知識に差があると考えられる。(表4)

必須の理科の授業で教えられている生物では、遺伝子やGM技術に関する内容は含まれないため、遺伝子に関する授業をまったく受けずに高校を卒業することも可能である。

また、近年、大学受験において生物系の学部(医学部など)を受験する場合でも、受験科目として生物が必須でないケースは増えてきている。一般に、理系の進路を志望する学生の科目選択においては、化学と物理を選択する方が進路選択の幅が広がる

<sup>1</sup> 大久保敦(2010)「高校大学7年間を通した科目履修実態調査(自然科学系科目・社会科学

系科目)、『大学教育』第7巻第2号, pp.45-48, 大阪市立大学

ため、明確に進路が定まっていない高校生の時点では、選択が広がる化学と物理を選択し、結果的に生物系の学部に進学して、大学で改めて生物学を勉強するケースも多いことが分かった。

## ii.年代やライフステージの変化による GM への需要の影響

### I-ii-1.研究方法

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：2017年2月
- 有効回答数：523人
- 回収率：48.8%
- 方法：Web アンケート
- 調査項目：
  - 結婚の有無・同居家族の有無
  - 幼少期・現在の食生活、理想とする食生活（自炊・惣菜購入・外食等の行動別にその頻度や重視する点等を把握）
  - ライフステージの変化に伴う食の安全に関する意識変化
  - 食品のラベル表示に関する知識（遺伝子組換え不分別等）
  - GM 食品（作物）の受容性
  - GM 食品の購買判断 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。

### I-ii-2. 研究結果

#### (1) GM 食品への抵抗感及び購入意向

食品の安全性に関心があると75.5%が回答しており、食品の安全性に不安を感じる

と67.1%が回答した（図2）。

GM 食品への抵抗感については、53.9%があると回答した（図3）。GM 食品の購入意向については、6割前後が購入したくないと回答しており、特に遺伝子組換えサケは68.1%と他の品目と比べて高い値であった（図4）。

#### (2) 食生活における GM への意識

平日の夕食で遺伝子組換えか否かを気にするかという設問に対して、自炊の場合は45.1%が気にすると回答した。農薬が少ないか、食品添加物を含まないかを気にするのは、それぞれ54.3%、53.7%であり、これと比較すると若干低い割合となった（図5）。

一方、外食の場合においても、42.9%が遺伝子組換えか否かを気にすると回答しており、必ずしも食品表示がされていないにも関わらず、自炊の場合と同等の割合で関心が示された。食材の産地を気にする割合は45.2%であり、これと近い値であった（図6）。

#### (3) ライフステージの変化と食の安全性への関心

ライフステージの変化に伴い、食の安全性への関心がどのように変容してきたかという設問では、結婚前後及び妊娠・授乳前後で変化が大きかった。食の安全性を気にするという回答は、結婚前後で23.0%増加しており、妊娠・授乳前後で20.7%増加していた（図7）。

また、食の安全性を気にかけるきっかけについて、食品に関する事件の発生を挙げたのは75.2%であり、もっとも高かった。子どもの誕生を挙げたのが67.8%、結婚を挙げたのが44.7%であった（図8）。

#### (4) 食品のラベル表示に関する知識等

食品を購入する際にラベル表示を確認するかという設問に対して、55.1%が確認すると回答した（図 9）。豆腐・ポテトチップスのラベルのイメージ画像を提示し、重視する項目を3つ聞いたところ、それぞれ3割程度が遺伝子組換えか否かを選択した（図 10、図 11）。

また、「遺伝子組換え不分別」の意味を知っていると回答したのは11.9%に留まった（図 12）。意味を知っていると回答した層では、不分別と表示された食品に遺伝子組換えの原材料が含まれる割合について、「10%以上 30%未満」という回答が17.7%でもっとも多かった（図 13）。一方、意味を知らないと回答した層では、遺伝子組換えの原材料が含まれる割合について、「5%未満」という回答が11.7%でもっとも多かった。

#### (5) 過去からの消費者意識の変化の比較

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、2017年の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月より減少傾向にある（図 14）。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年より減少傾向にある（図 15）。さらに、2008年1月に発生した中国産冷凍ギョウザ食中毒事件の報道後、中国産の食品を買い控えたかという設問について、「現在も買い控えている」という回答も減少傾向にある（図 16）。

なお、2017年の本調査では、平日の夕

食に自炊の準備をする場合に気にする点を聞いた。2007年調査においても、食品表示で確認する項目を聞いた。両者で設問の形式は異なるため、単純に比較はできないが、回答の分布について確認した。

価格や産地は、両年ともに消費者に重視されている項目であった（図 17、図 18）。2007年に遺伝子組換えの食品表示を確認すると回答したのは65.6%であり、2017年の本調査で自炊の準備をする際に遺伝子組換えか否か気にすると回答したのは45.1%であった。また、食品添加物の方が遺伝子組換えよりも、2007年には確認される食品表示であり、本調査でも気にする割合は高かった。

#### I-ii-3. 考察

食品の安全性に関心がある層、食品の安全性に不安を感じる層はともに7割程度であった。GM食品への抵抗感は5割程度であり、2016年調査と同程度であった。

GM食品への抵抗感は農薬や食品添加物と比べると低い値であったが、平日の夕食において、遺伝子組換えか否かを気にすると4割以上が回答した。外食の場合に遺伝子組換えの食材か否かを確認することは困難であるが、気にすることについては自炊の場合と外食の場合でほとんど差はなかった。食生活の形態に関わらず、遺伝子組換えについて一定の関心が持たれていることが明らかとなった。

また、食の安全性を気にかけるきっかけについては、食品に関する事件の発生が主な理由に挙げられたが、結婚や妊娠・授乳等、ライフステージの変化についても、関心が変容する重要な契機と考えられた。

そして、食品のラベル表示については、5割以上が購入の際に確認しており、遺伝子組換えか否かの表示にも約3割が関心を

示した。一方で、遺伝子組換え不分別の意味を知っていると回答したのは、1割程度に留まった。意味を知らない層では、意味を知っている層と比べて、不分別の場合に遺伝子組換えの原材料が含まれる割合をより低く回答する傾向にあった。一方で、全体では、遺伝子組換えの原材料が含まれている割合について、分からないと回答したのが52.8%であることから、一般消費者は正確な知識をもって、遺伝子組換えに関する食品表示を確認できているわけではないと考えられる。

さらに、過去からの消費者意識の変化については、2008年3月以降、食品の安全性への関心・不安ともに減少傾向にあった。2008年1月に発生した中国産冷凍ギョウザ食中毒事件の報道から時間が経過するにつれて、買い控えも減少していることが明らかとなった。食品を購入する際に確認する項目では、2007・2016年ともに、遺伝子組換えよりも食品添加物の方が少し重視される傾向にあった。

## II. 新たな説明ロジックおよび説明ツールの開発

遺伝やバイオテクノロジーに関するリテラシーに、その基礎的な知識の有無が影響を与えると考えられる。現在の高校生物の教科書では、GM技術に関してかなり高度な内容が含まれており、高校レベルの生物の知識があれば、GM技術の基礎的な理解ができると考えられる。

一方で、non-GM食品とGM食品の安全性の差については、これはDNAの構造に加え、例えば、消化吸収メカニズムなど、複数の知識も結び付けないと、判断できない事項である。

以上を踏まえ、GMに関する説明ロジッ

クおよび説明ツールの素案を作成、検討した。また、本研究では、この説明ツールの検証のためのアンケート調査を行った。

### i. 説明資料の作成

#### II-i-1 研究方法

##### (1) 説明資料の作成

近年、新しい植物育種技術（New Plant Breeding Technologies, NBT）の普及が急速に進んでいる。一方で、NBTについては消費者に十分な説明はなされておらず、従来の遺伝子組換え技術であるGM技術とNBTとの違いが消費者に理解されているとは言い難い。

このまま消費者に対して十分な説明がなされないまま技術が普及すると、製品化・商業化の段階でGM食品と同じような強い抵抗にあい、実用化の阻害となる恐れがある。

平成26年度の研究において、NBT及びセルフクロニング、ナチュラルオカレンスに関する消費者コミュニケーションを推進するためのツールとして、文章だけの説明文を作成していたが、文章のみでは分かりにくいとの意見を受け、イラストを試作した。

試作版のイラストについては、研究班メンバーや厚生労働省によるレビューを実施し、複数回の修正を行った。

イラストの修正履歴については、表5を参照されたい。

また、平成27年度、新たにGM食品の消化メカニズムに関するイラストを交えた説明ツールを、一般消費者に分かりやすく作成した。消化メカニズムを踏まえ、組み換えられた遺伝子が体内に残存しないことを説明することとした。

#### II-i-2. 研究結果

## (1) 説明資料の作成とその変遷

当初作成した資料に対するレビューを受けて、複数回の改定を重ねて説明資料を作成した。

修正の例として、当初は柑橘類を例として説明資料を作成していたが、「食べ物を事例にするのはやめた方がいい」との指摘を受けて、バラの例に変更をした（図 19）。その後、「ナチュラルオカレンス、セルフクローニングは微生物以外を想定しづらいため、花で説明資料を作成するとミスリーディングを招く可能性がある」との指摘を受け、微生物の例に変更している（図 20）。また、「エラー」「傷つける」等のネガティブな表現は使わない方がよいなどとの指摘を受け、表現の修正を行った（図 21）。

GM や NBT に関する説明資料としては、図 22～図 34 を参照されたい。

また、アンケートに使用する図として、GM 食品の消化メカニズムについて、次のとおり絵と文章に基づく説明資料を作成した。（図 35）

### II - i - 3. 考察

過去の研究において、文章とイラストの説明の組み合わせで、理解度がどう変わるかについての調査を実施した結果で、下記が明らかになっている。

- ・「文章のみ」を最初に見せて、次に「文章＋イラスト」を見せると「理解できる」総数が増す。
- ・「文章のみ」を最初に見せて、次に「文章＋イラスト」を見せると「分かる」または「よく分かる」人は、「理解できる」数が増す。
- ・「文章のみ」を最初に見せて「少し分かる」人は、次に「文章とイラスト」

を見せると「理解できる」数が減少する。

- ・最初から「文章とイラスト」を見せると、「理解できる」総数が別々に見せたより減少する。
- ・最初から「文章とイラスト」を見せると、「理解できる」と「少し理解できる」数が別々に見せたより減少する。

以上より、科学的な情報を含むリスクコミュニケーションでは、情報量が増えすぎると逆に分かりにくくなり、また、文章のみで理解したつもりになっていた内容が、イラストでより正確に伝わった結果、分からなくなることもあると考えられる。イラストがあると情報はより伝わりやすくなることは間違いないが、正確な情報が伝わることと理解が深まることとはイコールではないと考えられた。

また、科学的な正確性を期すことにより、ナチュラルオカレンスとセルフクローニングの題材をバラから微生物に変更した結果、消費者にとっては普段なじみがないものが題材となり、親しみやすさが低減しているのではないかと推測される。

### ii. アンケート調査

#### II - ii - 1 研究方法

一般消費者に対する 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とおりである。

- 調査実施日：2016年3～4月
- 有効回答数：1,273人
- 回収率：79.9%
- 方法：Web アンケート
- 調査項目：
  - 履修した学習指導要領の区分
  - 生物の学習状況

- 学習内容の理解（覚えているか）【テスト形式】
- GM 食品の安全性の理解（リテラシーがあるか）
- GM 食品の情報源信頼性
- GM 食品（作物）の受容性/GM 食品の利益・リスク認識に対する態度・判断
- GM 食品の購買判断 等

なお、サンプルの構成は、学習指導要領が現指導要領以前に3世代にわたって改定されていることから、対象者を旧々々・旧々・旧課程学習者に分け、各課程で履修状況（生物Ⅱ相当を学習、生物Ⅰ相当を学習、生物を学習していない）、年齢

（旧々々課程では40歳と45歳、旧々課程では30歳と35歳、旧課程では20・21歳<sup>2</sup>と25歳）性別で均等割り付けした。各課程で400サンプルを目標に回収した結果、計1273サンプルの有効回答を得た。

## II - ii - 2. 研究結果

### (1) 食品を購入する際に重視する項目（図 36）

食品を購入する際、GMでないかを重視している人は、全体で52.1%である。新鮮かどうかを重視する人が最も多く

（86.5%）、ついで味の良さ（86.1%）、価格の安さ（83.3%）である。

GMで無いかどうか（52.1%）は、農薬が少ないか（54.0%）と食品添加物が含まれていないか（51.6%）の間に位置している。

<sup>2</sup> 若年層はアンケートモニターの登録数が少ないため、十分な有効回答を得るために、旧

### (2) GM 食品への抵抗感（図 37、図 38）

高校生物の履修状況別では、生物Ⅱ・生物（発展的内容）学習者であっても、50%以上が、遺伝子組換え作物・食品を国内で生産することや、遺伝子組換え食品そのものに対して抵抗感を持っている。

履修課程ごとの分析では、年齢が上になる履修過程が古い人ほど遺伝子組換えに対する抵抗感が高く、旧々々課程（40代）で60%以上が遺伝子組換えに対する抵抗感を持っているのに対し、旧課程（20代）では40%余りとどまる。

履修内容の難易度よりも、履修課程（世代）によって、抵抗感に差が出る結果となった。

### (3) GM 食品の摂食意向（図 39、図 40、図 41）

摂食意向では、GM野菜、肉、魚での差はほとんど見られなかった。

高校生物の履修状況別では、ほとんど差は見られなかったが、生物Ⅱ・生物（発展的内容）学習者と生物を選択していない人で摂食意向が高めの結果であった。

履修課程別では、年齢が上になる履修状況が古い人ほど「食べない」「どちらかといえば食べない」と回答した人が多く、旧々々課程（40代）で70%以上が「食べない」「どちらかといえば食べない」と回答しているのに対し、旧課程（20代）では50%から60%の間にとどまる。

### (4) 遺伝子組換え・消化に関する知識（図 42、図 43、図 44）

DNAが4種類の塩基から構成されることについて、全体の正答率は51.8%であつ

課程の一番若い層のみ20歳と21歳を対象とした。

た。

タンパク質が消化酵素によりアミノ酸に分解されることについて、全体の正答率は56.6%であった。

遺伝子組換え食品が体内でどのように消化吸収されるかについては、全体の正答率は41.7%で、不正解者は、組換えられたDNAは、そのまま吸収されると認識している人が多かった。

履修内容の難易度が高い程、正答率も高い傾向があるが、GM食品への抵抗感や摂食意向には履修課程の違いによる傾向はあまり見られなかった。

### II - ii - 3. 考察

食品を購入する際に重視する事項として、GMかどうかは最も重視される事項ではないが、農薬や食品添加物といった、一般的にリスクとして認識されている内容と同程度にリスクと認識されている。価格や、新鮮さ、味等の品質情報と比較すると重視されていないが、品質が同程度の食品と比較した際に、できれば避けたいリスクとして認知されている可能性が高い。

また、履修別の傾向については、履修難易度（生物に対するリテラシー）でGMメカニズムの理解には多少の差があるが、GM食品への抵抗感について差はあまり見られず、課程別（年代）での差が大きかった。

単に年齢による影響のほか、年齢特有のライフイベント（結婚、出産、育児等）の影響等、年齢によるGMに対する受容性の差の要因が存在する可能性がある。

## 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)

過年度の研究で、欧米の食品安全行政におけるリスクコミュニケーションについて、EU、米国連邦政府での実施体制や計画、リスクコミュニケーションに関する新たな展開に関する調査を行った。その中で、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あった。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、2015年11月19日にはFDA（米国食品医薬品局）によって食品利用が承認されたと発表された。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、本研究では、米国におけるGMサーモンの食品利用の承認に係る動向やその反響について、レビューを行った。

また、EUをはじめとする各国の情報について、各種会議や文献での情報収集を行った。

### i .GMサーモンに関する米国・カナダの動向

#### III - i - 1. 研究方法

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。

#### III - i - 2. 研究結果

##### (1)平成27年度の動き

FDAは、2015年11月19日に発表したWebサイトの「Consumer Health

Information<sup>3</sup>」の記事の中で、AquaBounty 社による GM サーモンが連邦食品・医薬品・化粧品法 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) によって定められた安全性と有効性の基準を満たしていることを認め、食品として利用することを承認すると発表した。安全性については、GM 技術を用いることによって病気にならないサーモンの影響の側面と、GM サーモンの食用としての側面を確認した上で、成長速度が通常のサーモンに比べて速いという効果についても認めた。また、企業が養殖を実施する施設はパナマとカナダの二つの陸上施設に限られ、淡水の水槽の複層構造は、魚が自然に放たれる可能性が低く、その管理・監視状態は適切であり、環境に重大な影響を与えることはないという判断がされた。米国では、GM 食品に対して、特に GM である旨を表示することは法律では定められていないが、多くの消費者はその情報に関心があり、食品販売側もその区別をつけたいと考えているのではないかと FDA は認識している。そこで FDA は食品販売事業者向けに、GM サーモンを用いた食品に対して、自発的なラベリングに関する手引の草案を同記事内で発表している。

その後、2016年1月29日のFDAの報道「Import Alert 99-40<sup>4</sup>」によるとオムニバス法 (2016 Omnibus Appropriations Act) に基づいた GM サーモンの輸入警告

が発表された。報道では Omnibus Funding の会計年度が終わる 2016年9月30日までの間、GM サーモンを用いた食品のラベリングに関する手引が完成するまでは GM サーモンの輸入を差し止めるという内容が発表された。

2015年11月19日のAquaBounty社のWebサイトの記事「FDA Approves AquAdvantage® Salmon<sup>5</sup>」でも、FDAが自社のGMサーモンの生産、販売、消費を承認したことを発表している。AquaBounty社は、新鮮で安全で、トレーサビリティとサステナビリティを担保した食品の提供が、より温暖化への影響を低減した低炭素な方法で可能になることや、海洋資源を保全する方法としての水産養殖に対する新たなアプローチとなるという利点を主張している。

また、2016年1月29日のFDAによる輸入警告については、同日の記事「FDA's Import Alert for AquAdvantage® Salmon<sup>6</sup>」において、FDAはGMサーモンを用いた食品に対するラベリングに関する手引の完成に向けて取り組んでおり、現在AquaBounty社は米国へのGMサーモンの輸出をしていないため、経営に影響はないと述べている。

2015年11月19日のCNNの記事「Genetically engineered 'Frankenfish' salmon wins FDA approval<sup>7</sup>」では一部では「フランケンフィッシュ」とも呼ばれる

<sup>3</sup> Consumer Updates-FDA Has Determined That the AquAdvantage Salmon is as Safe to Eat as Non-GE Salmon  
<http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm472487.htm>

<sup>4</sup> Import Alert 99-40  
[http://www.accessdata.fda.gov/cms\\_ia/importalert\\_1152.html](http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_1152.html)

<sup>5</sup> FDA Approves AquAdvantage® Salmon

<https://aquabounty.com/media/press-releases/> (2018年3月29日現在では削除)

<sup>6</sup> FDA's Import Alert for AquAdvantage® Salmon  
<https://aquabounty.com/media/press-releases/> (2018年3月29日現在では削除)

<sup>7</sup> Genetically engineered 'Frankenfish' salmon wins FDA approval

GM サーモンが FDA の承認を得たと報道しており、それに対する社会の反響について紹介している。記事では Institute of Marine and Environmental Technology の Yonathan Zohar の見解として、2010 年に魚の供給よりも需要が上回っていることから、新しく導入される GM サーモンを避ける理由はないことを指摘している。

一方で、消費者擁護団体 Food and Water Watch の見解として、FDA の決定を残念としており、表記の自由については「消費者の知る権利を無視するもの」であるという評価を紹介している。

2015 年 11 月 19 日の New York Times の記事「Genetically Engineered Salmon Approved for Consumption<sup>8</sup>」によると、Aquabounty 社の GM サーモンの承認申請は 1990 年代から始まっており、環境及び食用として安全だという判断も 5 年以上前から下されていた。しかし、GM 動物の食用利用の承認は初めての事例であったため、時間を要したとされている。GM サーモンが市場に出せる程の大きさに成長するには今から 2 年程度かかり、また現在の生産量は年間 100 トンと、米国の総輸入量である 200,000 トンと比べて極めて少ないため、今後の商業化までにはまだ時間がかかるものと考えられている。売れ行きについても大手販売企業が販売の意向を示さないなど、不確かな要素が大きい。一方で、Aquabounty 社は、生産地をカナダと

パナマだけでなく、いずれは米国本土での生産を考えており、その米国産 GM サーモンを中国、アルゼンチン、カナダ、ブラジルへの輸出も考えていると述べている。また、これまでバイオテクノロジー分野の障害になっていた GM サーモンの承認の延期が解消されたことで、今後の GM 動物の開発がより一層進むことも考えられるとしている。

同じく 2015 年 11 月 19 日付の New York Times の記事である

「Genetically Engineered Salmon Will Not Be Labeled<sup>9</sup>」では、FDA が遺伝子組み換えを食品の栄養成分、味、色等の材料的な違い (Material difference) とは認めず、食品表示の義務がないとしたとされている。多くの企業は義務的な食品表示には反対しているが、その一方で消費者側の食品表示の透明性を求める声が大きくなっていくことから、non-GM 食品に表示をする企業は増えており、さらにバーモント州では GM 食品の表示義務付けに関する法案を 7 月までに発効する見通しもある。

2015 年 11 月 20 日の New York Times の記事「F.D.A. Takes Issue With the Term 'NonG.M.O.'<sup>10</sup>」ではさらに遺伝子組換え食品の表示に焦点を当て、消費者の要望に応じて 'non-GMO' (genetically modified organisms) という表記をする企業が増えてきたことや、遺伝子組換え食品の食品表示義務の法案を通そうと考えてい

---

<http://edition.cnn.com/2015/11/19/health/genetically-engineered-salmon/index.html>

<sup>8</sup> Genetically Engineered Salmon Approved for Consumption

<http://www.nytimes.com/2015/11/20/business/genetically-engineered-salmon-approved-for-consumption.html>

<sup>9</sup> Genetically Engineered Salmon Will Not Be Labeled

<http://www.nytimes.com/2015/11/20/business/genetically-engineered-salmon-will-not-be-labeled.html>

<sup>10</sup> F.D.A. Takes Issue With the Term 'NonG.M.O.'

<http://www.nytimes.com/2015/11/21/business/fda-takes-issue-with-the-term-non-gmo.html>

る州が多いことを指摘している。また、食品コンサルティング企業の Hartman Group の最高経営責任者の Laurie Demeritt は遺伝子組換えを気にする消費者の動向を「製品が製造される過程を、実験室で試験管や注射器を用いて食品加工をするイメージを持っている」と分析し、さらに「遺伝子組換えに関心があるからといって必ずしも遺伝子操作についての理解があるわけではない」とも述べている。

また、この事態をさらに複雑にしているのは FDA の言葉の定義の見解である。FDA は一般的に食品表示に使われる 'non-GMO' という言葉を推奨していない。というのも、FDA の見解では Genetical modification という言葉は品種改良等も含めたより広義なゲノムの変化のことを指し、バイオテクノロジーによる Genetical engineering (遺伝子操作) と区別すべきだという考えを公表している。そのため、FDA は 'Free of ingredients derived through the use of biotechnology' 「バイオテクノロジー由来の材料を用いていない」といった表現を推奨し、食品表示の仕方について警鐘を鳴らしている。

これらのような報道内容に対して、消費者団体の一つである Center for Food Safety の 2015 年 11 月 19 日の発表記事である「FDA Approves First Genetically Engineered Animal for Human Consumption Over the Objections of Millions<sup>11</sup>」では、FDA の GM サーモンの承認決定に対して複数の団体が裁判を起こすことを発表しており、GM サーモンの

安全性が担保されていないこと、カナダの施設周辺に生息するブラウントラウト (ニジマスの仲間) の異種交配の危険性や、AquaBounty 社のパナマにおける環境規定の不履行等を批判している。また、消費者の知る権利が奪われることも論点として挙げている。

以上、海外報道について、掲載日時、記事 (見出し)、単語数を整理した結果を表 6 に示す。

国内では日経新聞、産経新聞、読売新聞等が、合計 18 件の報道を 2015 年 11 月 20 日から 11 月 24 日にかけて掲載している。FDA の発表内容に加え、AquaBounty 社のコメントや消費者団体・環境保護団体の批判についてまとめているが、あまり大きな反響は起きていない。国内の報道について、掲載日時、記事 (見出し)、単語数を整理した結果を表 7 に示す。

## (2) 平成 28 年度の動き

### ① 米国

2015 年 11 月 19 日に、FDA が GM サーモンの生産・販売を承認し、米国メディアでも大きく報道された。GM サーモンについて、FDA は栄養価が通常のサーモンと等しい等の理由から、遺伝子組換えの表示を義務付けていない。しかし、2016 年 3 月末～4 月に、表示を義務付ける法案がマサチューセッツ州の議会等を通じた<sup>12</sup>。このように、GM 表示を巡る各州の動きが活発化したことを背景に、州毎に表示が異なることへの対応が必要となった。こ

<sup>11</sup> FDA Approves First Genetically Engineered Animal for Human Consumption Over the Objections of Millions  
<http://www.centerforfoodsafety.org/press-releases/4131/fda-approves-first->

genetically-engineered-animal-for-human-consumption-over-the-objections-of-millions#

<sup>12</sup> An Act establishing the genetic engineering transparency food labeling act

のことから、2016年7月29日に、遺伝子組換え食品表示義務化法案（通称「GMO表示義務法（S. 764）」）にオバマ大統領が署名したことを Boston Globe、NY Times、Washington Post 等各新聞社が報道している<sup>13</sup>。この法案により、米国全土で販売される食品に GM 表示が義務化され、メーカーは遺伝子組換え食品のパッケージに①「遺伝子組換え原料を含む」ことの表示、②遺伝子組換え作物が含まれていることが理解できるようなシンボルマークの表示、③スマートフォンで読み込める QR コードによるインターネット上での詳細の明記、のいずれかの義務を負うことになった。

食品関連企業の動向としては、FDA による GM サーモンの承認後、2社（Costco 及び Safeway）で自社ホームページ等において、GM サーモンを取り扱わない旨の表明がされている。具体的な表明内容については、以下の通りである。

- Costco<sup>14</sup>

- ‘Although the FDA has approved the sale of GM salmon, Costco has not sold and does not intend to sell GM salmon at this time.’

<sup>13</sup> People want GMO food labeled — which is pretty much all they know about GMOs [https://www.washingtonpost.com/news/energy-environment/wp/2016/07/21/people-want-gmo-food-labeled-which-is-pretty-much-all-they-know-about-gmos/?utm\\_term=.8e4e7f84a912](https://www.washingtonpost.com/news/energy-environment/wp/2016/07/21/people-want-gmo-food-labeled-which-is-pretty-much-all-they-know-about-gmos/?utm_term=.8e4e7f84a912)  
Congress OKs bill requiring labels for genetically modified foods <https://www.bostonglobe.com/business/2016/07/14/congress-oks-bill-requiring-first-gmo-food-labels/qOglugWMxGwTaluSuo6gDL/story>

- 「FDA が GM サーモンの販売を承認したが、Costco は GM サーモンを販売したことはなく、現時点では販売するつもりはない」

- Safeway<sup>15</sup>

- ‘While the FDA approved GE salmon for human consumption in November of 2015, we are not considering nor do we have any plans to carry GE salmon.’
- 「2015年11月にFDAがGMサーモンの消費を承認したが、我々はGMサーモンを提供するつもりはなく、その予定もない」

また、国際環境 NGO 「Friends of the Earth (FoE)」は、食料品店・海産物取引企業・レストランに対して、遺伝子組換え海産物を取り扱うか否か調査をしており、取り扱わない旨表明している企業のリストを公表している（図 45）。本リストには、Costco 及び Safeway の 2 社も記載されている。

そして、PRNewswire は、GM サーモンの開発を行った AquaBounty 社が 2017 年 1 月 19 日に NASDAQ に上場したことを報道している<sup>16</sup>。アメリカ市場への株式

[html](#)  
G.M.O. Labeling Bill Gains House Approval [https://www.nytimes.com/2016/07/15/business/gmo-labeling-bill-gains-house-approval.html?\\_r=0](https://www.nytimes.com/2016/07/15/business/gmo-labeling-bill-gains-house-approval.html?_r=0)

<sup>14</sup> [http://webiva-downton.s3.amazonaws.com/877/4d/7/6857/Costco\\_GMO\\_salmon\\_statement.pdf](http://webiva-downton.s3.amazonaws.com/877/4d/7/6857/Costco_GMO_salmon_statement.pdf)

<sup>15</sup> <http://csr.site.safeway.com/home/report-overview/position-statements/>

<sup>16</sup> AquaBounty Announces Completion of NASDAQ Listing and Equity Subscription

公開によって、さらに食料生産の戦略が広がるとしている。NASDAQ 上場の背景には 2016 年 11 月の親会社の Intrexon との会社分割の決定があり、AquaBounty 社の株の販売によって 2,500 万ドルの資金調達が行われ、条件として NASDAQ 上場の書類手続きが行われた。この資金調達によって、少なくとも 2 年間は GM サーモン展開戦略を進めるための資金が賄われ、北米での新しい生産施設の建設等が検討されている。

## ②カナダの動向調査

Canadian Broadcast Corporation (カナダ放送協会) の報道によれば、AquaBounty 社はサーモンの卵の輸出期限に間に合うように、同社からカナダ食品検査庁に安全評価試験を急がし、実施させた可能性があることが、政府の書類から明らかになったとされた (報道日: 2017 年 1 月 11 日)<sup>17</sup>。カナダ食品検査庁はサーモンの卵に対して輸出前に 4 つの疾病の検査を実施したが、2016 年 3 月の輸出期限が迫る中で AquaBounty 社の問い合わせに急かされ、試験の早急対応を迫られたことは事実のようである。AquaBounty 社のコメントとしては、不当に圧力をかけたことは否定しており、卵の貯蔵寿命に応じてカナダ食品検査庁に適切な時期に仕事を完了してもらえよう要請しただけだと述べている。これに対し、カナダの GM 反対運動団体「Canadian Biotechnology Action

Network」は政府の仕事は AquaBounty 社の商品が流通できるようにすることではなく、食品の安全な提供を保証することだと見解を述べている。

また、AquaBounty 社への販売認可に対して消費者保護団体の「Ecojustice」、「Living Oceans Society」、「Ecology Action Centre」がカナダ政府に対して提訴をしていたが、2016 年 10 月 21 日にカナダの連邦裁判所で消費者保護団体側の訴えが棄却されたと Radio Canada International (RCI) によって報道されている (報道日: 2016 年 11 月 8 日)<sup>18</sup>。消費者保護団体側の主張としては、政府の認可方法がカナダの環境規則 (Canadian Environmental Protection Act) に則っていなかった点や、他種の動物に GM の可能性を広げる懸念を挙げていた。訴えが棄却されたため、今後の消費者保護団体の動きとして、さらなる裁判所への提訴が可能かどうか注視され、もし不可能であれば一般家庭への GM 食品の周知方法や、ラベル表示の必要性について言及するだろうとの考えを述べている。

## (3)平成 29 年度の動き

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<sup>19</sup>。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、

---

from Intrexon  
<http://money.cnn.com/news/newsfeeds/articles/prnewswire/NE91744.htm>  
<sup>17</sup> CFIA fast-tracked tests on genetically modified salmon eggs for exports, documents suggest  
<http://www.cbc.ca/news/politics/genetically-modified-salmon-cfia-aquabounty->

1.3929571  
<sup>18</sup> Radio Canada International  
<http://www.rcinet.ca/en/2016/11/08/another-setback-for-groups-opposed-to-gm-salmon/>  
<sup>19</sup> AquaBounty 社プレスリリース (2017 年 8 月 4 日閲覧)  
(<http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=197553&p=irol->

ネイチャー誌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<sup>20</sup>。ほか、AFP 通信<sup>21</sup>、ワシントンポスト<sup>22</sup>、トロント・サン<sup>23</sup>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 の反対多数で否決されている<sup>24</sup>。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<sup>25</sup>、また、市民団体が署名運動を呼びかける<sup>26</sup>などの動きが見られる。

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の安全性・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<sup>27</sup>。

商業化においては、2018 年 1 月に GM

---

[newsArticle&ID=2292046](#))

<sup>20</sup> 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>)

<sup>21</sup> AFP 通信ウェブサイト (2018 年 3 月 6 日閲覧) <http://www.afpbb.com/articles/-/3138468>

<sup>22</sup>The 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](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)

<sup>23</sup> 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](#))

<sup>24</sup> PARLIAMENT OF CANADA (2018 年 3 月 6 日閲覧)

(<http://www.ourcommons.ca/Parliamentarians/en/votes/42/1/283>)

<sup>25</sup> 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>)

<sup>26</sup> CANADIAN BIOTECHNOLOGY ACTION NETWORK (2018 年 3 月 6 日閲覧) (<https://cban.ca/take-action/ge-fish/>)

<sup>27</sup> 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->

リンゴが試験販売されることがニュースになるなど<sup>28</sup>、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、チコリー、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 8)

### III-i-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規制となって未販売となっている。しかし、カナダにおいて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、消費者の抵抗感強いが法規制が追いついていない状況である。GMを忌避したい消費者のために、選択するための情報の提供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为了避免す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。

### ii.EUをはじめとした各国の動向

#### III-ii-1. 研究方法

EUをはじめとしたGMやNBTに関する各国の動向について、各種会議への参加や文献での情報収集を行った。

#### III-ii-2. 研究結果

[provision](#))

<sup>28</sup> CBC (2018年3月6日閲覧)

### (1)平成27年度の動き

2015年2月6日に農林水産省の研究班が開催した「新しい植物育種技術(New Plant Breeding Technologies)をめぐる欧州の最新動向に関するセミナー」に参加し、NBTに関する欧州の最新動向について情報収集を実施した。

セミナーの開催概要は下記の通りである。

●開催日時：平成27年2月6日

(金) 14:00~16:00

●開催場所：農林水産省三番町共用会議室

●講師：ヨアヒム・シーマン博士

(欧州委員会 GMO Risk Assessment and Communication of Evidens プロジェクトリーダー)

EUでのNBTの安全性評価について、“EFSA-Opinions (2012) on safety assessment of Cisgenesis and ZFN-3”や、“Report of the European Academies Science Advisory Council (2013)”、“EPSO Statement on Crop Genetic Improvement Technologies (2015)”等、科学者の見解についてはいくつか結果が公開されており、その概要は、技術の種類で規制をすべきではなく、プロダクトベースで規制を検討すべきというものである。一方で、規制側の立場である欧州委員会の結論は出ていない。

米国では技術に対する規制はなく、開発者からの申請に応じて審査を行っている。EU加盟国でも国によってスタンスは異なり、例えば育種が盛んなオランダでは

(<http://www.cbc.ca/news/technology/gmo-apple-canada-1.3943058>)

NBT に対してポジティブにとらえている。

## (2)平成 28 年度の動き

平成 29 年 2 月 2 日に農林水産省の研究室が開催した「ゲノム編集に関する米欧の現状に関する意見交換会」に参加し、NBT に関する欧州の最新動向について情報収集を実施した。

セミナーの開催概要は下記の通りである。

- 開催日時：平成 29 年 2 月 2 日（木）13:30～15:30
- 開催場所：農林水産省農林水産技術会議委員室
- 講師：
  - Jean-Christophe Pages 氏、フランスバイオテクノロジー高等審議会科学委員会委員長
  - Jennifer Kuzma 氏、ノースカロライナ大学教授、Genetic Engineering and Society Center 共同代表（体調不良のため欠席。コーディネーターより発表予定内容の概要が紹介された）

EU の New Technology Working Group (NTWG) によるレポートでは、科学的には European Commission (EC) 指令 (2001/18/EC) において判断するのが適切との評価結果を提出している。その後、政治的な結論はまだ出ていない。

EU の大多数の専門家の意見は、Zinc Finger Nucleases (ZFN) の ZFN-1 と ZFN-2 により作出された生物は GMO であるが、規制対象からは除外されるべきであるというものである。ZFN-1 と ZFN-2

による結果は、従来育種で発生する突然変異と区別できないためである。

NTWG によれば、以下は GMO として規制すべきでないとしている。

- オリゴヌクレオチドによる突然変異
- ZFN-1、ZFN-2（組換え遺伝子を含むものを除く）
- GM の台木に接木して non-GM の部分に生じた果実等
- アグロインフィルトレーション
- メチル化によるもので DNA に次世代に遺伝する変異が起きていないもの
- リバースブリーディング

フランスでは Haut Conseil des Biotechnologies (HCB バイオテクノロジーのための高等委員会) で検討を行った。政府から HCB に以下の点が質問された。

- ゲノム編集による産物の検査ができるのか
- 使用された技術が特定できるのか
- 産物を区別するための特定方法
- ゲノム編集されていない作物との共存
- 技術のリスク
- 緩和策、改善策
- 商業化される前に可能な特定方法

また、以下のリスクについて議論した結果、実際に作出された植物の特徴でケースごとに判断すべきと考えている。

- オフターゲット操作について（頻繁に起こる可能性がある点、局所化する可能性がある点）
- ベクターの使用について（痕跡が残るか、影響があるか）
- Site Directed Nucleases (SDN) の容易性について（変異の加速化、予

期せぬ新たな特質、新種の創出、新たな機能を多発的にもたらす)

ースのアプローチが求められる

### (3) 平成 29 年度の動き

#### 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、Scientific Advice Mechanism (SAM) による報告書<sup>29</sup>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

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。

the International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (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<sup>30</sup>。アグロバクテリウムやパー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。<sup>31</sup>

<sup>29</sup> New techniques in Agricultural Biotechnology

<sup>30</sup> ISAAA (2018 年 3 月 6 日閲覧) (<http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=15201>)

<sup>31</sup> 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>)

### 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<sup>32</sup>。

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。<sup>33</sup>

### III-ii-3. 考察

EUでは、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状態が継続している。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を進め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。

<sup>32</sup> 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/>)

<sup>33</sup> 日経バイオテク（2018年3月6日閲覧）

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、平成29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。

### i. コミュニケーション手法の試行調査

#### IV-i-1. 研究方法

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）<sup>34</sup>
- 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

<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/082400010/051000009/>

<sup>34</sup> 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

- 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
- 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。

#### IV-i-2. 研究結果

##### (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46）。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47）。

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48）。

##### (2) 食品の安全性、不安に対する意識の構成要素

安全だと思う食品について、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%）、農薬が少ないこと（有機・無農薬・減農薬）（9.6%）であった（図49）。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50）。

一方で、どのような食品を安心だと思いかについて、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51）。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52）。遺伝子組換えでないことは、順位自体は変わらないが、安心だと思ふ要素としてのほうが安全だと思ふ要素としてよりも若干ポイントが高かった。

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53）。

どのような場所で販売されている食品が安全だと思ふかについては、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54）。

##### (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55）。

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 56)。

#### (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 57、図 58)。

そこで、世界における栽培の現状や IP ハンドリング、安全性審査について情報提供 (図 59、図 60、表 9) した。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、「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 9) 後は 48.5%に増加した (図 61、図 62)。

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 63、図 64)。支払い意思額は、IP ハンドリングに対する情報提供の前後で、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 10)。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 11)、とうもろこしの缶詰が 41 名であった (表 12)。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 11)、とうもろこしの缶詰が 21 名 (表 12) 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 65)。

#### IV-i-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。

安全だと思う食品と安心だと思う食品については、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、国産であると同時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 割以上の人不安に思っており、約 8 割の人が食べたくないと思っている。

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、世界における栽培の現状や IP ハンドリング、安全性審査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。

## ii. コミュニケーションツールの検討

### IV-ii-1. 研究方法

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-ii-2. 研究結果

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の方が望ましい。(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と。
- 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-ii-3 考察

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により、GM食品を購入しても良いと思ふ人も増加

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

1) 今村知明、高谷幸、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、森川恵介、長谷川専、山口健太郎、池田佳代子. 食品防御の考え方とその進め方～よくわかるフードディフェンス～. 今村知明 編著. 2015 Apr;p.1-243 全文.

2) 今村知明. 【第2版】食品の安全とはなにか-食品安全の基礎知識と食品防御-. 2015; p.1-237.

3) 高谷幸、山本茂貴、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、山口健太郎、池田佳代子、名倉 卓、南谷 怜、一蝶茂人. フードディフェンス食品防御対策ガイドライン準拠. 今村知明 [編] 2016年7月22日.

4) K. Komoto, S. Okamoto, M. Hamada, N. Obana, M. Samori, & T. Imamura. Japanese consumer perceptions of genetically modified food: Findings from an international comparative study. *Interact J Med Res* 2016; 5(3), e23, p.1-19.

### 2. 学会発表・講演

1) 2015年05月21日～2015年05月21日 (奈良県、ホテル日航奈良). 第54回近畿公衆衛生学会. 医療における国民のリスク認知と意思決定に関する研究. 康原夏子、岡本左和子、和田千津子、植原慶太、濱田未来、

尾花尚弥、今村知明.

和子、濱田美来、藤馬裕一、今村知明.

2) 2015年05月29日～2015年05月31日  
(神奈川県、パシフィコ横浜). 第114回日本皮膚科学会総会. 医療の質向上を目指して～患者と医療者を守るため医療コミュニケーション～. 岡本左和子.

**D. 知的財産権の出願・登録状況**  
なし

3) 2015年09月05日～2015年09月06日  
(福岡県、西南学院大学 コミュニティーセンター). 日本ヘルスコミュニケーション学会第7回学術集会. がん患者の治療前後の状況の変容に伴った支援に関する研究. 岡本左和子、尾花尚哉、濱田未来、今村知明.

4) 2015年11月04日～2015年11月06日  
(長崎県、長崎ブリックホール). 第74回日本公衆衛生学会総会. 治療に伴うリスクの受容と決断のための患者のニーズと医師からの支援. 岡本左和子、野田龍也、濱田美来、尾花尚哉、今村知明.

5) 2015年11月04日～2015年11月06日  
(長崎県、長崎ブリックホール). 第74回日本公衆衛生学会総会. 国民の受療意思へのリスク情報の影響に関する研究. 康原夏子、岡本左和子、濱田美来、尾花尚弥、今村知明.

6) 2015年11月19日～2015年11月19日  
(奈良県、奈良県医師会館). 第36回奈良県公衆衛生学会. 糖尿病の発症・治療状況と社会性の関連に関する考察. 康原夏子、岡本左和子、今村知明.

7) 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

I 図表

A 研究目的

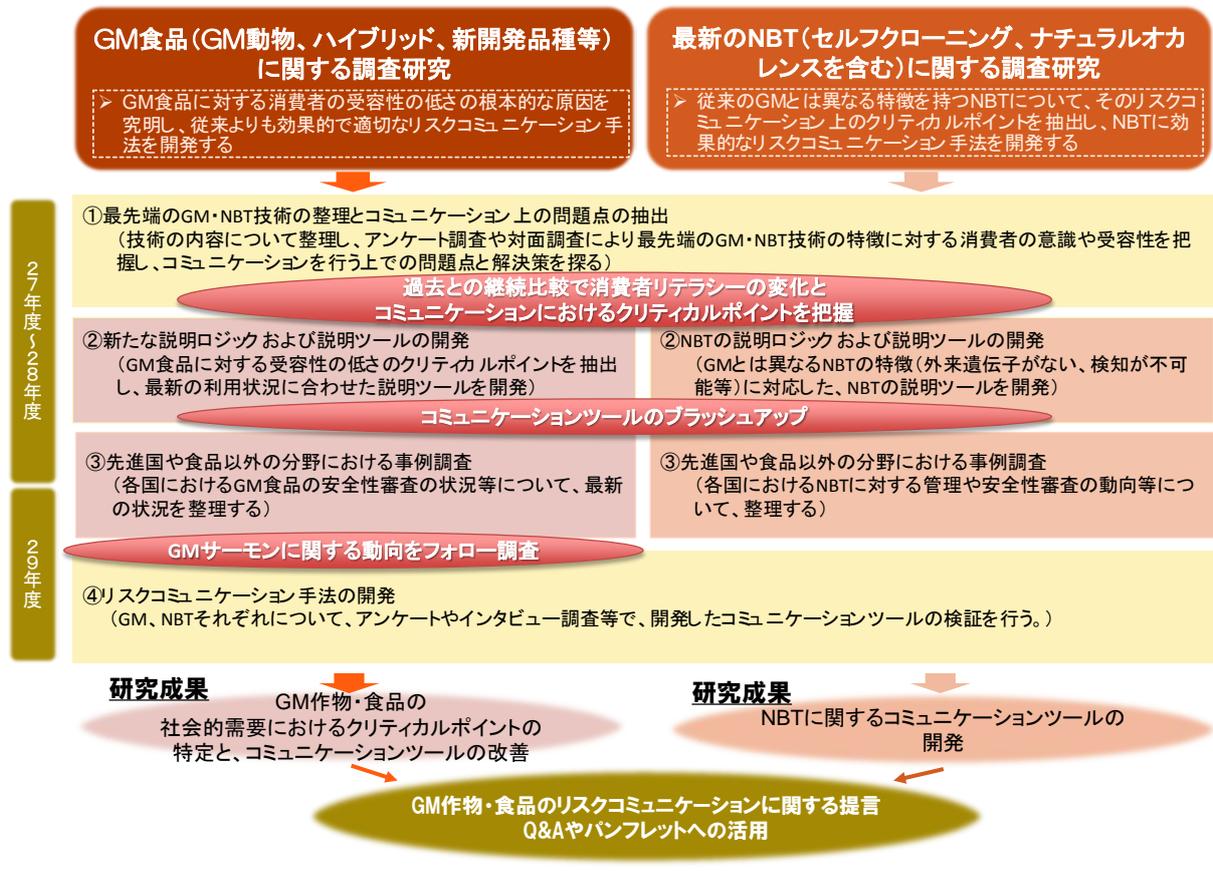


図 1 研究の全体像

B. 本研究の内容

I. 最先端のGM・NBT技術の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出

i. 高校生物の履修内容の変化

表 1 生物の指導内容一覧

項目	課程				旧指導要領(平成11年3月告示)			旧々指導要領(平成元年3月告示)		
	生物基礎	新編 生物基礎	生物	資料集	生物 I	生物 II	資料集	生物 I A	生物 I B	生物 II
遺伝子、DNAに関する基礎的知識										
DNA	○	○	○	○	○	○	○		○	○
スクレオチド	○	○	○	○	○	○	○			○
塩基	○	○	○	○	○	○	○			○
塩基の相補性	○	○	○	○	○	○	○			○
ゲノム	○	○	○	○	○	○	○			○
塩基配列	○	○	○	○	○	○	○			○
遺伝情報	○	○	○	○	○	○	○			○
遺伝子、DNA、ゲノムの関係	○	○	○	○	○	○	○			○
DNAの複製の仕組み										
DNAと染色体	○	○		○		○			○	
体細胞分裂による遺伝情報の分配	○	○		○		○				○
DNAの複製	○	○	○	○		○	○			○
半保存的複製		○		○		○	○			○
DNAポリメラーゼ			○	○		○	○			○
複製エラー			△	○		△				
遺伝子発現の仕組み										
遺伝情報の流れ	○		○	○		○				
セントラルドグマ	○		○	○		○				
タンパク質の体内における働き(酵素、抗体、構成物(筋繊維等))	○	○	○	○		○	○			
RNA	○	○	○	○		○	○			○
転写	○	○	○	○		○	○			○
逆転写			○	○		○	○			
転写調節			○	○		○	○			
オペロン			○	○		○	○			
プロモーター、RNAポリメラーゼ			○	○		○	○			
突然変異			○	○		○	○			
DNA多型			○	○		○	○		○	○
RNAの働きと種類			○	○		○	○			
DNAのセンス鎖とアンチセンス鎖			○	○		○	○			
リボザイム			○	○		○	○			
エキソン、イントロン			○	○		○	○			
スプライシング			○	○		○	○			
選択的スプライシング			○	○		○	○			
デオキシリボースとリボース	○	○	○	○		○	○			
翻訳	○	○	○	○		○	○			○
アンチコドン			○	○		○	○			
トリプレット	○		○	○		○	○			△
コドン	○		○	○		○	○			○
選択的遺伝子発現	△		○	○		○	○			○
バクと遺伝子発現	○	○	○	○		○	○			○
調節タンパク質と細胞分化			○	○		○	○			○
ホルモンによる遺伝子発現の調節			○	○		○	○			○
調節タンパク質と転写開始配列			○	○		○	○			○
遺伝子組換え										
遺伝子組換え			○	○		○	○			○
	異種の生物でもDNAの構成要素は同じ		○	○		○	○			○
	組換えで別の生物の遺伝子を含んだ組換えDNAを作ることができる		○	○		○	○			○
制限酵素			○	○		○	○			○
DNAリガーゼ			○	○		○	○			○
ベクター			○	○		○	○			○
	プラスミドによる遺伝子のコピーの仕組み		○	○		○	○			○
	大腸菌によるヒトタンパク質の合成		○	○		○	○			○
形質転換			○	○		○	○			○
クローニング			○	○		○	○			○
	大腸菌を用いたクローニング		○	○		○	○			○
PCR法			○	○		○	○			○
	プライマー		○	○		○	○			○
	DNAポリメラーゼ		○	○		○	○			○
	PCR法の実用先(親子関係の判別、犯罪捜査)		○	○		○	○			○
DNA塩基配列の解析			○	○		○	○			○
多細胞生物への遺伝子導入			○	○		○	○			○
	遺伝子治療の例		○	○		○	○			○
トランスジェニック			○	○		○	○			○
	トランスジェニック生物の例(農業抵抗性、害虫抵抗性作物)		○	○		○	○			○
	トランスジェニック生物のメリット		○	○		○	○			○
GFPタンパク質(マーカー)			○	○		○	○			○
RNA干渉			○	○		○	○			○
大腸菌を使った遺伝子組換え実験			○	○		○	○			○
パン酵母を利用した組換えDNA実験			○	○		○	○			○
最新技術の動向				▲		▲	▲			
	品種改良			▲		▲	▲			
	接ぎ木									
	穂木									
	次世代植物育種技術(NBT)									
	セルクローニング									
	ナチュラルオカレンス									
	メチル基				○					
	メチル化				○					
	ジメチルフィンガースクレアーゼ									
バイオテクノロジーの問題										
倫理的問題						○	○			
	ES細胞に受精卵を用いること					○	○			
	iPS細胞					○	○			
	クローン人間					○	○			
	代替臓器					○	○			
	ヒトゲノムとプライバシー	○	○			○	○			
安全性の問題						○	○			
	農業の使用過多					○	○			
	導入した遺伝子の影響					○	○			

表 2 項目別の記載事項数

項目	課程										
	現指導要領(平成21年3月告示)				旧指導要領(平成11年3月告示)			旧々指導要領(平成元年3月告示)			
	生物基礎	新編生物基礎	生物	資料集	生物 I	生物 II	資料集	生物 I A	生物 I B	生物 II	
遺伝子、DNAに関する基礎的知識	8	8	6	8	3	7	4	0	1	6	
DNAの複製の仕組み	3	4	4	6	0	6	2	0	1	4	
遺伝子発現の仕組み	11	6	26	24	0	20	10	0	1	10	
遺伝子組換え	0	0	25	24	1	21	14	0	1	4	
バイオテクノロジーの問題	1	1	0	0	0	9	5	0	0	0	
合計	23	19	61	62	4	63	35	0	4	24	

表 3 進路別の履修状況

内容/履修パターン	現指導要領				
	文系		理系		
	生物基礎・生物を履修せず	生物基礎のみ	生物基礎・生物を履修せず	生物基礎のみ	生物基礎+生物
遺伝子、DNAに関する基礎的知識	×	○	×	○	○
DNAの複製の仕組み	×	△	×	△	○
遺伝子発現の仕組み	×	△	×	△	○
遺伝子組換え	×	×	×	×	○
バイオテクノロジーの問題	×	×	×	×	×

表 4 指導要領の年代別対応

	現指導要領	旧指導要領	旧々指導要領
告示	平成21年3月	平成11年3月	平成元年3月
実施	平成24年4月(数学・理科先行実施)	平成15年4月	平成6年4月
平成27年度時点年齢	16～19歳	20～28歳	29～37歳
出生年	1996.4～1999.4	1987.4～1996.3	1978.4～1987.3
出生年(年号)	平成8.4～平成11.4	昭和62.4～平成8.3	昭和53.4～昭和62.3

ii.年代やライフステージの変化による GM への需要の影響

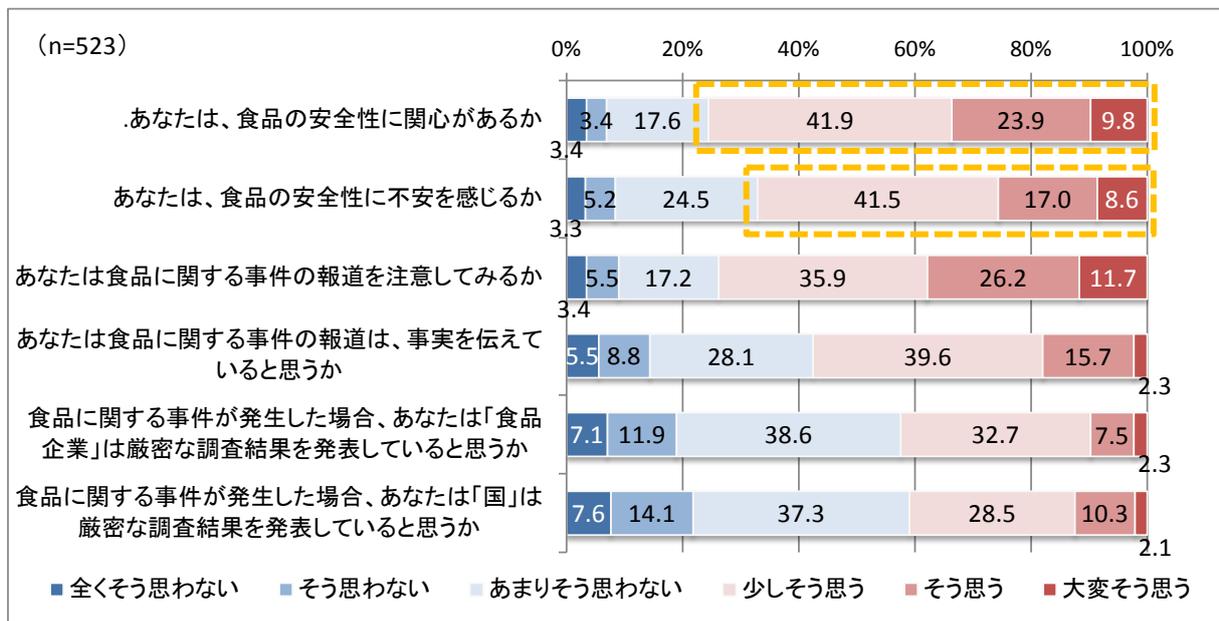


図 2 以下の設問に答えなさい

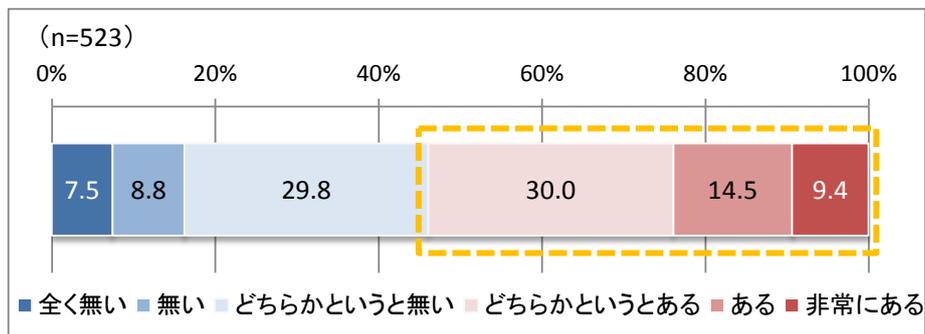


図 3 遺伝子組換え食品に抵抗がありますか

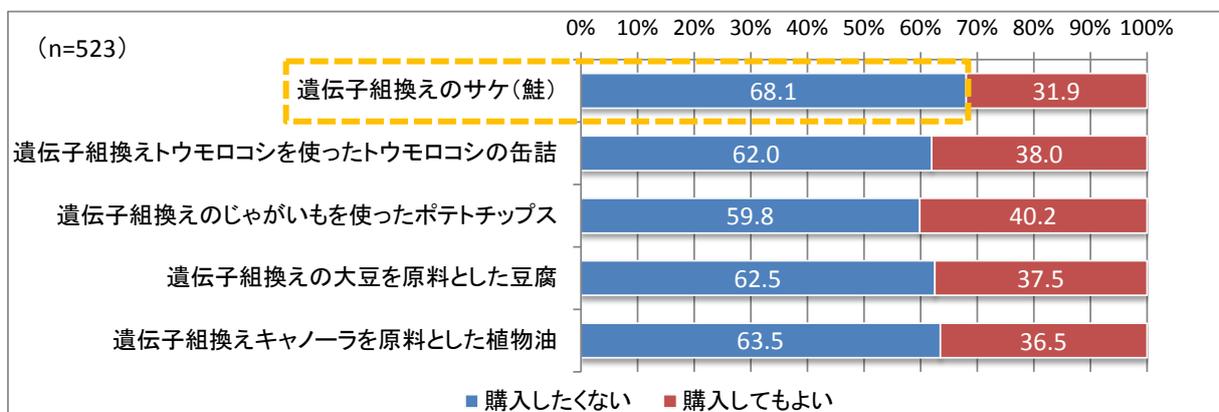


図 4 以下の製品について「購入してもよい」か「購入したくない」かお答えください

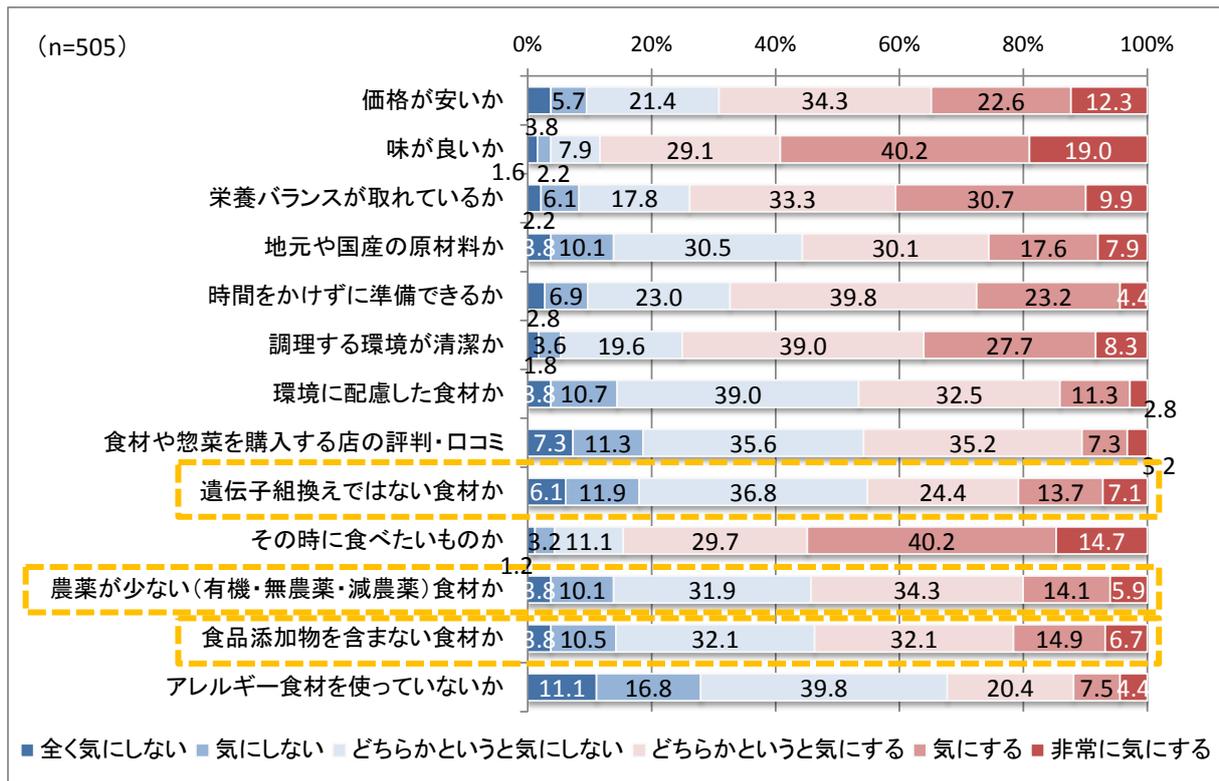


図 5 あなたは、平日の夕食に家で食べる食事を準備する際、以下の点をどの程度気にしていますか

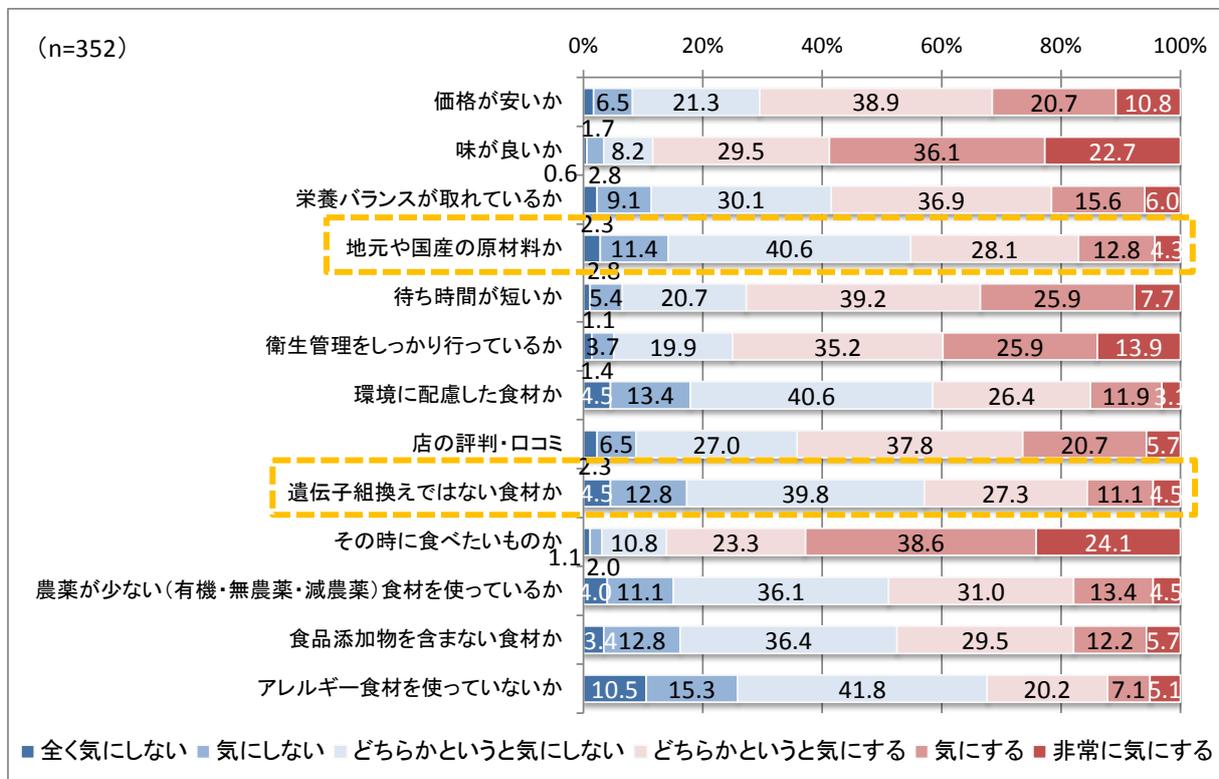


図 6 あなたは、平日の夕食に外食する際、以下の点をどの程度気にしていますか

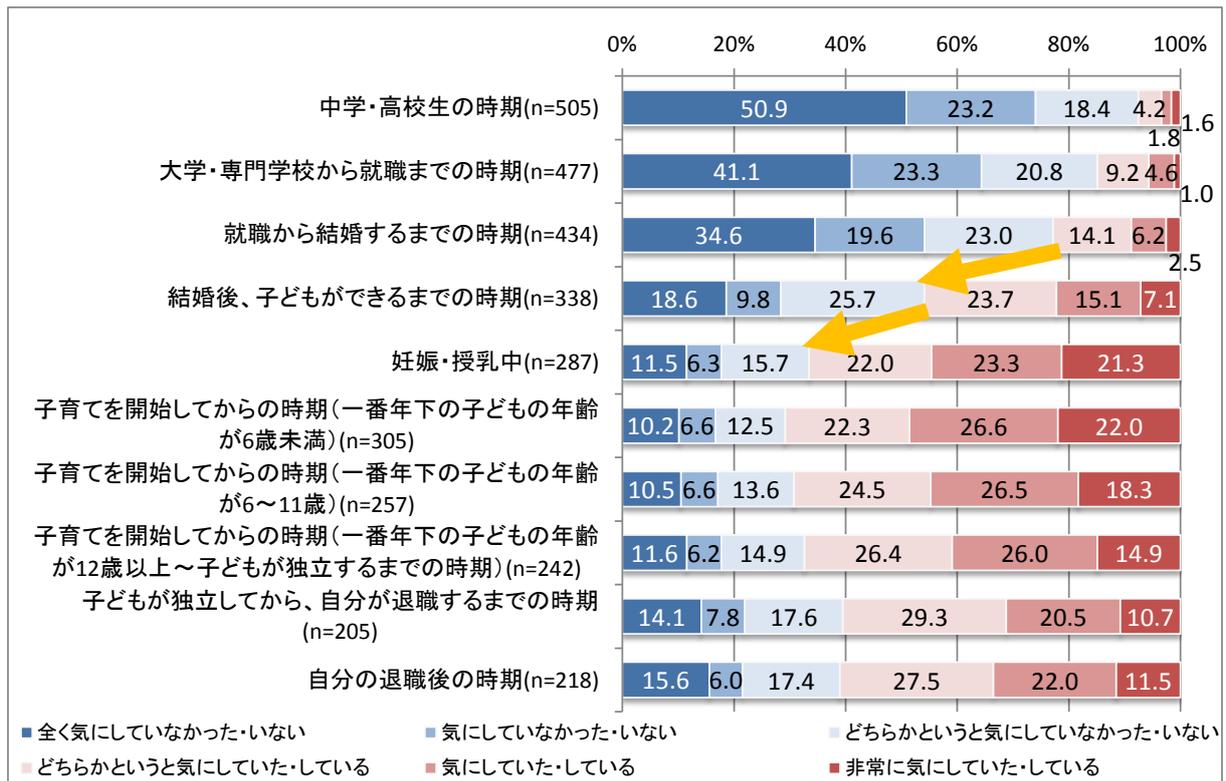


図 7 あなたが下記の年代において、自分が食べるものの安全性をどの程度気にかけましたか

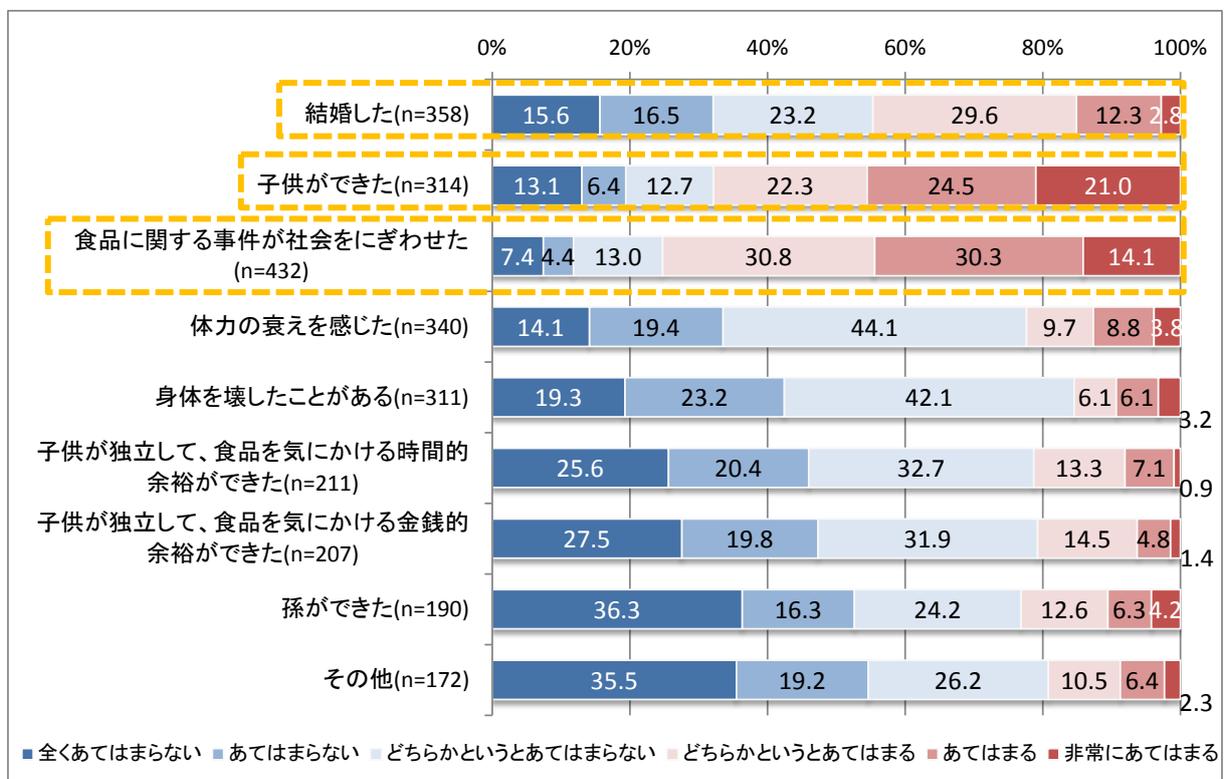


図 8 食品の安全性を気にかけるきっかけは何でしたか

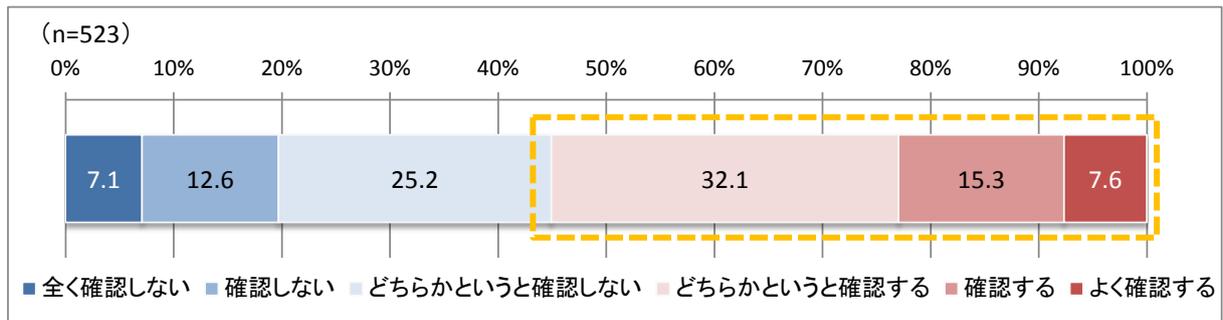


図 9 あなたは食品を購入する際、原材料や栄養成分が記載されたラベルを確認しますか

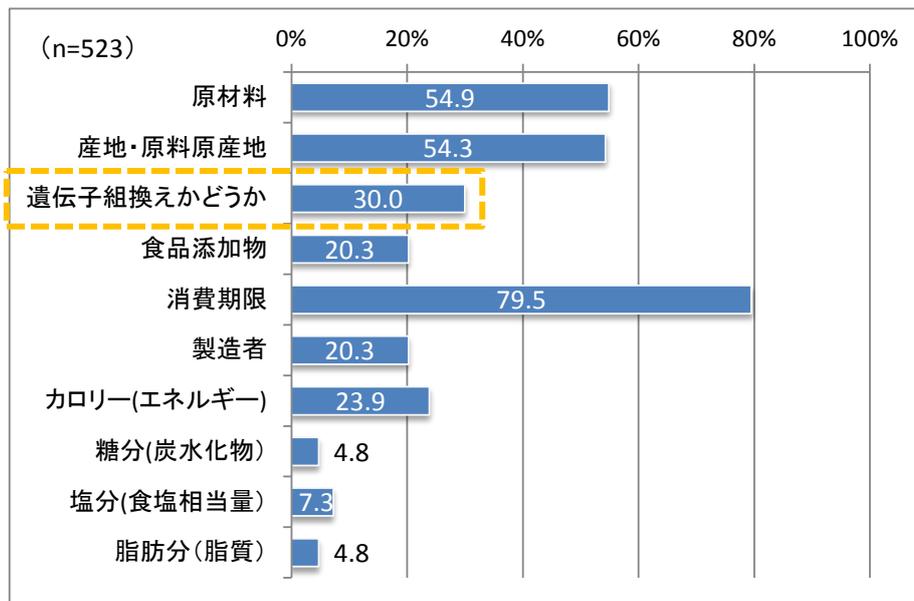


図 10 豆腐を想定して、食品ラベル表示でもっとも重視するものを3つお答えください

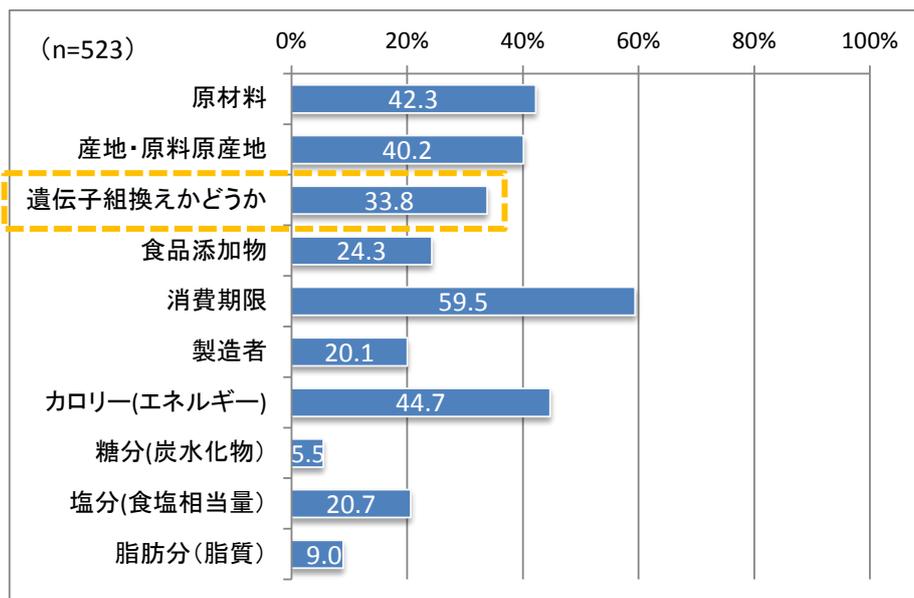


図 11 ポテトチップスを想定して、食品ラベル表示でもっとも重視するものを3つお答えください

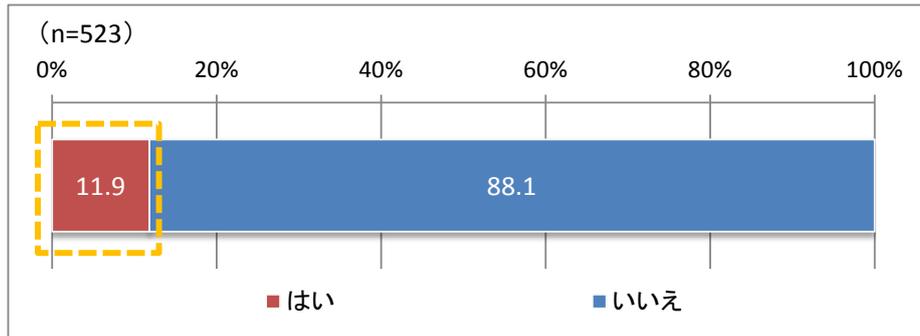


図 12 食品ラベルに「不分別」と表示されているものがあります。あなたは「不分別」がどういう意味かを知っていますか

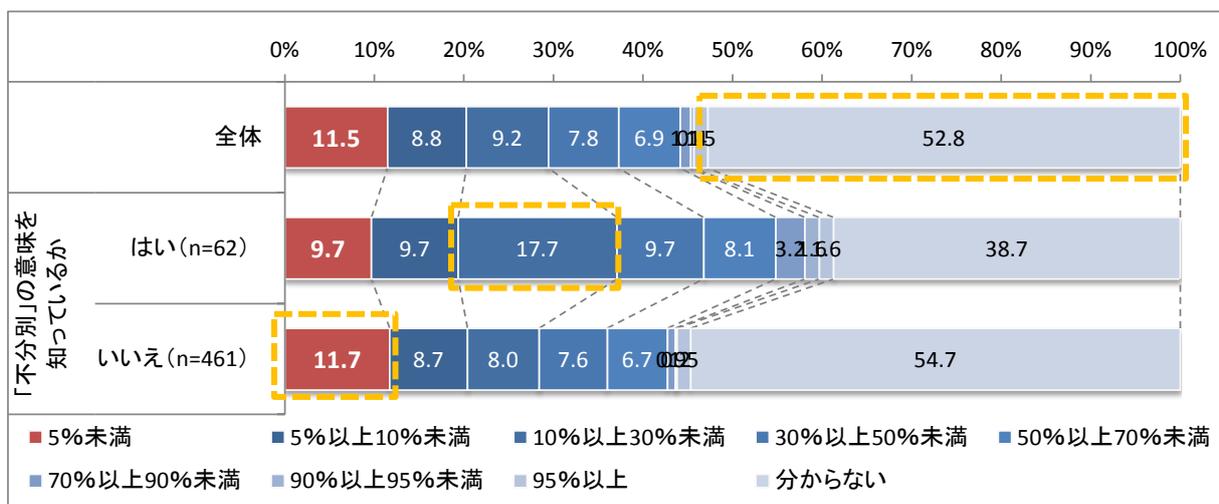


図 13 遺伝子組換え不分別の食品には、どの程度の割合で遺伝子組換えの原材料が含まれていると思いますか

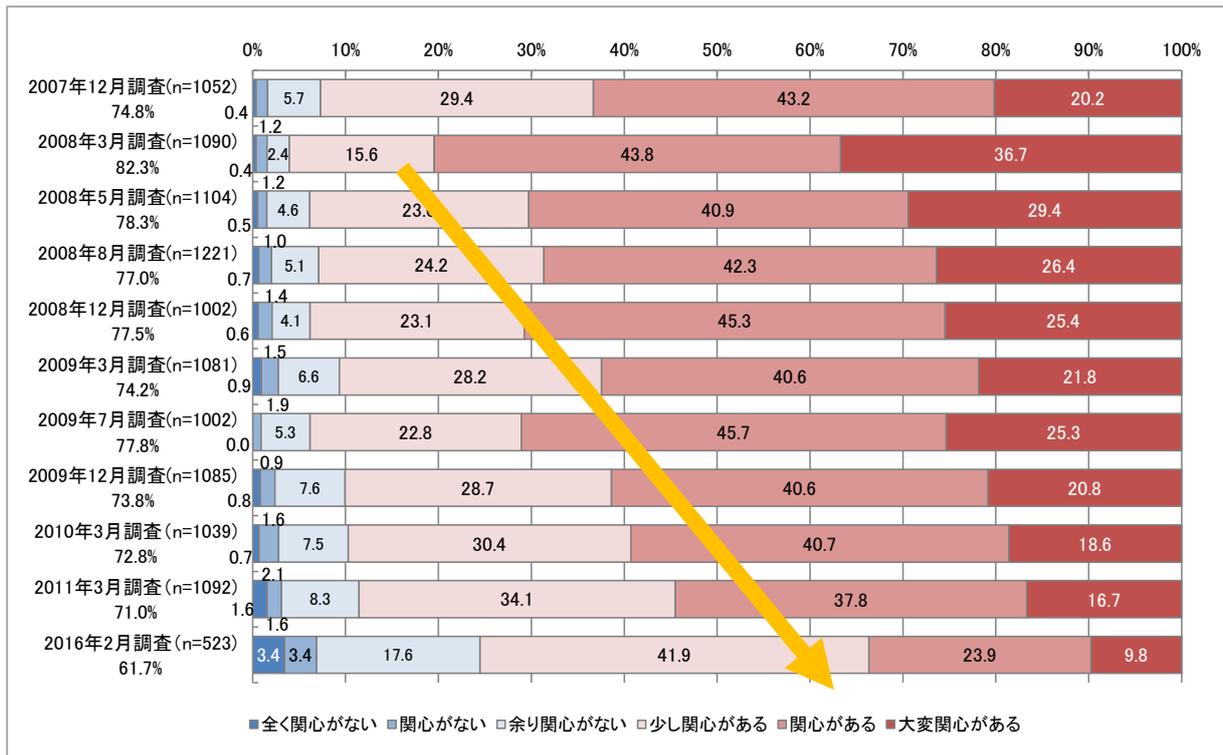


図 14 あなたは、食品の安全性に関心がありますか

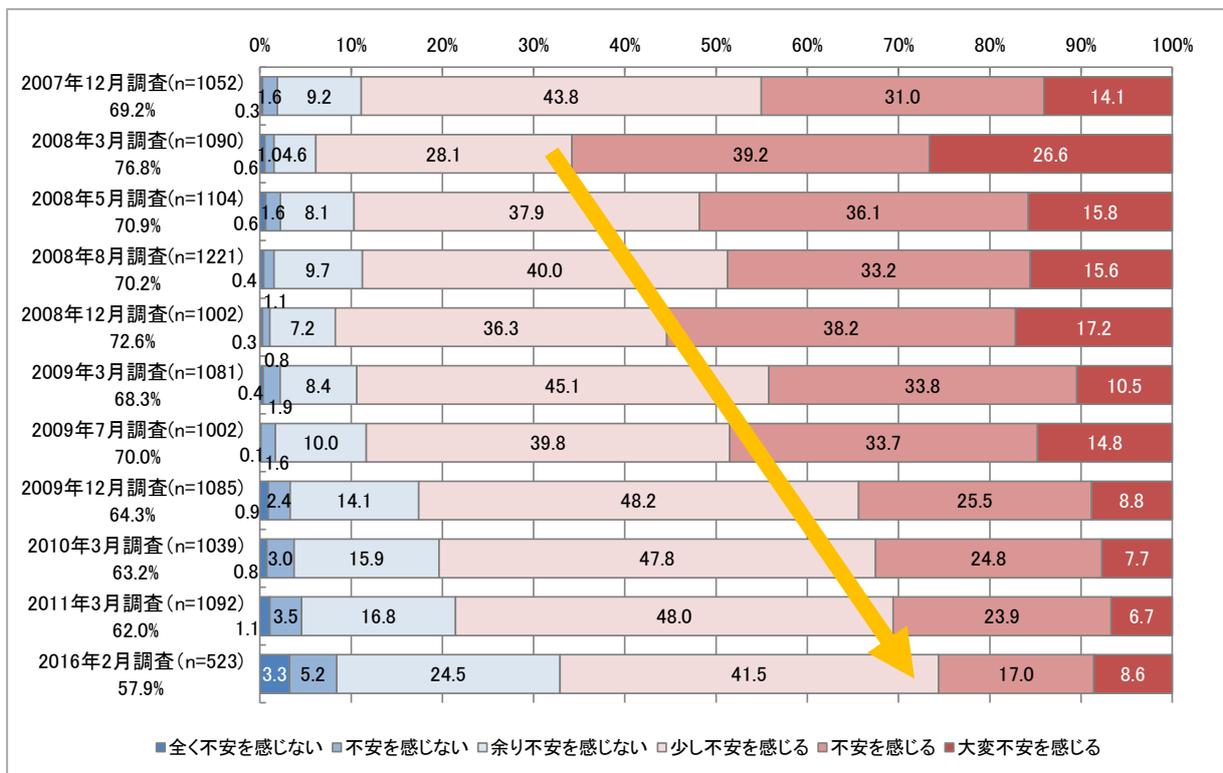


図 15 あなたは、食品の安全性に不安を感じますか

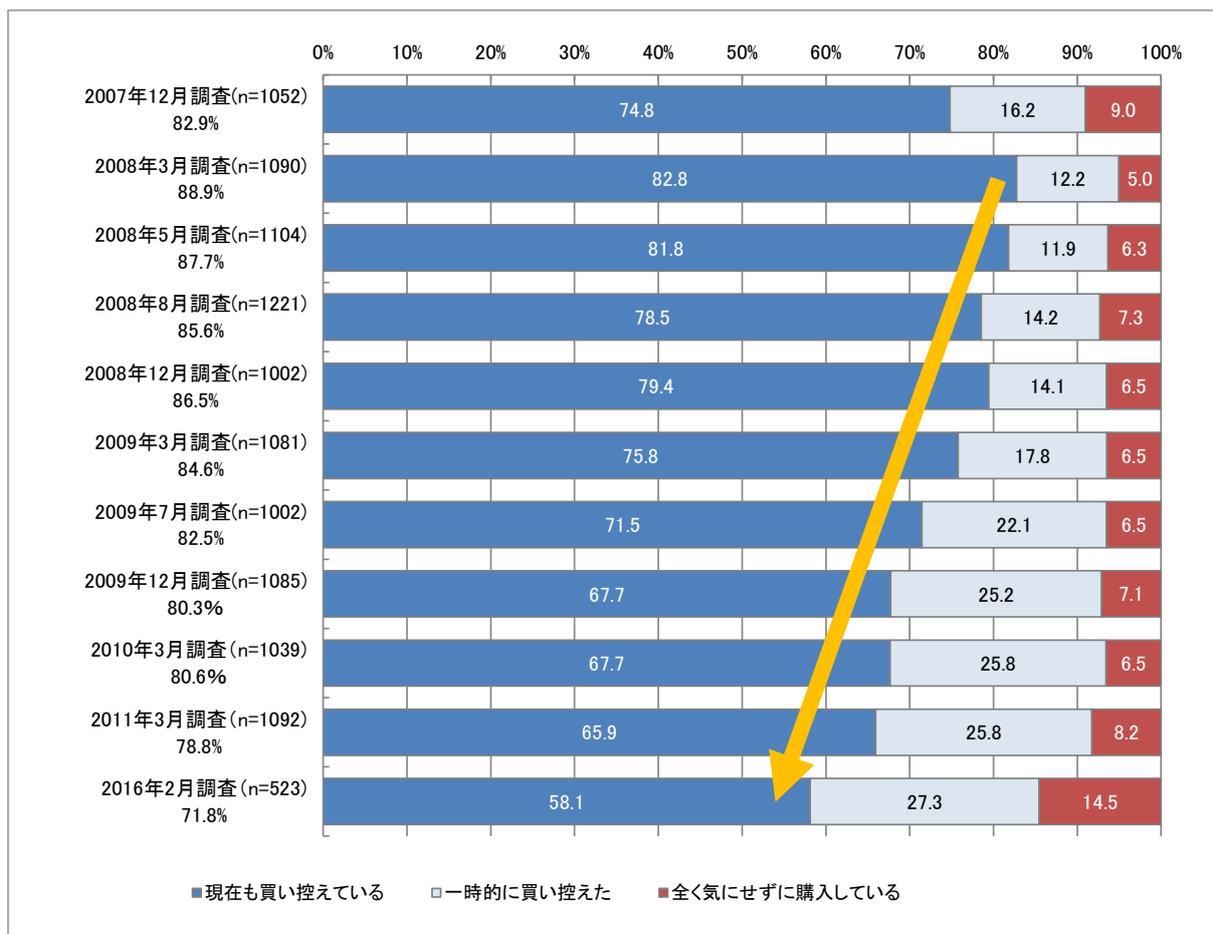


図 16 中国産の冷凍ギョウザによる食中毒事件の報道後、中国産の食品を買い控えましたか

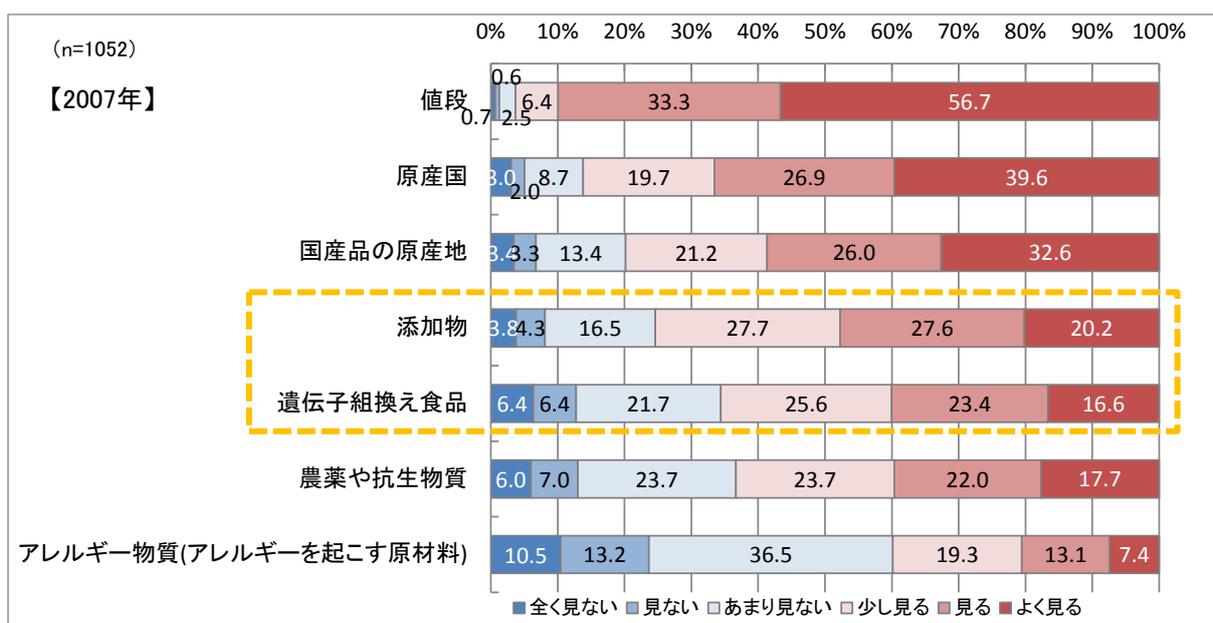


図 17 あなたは、食品の表示を見る場合には、どの項目を見ますか

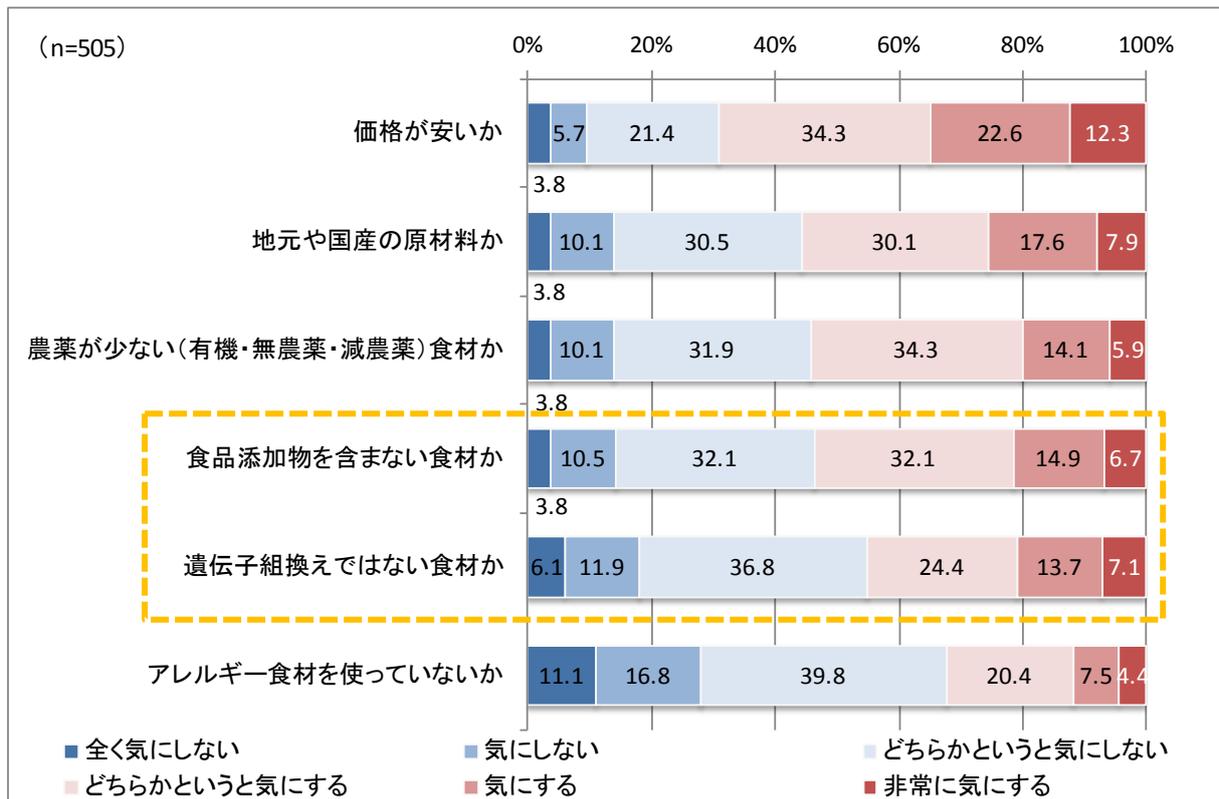


図 18 あなたは、平日の夕食に家で食べる食事を準備する際、以下の点をどの程度気にしていますか（一部抜粋）

## II. 新たな説明ロジックおよび説明ツールの開発

### i. 説明資料の作成

表 5 最新育種技術の説明資料の修正の履歴・経緯の概要

イラストの改定履歴		頂いた主なコメント
2014年6月	柑橘類バージョン	<ul style="list-style-type: none"> <li>・食べ物を題材にすると、実際に市場に出回っている印象を与え、ミスリーディングを引き起こすため、やめた方が良い</li> <li>・ネガティブな表現（傷つける、エラーを起こす）は使わない方が良い</li> </ul>
2014年7月	バラバージョン	<ul style="list-style-type: none"> <li>・誤解が生じないように、丁寧な説明にした方が良い</li> </ul>
2014年12月	バラバージョン (アンケート調査用に一部修正と追加)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ナチュラルオカレンス、セルフクローニングは実際には微生物以外を想定しづらいため、花で説明するとミスリーディングを起こす恐れがある</li> </ul>
2015年3月	微生物バージョン	<ul style="list-style-type: none"> <li>・特定の商品を想起させる絵・表現は避けたほうが良い</li> <li>・特定の商品を想起させないため、もう少し食品数があった方が良い</li> </ul>
2015年4月	微生物バージョン2	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ナチュラルオカレンスは大腸菌以外を用いて説明する</li> <li>・大腸菌は、一般消費者は食中毒菌を連想する可能性あり</li> </ul>
2015年5月	微生物バージョン3	<ul style="list-style-type: none"> <li>・納豆菌で描くと描きやすいし分かりやすいと指摘があったが、それは余りに直接的なので、乳酸菌で再度イラストを作成</li> </ul>

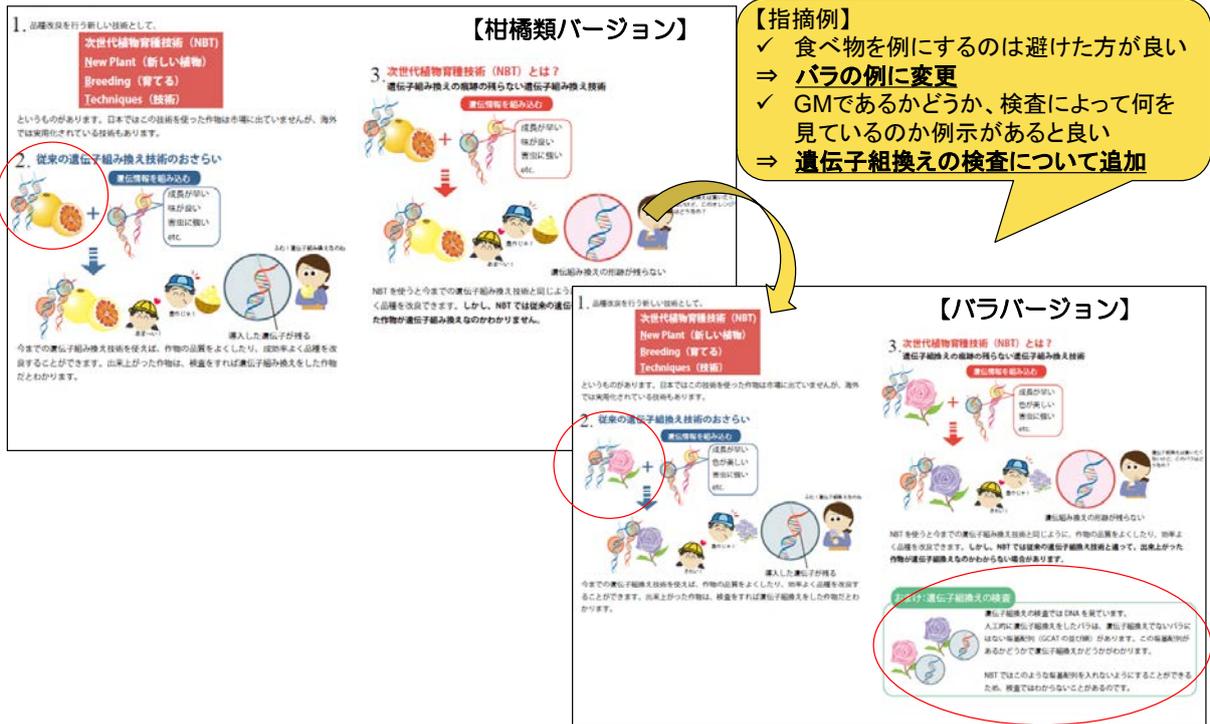


図 19 説明資料の変更例①

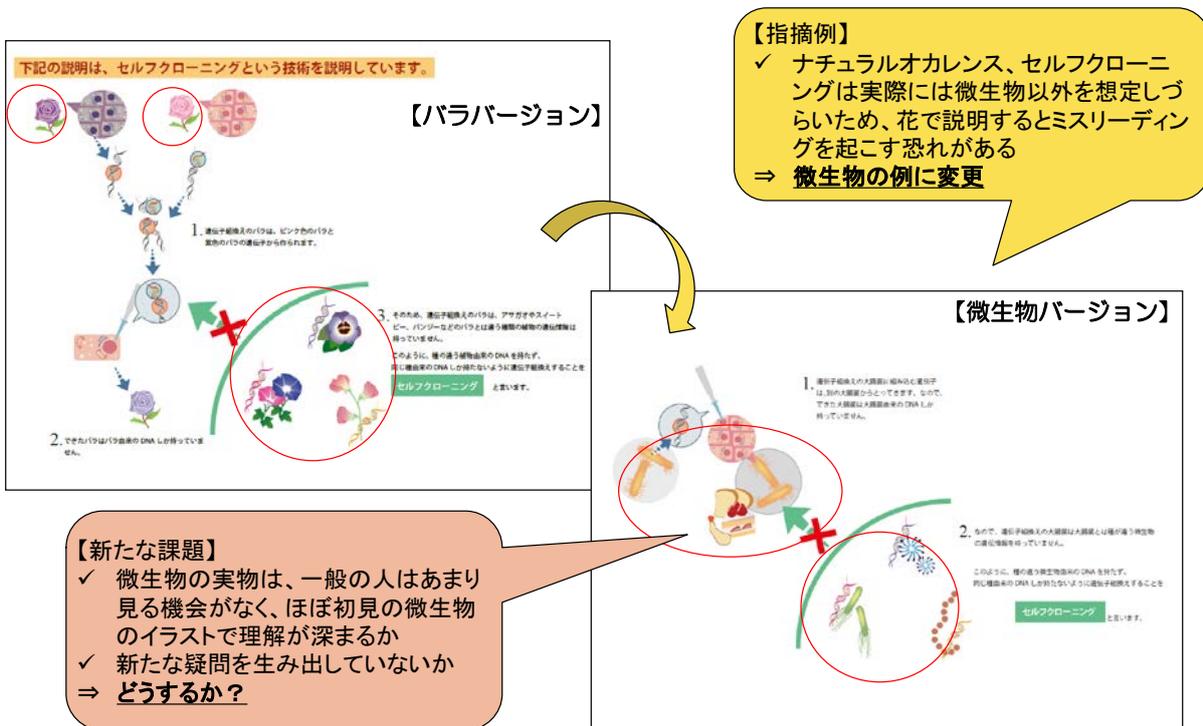


図 20 説明資料の変更例②

次世代植物育種技術にはどんな技術があるの? ①

**DNAを傷つけ、遺伝子のエラーを起こしやすくする技術**

1. DNAが傷ついた時のために、植物は傷ついたDNAを治す力を生まれつき持っています。

2. 傷ついたDNAを治すときに、エラーが起こって塩基配列 (GCATの並び) が自然に変わってしまうことがあります。NBTではDNAを傷つけて、遺伝子組換えをする技術が

3. 例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) というタンパク質を使って、DNAを切ることができます。切ったDNAを治すとき、遺伝子のエラーが起こりやすくなります。

4. ZFN以外にも、DNAを傷つけるタンパク質や放射線を使って、DNAを傷つけることができます。これらの技術では「DNAを傷つける」だけで、遺伝子組換えはしていません。遺伝子組換えはエラーによって自然に起こってしまうだけなので、遺伝子組換えの痕跡は残りません。

【指摘例】  
 ✓ 一部の表現ぶりが気になる  
 ⇒ 表現を修正 (遺伝子のエラー→塩基配列の変化、DNAを傷つける→DNAの一部に切り込みを入れる、等)

次世代植物育種技術にはどんな技術があるの? ②

**植物の持つDNAの修復力によって、遺伝子組換えを起こさせる技術**

1. DNAが傷ついた時のために、植物は傷ついたDNAを治す力を生まれつき持っています。

2. 傷ついたDNAを治すときに、エラーが起こって塩基配列 (GCATの並び) が自然に変わってしまうことがあります。NBTでは、DNAの一部に切り込みを入れ、修復の際に塩基配列が変わる性質を活用して遺伝子組換えを起こす技術があります。

3. 例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) というタンパク質で、DNAを切ることができます。切ったDNAを治すとき、塩基配列の変化が起こりやすくなります。

4. ZFN以外にも、タンパク質や放射線を使って、DNAに切り込みを入れることができます。NBTによってDNAの狙った場所に切り込みを入れた後は、植物が生まれつき持っている「傷ついたDNAを治す力」によって、遺伝子組換えが行われます。

図 21 説明資料の変更例②

**染色体や遺伝子、DNAなどの用語を説明します。**

**細胞とは：**  
 ほとんどの生物は細胞によってできていて、生物の身体を構成する最小単位。細胞1つは、中心に核を持っています。核は細胞全体を支配していて、これがないと細胞は生きていけない。

**染色体とは：**  
 細胞の核の中には染色体がある。染色体は小さく折り畳まれたDNAの鎖が集まってできている。

**DNAとは：**  
 DNAは2本の鎖がお互い絡まりあったような構造をしている。2本の鎖がらせん状になっていることから、これを二重らせん構造と言う。このらせんの中に4種類の塩基と呼ばれる部分 (GCAT) があり、この塩基の並び順によって生命の情報が記録される。

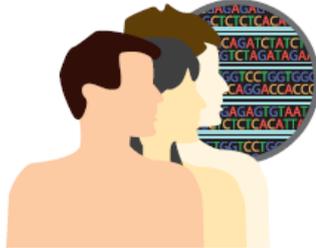
**遺伝子とは：**  
 遺伝子には外見や性質、個性などを決定する情報が含まれているため、生命の設計図とも言われている。2重螺旋であるDNAに遺伝子 (設計図) がいくつも乗っている。

**用語説明スライド**  
 (使用されている用語が一般には分かりにくいという指摘があり、追加したもの)

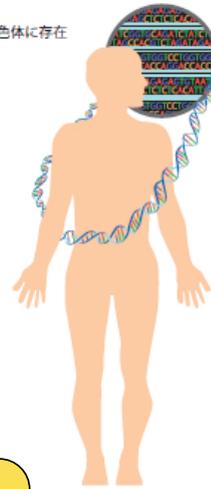
図 22 説明資料 (用語説明) ①

**染色体や遺伝子、DNAなどの用語を説明します。**

遺伝情報とは：  
 遺伝情報は個人によって異なり、遺伝情報の違いが性別、毛色等の個性を決めている。塩基の並び方を一部変更することで、違った遺伝情報・違った個性を持つ生物を創造することができる。



ゲノムとは：  
 生物が持つ遺伝情報全体のことで、染色体に存在する全 DNA（遺伝情報）をあらわす。



**用語説明スライド**  
 (使用されている用語が一般には分かりにくいという指摘があり、追加したもの)

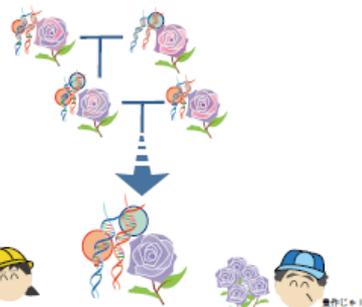
図 23 説明資料 (用語説明) ②

**下記の説明は遺伝子組換え技術がどういったものか説明をしています。**

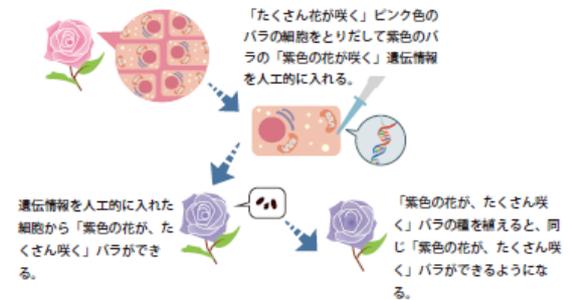
1. 紫色のバラは「紫色の花が咲く」遺伝情報を、ピンク色のバラは「たくさん花が咲く」遺伝情報を持ちます。これらをかけ合わせると...



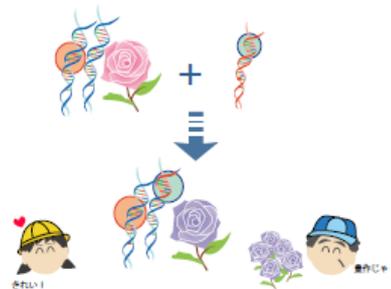
2. 紫色のバラの「紫色の花が咲く」遺伝情報やピンク色のバラの「たくさん花が咲く」遺伝情報を持つバラができます。



3. できたバラ同士で更にかけ合わせを行います。このようなかけ合わせをくり返すと、紫色のバラの「紫色の花が咲く」遺伝情報とピンク色のバラの「たくさん花が咲く」遺伝情報の両方を持っている「紫色の花が、たくさん咲く」バラができます。これが従来の品種改良です。



4. 遺伝子組み換え技術を使って、「紫色の花が、たくさん咲く」バラを作ることもできます。遺伝子組換え技術では、「たくさん花が咲く」ピンク色のバラに紫色のバラの「紫色の花が咲く」遺伝情報を直接入れて「紫色の花が、たくさん咲く」バラを作ることができます。



5. このように、遺伝子組換え技術を使えば品種改良と同じように「紫色の花が、たくさん咲く」バラを作ることができます。しかも、従来の品種改良でかかっていたコストと時間を削減でき、効率よく改良ができます。

図 24 説明資料 (遺伝子組換え技術・バラの例)

下記の説明は、セルフクローニングという技術を説明しています。

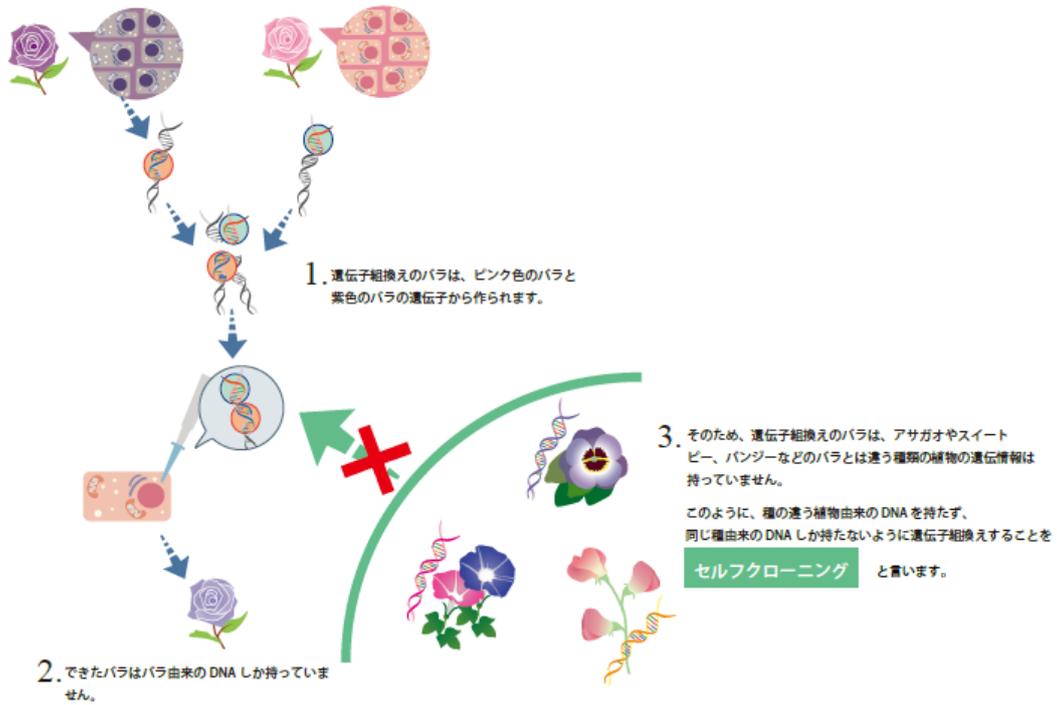


図 25 説明資料（セルフクローニング・バラの例）

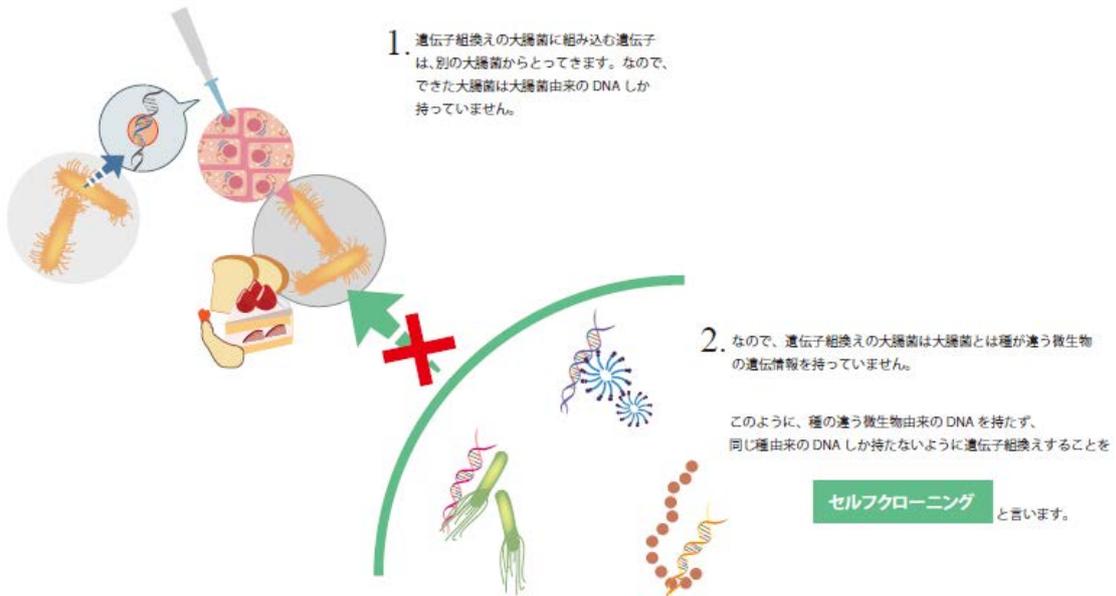


図 26 説明資料（セルフクローニング・微生物の例）

下記はナチュラルオカレンスという技術の説明です。

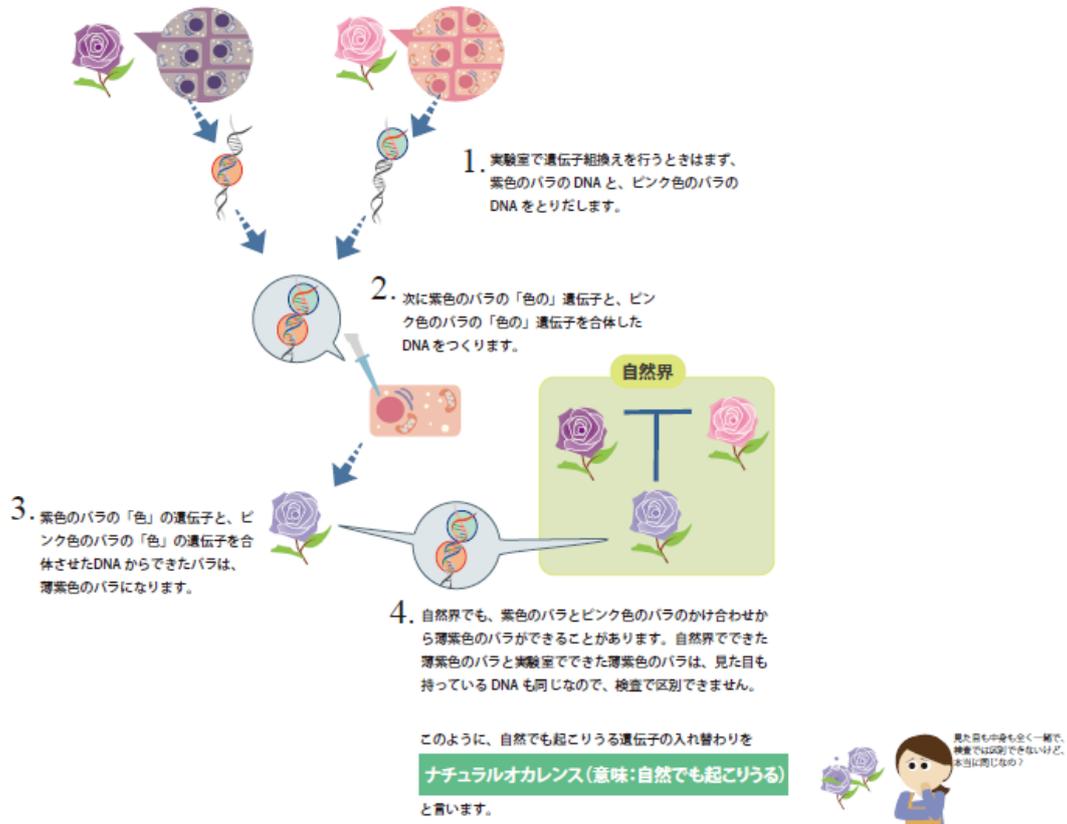


図 27 説明資料 (ナチュラルオカレンス・バラの例)

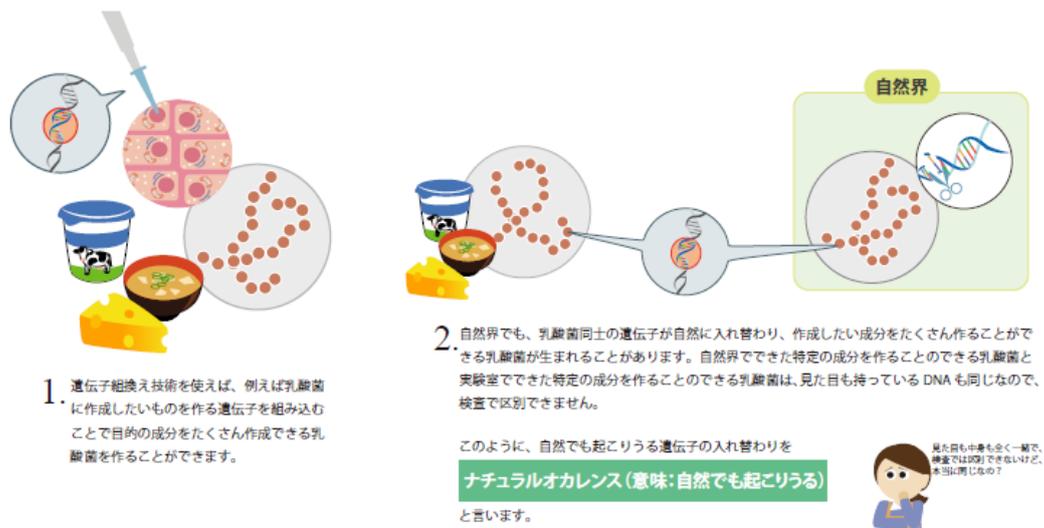


図 28 説明資料 (ナチュラルオカレンス・微生物の例)

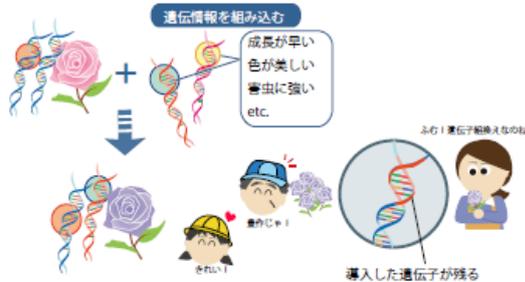
## 次世代植物育種技術 (NBT)

1. 品種改良を行う新しい技術として、

次世代植物育種技術 (NBT)  
New Plant (新しい植物)  
Breeding (育てる)  
Techniques (技術)

というものがあります。日本ではこの技術を使った作物は市場に出ていませんが、海外では実用化されている技術もあります。

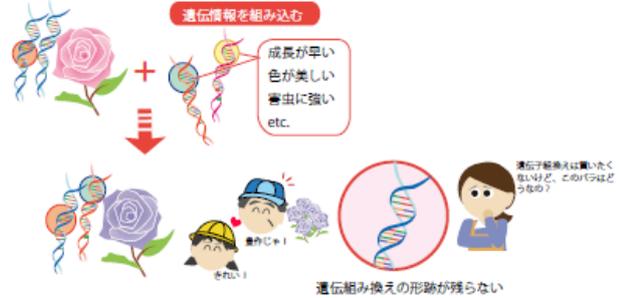
2. 従来の遺伝子組換え技術のおさらい



今までの遺伝子組換え技術を使うと、作物の品質をよくする、病気に強くなるなどの品種改良を、効率よく行うことができます。出来上がった作物は、遺伝子に遺伝子組換え特有の特徴が残るため、検査をすれば遺伝子組換えをした作物だとわかります。

3. 次世代植物育種技術 (NBT) とは？

遺伝子組換えの痕跡の残らない遺伝子組み換え技術



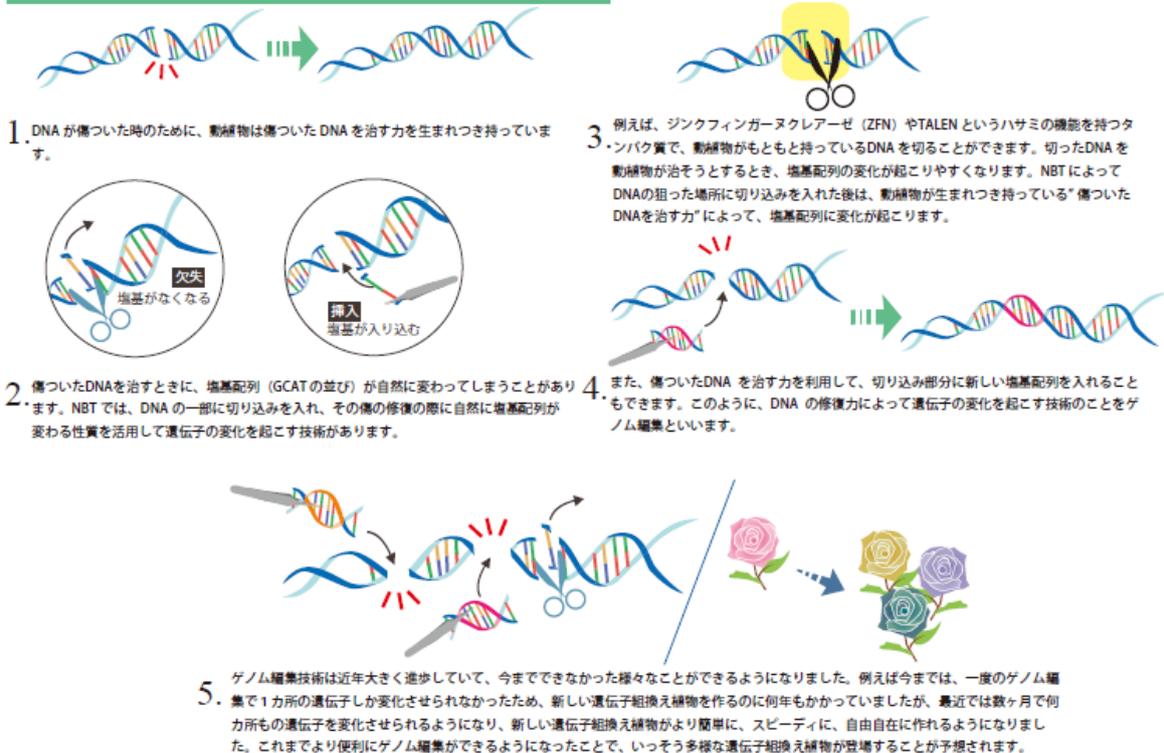
NBTを使うと今までの遺伝子組み換え技術と同じように、作物の品質をよくする、病気に強くなるなどの品種改良を、効率よく行うことができます。しかし、NBTでは従来の遺伝子組換え技術と違って、出来上がった作物の遺伝子に遺伝子組換え特有の特徴が残らず、遺伝子組換えなのかわからない場合があります。

図 29 説明資料 (NBT・バラの例)

## ゲノム編集

次世代植物育種技術にはどんな技術があるの？①

ゲノム編集: 動物の持つDNAの修復力によって、遺伝子の変化を起こす技術



1. DNA が傷ついた時のために、動物は傷ついた DNA を治す力を生まれつき持っています。

3. 例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) やTALEN というハサミの機能を持つタンパク質で、動物がもともと持っている DNA を切ることができます。切った DNA を動物が治そうとすると、塩基配列の変化が起こりやすくなります。NBT によって DNA の狙った場所に切り込みを入れた後は、動物が生まれつき持っている「傷ついた DNA を治す力」によって、塩基配列に変化が起こります。

2. 傷ついた DNA を治すときに、塩基配列 (GCAT の並び) が自然に変わってしまうことがあります。NBT では、DNA の一部に切り込みを入れ、その傷の修復の際に自然に塩基配列が変わる性質を活用して遺伝子の変化を起こす技術があります。

4. また、傷ついた DNA を治す力を利用して、切り込み部分に新しい塩基配列を入れることもできます。このように、DNA の修復力によって遺伝子の変化を起こす技術のことをゲノム編集といいます。

5. ゲノム編集技術は近年大きく進歩していて、今までできなかった様々なことができるようになりました。例えば今までは、一度のゲノム編集で1カ所の遺伝子しか変化させられなかったため、新しい遺伝子組換え植物を作るのに何年もかかっていましたが、最近では数ヶ月で何カ所もの遺伝子を変化させられるようになり、新しい遺伝子組換え植物がより簡単に、スピーディに、自由自在に作れるようになりました。これまでもより便利にゲノム編集ができるようになったことで、いっそう多様な遺伝子組換え植物が登場することが予想されます。

図 30 説明資料 (ゲノム編集・バラの例)

## ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)

次世代植物育種技術にはどんな技術があるの?①

植物の持つDNAの修復力によって、遺伝子組換えを起こさせる技術

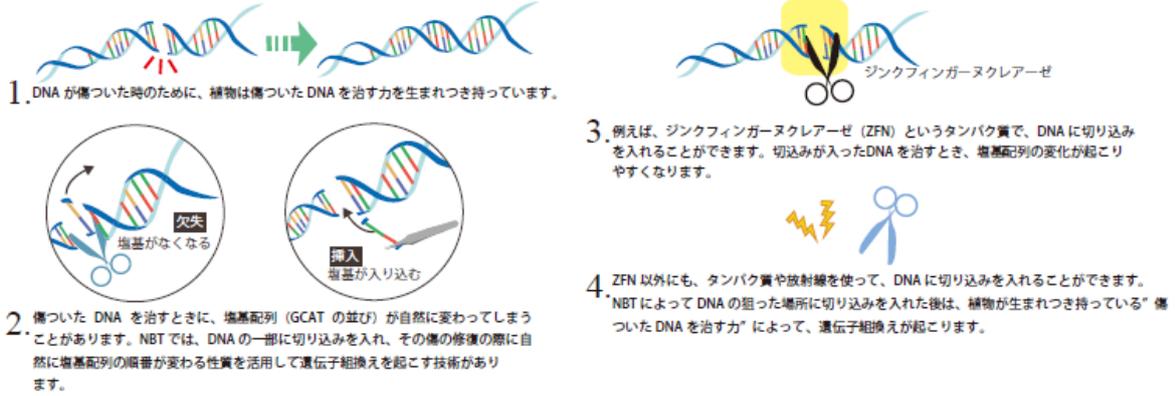
- 
1. DNAが傷ついた時のために、植物は傷ついたDNAを治す力を生まれつき持っています。
2. 傷ついたDNAを治すときに、塩基配列(GCATの並び)が自然に変わってしまうことがあります。NBTでは、DNAの一部に切り込みを入れ、その傷の修復の際に自然に塩基配列の順番が変わる性質を活用して遺伝子組換えを起こす技術があります。
3. 例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)というタンパク質で、DNAに切り込みを入れることができます。切込みが入ったDNAを治すとき、塩基配列の変化が起こりやすくなります。
4. ZFN以外にも、タンパク質や放射線を使って、DNAに切り込みを入れることができます。NBTによってDNAの狙った場所に切り込みを入れた後は、植物が生まれつき持っている“傷ついたDNAを治す力”によって、遺伝子組換えが起こります。

図 31 説明資料 (ジンクフィンガーヌクレアーゼ)

## クリスパーキャス(CRISPR CAS)

おまけ:最新技術!免疫力を利用して、DNAを切る

ゲノム編集をするとき、DNAに切り込みをいれます。このとき、動物がもともと持っているウイルスに対する免疫力を利用してDNAに切り込みを入れる技術があります。

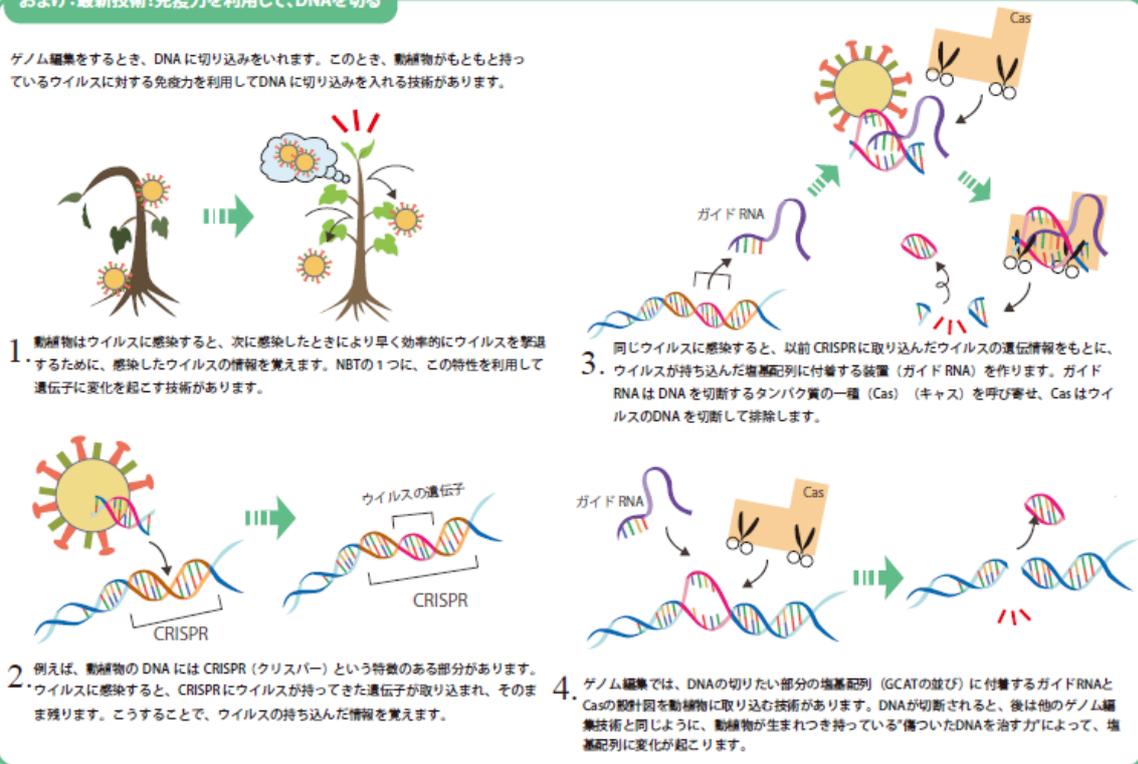
- 
1. 動物はウイルスに感染すると、次に感染したときより早く効率的にウイルスを撃退するために、感染したウイルスの情報を覚えます。NBTの1つに、この特性を利用して遺伝子に変化を起こす技術があります。
2. 例えば、動物のDNAにはCRISPR(クリスパー)という特徴のある部分があります。ウイルスに感染すると、CRISPRにウイルスが持ってきた遺伝子を取り込まれ、そのまま残ります。こうすることで、ウイルスの持ち込んだ情報を覚えます。
3. 同じウイルスに感染すると、以前CRISPRに取り込んだウイルスの遺伝情報をもとに、ウイルスが持ち込んだ塩基配列に付着する装置(ガイドRNA)を作ります。ガイドRNAはDNAを切断するタンパク質の一種(Cas(キャス))を呼び寄せ、CasはウイルスのDNAを切断して排除します。
4. ゲノム編集では、DNAの切りたい部分の塩基配列(GCATの並び)に付着するガイドRNAとCasの設計図を動物に取り込む技術があります。DNAが切断されると、後は他のゲノム編集技術と同じように、動物が生まれつき持っている“傷ついたDNAを治す力”によって、塩基配列に変化が起こります。

図 32 説明資料 (クリスパーキャス)

## メチル化

次世代植物育種技術にはどんな技術があるの？②

### 遺伝情報に標識を立て、使う遺伝子を取捨選択する技術

動物の色や形などの特徴がどのように表れるかは、遺伝子によって決まります。動物は、持っているすべての遺伝子情報を使っているわけではありません。色や形などを現す遺伝子を取捨選択することにより、動物が持つ特徴を左右することができます。

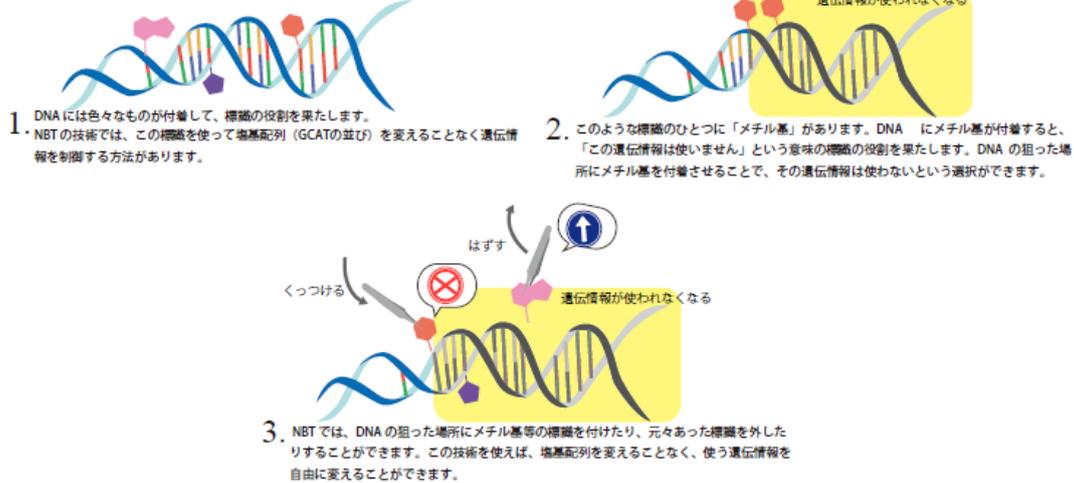


図 33 説明資料（メチル化）

## 接ぎ木

次世代植物育種技術にはどんな技術があるの？③

### 作物のなる木や苗だけを遺伝子組換えにする技術

栽培や育種の過程で遺伝子組換え技術を利用するが、人が食べる部分は遺伝子組換えではないようにする技術

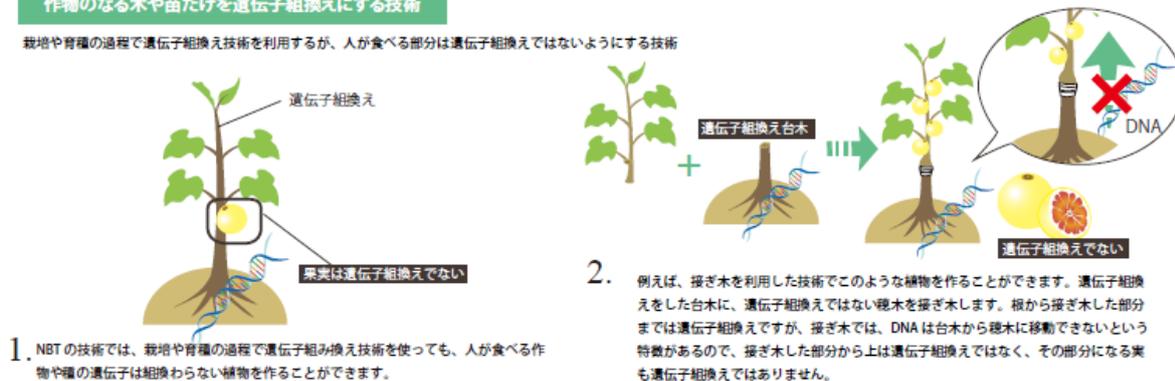


図 34 説明資料（接ぎ木）

## 遺伝子組み換え食品を食べて体に害はないの？

遺伝子がそのまま体内に吸収されたり、組みかえられた遺伝子がそのまま体内に残ったりすることはありません。(遺伝子を組み換えるのは特徴のある食品を作るためであって、)その栄養素などは遺伝子組換えをしてもしてなくても全く同じで、健康には影響を及ぼしません。

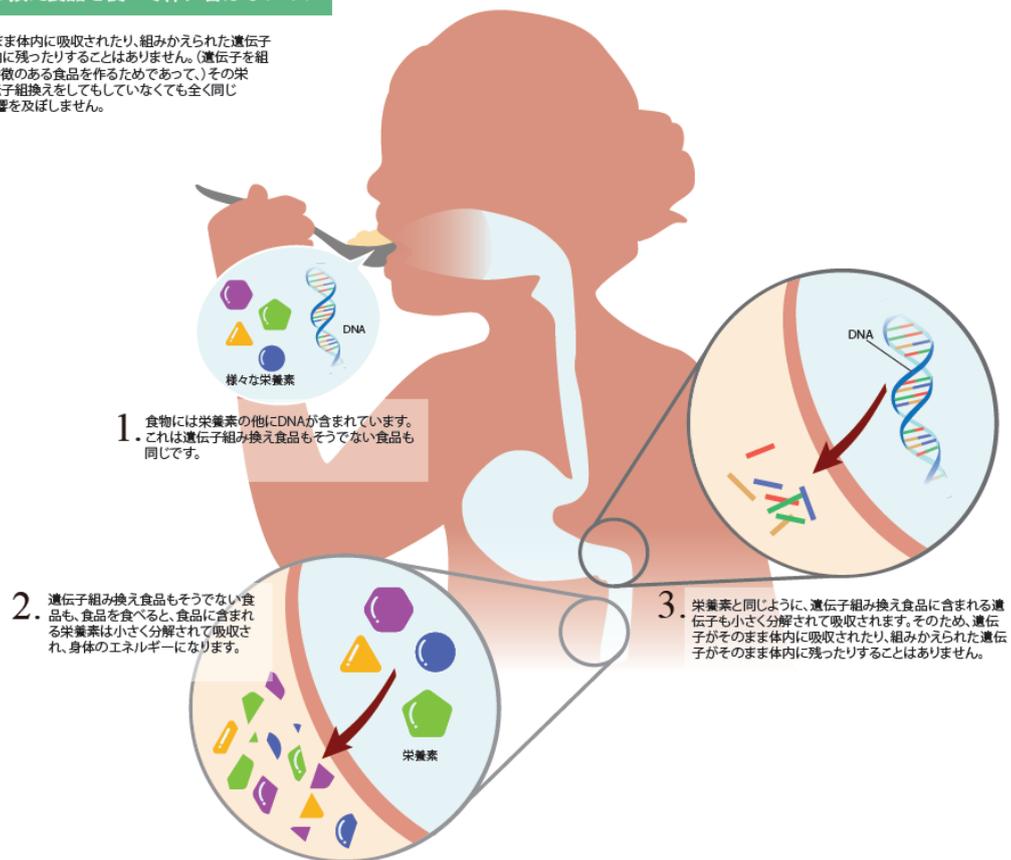


図 35 GM 食品の消化メカニズム説明資料

## ii. アンケート調査

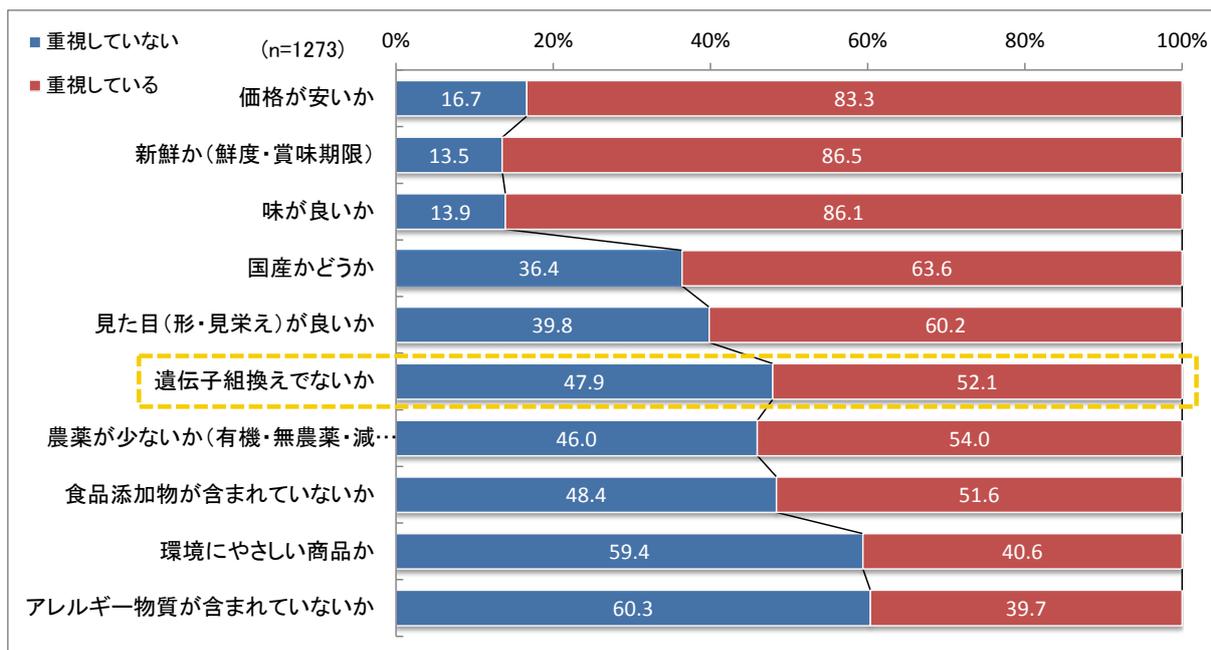


図 36 あなたは普段食品を購入する際、以下の点を重視していますか

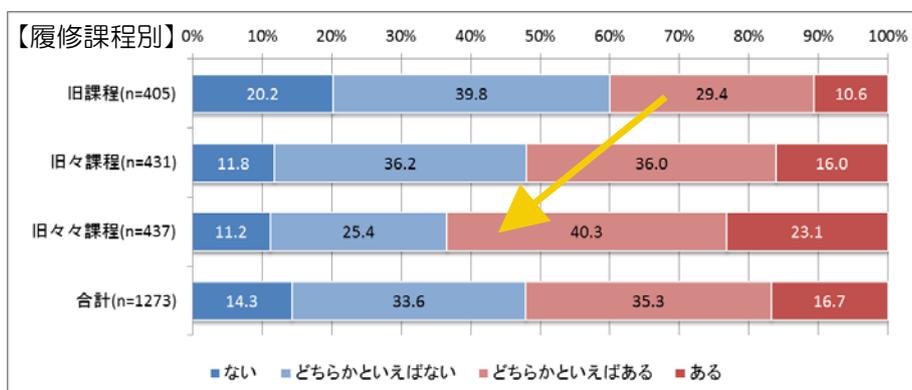
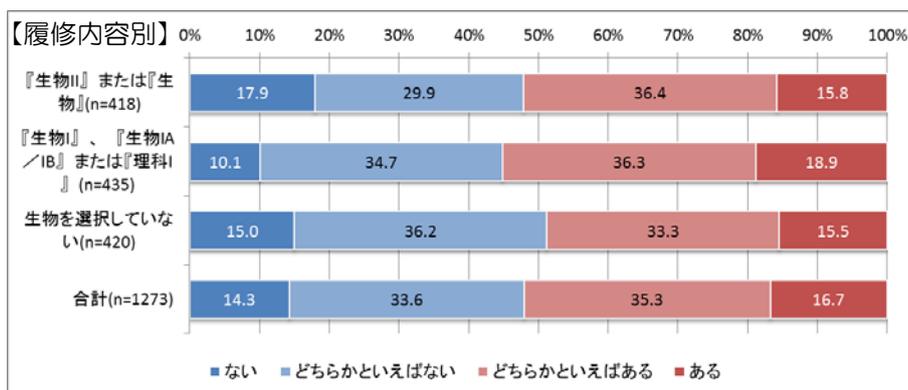


図 37 遺伝子組換え作物・食品を国内で生産することにはあなたは抵抗がありますか

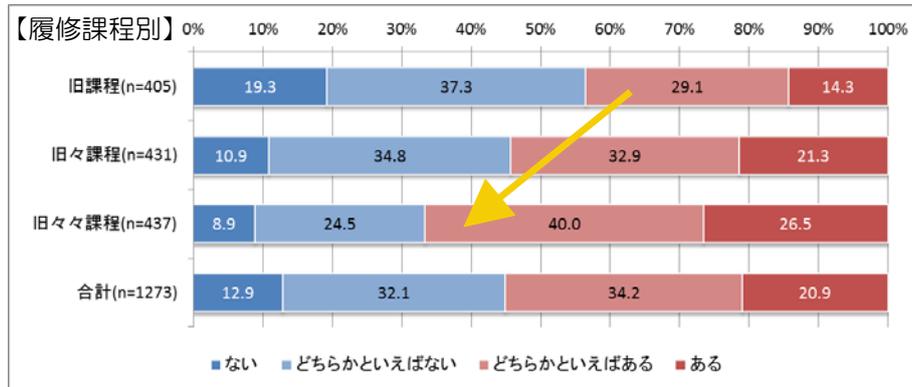


図 38 遺伝子組換え食品に抵抗がありますか

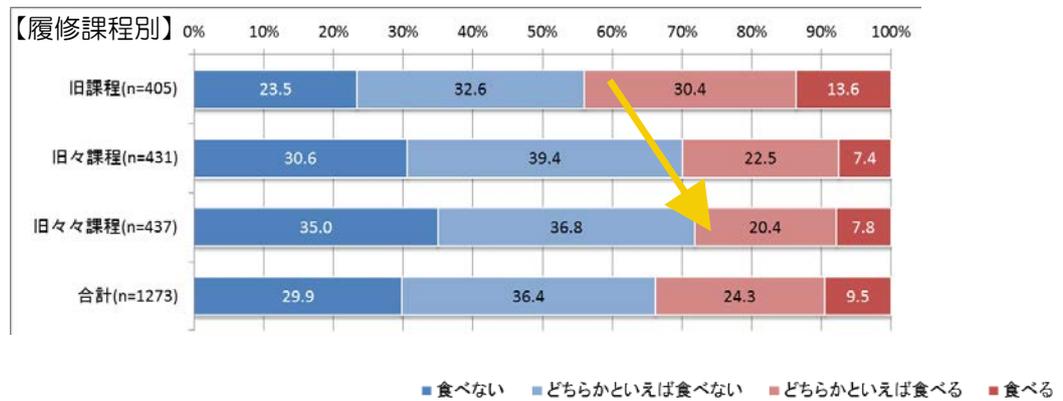
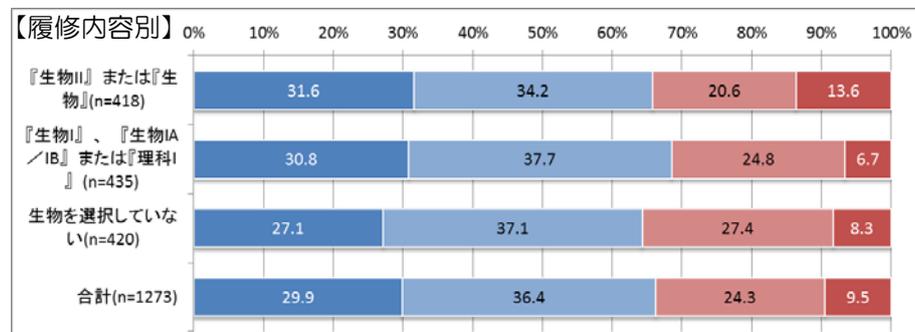


図 39 遺伝子組換えの野菜を食べますか

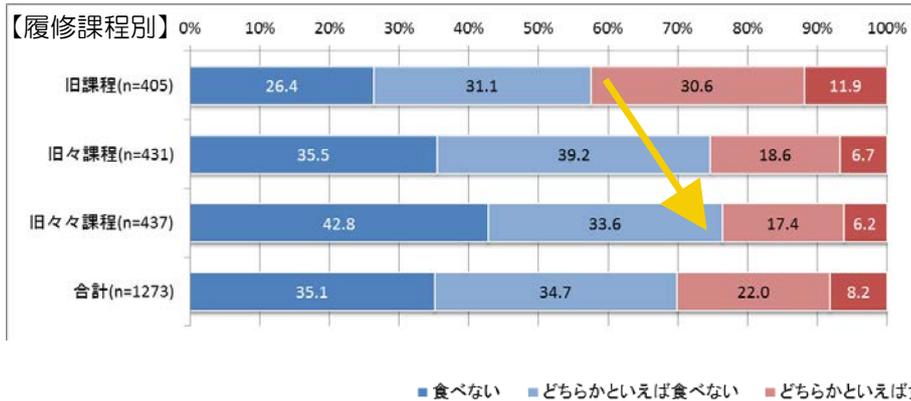
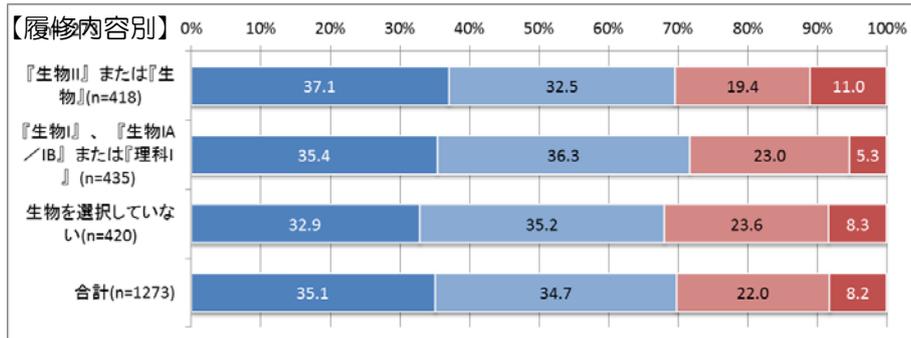


図 40 遺伝子組換えの肉を食べますか

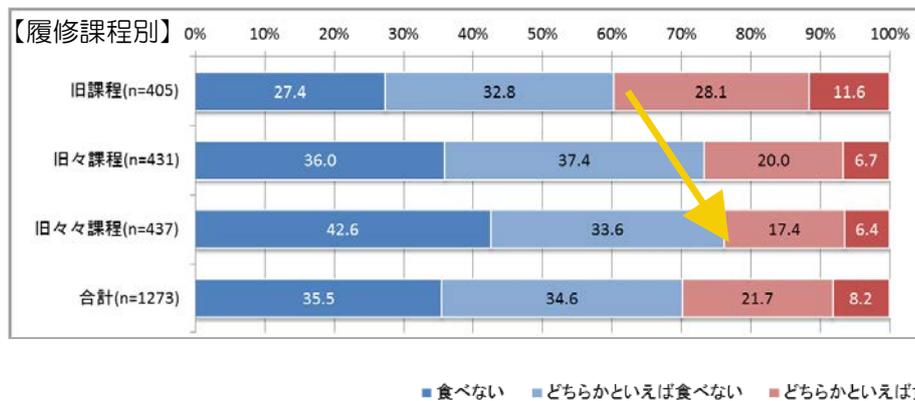
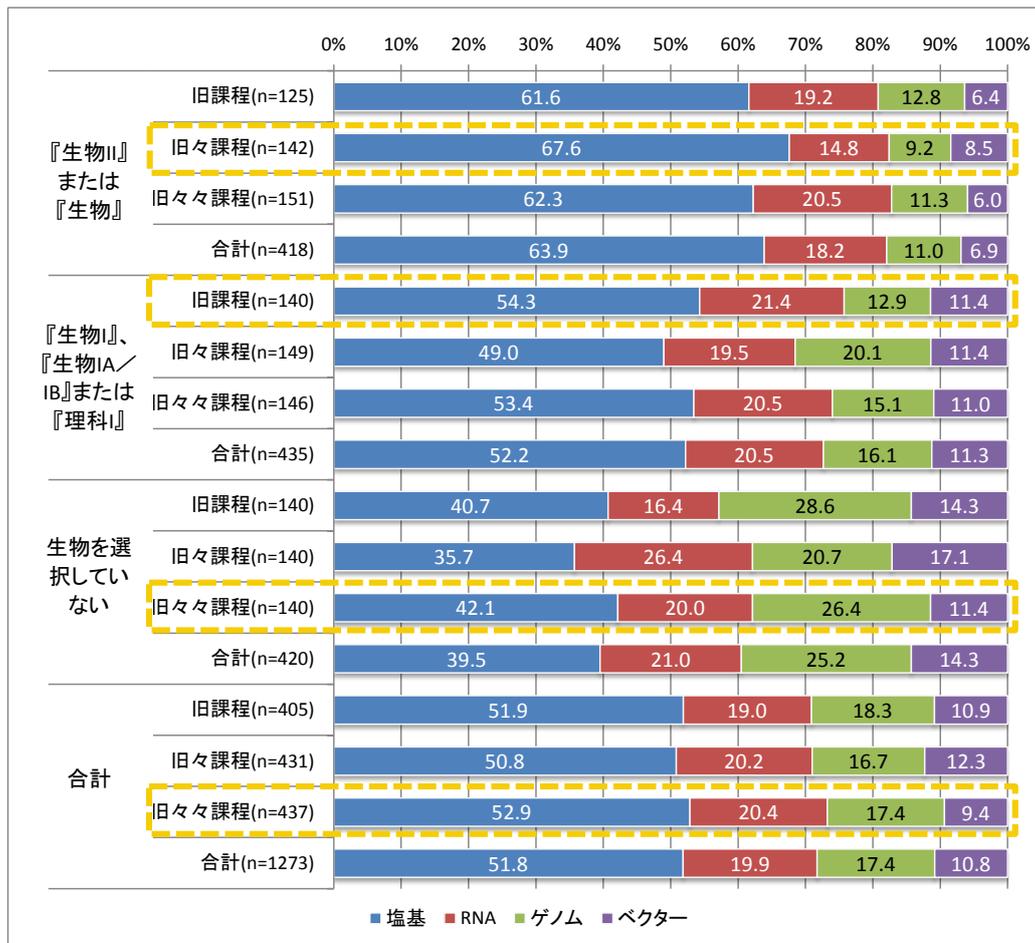


図 41 遺伝子組換えの魚を食べますか



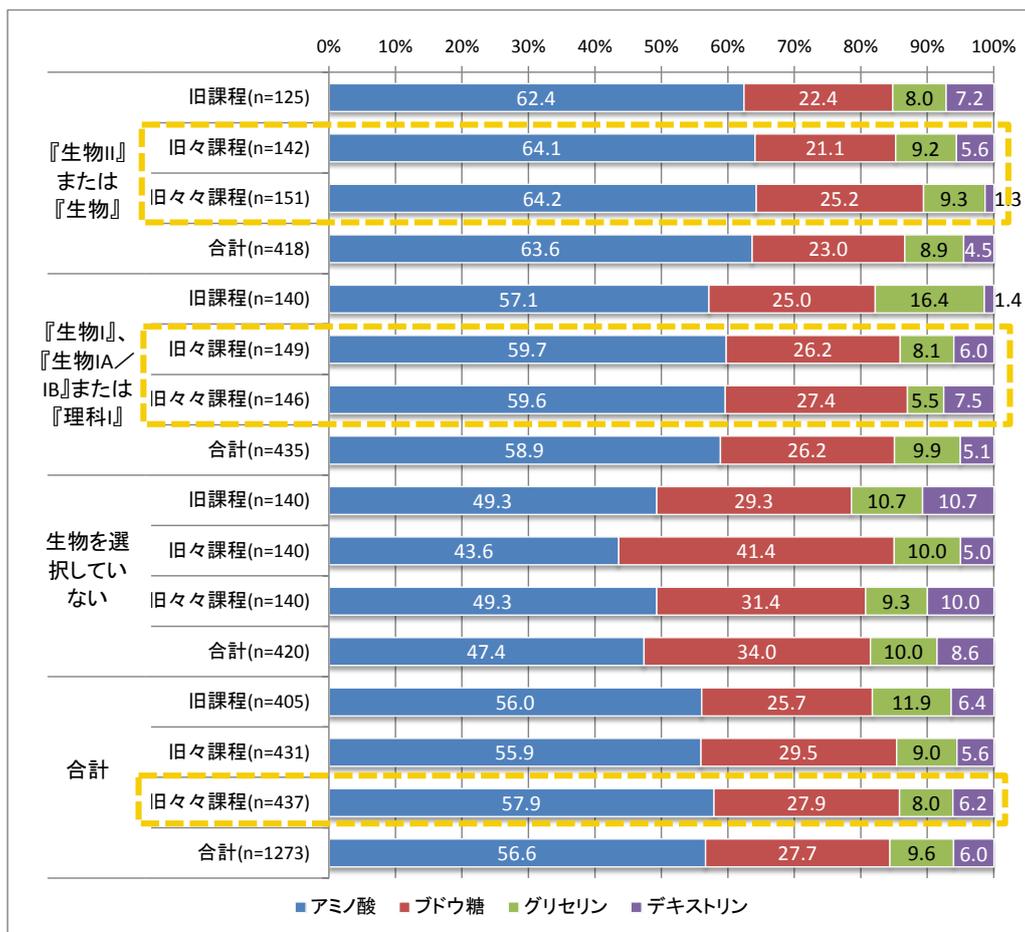
問) DNAは、4種類の(オ)で構成されており、(オ)の並び順によって遺伝子の性質が決まる。

必須 (オ)にあてはまると思うものを以下より選んでください。

- ベクター
  塩基
  RNA
  ゲノム

正解の選択肢

図 42 遺伝子組換えに関する次の文章を読んで、空欄に当てはまる言葉を選択肢の中から選んでください。



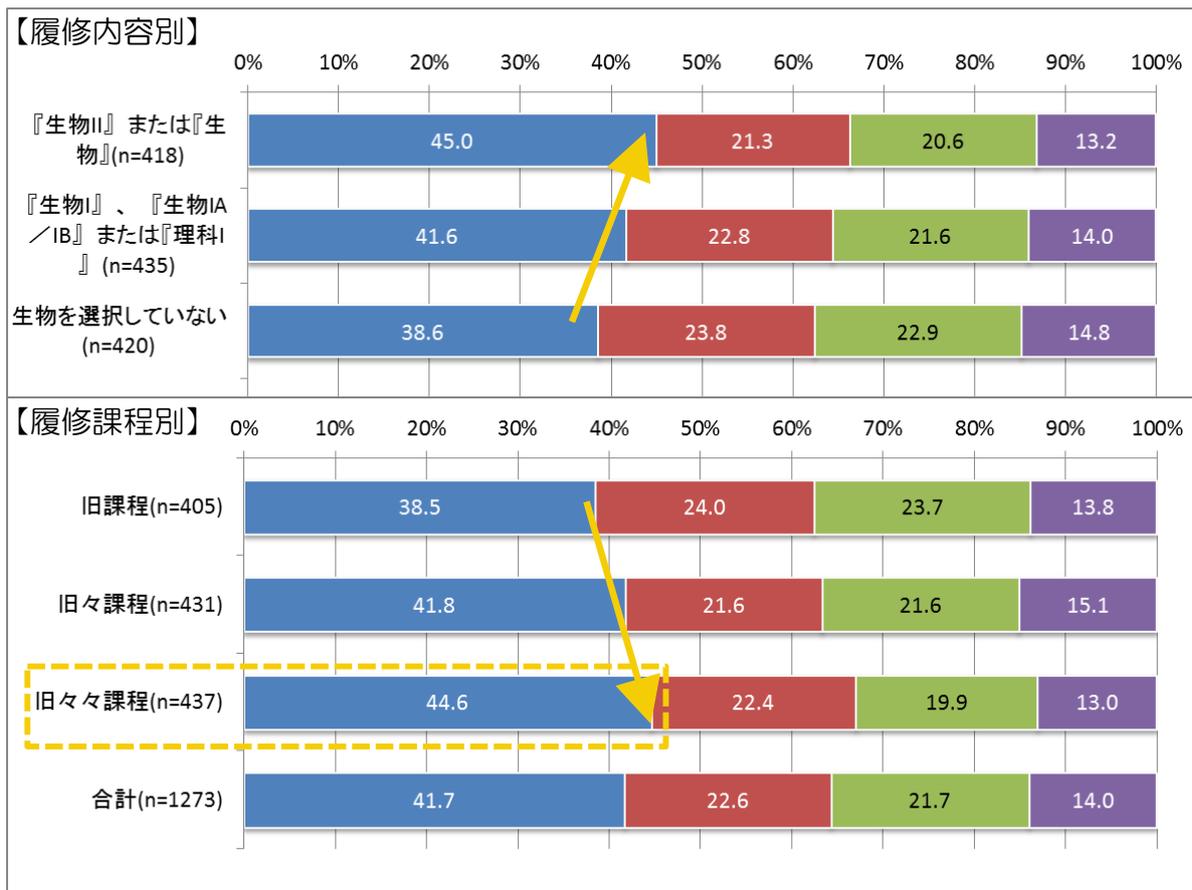
問) タンパク質は消化酵素によって  
(ク) に分解され、吸収される。

**必須** (ク) にあてはまると思うものを以下より選んでください。

ブドウ糖   
 グリセリン   
 デキストリン   
 **アミノ酸**

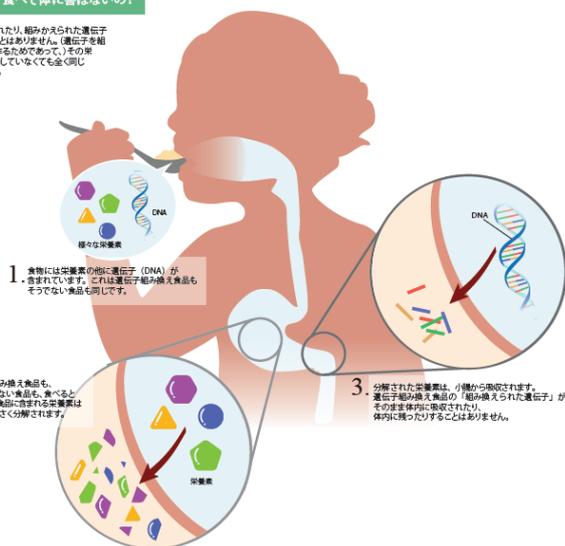
正解の選択肢

図 43 消化吸収に関する次の文章を読んで、  
空欄に当てはまる言葉を選択肢の中から選んでください



**遺伝子組み換え食品を食べて体に害はないの？**

遺伝子がその産生体的に吸収されたら、組み換えられた遺伝子がその産生体内に降りたりすることはありません。(遺伝子を組み換えるのは特定の食品を作るためであって、その産生体からは遺伝子組み換えをしてもらってなくても全く同じで、健康には影響を及ぼしません。)



- 選択肢**
1. 組換えられたDNAはそのまま吸収されてタンパク質等となり、体内に残存し、子どもにも受け継がれる
  2. 組換えられたDNAはそのまま吸収されてタンパク質等となり、体内に残存するが、子どもには受け継がれない
  3. 組換えられたDNAはそのまま吸収されてタンパク質等となるが、時間がたつと体外に排出される
  4. 組換えられたDNAは消化吸収される過程で分解され、タンパク質等となるため、そのままの形で体内に残存しない

**正解の選択肢**

図 44 遺伝子組換え食品を摂取した場合、体内でどのように消化・吸収されると思いますか

### 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)

#### i. GM サーモンに関する米国・カナダの動向

表 6 海外報道記事の分析結果

記事数 2		出所: FDA	
日時	記事(見出し)	単語数(記事別)	
1	NOV. 19, 2015	FDA Has Determined That the AquAdvantage Salmon is as Safe to Eat as Non-GE Salm	453
2	JAN. 29, 2016	Import Alert 99-40	442

記事数 2		出所: Aquabounty	
日時	記事(見出し)	単語数(記事別)	
1	NOV. 19, 2015	FDA Approves AquAdvantage® Salmon	312
2	JAN. 29, 2016	FDA's Import Alert for AquAdvantage® Salmon	316

記事数 1		出所: CNN	
日時	記事(見出し)	単語数(記事別)	
1	NOV. 19, 2015	Genetically engineered 'Frankenfish' salmon wins FDA approval	628

記事数 7		出所: New York Times	
日時	記事(見出し)	単語数(記事別)	
1	NOV. 19, 2015	Genetically Engineered Salmon Approved for Consumption	1275
2	NOV. 19, 2015	Genetically Engineered Salmon Will Not Be Labeled	262
3	NOV. 19, 2015	What's for Dinner? Genetically Engineered Salmon OK'd by FDA	676
4	NOV. 19, 2015	U.S. Clears Genetically Modified Salmon for Human Consumption	768
5	NOV. 19, 2015	GMO Salmon Approval Turns Up Heat in U.S. Labeling Battle	506
6	NOV. 20, 2015	F.D.A. Takes Issue With the Term 'Non-G.M.O.'	1095
7	NOV. 27, 2015	The G.M.O. Debate Turns to Salmon	419

表 7 国内報道記事の分析結果

記事数 19件		日経テレコンより	
日時	記事(見出し)	文字数(記事別)	参考
1	2015年11月29日 (天声人語) 遺伝子組み換えサケ、米市場に	611	朝日新聞 朝刊 1ページ
2	2015年11月24日 遺伝子組み換えサケを承認(フラッシュ)	293	日経産業新聞 8ページ
3	2015年11月24日 遺伝子組み換えサケ認可 米「安全」、成長スピード2倍	436	産経新聞 東京朝刊 8ページ
4	2015年11月24日 遺伝子組み換えサケ認可 米、植物以外の食品では初	436	産経新聞 大阪朝刊 7ページ
5	2015年11月22日 遺伝子組み換えサケ 米で販売へ	279	北海道新聞朝刊全道(社会) 29ページ
6	2015年11月21日 遺伝子組み換えサケの食用承認 米FDA	430	岩手日報朝刊 5ページ
7	2015年11月21日 遺伝子組み換え成長速度2倍 FDA、サケの食用販売承認	657	秋田魁新報 朝刊 24ページ
8	2015年11月21日 世界24時=遺伝子組み換えサケ、米で承認	375	信濃毎日新聞朝刊 7ページ
9	2015年11月21日 遺伝子組み換えサケ 米FDAが食用承認 動物初、倍の速さで成長	296	愛媛新聞 7ページ
10	2015年11月21日 遺伝子操作サケ 食用販売を承認 米FDA 動物で初	296	愛媛新聞 7ページ
11	2015年11月21日 NEWS短信/遺伝子組み換えサケ食用に	207	長崎新聞 6ページ
12	2015年11月20日 遺伝子組み換え食品: FDA、動物で初承認 サケ速く成長	397	毎日新聞 夕刊 14ページ
13	2015年11月20日 遺伝子組み換えサケ 米で認可 動物で初 販売へ	509	東京読売新聞 夕刊 18ページ
14	2015年11月20日 遺伝子組み換えサケ食用に=米FDAが承認	323	共同通信ニュース
15	2015年11月20日 遺伝子操作サケが食卓に=成長速度2倍=米で認可	607	時事通信ニュース
16	2015年11月20日 米・FDA 「遺伝子組み換えサケ」の販売を認可 食用動物で初	614	NHKニュース
17	2015年11月20日 遺伝子操作サケ 食卓に 成長速度2倍 米FDA承認	400	静岡新聞 夕刊 2ページ
18	2015年11月20日 遺伝子組み換えサケ承認 米FDA	322	中日新聞朝刊 5ページ
19	2015年11月20日 遺伝子組み換えサケ 食用承認 米FDA、動物初 成長速度2倍、安全疑問視も	587	西日本新聞夕刊 11ページ

Companies with policies to not sell genetically engineered seafood	
GROCERY STORES	
21 Acres Farm Market	Jewel-Osco
Abundance Co-op Market	Kroger
ACME	Lassen's Natural Food & Vitamins
Albertsons	Life Source Natural Foods
Aldi	Linden Hills Co-Op
Alfalfa's Market	Marlene's Market & Deli
Alternative Food Cooperative	Marsh Supermarket
Amazing Grains Food Co-op	Medford Food Co-op
Amigos	Meijer
Belfast Cooperative	Merc Co-op
Berkshire Co-op Market	Mississippi Market Natural Foods Co-op
Bi-Rite Market	Mustard Seed Market & Café <sup>2</sup>
Boise Consumer Co-op	New Leaf Community Market
Carrs	Oryana Natural Foods Market
Chautauqua Natural Foods	Pavilions
Common Market Co-op	PCC Natural Markets
Community Food Co-op	Rainbow Natural Foods (Georgia)
Coopertunity	Rainbow Natural Grocery Cooperative (California)
Costco	Raley's Family of Fine Foods
Davis Food Co-op	Randall's
Dawson's Market	Rebecca's Natural Foods
Eagle	Red Lobster
East End Food Co-op	Roundy's Supermarkets
Elm City Market	Sacramento Natural Foods Cooperative
Ellwood Thompson's Local Market	Safeway
Food & Thought	Santa Monica Coopportunity
First Alternative Natural Foods Co-op	Shaw's
The Food Co-op	Star Market
Follow Your Heart Natural Foods	Tacoma Food Co-op
Giant Eagle	Target
Good Earth Natural Foods	Three Rivers Market
Good Foods Market & Café	Tom Thumb
Green Bean Delivery	Trader Joe's
Hanover Co-op Food Stores	United
H-E-B <sup>1</sup>	Vashon Thriftway
Hendersonville Community Co-op	Vons
Honest Weight Food Co-op	Wedge Natural Foods Co-op
Hy-Vee	★ Whole Foods <sup>3</sup>
Hungry Hollow Co-op	Whole Foods Co-op
Jimbo's...Naturally	Wise Women Care Associates
<b>TOTAL NUMBER OF STORES: 11,105</b>	
SEAFOOD COMPANIES	
Crown Prince, Inc	Marine Harvest USA
Ducktrap River of Maine	Onesta Organics <sup>4</sup>
EcoFish	Vital Choice Wild Seafood & Organics, Inc. <sup>5</sup>
RESTAURANTS/CHEFS	
Le Bernadine	Sundown at Granada
Restaurant Nora	Eataly
Waterbar Restaurant	Esca

\*Companies listed on this website have stated their policies against the sale of genetically engineered seafood in at least one of the following ways: by signing and returning the **Pledge for GE-Free Seafood**, direct email communication with Friends of the Earth, or through public statements or public corporate policies.

\*Companies with unknown policies are unlisted.

1 Policy expressed to media: <http://www.mysanantonio.com/business/article/H-E-B-other-grocery-chains-agree-not-to-sell-4383183.php>

2 Grocery store & café

★ 3 Whole Foods policy: [www.wholefoodsmarket.com/sites/default/files/media/Global/PDFs/WholeFoodsMarket\\_FarmStandardsFinfishShrimp.pdf](http://www.wholefoodsmarket.com/sites/default/files/media/Global/PDFs/WholeFoodsMarket_FarmStandardsFinfishShrimp.pdf)

Whole Foods has taken a big step further and ended its relationship with Lamasur Aquaculture, which used to supply Whole Foods' rainbow trout and which owns the aquaculture facility where genetically engineered salmon are raised Panama.

4 Pet food company, [www.onestaorganics.com](http://www.onestaorganics.com)

5 Online seafood company

図 45 遺伝子組換え海産物を販売しない旨表明している企業リスト

出所)「GMO Animals」(Friends of the Earth ホームページ)

<http://www.foe.org/projects/food-and-technology/genetic-engineering/gmo-animals>

表 8 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)

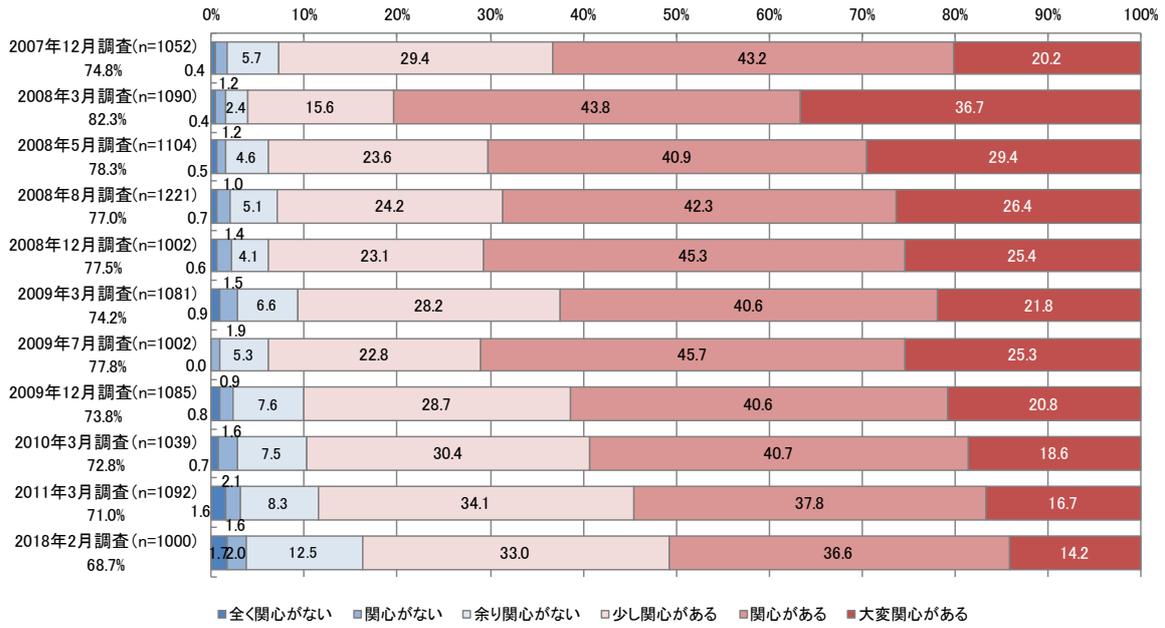


図 46 食品の安全性に関心があるか

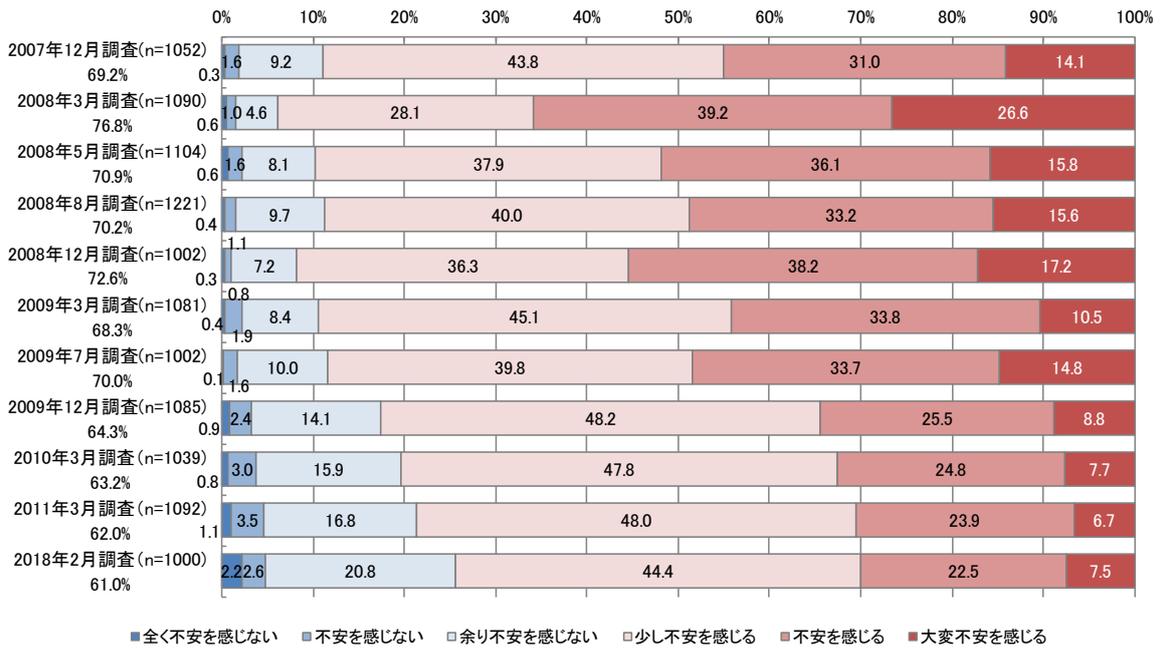


図 47 食品の安全性に不安を感じるか

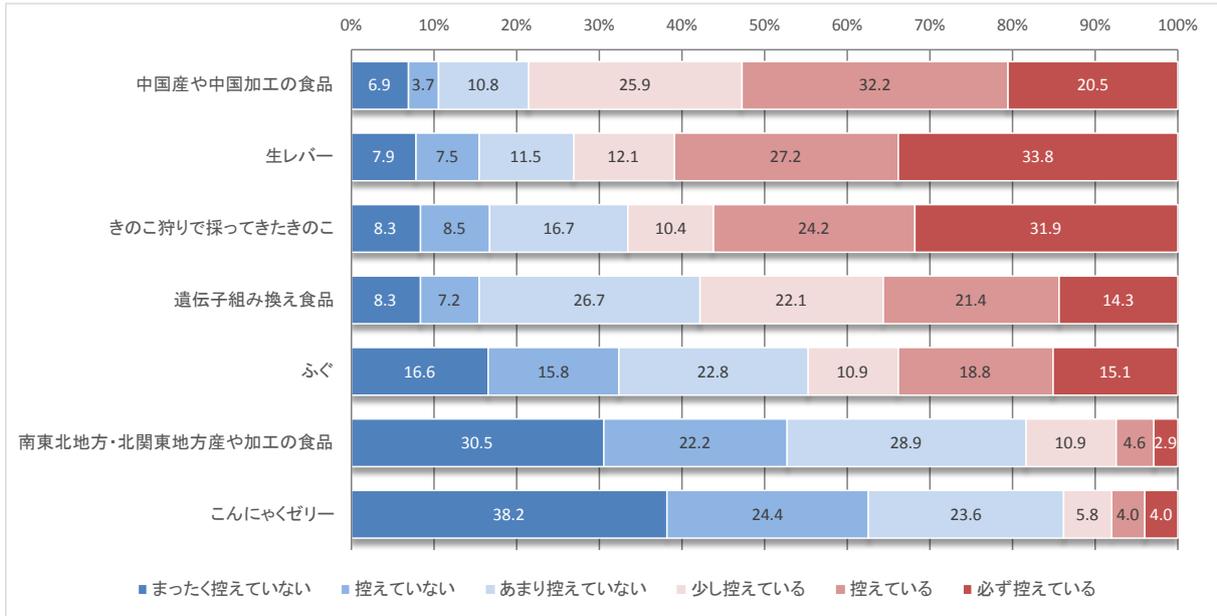


図 48 食品への不安から食べるのを控えている食品

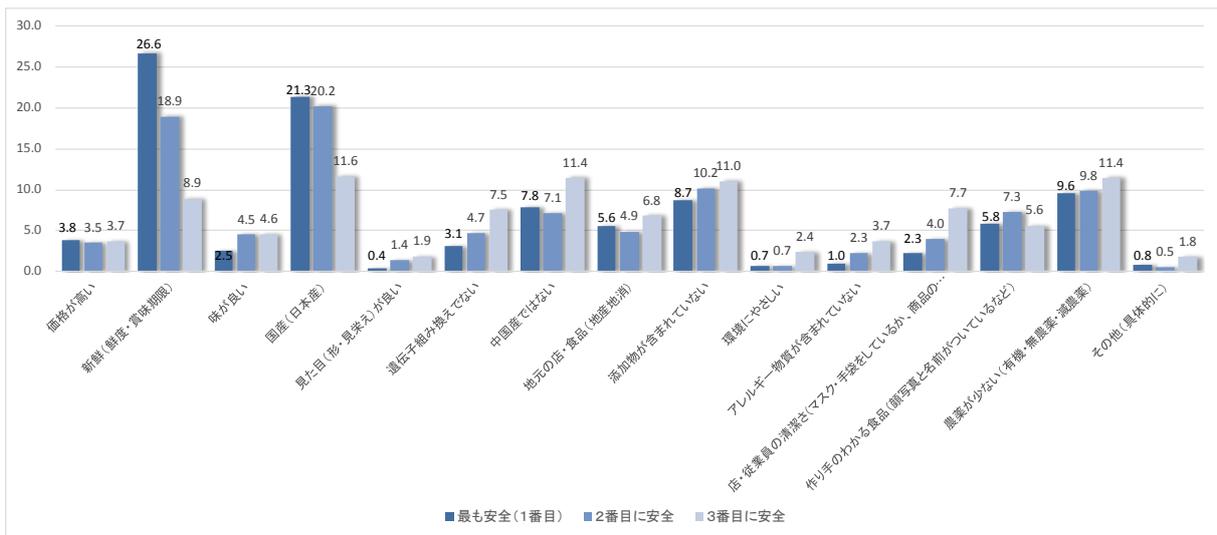


図 49 どのような食品を安全だと思うか(割合)

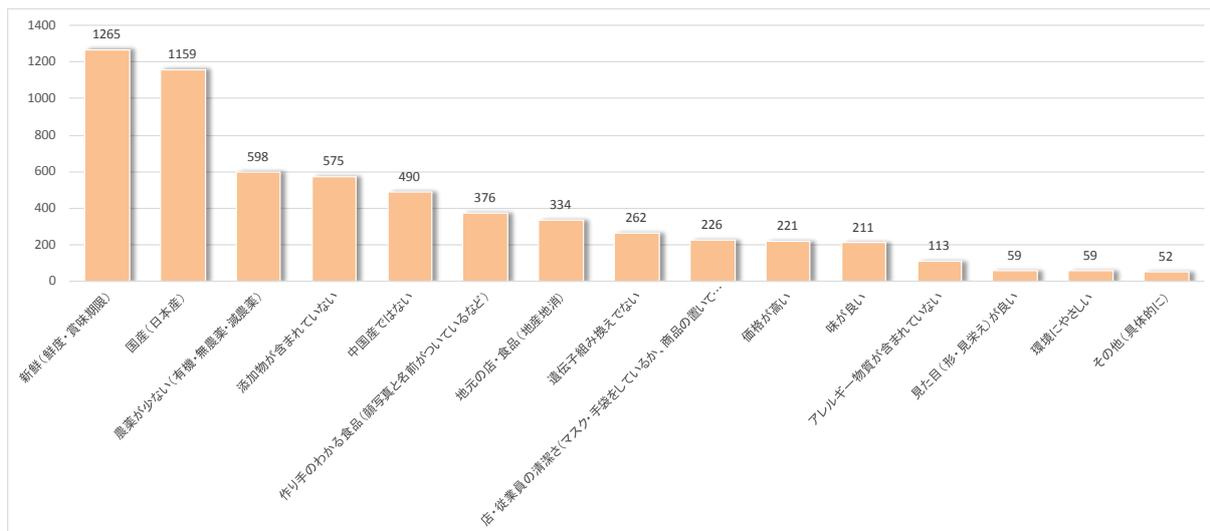


図 50 どのような食品を安全だと思うか (ポイント換算)

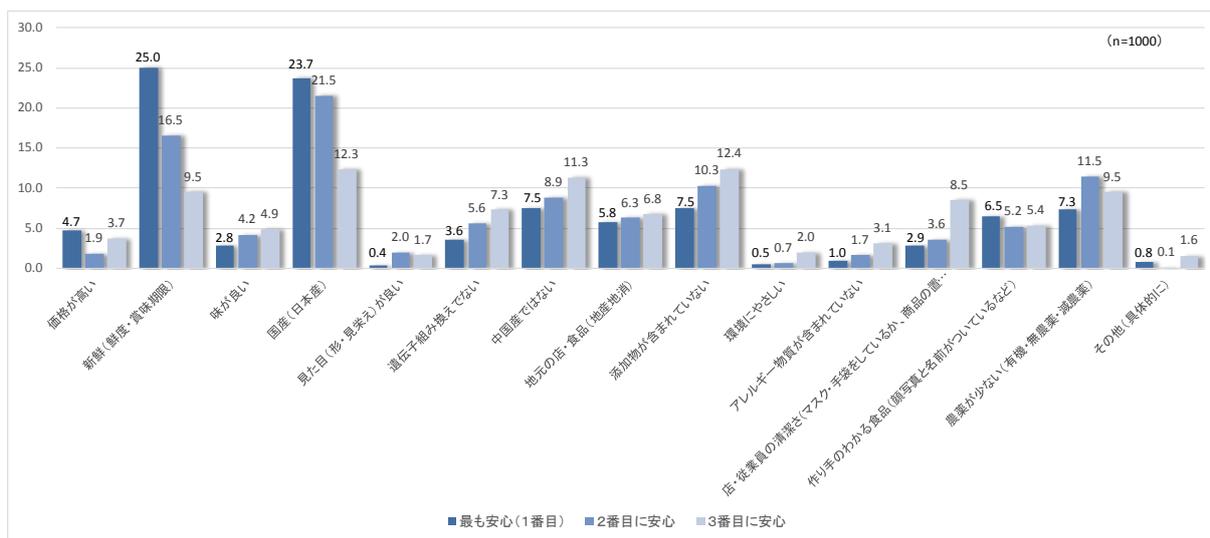


図 51 どのような食品を安心だと思うか (割合)

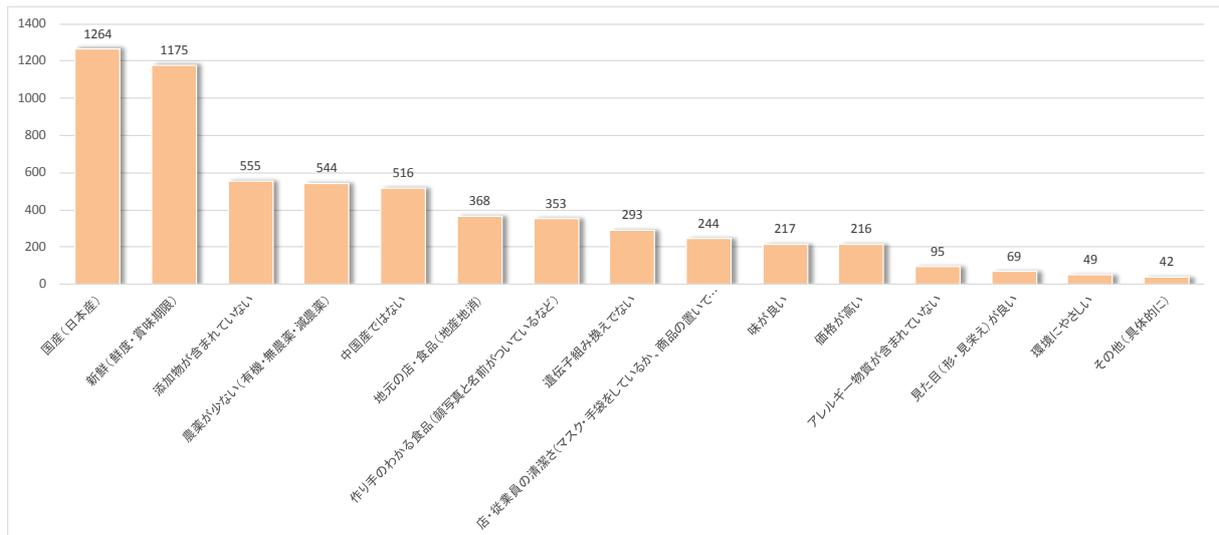


図 52 どのような食品を安心だと思うか (ポイント換算)

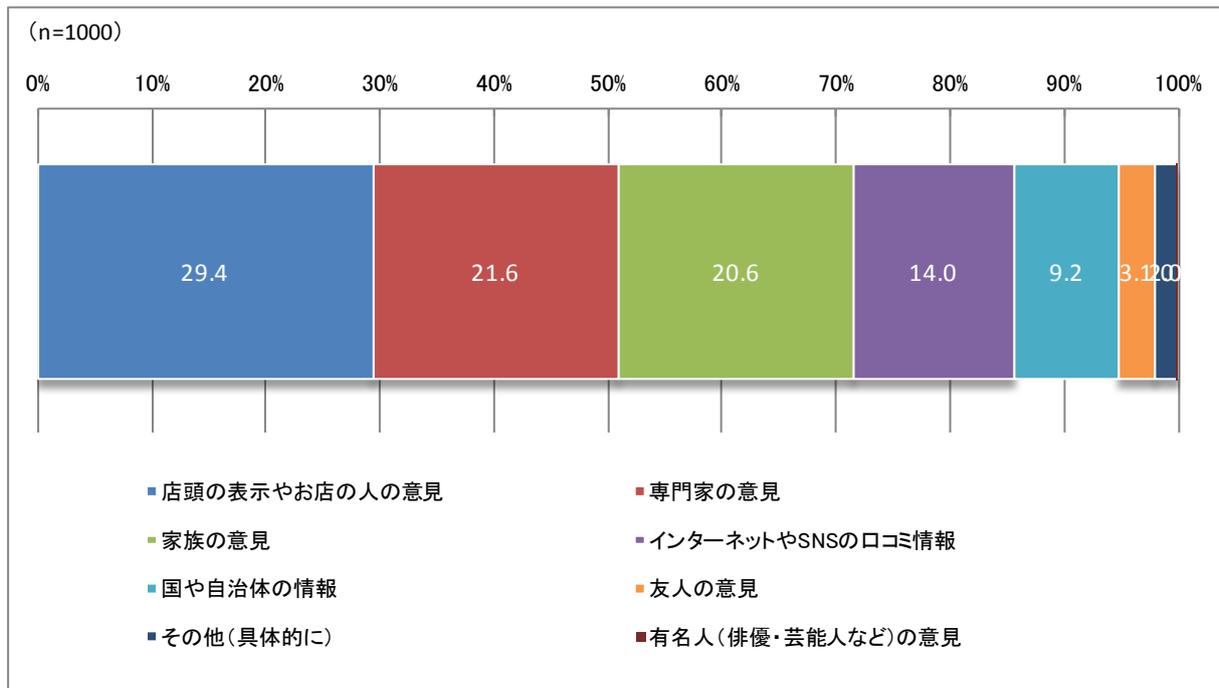


図 53 どのような情報を信頼して食品を選ぶか

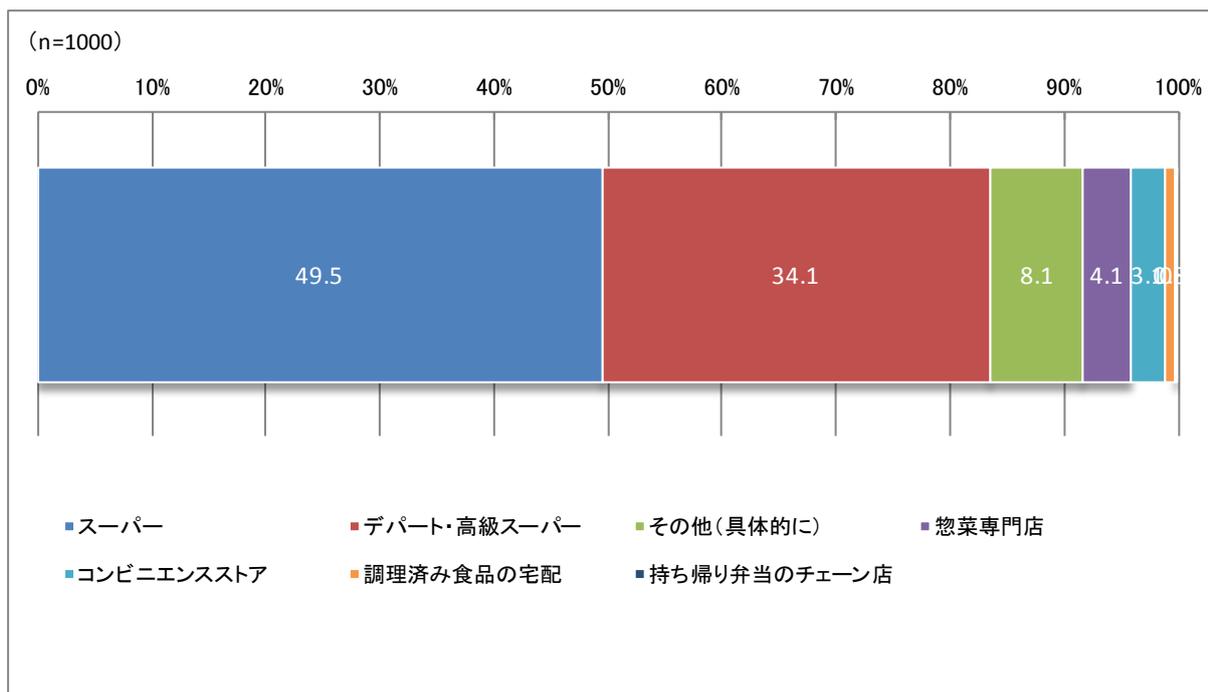


図 54 どのような場所で販売されている食品が安全だと思うか

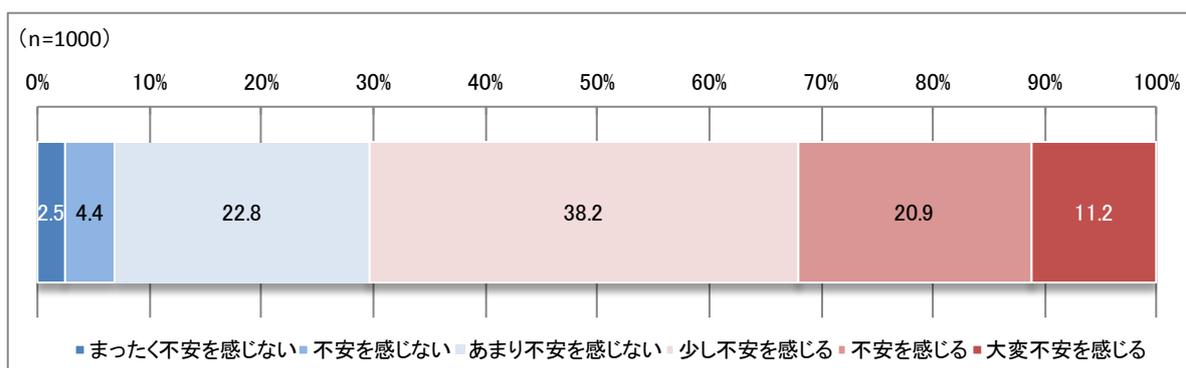


図 55 遺伝子組換え食品に不安を感じるか

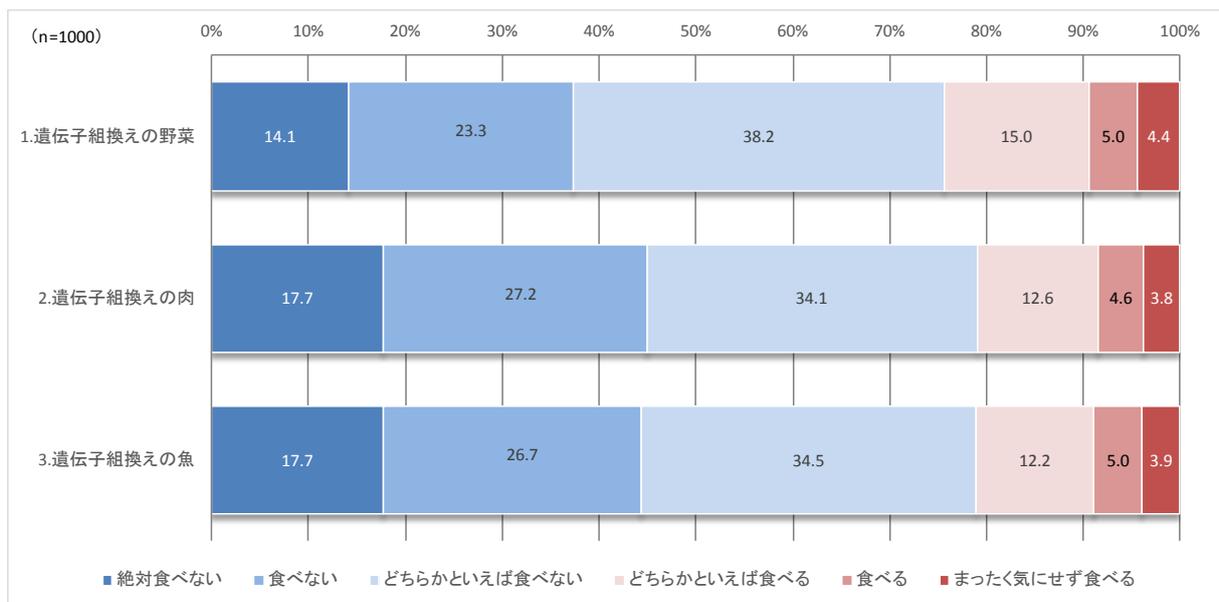


図 56 遺伝子組み換え食品を食べるか

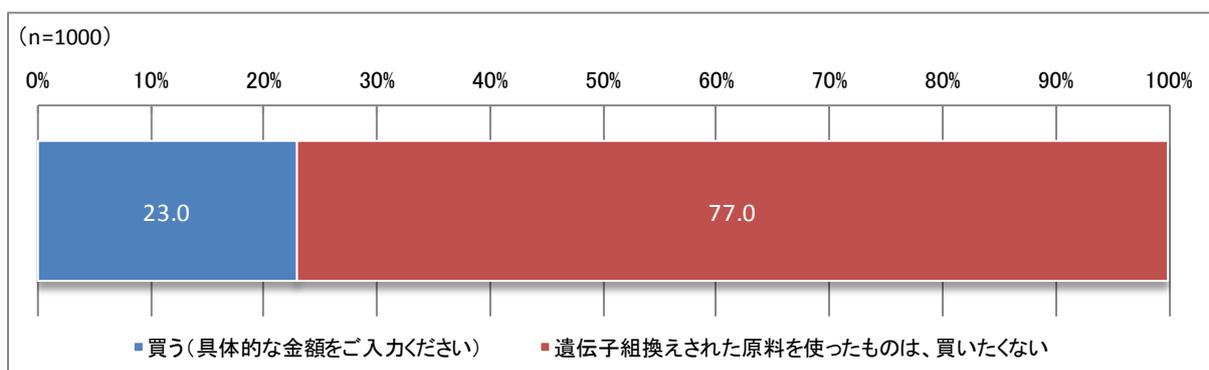


図 57 遺伝子組換え大豆を使った豆腐を買うか (情報提供前)

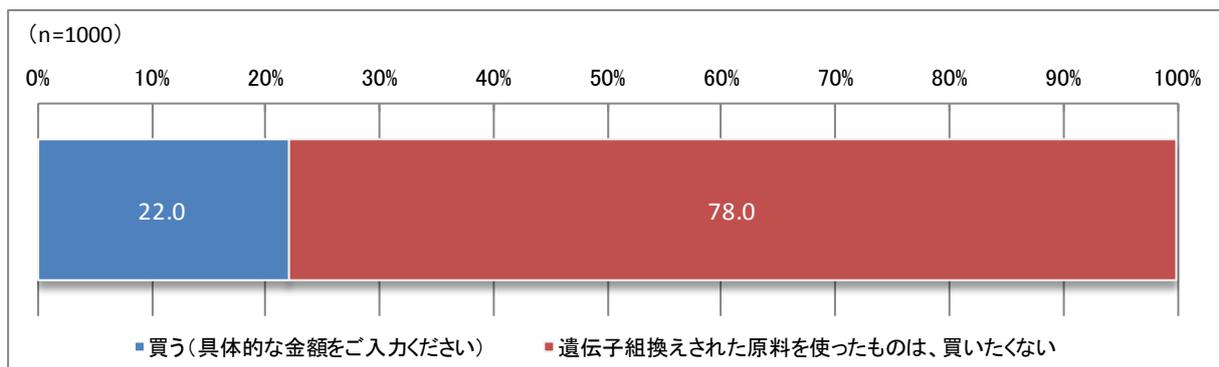


図 58 遺伝子組換えとうもろこしを使ったとうもろこしの缶詰を買うか (情報提供前)

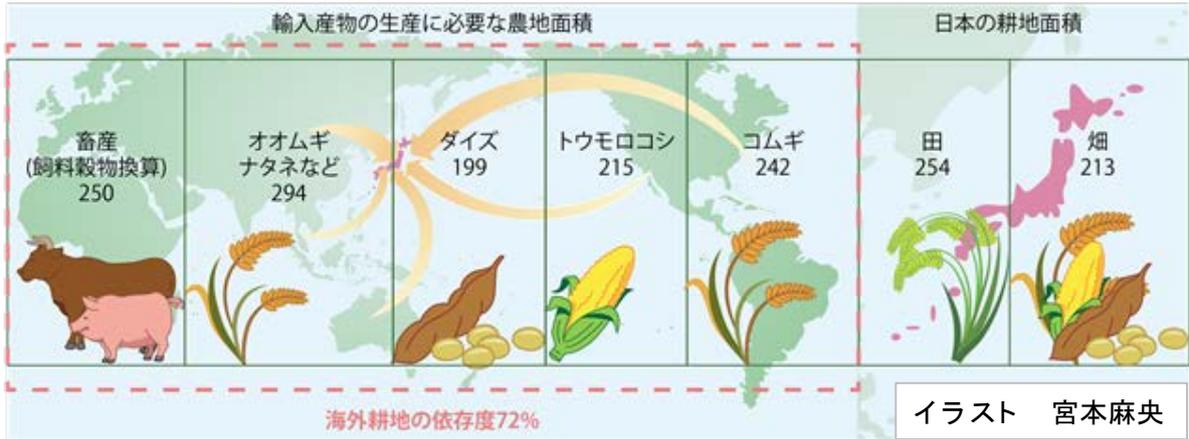


図 59 穀物生産に関する情報提供

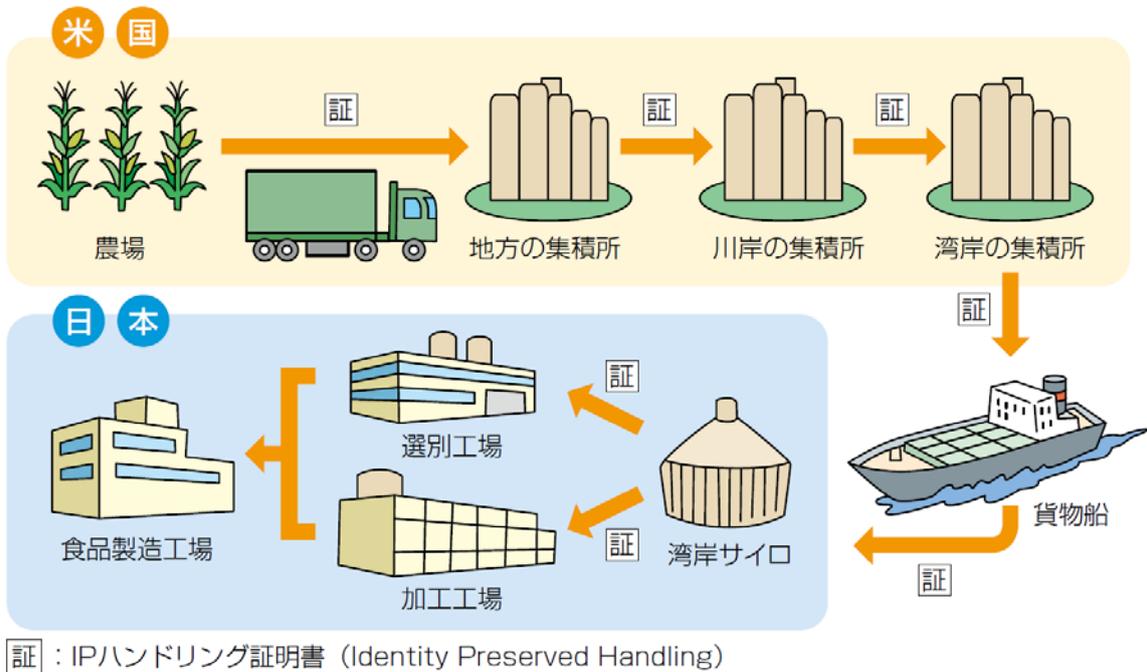


図 60 IP ハンドリングに関する情報提供

(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 9 GM 食品の規制に関する情報提供

<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 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。</li> </ul>
--

・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。

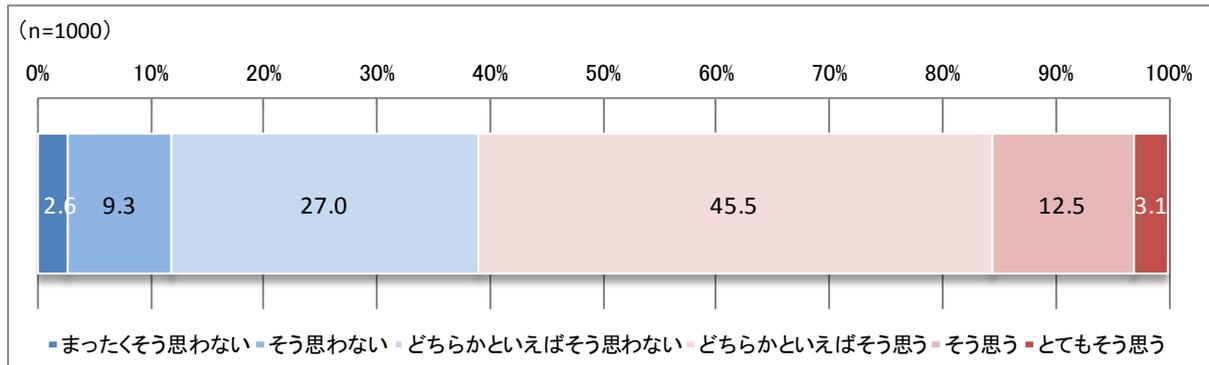


図 61 IP ハンドリングされた農産物は non-GM といっても良いか (情報提供前)

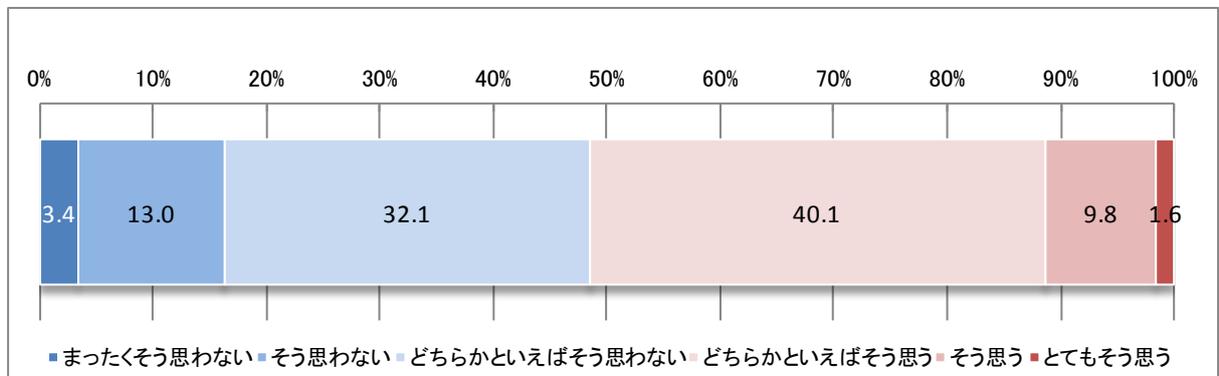


図 62 IP ハンドリングされた農産物は non-GM といっても良いか (情報提供後)

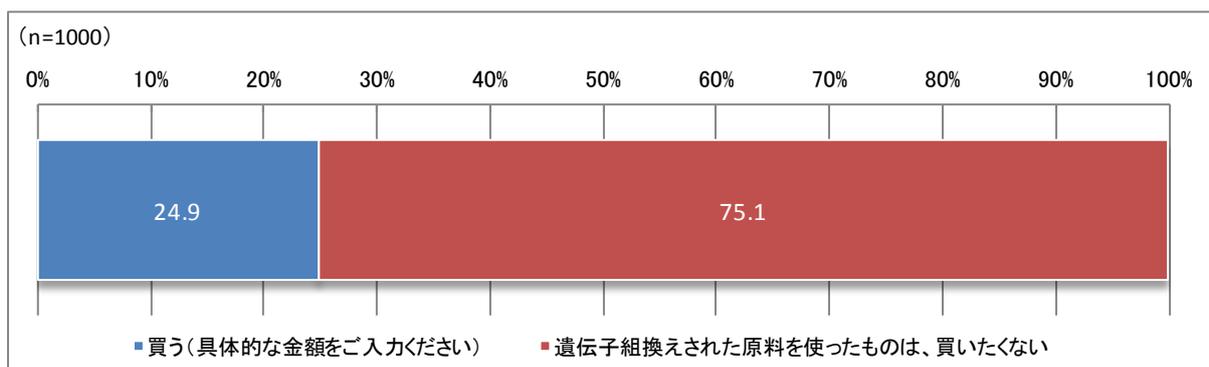


図 63 遺伝子組換え大豆を使った豆腐を買うか (情報提供後)

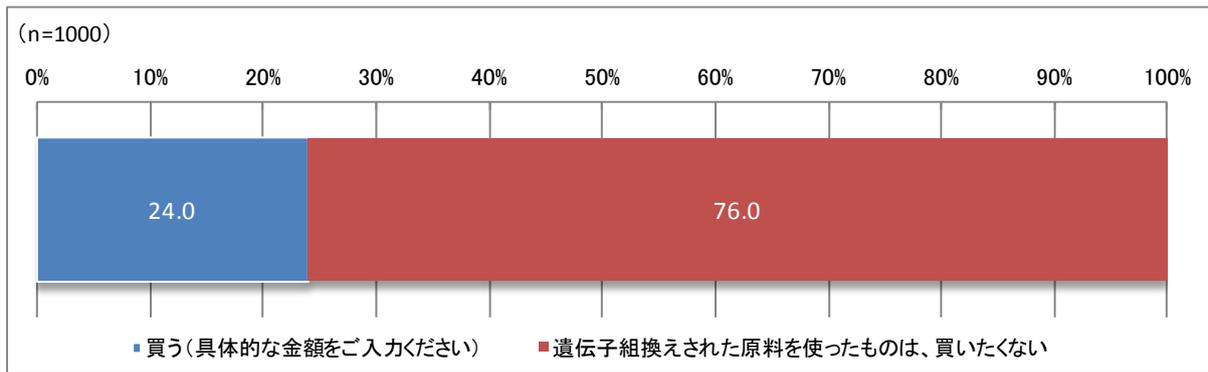


図 64 遺伝子組換えとうもろこしを使ったとうもろこしの缶詰を買うか（情報提供後）

表 10 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 11 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	<b>23 人</b>
買わない	<b>42 人</b>	728 人

McNemar 検定結果：カイ 2 乗値=4.985、p 値=0.026

表 12 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	<b>21 人</b>
買わない	<b>41 人</b>	739 人

McNemar 検定結果：カイ 2 乗値=5.823、p 値=0.016

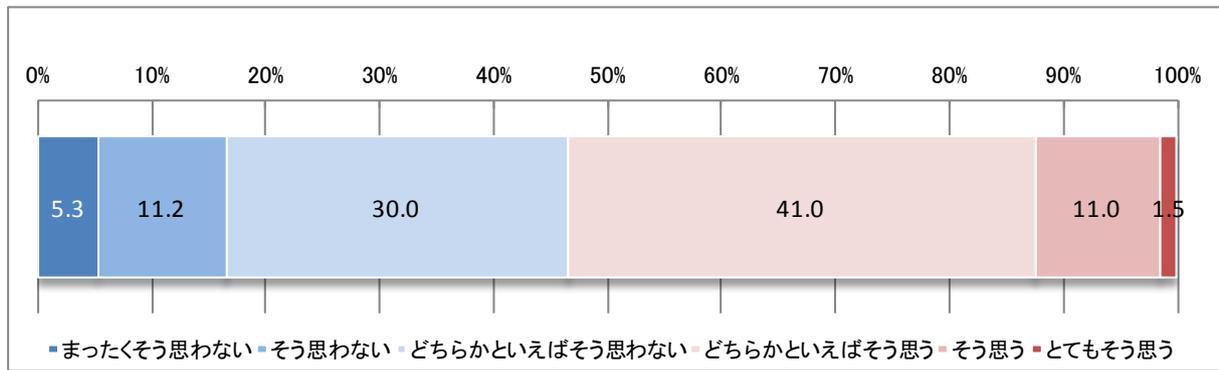


図 65 安全性審査を受けて承認された GM は安全だと思うか

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 27-29 年度）

**未承認遺伝子組換え作物検知法、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規制および安全性に関する情報収集情報収集**

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 中村公亮、野口秋雄、中島 治、坂田こずえ  
（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：未承認遺伝子組換え作物のための検知法としては、EU でよく検出されるコメおよびパパイヤが重要である。国内侵入の可能性のある様々な GM パパイヤ及びコメ系統を網羅的に検出する手法を検討した。その結果、パパイヤでは P35S と T-nos を標的にして承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが混入した食品を検知可能なスクリーニング法を開発した。コメにおいては P35S, TNOS, cry1Ab/Ac を標的とした検査法を開発した。僅かな既知配列から周辺未知配列を解明する手法の検討として LAM (Linear-Amplified Mediated)-PCR 法を、ゲノム情報が公開されている GM パパイヤ 55-1 系統をモデル作物として検討を行った。既知 DNA 配列として、異なる染色体に 2 コピー導入されている *nptII* 部分配列を用いた。*nptII* 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施した結果、2 つの増幅産物が検出され、ゲノム中のコピー数が 2 であることを示すことができた。次に、内在性プロモーターが既知で周辺配列が未知の場合を想定して、*nptII* のような細菌由来外来遺伝子ではなく、ジャガイモ GBSS プロモーターを用いた遺伝子組換えジャガイモをモデルに用いた。ジャガイモの内在性プロモーター-pGBSS の配列をもとにプライマーを設計し、LAM-PCR を実施した結果、予想される断片長の増幅産物が得られた。シーケンス解析の結果、元々ジャガイモゲノム上に存在する配列と一致する配列、組換え導入された PHL 遺伝子の一部と一致する配列および導入された ASN 遺伝子の一部と一致する配列が確認された。以上の結果から、LAM-PCR は内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。

諸外国（特に、米国、EU、オーストラリア・ニュージーランド、カナダ）の GM 生物の規制に関する法律等について整理した。親育種法を用いて作製された生物では、米国においてイントラジェネシスのジャガイモ、ゲノム編集のマッシュルーム、トウモロコシが承認されている。EU では、ゲノム編集を含む親育種法を用いた生物に対する規制上の取り扱いの判断はされていない

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

安全性が未確認の食品が国内に侵入しないように、未承認遺伝子組換え食品をもれなく検出するためのスクリーニング検査について、パパイヤとコメを対象に検討した。

遺伝子組換え体の同定と導入遺伝子の解明を行うために、限定された既知配列から周辺未知配列を明らかにする LAM-PCR 法の検討を行った。

ゲノム編集技術を用いた動物・植物の開発状況の調査、および規制情報、ゲノム編集技術を用いた場合の安全性確認方法のあり方について調査検討した。

## B. 研究方法

分担報告書を参照

## C. 研究結果および考察

### (1) スクリーニング法開発(パパイヤ)

・各種 GM パパイヤ系統をサンプルとしたリアルタイム PCR 反応性についてリアルタイム PCR にて各種 GM パパイヤ系統の増幅曲線の特徴を調べたものを図 1 に示した。パパイヤの内在性遺伝子 Chymopapain 遺伝子 (Chy) を検出するリアルタイム PCR 法 (Chy)、カリフラワーモザイクウイルス由来 35SRNA プロモーターを検出するリアルタイム PCR 法 (P35S)、ノパリンシンテターゼプロモーターを検出するリアルタイム PCR 法 (T-nos)、パパイヤ 55-1 系統遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法 (55-1) を用いて、非 GM (Sunset)、承認済 55-1 系統のホモ型 (SunUp) とヘテロ型 (Rainbow)、未承認のパパイヤの DNA を検体としてリアルタイム PCR を行った。GM パパイヤの標的配列の特徴から新規スクリーニング法を考案した。Chy のみが検出された場合は非 GM パパイヤであり、Chy と 55-1 が検出された場合は承認済 55-1 系統パパイヤとなる。55-1 以外の Chy、P35S、T-nos が検出された場合は未承認 GM パパイヤと判定される可能性が考えられた。

本研究で構築した新規 GM パパイヤスクリーニング法の妥当性の確認を行った。その結果、PRSV-

YK, PRSV-SC, Huanong No.1 はスクリーニング陽性と適切に判定され、また、調査を行ったすべての非パパイヤ加工食品検体において、パパイヤ内在性遺伝子である Chy のみ検出され、試験法の妥当性が確認された。

### (2) LAM-PCR を用いた周辺未知配列の解析

・ LAM-PCR による nptII 周辺配列の増幅

GM パパイヤ 55-1 系統には、nptII 部分配列が異なる染色体に導入されている。そのため、LAM-PCR によって nptII の周辺配列を増幅させた場合、適切な制限酵素を選択すれば 2 つの増幅断片が形成されると考えられる。その結果、HpyCH4IV 反応系の 1st Nested PCR において、予想される 2 本のバンドが検出された。さらに、2nd Nested PCR においても、非特異的なバンドが若干検出されたものの予想される 2 本のバンドが検出された。一方、MseI 反応系の 1st Nested PCR においても、予想される 2 本のバンドが検出された。また、2nd Nested PCR においては、予想される短鎖のバンドは検出された。一方で、non-GM パパイヤから抽出した DNA 溶液に対して LAM-PCR を実施した際には、1st Nested PCR、2nd Nested PCR とともに主要なバンドは検出されなかった。増幅産物をクローニングし、シーケンス解析を行った結果、PCR エラーによる数塩基の変異が観察されたものも存在したが、ゲノム配列とほぼ一致していた。

内在性プロモーターの使用や NBT によって開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では GMO であることを迅速に確認することは極めて困難である。これらの問題を解決する手法の一つである LAM-PCR 法について本研究で GM パパイヤ 55-1 系統を対象に検討を行った。LAM-PCR 法は小さい既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできることが示された。

### (3) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

・ LAM-PCR による内在性プロモーター-pGBSS 下流領域

## 域の増幅

GM ジャガイモ Innate™ event-1 の導入配列中にはジャガイモ内在性プロモーター-pGBSS が 2 コピー存在している。そのため、LAM-PCR によって pGBSS 下流領域を増幅させた場合、元々ジャガイモゲノム中に存在する pGBSS 由来のものを含めて少なくとも 3 つの増幅断片が形成されると予想され、LAM-PCR の結果、非組換えジャガイモから抽出した DNA 溶液を鋳型にした場合に、2nd Nested PCR において、約 300 bp の 1 本のバンドが検出された。一方で、GM ジャガイモ Innate™ event-1 から抽出した DNA 溶液を鋳型にした場合に、2nd Nested PCR において、約 300 bp と約 250 bp の 2 本のバンドが検出された。元々の pGBSS 由来の配列は予想増幅断片長が 297 bp、GM ジャガイモ Innate™ event-1 に導入した pGBSS 由来の配列は予想増幅断片長が 254 bp と 297 bp であり、LAM-PCR の結果はこれに一致した。GM ジャガイモ Innate™ event-1 を対象に LAM-PCR の検討を行った結果、内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。本方法は、スクリーニング検査などで陽性と判定された検体について迅速に GM 品種を特定することが可能になると期待される。

### (4) GMO 規制と開発に関する情報収集

#### NPBT 作物・動物の承認状況

米国では、(1) Dupont Pioneer's waxy gene knockout corn USDA approved on April 2016  
理由：7CFR340 に基づき、PPA (Plant Protection Act) に該当しないため。

(2) PPO knockout Mushroom to prevent browning (Pennsylvania Univ) on April 2016  
理由：7CFR340 に基づき、PPA (Plant Protection Act) に該当しないため、の 2 例があった。

欧州では、承認したものは無い。ゲノム編集（小さな改変）作物の GMO 規制からの除外に前向きな国は、英国、ドイツ、スウェーデン、イタリア、フランス、オランダ。ただし、ドイツは ZKBS、BVL が ODM とゲノム編集による小さな改変を GMO 規制外としたが、EU の現在の枠組みである Directive 2001/18/EC に基づいた NPBT 技術の判断について、多くの技術が GMO の規制の枠内とされるのではないかと考えられる。フランスは、現在欧州司法裁判所にゲノム編集作物の扱いについて判断を求めており、その判断は 2018 年と言われているため、

それまでは EU の正式な判断はない。ゲノム編集での塩基の変異や ODM について、2015 年 EASAC (欧州科学アカデミー) は、技術ではなく形質 (trait) やプロダクトで判断すべきと指摘した。

日本では、ゲノム編集生物は京都大学と近畿大学による筋肉量増強マダイを始め、マグロ、ニワトリトマトなどで研究されている。接ぎ木を利用したジャガイモ（穂木として GM タバコを非 GM ジャガイモ台木に接木して GBSS 遺伝子抑制）は、産生した siRNA は非 GM 体へ移行して機能する（もち性上昇）もので、ゲノム編集イネとともに国内での隔離圃場試験が承認される予定である（すでに開始されている）。

### (5) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

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、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次世代シーケンズ解析し、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が報告された。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。

### (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。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。

DNA 2 本鎖を切断するかどうかで区別する。DNA 2 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 DNA 2 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。

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、接ぎ木を切り離れ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](http://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。ただし、組織トランスクリプトーム解析では付加的な情報が得られる可能性が示唆された。

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。

### (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) ゲノム編集後に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調べた。その結果、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同一性があり、新規ペプチドも同じくその食物アレルゲンと同一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。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。

## D. 結論

### (1) パパイアおよびコメ未承認遺伝子組換え食品スクリーニング法の検討

p35S, tNOS, Cry 遺伝子を標的にして可能な限り網羅的に検出する方法を幾つか検討、検証した。今後、監視対策にスクリーニング法を導入する際に参考にすることができる。

### (2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

LAM-PCR を用いた未知配列の解析は、有用な手法であることが確認できた。多検体処理など網羅性と迅速性のために次世代シーケンサーの活用が有効であると考えられた。

### (3) ゲノム編集生物等の開発状況調査・NBT の規制の考え方検討

植物はゲノム編集の応用が遅れていたが、ここ 2 年程前から急速に報告が増加している。大きな変化は、果樹への応用が始まったことである。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、開発者は注意をほとんど払っていないことが明確になった。

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、懸念される事項を整理しやすく規制を考える上で必要と考えられた。

#### (4) 諸外国での安全性評価に関する調査

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。

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  
総合研究報告書（平成 28～29 年度：分担）

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

本分担研究では、平成 28 年度から 2 年間を通じて、わが国の合法的な遺伝子組換え (GM) 食品の流通を確保するために必要な①GM 食品を検知する技術、並びに、②既存の食品を比較対象にして、GM 食品の成分の相違を分析する技術の高度化を目指した。特に、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科学的知見の取集を行った。平成 28 年度では、GM 食品のゲノム DNA の 1 塩基の変異を検知する方法の開発と性能比較を行った。平成 29 年度では、引き続き新しい GM 食品の検知技術の開発を目的とし、(1) isothermal PCR (LAMP) -DNA クロマト法、並びに、(2) データベース上のリファレンスゲノム配列を使用した内在性遺伝子検知法の開発を行った。また、発芽ダイズ食品と発芽 GM ダイズ食品の成分の相違を分析する (3) トランスクリプトーム解析法の開発を行った。

協力研究者

石垣拓実（国立医薬品食品衛生研究所）  
木俣慎弥（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

平成 28 年度では、遺伝子組換え (GM) 食品のゲノム DNA の 1 塩基の変異を検知する方法の開発と性能比較を行った。除草剤耐性セイヨウアブラナ 5722 系統は、oligonucleotide-directed mutagenesis 法 (ODM 法) (Plant Biotechnol. J., 14, 496-502, 2016) を用いて、セイヨウアブラナ由来アセト乳酸合成酵素遺伝子 (AHASIII) の 1 塩基を変異させ、開発された除草剤耐性セイヨウアブラナである。我が国では、同系統は、安全性未審査である。まず、このような 1 塩基の変異を有する作物を検知する方法の開発と性能比較を行った。平成 29 年度では、引き続き新しい GM 食品の検知技術の開発を目的とし、以下の 3 つのテーマについて検討を行った。

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：世界では、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方法の確認を行った。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

### 平成 28 年度：

#### 1. 試料、試薬および機器

##### (1) 試料

試験には、Cibus 社より提供されたセイヨウアブラナ 3 系統 (Cibus 5715 系統、5720 系統、5722 系統) と野生型品種 (Bn2wt、東北 3 号) を供した。

##### (2) 試薬

DNA の抽出・精製には、QIAGEN 製イオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tip 100/G) を用いた。DNA の抽出・精製時に用いた分解酵素は、(株)ニッポンジーン製  $\alpha$ -amylase (高濃度品) (Cat. No.316-04751)、和光純薬工業(株)製 Proteinase K (Cat. No.160-22752)、QIAGEN 製 100 mg/mL RNaseA (Cat. No.145048133)、シグマアルドリッチジャパン(株)製 Cellulase (Cat. No.C2730) を用いた。また、DNA の抽出・精製時に用いた緩衝液は、QIAGEN 製 Genomic DNA Buffer Set を用いた。イソプロパノールとエタノールは、ナカライテスク(株)製のものをを用いた。試薬は全て analytical grade を使用した。

ゲノム DNA の増幅には、QIAGEN 製 REPLI-g Mini Kit (Cat. No.150025) を用いた。定性 PCR 反応液には、東洋紡製の 2× KOD FX buffer と KOD FX (Cat. No.KFX-201) を用い、タカラバイオ(株)製の dNTP Mixture を使用した。DNA 電気泳動解析に使用したアガロースは、タカラバイオ(株)製 LO3「TAKARA」(Cat. No.5003) を用

い、核酸染色試薬は、Biotium 製の GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Cat. No.41003) を用いた。サンプルの添加液 (Loading Buffer) は、タカラバイオ(株)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(株)製 100 bp ラダー (Cat.No.3407A) と Invitrogen 製 1 kb ラダー (Cat. No.15615-016) を用いた。PCR 産物の精製には、プロメガ製 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9282) を用いた。各アッセイの標的配列増幅のための PCR 反応には、アジレント製の PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase & PCR Master Mix (Cat. No.600670) を用い、タカラバイオ(株)製の dNTP Mixture を用いた。Cell アッセイに使用した核酸分解酵素は、NEB 製の T7 Endonuclease I (Cat. No.M0302S)、及び、10×NEBuffer2.0 を用い、アニーリング反応には、10×ハイブリダイゼーションバッファー (100 mM Tris-HCl (pH8.0)、750 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>)、反応停止試薬として EDTA を用いた。制限酵素アッセイは、NEB 製の *BsrDI* (Cat. No.R0574S)、10×NEBuffer2.0 を用いた。次世代シーケンズ解析は、Illumina Miseq を使用して行った。実験に使用した水は、日本ミリポア(株)製 Mill-Q Synthesis A10 で精製した超純粋を用いた。その他の試薬は、全て市販特級品を用いた。使用したプライマーの塩基配列は、以下のものを使用した。

Cell アッセイ・制限酵素アッセイ用標的プライマー：

Cibus canola AHAS mut nt\_F:

5'-ggacttctgctgcgattgg-3'

Cibus canola AHAS mut nt\_R:

5'-gccaccactgggatcatcg-3'

次世代シーケンサー用 1st PCR プライマー：

1st\_target-F:

5'-acactcttccctacacgacgctctccgatctaaccctgatgcgattgtgt-3'

1st\_target-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctcgcaagctcctgcaact-3'

1st\_control-F: 5'-

acactcttccctacacgacgctcttccgatctcgaagggaaggcaattca-3'

1st\_control-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctaagattctctacacggattgtgg-3'

次世代シーケンサー用 2nd PCR プライマー：  
SET2-F1\_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacactatagcctacactctttc  
cctacacgacgc-3'  
SET2-F2\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacatagaggcacactcttt  
ccctacacgacgc-3'  
SET2-F3\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacaccctatcctacactctttc  
cctacacgacgc-3'  
SET2-F4\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacggctctgaacactctttc  
cctacacgacgc-3'  
SET2-F5\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacagggcgaagacactcttt  
ccctacacgacgc-3'  
SET2-F6\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacactaatcttaacactctttc  
ctacacgacgc-3'  
SET2-F7\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacaccaggacgtacactcttt  
ccctacacgacgc-3'  
SET2-F8\_Primer:  
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacgtactgacacactctttc  
cctacacgacgc-3'  
SET2-R1\_Primer:  
5'-caagcagaagacggcatacagagataatgagcgggtgactggagttc  
agacgtgtg-3'  
SET2-R2\_Primer:  
5'-caagcagaagacggcatacagagatggaatctcgtgactggagttc  
agacgtgtg-3'

### (3) 機器

粉碎機は、Retsch 製ミルサーミル MM200、及び、Iwatani 製 MILLSER ミルサー 720G-Y を用いた。電子天秤は、ザルトリウスメカトロニクス(株)製 BP 210 S を用いた。恒温槽は、タイテック製ドライサーモユニット DTU-1B を用いた。冷却遠心機は、トミー製 Mx-305 を用いた。卓上遠心機は、フナコシ(株)製 KR-1000、05-514-0、KURABO 製 DISKBOY を用いた。96 ウェルプレート遠心機は、Labnet 製 mps 1000 を用いた。タッチミキサーは、大和製 MT-5 と Scientific Industries 製 VORTEX GENIE-2 (G-560) を用いた。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems™ 製 PRISMTM 7900HT を用いた。マグネチックホットスターラーは、三田村理研工業(株)製 MRK を用いた。電気泳動装置は、(株)アドバンス製 Mupid II を用いた。ゲルイメージ解析装置は、Raytest 製ケミルミイメーリアナライザーに Diana システムを組み込んだものを用いた。UV ボードは、UVP 製 Benchtop2UV Transilluminator を用いた。分光光度計は、Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop 1000 を用いた。サーマル

サイクラーは、Applied Biosystems™ 製 Applied Biosystems Veriti® 96-Well サーマルサイクラーを用いた。バイオアナライザーは、アジレント製 Agilent2100 バイオアナライザーを用いた。

2. セイヨウアブラナからの DNA の抽出・精製  
試験に供した種子は、Millser (Iwatani 社製) で粉碎した。粉碎した試料 10 g (乾物製品は 2 g) をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量りとり、G2 緩衝液 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にした。粉碎した各試料は、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip 100/G) を用い、付属のプロトコルを改変し以下の通り DNA の抽出・精製を行った。DNA 抽出用試料に、100 mg/mL RNaseA 20 µL、cellulase 500 µL を加え、転倒混合し均質化した後、50°C で 1 時間放置した。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。次いで、その遠沈管を 3,000×g、低温下 (4°C)、20 分間遠心し、得られた上清 (約 25~35 mL) を採取し、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。次いで、100/G を QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し、はじめの溶出液は捨てた。新しい遠沈管に移し、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し、DNA を溶出した。溶出液と等量のイソプロピルアルコールを加え、よく混合し、遠沈管 (1.5 mL もしくは 2.0 mL 容) に移し、10,000×g 以上で、低温下 (4°C) 15 分間遠心した。そして上清を捨てた。この際、上清を極力除去し、沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を除去した。70% エタノール 1 mL を加え、さらに 10,000×g 以上で、低温下 (4°C) 5 分間遠心した。さらに上清を捨て、残った沈殿を十分に乾燥させた後、あらかじめ 50°C に温めておいた滅菌蒸留水 50 µL に溶解し、DNA 試料原液とした。実験に使用せず、残った試料は、ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) にとり、冷凍庫 (-30°C) で保管した。抽出した DNA 原液は、230、260 及び 280 nm の吸光度を測定することで DNA の定量、及び、純度の推定を行った。吸光度の測定は、NanoDrop 社製分光光度計 ND-1000 V3.2 を使用した。吸光度の測定比 260 nm/230 nm から塩類などの夾雑物量を推定し、260 nm/280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。得ら

れた DNA 濃度から、DNA 原液を 10 ng/μL に水で希釈して調製し、DNA 試料液とした。なお、DNA 原液の濃度が 10 ng/μL に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いた。

### 3. DNA のランダム増幅

DNA のランダム増幅には、REPLI-g Mini Kit (Qiagen 社製) を使用した。反応に使用した BufferD1 (変性剤) として 5 サンプルあたり Reconstituted Buffer DLB 9 μL、超純水 32 μL を加えて調製した。続いて BufferN1 (中和剤) として Stop solution 12 μL、超純水 68 μL を加えて調製した。次にマイクロチューブに試料 2.5 μL、BufferD1 2.5 μL を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、卓上遠心機でスピンドウンをした後、室温で 3 分間インキュベートした。続いて、BufferN1 5 μL を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、卓上遠心機でスピンドウンをした。次に、REPLI-g Mini Reaction Buffer 29 μL と REPLI-g Mini DNA Polymerase 1 μL、及び、超純水 10 μL を氷上で混合して master mix を調製した後、全量を中和済みの試料 10 μL へ加えた。これを、サーマルサイクラーを用いて、30°C で 16 時間インキュベートした後、65°C 3 分加熱し、DNA ポリメラーゼを不活化した。最後に試料溶液を超純水で 20 倍希釈し、PCR 用試料とした。

### 4. ナタネ標的配列の合成、及び、シークエンス

#### (1) 反応液の調製

定性 PCR 用反応液は、25 μL/well として以下のとおり調製した。内訳は以下のとおりである。2×KOD FX buffer neo を 12.5 μL と dNTP を 5 μL 加えて混合し、プライマーを 0.2 μL ずつ、KOD FX neo 0.5 μL を加え全量 22.5 μL に調製した。先にウェルに DNA 試料液もしくはランダム PCR 産物試料液 5 μL を底に付けるように添加し、その後、調製液を添加して混合した。

#### (2) 増幅条件

定性 PCR 装置にチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。94°C 2 分間の条件で保持した後、98°C 10 秒間、59°C 30 秒間、68°C 30 秒間を 1 サイクルとして、30 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 5 分間の条件で保持し、4°C 保存した。

#### (3) 電気泳動及び画像解析

定性 PCR 後の解析には、1% (w/v) アガロー

スゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。タカラバイオ(株)製のアガロース 1 g を電子天秤で量りとり、三角フラスコ (500 mL 容) の中に入れ、1×TAE buffer 100 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の出入りができるように穴を 2~3 個開け、電子レンジで加熱しながら溶解させた。このとき吹きこぼれに注意した。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで攪拌した。光に当てて観察し、アガロースが完全に溶けてなくなっていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。次に、GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water を 5 μL を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型に厚さ約 5 mm になるようにゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの先やキムワイプなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で 2 時間ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。PCR 反応液は PCR 反応後、PCR チューブごと軽く遠心し、試料とした。1%アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5 μL、試料 5 μL (10× Loading buffer 0.5 μL ずつ加え混合した) をロードし、電気泳動 (100 V、15~20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメーリアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。

#### (4) シークエンス解析

UV ボードの上にエタノールを吹きかけ、ラップを張り、その上に 1%アガロースゲルを置き、320 nm UV 照射下で DNA を検出した。そして、電気泳動を行った際の DNA バンドをメスで切り出した。このとき、DNA を切断しないように注意した。ゲルからの DNA の精製は、MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を使用した。精製された DNA は、シークエンス用の試料として用いた。

### 5. Cel1 アッセイ、及び、制限酵素アッセイの試料液調整

#### (1) PCR反応液の調製

PCR 用反応液は、50 μL/well として以下のとおり調製した。超純水 33.6 μL に 10×Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 5 μL と dNTP を 5 μL 加えて混合し、プライマーを 0.2 μL ずつ、最後に

PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase を 0.5  $\mu\text{L}$  を加え、全量 45.0  $\mu\text{L}$  となるようにした。先にウェルにランダム PCR 産物 5  $\mu\text{L}$  を底に付けるように添加し、その後、調製液を DNA 試料液と混合させながら添加した。

### (2) 増幅条件

サーマルサイクラーにチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。94°C 2分間の条件で保持した後、94°C 30秒間、57°C 30秒間、72°C 30秒間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 5分間の条件で保持し、4°C 保存した。

### (3) 電気泳動及び画像解析

定性 PCR 後の解析には、1% (w/v) アガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。タカラバイオ(株)製のアガロースを 1 g 電子天秤で量りとり、三角フラスコ (500 mL 容) の中に入れ、1×TAE buffer 100 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の入りができるように穴を 2~3 個開け、電子レンジで加熱しながら溶解させた。このとき吹きこぼれに注意した。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで攪拌した。光に当てて観察し、アガロースが完全に溶けてなくなっていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。次に、GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water を 5  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型に厚さ約 5 mm になるようにゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの先やキムワイプなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で 2 時間ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。PCR 反応液は PCR 反応後、PCR チューブごと軽く遠心し試料とした。1%アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5  $\mu\text{L}$ 、試料 5  $\mu\text{L}$  (10× Loading buffer 0.5  $\mu\text{L}$  ずつ加え混合した) を入れ電気泳動 (100 V、15~20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。

### (4) DNA精製

アガロースゲルからの DNA の精製は、

MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を使用した。精製された DNA は、シーケンス用の試料として用いた。精製 DNA の原液は、230 nm、260 nm、及び、280 nm の吸光度を測定することで DNA の定量、及び、純度の推定を行った。吸光度の測定は、NanoDrop 社製分光光度計 ND-1000 V3.2 を使用した。吸光度の測定比 260 nm/230 nm から塩類などの夾雑物量を推定し、260 nm/280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。DNA 原液の濃度が 25 ng/ $\mu\text{L}$  に達しないときは、改め PCR を行い、2 回の PCR を合わせた精製 DNA 原液に対して 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の -20°C で冷却したエタノールを加え DNA をエタノール沈殿させ、13,000×g、4°C で 20 分間遠心し、上清を廃棄した後、-20°C で冷却した 70% (v/v) エタノール 1 mL を加え、さらに 13,000×g、4°C で 10 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿物を乾燥させた。水 55  $\mu\text{L}$  で沈殿物を溶解させ Cell アッセイ用の標的配列 cDNA 試料液とした。

## 6. Cell アッセイ

### (1) 試料調整

変異非導入ナタネ (東北 3 号) の試料液に対して、変異導入ナタネ 3 系統 (Cibus 5715 系統、5720 系統、5722 系統) より任意の 1 系統の標的配列 cDNA 試料液を、以下に示す比率となるよう混合し、合計 200 ng の混合液を、PCR チューブに調製した。混合比率は、溶液に占める変異導入ナタネ濃度 50%、10%、1%、0.1%、0.01% の 5 段階をそれぞれ調製し、またネガティブコントロールとして変異導入ナタネ 100% および 0% の溶液も用意した。これら DNA 混合溶液の入った PCR チューブに、ハイブリダイゼーションバッファー (10×) 1.7  $\mu\text{L}$  を加え、さらに超純水を合計液量が 17  $\mu\text{L}$  に達する分量だけ加えて混合した。

### (2) アニーリング条件

サーマルサイクラーにチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。95°C 5分間の条件で試料を変性させた後、95~85°C を -2°C 秒、85~25°C を -0.1°C 秒の条件でアニーリングを行い、4°C 保存した。

### (3) 酵素反応

アニーリング済み試料 17  $\mu\text{L}$  に T7 Endonuclease I 1  $\mu\text{L}$ 、10×NEBuffer 2.0 2  $\mu\text{L}$  を加

えて混合する。T7 EndonucleaseI は必要量以上に吸い上げないように注意しながらピペット操作を行った。その後、サーマルサイクラーを用いて 37°C 15分の条件でインキュベートを行った。反応終了後、0.25 M EDTA を加えて混合し、酵素反応を停止させた。

#### (4) 電気泳動及び画像解析

Cell アッセイの解析には、1% (w/v) アガロースゲルによるアガロースゲル電気泳動を用いた。タカラバイオ(株)製のアガロースを 1 g 電子天秤で量りとり、三角フラスコ (500 mL 容) の中に入れ、1×TAE buffer 200 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の出入りができるように穴を 2~3 個開け、電子レンジで加熱しながら溶解させた。このとき吹きこぼれに注意した。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで攪拌した。光に当てて観察し、アガロースが完全に溶けてなくなっていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。次に、GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water を 10 µL を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型に厚さ約 5 mm になるようにゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの先やキムワイプなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で 2 時間ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。1%アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5 µL、試料 5 µL (10× Loading buffer 0.5 µL ずつ加え混合した) を入れ電気泳動 (100 V、15~20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。バンドのパターンから、変異導入ナタネの検出限界濃度を推定した。

#### (5) バイオアナライザーによる解析

解析にはシリーズ II DNA1000 キット (Agilent Technologies 社) を用い、付属プロトコルに従って実験を行った。

### 7. 制限酵素アッセイ

#### (1) 反応液の調製

野生型ナタネ (東北 3 号) の試料液に対して、変異導入ナタネ 3 系統 (Cibus 5715 系統、5720

系統、5722 系統) より任意の 1 系統の標的配列 cDNA 試料液を、以下に示す比率となるよう混合し、合計 200 ng の混合液を、PCR チューブに調製した。混合比率は、溶液に占める変異導入ナタネ濃度 50%、10%、1%、0.1%、0.01% の 5 段階をそれぞれ調製し、またネガティブコントロールとして変異導入ナタネ 100%および 0% の溶液も用意した。これら DNA 混合溶液の入った PCR チューブに、*BsrDI* 1 µL、10×NEBuffer2.0 5 µL を加え、全量 50 µL となるよう超純水を加えて混合した。

#### (2) 反応条件

サーマルサイクラーにチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。65°C 2時間の条件で酵素反応させた後、80°C 20 分間の条件で酵素を不活性化し、4°C で保存した。

#### (3) 電気泳動、及び、画像解析

Cell アッセイの解析には、1% (w/v) アガロースゲルによるアガロースゲル電気泳動を用いた。タカラバイオ(株)製のアガロースを 1 g 電子天秤で量りとり、三角フラスコ (500 mL 容) の中に入れ、1×TAE buffer 200 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の出入りができるように穴を 2~3 個開け、電子レンジで加熱しながら溶解させた。このとき吹きこぼれに注意した。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで攪拌した。光に当てて観察し、アガロースが完全に溶けてなくなっていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, (10,000×) in water を 10 µL を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型に厚さ約 5 mm になるようにゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの先やキムワイプなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で 2 時間ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。1%アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5 µL、試料 5 µL (10× Loading buffer 0.5 µL ずつ加え混合した) を入れ電気泳動 (100 V、15~20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて

行った。バンドのパターンから、変異導入ナタネの検出限界濃度を求めた。

#### (4) バイオアナライザーによる解析

解析にはシリーズ II DNA1000 キットを用い、付属プロトコルに従って実験を行った。

### 8. 次世代シーケンス解析

#### (1) 1<sup>st</sup> PCR反応液の調製

PCR 用反応液は、50  $\mu\text{L}/\text{well}$  として以下のとおり調製した。超純水 33.6  $\mu\text{L}$  に 10 $\times$ Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 5  $\mu\text{L}$  と dNTP を 5  $\mu\text{L}$  加えて混合し、プライマーを 0.2  $\mu\text{L}$  ずつ、最後に PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase を 0.5  $\mu\text{L}$  を加え、全量 45.0  $\mu\text{L}$  に調製した。先にウェルにランダム PCR 産物 5  $\mu\text{L}$  を底に付けるように添加し、その後、調製液を DNA 試料液と混合させながら添加した。

#### (2) 増幅条件

サーマルサイクラーにチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。94 $^{\circ}\text{C}$  2分間の条件で保持した後、94 $^{\circ}\text{C}$  30秒間、55 $^{\circ}\text{C}$  30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$  30秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った後、72 $^{\circ}\text{C}$  5分間の条件で保持し、4 $^{\circ}\text{C}$  保存した。

#### (3) 電気泳動、及び、画像解析

定性 PCR 後の解析には、1% (w/v) アガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。タカラバイオ㈱製のアガロースを 1 g 電子天秤で量りとり、三角フラスコ (500 mL 容) の中に入れ、1 $\times$ TAE buffer 100 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の出入りができるように穴を 2~3 個開け、電子レンジで加熱しながら溶解させた。このとき吹きこぼれに注意した。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで攪拌した。光に当てて観察し、アガロースが完全に溶けてなくなっていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。次に、GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 $\times$  in water を 5  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型に厚さ約 5 mm になるようにゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの先やキムワイブなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で 2 時間ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロー

スゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。PCR 反応液は PCR 反応後、PCR チューブごと軽く遠心し試料とした。1%アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5  $\mu\text{L}$ 、試料 5  $\mu\text{L}$  (10 $\times$  Loading buffer 0.5  $\mu\text{L}$  ずつ加え混合した) を入れ電気泳動 (100 V、15~20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。

#### (4) DNA精製

上述した方法に従い、アガロースゲルからの DNA 精製を行い、精製した DNA の原液は、230 nm、260 nm、及び、280 nm の吸光度を測定することで DNA の定量及び純度の推定を行った。吸光度の測定は、NanoDrop 社製分光光度計 ND-1000 V3.2 を使用した。吸光度の測定比 260 nm/230 nm から塩類などの夾雑物量を推定し、260 nm/280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。得られた DNA 濃度から、DNA 原液を 10 ng/ $\mu\text{L}$  に水で希釈して調製し 2ndPCR 用 DNA 試料液に供した。

#### (5) 2<sup>nd</sup> PCR試料の調製

1 塩基変異導入ナタネ 3 系統より得られた 2 種類の標的配列 cDNA (計 6 種類) について、野生型ナタネ cDNA を用いて希釈し、それぞれ野生型ナタネ由来 cDNA 濃度が 10%、1%、0.01% となるよう調製したものを 2ndPCR 用 DNA 試料液として供した。

#### (6) 2<sup>nd</sup> PCR反応液の調製

PCR 用反応液は 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  として以下のとおり調製した。超純水 33.6  $\mu\text{L}$  に 10 $\times$ Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 5  $\mu\text{L}$  と dNTP を 5  $\mu\text{L}$  加えて混合し、プライマーを 0.2  $\mu\text{L}$  ずつ、最後に PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase を 0.5  $\mu\text{L}$  を加え、全量 45.0  $\mu\text{L}$  に調製した。先に DNA 試料液をウェルに 15  $\mu\text{L}$  を底に付けるように添加し、その後、調製液を DNA 試料液と混合させながら添加した。

#### (7) 増幅条件とシーケンス解析用サンプルの調製

サーマルサイクラーにチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。94 $^{\circ}\text{C}$  2分間の条件で保持した後、94 $^{\circ}\text{C}$  30秒間、59 $^{\circ}\text{C}$  30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$  30秒間を 1 サイクルと

して、40 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 5 分間の条件で保持し、4°C保存した。

上述した方法と同様に、1%アガロースゲル電気泳動後、320 nm UV 照射下で DNA を検出し、DNA バンドをメスで切り出した。このとき、DNA を切断しないように注意した。次いで、ゲルからの DNA の精製を行った。DNA 原液は、230、260、及び、280 nm の吸光度を測定することで DNA の定量及び純度の推定を行った。吸光度の測定は、NanoDrop 社製分光光度計 ND-1000 V3.2 を使用した。吸光度の測定比 260 nm/230 nm から塩類などの夾雑物量を推定し、260 nm/280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。得られた DNA 濃度については、DNA 原液を約 20~50 ng/μL の範囲で濃度が揃うように水で希釈して調製し、Illumina MiSeq を使用してシーケンス解析を行った。

平成 29 年度：

#### 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<sup>1)</sup> 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) をご提供いただいた。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、チューブを氷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'-TGACAAGGCCTGATCTTGC-3'

FIP:

5'-AACACTCCAGGCCTCACCGTGGCCGACCTCATTATTCCG-3'

BIP:

5'-GTTCCGGTCCATCGATGGCTGCAGCCTCTGGAGTGCTA-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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 16 mM MgSO<sub>4</sub>; 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 B3 (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  $\alpha$ -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、タカタバイオ社製 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 $\alpha$  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'-CATCGGAGAGAGCAGCCATTAGAAACAATG AG-3'

Insert ch2-F:

5'-AATGGCTGCTCTCTCCGATGTGGTCGATTT-3'

Insert ch2-R:

5'-ATTCCGCGCGGCAAATTGGAAGCAAAGA -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 µL の 2 x KOD FX PCR buffer (東洋紡)、0.75 µL の 50 µM primer-F、0.75 µL の 50 µM primer-R、5 µL の 2.5 mM dNTP mix、0.5 µL の KOD FX、2.5 µL の 10 ng/µL サイズゲノム DNA と 3 µL 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 µL 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 µL の In-Fusion HD Enzyme Premix (5x) と滅菌水を混合し、合計 10 µL 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 DH5α (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]CCTGCTTGTCATCCATGGGCACA-[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'-CTTCACTGTCGAACCCAGCAA-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]CAGTAGTACAACGTTGGCAGATGTAT GAGAACT[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  $\mu$ M と 10  $\mu$ 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/5  $\mu$ L の 10 倍希釈系列の範囲で検討した。12.5  $\mu$ L Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4  $\mu$ L 各 primer-forward (50  $\mu$ M)、0.4  $\mu$ L 各 primer-reverse (50  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ L probe (10  $\mu$ M)、6.45  $\mu$ L の蒸留水、5  $\mu$ L の各コピー数を含む鋳型 DNA が混合された 25  $\mu$ 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 秒間破砕した。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  $\mu$ L cellulase, 10  $\mu$ L RNase A (100 mg/mL)、5  $\mu$ L  $\alpha$ -amylase (4 units/ $\mu$ 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、数回チューブを上し溶液を混ぜた。その後、100  $\mu$ 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 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。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 xg, 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 xg, 4°C で 10 分間遠心した。上清を破棄した後、数分間 DNA を風乾し 50-100  $\mu$ 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/ $\mu$ 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  $\mu$ 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  $2 \times 10^4$  copy/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ L 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  $\mu$ L 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。

#### 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4  $\mu$ L 各 primer-forward (50  $\mu$ M)、0.4  $\mu$ L 各 primer-reverse (50  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ L probe

(10  $\mu\text{M}$ ) と 6.45  $\mu\text{L}$  超純水を含む反応混合液 (20  $\mu\text{L}$ ) 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、 $\Delta\text{Ct}$  値を算出した。これら  $\Delta\text{Ct}$  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。 $\Delta\text{Ct}$  値の相対値への変換は、[式:  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ] 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、試料を直ちに氷中に移し冷却した。

#### 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、試料は直ちに氷中で冷却した。

#### 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、試料は直ちに氷中で冷却した。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  $\mu\text{L}$  cellulase、10  $\mu\text{L}$  RNase A (100 mg/mL)、5  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -amylase (4 units/ $\mu\text{L}$ ) と 5  $\mu\text{L}$  のプラスミドベクター (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) 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。その後、100  $\mu\text{L}$  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。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 ベクターである。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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4  $\mu\text{L}$  各 primer-forward (50  $\mu\text{M}$ )、0.4  $\mu\text{L}$  各 primer-reverse (50  $\mu\text{M}$ )、0.25  $\mu\text{L}$  probe (10  $\mu\text{M}$ ) と 6.45  $\mu\text{L}$  超純水を含む反応混合液 (20  $\mu\text{L}$ ) 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、 $\Delta Ct$  値を算出した。さらに、各  $\Delta Ct$  から未処理 (0 分加熱) の Ct 値を減じ  $\Delta\Delta Ct$  値を算出した。これら  $\Delta\Delta Ct$  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。 $\Delta\Delta Ct$  値の相対値への変換は、[式:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ] 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碎し、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  $\mu\text{g}$  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® UltraTM 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%以上の未解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/](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、 $-80^{\circ}\text{C}$  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、 $-20^{\circ}\text{C}$  で45分間静置した。遠心分離 ( $35,000\times g$ ,  $0^{\circ}\text{C}$ , 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  $\mu\text{L}$  加え、攪拌しながら  $37^{\circ}\text{C}$  で1時間保温した。その後、遠心分離 ( $15,000\times g$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ , 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  $\mu\text{g}$  分を 1.5-mL マイクロ容器に分取した。分取液に DTT を加え  $37^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{g}$  を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{m}$ 、内径 75  $\mu\text{m}$ 、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 :  $250^{\circ}\text{C}$

・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](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,  $\pm 5$  ppm  
MS/MS tolerance,  $\pm 0.02$  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

### 平成 28 年度 :

除草剤耐性セイヨウアブラナ Cibus5715 系統、5720 系統、5722 系統のスルフォイルウレア系除草剤標的遺伝子 (AHASI [GenBank accession no. Z11524]、及び、AHASIII [GenBank accession no. Z11526]) へ導入された 1 塩基変異を、PCR にて標的配列周辺遺伝子を増幅させ、サンガー法を用いてシーケンス解析を行った。Cibus 社より提供された情報を基に、1 塩基変異配列を中心に 420 bp 増幅断片長となるようプライマーを設計し、そのプライマーを使用して PCR 後、アガロース電気泳動を使用して、増幅産物を確認した。その結果、PCR による特異的な増幅産物を確認した。シーケンス解析の結果、標的配列の蛍光ピークは 1 本の波長であることが確認された。よって、野生型の標的配列はグアニンであるのに対し、5715 系統、5720 系統、及び、5722 系統すべてにおいてチミンに 1 塩基置換されていることが確認された。

1 塩基置換された作物を検知する方法について解析するため、まず、Cibus5715 系統、5720 系統、及び、5722 系統より抽出・精製した DNA を鋳型に、①酵素を用いた方法 (Cell1 アッセイ法、制限酵素アッセイ法) 及び②次世代シーケンサーを使用した方法 (PCR-NGS 法) の各方法の検出感度に関する解析を行った。前述した 1 塩基変異の標的配列を含む 420 bp の PCR 増幅断片長を用いて、各系統の PCR 増幅断片を野生型の PCR 増幅断片で希釈して希釈系列 (0.01~50%) を調製し、熱変性によるリアニリング後、T7 endonuclease を使用して、Cell1 アッセイを試みた。その結果、T7 endonuclease により、標的配列の野生型と変異型のヘテロ分子を分解後、アガロース電気泳動、又は、キャピラリー電気泳動により定性的に判別できる濃度は、10% であることが示唆された。1 塩基変異導入型の PCR 増幅断片を野生型の PCR 増幅断片で希釈し、希釈系列 (0.01~50%) を作

成して、標的配列を認識して分解する制限酵素 (*BsrDI*) で分解させて変異型を検出する制限酵素アッセイ法の検出感度を検証した。その結果、変異型の野生型への混入をアガロース電気泳動、又は、キャピラリー電気泳動により 10% まで検出可能であることが確認された。

次に、PCR-NGS 法の定量限界について解析を行った。NGS の解析に供したサンプルは、標的配列を有さない領域を PCR 増幅させたコントロールと標的配列を有する領域を PCR 増幅させたターゲットを供した。シーケンサーのフローセルに対応するよう、PCR 増幅産物のタグ配列は 16 種類 (コントロールとターゲットそれぞれの 10%, 1% 及び 0.001% に調製した 5715 系統及び 5720 系統混入サンプルと、0.001% に調製した 5722 系統) を使用した。シーケンシングの結果、コントロールとターゲットをシーケンシングした配列は、全ての調製したサンプルにおいてリード配列をリファレンス配列へマッピング後、アラインメントを行った。シーケンシング解析結果より得られた塩基の積算値は、各サンプルで 28 万~38 万塩基であった。得られたリードのデータから、野生型ゲノム DNA にはない、変異導入塩基配列の検出率を算出するため、本法のシーケンシングエラー率とバリエーション検出率の解析を行った。その結果、標的配列 (4184 番 g→t) を含むリードは 0.001% の濃度に調製した 5715 系統、及び、5720 系統の両系統の混入率で検出可能であった。0.001% の混入率で、バリエーション検出率は、5715 系統で 0.388%、5720 系統で 0.376% であった。しかし、リード全体にわたって確認されるシーケンシングエラー率は、バリエーション検出率と同程度であった。一方で、1% の混入率ではバリエーション検出率は、5715 系統で 1.191%、5720 系統で 1.214% で、10% の混入率ではバリエーション検出率は、5715 系統で 7.488%、5720 系統で 8.237% であった。本研究で得られた、5715 系統及び 5720 系統の混入率とバリエーション検出率をグラフ化した結果、両系統で相関性 (5715 系統,  $R^2=0.9998$ ; 5720 系統,  $R^2=1.0000$ ) が示唆された。

平成 29 年度 :

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。

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。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。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。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。

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。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。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。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。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。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。

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。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。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。

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。 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

##### 平成 28 年度：

新育種技術を使用して開発された作物の食品への応用例として、Cibus社が開発した除草剤耐性セイヨウアブラナ系統を例に、1塩基置換された作物の各種検知技術法の検出感度について解析した。これまでに、スルフォニルウレア系除草剤耐性を獲得する標的遺伝子、AHAS、については、植物ゲノム上に複数のホモログを有する遺伝子であること (Theor. Appl. Genet., 80, 449-458, 1990, Mol. Gen. Genet., 229, 31-40, 1991, Plant J., 2, 321-330, 1992) が報告されている。また AHAS へのアミノ酸変異は、シロイヌナズナを例に解析が進んでおり (Plant Cell Rep., 8, 445-449, 1989)、本研究で使用した除草剤耐性セイヨウアブラナ系統 5715 系統、及び、5722 系統では、AHASI (W559L) と AHASIII (W556L)、5720 系統では、AHASI (W559L) と AHASIII (W556L と R559W) の変異が導入されていることが報告されている。そこで本研究では、ODM

の標的であるAHASIIIのW556L変異について、ゲノム上の塩基配列を解析した。その結果、全系統中のAHASIIIにグアニンがチミンに置換された1塩基変異を有していることが確認された。また、標的遺伝子以外のAHASホモログの塩基配列相同性は非常に高く、本研究で得られたサンガー法の蛍光ピークの解析から、AHASI[GenBank accession no. Z11524]とAHASII[GenBank accession no. Z11526]の両遺伝子に変異が導入されたホモ型の作物であることが確認された。この結果から、ゲノム上に複数あると考えられる複数の遺伝子ホモログの標的塩基配列すべてにおいて、1塩基置換によるアミノ酸残基の置換が誘導された除草剤耐性を獲得したセイヨウアブラナ系統であることが示唆された。

変異が導入された塩基配列を検知する方法として、PCR増幅産物を分解させる酵素を使用した方法、並びに、DNA polymeraseを使用しDNA増幅を基本原理とした方法について解析を行った。PCR増幅産物を分解させる酵素を使用した方法として、Cel1アッセイ法とBsrDIを使用した制限酵素処理法を取りあげ、それぞれの検出限界を求めたところ、検出は定性的に混入率10%まで可能であることが示唆された。一方、DNA polymeraseを使用したDNA増幅法には、244~247 bpアンプリコン配列を次世代シーケンサーを使用して解析した。得られたリードは、野生型セイヨウアブラナのリファレンス配列へマッピングし、標的塩基配列の変異を検出可能な混入率を解析した。バリエント推定モデルには、倍数性を指定せずに、低頻度で見られるバリエントを検出する「Low frequency variant detection」プログラムを使用して解析を行った。解析に使用した標的配列を含むPCR領域を次世代シーケンシング解析した結果、5%のバリエント検出率で多数の変異箇所を同定した。多数の変異箇所を同定した要因としては、以下の3つの可能性が考えられた。

- ・元々存在している複数の遺伝子間の変異
- ・PCRバイアスによる変異
- ・MiSeq機器によるシーケンシングエラー

500 bp以下の増幅断片長でPCR酵素は正確性の高いDNA polymerase (Pfu Turbo DNA polymerase) を使用しており、同じ箇所の変異がサンプル間で見られることから、「元々存在している複数の遺伝子間の変異である可能性」

が高いことが考えられた。また、本研究結果から、MiSeq機器、及び、PCR増幅によるシーケンシングエラーは、最大0.5%程度の確立であることが示唆された。以上のことから、5%のバリエント検出率が確認された配列は、元々存在している複数の遺伝子間の変異の可能性が高いことが示唆された。次世代シーケンシングの結果、並びに、1塩基標的配列周辺のPCR増幅断片のシーケンシングの結果から、AHASには複数のホモログが存在していることが確認された。

ODMを使用してセイヨウアブラナに除草剤耐性の表現型を獲得させるために変異導入された標的配列 (position : 4184) については、混入率とバリエント検出率との間に相関関係が示唆された。また、同様に本研究で解析に使用した401 bp中において、両確率の相関関係のある配列は他には存在しないことが確認された。また、検出感度に関しては、0.001%までを変異の入ったリードを検出しているが、シーケンシングエラーと同等の確立で検出されたことから、1%以上のバリエント配列の確立で配列を検索する閾値を設定すれば、本法を使用して1塩基変異導入のセイヨウアブラナの検出は可能であることが示唆された。よって、本法の検出感度は1%程度であることが判った。また、本法は、サンプル中に混入した標的変異配列を特定し、定量的に混入率を概算することができる新しい方法 (PCR-NGS法) であることが示唆された。

#### 平成 29 年度 :

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<sup>リ</sup>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、低密度のほうはユークロマチン、高密度のほう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。

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。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ーブの GC 含量は他と比べて 10°C以上高かった。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、遺 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。再度、*Le1* の DNA 配列を BLAST 検索すると、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 *HMGI* (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°C 48 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

本研究結果から、Cell アッセイ法、制限酵素スクリーニング法、及び、PCR 法は、定性、及び、定量的に優れているが、本研究で開発した PCR-NGS 法は、配列を特定すると同時に定量可能な方法であることが示唆された。

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ことが判った。

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。また、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。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 japonicas* 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)
  - 5) 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.
  - 6) 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  $\Delta\Delta\text{Cq}$ -based multiplex real-time PCR. Analytical Chemistry, 88, 4285-4293, 2016.
  - 7) 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.
  - 8) 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、高島令王奈、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
  - 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：アクリリ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、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ア検知に向けた全ゲノムシーケンシング技術応用の検討について、日本食品化学学会 第22回総会・学術大会、高知、2016年6月
  - 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) 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

20) 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、高嶋令王奈、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

なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

## 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）  
研究協力者 酒井 信夫 （国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・室長）

#### 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、3年間で、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報367、及び、25種のアレルゲンについて総数86のエピトープ情報を追加することができ、最終的に、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、エピトープ既知のアレルゲン数は236となった。また、29年度にはそ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

平成27年度から29年度の各年度ごとに、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

平成 27 年度から 29 年度の各年度ごとに、前年の 6 月から当該年 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ることで 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。27-29 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、27-29 年度の 3 年間で、キーワード検索により抽出された論文は 67 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 31 報を選択し、ピアレビューを行った。その結果、16 報の論文 (Table 1) から 25 種のアレルゲンについて、総数 86 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、最終的に、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。

##### 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

27-29 年度の 3 年間で、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報を 367 種追加、また、25 種のアレルゲンについて総数 86 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。

#### E. 結論

平成27年度から29年度の各年度ごとに、前年の6月から当該年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、16報の論文から25種のアレルゲンについて、総数86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 27-29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. Pahr S, Selb R, Weber M, Focke-Tejkl M, Hofer G, Dordić A, Keller W, Papadopoulos NG, Giavi S, Mäkelä M, Pelkonen A, Niederberger V, Vrtala S, Valenta R.  
Biochemical, biophysical and IgE-epitope characterization of the wheat food allergen, Tri a 37.  
PLoS One. 2014 Nov 4;9(11):e111483.  
PMID: 25368998
2. Longo V, Costa MA, Cibella F, Cuttitta G, La Grutta S, Colombo P.  
Multiple IgE recognition on the major allergen of the Parietaria pollen Par j 2.  
Mol Immunol. 2015 Feb;63(2):412-9.  
PMID: 25284812
3. Asam C, Batista AL, Moraes AH, de Paula VS, Almeida FC, Aglas L, Kitzmüller C, Bohle B, Ebner C, Ferreira F, Wallner M, Valente AP.  
Bet v 1--a Trojan horse for small ligands boosting allergic sensitization?  
Clin Exp Allergy. 2014 Aug;44(8):1083-93.  
PMID: 24979350
4. Allergy. 2014 Dec;69(12):1617-28.  
Devanaboyina SC, Cornelius C, Lupinek C, Fauland K, Dall'Antonia F, Nandy A, Hagen S, Flicker S, Valenta R, Keller W.  
High-resolution crystal structure and IgE recognition of the major grass pollen allergen Phl p 3.  
PMID: 25123586
5. Yang Y, Cao MJ, Alcocer M, Liu QM, Fei DX, Mao HY, Liu GM.  
Mapping and characterization of antigenic epitopes of arginine kinase of Scylla paramamosain.  
Mol Immunol. 2015 Jun;65(2):310-20.  
PMID: 25728640
6. Mameri H, Brossard C, Gaudin JC, Gohon Y, Paty E, Beaudouin E, Moneret-Vautrin DA, Drouet M, Solé V, Wien F, Lupi R, Larré C, Snégaroff J, Denery-Papini S..  
Structural Basis of IgE Binding to  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Gliadins: Contribution of Disulfide Bonds and Repetitive and Nonrepetitive Domains.  
Agric Food Chem. 2015 Jul 29;63(29):6546-54..  
PMID:26186140
7. Bublin M, Kostadinova M, Fuchs JE, Ackerbauer D, Moraes AH, Almeida FC, Lengger N, Hafner C, Ebner C, Radauer C, Liedl KR, Valente AP, Breiteneder H  
A Cross-Reactive Human Single-Chain Antibody for Detection of Major Fish Allergens, Parvalbumins, and Identification of a Major IgE-Binding Epitope..  
PLoS One. 2015 Nov 18;10(11):e0142625.  
PMID:26579717
8. Saeed H, Gagnon C, Cober E, Gleddie S.  
Using patient serum to epitope map soybean glycinins reveals common epitopes shared with many legumes and tree nuts.  
Mol Immunol. 2016 Feb;70:125-33..  
PMID:26766775
9. Han Y, Lin J, Bardina L, Grishina GA, Lee C, Seo WH, Sampson HA..  
What Characteristics Confer Proteins the Ability to Induce Allergic Responses? IgE Epitope Mapping and Comparison of the Structure of Soybean 2S Albumins and Ara h 2..  
Molecules. 2016 May 12;21(5)  
PMID:27187334
10. Zhang Y, Zhu L, Li S, Zhang J, She T, Yan J, Bian Y, Li H  
Identification of the major allergenic epitopes of Eriocheir sinensis roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses.  
Mol Immunol. 2016 May 18;74:125-132.  
PMID:27208437

11. Chen X, Negi SS, Liao S, Gao V, Braun W, Dreskin SC.  
Conformational IgE epitopes of peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6.  
Clin Exp Allergy. 2016 May 30.  
PMID:27238146
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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 27-29 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	Tri a 37	2	31	KSCORSTLG RNCYNLCRAR GAQKLCAGVC R	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	22	51	AQKLCAGVC RCKISSGLSC PKGFFPKLAL E S	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	42	71	KGFPKLALE SNSDEPDIT E YCNLGCRRSS V C	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	62	90	CNLGORSSV CDYMNVAAD DEEMKLYVEN	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
	Tri a 37	82	111	EEMKLYVEN CADACVFCFN GDAGLPSLDA Y	Dot-blot / Inhibition ELISA	L	PMID 25368998	J7K291
002	Par j 2	32	61	EEACGKVVQD IMPCLHFVKG EEKEPSKECC	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	32	85	EEACGKVVQD IMPCLHFVKG EEKEPSKECC SGTKKLSSEV KTTEQKREAC KCIV	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	68	107	SEEV KTTEQKREAC KCIVRATKG I SGIKNELVAE VPKKCD	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	79	107	EAC KCIVRATKG I SGIKNELVAE VPKKCD	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	91	107	I SGIKNELVAE VPKKCD	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
	Par j 2	91	133	I SGIKNELVAE VPKKCDIKTT LPPITADFD C SKIQSTIFRG YY	Immuno Blot	L	PMID 25284812	P55958
003	Bet v 1				NMR	C	PMID 24979350	P15494
004	Phl p 3				ELISA with amino acid mutation	C	PMID 25123586	Q69B42
005	Scy p ?	113	127	VDPDQKFVISTRVRC	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
	Scy p ?	127	141	CGRSMEGYFPNCLT	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
	Scy p ?	141	155	TEAQYKEMESKVSST	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
	Scy p ?	204	218	WPTGRGLYHNDNKT F	SPOTs/Degranulation assay	L	PMID 25728640	H6VG13
006	Tri a 21	21	31	VRVPVPLQLP	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	45	52	VQQQFPFG	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	75	84	YLQLQFPFPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	102	107	QSFPPQPPYQQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	239	250	QQQPSSQVFSQQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
007	Tri a ?	144	152	PQQPFPQPPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P08453
	Tri a ?	44	54	LSQQPQTFPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P08453
008	Gad m 1				Phage library/NMR	C	PMID 26579717	Q90YK9
009	Gly m 6.0501.	214	222	KQGQHQQQE	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
	Gly m 6.0501.	226	236	GSVLSGFSKHFL	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
	Gly m 6.0501.	313	324	EEEDQPRPDHPP	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
010	Gly m 6.0201.	121	129	QRPQDRHOK	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	130	141	VHRFREGDLIAV	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	136	153	GDLIAVPTGVAVWVMYNE	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	214	225	GSNILSGFAPEF	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	256	261	KGGLRV	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	283	291	QCVETDKGC	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
011	Ara h 2	22	30	RQWELQGD	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	31	39	RRCQQLER	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	43	51	RPCEQHLMQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	61	69	ERDPYSPSQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	70	78	DPYSPSPYD	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	88	99	QERCCNELNEFE	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	94	105	ELNEFENRCOM	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	115	123	NQSDRLQGR	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	121	132	QGRQEQQFKRE	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	130	138	KRELRLNPQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	139	150	QCGLRAPQRCDL	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	Ara h 2	145	156	PQRCDLDES GG	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2
	012	Soy AL 1	39	50	NINPCEHIMEKI	peptide microarray	L	PMID 27187334
Soy AL 1		69	80	TMPGRINIRKK	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZN24
Soy AL 1		84	94	EEEEEGHMQKC	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZN24
Soy AL 1		99	110	SELKSPICQCKA	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZN24
013	Gly m 8 (Soy AL 3)	31	42	CRKQLQGVNLTP	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8 (Soy AL 3)	67	78	ILRTMRGRINYI	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8 (Soy AL 3)	102	113	SELRSKPKQCKA	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8 (Soy AL 3)	127	138	EKQKKMEKELI	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
014	Eri s ?	181	208	NSEVIQEAYTAQMTQTPSKIKSHFTGS	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
	Eri s ?	237	255	FWWDDSHENHIERK GENF	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
	Eri s ?	360	378	GDVIESS TYPNPQY GAL	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
015	Ara h 2				Phage Display Peptide Library	C	PMID 27238146	Q6PSU2
016	Ara h 6				Phage Display Peptide Library	C	PMID 27238146	Q647G9
017	Bos d 4	20	34	EQLTKCEVRELKDL	ELISA	L	PMID 26703546	P00711
	Bos d 4	120	134	INYWLAHKALCSEKL	ELISA	L	PMID 26703546	P00711
018	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
019	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	RIYGGSVTPGNCKE	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	F5A6E9
020	Pro c ?	478	492	FKDRKD GSCYVSYVK	Phage Display / Dot blot	L	PMID 28072528	E0VB57
021	Rhi o 1	44	59	TGEYLTKQYFN SQRNN	ELISA	L	PMID 27358405	A0A097CKB4
	Rhi o 1	311	326	GAENWAGQYVVD CNK	ELISA	L	PMID 27358405	A0A097CKB4
022	Der f 1	46	53	SAYLAYRN	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	71	78	GCHGD TJP	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	99	110	AREQQCRPN SQ	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 1	179	186	GSTQGV D Y	peptide microarray	L	PMID 27481284	P16311
	Der f 2	32	39	KVMVDGCH	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
023	Der f 2	97	106	LVKGQQYDIK	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
	Der f 2	123	130	VTVKLIGD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q00855
	Der f 4	92	105	DIHTRSGDEQQRFR	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
024	Der f 4	130	139	QSGLGTNGHH	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	248	255	SHPRHYE	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	284	291	ITNVRFN N	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	378	388	VGPPTD QHGNI	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 4	506	519	VGHDEFDAFVAYHI	peptide microarray	L	PMID 27481284	A0A023NMA7
	Der f 7	49	56	MKVPDHAD	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456
025	Der f 7	69	81	GELAM RNIEARGL	peptide microarray	L	PMID 27481284	Q26456
	Der f 7	117	124	DLAYKLG D	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) 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)
- 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 (in press)
- 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) 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
- 5) 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
- 6) 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。
- 7) Komoto K., Okamoto S., Hamada M., Obana N., Samori M., and Imamura T. Japanese consumer perceptions of genetically modified food: Findings from an international comparative study. *Interactive Journal of Medical Research*, 2016, vol. 5, iss. 3, e23, p.1-19.

- 8) 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. *Japanese J. Food Chem. Safety* 23, 9-19, 2016
- 9) 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)
- 10) Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. “Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272” *Food Hyg.Saf.Sci.* 57, 1-6 (2016)
- 11) Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S, Poulsen LK, Privalle L, Ward JM, Doerr N, Rascle JB. “Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens” *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198–2207 (2016)
- 12) 今村知明、高谷幸、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、森川恵介、長谷川専、山口健太郎、池田佳代子. 食品防御の考え方とその進め方～よくわかるフードディフェンス～. 今村知明 編著. 2015 Apr;p.1-243 全文.
- 13) 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.
- 14) Satoh R., Teshima R. “Genetically modified organisms in food” 40. Allergen Analysis in plants and use in the assessment of genetically modified plants. ed., Watson RR and Preedy VR, Academic Press, pp453-463 (2015)
- 15) 今村知明. 【第2版】食品の安全とはなにか-食品安全の基礎知識と食品防御-. 2015; p.1-237
- 16) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H. Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via down-regulation of T helper 17 (Th17) cell responses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 1406-1410, 2015.
- 17) Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015.

- 18) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 240, 413-422, 2015.