

令和3年度 食品健康影響評価技術研究 成果発表

課題名

導入遺伝子が存在しない宿主ゲノム遺伝子発現改変植物由来食品の安全性評価点の解明

研究代表

児玉 浩明

千葉大学大学院園芸学研究院

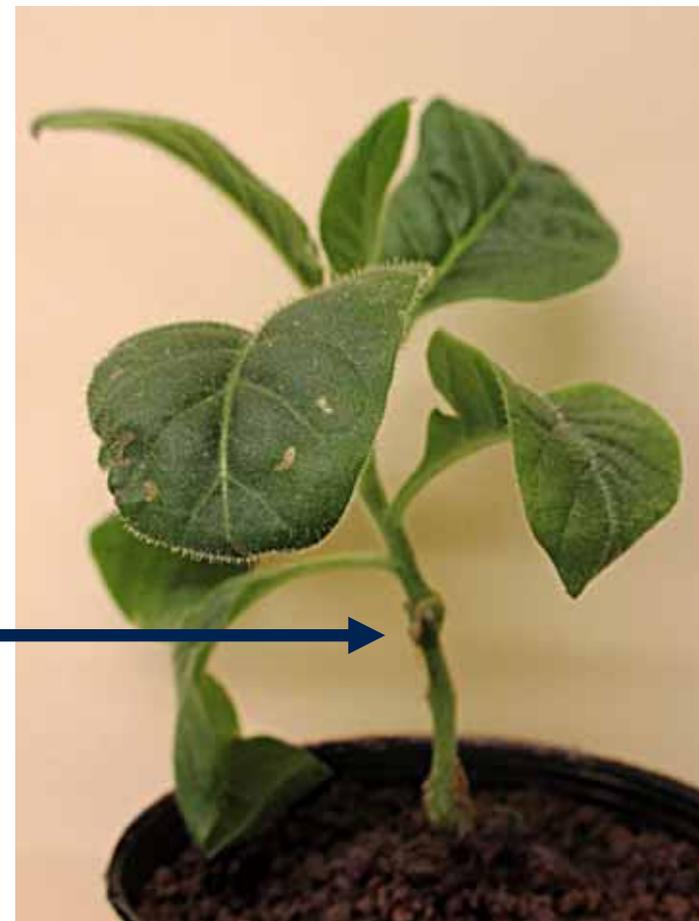
研究グループ

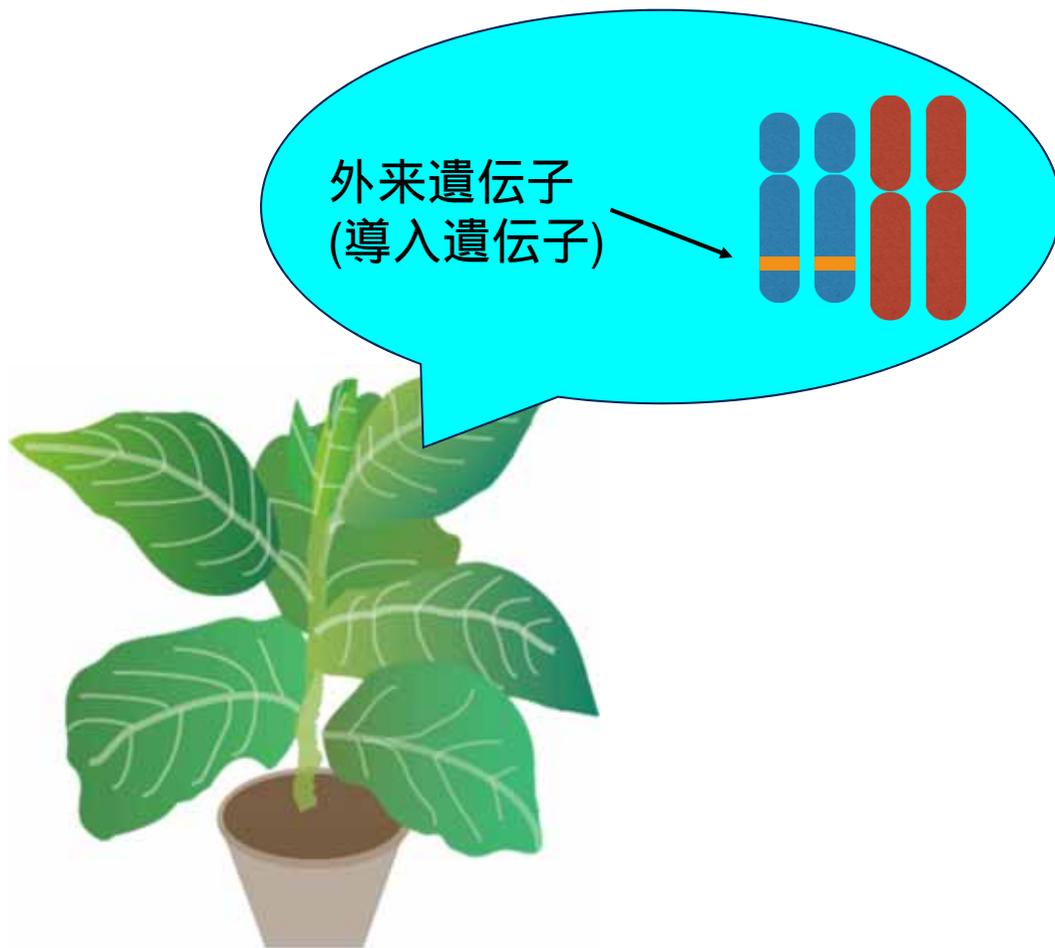
小関良宏(東京農工大学)

太田大策(大阪府立大学)

小口太一(筑波大学)

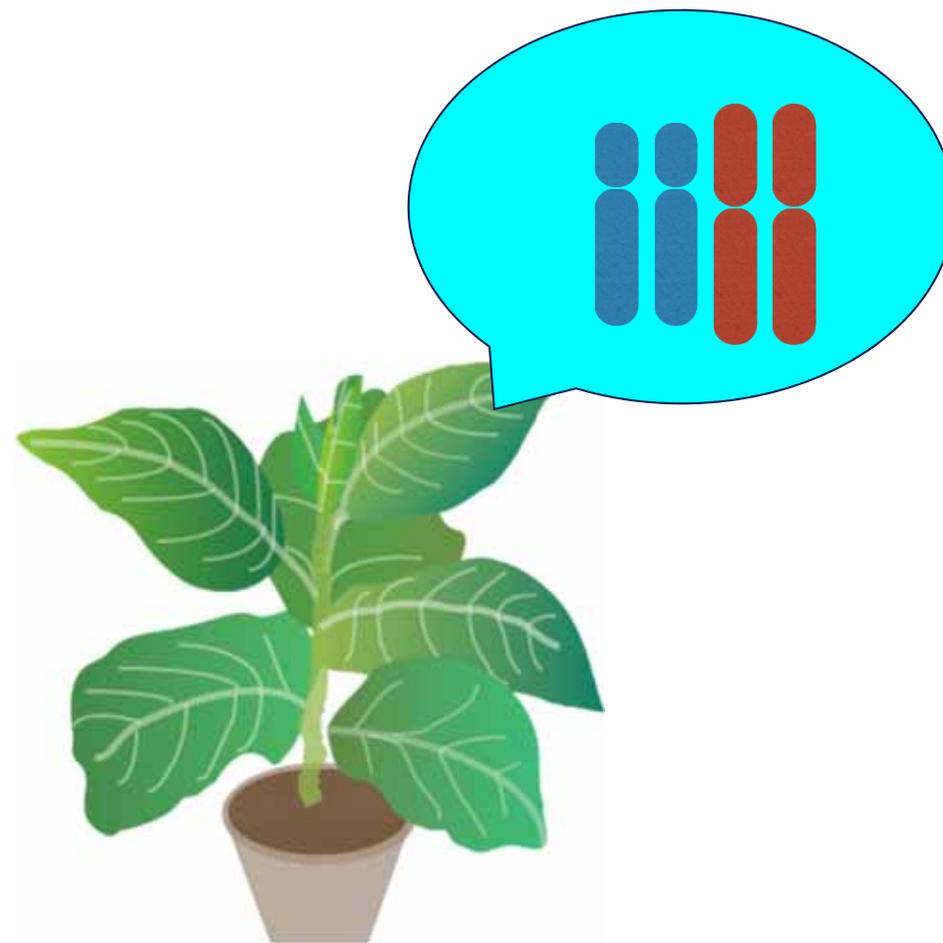
接ぎ木
部分





遺伝子組換え植物
Genetically Modified Plant
(GM plant)

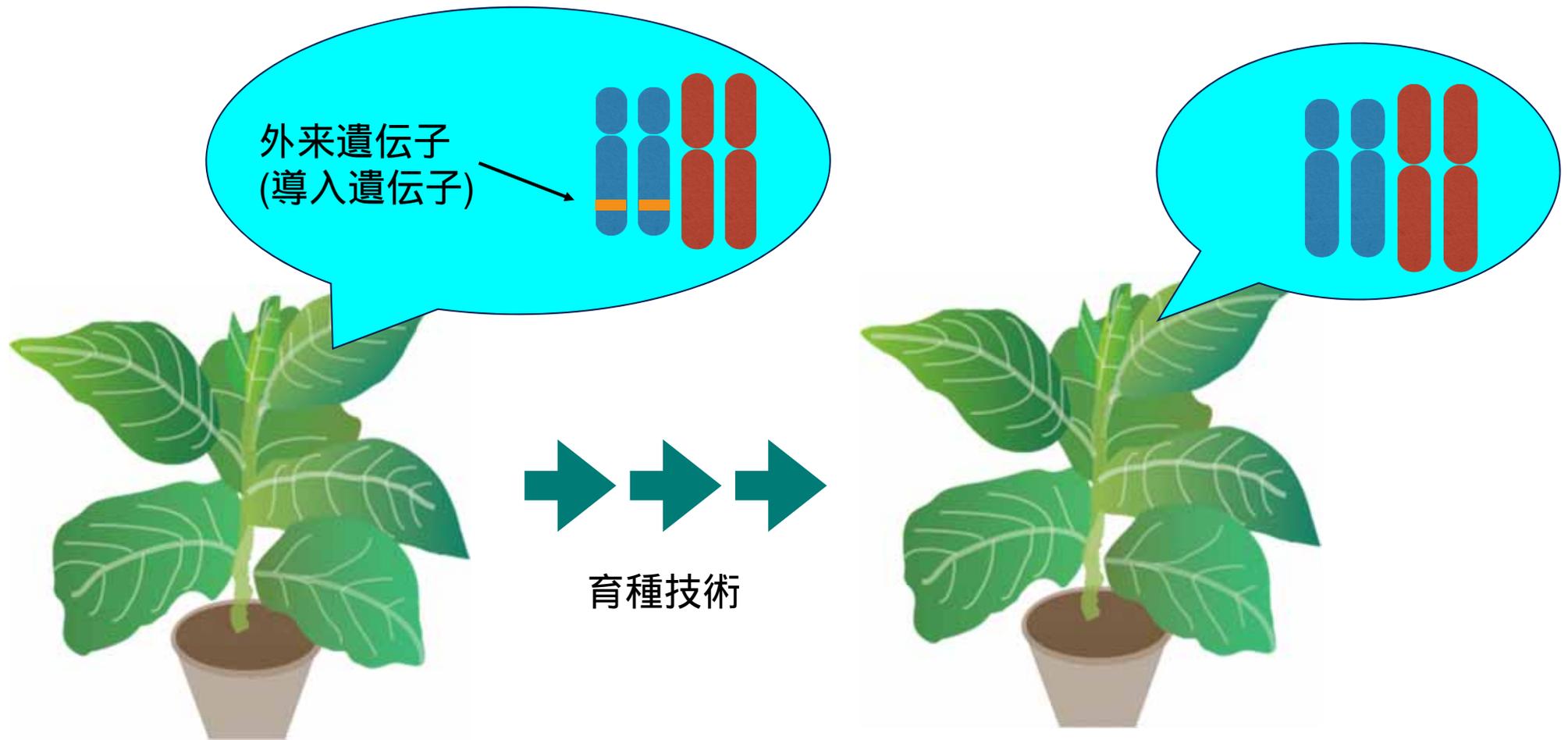
➡ リスク評価が必要



非遺伝子組換え植物
non-GM plant

➡ リスク評価は必要ない

New Plant Breeding Technology (NPBT)



GM plant

最終的な可食部に
外来遺伝子を含まない

新しい育種技術 (New Plant Breeding Technology)

育種や栽培の過程で遺伝子組換え技術を用いるが、最終的には導入遺伝子が存在しない成果物(食品)を作り出す技術

ゲノム編集

オリゴヌクレオチドを用いた突然変異

シスジェネシスとイントラジェネシス

RNA介在型DNAメチル化 (RdDM)

接ぎ木

逆育種

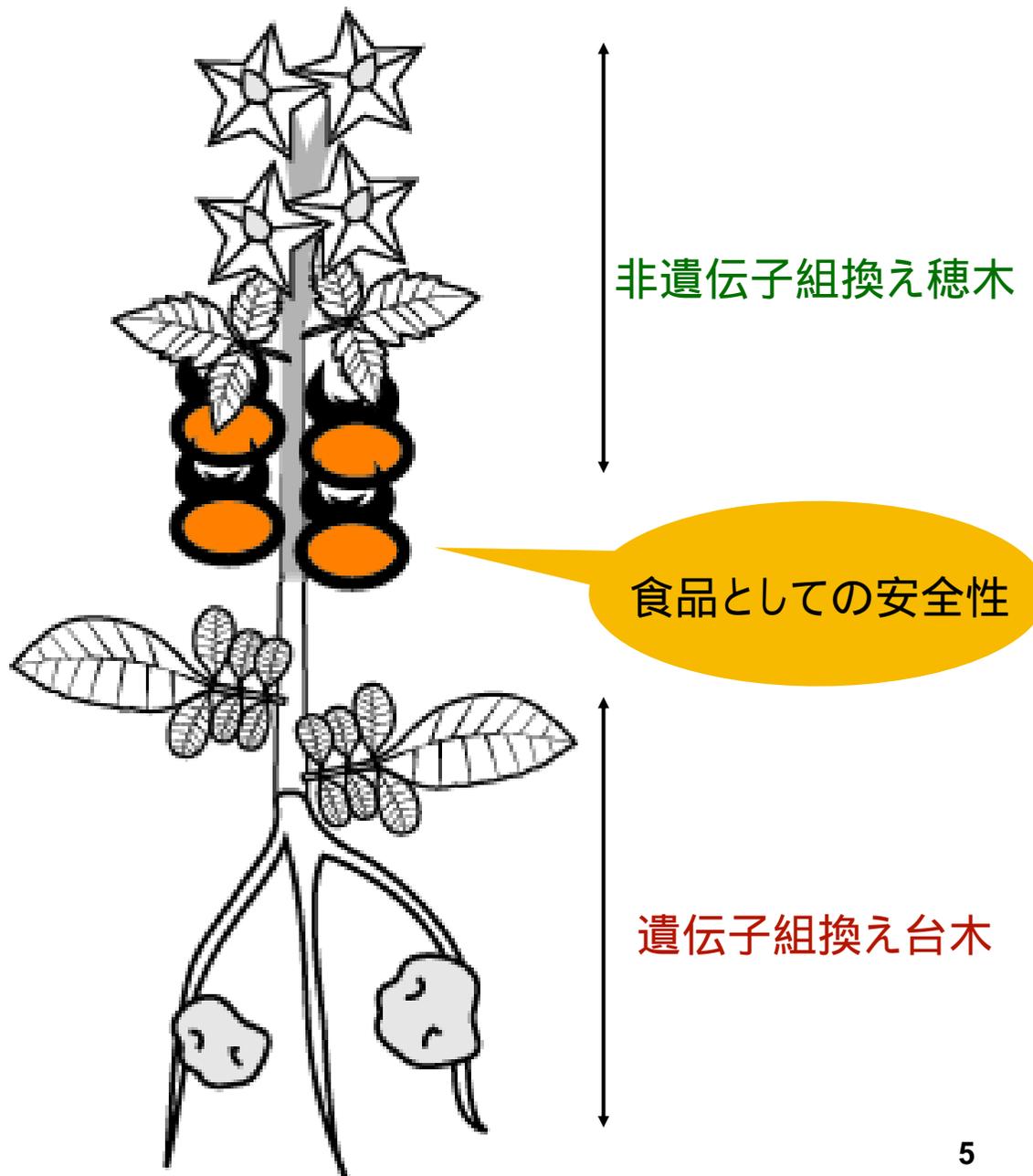
アグロインフィルトレーション

食品の安全性をどう評価するか、議論されていない

課題名

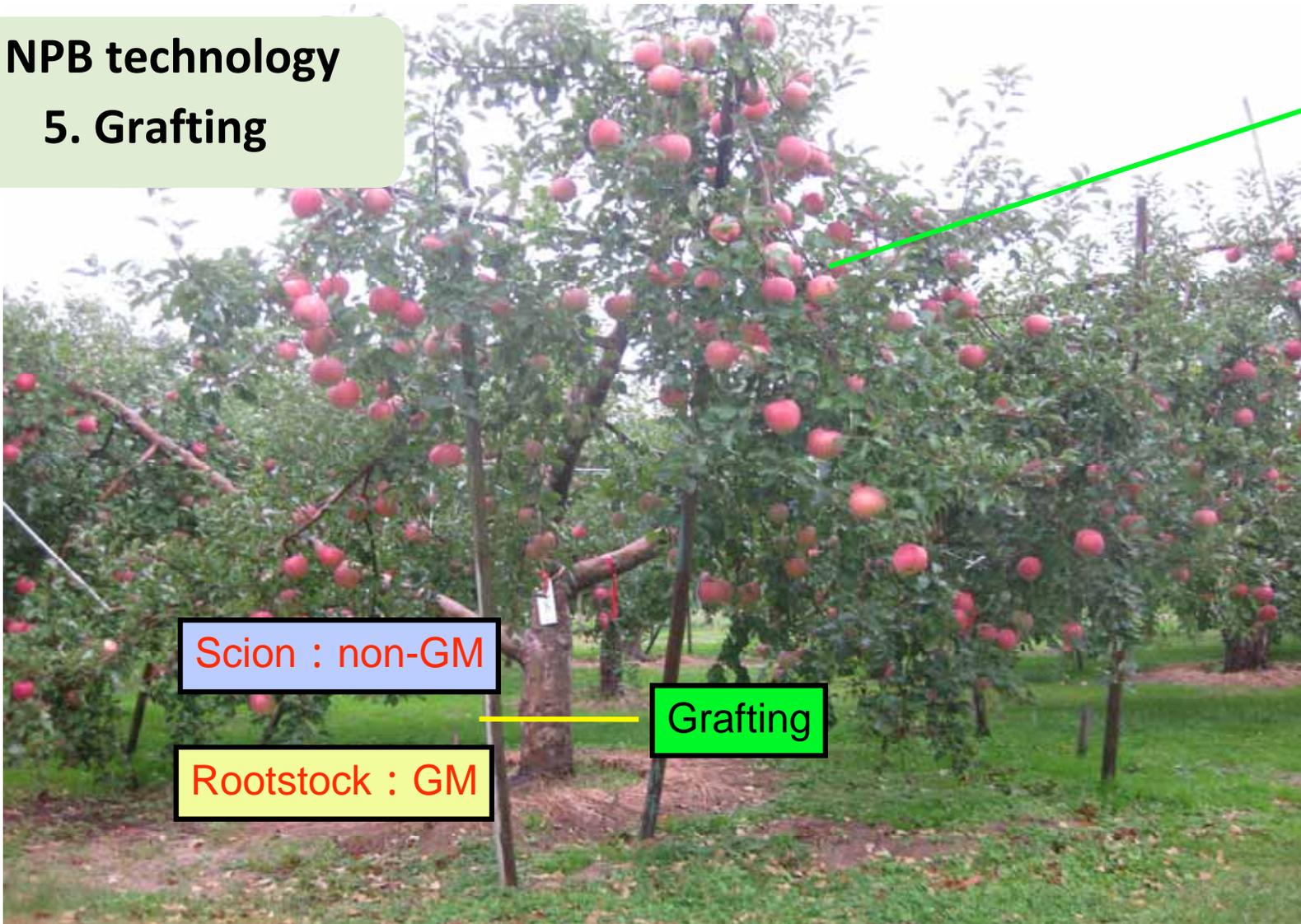
導入遺伝子が存在しない宿主
ゲノム遺伝子発現改変植物由
来食品の安全性評価点の解明

GM植物を利用した接ぎ木技術
トランスグラフティング



New Plant Breeding Technology

NPB technology 5. Grafting



Scion : non-GM

Rootstock : GM

Grafting



Fruits harvested
GM or non-GM ?



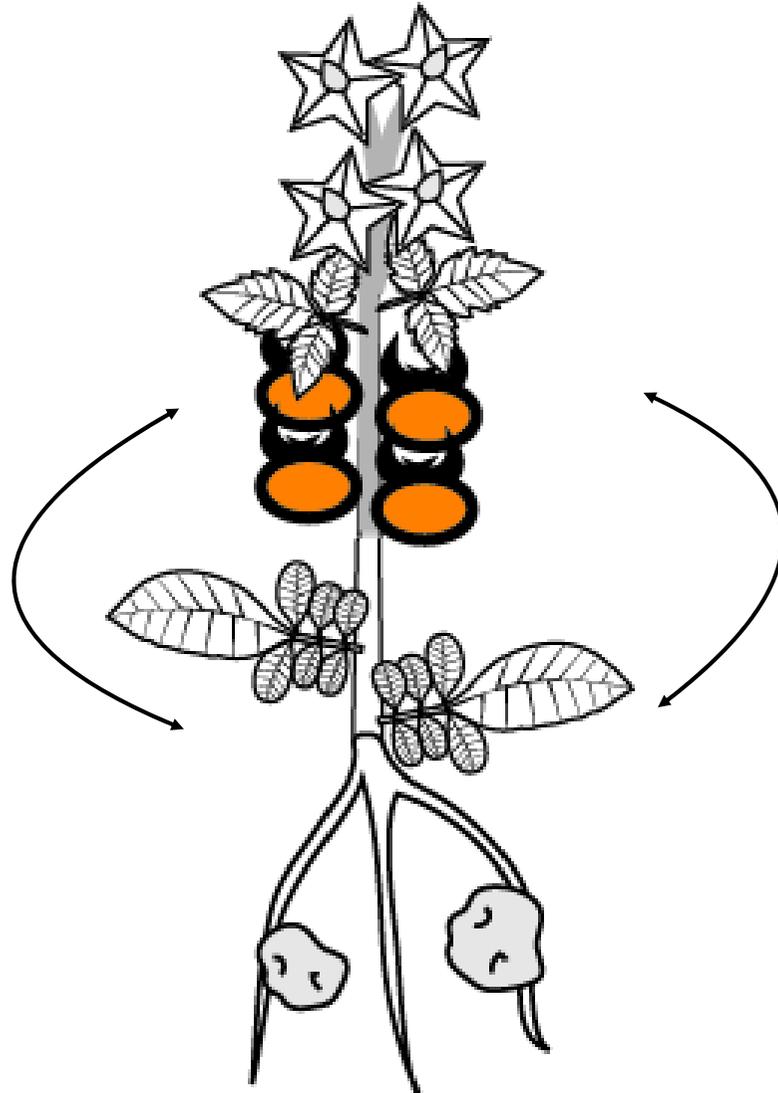
Progeny seedlings
from the seeds
GM or non-GM ?

Courtesy of Prof. Kamada

Utilize of fruit trees by grafting (non-GM scion on GM root stock)
Treatment of fruits produced and utilization in breeding?

接ぎ木

台木から穂木へ
穂木から台木へ



移動する因子

- (1) タンパク質
- (2) 短鎖RNA
遺伝子発現の調節
(mRNAの分解)
(DNAのメチル化)
- (3) 栄養成分
- (4) 無機塩類
- (5) 低分子化合物
(栄養阻害物質)
(二次代謝産物)

GM食品(植物)の評価項目

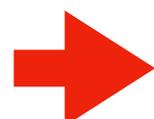
- 1) 導入遺伝子およびその翻訳産物の特徴
- 2) 翻訳産物のバイオインフォマティクス解析
(アレルギー性、毒性)
- 3) 消化性試験と熱安定性試験
- 4) ゲノムへの挿入部位の解析、発現レベル、世代安定性
- 5) 翻訳産物の宿主植物代謝系への影響
- 6) 構成成分解析
(アミノ酸、脂肪酸、栄養阻害物質などの組成分析)

NPBT (接ぎ木) に想定されるリスク

(1) 導入遺伝子およびその翻訳産物の特徴

(2) 翻訳産物のバイオインフォマティクス解析

(3) 消化性試験と熱安定性試験

 GM台木からの組換えタンパク質

 今回のテーマ

(4) ゲノムへの挿入部位の解析、発現レベル、世代安定性

(5) 翻訳産物の宿主植物代謝系への影響

 穂木の代謝系に影響を与える物質
(タンパク質・RNA)

 今回のテーマ

(6) 構成成分解析

 GM台木からのリスクを有する低分子化合物

本研究内容

siRNA産生導入遺伝子が排除されたnull segregantの解析

プロモーター標的siRNA産生台木を用いた接ぎ木植物の解析

GUS遺伝子発現台木を用いた異品種間トマト可食部の解析

接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析

FT遺伝子発現穂木を用いた同品種間ジャガイモ可食部の解析

接ぎ木

本日紹介する内容(、 、)

- 1, トランスグラフティング自体に食品としてのリスクはあるのか?
- 2, トランスグラフティングにおける短鎖RNAの移動とDNAのメチル化
- 3, トランスグラフティングにおけるタンパク質の移動

1, トランスグラフティング自体に食品としてのリスクはあるのか？



Non-GM 穂木

食用ミニトマト品種
(Stella)

GM 台木

GUS 遺伝子を導入した
モデルトマト
(Micro-Tom)

GUS遺伝子

植物の代謝系とは
相互作用しない
レポーター遺伝子

Stella
T-MT

Stella
N-MT

1, トランスグラフティング自体に食品としてのリスクはあるのか？



Non-GM
穂木



GM 台木

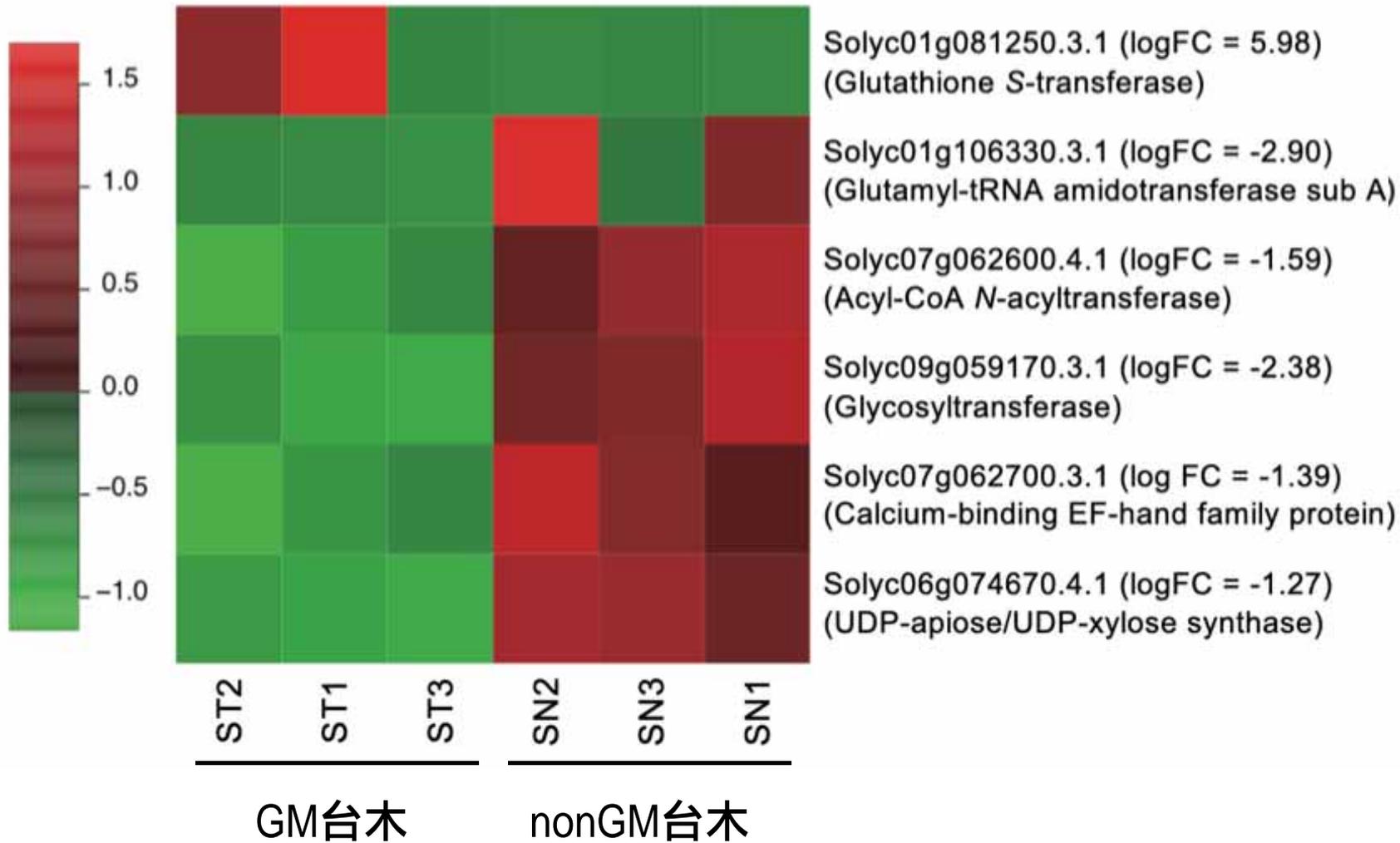
トマト果実でのオミックス解析

- ・mRNA分析
(トランスクリプトーム)
- ・タンパク質分析
(プロテオーム)
- ・代謝産物分析
(メタボローム)
- ・食品成分分析

Stella
T-MT

Stella
N-MT

トマト果実のトランスクリプトーム解析

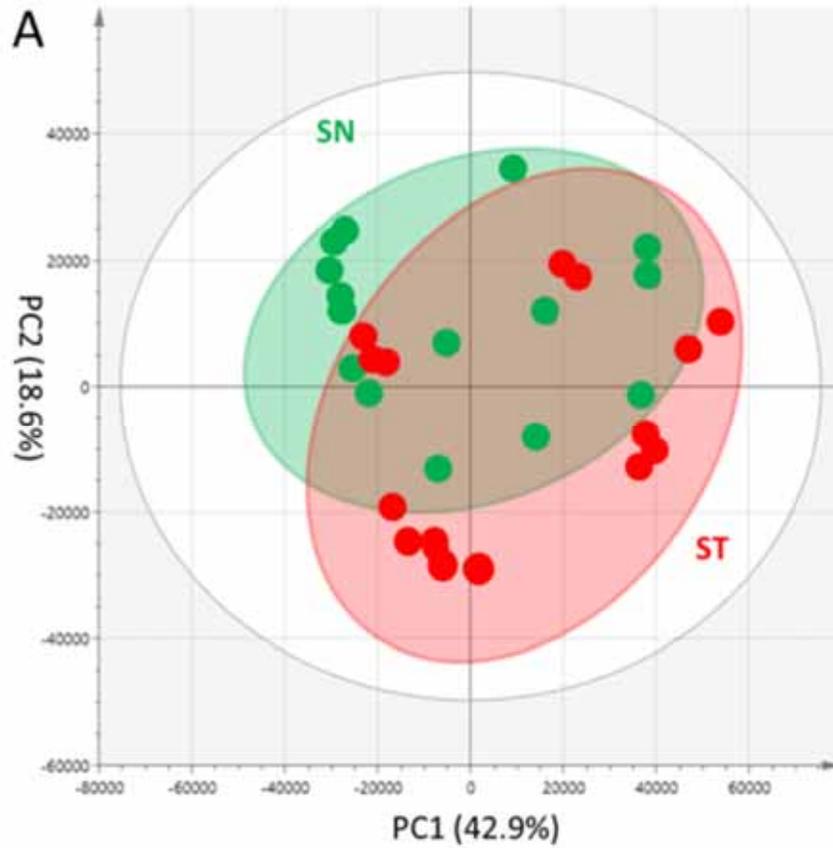


18,500のmRNA種のうち、6個のmRNAがトランスグラフィティングで変動

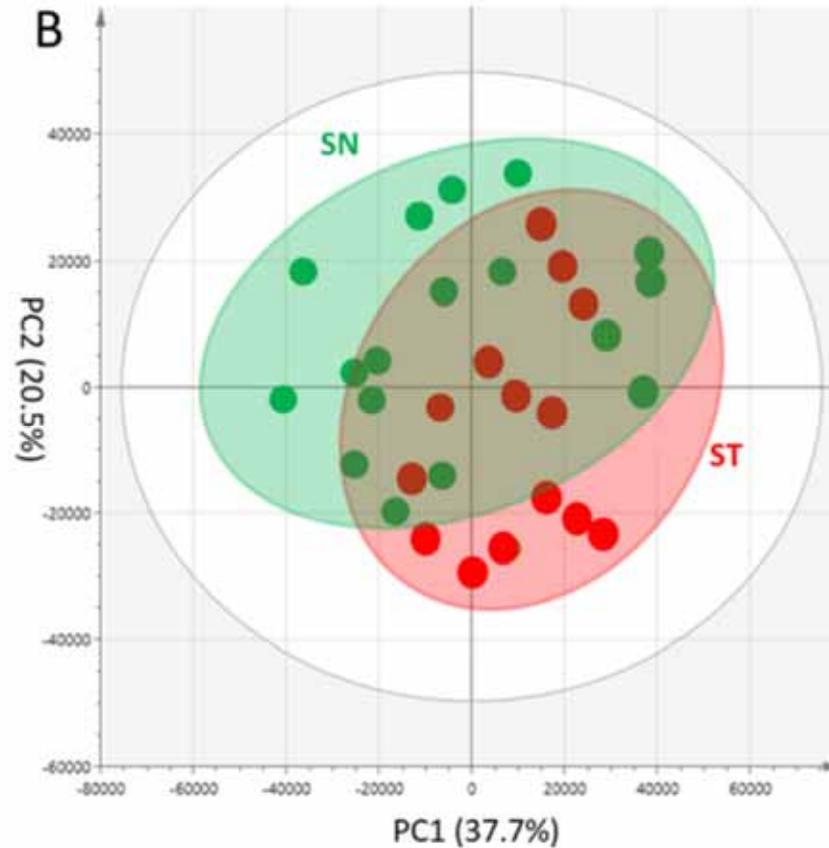
トマト果実のプロテオーム解析



UHPLC-ESI-MS (positive)



UHPLC-ESI-MS (negative)



GM台木 nonGM台木

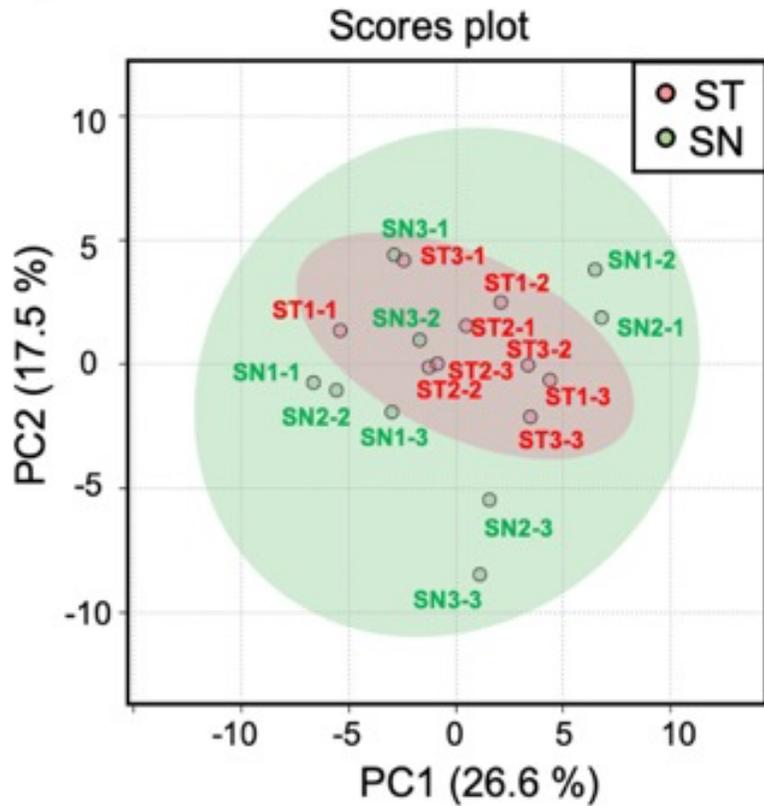
2,442のペプチド断片についての主成分分析

➡ トランスグラフティングによる大きな変動は認められない

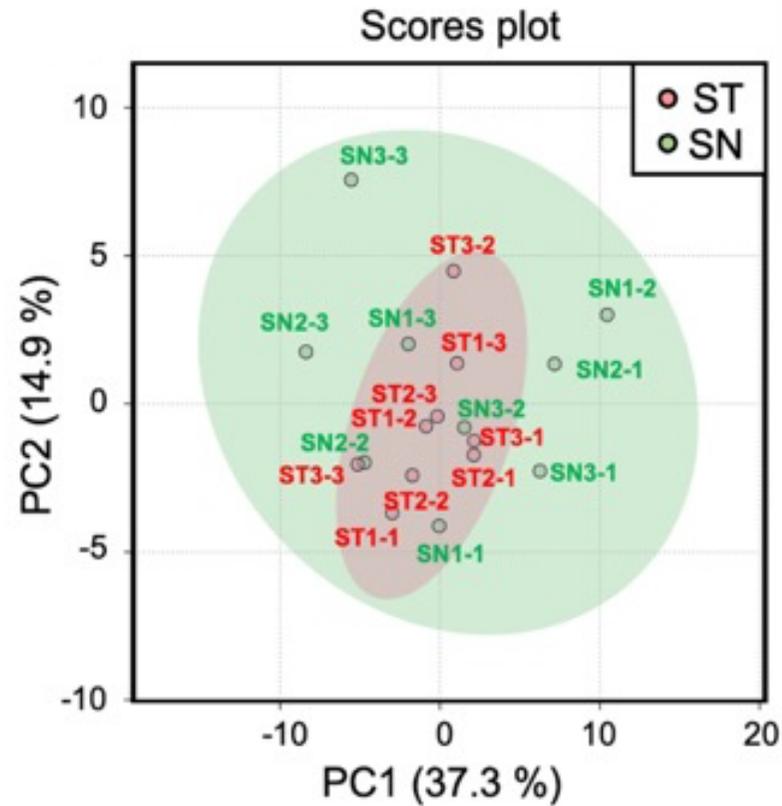
トマト果実のメタボローム解析(LC-ESI-MS)



UHPLC-ESI-MS (positive)



UHPLC-ESI-MS (negative)

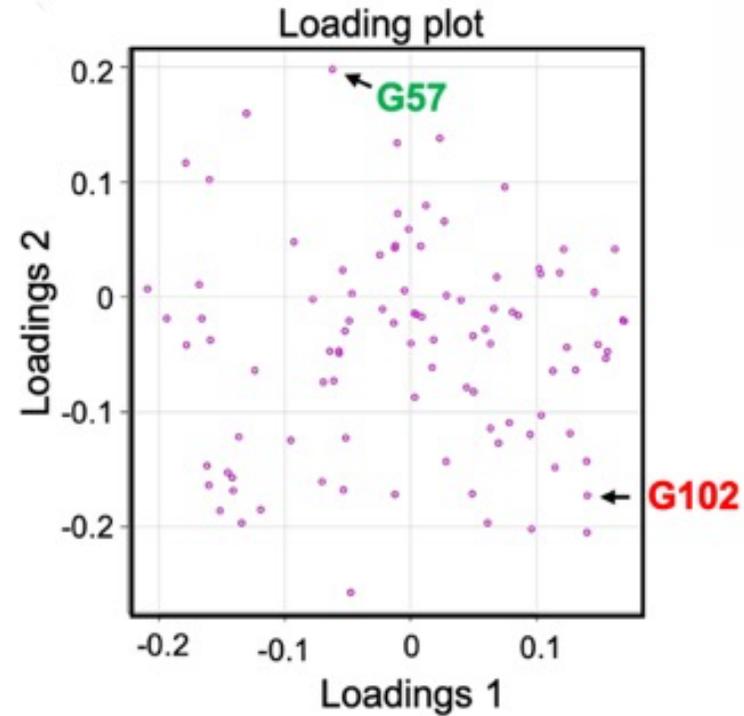
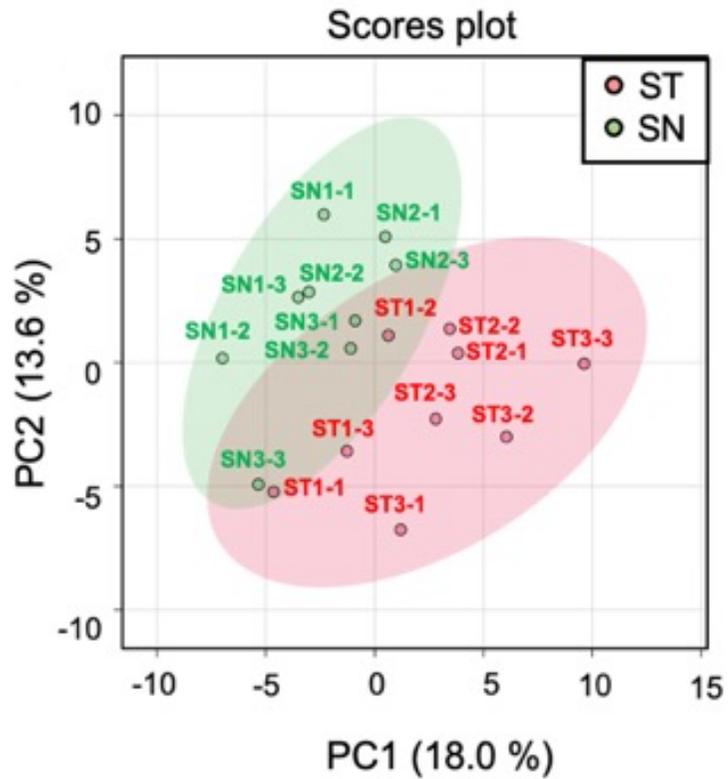


● GM台木 ● nonGM台木

93のピークについての主成分分析

➡ トランスグラフティングによる大きな変動は認められない

トマト果実のメタボローム解析 (GC-EI-MS)



GM台木 (red oval) nonGM台木 (green oval)

114のピークについての主成分分析

➡ 2つのピークが2倍以上の変動を示す
(接ぎ木個体間のばらつきに原因)

トマト果実の食品成分解析



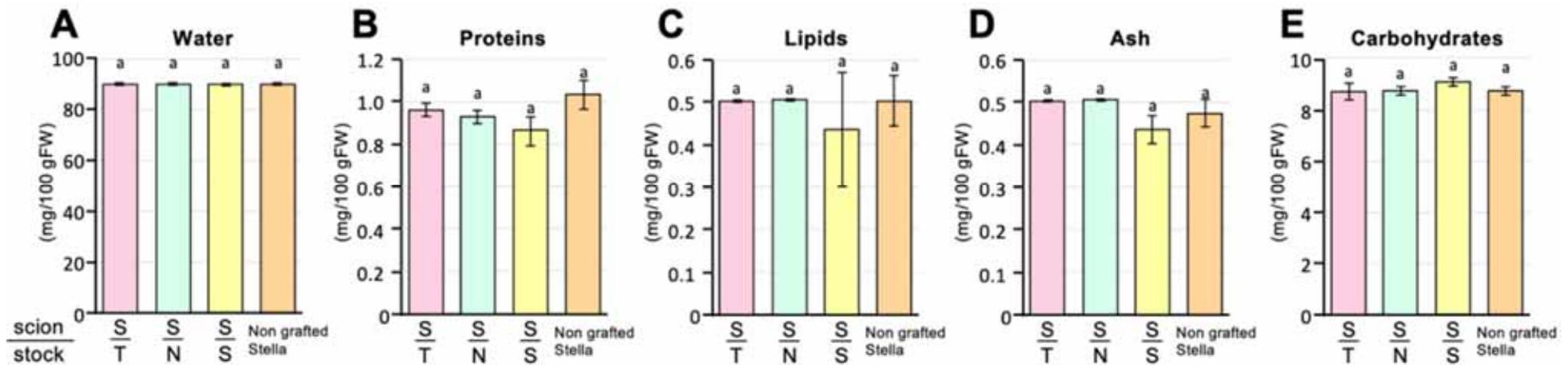
水分

タンパク質

脂質

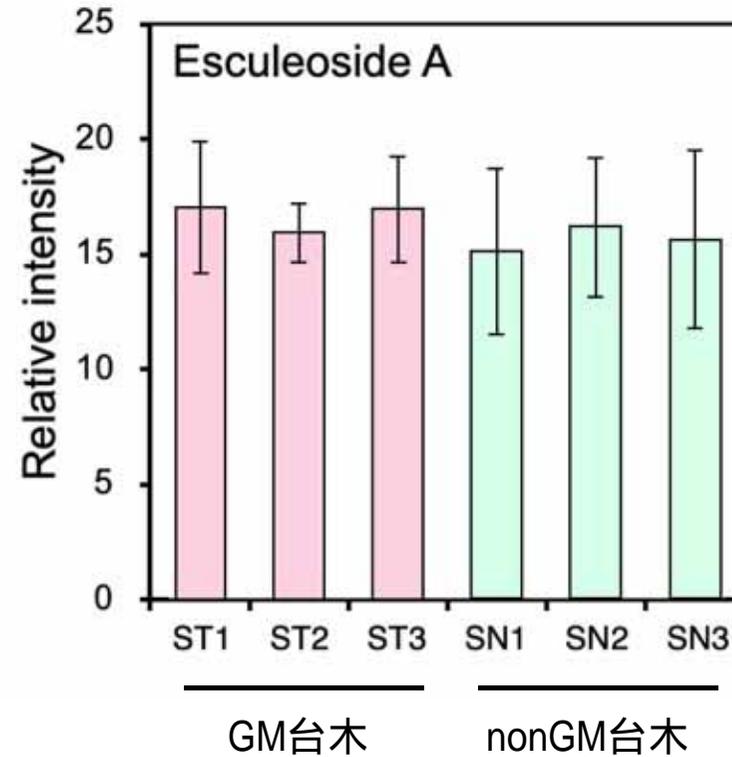
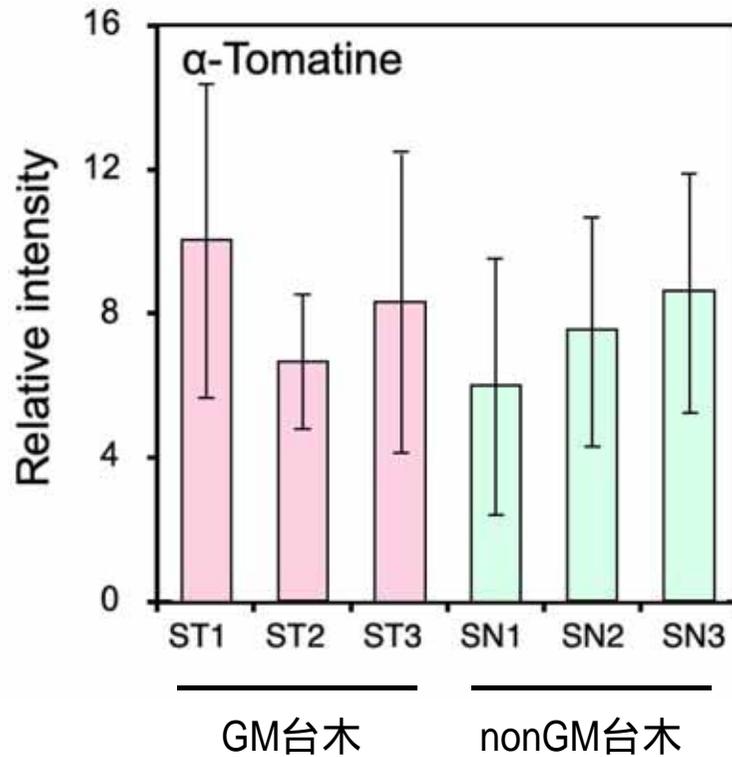
灰分

炭水化物



トランスグラフティングによる大きな変動は認められない

トマト果実の毒性成分の解析



トランスグラフティングによるステロイドグリコアルカロイド量には大きな変動は認められない

1, トランスグラフティング自体に食品としてのリスクはあるのか？



Non-GM
穂木

GM 台木

Stella
T-MT

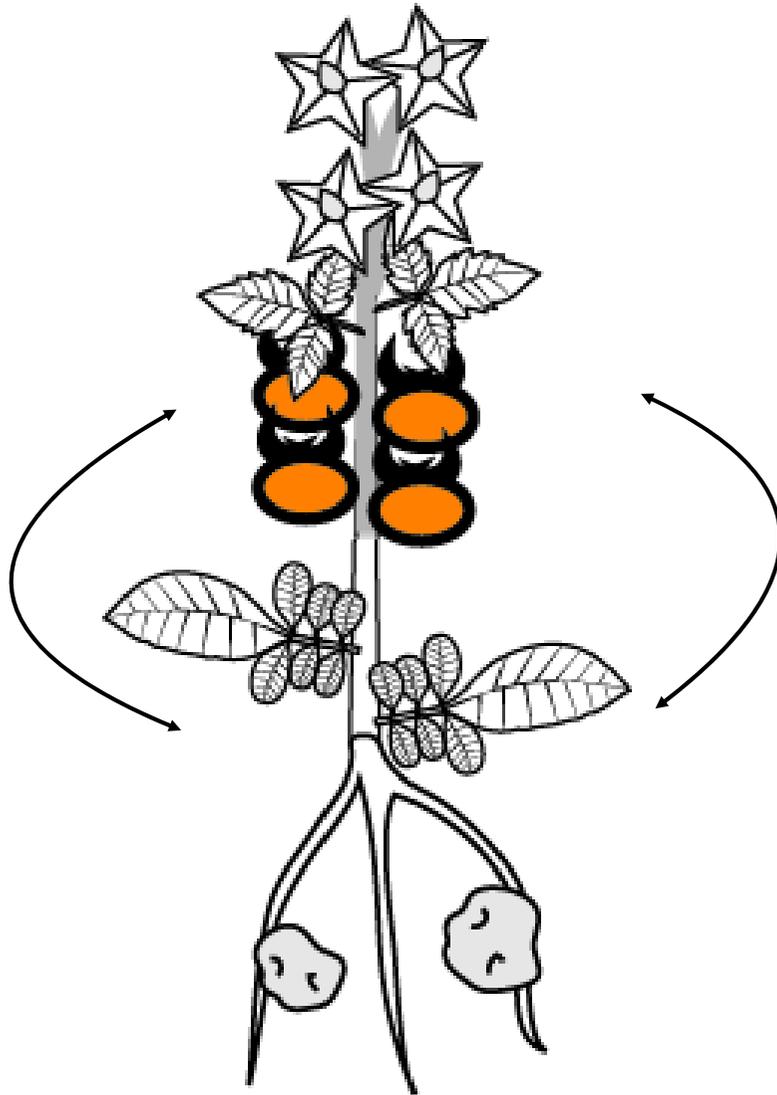
Stella
N-MT

今回の研究から
GUS遺伝子を導入したGM台木による
トランスグラフティングには
食品としての新たなリスクは
見いだされなかった

成果発表

Kodama, H., Miyahara, T., Oguchi, T., Tsujimoto, T., Ozeki, Y.,
Ogawa, T., Yamaguchi, Y., Ohta, D. (2021)
Food Safety 9: 32-47

2. トランスグラフティングにおける短鎖RNAの移動とDNAのメチル化



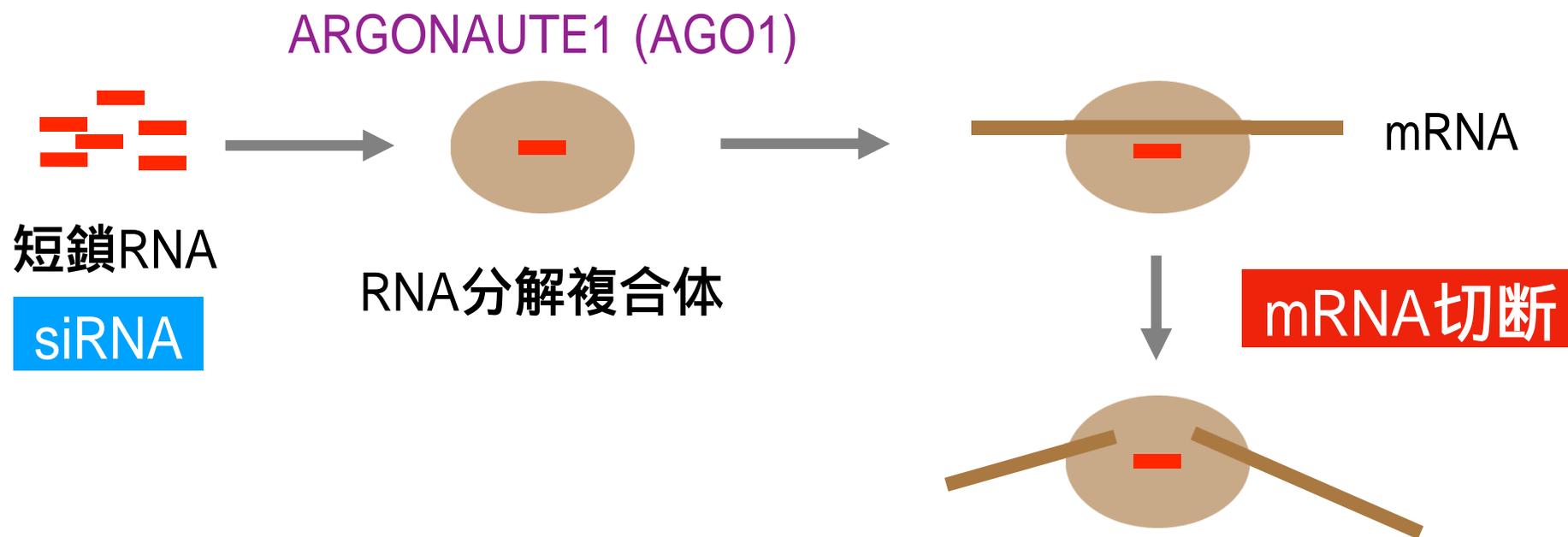
移動する因子

- (1) タンパク質
- (2) 短鎖RNA
遺伝子発現の調節
(mRNAの分解)
(DNAのメチル化)
- (3) 栄養成分
- (4) 無機塩類
- (5) 低分子化合物
(栄養阻害物質)
(二次代謝産物)

← 今回のテーマ

RNA サイレンシング

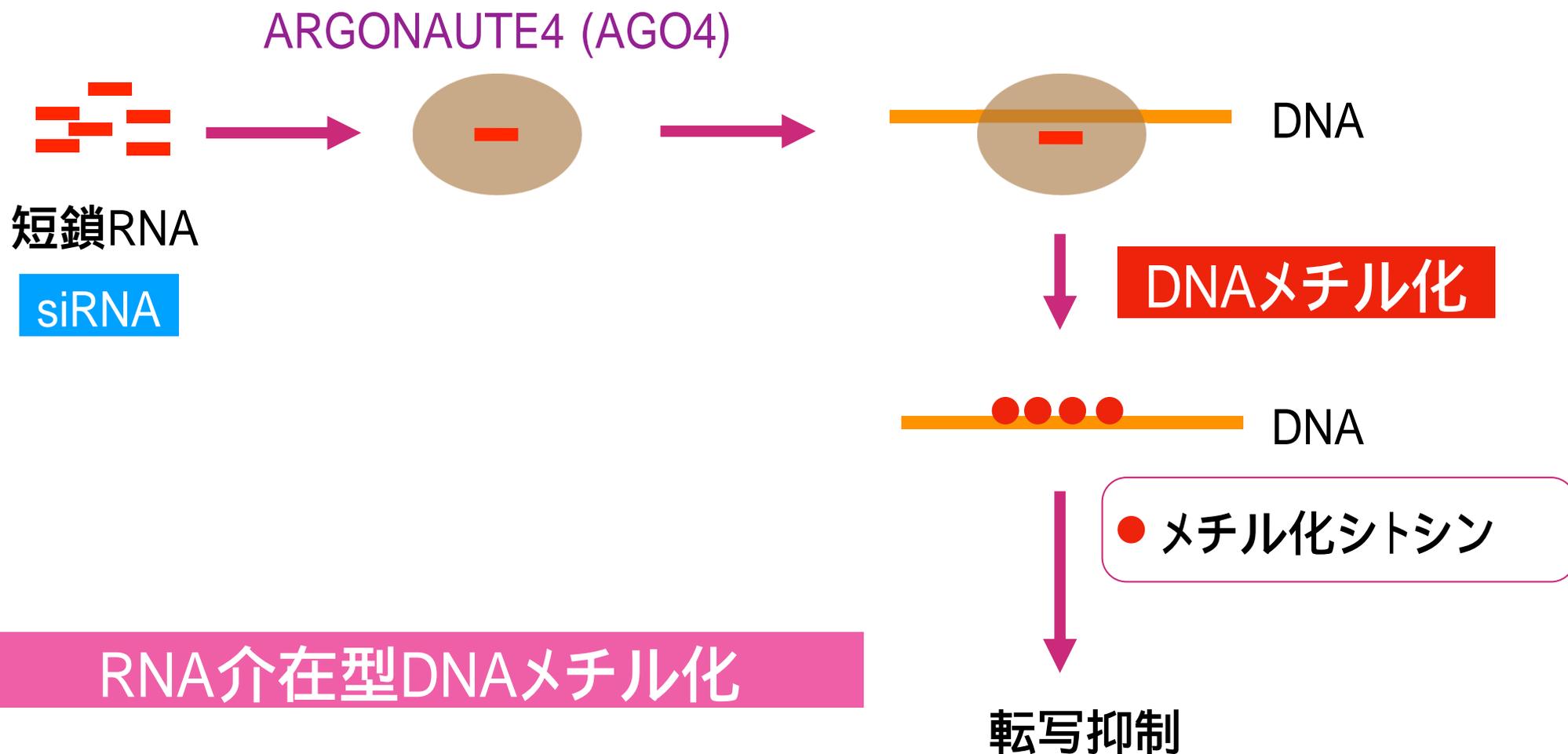
21-24塩基の短いRNA鎖によって遺伝子発現が抑制される仕組み



PTGS (転写後遺伝子サイレンシング)

RNA サイレンシング

21-24塩基の短いRNA鎖によって遺伝子発現が抑制される仕組み



トランスグラフティングにおける短鎖RNAの移動とDNAのメチル化

Non-GM 穂木

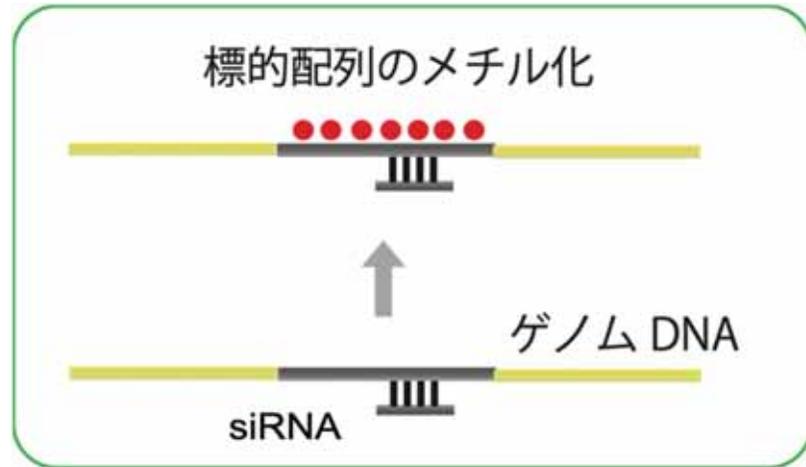
WT タバコ
(もしくは 35S-LUC
タバコ)



↑
35S 抑制
siRNA

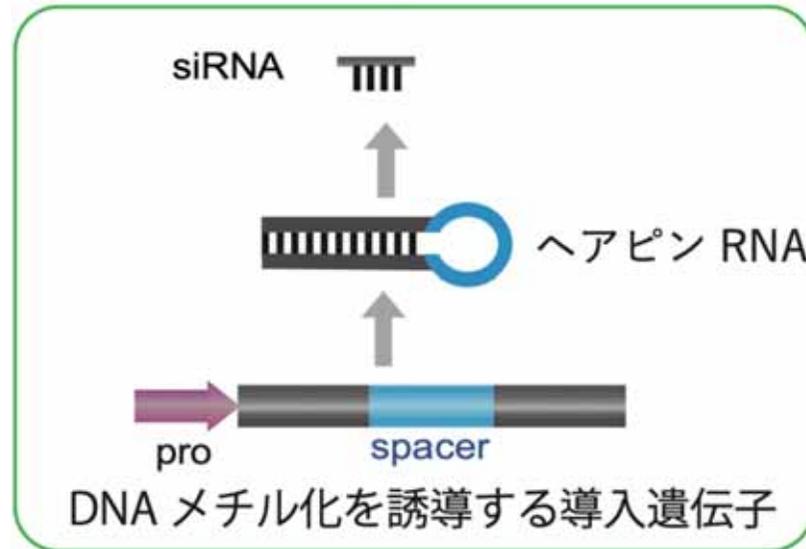
35S プロモーター
抑制 siRNA タバコ

GM 台木



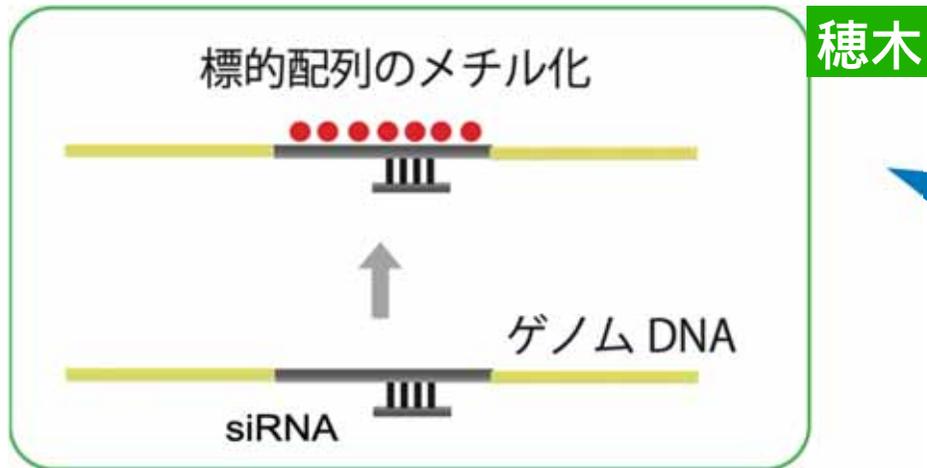
穂木

↑ 接ぎ木面



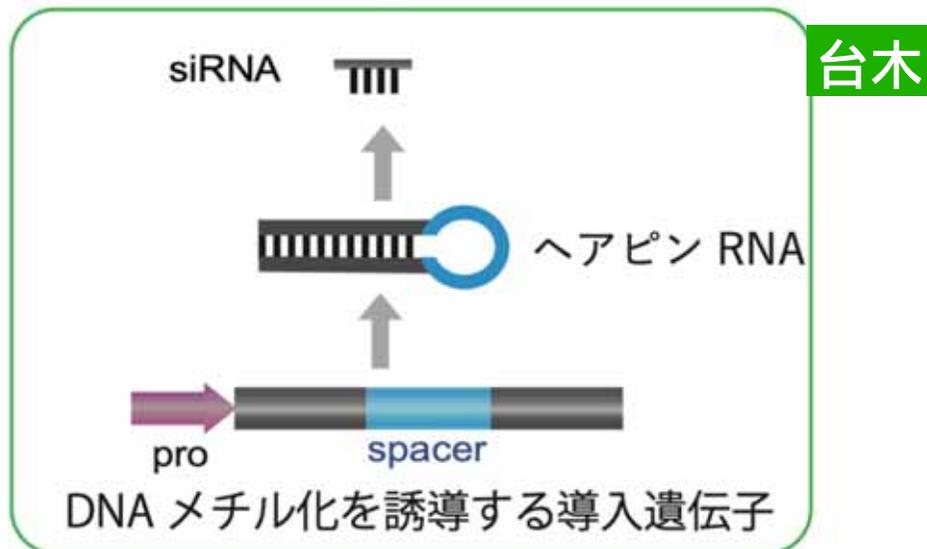
台木

トランスグラフティングにおける短鎖RNAの移動とDNAのメチル化



穂木

↑ 接ぎ木面

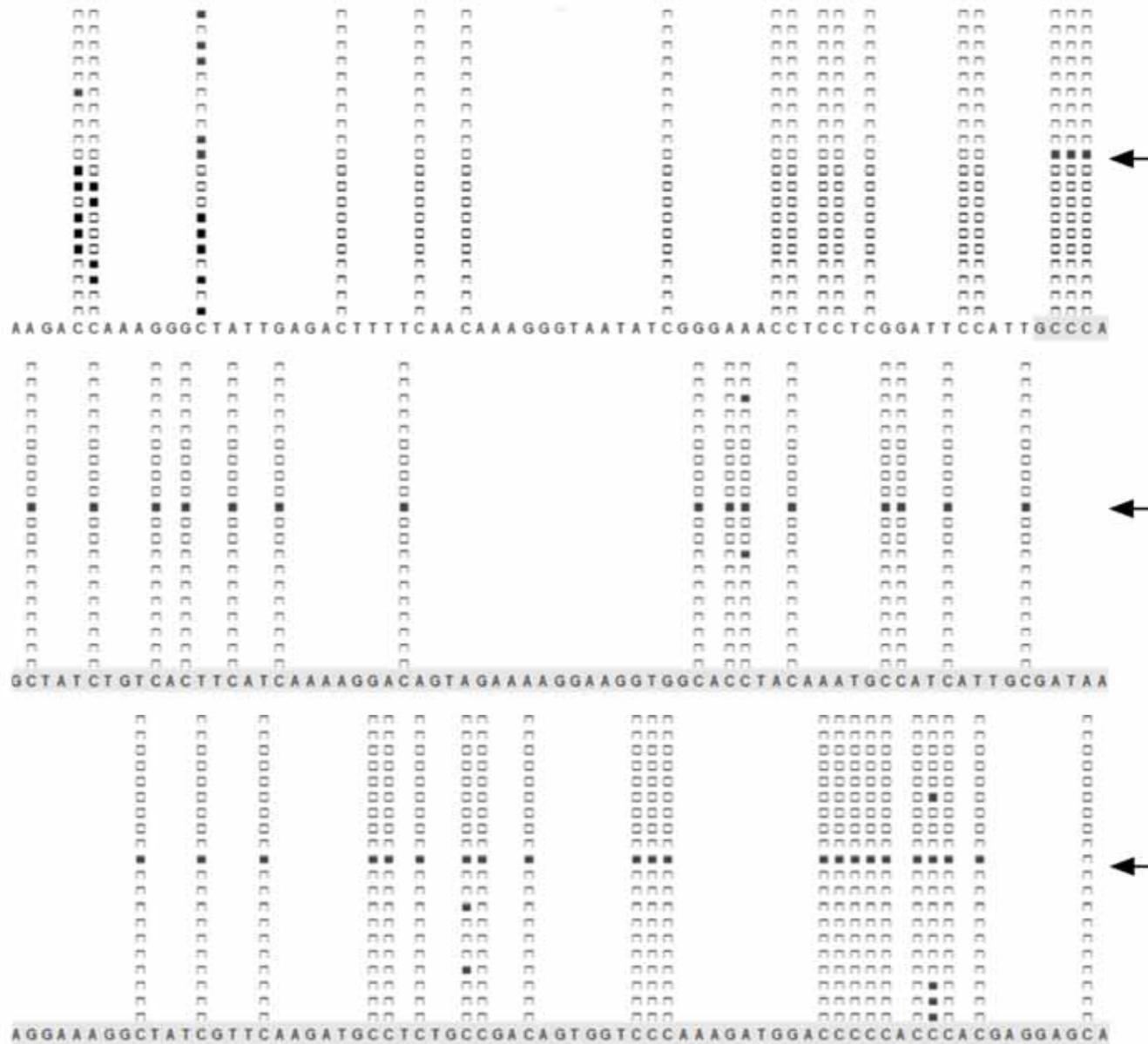


台木

研究項目 (以下、すべて穂木)

- (1) 標的配列のメチル化
- (2) 短鎖RNAの検出
- (3) トランスクリプトーム解析
- (4) プロテオーム解析
- (5) メタボローム解析

穂木における標的配列のメチル化



塩基配列は短鎖RNAの標的配列
:メチル化シトシン

35S pro-LUC
GM穂木



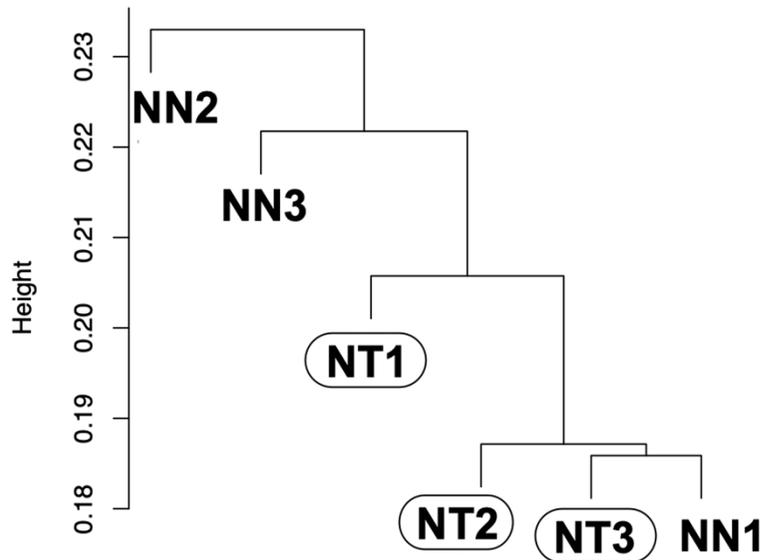
35S pro標的
siRNA産生GM台木

標的配列に弱いメチル化を検出

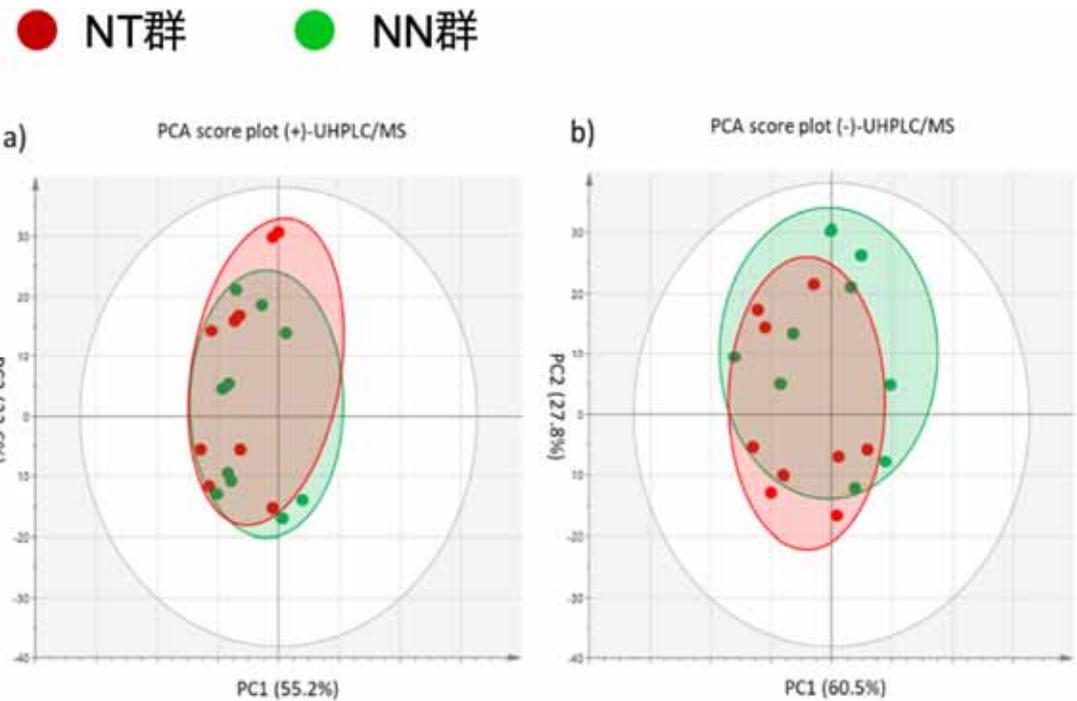
標的配列を有する短鎖RNAごく少量検出



タバコ葉の トランスクリプトーム解析



タバコ葉のプロテオーム解析



穂木 / 台木: NT群 (WT / Transgenic) , NN群 (WT / WT)



短鎖RNA産生台木 (NT群) とWT台木 (NN群) との間でサンプルが分離しない

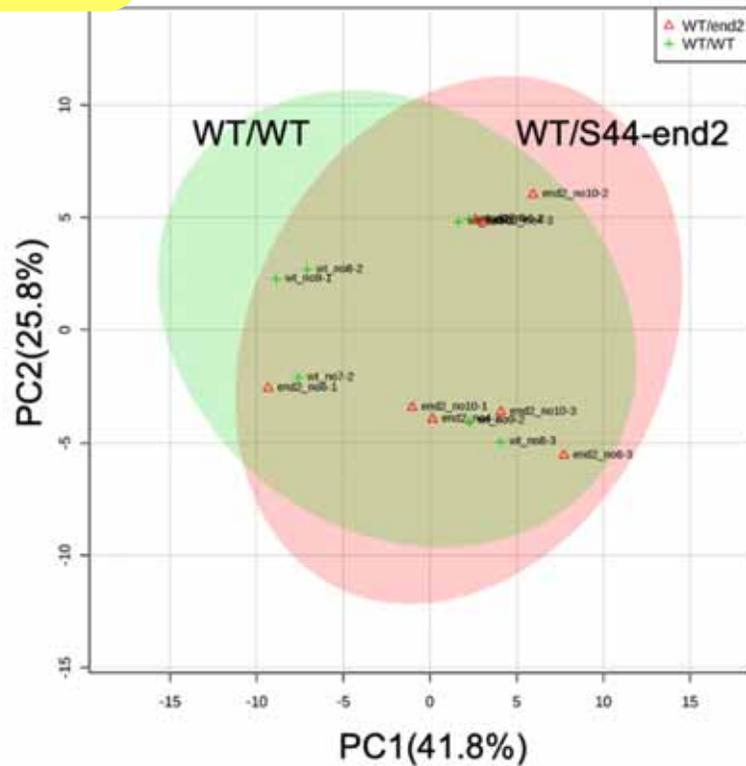
DNAメチル化



タバコ葉のメタボローム解析

GC-MS

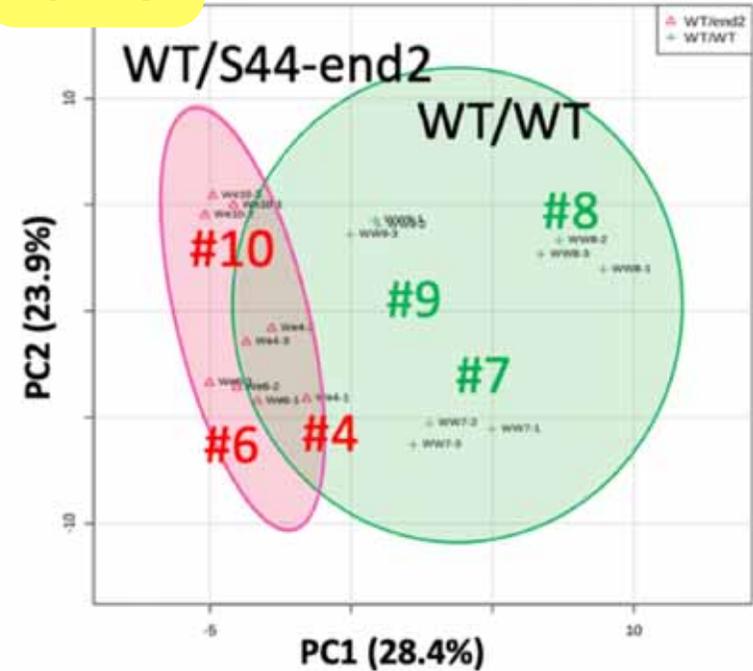
Scores Plot



- WT/S44-end2 (NT群) クラスタ
- WT/WT (NN群) クラスタ

LC-MS

Scores plot



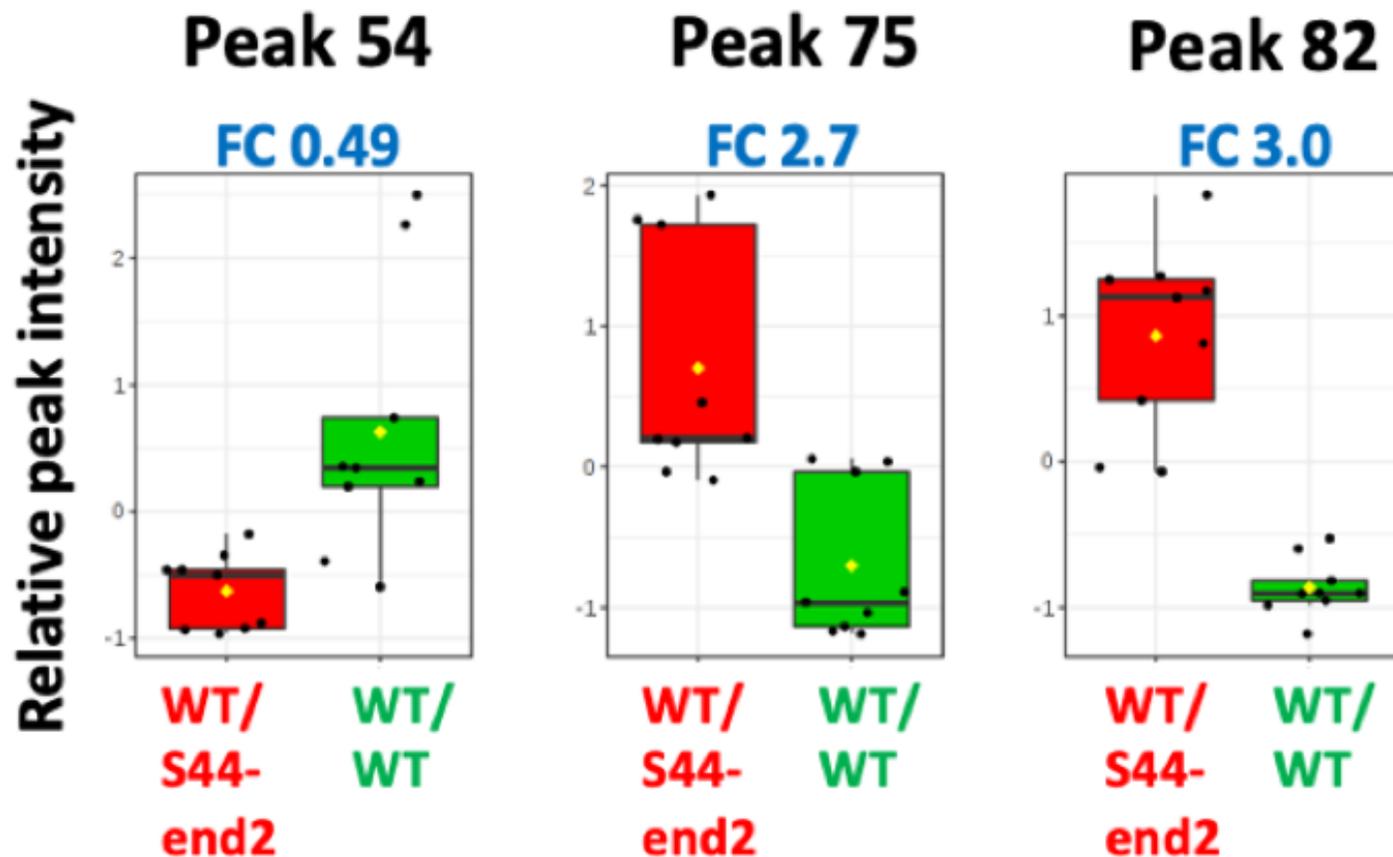
- WT/S44-end2 (NT群) クラスタ
- WT/WT (NN群) クラスタ

短鎖RNA産生台木とWT台木との間で分布が分離せず

短鎖RNA産生台木とWT台木との間でわずかにサンプルの分布が分離



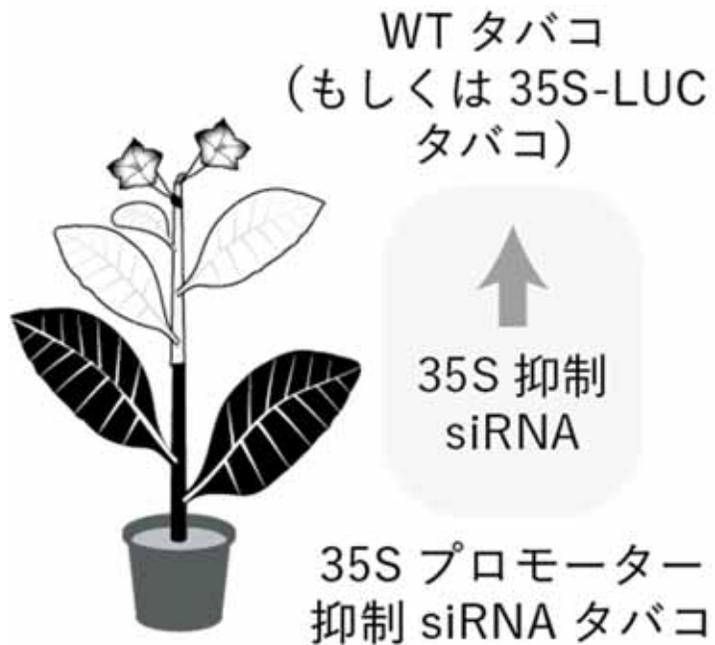
LC-MS



主成分分析のクラスター分離の要因: peak 54, 75, 82のイオンに起因し、特に多く含まれる特定のサンプル(個体)があったことがクラスター分離の原因(群の特徴ではなく、個体差)

トランスグラフティングにおける短鎖RNAの移動とDNAのメチル化

Non-GM 穂木



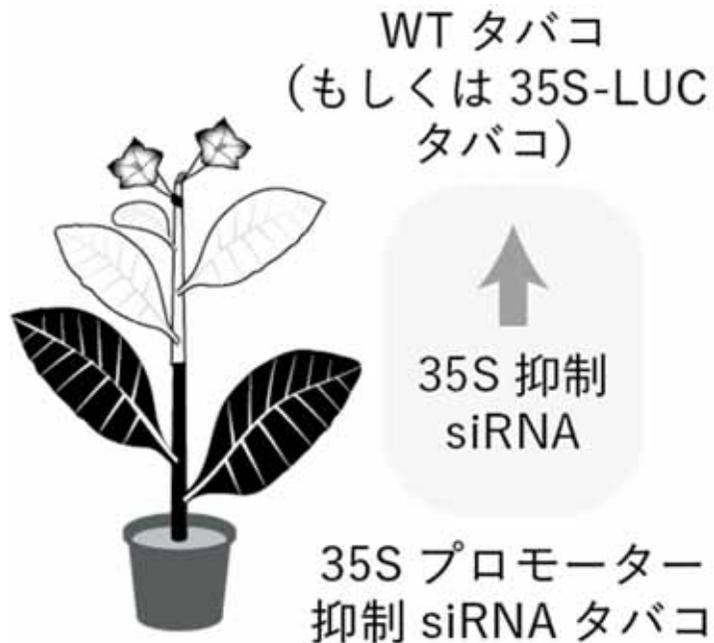
- 研究項目 (以下、すべて穂木)
- (1) 標的配列のメチル化
 - (2) 短鎖RNAの検出
 - (3) トランスクリプトーム解析
 - (4) プロテオーム解析
 - (5) メタボローム解析

GM 台木

結果: 短鎖RNAは移動し、標的配列のメチル化を部分的に誘導したが、オミックス解析により、その影響は極めて限定されていた。

トランスグラフティングにおける短鎖RNAの移動とDNAのメチル化

siRNAの移動:ごく少量
標的配列のDNAメチル化:ごく少量
オミックスへの影響:限定された影響



nonGMですが、

食経験あり

異なる種間での接ぎ木



台木からの短鎖RNAの移動により
穂木でのDNAメチル化パターンに
大きな影響があることが報告

成果発表

Kodama, H., Umeyama, Y., Miyahara, T., Oguchi, T., Tsujimoto, T.,
Ozeki, Y., Ogawa, T., Yamaguchi, Y. Ohta, D.
Food Safety (in press)

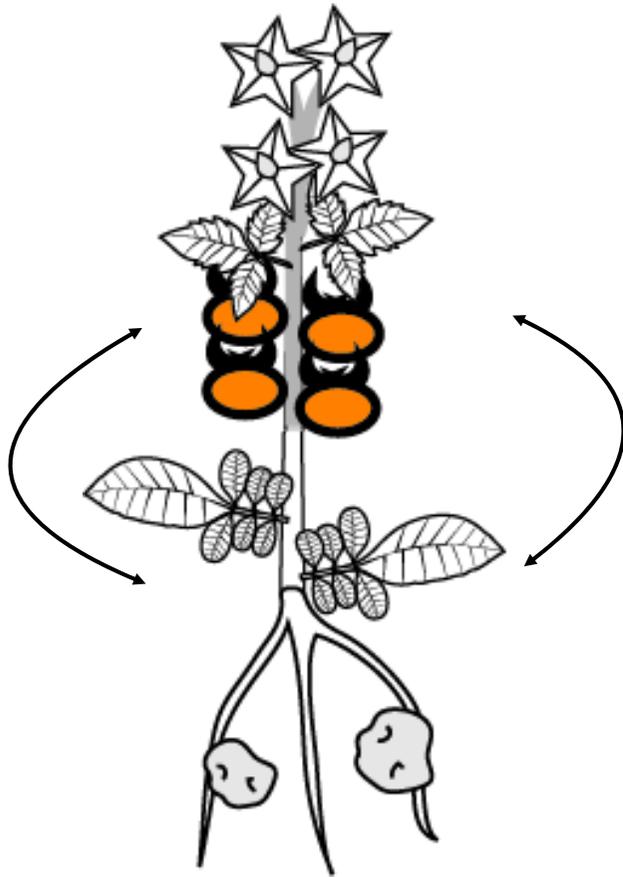
今回の研究範囲ではありませんが、

移動する因子

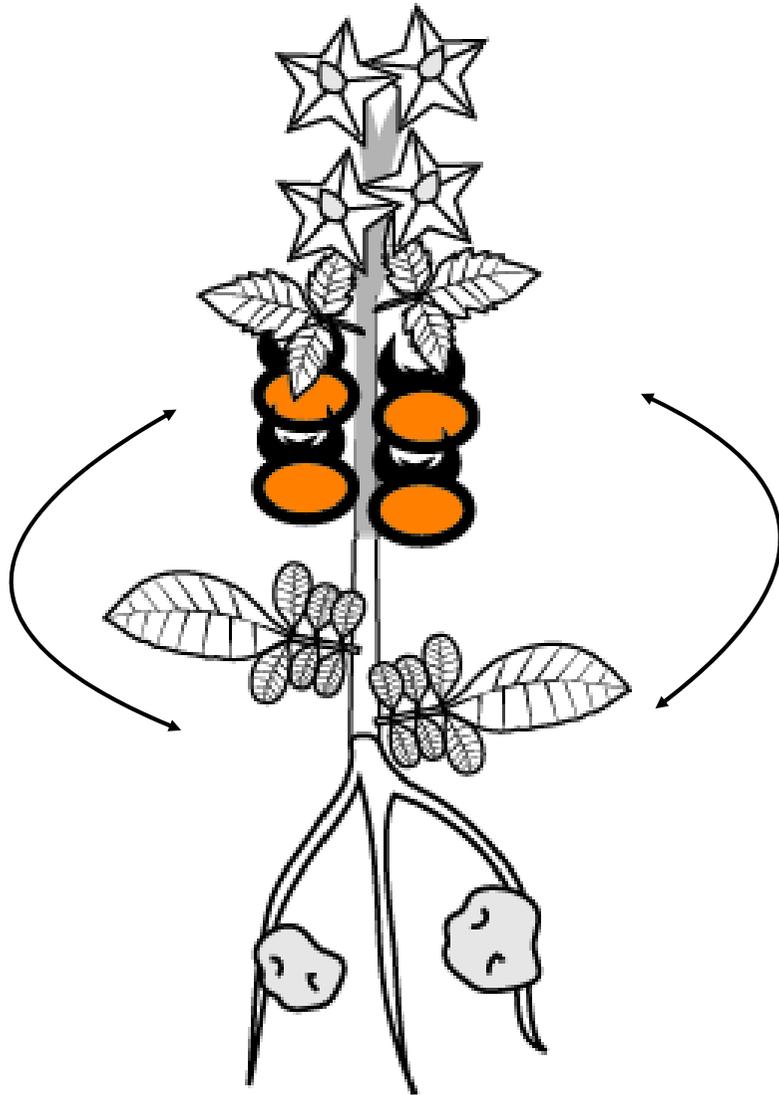
- (1) タンパク質
- (2) 短鎖RNA
遺伝子発現の調節
(mRNAの分解)
(DNAのメチル化)
- (3) 栄養成分
- (4) 無機塩類
- (5) 低分子化合物
(栄養阻害物質)
(二次代謝産物)

短鎖RNAが穂木に移動し、
場合によって大量に増幅

内在性遺伝子も標的
(増幅される場合もある)



3. トランスグラフティングにおけるタンパク質の移動



移動する因子

- (1) タンパク質
- (2) 短鎖RNA
遺伝子発現の調節
(mRNAの分解)
(RdDM)
- (3) 栄養成分
- (4) 無機塩類
- (5) 低分子化合物
(栄養阻害物質)
(二次代謝産物)

← 今回のテーマ

トランスグラフティングにおけるタンパク質の移動

Non-GM 穂木

WT タバコ



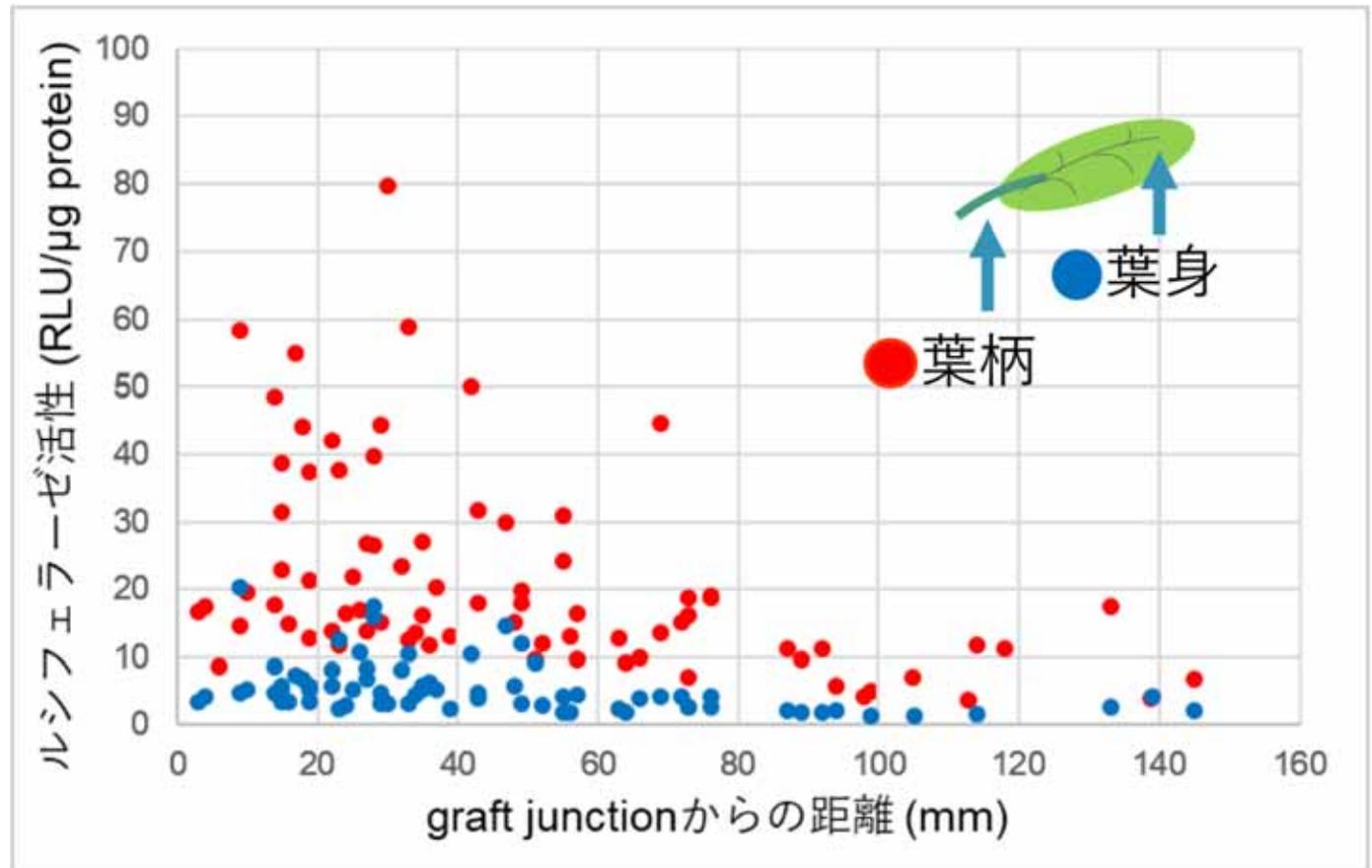
ルシフェラーゼ
発現タバコ

GM 台木

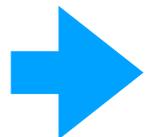
研究項目 (以下、穂木部分)

- (1) LUC活性測定
- (2) トランスクリプトーム解析

トランスグラフティングにおけるタンパク質の移動

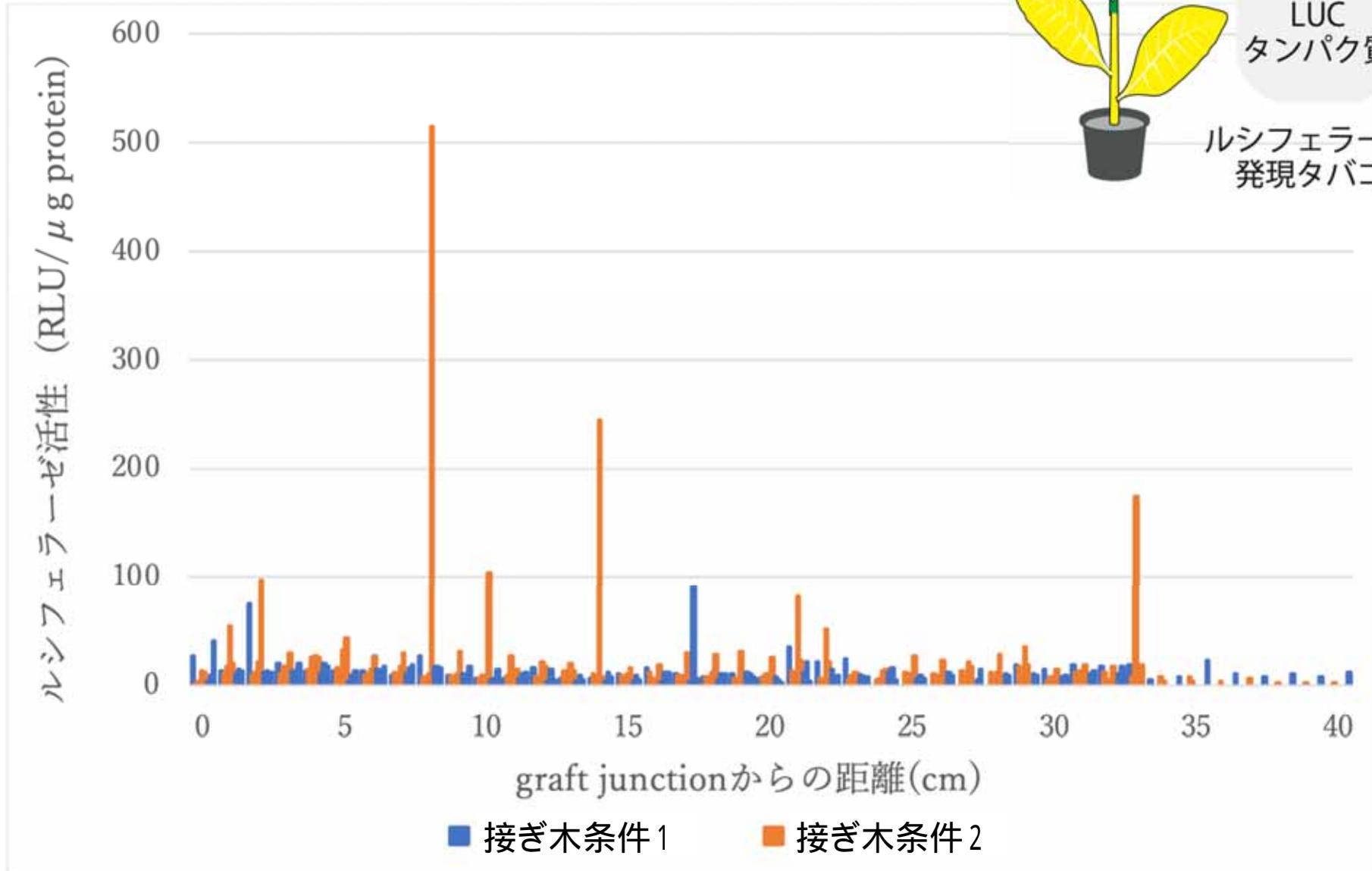
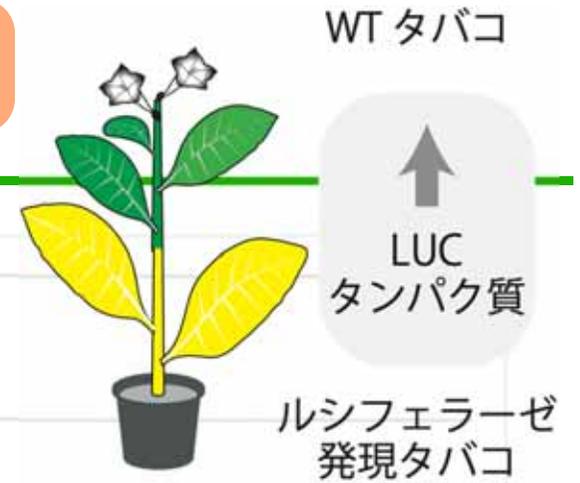


結果



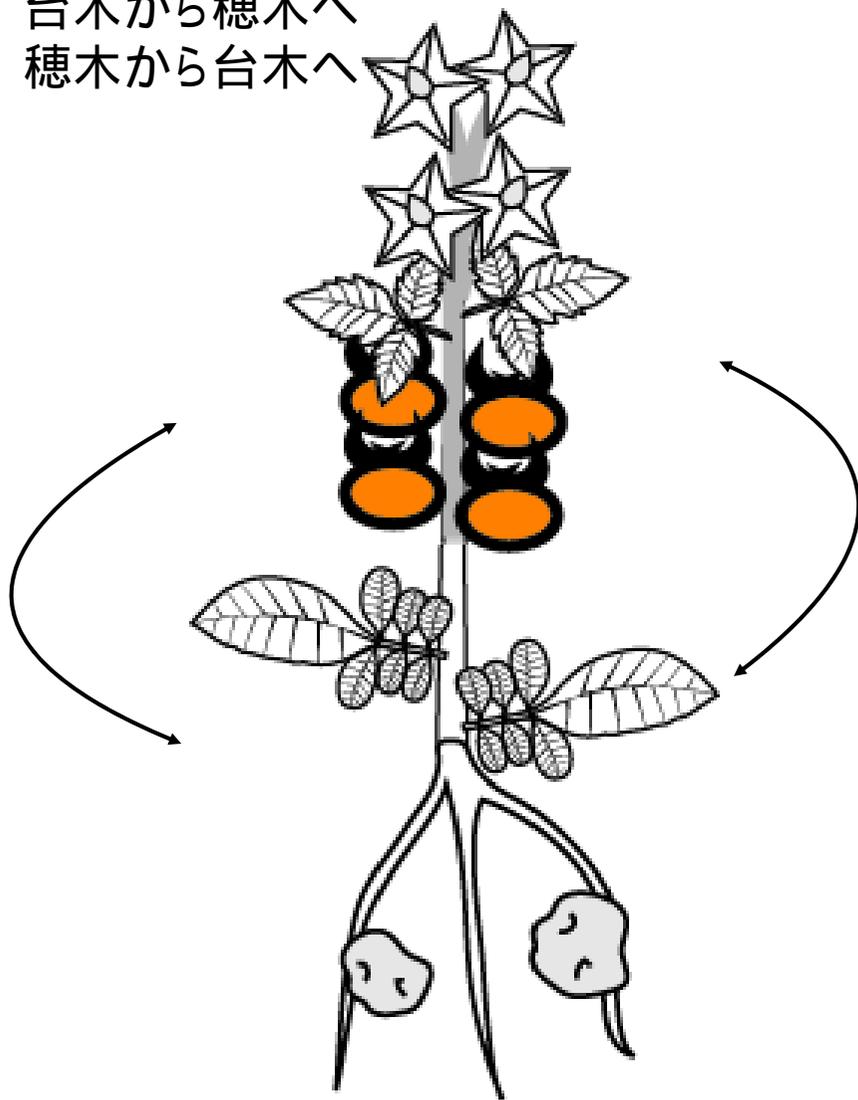
約62 kDaの分子量であるルシフェラーゼが穂木にて検出。
葉柄に多く分布

トランスグラフティングにおけるタンパク質の移動



接ぎ木部分から非常に遠くまで輸送される場合もある

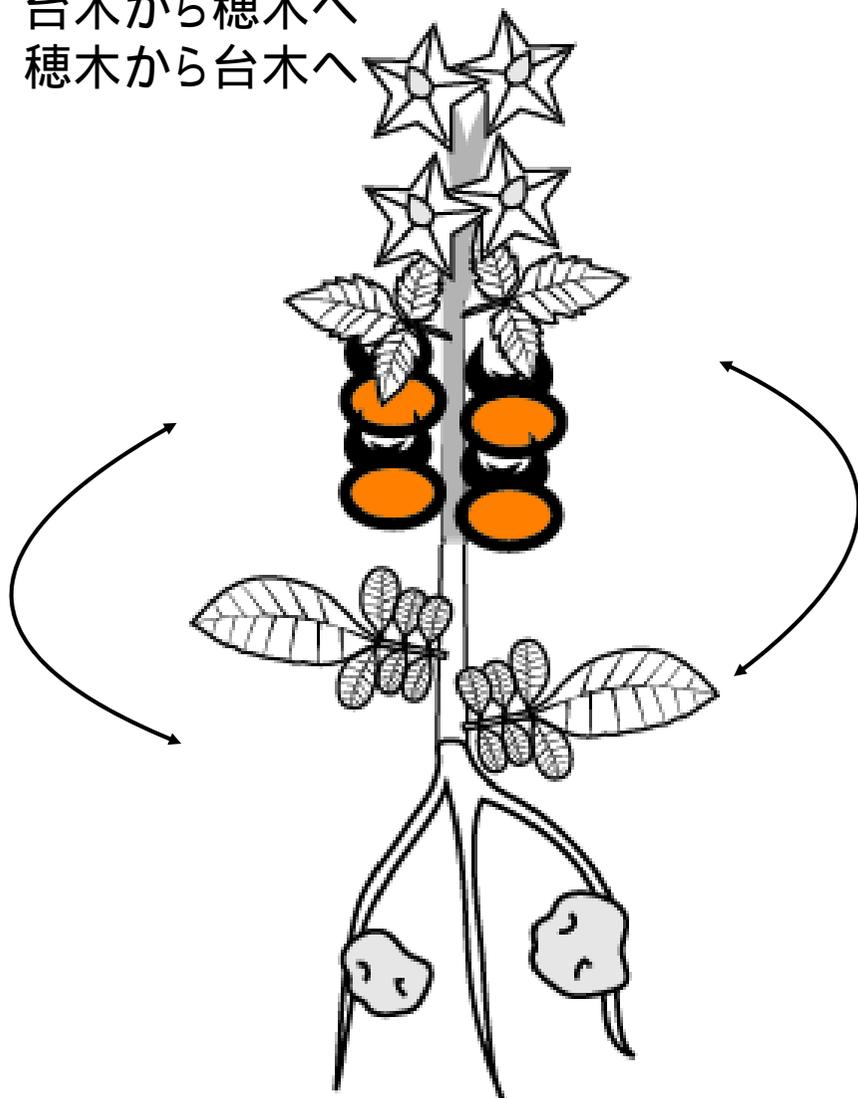
台木から穂木へ
穂木から台木へ



結論

1. 遺伝子組換え台木、もしくは穂木を用いる接ぎ木技術そのものには、食品の安全性上のリスクはない
2. 短鎖RNAは移動し、標的ゲノム配列をメチル化しうる。
3. 組換えタンパク質は、台木から穂木へと移動しうるため、アレルギー性、毒性の観点でのリスク評価が必要である可能性がある。

台木から穂木へ
穂木から台木へ



さらに検討の余地がある点

1. タンパク質の長距離移動に影響を及ぼす環境因子
2. 宿主の代謝系と相互作用する導入遺伝子の場合、代謝産物の長距離移動
3. mRNAの分解をもたらす短鎖RNAは穂木で内在性遺伝子もターゲットになり、増幅される場合がある。

課題名

導入遺伝子が存在しない宿主ゲノム遺伝子発現改 変植物由来食品の安全性評価点の解明

ご視聴ありがとうございました

研究代表
児玉 浩明
千葉大学大学院園芸学研究院

研究グループ
小関良宏(東京農工大学)
太田大策(大阪府立大学)
小口太一(筑波大学)