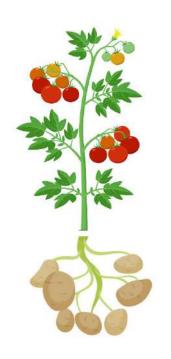
令和3-4年度食品健康影響評価技術研究

"遺伝子組換え台木と非組換え穂木の間の生体成分輸送に 起因する食品安全性の評価点解明"



大阪公立大学大学院農学研究科 太田大策



令和3-4年度食品健康影響評価技術研究

太田 大策(代表・大阪公立大学大学農学研究科) 研究総括と植物体のメタボローム解析

児玉 浩明(千葉大学大学院園芸学研究科) モデル接ぎ木植物体の作出

望月 知史(大阪公立大学大学農学研究科) ウイルス感染による組換えタンパク質の体内移行亢進モデルの作出と解析

宮原 平(千葉大学大学院園芸学研究科) 台木から導入遺伝子由来の組換えタンパク質の穂木への移行の検証 植物体のトランスクリプトーム解析

発表内容

•背景

作物(栽培化)

遺伝子組換え (GM), New Plant Breeding Techniques (NPBT)

・接ぎ木 (トランスグラフト: GMとnonGM)

トランスグラフトとは?

安全性評価

先行研究(食品健康影響評価技術研究)

導入遺伝子産物(酵素タンパク質)が植物体内で移行する 見過ごされていた評価ポイント

•研究計画と結果

植物材料(接ぎ木体)の作出 タンパク質移行、接ぎ木体の解析

・まとめ

安全性評価の考え方

作物(野生種から栽培種へ)

~ BC 5,000

~ 1800

~ 1980

2000~

野生種

在来種

栽培品種

多様化



おいしくない 毒がある 収量が少ない



おいしい 栽培しやすい 収穫しやすい 病害虫に強い



交配(交雑) "遺伝形質"を賦与

~ BC 5,000

~ 1800

~ 1980

2000~

経験 種子保存



交配 選抜



課題:時間がかかる

異種交配できない



おいしくない 毒がある 収量が少ない



おいしい 栽培しやすい 収穫しやすい 病害虫に強い



交配(交雑) "遺伝形質"を賦与

~ BC 5,000

~ 1800

~ 1980

2000~



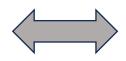
- Biotechnology
 - 変異導入•選抜(加速)

品質,生育,収穫

・遺伝子組換え (GM作物)

除草剤耐性, 昆虫食害防除

交配(交雑)"遺伝形質"を賦与 課題の解決



時間がかかる、異種交配できない



1990年 ~ 遺伝子組換え (GM作物, 種子植物)

外来DNAが存在する



リスク評価が必要



安全性評価





安全性評価のポイント

GM作物

- 1. 宿主の性質(食経験,遺伝的先祖の有害生理活性物質)
- 2. 遺伝子組換え(挿入遺伝子,薬剤耐性遺伝子,導入方法)
- 3. 組換え体(挿入部位, 意図しない翻訳産物, 発現情報)
- 4. 翻訳産物の性質(アレルギー誘発性,安定性)
- 5. 翻訳産物の活性(宿主代謝系への影響)
- 6. 構成成分への影響 (アミノ酸, 脂肪酸, 栄養阻害物質, 生理活性物質など)

交配(交雑)"遺伝形質"を賦与



課題の解決

時間がかかる、異種交配できない



1990年 ~ 遺伝子組換え(GM作物) 外来DNAが存在する



21世紀 ~

New Plant Breeding Techniques (NPBT)



NPBTに由来する食品・製品



開発過程でGM技術 → 最終産物に異種生物由来の核酸配列は無い

- ゲノム編集技術 トマト
- オリゴヌクレオチド誘発突然変異導入技術
- シスジェネシス/トランスジェネシス
- RNA介在型DNAメチル化(RdDM)
- 逆育種
- アグロインフィルトレーション
- GM台木等を利用した接ぎ木

NPBTに由来する食品・製品



開発過程でGM技術 最終産物に異種生物由来の核酸配列は無い

- ゲノム編集技術 トマト
- オリゴヌクレオチド誘発突然変異導入技術
- シスジェネシス/トランスジェネシス
- RNA介在型DNAメチル化(RdDM)
- 逆育種
- アグロインフィルトレーション
- GM台木等を利用した接ぎ木



食品安全性



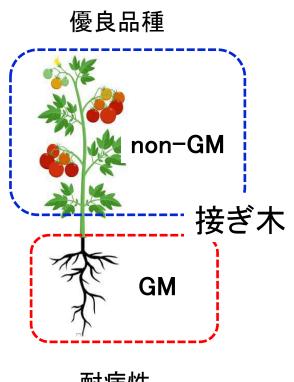




トランスグラフト作物

接ぎ木トランスグラフト作物

GM部位とnon-GM部位を持つ接ぎ木体



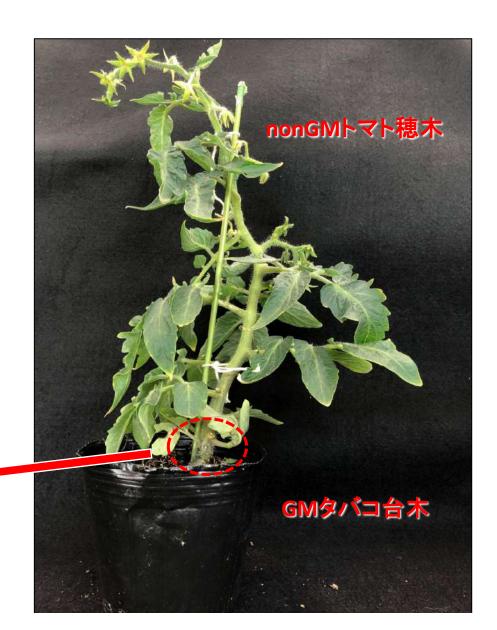
耐病性 昆虫食害 耐旱性

- GM植物を使って容易に作出 開発済GMのメリットを活用 実用化の加速
- non-GM部位を食用とする
 可食部ゲノムに導入遺伝子は無い
- → 同一個体にはGM部位
 - → non-GMとして扱えるのか?
 - → 食品としての安全性?
 - ⇒ 評価の基礎となる科学的エビデンス

接ぎ木 トランスグラフト作物







トランスグラフトとヘテロ・トランスグラフト

接ぎ木系統		
	穂木(食用)	<u>台木</u>
ホモグラフト*	nonGM	nonGM
ヘテログラフト**	nonGM	nonGM
ホモ・トランスグラフト (同種)***	nonGM	GM
ヘテロ・トランスグラフト (異種植物)****	nonGM	GM

- * 同種植物間の接ぎ木
- ** 異種植物間の接ぎ木
- ** GMを含む接ぎ木(同種植物)
- *** GMを含む接ぎ木(異種植物)

接ぎ木トランスグラフト作物

トランスグラフト作物の安全性評価ポイント

GM作物の評価シナリオが基礎(承認済みGMを利用)

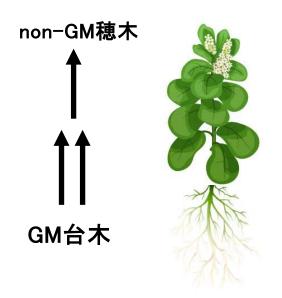
- 1. 宿主の性質(食経験,遺伝的先祖の有害生理活性物質)
- 2. 遺伝子組換え(挿入遺伝子,薬剤耐性遺伝子,導入方法)
- 3. 組換え体(挿入部位, 意図しない翻訳産物, 発現情報)
- 4. 翻訳産物の性質(アレルギー誘発性,安定性)
- 5. 翻訳産物の活性(宿主代謝系への影響)
- 6. 構成成分への影響 (アミノ酸, 脂肪酸, 栄養阻害物質, 生理活性物質など)

接ぎ木(先行研究)

平成31年・令和1年 食品健康影響評価技術研究 (課題番号:1902) 遺伝子組換え台木と非組換え穂木の間の生体成分輸送に起因する 食品安全性の評価点解明

同種間接ぎ木 ホモ・トランスグラフト

- 安全性の懸念は認められなかった(マルチオミクス解析)
- 毒性成分含量の増加はなかった



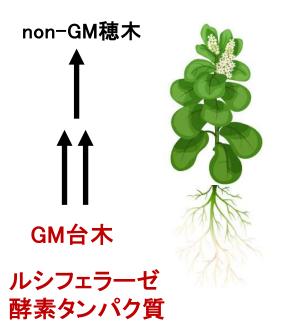
- 4. 翻訳産物の性質(アレルギー誘発性, 安定性)
- 5. 翻訳産物の活性(宿主代謝系への影響)
- 6. 構成成分への影響 (アミノ酸, 脂肪酸, 栄養阻害物質, 生理活性物質など)
- . Miyahara et al. (2023) Omics Profiles of Non-GM Tubers from Transgrafted Potato with a GM Scion. *Food Saf* . **11**, 1-20.
- 2. Kodama et al. Omics Profiles of Non-transgenic Scion Grafted on Transgenic RdDM Rootstock. *Food Saf* . **10**, 13-31.
- 3. Kodama et al. (2021) Effect of Transgenic Rootstock Grafting on the Omics Profiles in Tomato. *Food Saf* . 9, 32-47.

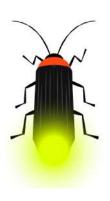
接ぎ木(先行研究)

平成31年・令和1年 食品健康影響評価技術研究 (課題番号:1902) 遺伝子組換え台木と非組換え穂木の間の生体成分輸送に起因する 食品安全性の評価点解明

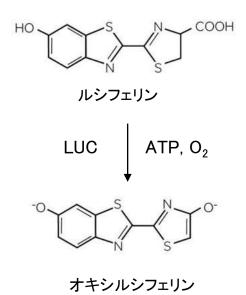
タバコどうしの接ぎ木 ホモ・トランスグラフト

- 安全性の懸念は認められなかった(マルチオミクス解析)
- 毒性成分含量の増加はなかった





ホタル LUC (ルシフェラーゼ) 分子量 62 kDa



接ぎ木(見過ごされていた評価点)

平成31年·令和1年 食品健康影響評価技術研究 (課題番号:1902)

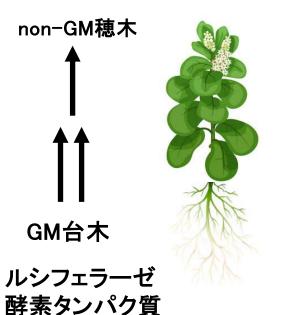
遺伝子組持

導入遺伝子が無い(non-GM部位)ということで見過ごされていた評価点

• 導入遺伝子産物が移行

タバコどうしの接き ホモ・トランスグラ

non-GM部位の内在代謝活性への影響



導入遺伝子産物(LUC)がnon-GM部位に移行した

Miyahara et al.

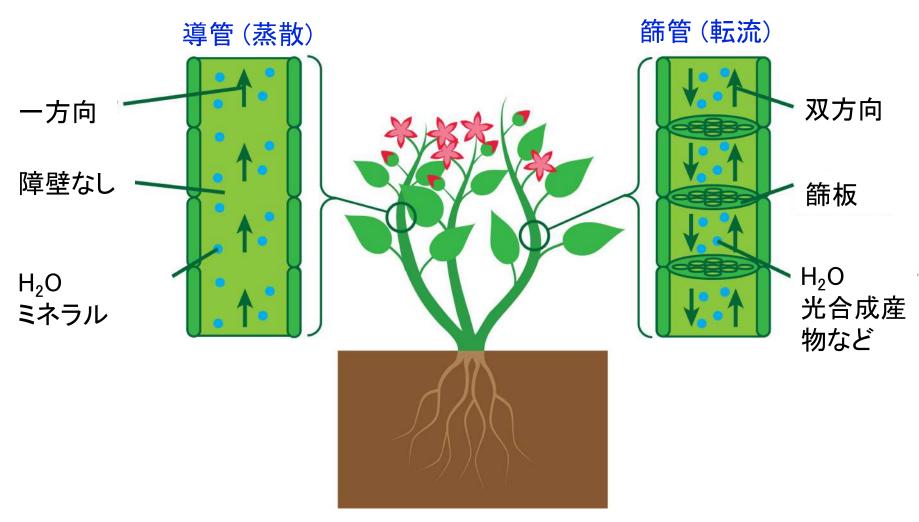
Discontinuous translocation of a luciferase protein beyond the graft junction in tobacco. (Food Safety 2024 in press)

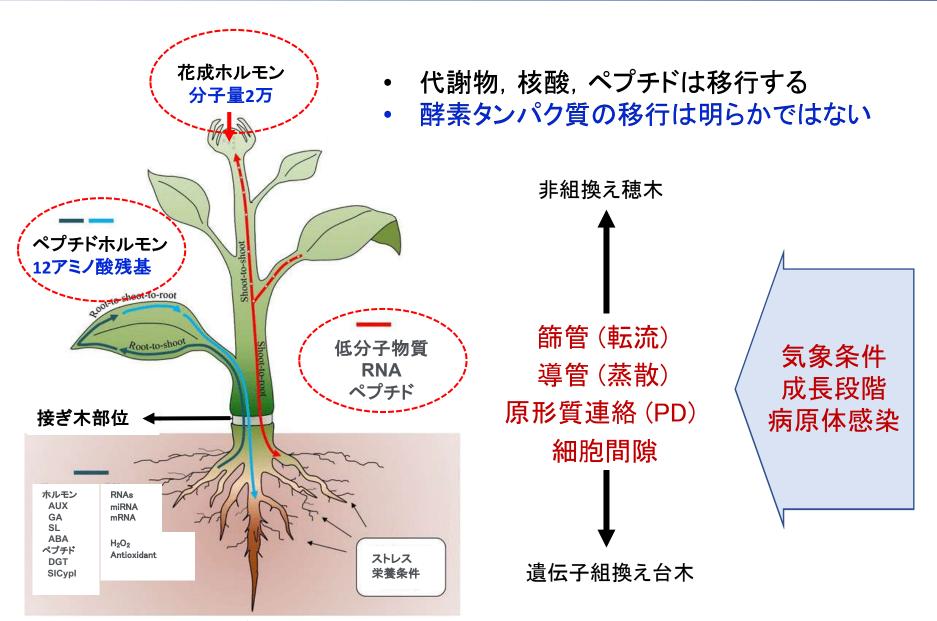


- ・ 見過ごされてきた安全性評価点(導入遺伝子産物の移行)
- タンパク質移行は評価ポイントとはなっていない
- 移行経路



物質移行経路(維管束植物)





PD (隣接細胞間の連絡経路)

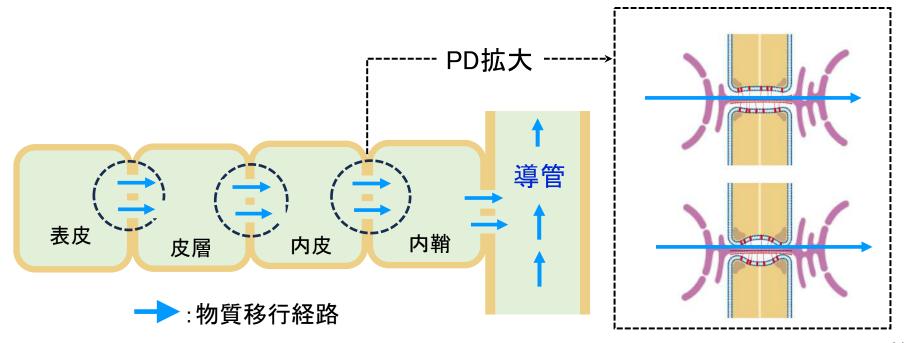
- 低分子化合物は自由に通過
- 高分子の移動は制限

PDと導管を通る経路 導入遺伝子産物の移行経路?

環境要因

植物の病原ウイルス Movement protein (MPタンパク質) PDを通る物質移動を亢進

導入遺伝子産物の移行促進?



安全性評価

トランスグラフト作物の安全性評価

GM作物の評価シナリオが基礎(承認済みGMを利用)

1. 宿主の性質(食経験,遺伝的先祖の

先行研究結果

- 2. 遺伝子組換え(挿入遺伝子,薬剤耐管
- 見過ごされていた重要な評価ポイント
- 3. 組換え体(挿入部位, 意図しない翻訳
- 4. 翻訳産物の性質(アレルギー誘発性,移行,安定性)
- 5. 翻訳産物の活性(宿主代謝系への影響)
- 6. 構成成分への影響 (アミノ酸, 脂肪酸, 栄養阻害物質, 生理活性物質など)

研究

トランスグラフト作物(GM台木とnon-GM穂木)

- ・ 同種植物間と異種植物間で違うのか?
- LUC以外の導入遺伝子産物も移行するか?
- 特異的な代謝物の移行はあるか?

研究 (材料)

トランスグラフト作物の作出(GM台木とnon-GM穂木)

供試植物(3種類)

タバコ (Nicotiana tabacum, N. benthamiana) トマト (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom)

GM植物の作出(3種類)

導入遺伝子(35Sプロモータ制御下で恒常的発現)

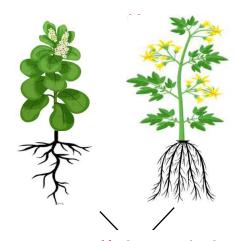
LUC (ホタル ルシフェラーゼ; 分子量 62 kDa)

GFP (クラゲ 緑色蛍光タンパク質; 分子量 29 kDa)

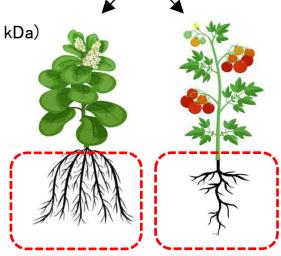
MP (キュウリモザイクウイルス 移行タンパク質; 分子量 30 kDa)

non-GM穂木

タバコ (N. tabacum, N. benthamiana) トマト (S. lycopersicum cv Micro-Tom)







補足資料4 モデル接ぎ木体(呼称のまとめ)

作出・解析した接ぎ木系統

接ぎ木系統名 (台木-穂木)		台木	穂木	
MT-MT (ホ -	モグラフト)	non-GMトマト non-GMト		
Nb-MT (^-	テログラフト)	non-GM タバコ	do.	
Nt-MT (^-	テログラフト)	non-GM タバコ	do.	
NtLUC-Nt	(ホモ・トランスグラフト)	LUC 発現タバコ	non-GM タバコ	
NtLUC-MT	(ヘテロ・トランスグラフト)	LUC 発現タバコ	non-GM トマト	
NtGFP-MT	(ヘテロ・トランスグラフト)	GFP 発現タバコ	do.	
NbGFP-MT	(ヘテロ・トランスグラフト)	GFP 発現タバコ	do.	
MTGFP-MT	(ホモ・トランスグラフト)	GFP 発現トマト	do.	
NbMP-MT	(ヘテロ・トランスグラフト)	MP 発現タバコ	do.	

導入遺伝子: GFP; 緑色蛍光タンパク質, LUC; ホタルルシフェラーゼ, MP; CMV 移行タンパク質 供試植物: Nt; Nicotiana tabacum (タバコ), Nb; N. benthamiana (タバコ), MT; Solanum lycopersicum cv Micro-Tom (トマト).

凡例: NtLUC; LUC 発現する Nt, NtGFP; GFP 発現する Nt.

トランスグラフト作物の作出(GM台木とnon-GM穂木)

解析計画

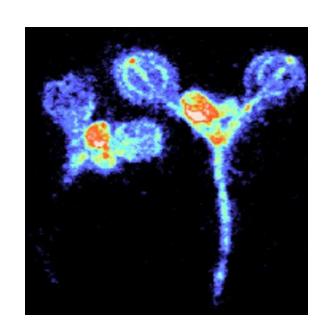
- 1) タンパク質移行
 - ・ LUC, GFPタンパク質の移行 (存在場所を高感度で検出できる)



オワンクラゲ GFP (緑色蛍光タンパク質) 分子量 29 kDa



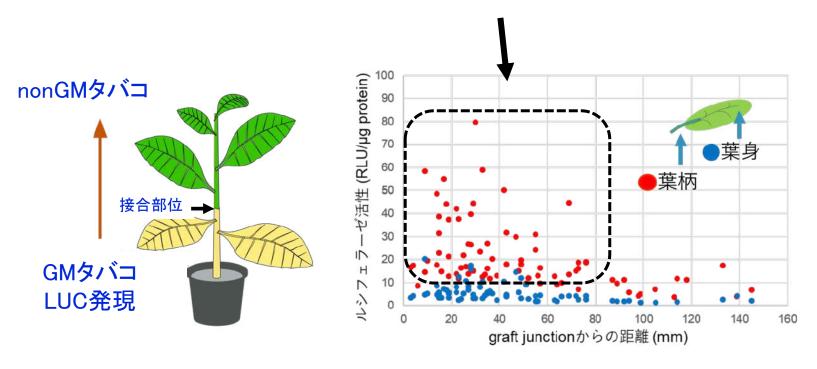
ホタル LUC (ルシフェラーゼ) 分子量 62 kDa





LUC移行 (ホモ・トランスグラフト LUC発現タバコ台木とnonGM タバコ穂木)

GM台木からnon-GM穂木にLUCが移行した



●:葉柄 ●:葉身

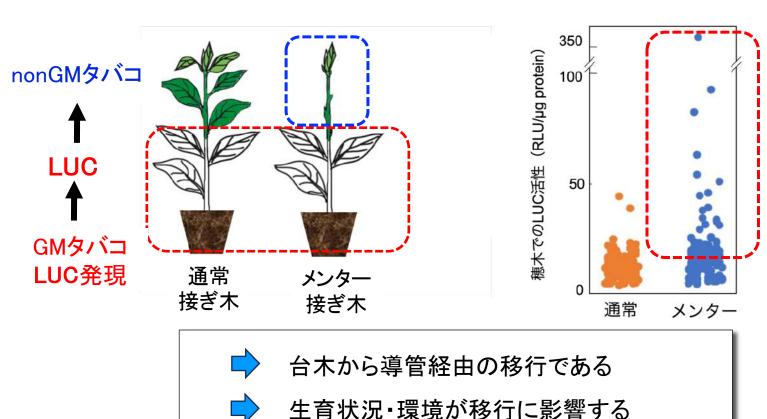
LUC移行 (ホモ・トランスグラフト LUC発現タバコ台木とnonGM タバコ穂木)

LUCがGM台木由来である証拠

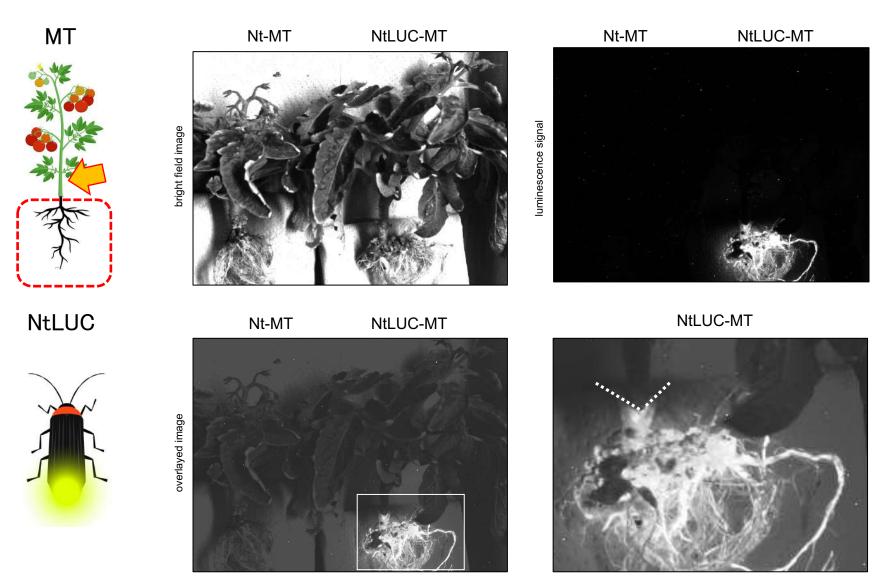
メンター接ぎ木 穂木の葉を切除



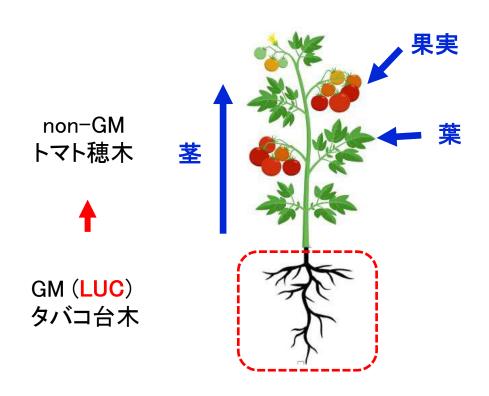
台木からの物質移行(導管)が亢進される条件



LUC移行 (ヘテロ・トランスグラフト LUC発現タバコ台木とnonGM トマト穂木)



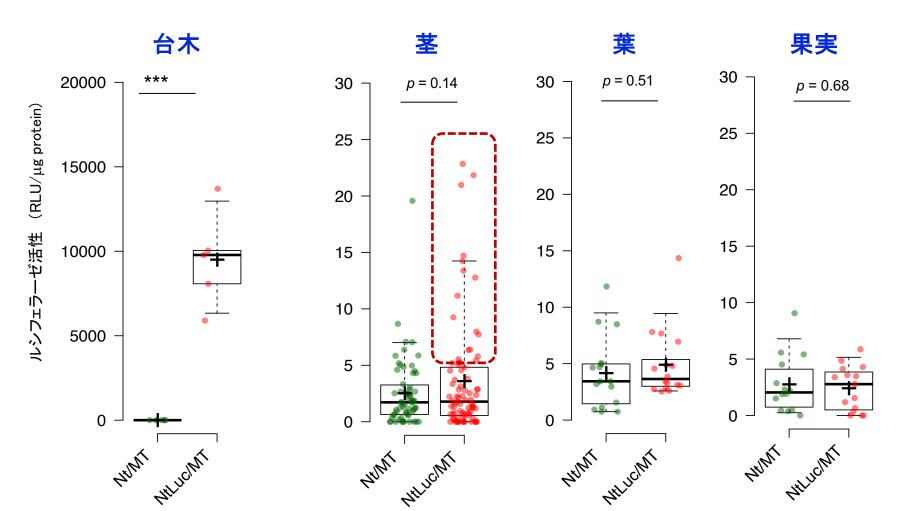
LUC移行 (ヘテロ・トランスグラフト LUC発現タバコ台木とnonGM トマト穂木)



LUC移行 (ヘテロ・トランスグラフト LUC発現タバコ台木とnonGM トマト穂木)

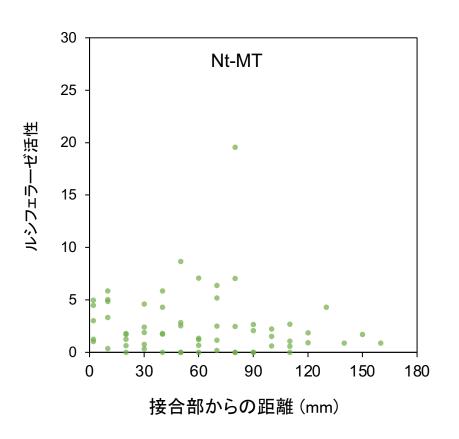


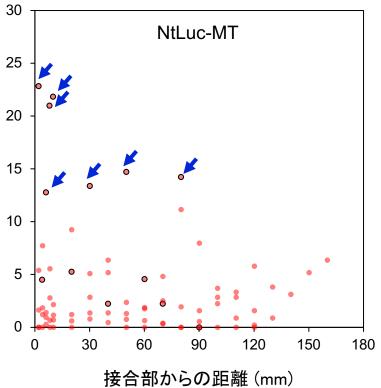
タバコ台木からトマト穂木(茎部分)へ移行



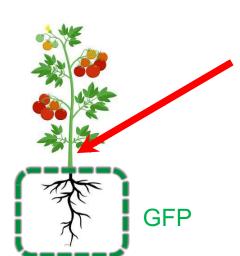
LUC移行 (ヘテロ・トランスグラフト LUC発現タバコ台木とnonGM トマト穂木)

- ➡️ 茎部分へ移行は特定の個体で高い値を示す
- ⇒ 安全性評価のための重要な情報





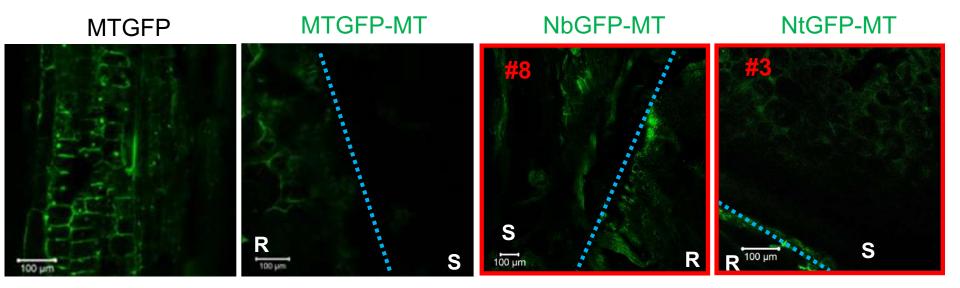
GFP移行 (トランスグラフト, ヘテロ・トランスグラフト: GFP発現台木とnonGMトマト穂木)



接合部に GFP が検出された

台木:GFP発現トマトとタバコ台木

穂木:トマト

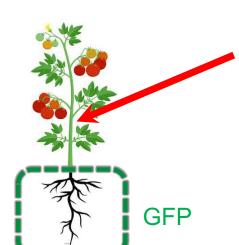


R:台木,S:穂木.

----:接合部

33

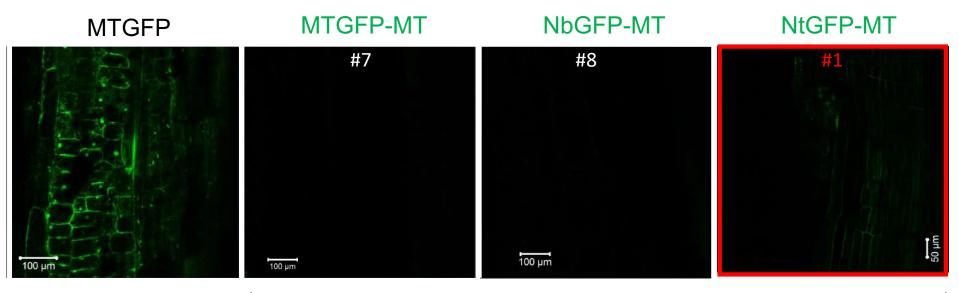
GFP移行 (トランスグラフト, ヘテロ・トランスグラフト: GFP発現台木とnonGMトマト穂木)



接合部より離れた部位でも GFP が検出された

台木:GFP発現トマトとタバコ台木

穂木:トマト



接合部から 4-5 cmの部位

GFP移行(トランスグラフト、ヘテロ・トランスグラフト: GFP発現台木とnonGMトマト穂木)



果実 (可食部) にGFPは検出されなかった

		GFP発現MT台木		GFP発現Nb台木		GFP発現Nt台木	
		MT-MT	MTGFP-MT	Nb-MT	NbGFP-MT	Nt-MT	NtGFP-MT
	個体数	3	3	4	2	3	3
	果実数	3	7	4	7	3	9
	MTGFP	MT-MT	MTGFP-MT	Nb-MT	NbGFP-MT	Nt-MT	NtGFP-MT
GFP	20 mg	20 µm	20 µm	20 pm	20 µm	20 μπ	∑o µm
blight field							

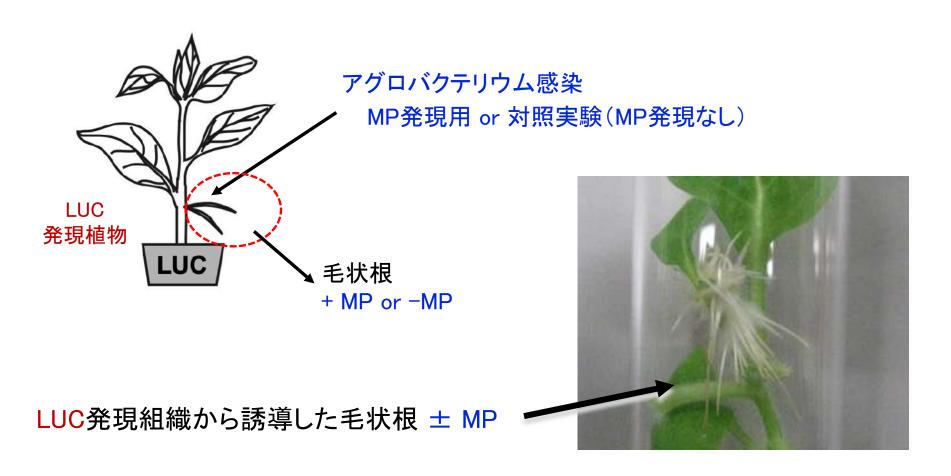
- 1) タンパク質移行
 - · LUC, GFPタンパク質の移行
 - 導入遺伝子産物は移行する(LUC, GFP)同種植物間, 異種植物間分子量, タンパク質の性質に依存しない
 - ・ 個体差がある

研究(計画)

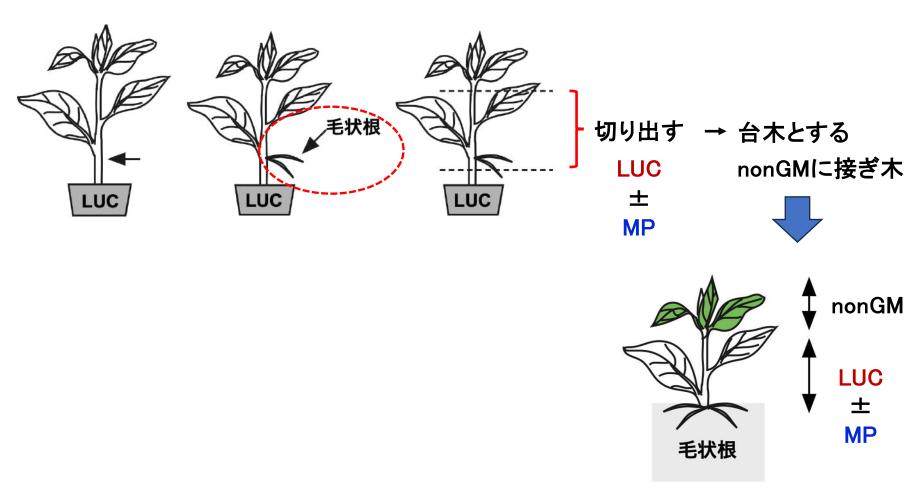
解析計画

- 1) タンパク質移行
 - · LUC, GFPタンパク質の移行
- 2) ウイルス感染による物質移行亢進
 - · LUC 発現植物におけるMP発現
 - · GFP発現植物へのウイルス感染
- 3) 遺伝子発現・代謝物の一斉分析
- 4) 食品成分分析, アルカロイドの定量

MP発現根を有するLUC発現タバコ台木の作出

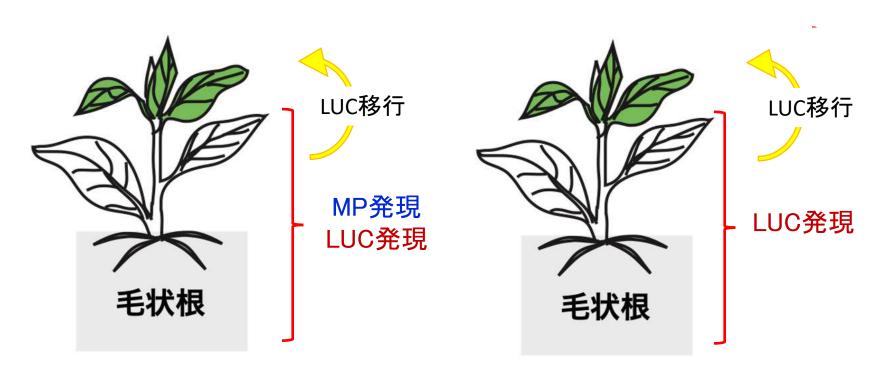


LUC ± MP ホモ・トランスグラフトの作出



LUC ± MP ホモ・トランスグラフトの作出

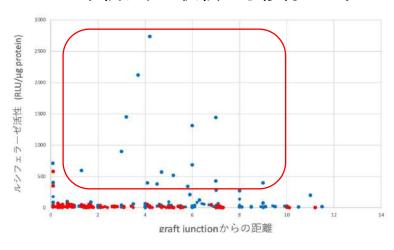
- LUCはnonGM部位に移行するのか?
- · MPはLUC移行に影響を及ぼすのか?



LUC ± MP ホモ・トランスグラフトの作出

- (1) 根の特性はタンパク質移行に影響する(台木の特性が重要)
- (2) MPによる移行亢進は検出されなかった
- (1) 毛状根 LUC台木 vs 正常根のLUC台木

LUCは正常根より毛状根から移行しやすい

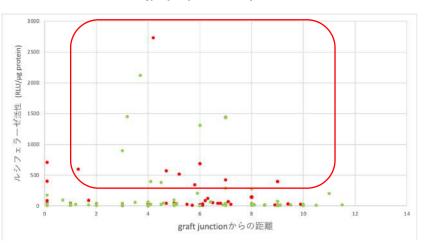


●:毛状根 LUC台木

●:正常根 LUC台木

(2) 毛状根(LUC台木) vs 毛状根(LUC + MP)

MPによる移行促進は認められない



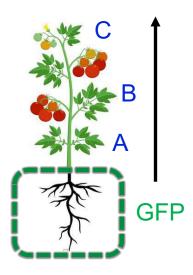
●:LUC + MP毛状根

●:LUC 毛状根

結果 ウイルス感染は物質移行を亢進するのか?

GFP の移行性

nonGMトマト



MTGFP (トマト) or NbGFP (タバコ)

A: 接合部からすぐ上の葉

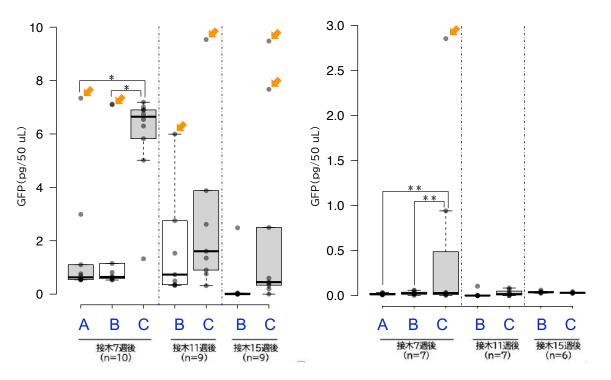
B: 中間葉位の葉

C: 頂葉

ウイルス感染前

8個体中の特定の個体で GFP移行が検出された(**一**)

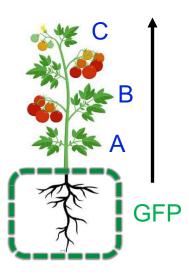
トマト台木 タバコ台木 (トランスグラフト: MTGFP-MT) (ヘテロ・トランスグラフト: NbGFP-MT)



結果 ウイルス感染は物質移行を亢進するのか?

GFP の移行性

nonGMトマト



MTGFP (トマト) or NbGFP (タバコ)

A: 接合部からすぐ上の葉

B: 中間葉位の葉

C: 頂葉

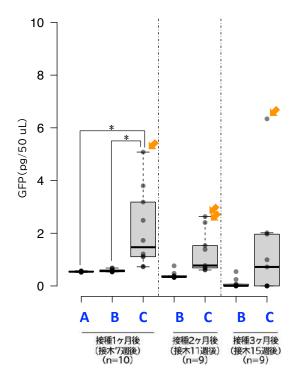
ウイルス接種後 (1ヶ月, 2ヶ月, 3ヶ月)

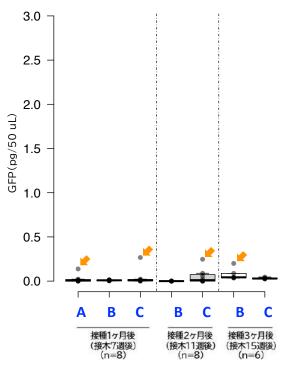


ウイルス感染による顕著な促進は認められない

トマト台木 (トランスグラフト:MTGFP-MT)

タバコ台木 (ヘテロ・トランスグラフト: NbGFP-MT)





結果 同種・異種植物間の接ぎ木 (トランスグラフト, ヘテロ・トランスグラフト)

- 2) ウイルス感染による物質移行亢進
 - · LUC 発現植物へのウイルス感染
 - · MP発現植物におけるGFPの一過的発現、全身移行性
 - ・ MP発現台木でのGFPの一過的発現、穂木への移行性



ウイルス感染やMPによる物質移行亢進の可能性は低い (一般化はできない)

GFP移行も個体差がある(すべての個体で移行が検出されるわけではない)

研究(計画)

解析計画

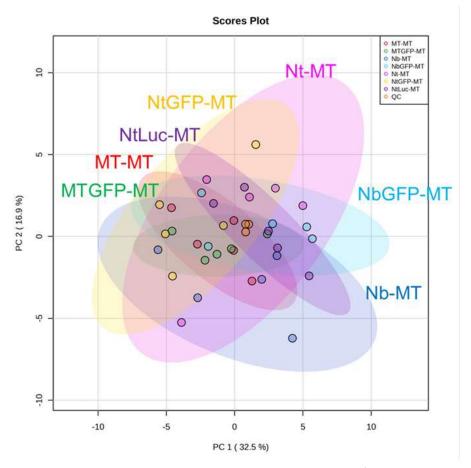
- 1) タンパク質移行
 - · LUC, GFPタンパク質の移行
- 2) ウイルス感染による物質移行亢進
 - · LUC 発現植物におけるMP発現
 - · GFP発現植物へのウイルス感染
- 3) 遺伝子発現・代謝物の一斉分析



オミクス解析による比較 データ精査による差異の検討

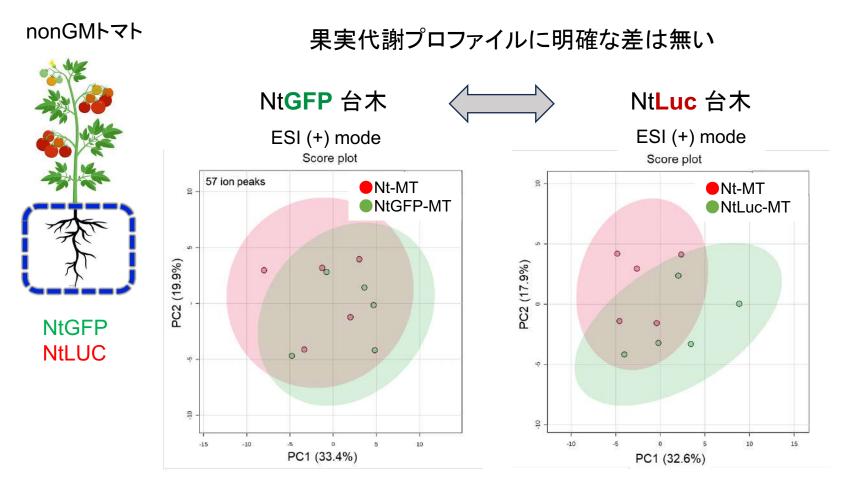
4) 食品成分分析、アルカロイドの定量

トマト果実のメタボローム解析結果 (質量分析と代謝物データベース解析) すべての接ぎ木植物



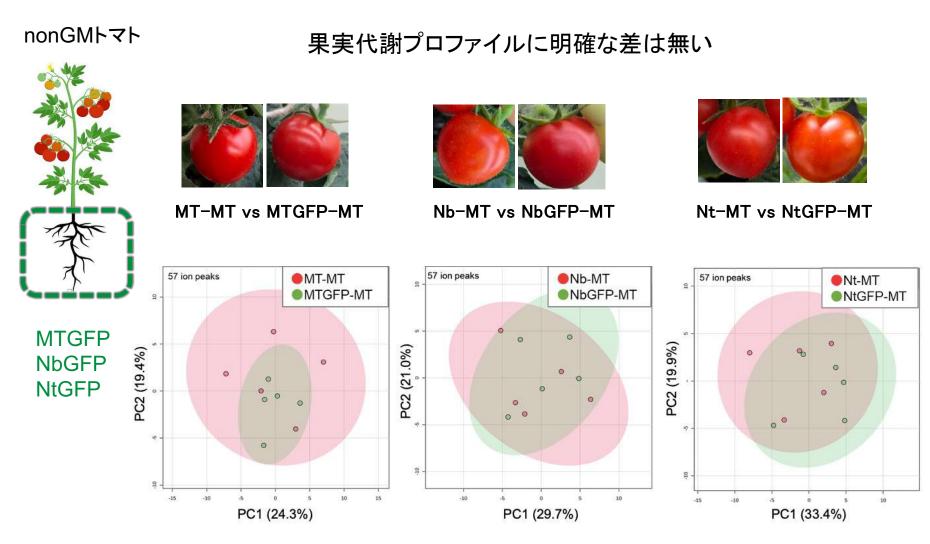
non-GM穂木果実のメタボロームデータの主成分分析 (n = 5)。各接ぎ木系統のプロットを含む楕円は95%信頼区間を示す。

GFP台木とLUC 台木の違い



ES (-) mode も同様

GFP台木がnon-GMトマト穂木果実メタボロームに及ぼす影響

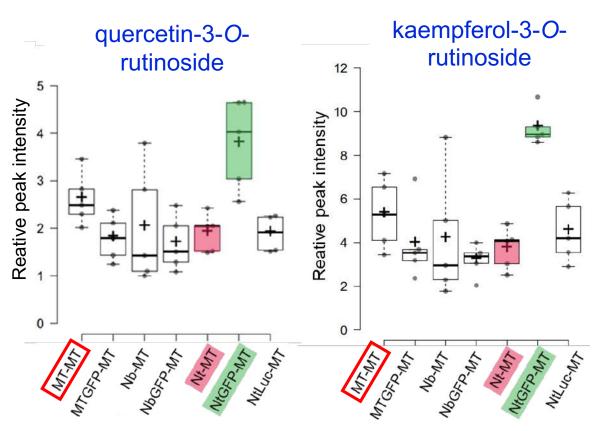


トマト果実のメタボローム解析結果

代謝物ID N244, N366 は NtGFP 台木使用で増加した





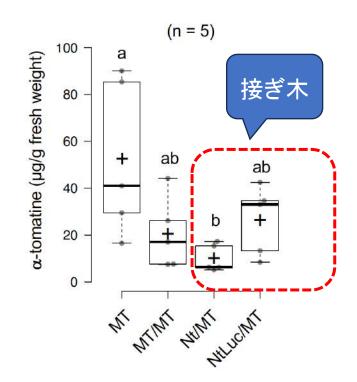


接ぎ木台木が果実成分に及ぼす影響(内生有害物質蓄積量)

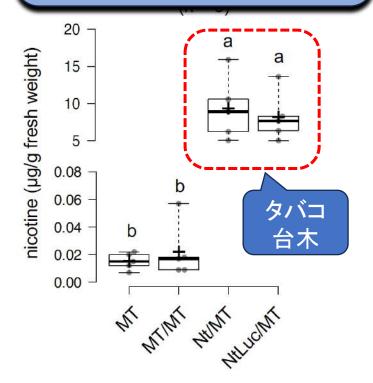
台木から穂木への代謝物移行は潜在的リスク因子



|食経験(HOSU)の情報



トランスグラフトにおいて 毒性物質の移行可能性は 重要な評価ポイント

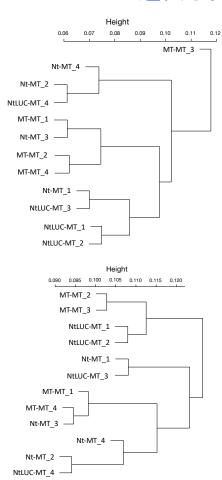


結果 マルチオミクス解析(トランスクリプトミクス LUC発現台木)

LUC発現台木による遺伝子発現変動の解析(non-GMトマト果実)

遺伝子発現プロファイルに明確な差は無い



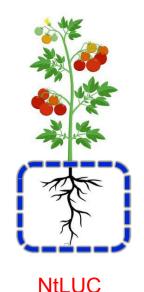


- ・ LUC遺伝子は検出されなかった
- 遺伝子発現に大規模な影響はない
- トランスグラフト (GM台木) の影響 より ヘテログラフト (異種接ぎ木) による影響が大

結果 マルチオミクス解析(プロテオミクス LUC発現台木)

LUC発現台木によるタンパク質発現変動の解析(non-GMトマト果実)

果実のタンパク質蓄積プロファイルに明確な差は無い



• LUC移行は検出されなかった

■ <u>タバコムオ (CM man CM) でLTD祭</u>現量が低下 (Nt-MTとNtLUC-MT)

トランスグラフトにおいて アレルゲンの移行可能性は 重要な評価ポイント ではLTPお上イドの AI 登刊量が低下

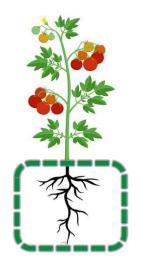
^{大果} 食経験(HOSU)の情報

台木から穂木へのタンパク質移行は潜在的なリスク因子となる

結果 マルチオミクス解析(トランスクリプトミクス GFP発現台木)

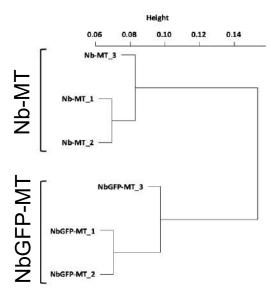
GFP台木による遺伝子発現変動の解析 (non-GMトマト果実)

nonGMトマト



NbGFP

遺伝子発現プロファイルに明確な差は無い



- GFP遺伝子は検出されなかった
- NbとNbGFPで別クラスター形成された
- 3408遺伝子が変動
- アレルゲンタンパク質遺伝子の発現変動はない

研究 マルチオミクス解析(プロテオミクス GFP発現台木)

GFP発現台木によるタンパク質発現変動の解析(non-GMトマト果実)

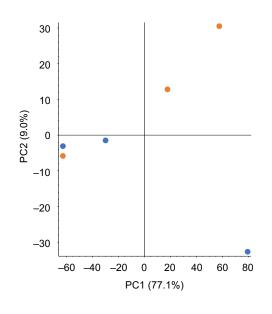
nonGMトマト

果実のタンパク質蓄積プロファイルに明確な差は無い



NbGFP

Nb-MTとNb-GFPの比較



:Nb-MT :NbGFP-MT

- クラスター形成は無い
- 発現量が異なったタンパク質は119個
- 特定の代謝経路の活性化は無い
- GFPタンパク質の移行は無い
- ・ アレルゲンタンパク質が検出(差は無い)
- タバコ由来のタンパク質の検出なし

プロ

結果

接木植物(GM台木とnon-GM穂木)

- ・同種植物間と異種植物間で違うのか?
- ・他の導入遺伝子産物も移行するか?
 - 3) 遺伝子発現・代謝物の一斉分析



代謝物の一斉解析ではGM台木によるリスクは検出されなかった 台木から穂木に物質移行する(安全性評価点)

台木の特性は重要(食経験)

4) タンパク質 (アレルゲン), 毒性成分の精査



作物として有害となるような変動は検出されなかった 台木からタンパク質が輸送された(この研究ではアレルゲンではなかった)

台木の特性は重要(食経験)

まとめ

- ① GM台木からnon-GM穂木に台木の導入遺伝子産物(タンパク質)が移行する。 移行性に一般化できる法則は無い。導入遺伝子の転写物は無い。
- ② 接ぎ木によって植物の内在代謝活性が影響を受ける(αトマチン含量低下)。
- ③ 台木・穂木の間で物質(毒性物質を含む)移行がある(ニコチンの移行)。 台木の種類や特性が物質移行に影響を及ぼす(毛状根の実験)。
- ④ ウイルス感染によってタンパク質移行が亢進される可能性は低い。 (移行がPDを経由するかどうかは不明)

考察

- ➤ トランスグラフト作物のnon-GM可食部
 - 収穫後はトランスグラフト由来かどうかを検知できない(導入遺伝子が無い 法規制困難)
 - 可食部に導入遺伝子産物が含まれる可能性が否定できない(検出限界)
- ▶ ゲノム編集食品で実施されているような事前相談的スキームが望まれる
 - 予想されるリスク(評価ポイント)
 - (1)台木由来の毒性物質、栄養阻害物質、アレルゲンの穂木への移行
 - (2)GM台木で発現するタンパク質のアレルゲン性, 毒性

承認済みGMであれば台木として利用可能かどうか 未承認GMの場合、タンパク質の安全性評価が必要 (そもそもGMの承認が必須)

(3) 導入遺伝子産物は台木の代謝系に影響するか

新しい代謝産物の生合成 新しい代謝物が作られる場合、収穫物での定量値と安全性評価が必要