

研究課題名 (研究項目名)	遺伝子組換え台木と非組換え穂木間の生体成分輸送に起因する食品安全性の評価点解明（課題番号：JPCAFSC20212101） (新たな育種技術を用いた食品のリスク評価手法に関する研究)
主任研究者	研究者名：太田大策 所属機関：公立大学法人大阪 大阪公立大学

## I 研究期間及び研究目的等

### 1 研究期間

令和3年度～令和4年度（2年間）

### 2 研究目的

遺伝子組換え作物と従来の育種法である接ぎ木を組合せ、ゲノム配列の改変なしに、可食部に有用形質を付与する新しい栽培技術 (New Plant Breeding Technology, NBT) が開発されている。本研究では、遺伝子組換え (GM) 台木が導入遺伝子を有さない非組換え (non-GM) 穂木の可食部に与える影響を精査するため、GM 台木由来の組換えタンパク質が non-GM 穂木に移行する可能性を解析するためのモデル接ぎ木作物を作出し、外来遺伝子産物が non-GM 穂木にどのような影響を及ぼすかをマルチオミクス研究と食品成分分析によって解析することで、GM 台木を持つ接ぎ木作物の可食部を食品とする場合の安全性評価点を明らかにすることを目的とした。

### 達成目標

- (1) GM 植物を台木として接ぎ木した non-GM 作物の穂木 (同品種、異品種、異種植物種) において、意図した改変形質を有する可食部の安全性評価ポイントを明らかにする。
- (2) 害虫抵抗性 Bt タンパク質、あるいは LUC (ホタルルシフェラーゼ) タンパク質を発現するナス科植物を GM 台木とした接ぎ木体において、台木に導入した遺伝子の翻訳産物の移行性、non-GM 穂木の遺伝子発現プロファイル、代謝物プロファイルを明らかにする。
- (3) ウイルス感染によって外来遺伝子産物の移行が亢進される可能性を検証するため、キュウリモザイクウイルス (CMV) の MP (移行タンパク質) を恒常発現させた MP 発現植物を用いて、物質の体内移行の解析を行う。
- (4) MP 発現植物を Bt 発現植物などと接ぎ木し、台木・穂木間の物質移行における原形質連絡 (PD) の関与の検証、生体分子の網羅的解析によって、導入遺伝子を含まない non-GM 可食部の安全性評価ポイントを明らかにする。
- (5) 接ぎ木によって改変された形質のみが付与されたことを確認された食品においては、実質的同等性を演繹した食品の安全性評価が可能かどうか、その適応範囲と限界について明らかにする。

### 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
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	モデル接ぎ木植物（異種および同種間）の作出と解析	太田大策（公立大学法人 大阪 大阪公立大学）
	物質移行亢進を検証するモデル系における組換えタンパク質の体内移行解析	望月知史（公立大学法人 大阪 大阪公立大学）
	接ぎ木植物のプロテオーム解析	児玉浩明（国立大学法人 千葉大学）
	遺伝子組換え体-非組換え体による接ぎ木植物のトランスクリプトーム解析	宮原 平（国立大学法人 千葉大学）

### 4 倫理面への配慮について

応募に含まれるすべての組換え DNA 実験および遺伝子導入植物体の譲渡については、「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」（平成 16 年 2 月 19 日施行）およびこの法に基づく政省令および告示、および各大学における遺伝子組換え生物安全管理規程に則り、当該学内規程による学内委員会の上を承を得て研究を実施する。なお大学間における遺伝子組換え植物の譲渡については、譲渡側の大学における当該組換え体を用いた実験についての上を承を得て、譲渡側からの情報提供書とともに譲渡される。研究に用いる材料は植物であり倫理上の配慮すべき問題はない。

## II 研究内容及び成果等

- 1 研究項目：遺伝子組換え台木と非組換え穂木間の生体成分輸送に起因する食品安全性の評価  
(1) 個別課題：モデル接ぎ木植物（異種および同種間）の作出と解析（太田大策（公立大学法人大阪 大阪公立大学））

### 【研究内容】

LUC および GFP を発現する GM タバコ (NtLuc、NtGFP、NbGFP)、および GFP を発現する GM トマト (MTGFP) 台木に、non-GM トマト穂木 (MT) を接ぎ木したモデル接ぎ木植物 (表 1) を作出し、以下の実験に供試する。

#### (1) GM 台木から non-GM 穂木へのタンパク質移行

LUC および GFP の、台木から穂木への移行を生化学的・組織化学的な方法を組合せて検出し、台木の導入遺伝子産物である組換えタンパク質の体内移行の可能性を検証する。

#### (2) マルチオミクス解析

台木の導入遺伝子の発現が穂木の代謝系にどのような影響を及ぼしているのかをマルチオミクス研究によって解析する。

#### (3) ウイルス感染と台木穂木間の物質移行

ウイルス感染が組換えタンパク質移行に及ぼす影響を検証するために、接ぎ木植物にキュウリモザイクウイルス(CMV) 接種し、組換えタンパク質移行を調査する (個別課題 (2) と連携)。

### 【研究方法】

#### (1) GM 台木から non-GM 穂木へのタンパク質移行

LUC を発現する GM タバコ台木 (NtLuc\*)、GFP を発現する GM タバコ台木 (NtGFP\*、NbGFP\*)、および GFP を発現する GM トマト台木 (MTGFP\*) に、non-GM トマト穂木 (MT) を接ぎ木した接ぎ木植物を作出した (表 1)。

表 1 作出した接ぎ木系統

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 トマト
Nb-MT (ヘテログラフト)	non-GM タバコ	do.
Nt-MT (ヘテログラフト)	non-GM タバコ	do.
MTGFP-MT (トランスグラフト)	GFP 発現トマト	non-GM トマト
NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト)	GFP 発現タバコ	do.
NtGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト)	GFP 発現タバコ	do.
NtLuc-MT (ヘテロ・トランスグラフト)	LUC 発現タバコ	do.
NbMP-MT** (ヘテロ・トランスグラフト)	MP 発現タバコ	do.

\* NtLuc (LUC を恒常発現する *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1)、NbGFP (GFP を恒常発現する *N. benthamana*)、NtGFP (GFP を恒常発現する *N. tabacum* L. cv. SR1)、MTGFP (GFP を恒常発現する *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)、MbMP (MP を恒常発現する *N. benthamana*)。

\*\* 個別課題(2)で作出した接ぎ木系統。MP: CMV 細胞間移行タンパク質。do.; same as above.

本研究では、同一植物種から成る接ぎ木をホモグラフト、異なる植物種から成る接ぎ木をヘテログラフト、GM 植物を用いた接ぎ木をトランスグラフト、異なる種由来の GM 植物を用いた接ぎ木をヘテロ・トランスグラフトと呼ぶ。ヘテロ・トランスグラフト植物 (NtLuc-MT) の台木で発現する LUC の non-GM トマト穂木への移行性を、抗 LUC 抗体を用いた免疫検出 (tissue-printing 法、ウエスタンブロット法)、ルシフェラーゼ発現部位の *in situ* 生物発光イメージング、ルミノメーターを用いたルシフェラーゼ活性測定により解析した。また、トランスグラフト (MTGFP-MT)、およびヘテロ・トランスグラフト植物 (NbGFP-MT, NtGFP-MT) の台木から non-GM トマト穂木への GFP 移行を、tissue-printing 法と共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光検出により解析した。

## (2) マルチオミクス解析

モデル接ぎ木植物 (表 1) を同一環境条件下で生育させ、non-GM トマト穂木から催色開始 10 日後の果実を採取した。採取した果実を速やかに四分割し、小分けした後に液体窒素中で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。四分割した果実のうち 2 片をトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析に供試する試料として共同研究先の千葉大学に送付した。残り 2 片のうち 1 片を LC-MS 分析に供試し、得られた計測データを基にしてメタボローム解析を実施した。

## (3) ウイルス感染と台木穂木間の物質移行

GFP を発現する GM タバコ台木に non-GM トマト穂木を接ぎ木したモデル接ぎ木植物を作出した。この研究は個別課題 (2) と連携して実施した。

## 【研究成果】

### (1) GM 台木から non-GM 穂木へのタンパク質移行

LUC 発現する GM タバコ台木 (NtLuc) と non-GM トマト穂木 (MT) から成るヘテロ・トランスグラフト系統 (NtLuc-MT) を供試し、生物発光測定装置を用いて組織中 LUC を可視化した。根をルシフェリン溶液に 2 時間浸漬後、植物体全体にルシフェリン溶液を噴霧し、発光を計測した。NtLuc 台木の根や接合部に近い NtLuc 台木側の茎で発光を検出したが、non-GM トマト穂木での発光は検出されなかった (図 1)。同じ接ぎ木体の接合部近傍の茎の縦断面において、NtLuc 台木側の組織で発光を検出したが、non-GM 穂木組織では発光は検出されなかった (not shown)。NtLuc-MT の 1 個体由来の茎、および果実基部の萼を高感度で画像解析したところ、一部のサンプルで対照区よりも高強度の LUC 発光が観察され、台木から LUC が移行した可能性が示唆された。(図 2)。ルミノメーターを用いたルシフェラーゼ活性測定においても、5 個体中の 1 個体の茎の一部に高い LUC 活性を認めた (図 3)。これらの結果は、LUC 発現する GM タバコ台木から、LUC タンパク質が、non-GM トマト穂木に移行する可能性、さらに接ぎ木個体間で移行性に差があること示している。

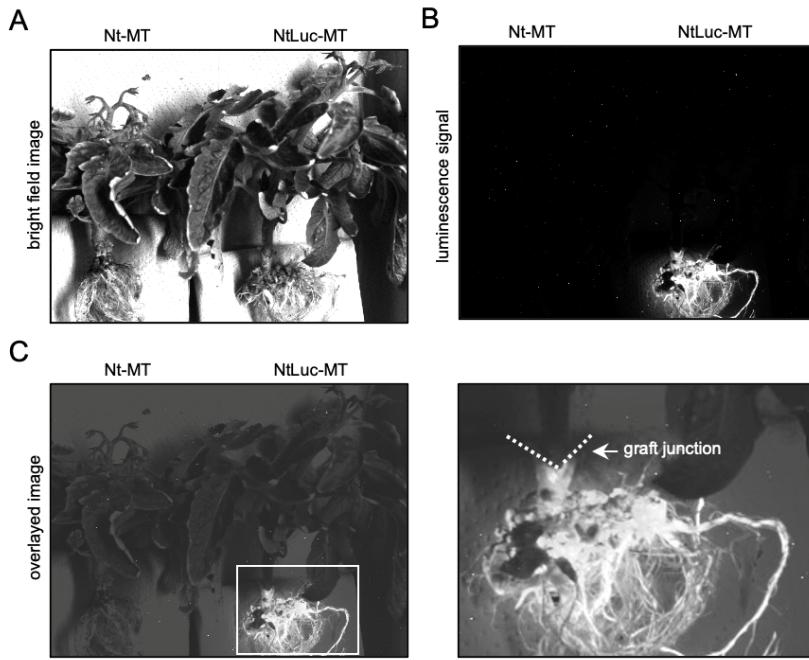


図1. ヘテロ・トランスグラフト (NtLuc-MT) におけるLUC発現部位の生物発光イメージング ( $n = 2$  の代表例を示す)。

(A) 明視野画像、(B) Aに示した植物の発光シグナル像、(C) AとBの合成画像。白色の線で囲んだ部分を拡大した画像を右側に示す。接ぎ木体の台木と穂木の境界面 (graft junction) を点線で示す。供試植物は表1に記載のとおり。

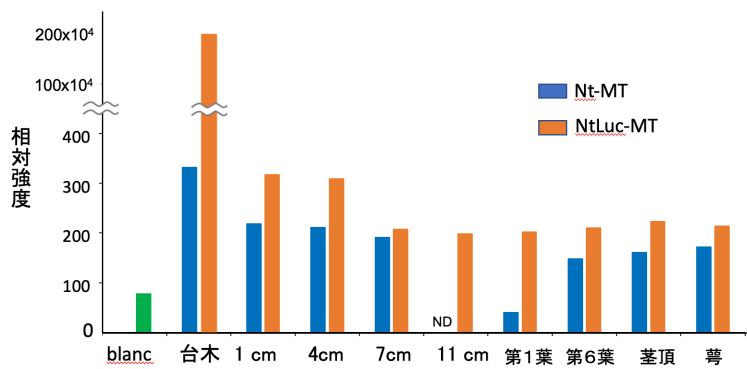


図 2. 高感度生物発光測定装置 (\*コンドートロン) を用いた個体各部位の発光強度の解析 ( $n = 1$ )。切断した茎 (台木からの距離をcmで表記)、異なる葉位、及び果実の萼部分の計測結果。  
\*[https://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL\\_ID=201402223992823349](https://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL_ID=201402223992823349)

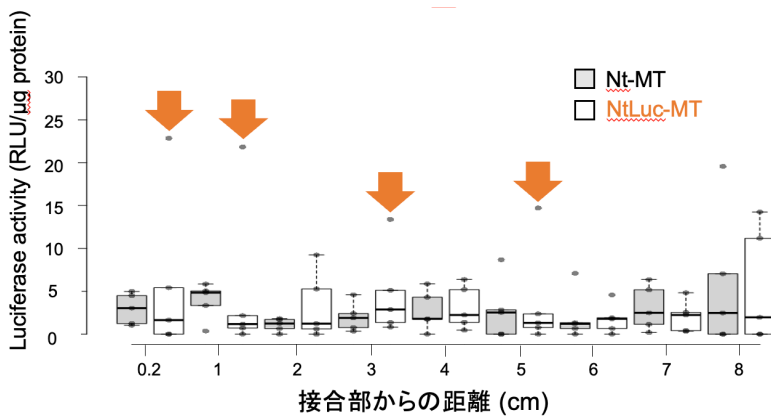


図 3. 供試個体の切断した茎抽出液のLUC活性 (茎の部位を台木からの距離をcmで表記)。サンプル間で統計的に有意な差は認められないが、同一個体由来のサンプルの一部で高い活性が確認された (橙色矢印)。  $n = 5, P < 0.05$  Student's *t*-test

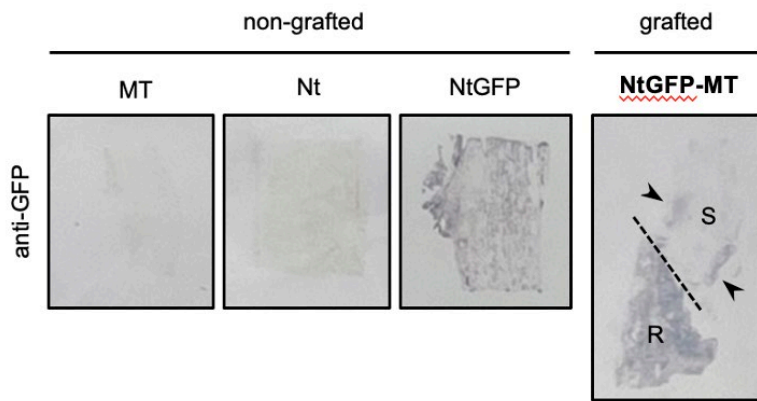


図 4. Tissue-printing 法によるヘテロ・トランスグラフト (NtGFP-MT) の接合部周辺組織における GFP の検出。茎縦断面から滲出したタンパク質中の GFP を抗 GFP 抗体で検出。点線は接ぎ木体の台木 (NtGFP) と穂木 (MT) の境界面を表す。穂木側で検出された GFP シグナルを矢尻で示す。

続いて、GFP を発現する GM 台木に、non-GM トマト穂木を接ぎ木した植物 (表 1、トランスグラフトとヘテロ・トランスグラフト) を供試し、抗 GFP 抗体を用いた免疫検出 (tissue-printing 法) を行った。GFP 発現タバコ台木を持つ接ぎ木系統の一部の個体において、接合部付近の non-GM 穂木側の組織の縦断面から GFP シグナルが検出された (図 4、黒矢尻)。また、GFP を発現する GM ベンサミアナタバコ台木を持つ接ぎ木系統 (NbGFP-MT) の 2 個体中の 1 個体で、接合部から穂木側に 4-5 cm 離れた位置の茎の縦断面から GFP シグナルが検出された (図 5 #8)。non-GM トマト穂木での GFP シグナル検出の有無や検出位置は接ぎ木個体ごと異なっていた。

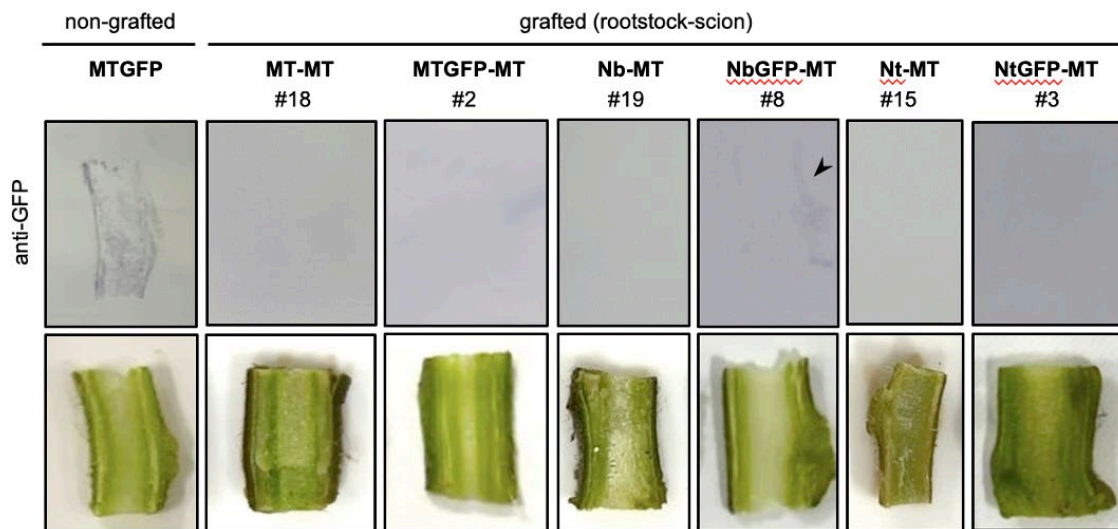


図 5. GFP 発現台木を有する接ぎ木植物の non-GM トマト穂木における GFP の検出 (Tissue-printing 法)。接合部から穂木側に 4-5 cm の位置にある茎の縦断切片を供試した (MTGFP-MT,  $n = 3$ ; NbGFP-MT,  $n = 2$ ; NtGFP-MT,  $n = 3$ )。検出された GFP シグナルを黒矢尻で示す。比較のため、左端に接ぎ木していない GFP 発現トマト (MTGFP) 茎の GFP 検出結果を示した。

図 6 に示すように、GFP 発現台木と non-GM トマト穂木から成る接ぎ木系統 (表 1、トランスグラフト

トとヘテロ・トランスグラフト) の non-GM 穂木 (茎、葉、果実) からは、明瞭な GFP 蛍光は観察されなかった。しかし、接合部付近の茎組織は自家蛍光が強く、正確に GFP 移行の有無を判断できなかった。Tissue printing の結果と合わせると、台木から穂木への GFP 移行が無いと断定することはできないと判断された。さらに、台木から GFP 転写産物、あるいは GM 台木由来の組織・細胞が台木・穂木の接合部で癒着・移行する可能性も検証が必要である。NbGFP-MT 茎でのみ GFP 移行が観察されたが (図 5#8)、これがベンサミアナタバコを台木としたヘテロ・トランスグラフトに特異的であるというよりも、接ぎ木個体間での差と考えられる。

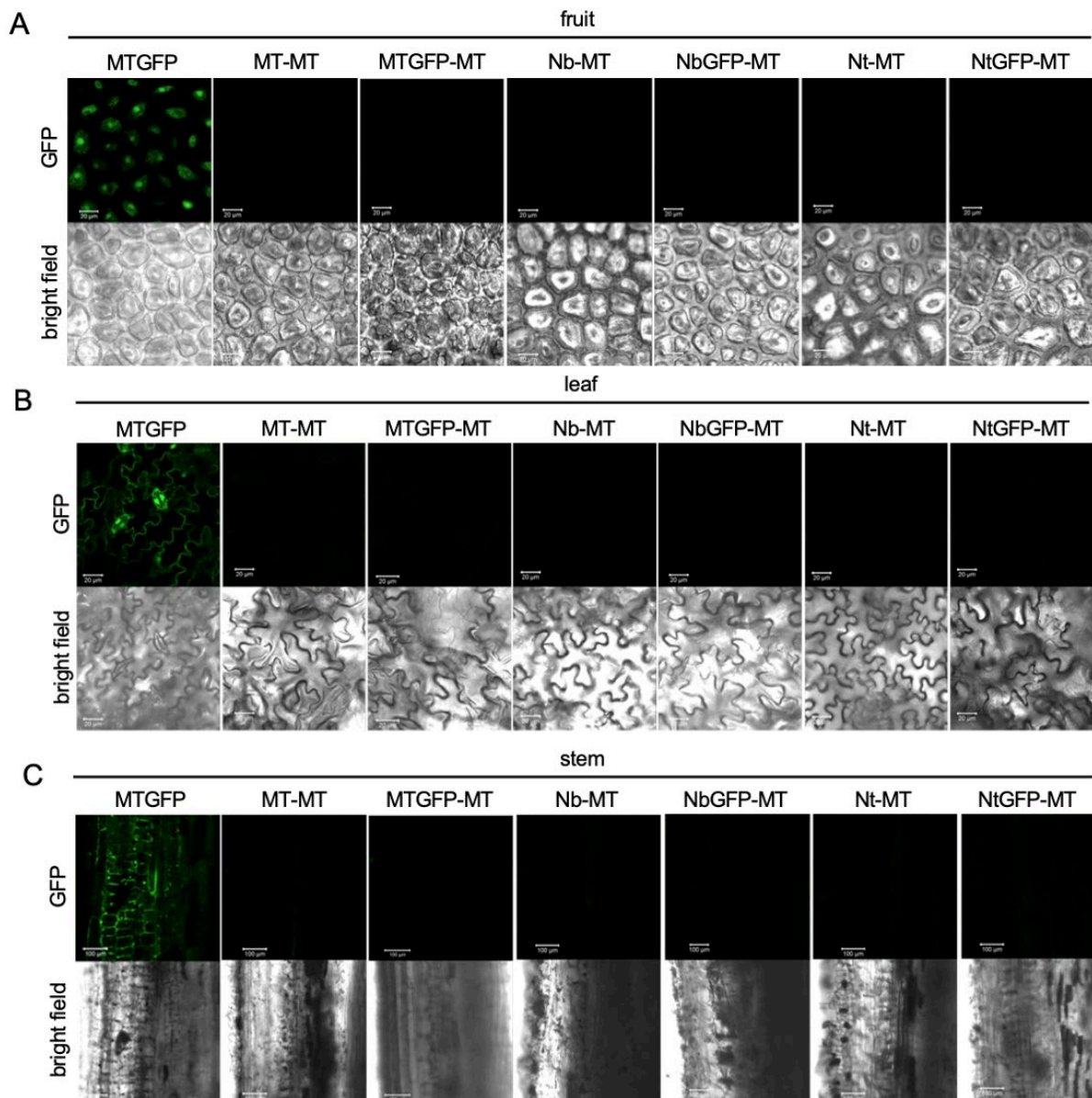


図 6. GFP 発現台木を有する接ぎ木植物の non-GM トマト穂木における GFP 検出。(A) 果実表皮、(B) 接合部の上 2 番目の葉、(C) 接合部の上 4-5 cm の茎。(MTGFP-MT,  $n = 3$ ; NbGFP-MT,  $n = 2$ ; NtGFP-MT,  $n = 3$ )。左端：接ぎ木していない GFP 発現トマト (MTGFP) 茎の観察結果。

## (2) マルチオミクス解析 (メタボローム解析)

LUC発現するGMタバコ台木の影響を調べた。実験には、ヘテロ・トランスグラフト (NtLuc-MT)、non-GMタバコ台木にnon-GMトマト穂木から成るヘテログラフト (Nt-MT)、non-GMトマト台木とnon-GMトマト穂木のホモグラフト (MT-MT) の果実を供試してメタボローム解析を行った (図7)。第一主成分軸 (PC1, 寄与率25.5%) は、トマト台木を有するホモグラフト (MT-MT) のクラスターと、タバコ台木を有する接ぎ木系統 (ヘテログラフト: Nt-MT、ヘテロ・トランスグラフト: NtLuc-MT) から成るクラスターを分離させた。一方、第一主成分と第二主成分 (PC2, 寄与率22.2%) の二次元プロット図ではNt-MTとNtLuc-MTの間でのクラスター分離は認められなかった。この結果から、トマト穂木果実の代謝産物蓄積に与える影響は、台木がGMかnon-GMであるかとは無関係に、台木植物種の違いの方が大きいことを示している。MT-MT、NtLuc-MT、Nt-MTの3系統のいずれか一つ以上の比較において有意な平均イオン強度差を示すイオンピークは89個あった。計測した精密質量値から代謝物データベースを網羅的に調査したが (MFSearcher, [http://webs2.kazusa.or.jp/mfsearcher/index\\_jp.html](http://webs2.kazusa.or.jp/mfsearcher/index_jp.html))、代謝物名を特定することは出来なかった。一方、代謝物蓄積の精査では、MT-MTに対して、NT-MTとNtLUC-MTに共通した変動であることがわかった。すなわち、代謝物蓄積の違いはLUC台木に起因するものではなく、タバコを台木として用いたことが原因であると考えられた。トマト内生のステロイドアルカロイド ( $\alpha$ -tomatine) 含量もNtLUC-MTで特異的に増加することにはなかった。タバコ台木に由来する極微量のニコチン代謝物がNtLUC-MTとNT-MTで検出されたが、NtLUC-MTで特に含量が増大することにはなかった。以上より、LUC発現によるnon-GM果実の食品としての安全性に懸念が生じるものではないと判断した (Ogawa et al., Food Safety 投稿中)。

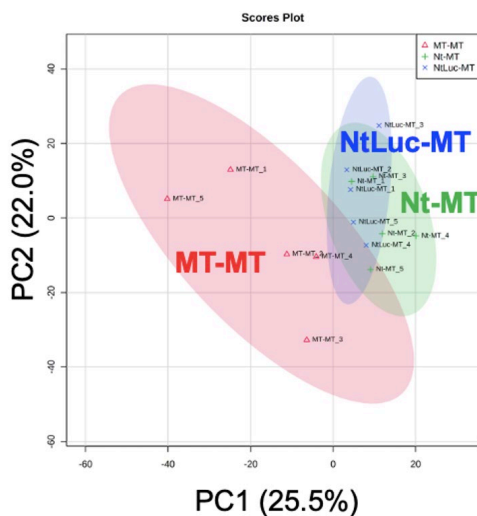


図 7. non-GM穂木果実のメタボロームデータの主成分分析 ( $n=5$ )。個々の果実サンプルの第一主成分スコア (PC1) と第二主成分スコア (PC2) の二次元プロットを示す。各接ぎ木系統のプロットを含む楕円は95%信頼区間を示す。

$^{13}\text{C}$  安定同位体標識化合物を用いた絶対定量によって、タバコ台木を持つ接ぎ木体 (ヘテログラフトおよびヘテロ・トランスグラフト) では、non-GM トマト穂木果実にタバコ台木由来と推定されるニコチンが蓄積することを確かめた。MT-MT、Nt-MT、NtLuc-MT の果実におけるニコチン含量は、それぞれ 0.01-0.06  $\mu\text{g/g}$  fresh weight (FW)、5.0-15.4  $\mu\text{g/g}$  FW、5.0-13.6  $\mu\text{g/g}$  FW であり、タバコ台木でのLUC発現はnon-GM トマト穂木果実ニコチン含量を増加させることはなかった。ニコチンの成人での経口摂取によるLD50値は0.8 mg/kgと推定されている。タバコ台木を持つ接ぎ木体 (Nt-MT、NtLuc-MT) のnon-GM トマト穂木果実を食用として用いたとしても人の健康に重大な影響を及ぼすことはないと判断できる。各接ぎ木系統 (MT-MT、Nt-MT、NtLuc-MT) における $\alpha$ -tomatine および関連するSGA

代謝物の蓄積量は、接ぎ木していない non-GM トマト果実の蓄積量 (~90.0  $\mu\text{g/g}$ ) より減少した (Ogawa et al., Food Safety 投稿中)。原因は明らかではないが、接ぎ木によってトマト植物が持つ本来の二次代謝活性が影響を受けること、またその影響は GM と non-GM による違いは無いと考えられる。

次に、GFP を発現する GM 台木の影響を調べた。実験には、トランスグラフト (MTGFP-MT)、ヘテロ・トランスグラフト (NbGFP-MT、NtGFP-MT)、及びそれぞれの対照としてホモグラフト (MT-MT)、ヘテログラフト (Nb-MT、Nt-MT) を用い、それぞれの接ぎ木の non-GM トマト穂木から採取した果実を用いてメタボローム解析を行った。LC-MS 分析において検出されたイオンピークのイオン強度値に基づく主成分分析を行った。GFP 発現する GM 台木を持つトランスグラフト (MTGFP-MT)、及びヘテロ・トランスグラフト系統 (NbGFP-MT、NtGFP-MT) をそれぞれの対照 (ホモグラフト、ヘテログラフト) と比較したところ、何れの比較においても、第一主成分と第二主成分の二次元プロット図では群間でのクラスター分離は認められなかった (図 8)。さらに、図 8 のメタボローム解析で検出された代謝物イオンピークの精査から、GFP 発現による non-GM トマト果実の食品としての安全性には問題は無いことがわかった。また、これらの接ぎ木系統間でトマトの未熟果実に高蓄積するステロイドグリコアルカロイドである  $\alpha$ -tomatine の含量を比較したところ、いずれの群間においても有意差は見られなかった (Ogawa et al., Food Safety 投稿準備中)。以上の結果から、今回の実験条件では、トマト台木、ベンサミアナタバコ台木、タバコ台木における GFP の発現は、non-GM トマト穂木果実の代謝プロファイルに及ぼす影響は検出されなかったと判断できる。

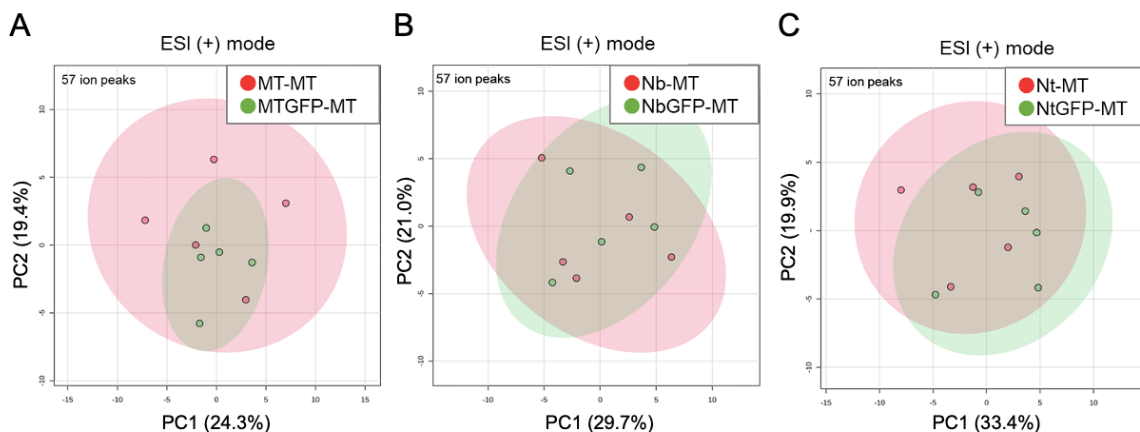


図 8. GFP発現台木がnon-GMトマト穂木果実メタボロームに及ぼす影響 ( $n = 5$ )。メタボローム解析データの主成分分析 (第一主成分得点と第二主成分得点をプロットした二次元プロット図)。図の横軸は第一主成分 (PC1)、縦軸は第二主成分 (PC2)、括弧内の数字は寄与率を表す。各接ぎ木系統のプロットを囲う楕円は95%信頼区間を表す。(A) MT-MTとMTGFP-MT、(B) Nb-MTとNbGFP-MT、(C) Nt-MTとNtGFP-MT。

### (3) ウイルス感染と台木穂木間の物質移行

GM トマト台木と non-GM トマト穂木のトランスグラフト (MTGFP-MT)、および GM ベンサミアナ台木と non-GM トマト穂木のヘテロ・トランスグラフトの健全接ぎ木体 (NbGFP-MT) を6~9個体、CMV 感染したそれぞれの接ぎ木個体も6~9個体を得た。CMV 接種後1、2、3ヶ月目 (接ぎ木後7、11、15週目) に、接合部からすぐ上の葉 (A)、中間葉位の葉 (B)、頂葉 (C) をサンプリングした (図

9). CMV 非接種の健全 MTGFP-MT (トランスグラフト) および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) 個体において GFP 抗体による ELISA 解析を行ったところ、接ぎ木 7 週後の穂木頂葉において微量の GFP が検出された (図 9)。GFP 蓄積量は個体によって異なっており、1~2 個体で他の個体より多く蓄積していた。この結果から、接ぎ木個体間で移行性に差が有り、移行の有無は個別に調べる必要があると考えられる (図 9、橙色矢印)。

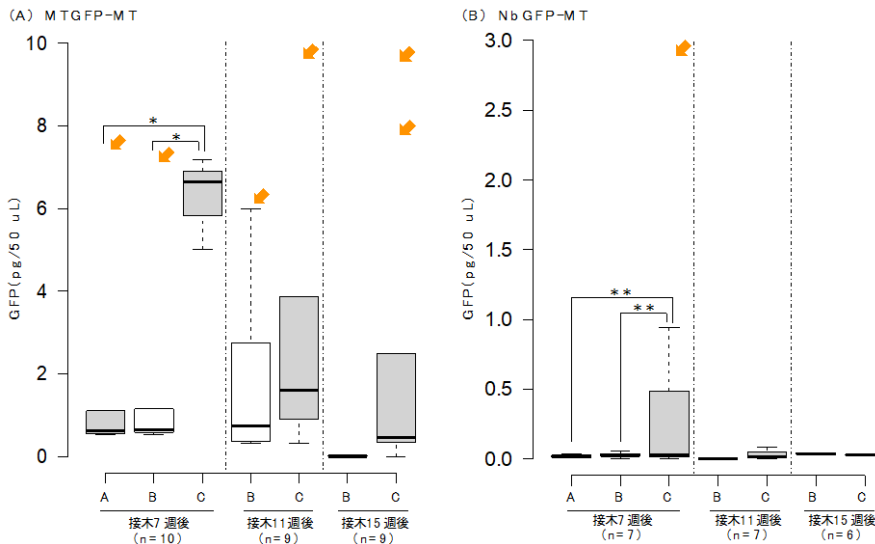


図 9. CMV 非接種の健全 MTGFP-MT (トランスグラフト) および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) 穂木における GFP 蓄積量。接ぎ木後 7、11、15 週目に解析した。

A: 接合部からすぐ上の葉、B: 中間葉位の葉、C: 頂葉。Tukey の多重比較検定で有意差が見られた区間のみ示している (\*= $p<0.05$ 、\*\*= $p<0.01$ )。

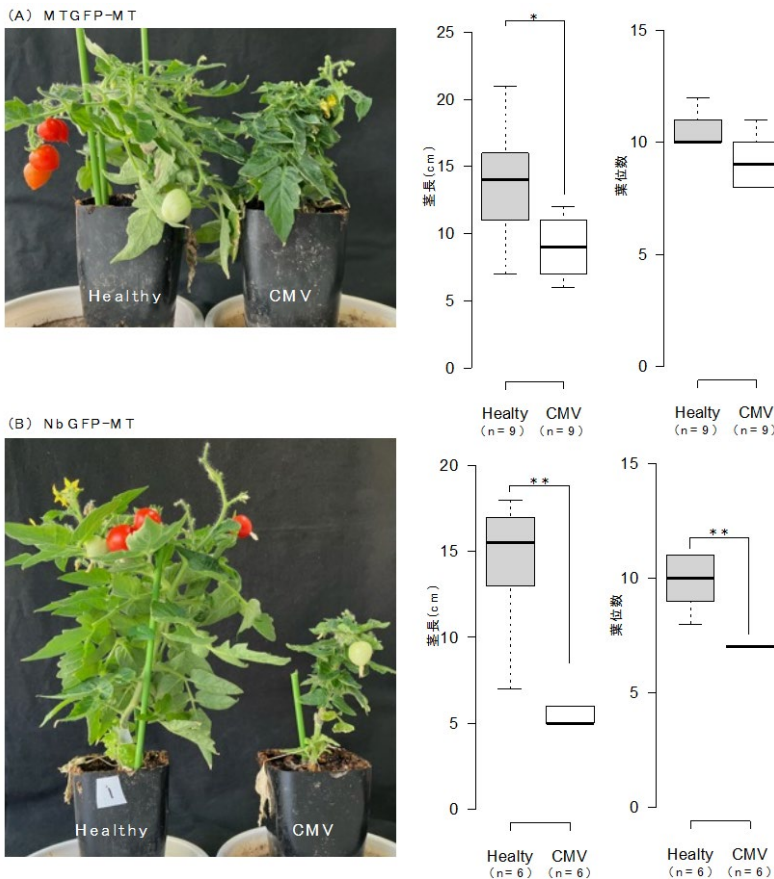


図 10. MTGFP-MT (トランスグラフト) および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) 接ぎ木体の生育に及ぼす CMV 感染の影響。接種後 3 ヶ月 (接ぎ木後 15 週目) における写真と茎長、葉位数を計測した。

Healthy: CMV 非接種の健全接ぎ木体、CMV: CMV 感染接ぎ木体。統計解析にはマンホイットニーの u 検定を用い、有意差が見られた区間のみ示している (\*= $p<0.05$ 、\*\*= $p<0.01$ )。

CMV 接種して 1 ヶ月後の上位葉、および 3 ヶ月後の台木茎における CMV 感染を全ての接ぎ木体の穂木および台木で CMV 感染 (抗 CMV 抗体に陽性) を確認した。CMV 感染した MTGFP-MT (トランスグラフト) および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) は、健全個体と比較して生育、特に茎長が著しく抑制されていた (図 10 A、B)。

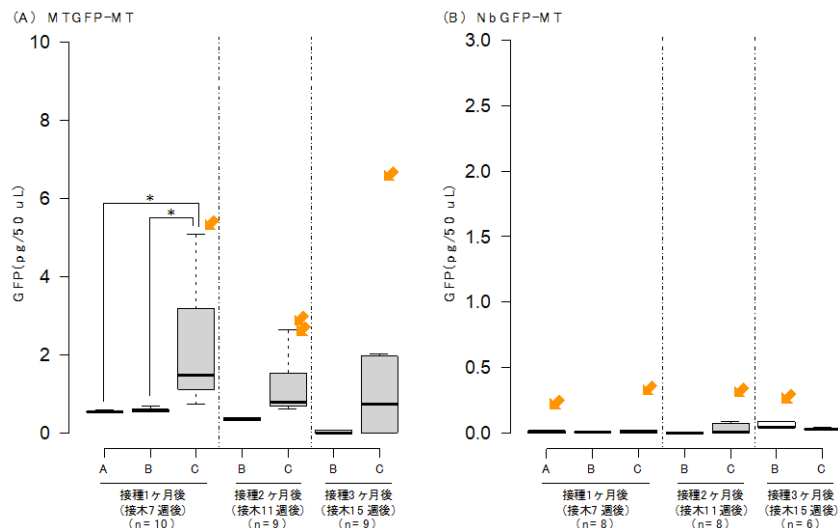


図 11. CMV 感染が MTGFP-MT (トランスグラフト) および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) の葉における GFP 蓄積量に及ぼす影響。

CMV 接種後 1、2、3 ヶ月目 (接ぎ木後 7、11、15 週目) に解析を行った。A: 接合部からすぐ上の葉、B: 中間葉位の葉、C: 頂葉。統計解析には Tukey の多重比較検定を用い、有意差が見られた区間のみ示している (\*= $p<0.05$ 、\*\*= $p<0.01$ )。

また、CMV 感染接ぎ木体からは一つの果実しか得られず、オミクス解析は実施できなかった。GFP 抗体を用いた ELISA 法で CMV 感染接ぎ木体の穂木葉における GFP 蓄積を解析したところ、健全接ぎ木体と同様に、穂木頂葉において微量の GFP が検出された。さらに GFP 蓄積量は個体によって異なり、他の個体より多く蓄積している個体があった (図 11、橙色矢印)。いずれの接ぎ木体においても、CMV 感染個体の葉における GFP 蓄積量は、健全個体と比べて差はない、あるいは少なかった (図 9、11)。移行の有無は、接ぎ木体の個別検査によって調べる必要があると考えられる。接種後 3 ヶ月目の穂木茎では、有意差はみられないものの、一部の接ぎ木体において、接合部に近い組織から微量の GFP が蓄積していた (図 12、橙色矢印)。また、非感染接ぎ木体から得られた 10 個の果実を含め、いずれの接ぎ木体においても果実からは GFP は検出されなかった。

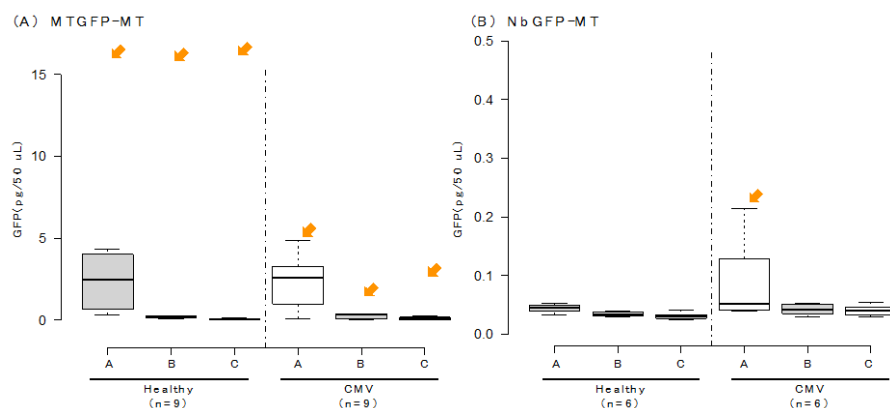


図 12. CMV 感染が MTGFP-MT および NbGFP-MT 接ぎ木体の茎における GFP 蓄積量に及ぼす影響。

CMV 接種後 3 ヶ月目 (接ぎ木後 15 週目) に解析を行った。A: 接合部からすぐ上部の茎、B: 中間部位の茎、C: 頂部の茎。統計解析には Tukey の多重比較検定を用いた。

## 【考察と今後の課題】

ナス科作物であるタバコ (工芸作物) とトマト (食用作物) の GM 系統 (LUC、GFP 発現) を台木、non-GM トマトを穂木とする一連の接ぎ木系統 (表 1) を作出した。マルチオミクス解析では、non-GM 穂木のトマト果実には食品安全性に関する懸念は検出されなかった。

一方、GM 台木ゲノムに挿入された外来遺伝子の産物である組換え LUC、および組換え GFP が穂木に移行することが明らかとなった。本研究では、接ぎ木植物の供試数が少ないにもかかわらず一定数の移行が確認されたこと、また移行した 2 種類の組換えタンパク質 (LUC と GFP) の物理化学的性質は全く異なることから、どのようなタンパク質であっても、多少なりとも GM 部位から non-GM 部位に移行すると考えるのが妥当である。本研究では、GM 部位から non-GM 部位への導入遺伝子の移行そのものを検出する実験は行っていないので、台木と穂木の接合部の癒着部位において細胞あるいは核酸の交換が起こり、その結果として non-GM の穂木に微量の組換えタンパク質が検出されたという可能性も否定できない。トランスグラフトイングが GM による恩恵を広く利用する上で重要な育種技術であることは間違いないが、トランスグラフトイング作物の non-GM 部位に細胞外で加工された核酸が存在しないと短絡的に結論づけることは出来ない。今後、移行の選択性の考察に必要な、タンパク質移行の経路についての情報を得る必要がある。

栽培環境が組換えタンパク質の移行性に影響を及ぼす可能性を検討するため、生物的環境ストレスの一つとして CMV 感染実験を行った。CMV は自らのゲノムにコードする MP によって、PD の通過を容易にすることで全身感染を広げる。すなわち、トランスグラフト作物に CMV 感染すると、組換えタンパク質の non-GM 部位への移行が亢進する可能性がある。本研究では、CMV 感染は全身に広がっていたが、GFP 移行性への影響は確認できなかった。今後、日長や湿度などの非生物的環境がタンパク質移行に及ぼす影響を調べる必要がある。

以上の結果から、トランスグラフトイングによって作出された接ぎ木系統の non-GM 部位を食品とする際には、収穫された可食部の食品としての安全性の評価に加えて、組換えタンパク質が GM 部位から non-GM 部位に移行することを前提とし議論と審査を進める必要があると結論づけられる。

(2) 個別課題：物質移行亢進を検証するモデル系における組換えタンパク質の体内移行解析（望月知史（公立大学法人大阪 大阪公立大学））

### 【研究内容】物質移行亢進を検証するモデル系

本研究開始時に、組換え LUC タンパク質が GM 台木から non-GM 穂木に移行することがわかってきた（千葉大 児玉・宮原）。しかし、移行するタンパク質の種類、移行量、移行に影響する環境条件、移行経路についての情報は無かった。本課題では組換えタンパク質が原形質連絡 (PD) を介して移行する可能性を検証した。

CMV の細胞間移行タンパク質 (MP) は、PD を介した物質移行を亢進する。CMV の MP を恒常発現するベンサミアナタバコ (NbMP) の葉組織でレポーター蛍光タンパク質 (GFP) を一過性で発現させ、その移行性が亢進されれば、GFP は主として PD 経路によって他の部位に移行すると考えられる。

### 【研究方法】アグロバクテリウム法による CMV MP 遺伝子発現

CMV MP 遺伝子を恒常発現する NbMP 系統を得た（植物発現用バイナリーベクター pRI101AN の 35S プロモーター制御下で N 末端に FLAG タグを融合した MP を発現）。得られた NbMP 葉にアグロバクテリウム・インフィルトレーション法により GFP を一過的に発現させ、インフィルトレーション組織、インフィルトレーション隣接組織、インフィルトレーション上位葉および下位葉における GFP 蓄積を蛍光実体顕微鏡を用いて可視化した。さらに、GFP 抗体を用いた ELISA 解析（アブカム GFP SimpleStep ELISA Kit）により GFP 蓄積量を解析した。続いて、NbMP 台木と non-GM トマト穂木のヘテロ・トランスグラフト体 (NbMP-MT)、および、non-GM ベンサミアナタバコ台木 (Nb) と non-GM トマト穂木のヘテログラフト体 (Nb-MT) を作出し、それぞれの non-GM トマト穂木葉をサンプリングし、トランスクリプトームおよび small RNA-seq 解析に供試する試料として共同研究先の千葉大学に送付した。

### 【研究成果】

6 系統の MP 発現ベンサミアナタバコを得た。FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法で MP 発現を確認したベンサミアナタバコ（系統 2-1）の T1 世代 (NbMP) を用いて解析を進めた。NbMP と対照区 non-GM ベンサミアナタバコ (Nb) を用いてアグロバクテリウム・インフィルトレーション法による GFP 一過的発現を行った。NbMP および wtNb とともにインフィルトレーション部位からは GFP が検出されたが、他の組織・部位では GFP は検出されず、NbMP と Nb 間に有意な蓄積量の差も見られなかった（図 13）。

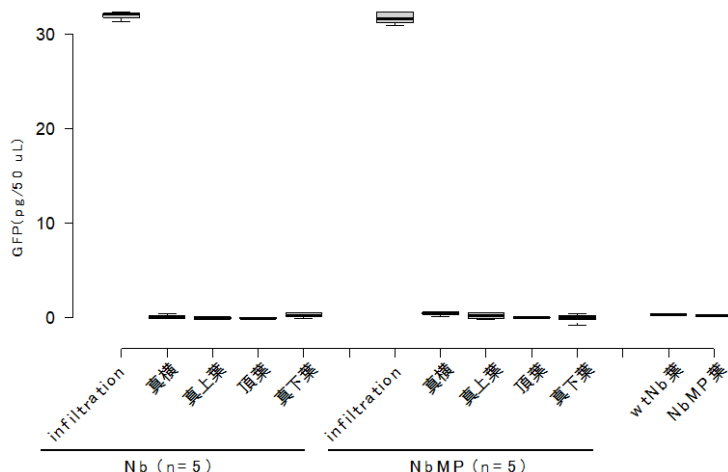


図 13. MP 発現ベンサミアナタバコ (NbMP) における GFP 移行。

GFP はアグロバクテリウムの一過性発現法によって、葉で発現させた。インフィルトレーション7日後に、インフィルトレーション部位、インフィルトレーション部位の隣接組織（真横）、インフィルトレーションした葉の真上の上位葉（真上）、頂葉、真下の下位葉（真下）の GFP 蓄積を解析した。

NbMP-MT ではトマト果実が得られなかったが、non-GM トマト穂木の葉を用いて GFP の検出を行った。NbMP 発現する GM 台木で GFP を一過的に発現させ、その7日後に接ぎ木体接合部から遠隔にある non-GM 部位をサンプリングしてウェスタンブロット解析したが、GFP は検出されなかった。

以上から、MP 恒常的発現では GFP 移行の顕著な亢進は起こらず、GFP 移行の主要経路が PD であると結論づけることはできなかった。個別課題 (1) の結果と合わせ、CMV 感染では台木から穂木への物質輸送の亢進は無く、また組換えタンパク質移行には PD の関与は限定的であると考えられた。

#### **【考察と今後の課題】**

個別課題 (1) の実施と協調しながら、CMV 感染が植物体内での GFP 移行を亢進するか否か、また移行性が MP の関与によって影響を受けるかどうかを調査した。台木から穂木へのタンパク質の移行への PD の関与は限定的であると考えられた。組換えタンパク質が台木から穂木にどのような経路で移行するかを明らかにすることは、今後の重要な課題である。

(3) 個別課題名：接ぎ木植物のプロテオーム解析（児玉浩明（国立大学法人 千葉大学））

**【研究内容】** 台木-穂木間のタンパク質の移動について、レポータータンパク質であるルシフェラーゼを発現するタバコ（以下 LUC 株）を用いて、接ぎ木環境の違いによるタンパク質移行への影響、およびウイルス由来タンパク質によるタンパク質移行への影響を調べる。以下の5つの試験項目を実施した。

(1) **穂木から台木への LUC タンパク質の移行。** 台木から穂木への LUC タンパク質の移行については令和元年～2年の食品健康影響評価技術研究（課題番号：1902）にて報告した。今回、穂木から台木への移行について調べる。

(2) **メンター接ぎ木による移行促進効果。** 穂木の葉を接ぎ木時にとりのぞくメンター接ぎ木の影響を解析する。メンター接ぎ木では、穂木の初期成長は、台木からの栄養分供給により強く依存するため、そのような条件下でのタンパク質の移行について調べる。

(3) **毛状根を有するキメラ台木による台木から穂木への移行促進効果。** *Agrobacterium rhizogenes* の感染によって得られる毛状根は根としての活性が高い。この毛状根を有する台木から穂木への移行について調べる。また Cucumber mosaic virus MP タンパク質は原形質連絡を通過できる物質の分子量を拡大させる働きがある。そこで、MP タンパク質を発現する毛状根を有する台木から穂木へのタンパク質の移行について調べる。

(4) **MP タンパク質を発現する遺伝子組換え台木を用いた、台木から穂木へのタンパク質の移行。** MP タンパク質を発現する組換えタバコを台木として用い、LUC タンパク質の台木から穂木への移行を調べる。

(5) **LUC 株を台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるプロテオーム解析。** LUC 株台木に nonGM トマト穂木を接ぎ木した異種接ぎ木個体の穂木におけるトマト果実のプロテオーム解析を実施した。

以上の5つの試験内容に加えて、3つの試験研究を実施した（項目(6)～(8)）。

(6) **GFP 発現タバコ株を台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるプロテオーム解析。** GFP 遺伝子発現タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 台木に non-GM トマト穂木を接ぎ木した異種接ぎ木個体の穂木におけるトマト果実のプロテオーム解析を実施した。

(7) **Bt タンパク質発現台木から穂木への Bt タンパク質の移行。** 害虫抵抗性を付与する Bt タンパク質の移行の可能性について調べた。

(8) **FT 発現ジャガイモ穂木を接ぎ木したジャガイモ塊茎でのプロテオーム解析。** 前回の課題研究である「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（課題番号:1902）」において実施した、FT 遺伝子発現ジャガイモを使用した接ぎ木の研究について、論文を作成するにあたり追加で解析を実施した。

#### **【研究方法】**

(1) **穂木から台木への LUC タンパク質の移行。** LUC 穂木を用いて野生株タバコ (WT) を台木として接ぎ木を実施した。接ぎ木後、台木から生じた脇芽について LUC 活性を調べた。

(2) **メンター接ぎ木による移行促進効果。** メンター接ぎ木では、台木に LUC 発現タバコ、穂木に野生株タバコを用い、接ぎ木の際、穂木の葉をすべて除去した。また接ぎ木後は、茎頂分裂組織から新たに形成された葉は、そのままに残し、接ぎ木時に除去した葉があったところから新たに形成される脇芽は、形成される都度、除去した。メンター接ぎ木によって新しく葉が生じた段階で LUC 活性を測定

した。

(3) 毛状根を有するキメラ台木による台木から穂木への移行促進効果。LUC タバコの茎に MP 発現コンストラクトを有する *A. tumefaciens* R1000 株 (*A. tumefaciens* ではあるが *A. rhizogenes* 由来の Ri plasmid (毛状根形成に必要なプラスミド) を有しており、*A. rhizogenes* と同様に毛状根を誘導できる) と MP 発現コンストラクトを持たない R1000 株を接種した。毛状根形成後に、接種部位の下部にて茎を切断し、毛状根を有するキメラ LUC 台木を得た。ここに野生株タバコを穂木として接ぎ木を行った。

(4) MP タンパク質を発現する遺伝子組換え台木を用いた、台木から穂木へのタンパク質の移行。MP タンパク質発現する MP 株を作成し、LUC 株と交配した。得られた後代の植物体に対し、PCR による MP 発現コンストラクトの確認と LUC 活性の確認を実施し、MP および LUC の両タンパク質を発現する MP-LUC 株を選んだ。この MP-LUC 株を台木として WT 穂木を接ぎ木し、穂木での LUC 活性を測定した。

(5) LUC 株を台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるプロテオーム解析。トマト果実から得られたタンパク質についてショットガンプロテオーム解析を実施した。得られたペプチド配列はナス科植物のゲノム情報が公開されているデータベースサイト (<https://solgenomics.net/>) にあるトマト (ITAG4.0\_protein.fasta) およびタバコ (Nitab\_v4.5\_proteins\_Edwards2017.fasta) のタンパク質データと照合し、各個体におけるそれぞれの発現量データを得た。検出されたペプチド配列が特定のタンパク質のアミノ酸配列の異なる 2 箇所以上の部位に一致しており、群間での発現量の有意差が  $p < 0.05$  であった場合に、そのタンパク質の発現量が群間で差があると判断した。さらに前述の条件に加え、ペプチド配列が 2 アミノ酸以上トマトのタンパク質と異なっておりタバコ特有のアミノ酸配列であった場合は、そのタンパク質はタバコ台木由来として判断した。LUC タンパク質 (Uniprot Accession: P08659) も同様に検出されたペプチド配列と照合することで存在の有無を確認した。アレルギータンパク質はデータベースサイト (<http://www.allergenonline.org/>) に登録されているデータを元に、照合されたトマトタンパク質から同定し、発現量データを確認した。

(6) GFP 発現タバコ株を台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるプロテオーム解析。解析方法は (5) と同様であるが、サンプルはヘテログラフト (Nb-MT) とヘテロ・トランスグラフト (NbGFP-MT) のみで行った。アライメントにはタバコの *N. benthamiana* のデータ (Niben261\_genome.annotation.proteins.fasta) を使用した。GFP タンパク質 (Uniprot Accession: P42212) も同様に検出されたペプチド配列と照合することで存在の有無を確認した。

(7) Bt タンパク質発現台木から穂木への Bt タンパク質の移行。Bt 遺伝子 (Pesticidal crystal protein Cry1A 遺伝子) 過剰発現体のタバコを作成し、葉においてどの程度のタンパク質が検出されるか事前調査するためプロテオーム解析を実施した。Bt 組換え体 2 系統を使用し、各 2 個体ずつ計 4 個体の葉からタンパク質を抽出し、ショットガンプロテオーム解析を行った。検出されたペプチド配列は Bt タンパク質配列を含めたタバコのタンパク質データと照合した。

(8) FT 発現ジャガイモ穂木を接ぎ木したジャガイモ塊茎でのプロテオーム解析。ジャガイモの塊茎形

成促進に關与する flowering locus T (FT) 相同タンパク質 SP6A を過剰発現する組換えジャガイモを穂木、その宿主である non-GM ジャガイモ (品種サヤカ) 台木との接ぎ木体 (TN 群) が作成された。その塊茎をサンプルとしてショットガンプロテオーム解析を行った。コントロール群として、non-GM 同士の接ぎ木体 (NN 群) の塊茎を使用した。検出されたペプチド配列の同定にはジャガイモのゲノムデータベース (Spud DB) に登録されているタンパク質配列データ (DM\_13\_516\_R44\_potato.v6.1.hc\_gene\_models.pep.fa) を使用した。

### 【研究成果】

(1) 穂木から台木への LUC タンパク質の移行。LUC 穂木を用いて野生株タバコ (WT) を台木として接ぎ木を実施した。接ぎ木後、台木から生じた脇芽について LUC 活性を調べた。このケースでは、脇芽形成初期の段階では穂木からの栄養供給に依存していることが考えられる。令和元年~2 年の食品健康影響評価技術研究 (課題番号: 1902) にて報告した、LUC 株台木と WT 穂木を用いた接ぎ木における穂木での LUC 活性 (図 14A) と比較すると、移動距離および LUC 活性ともに、穂木から多くの LUC タンパク質が長距離移動していることが明らかになった。LUC 台木 WT 穂木の組み合わせでは、LUC 活性は高くても 100 RLU/ $\mu$ g protein であったが、WT 台木 LUC 穂木の組み合わせによる脇芽では、最大で 2000 RLU/ $\mu$ g protein 以上の活性が観察された。この結果から small RNA と同様に、台木から穂木よりは、穂木から台木へのほうがタンパク質が移動しやすいことが示された。また、脇芽の茎サンプルは、一本の茎を連続的に輪切り切片として調製している。高い LUC 活性を示した茎サンプルの隣の茎切片サンプルは LUC 活性が非常に低く、移動した LUC タンパク質は局所的に蓄積していることが示された。

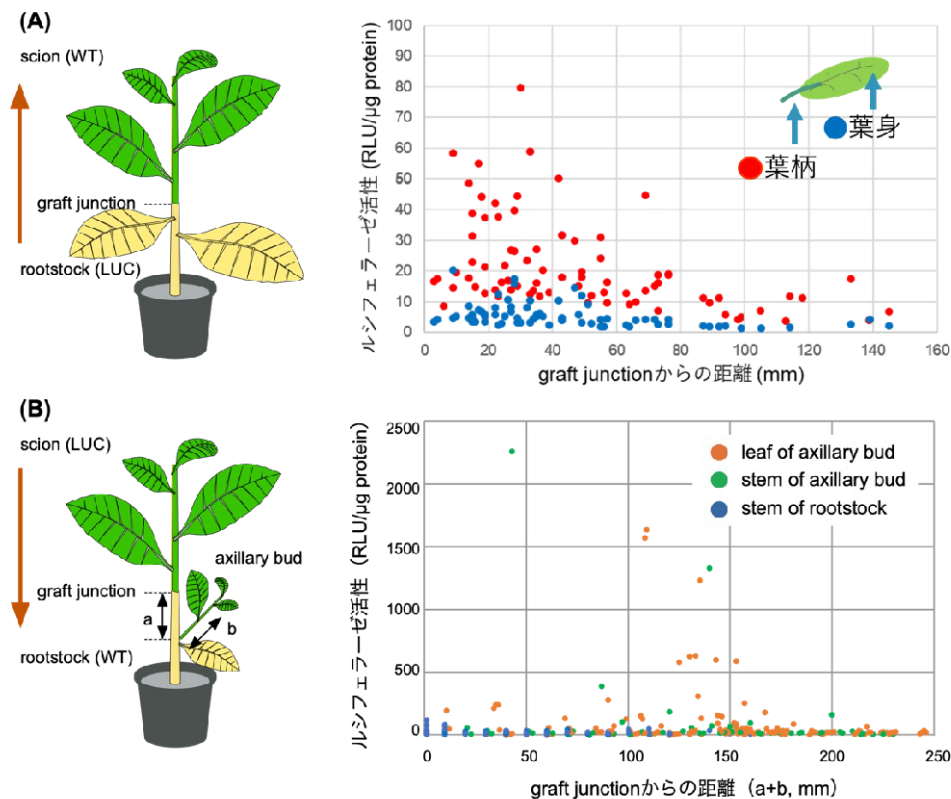


図14 graft junction を介したルシフェラーゼタンパク質の長距離移動 (A) ルシフェラーゼ発現台木から野生株穂木への移動 (令和2年食品健康影響評価技術研究にて報告) (B) ルシフェラーゼ穂木から野生株台木への移動。台木から接ぎ木後に成育した脇芽 (axillary bud) でのルシフェラーゼ活性を示す。矢印はルシフェラーゼタンパク質の移動方向を示す

(2) **メンター接ぎ木による移行促進効果**。メンター接ぎ木を実施し、穂木の LUC 活性を測定した (図 15)。メンター接ぎ木では、穂木での成長は、台木からの栄養供給により強く依存するため、台木から穂木への物質の移動量が増加すると予測される。実際に LUC 活性を測定したところ、穂木で、局所的に高い LUC 活性が測定され、通常の接ぎ木よりも LUC タンパク質の移動量が増加していると考えられた。

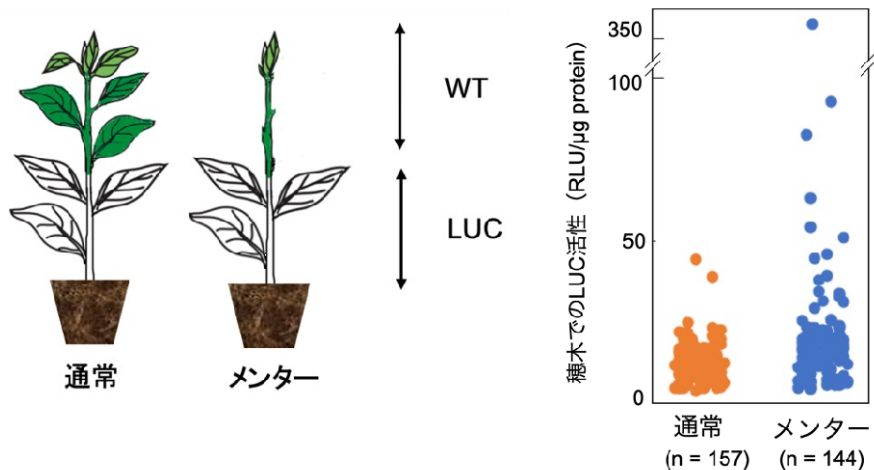


図15 メンター接ぎ木による台木から穂木への外来遺伝子産物の移動。LUCタンパク質を発現する台木に、野生株の穂木を接ぎ木した。3週間後に、穂木におけるLUC活性を測定した。なお、メンター接ぎ木において、1つの測定点が非常に高い値を示している。

(3) **毛状根を有するキメラ台木による台木から穂木への移行促進効果**。毛状根を有する LUC 台木 (LUC 毛状根台木) を用いると、穂木へのルシフェラーゼの移行が大幅に増加した (図 16A)。さらに毛状根において MP タンパク質を発現する MP-LUC 台木と、MP 発現コンストラクトを持たない LUC 毛状根台木を用いて、野生株タバコと接ぎ木を行った場合で比較したところ、穂木へと移行したルシフェラーゼの量に大きな差はみとめられなかった (図 16B)。以上の結果は、台木の特性とくに根の特性によって導入遺伝子産物の穂木への移行は大きく変化しえることを示しており、台木に食経験がない植物種を用いた場合に穂木におけるリスク評価には注意が必要であることを示唆している。

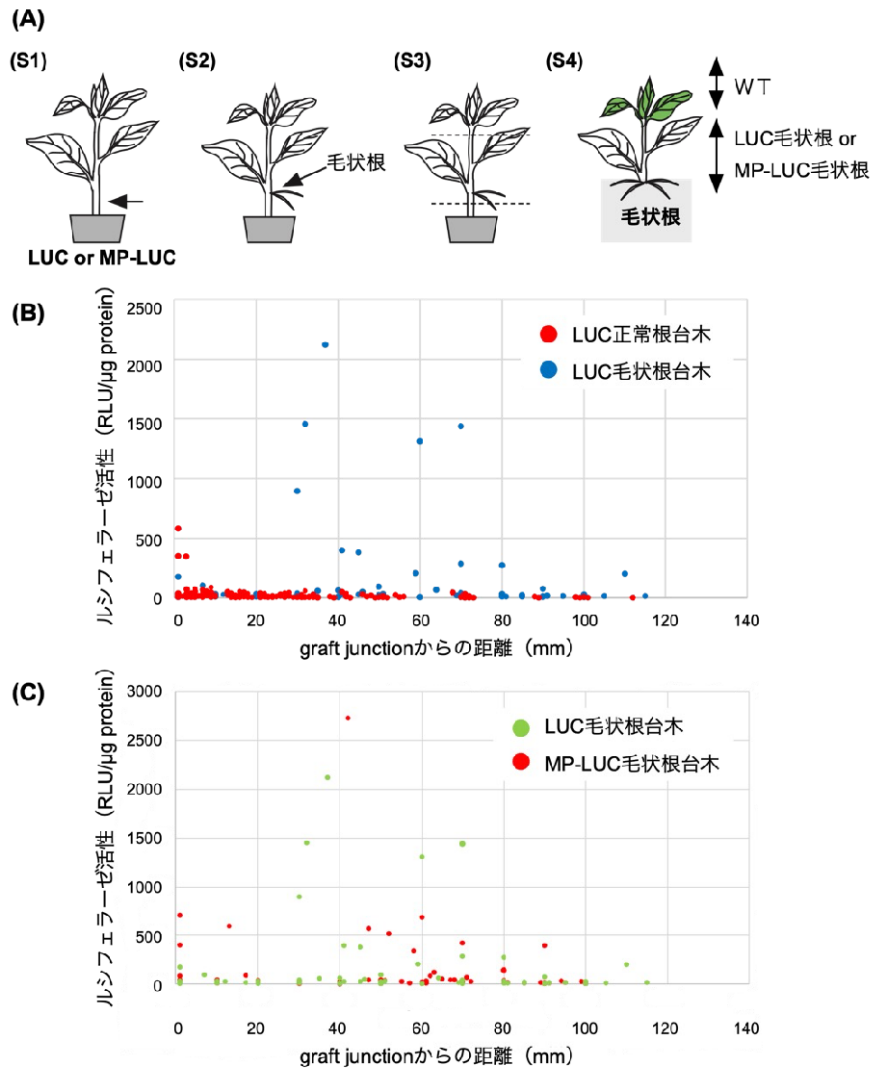


図16 毛状根を有するLUC台木から野生株穂木へのルシフェラーゼタンパク質の移動

(A) 毛状根を有するキメラ台木の作成手順。(S1) LUC発現タバコの基部にRiプラスミドを有する *Agrobacterium* を接種する。(S2) 接種部位に毛状根が誘導される。(S3) 生じた毛状根を含むように台木として切り出す。(S4) 毛状根台木に野生株タバコを穂木として接ぎ木する。

(B) 正常根を有するLUC台木と毛状根を有するLUC台木に接ぎ木した野生株穂木でのルシフェラーゼ活性

(C) 毛状根を有するLUC台木と、MP遺伝子を導入したLUC台木を用いた接ぎ木個体における野生株タバコ穂木でのルシフェラーゼ活性

(4) MP タンパク質を発現する遺伝子組換え台木を用いた、台木から穂木へのタンパク質の移行。MP 形質転換体と LUC 株を交配することにより、MP-LUC 株を作出した (図 17A)。この MP-LUC 株を台木として WT 穂木を接ぎ木したところ (図 17B)、LUC 株を台木として接ぎ木した場合と比較して、接ぎ木面にきわめて近い穂木部分ではやや LUC 活性が高い傾向が認められたものの、LUC タンパク質の移動に与える MP タンパク質の影響は少ないと考えられた。今後、穂木で MP が発現している場合の台木からのタンパク質の移動、穂木と台木ともに MP が発現している場合の台木からのタンパク質の移動についても調べていく予定である。

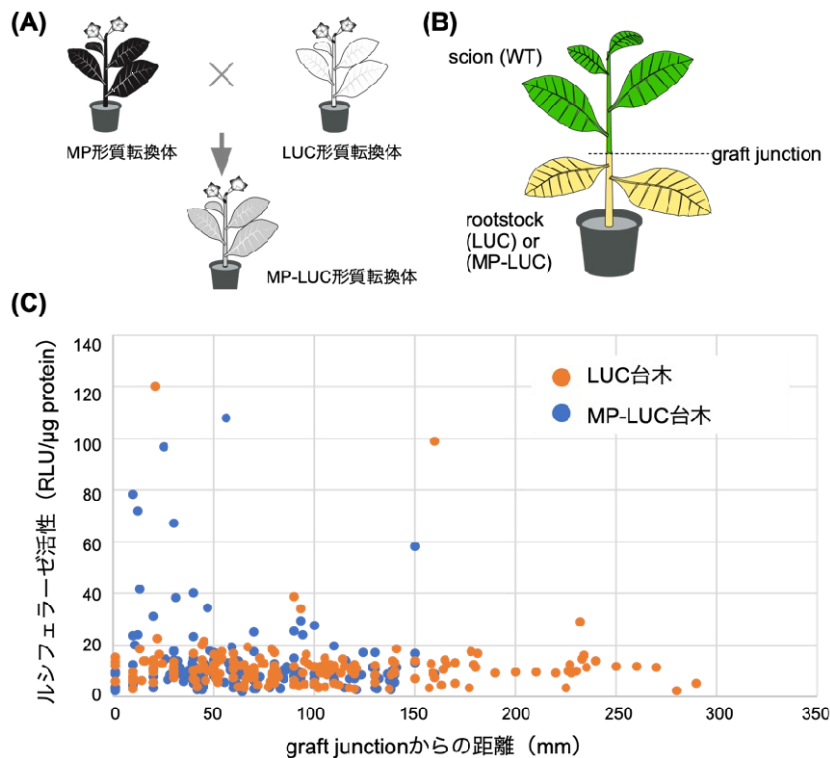


図17 CMV MPタンパク質の発現が野生株穂木へのルシフェラーゼタンパク質の移動に与える影響  
 (A) MP-LUC株の作成。MP遺伝子を導入した株とLUC遺伝子を発現する株を交配して得た。  
 (B) LUC台木とMP-LUC台木を用いた接ぎ木  
 (C) LUC台木と、MP遺伝子を導入したLUC台木を用いた接ぎ木個体における、野生株タバコ穂木でのルシフェラーゼ活性

(5) LUC株を台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるプロテオーム解析。各サンプルにおけるタンパク質発現量データをもとに主成分分析を行った結果、各群でのクラスター形成は確認されなかった。2群間比較により発現量に変動の見られるタンパク質を調査した結果、48個のタンパク質がヘテログラフト (Nt-MT) とホモグラフト (MT-MT) で発現量が異なっていた (図 18)。同様に 53個のタンパク質がヘテロ・トランスグラフト (NtLUC-MT) とホモグラフト、40個のタンパク質がヘテロ・トランスグラフトとヘテログラフトにおいて変動していた。これら発現量が変動したタンパク質について GO 解析を行った結果、ヘテログラフト系統 (Nt-MT および NtLUC-MT) では脂質輸送タンパク質 (A0A3Q7G5J4, A0A3Q7EII7) が共通して発現量が低下していた。また、ヘテロ・トランスグラフトでは脂質輸送 (K4D1U9) および  $\alpha$ -アミラーゼ阻害タンパク質 (A0A3Q7IIL2) の発現量が、他の2群との比較で共通して減少していた。さらに、タバコ由来と考えられるタンパク質として、elongation factor 1-alpha (A0A1S4BVP1) とリポキシゲナーゼ (A0A1S4DI50) が確認された (図 19)。

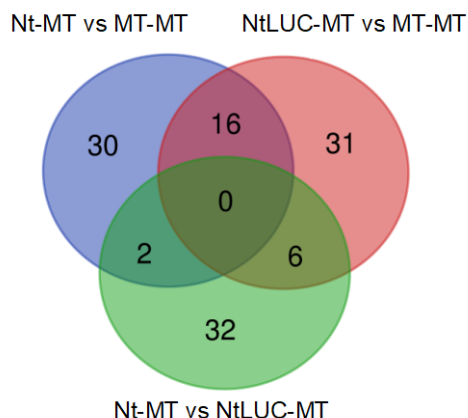


図18 LUC発現タバコ台木-nonGMトマト穂木果実のプロテオームデータの2群間比較による発現変動タンパク質のベン図  
 青：Nt-MTとMT-MTの2群間比較から得られた発現変動タンパク質の数、  
 赤：NtLUC-MTとMT-MTの比較、緑：Nt-MTとNtLUC-MTの比較

**A**

A0A1S4BVP1	VYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFGPTGLTTEVKSVEMHHEALQEALPGDNVGFNV	300
Solyc06g005060	VYKIGGIGTVPVGRVETGVIKPGMVVTFGPTGLTTEVKSVEMHHEALQEALPGDNVGFNV	300
	*	
A0A1S4BVP1	RNVAVKDLKRGFVASNSKDDPAKASNFSTSQVIIMNHFGQIGNGYAPVLDCHTSHIAVKF	360
Solyc06g005060	RNVAVKDLKRGYVASNSKDDPAKASFTAQVIIMNHFGQIGNGYAPVLDCHTSHIAVKF	360
	** *	
A0A1S4BVP1	AEILTKLDRRSGKELEKEPKFLKNGDAGMVKMIPTKPMVVETTFSEYPLGRFAVRDMRQT	420
Solyc06g005060	AEILTKLDRRSGKELEKEPKFLKNGDAGMVKMIPTKPMVVETFAEYPLGRFAVRDMRQT	420

**B**

A0A1S4DI50	SDDAVQKDTLQAWWKELREEGHGDKKDEPWWPKMQTVQELIDSCTIITWIASALHAAVN	718
Solyc01g099190	SDETVEKDTLQAWWKELREEGHGDKKDEAWWPKLQTRQELRDCCTIITWIASALHAALH	716
A0A1S4DI50	FGQYPYAGYLPNRPTLSRNFMEPEPGSTEYEEELKTNPDKVFLKTI TPQLQTLLGISLIEIL	778
Solyc01g099190	FGLYSYAGYLPNRPTLSCNLMPEPGSVEYEEELKTNPDKVFLKTFVPQLQSLLIEISIFEVS	776
A0A1S4DI50	SRHSSDTLYLQGRESPEWTKDQEPLSAFERFGKKLSDIEDQIMEMNGDEKWKNRSGPVKV	838
Solyc01g099190	SRHASDEVYLGQRDSIEWTKDKPLVAFERFGKMLSDIENRIMMNSHKSWKNRSGPVNV	836
	* *	

図19 トマト穂木果実から検出されたタバコ台木由来タンパク質とトマトの相同タンパク質のアライメント

A：タバコの elongation factor 1-alpha (A0A1S4BVP1) とトマトの相同タンパク質 (Solyc06g005060)。B：タバコのリポキシゲナーゼ (A0A1S4DI50) とトマトの相同タンパク質 (Solyc01g099190)。アミノ酸配列の枠囲いの部分がプロテオーム解析で検出されたペプチド配列。アスタリスクがタバコとトマトで異なるアミノ酸残基。

(6) GFP 発現タバコ株を台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるプロテオーム解析。各サンプルにおけるタンパク質発現量データをもとに主成分分析を行った結果、各群でのクラスター形成は確認されなかった (図 20)。群間で発現量のことなるタンパク質は 119 個あり、ヘテログラフト (Nb-MT) で発現量が多いタンパク質は 62 個、ヘテロ・トランスグラフトで発現量が多いタンパク質は 57 個であった。これらのタンパク質の GO 解析からは特定の代謝経路に関わるタンパク質のクラスターは確認されなかった。また、GFP タンパク質に該当するペプチド配列は検出されず、アレルゲンタンパク質として Sola l 1, 3, 4, 5 が検出されているが、発現量に群間での差は確認されなかった。トマト果実からタバコ由来のタンパク質は確認されなかった。

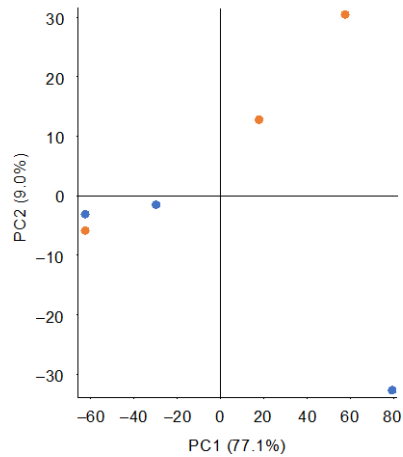


図20 GFP発現タバコ台木-nonGMトマト穂木果実のプロテオームデータの主成分分析  
青：Nb-MT、オレンジ：NbGFP-MT

(7) **Bt タンパク質発現台木から穂木への Bt タンパク質の移行。**ショットガンプロテオーム解析の結果、照合データにタバコのタンパク質データを含めた場合には Bt タンパク質を検出することが出来なかった。このため、Bt タンパク質データに一致するペプチド配列のみを検出した結果、4 個体すべてのサンプルで Bt タンパク質に該当するペプチド配列を検出することが出来たが、蓄積量は非常に低濃度であることが考えられた。得られた Bt 株を台木として WT 穂木を接ぎ木した Bt 発現遺伝子組換えタバコの作成に予定より時間がかかり、令和 5 年になって、Bt 株を台木とする野生株穂木の葉・茎サンプルは得ることができたが、台木での Bt タンパク質の発現量が微量であったことから、Bt タンパク質の穂木への移動量はごく微量であると想定され、プロテオーム解析で用いられる質量分析法では検出が困難であった。そのため、抗 Bt タンパク質抗体を用いた免疫沈降法による高感度検出方法を検討していたが、実験方法等の確立に時間がかかり、解析が間にあわなかった。引き続き、免疫沈降法によって Bt タンパク質が移動しているか、調べる予定である。

(8) **FT 発現ジャガイモ穂木を接ぎ木したジャガイモ塊茎でのプロテオーム解析。**FT 遺伝子発現ジャガイモの接ぎ木 (TN) におけるプロテオーム解析では、non-GM ジャガイモ同士の接ぎ木 (NN) サンプルと比較してアレルゲンタンパク質の存在比の変動は確認されなかった。一方で、抗栄養素であるプロテアーゼインヒビターに分類される 5 種類のタンパク質が TN 群で存在比が増すことが明らかになった。プロテアーゼインヒビターは、ジャガイモ塊茎の主要なタンパク質であり、アイソフォームによって可溶性タンパク質の 10%から 20%以上占める。今回、5 種類のプロテアーゼインヒビターが増加したが、TN 群と NN 群で総タンパク質量に差がないことから、この 5 種類のプロテアーゼインヒビターは、微量なタンパク質量の変動が検出された結果であると考えられた。存在比が変動した原因については現在のところ不明である。また、穂木に導入されている FT 遺伝子の産物は台木の塊根で検出されないことが確認された。この結果は、Food Safety 誌にて発表された (Miyahara et al. (2023) Food Safety 11: 1-20)。

### 【考察と今後の課題】

ルシフェラーゼタンパク質を発現する GM タバコを用いて、種々の接ぎ木条件下での導入遺伝子産物の移動について調べた結果、可食部への移動は認められなかったものの、台木から穂木、穂木から

台木へと長距離移動することが明らかになった。とくに穂木から台木の脇芽への移動が顕著であったこと、毛状根を有する台木から穂木への移動が顕著であったことから、植物体の状態に依存して移動量が変わることが明らかである。そのため、食経験のない組み合わせでの接ぎ木の場合、遺伝子組換え作物で作られたタンパク質がどのように移動しえるか、注意が必要である。一方で、原形質連絡の排除限界を拡張する、植物ウイルス由来の MP タンパク質は、接ぎ木面を介したタンパク質の移動に大きな影響をもたらさないことが明らかになったことは、接ぎ木技術の安全な利用にとって良い知見となったと思われる。今後、実際に GM 作物で使用されている Bt タンパク質の移動について、準備が進められているので、詳細な解析が待たれる。さらに、異種間の接ぎ木であるヘテログラフティングにおいて、可食物に台木由来のタンパク質が検出されたことから、どのような種類のタンパク質が移動しやすいのか、より進化的に遠い種間での接ぎ木を実施することで、明らかにされることが望まれる。

(4) 個別課題名：遺伝子組換え体-非組換え体による接ぎ木植物のトランスクリプトーム解析  
(宮原 平 (国立大学法人 千葉大学) )

### 【研究内容】

- (1) LUC 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるトランスクリプトーム解析  
LUC 遺伝子発現タバコ (*Nicotiana tabacum*) 台木に non-GM トマト穂木を接ぎ木した個体の穂木におけるトマト果実のトランスクリプトーム解析を実施した。異種接ぎ木における可食部の安全性評価調査として、遺伝子組換え台木に発現している外来遺伝子の影響が穂木の可食部に及ぼされるか調査を行った。
- (2) GFP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるトランスクリプトーム解析  
GFP 遺伝子発現タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 台木に non-GM トマト穂木を接ぎ木した個体の穂木におけるトマト果実のトランスクリプトーム解析を実施した。(1)と同様に、異種接ぎ木における可食部の安全性評価調査として、遺伝子組換え台木に発現している外来遺伝子の影響が穂木の可食部に及ぼされるのか調査を行った。(1)とは使用しているタバコの種と導入している遺伝子が異なっている。
- (3) MP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の葉におけるトランスクリプトーム解析  
MP 発現タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 台木に non-GM トマト穂木を接ぎ木した穂木におけるトマトの葉でのトランスクリプトーム解析を実施した。植物は原形質連絡を介した RNA 輸送経路をもっており、植物ウイルスはこの輸送機構を利用するために MP を発現して自身の RNA を隣接する細胞に輸送している。このため、植物ウイルスに感染した接ぎ木では RNA の移動が活発に行われる可能性が考えられるため調査を行った。
- (4) MP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の葉における small RNA-seq 解析  
上記 (3) のサンプルについて、(3) では 50 bp 以上の mRNA を対象に解析を行っているため、25 bp 以下の配列長の small RNA についても small RNA-seq により解析を実施した。

### 【研究方法】

- (1) LUC 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるトランスクリプトーム解析  
トマト果実から得られた total RNA を mRNA-seq 解析にかけることで、トランスクリプトームデータを得た。得られた配列データは公開されているトマト (ITAG4.0\_cDNA.fasta) およびタバコ (Ntab-v4.5\_cDNA\_Edwards2017.fasta) のゲノムデータから作成されたトランスクリプトームデータにアライメントすることで、各個体におけるそれぞれの遺伝子発現量データを得た。その後、n=3 として統計解析を行い、発現変動遺伝子の抽出を行った。LUC 遺伝子 (Uniprot Accession: P08659) に対してヘテロ・トランスグラフト (NtLUC-MT) のリードデータをアライメントすることで、LUC 遺伝子が穂木に移行しているか確認を行った。
- (2) GFP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるトランスクリプトーム解析  
解析方法は (1) と同様であるが、サンプルはヘテログラフト (Nb-MT) とヘテロ・トランスグラフト (NbGFP-MT) のみで行った。アライメントにはタバコの *N. benthamiana* のデータとして Niben261\_genome の配列データを使用した。GFP 遺伝子 (Uniprot Accession: P42212) に対してヘテロ・トランスグラフト (NbGFP-MT) のリードデータをアライメントすることで、GFP 遺伝子が穂木に移行しているか確認を行った。

### (3) MP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の葉におけるトランスクリプトーム解析

MP 発現タバコを接ぎ木したトマト穂木では果実の形成が見られなかったことから、サンプルは穂木の葉 (NbMP-MT、Nb-MT とともに n=2) を使用した。穂木の葉から得られた total RNA を用いて、(2) と同様に解析を行った。MP 遺伝子 (Cucumber mosaic virus 3a protein, Uniprot Accession: Q00271) に対してヘテロ・トランスグラフト (NbMP-MT) のリードデータをアライメントすることで、MP 遺伝子が穂木に移行しているか確認を行った。

### (4) MP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の葉における small RNA-seq 解析

(3) の解析と同じサンプルを使用して、small RNA-seq を行った。得られた配列データは公開されているトマトのゲノムデータ (GCF\_000188115.5\_SL3.1) にアライメントすることで、miRNA のアノテーションを行った。タバコのゲノムデータおよび MP 遺伝子配列は上記と同じものを使用した。

## 【研究成果】

### (1) LUC 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるトランスクリプトーム解析

タバコ台木に導入されている LUC 遺伝子についてリードデータを検索した結果、トマト果実では LUC 遺伝子は検出されなかった。また、各個体における遺伝子発現量データを基に階層クラスタ解析を行ったところ、特定の接ぎ木の組み合わせをもつ群によるクラスタ形成は確認されなかった。このため、今回比較した 3 群では、同種接ぎ木 (MT-MT: ホモグラフト) または異種接ぎ木 (NtLUC-MT: ヘテロ・トランスグラフト、Nt-MT: ヘテログラフト) を問わず大規模に遺伝子発現量に影響を与える接ぎ木の組合せは確認されなかった (図 21)。発現変動遺伝子の調査では、ホモグラフトと比較してヘテログラフトの 2 群で共通して発現変動する遺伝子には生体リズムやストレス応答に関与する遺伝子が含まれていた。また、ヘテロ・トランスグラフトでは NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 1 遺伝子が他の 2 群よりも発現が低下することが示された。アレルゲンタンパク質をコードする遺伝子として、Sola14 をコードする 2 遺伝子 (Sola14.0101 (CAA75803.1) と Sola14.0201 (AHC08074.1)、ともに pathogenesis-related protein-10) がヘテロ・トランスグラフトで発現が低下することが示された。以上の結果から、今回使用したサンプルでは、作物として有害となるような変動は確認されず、発現変動遺伝子を調査した結果から、トランスグラフト (遺伝子組換え台木を使用した接ぎ木) としての影響よりも、ヘテログラフト (異種接ぎ木) による影響が大きいことが示唆された。

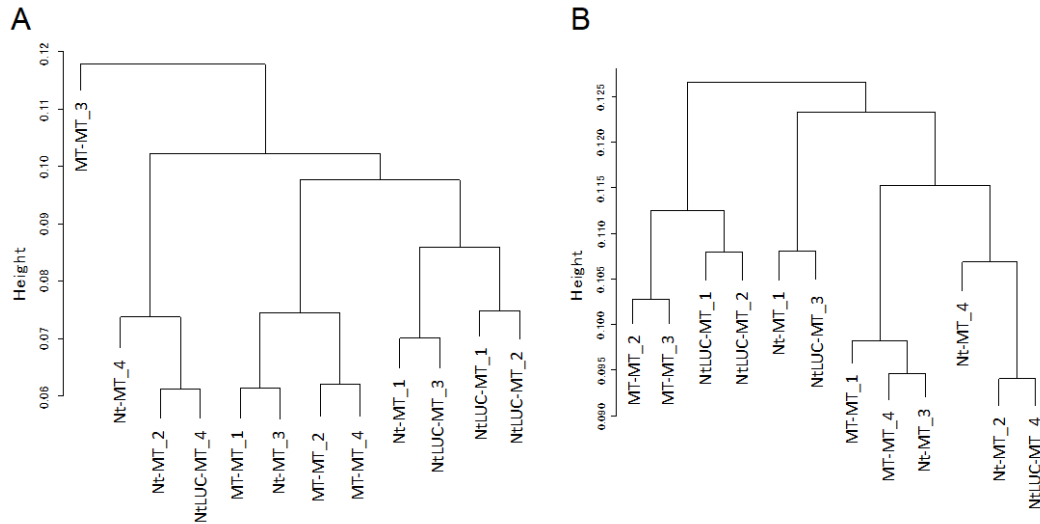


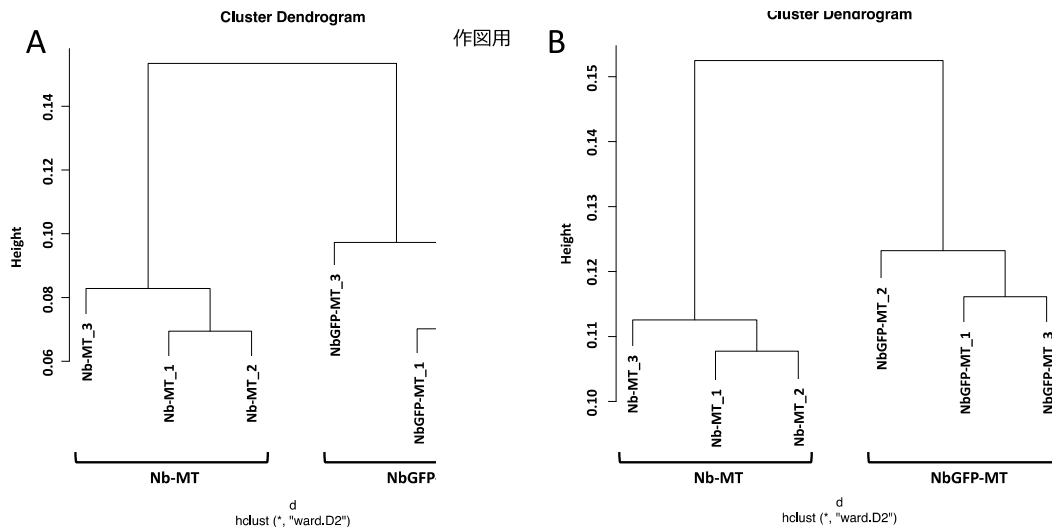
図21 LUC発現タバコ台木-nonGMトマト穂木接ぎ木の果実トランスクリプトームによる階層クラスタ解析

A: トマトのトランスクリプトームデータにリードデータをアライメントして得られた発現量から作成した。B: タバコのトランスクリプトームデータにリードデータをアライメントして得られた発現量から作成した。

## (2) GFP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の果実におけるトランスクリプトーム解析

タバコ台木に導入されている GFP 遺伝子についてリードデータを検索した結果、トマト果実では GFP 遺伝子は検出されなかった。次に各個体における遺伝子発現量データを基に階層クラスタ解析を行ったところ、各群でのクラスタ形成が確認された (図 22)。発現変動遺伝子の調査では、3408 遺伝子が抽出され、このうち、ヘテロ・トランスグラフトで 4 倍以上発現量が低下した遺伝子が 828 遺伝子あり、GO 解析から細胞壁合成、核酸代謝、遺伝子発現に関わる機能をもつ遺伝子が多いことが示された。また、373 遺伝子が 4 倍以上ヘテロ・トランスグラフトで発現量が上昇しており、GO 解析から塩ストレス応答、過酸化水素への応答、熱への応答など多くの遺伝子が環境ストレスに応答する機能をもつことが示された。アレルゲンタンパク質をコードする遺伝子については、発現量が変動するものは確認されなかった。これらの結果より、ベンサミアナタバコを用いたトマトとのヘテログラフトにおいても、作物として有害となるような変動は確認されなかった。

図用



作図用

サンプルに発現量が示された。

### (3) MP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の葉におけるトランスクリプトーム解析

タバコ台木に導入されている MP 遺伝子についてリードデータを検索した結果、トマト穂木の葉では MP 遺伝子は検出されなかった。階層クラスター解析では、各群でのクラスター形成が確認された。解析に使用しているサンプル数が各群で 2 個体であるため、統計的に発現量に変動のある遺伝子の抽出は行えていないが、正規化された発現量 (logCPM) が 5 以上であり、群間での発現量の差 (logFC) が 2 以上を示す遺伝子が 23 遺伝子確認された。しかしながら、これらの遺伝子の GO 解析からは特定の代謝経路に関わるクラスターは確認されなかった。アレルゲンタンパク質をコードする遺伝子では Sola14.0201 (pathogenesis-related protein-10, AHC08074.1) の発現量がヘテロ・トランスグラフトではヘテログラフトよりも 2 倍程度の発現量が示された。Sola14.0201 は (1) の解析でも遺伝子発現量の変動が確認されており、今後はさらに検体数を増やして確認する必要がある。

### (4) MP 遺伝子発現タバコを台木とする non-GM トマト穂木の葉における small RNA-seq 解析

タバコ台木に導入されている MP 遺伝子についてリードデータを検索した結果、トマト穂木の葉では MP 遺伝子の small RNA は検出されなかった。トマトのゲノムデータに対するリードデータのアライメント率はどの個体においても 90%程度であり、タバコのゲノムデータでは 30%程度であった。このため、アライメント率に群間で顕著な差は確認されなかった。群間で発現量に差があると考えられる small RNA として、35 遺伝子が検出され、うち 25 遺伝子が miRNA に分類され、10 遺伝子がタンパク質をコードする遺伝子的一部分と考えられた。特に発現量の差が大きい miRNA として、miRNA-125 が NbMP-MT 群で 60 倍以上発現量が上昇しており、miRNA-18 が NbMP-MT 群で 50 倍以上発現量が低下していた。これら 2 つの miRNA の機能については不明であった。

### 【考察と今後の課題】

本研究ではヘテログラフトおよびヘテロ・トランスグラフトにより穂木の可食部における遺伝子発現にどのような影響があるか調査を行った。その結果、台木に導入された外来遺伝子 (LUC、GFP および MP) は穂木の可食部では検出されなかった。また、トマトのアレルゲンタンパク質をコードする

遺伝子の発現に有害となる影響は確認されなかったものの、アレルゲンの1つである Sola 14 (PR-10) がヘテログラフトにおいて発現変動しやすいことが考えられた。ヘテログラフトでは PR タンパク質のような環境ストレスに応答する遺伝子発現が変動しやすい可能性があるため、組合せの異なるヘテログラフトでアレルゲン遺伝子の発現が有害となるものがないか調査することは重要だと考えられた。

## 2 研究全体の成果、考察及び結論

トランスグラフト作物の non-GM 可食部のゲノムには細胞外で加工した核酸は含まれず、non-GM として取扱える可能性があり、今後の開発が加速すると考えられる。しかし、トランスグラフト作物から収穫される non-GM 可食部を食品として利用する際の安全性評価のポイントは明確にされていない。

本研究では、トランスグラフト作物の GM 台木が non-GM 穂木の可食部に与える影響を精査するため、GM 台木由来の組換えタンパク質が穂木に移行する可能性を解析するためのモデル接ぎ木作物を作出するとともに、マルチオミクス研究と食品成分分析によって、外来遺伝子産物が穂木にどのような影響を及ぼすか解析することで、GM 台木を持つ接ぎ木作物の non-GM 可食部を食品とする場合の安全性評価点を明らかにすることを目的とした。

本研究の実験結果は以下の 4 点に集約される

- 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。移行量は限定的であり、移行性も接ぎ木個体間で差がある。移行の有無に植物種の違いも、トランスグラフト、ヘテロ・トランスグラフトの違いも影響しない。一般化できる移行性の法則は無い。
- ② 接ぎ木技術そのものが植物の内在代謝活性に影響を及ぼす可能性がある。
- ③ 台木・穂木の間で物質 (毒性物質を含む) 移行がある。
- 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。

以下に、研究の個別の成果、考察、および結論をまとめる。

### 【成果】

**LUC タンパク質の移行性：**NtLuc-MT (ヘテロ・トランスグラフト) の解析から、GM タバコ台木で発現する LUC タンパク質が non-GM 穂木の茎に移行すること、また LUC タンパク質移行の有無は 接ぎ木個体間で差があることがわかった。本研究の実験条件では、non-GM 穂木果実への移行は検出されなかった。

**GFP タンパク質の移行性：**MTGFP-MT (トランスグラフト)、NtGFP-MT および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) の解析から、non-GM 穂木の茎と葉に GFP が移行することがわかった。移行した場合においては、non-GM 穂木での GFP シグナル検出の有無や検出位置は接ぎ木個体ごと異なっていた。本研究の実験条件では、non-GM 穂木果実への移行は検出されなかった。

**プロテオーム解析：**台木 (GM、non-GM に限らず) から、穂木可食部にタンパク質が移行することがわかった。ヘテロ・トランスグラフト系統の解析では、GM タバコ台木由来のタンパク質が non-GM 穂木 トマト果実中への移行が検出された。以上の結果は、台木から穂木へタンパク質移が移行すること、台木のタンパク質の種類 (性質) や発現量 (GM、non-GM に限らず) によって、移行性が異なることを示している。さらに、GM 台木で発現する LUC および GFP のいずれの場合も、供試接ぎ木個体で穂木への移行が確認された場合と確認されなかった場合があること、移行した場合でも移行部位について一般化できないがわかった。

**メタボローム解析：**今回の解析では、GM 台木を使用したことによって non-GM トマト穂木果実の安全性に懸念が生じる結果は認められなかった。一方、供試した接ぎ木系統のすべてで、非接ぎ木体と比較してトマトの内在性のステロイドアルカロイド ( $\alpha$ -tomatine、およびその代謝物) 含量が低下していた、またその影響は GM と non-GM による違いは無かった。また、ヘテログラフト (Nb-MT、Nt-MT)、ヘテロ

・トランスグラフト系統 (NbGFP-MT、NtGFP-MT、NtLuc-MT) のいずれの場合でも、タバコ台木由来のニコチンが穂木トマト果実に検出された。以上の結果は、接ぎ木によって植物が持つ本来の二次代謝活性が影響を受けること、また接ぎ木植物では、可食部には本来蓄積しない有害物質が、接ぎ木パートナ一部位から移行して蓄積する可能性があることを示している。

トランスクリプトーム解析：今回の解析では、タバコ台木 (GM、non-GM に限らず) の異種接ぎ木による non-GM トマト穂木果実の遺伝子発現変動から安全性に懸念が生じる結果は認められなかった。ヘテログラフト系統 (NtLUC-MT、Nt-MT、NbMP-MT) では生体防御 (ストレス応答) に関連する遺伝子の発現量が変動しやすいことが考えられた。トマトのアレルゲンタンパク質である Sola14 も生体防御に関わるタンパク質であるが、プロテオーム解析では、Sola14 発現量の変動は確認されていないことから、タンパク質への翻訳までは至らないことが考えられる。GM 台木で発現する LUC、GFP および MP (small RNA も含む) はいずれの場合でも、供試接ぎ木個体で穂木への移行は確認されなかった。

ウイルス感染によるタンパク質移行の促進可能性：MTGFP-MT (トランスグラフト) および NbGFP-MT (ヘテロ・トランスグラフト) 葉への CMV 感染が GFP 蓄積に及ぼす影響を調査した結果、健全接ぎ木体と CMV 接種個体の両方で、穂木頂葉において微量の GFP が検出された。GFP 蓄積量は個体によって異なり、他の個体より多く蓄積している個体があった。CMV 感染による生育阻害との関連は不明であるが、CMV 感染個体の葉の GFP 蓄積量は、健全個体と比べて差はない、あるいは少なかった。また、MP 恒常的発現では GFP 移行の顕著な亢進は起こらなかった。本研究項目においては、いずれの接ぎ木体においても果実からは GFP は検出されなかった。以上より、CMV 感染によって台木から穂木への物質輸送が亢進されることは無いと考えられた。

## 【考察および結論】

### 遺伝子組換え台木と非組換え穂木間の生体成分輸送に起因する食品安全性の評価

GM 植物を接ぎ木に用いた作物の non-GM 部位を食品とする際には、組換えタンパク質が GM 部位から non-GM 部位に移行することを前提として議論と審査を進める必要がある。すなわち、接ぎ木に使用された GM 作物が GM 食品として安全性審査が終了している場合と、新規 GM 作物である場合では、異なる対応が求められる。GM 食品として承認されていない場合には個別の安全性評価が必要となる。

台木・穂木間で代謝物とタンパク質も移行すること、さらに接ぎ木技術の適用そのものが植物の代謝活性に影響を及ぼすことから、接ぎ木に供試した植物種の台木・穂木間で、アレルゲンや毒性物質の可食部への移行や毒性物質の生合成の活性化にも配慮する必要がある。

接ぎ木に使用する植物に食品生産に使用された実績があるかどうか (HOSU: history of safe use) が重要な検討項目となる。HOSU が無い植物を遺伝子組換えして接ぎ木に使用する場合にも個別の安全性評価が必要となることは言うまでもない。

## Ⅲ 本研究を基にした論文等

### 1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

Omics Profiles of Non-GM Tubers from Transgrafted Potato with a GM Scion.

Miyahara T, Nishiuchi T, Fujikawa N, Oguchi T, Kikuchi A, Taoka KI, Ogawa T, Honda K, Yamaguchi Y,

Mochizuki T, Ohta D, Kodama H.

©Food Saf (Tokyo). 2023 11:1-20. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.

(食品健康影響評価技術研究：課題番号 1902 との共同成果)

Multi-omics analyses of non-GM tomato fruits borne on transgrafted plants.

Ogawa T, Kato K, Asuka H, Sugioka Y, Mochizuki T, Nishiuchi T, Taira Miyahara T, Kodama H, Ohta D.

Food Saf (Tokyo) 投稿中

## 2 本研究を基にした学会発表の実績

望月 知史, 明日香 晴絵, 加藤 奏, 小川 拓水, 宮原 平, 児玉 浩明, 太田 大策

日本植物病理学会 令和5年度大会 (2023年3月)

遺伝子改変台木と非遺伝子改変穂木間の外来タンパク質輸送への植物ウイルス感染の影響評価

大久保 一実, 梅山 幸子, 小川 拓水, 望月 知史, 太田 大策, 宮原 平, 児玉 浩明

植物バイオテクノロジー学会堺大会 (2022年9月)

トランスグラフトニングにおける台木から穂木へのルシフェラーゼタンパク質の移動

加藤 奏, 杉岡 優美, 明日香 晴絵, 小川 拓水, 望月 知史, 宮原 平, 児玉 浩明, 太田 大策

植物バイオテクノロジー学会堺大会 (2022年9月)

遺伝子改変台木と非遺伝子改変穂木間の生体成分輸送に起因する食品安全性評価点の解明

## 3 特許権等の出願・申請等の状況

無し

## 4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

無し

## 5 その他 (各種受賞、プレスリリース等)

無し

#### IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

##### 1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 遺伝子組換え植物を台木として接ぎ木した非遺伝子組換え作物の穂木 (同品種、異品種、異種植物種) において、意図した改変形質を有する可食部の安全性評価ポイントを明らかにする。	5	GM タバコ台木 ( <i>N. tabacum</i> , <i>N. benthamiana</i> ) および GM トマト台木と、non-GM トマト穂木から成る多数の接ぎ木系統を作出した。マルチオミクス解析を含めた多面的な解析によって安全性評価ポイント明らかにした。
(2) 害虫抵抗性 Bt タンパク質、あるいは LUC タンパク質を発現するナス科植物を台木とした接ぎ木体において、台木に導入した遺伝子の翻訳産物の移行性、穂木の遺伝子発現プロファイル、代謝物プロファイルを明らかにする。	5	LUC 発現タバコに加えて、GFP をタバコおよびトマトで発現させて GM 台木とし、non-GM トマトを穂木とした接ぎ木系統を多数作出した (表 1 など)。導入遺伝子産物である LUC と GFP が non-GM 部位に移行することを様々な方法で明らかにするとともに、マルチオミクス解析によって non-GM トマト果実を食品として利用しても、その安全性に懸念は無いことを示した。
(3) ウイルス感染によって外来遺伝子産物の移行かが亢進される可能性を検証するため、キュウリモザイクウイルス (CMV) の MP (移行タンパク質) を恒常発現させた MP 発現植物を用いて、物質の体内移行の解析を行う。	5	MP 恒常発現タバコを作出し、GFP の部位特異的な一過的発現系を構築した。GFP は一過的発現部位から他の組織に GFP 移行しないこと、CMV 感染 (MP による原形質連絡を介した輸送亢進) によって GFP の体内移行が亢進されることはないことを明らかにした。
(4) MP 発現植物を Bt 発現植物等と接ぎ木し、台木・穂木間の物質移行における原形質連絡の関与の検証、生体分子の網羅的解析によって、導入遺伝子を含まない可食部の安全性評価ポイントを明らかにする。	4	達成目標 (3) の結果と合わせ、CMV 感染が原形質連絡を介した物質輸送を亢進し、その結果として組換えタンパク質が non-GM 部位に移行する可能性は極めて低いことがわかった。GM 台木から non-GM 部位へのタンパク質の移行経路とともに、CMV 感染による代謝物輸送の促進の可能性についても今後の調査が必要である。
(5) 接ぎ木によって改変された形質のみが付与されたことを確認された食品においては、実質的同等性を演繹した食品の安全性評価が可能かどうか、その適応範囲と限界について明らかにする	5	GM 台木を持つ non-GM 穂木可食部の品質には食品としての安全性の懸念は無かった。GM と non-GM に関わらず台木の代謝産物とタンパク質は穂木に移行した。安全性の審査においては、non-GM 穂木には外来遺伝子が存在しなくとも、GM 台木の外来遺伝子産物 (タンパク質) が non-GM 穂木に移行することを前提

		とする必要があることを明確に示した。GM 台木の安全性が承認されているか否かが必要な評価点であることを明確にした。
--	--	---

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

## 2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	GM 台木と non-GM トマト穂木を有する接ぎ木系統を作出し、台木・穂木間の物質移行を精査した。台木植物に特異的な代謝産物やタンパク質が穂木に移行することを明らかにした。今回の結果では、GM 台木の使用が non-GM 穂木可食部の食品としての安全性に関わる著しい影響を及ぼすことは検出されなかったが、安全性審査は GM 台木から外来遺伝子産物 (タンパク質) が、non-GM 穂木に移行すること、様々な代謝物が移行することを前提とする必要があることを明確にした。ウイルス感染は台木から穂木への顕著な GFP 移行亢進に影響しないことも明らかにした。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究成果は、組換えタンパク質が GM 部位から non-GM 部位に移行するという事実を基にした安全性の評価が必要となることを明確するものであり、新たな評価指針として有用である。
<p>総合コメント</p> <p>GM 植物と non-GM 作物から成る接ぎ木によって、ゲノム配列の改変なしに、non-GM 部位の生産に優位な形質を付与する新品種開発が進むと考えられる。このような接ぎ木体由来の食品安全性審査には、(1) GM 台木由来の組換えタンパク質が non-GM 部位に移行することが前提となること、すなわち接ぎ木に使用する GM 作物の安全性がすでに承認されているかどうか、(2) 内生タンパク質や代謝物が台木から穂木に移行することから、接ぎ木に用いる植物種の HOSU 情報が必須であることが、食品安全性の評価点となることを示すことができた。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

<p>この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。</p> <p>本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。</p>
--

(別添1)

## 研究成果の概要 (和文)

遺伝子組換え (GM) 作物と非組み換え (non-GM) 作物を用いた接ぎ木 (トランスグラフト) によって、ゲノム配列の改変なしに、non-GM の可食部に有用形質を付与する新しい栽培技術 (New Plant Breeding Technology, NBT) が開発されている。本研究では、GM 台木由来の組換えタンパク質が non-GM 穂木に移行する可能性を解析するためのモデル接ぎ木作物を作出し、non-GM 穂木の可食部を食品とする場合の安全性評価点を明らかにすることを目的とした。マルチオミクス研究と食品成分分析によって non-GM 可食部の食品安全性に懸念される要因は検出されなかったが、GM 台木由来の組換えタンパク質や代謝成分が non-GM 部位の可食部に移行することが明らかとなった。このようなトランスグラフト作物から収穫される non-GM 部位を食品として利用する場合には、(1) GM 台木由来の組換えタンパク質が non-GM 部位に移行することを前提として、その GM 作物の安全性がすでに審査・確認されているかどうか、また、(2) 内生タンパク質や代謝物も台木・穂木間で移行することから、接ぎ木に用いる植物種の HOSU (history of safe use) 情報も安全性審査の評価点となることを示した。

(別添2)

## 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Clarification of food safety assessment points from the perspective of bio-molecule transport between genetically modified rootstock and non-genetically modified scion.
Research project number	2101
Research period	FY 2021 – 2022
Name of principal research investigator (PI)	Daisaku Ohta

## Abstract/Summary

Transgrafting, comprising non-genetically modified (non-GM) plants for food use and genetically modified (GM) plants with agronomically useful traits, is expected to be a promising technology that takes full advantage of the benefits of genetic modification, without the direct manipulation of the genome sequence of the edible part of the crop. Our objective was to clarify the safety assessment points when such non-GM parts from transgrafted crops are used as food: we generated model transgrafted plants consisting of rootstocks (tobacco or tomato) expressing either GFP or firefly luciferase and non-GM tomato scions and studied the quality of the non-GM tomato fruits and the possibility of transferring recombinant proteins from the GM rootstocks to non-GM tomato scions. Multi-omics studies and food constituent analysis showed no food safety concerns in the edible parts of the non-GM scions, while recombinant proteins and metabolites derived from the GM rootstocks were transferred to the edible parts of the non-GM scions. In conclusion, from a safety assessment point of view, even if the edible parts of such transgrafted crops are non-GM, it is necessary to clarify (1) whether the safety of the GM plants used for the transgrafting partner has already been assessed and approved for food use, assuming that recombinant proteins derived from the GM rootstock could be transferred to the non-GM parts, and (2) since endogenous proteins and metabolites are transferred from the rootstock to the scion, it is essential to investigate whether the plant species used for transgrafting has already been used for food production (history of safe use: HOSU).

遺伝子組換え (GM) 作物と非組み換え (non-GM) 作物を用いた接ぎ木によって、ゲノム配列の改変なしに、non-GM の可食部に有用形質を付与する新しい栽培技術 (New Plant Breeding Technology, NBT) が開発されている。本研究では、GM 台木由来の組換えタンパク質が non-GM 穂木に移行する可能性を解析するためのモデル接ぎ木作物を作出し、non-GM 穂木の可食部を食品とする場合の安全性評価点を明らかにすることを目的とした。マルチオミクス研究と食品成分分析によって non-GM 穂木の可食部の食品としての安全性の懸念となる要因は検出されなかったが、GM 台木由来の組換えタンパク質や代謝成分が non-GM 部位の可食部に移行することが明らかとなった。その結果、このような接ぎ木作物から収穫される部位が non-GM であったとしても、それを食品として利用する場合には、(1) GM 台木由来の組換えタンパク質が non-GM 部位に移行することを前提として、接ぎ木に使用する GM 作物の安全性がすでに審査・確認されているかどうか、(2) 内生タンパク質や代謝物が台木から穂木に移行することから、接ぎ木に用いる植物種がすでに食品として利用されたものかどうかの情報 (history of safe use: HOSU) が必須であることを、安全性審査の評価点となることを示した。

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ).  
This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose.  
All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

## 1 . List of papers published on the basis of this research

Omics Profiles of Non-GM Tubers from Transgrafted Potato with a GM Scion.

Miyahara T, Nishiuchi T, Fujikawa N, Oguchi T, Kikuchi A, Taoka KI, Ogawa T, Honda K, Yamaguchi Y, Mochizuki T, Ohta D, Kodama H.

©Food Saf (Tokyo). 2023 11:1-20. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.

(Published as a joint work with the research project number: 1902)

Multi-omics analyses of non-GM tomato fruits borne on transgrafted plants.

Ogawa T, Kato K, Asuka H, Sugioka Y, Mochizuki T, Nishiuchi T, Taira Miyahara T, Kodama H, Ohta D.  
Food Saf (Tokyo) under review

## 2 . List of presentations based on this research

Mochizuki et al. (March 2023, The Phytopathological Society of Japan)

Studies on the effects of viral infection on the possible transfer of transgene products from genetically modified rootstock to non-genetically modified scion of transgrafted plants.

Okubo et al. (September 2022, The Japanese Society for Plant Biotechnology)

Studies of the transfer of luciferase protein from rootstock to scion of transgrafted plants.

Kato et al. (September 2022, The Japanese Society for Plant Biotechnology)

Clarification of food safety evaluation points attributable to biomolecule transfer from genetically modified rootstock to non-genetically modified scions of transgrafted plants.

## 3 . The number and summary of patents and patent applications

N/A

## 4 . Others (awards, press releases, software and database construction)

N/A