

平成31～令和2年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）
（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	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（課題番号：1902） 3. 新たなリスク評価方法等の確立 （1）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：児玉 浩明 所属機関：国立大学法人 千葉大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成31年度～令和2年度（2年間）

2 研究目的

新たな植物育種技術では、導入遺伝子の転写産物や翻訳産物を、接ぎ木や交配によって非遺伝子組換え植物部位や植物個体に伝搬することが可能である。すなわち導入遺伝子が存在せずとも、意図した有用形質を発現する作物の生産が現実となった。接ぎ木では翻訳産物や代謝産物、植物ホルモンが移動して可食部が形質転換され、siRNA による転写後抑制・転写抑制ではその形質が接ぎ木もしくは交配により伝搬される。本研究では、導入遺伝子を有さない形質改変食品を生み出す同種・異植物種間の接ぎ木、siRNA 技術による接ぎ木および交配後代の形質転換、特に RNA オフターゲット分解および宿主ゲノム DNA オフターゲット抑制の可能性を明らかにし、安全性評価に資することを目的とする。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
（1）同種植物間の導入遺伝子を含まない接ぎ木形質改変食品および siRNA 技術応用食品の解析	1）同種植物間の導入遺伝子を含まない接ぎ木形質改変体と後代交配体の作出およびトランスクリプトーム解析	児玉 浩明 (国立大学法人千葉大学)
	2）導入遺伝子が存在しない表現型改変接ぎ木体および後代交配体におけるプロテオーム解析	小関 良宏 (国立大学法人東京農工大学)
	3）新育種技術によって作出された作物のメタボローム解析	太田 大策 (大阪府立大学)
	4）同種間の遺伝子組換え体-非組換え体接ぎ木植物の作出と可食部の食	小口太一 (筑波大学)

	品成分分析	
(2) 異種植物間の導入遺伝子を含まない接ぎ木形質改変食品および siRNA 技術応用食品の解析	1) 異種植物間の接ぎ木形質改変体の作出およびプロテオーム解析	児玉 浩明 (国立大学法人 千葉大学)

4 倫理面への配慮について

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了承を得て、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) 研究項目名: 同種植物間の導入遺伝子を含まない接ぎ木形質改変食品および siRNA 技術応用食品の解析

1) 個別課題名: 同種植物間の導入遺伝子を含まない接ぎ木形質改変体と後代交配体の作出およびトランスクリプトーム解析 (研究担当者名: 児玉 浩明 (所属機関名: 国立大学法人 千葉大学))

【研究内容】

- ① siRNA 産生導入遺伝子が排除された null segregant の解析
- ② 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
- ③ 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
- ④ 接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析
- ⑤ 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

【研究方法】

- ① siRNA 産生導入遺伝子が排除された null segregant の解析
α-リノレン酸合成を触媒する FAD3 遺伝子の転写後発現抑制タバコ個体 (S44 株) に、FAD3 導入遺伝子の転写を行う 35S プロモーターを標的とする siRNA を産生する転写抑制コンス

トラクト (end2) を導入した株を用いた。この株 (交配株 : S44-end2) を 2 度野生株と戻し交配を行うことで、転写後発現抑制を誘導する導入遺伝子座と転写抑制を誘導する導入遺伝子座の両方が分離して排除された null segregant タバコを作出した。この null segregant の葉を材料としてトランスクリプトーム解析を実施した。

② 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

35S プロモーターを標的にした siRNA を発現するタバコ (S44-end2) を台木とし、レポーター遺伝子として 35S プロモーターに接続したホタルルシフェラーゼ遺伝子による形質転換体 (LUC 株) を穂木とした接ぎ木を行った (穂木/台木 : LUC/S44-end2)。台木から移動した siRNA の穂木における効果については、穂木のルシフェラーゼ活性を測定することで評価した。また、穂木の葉柄における siRNA シーケンス解析により、siRNA の穂木への移行を調べた。さらに台木由来のプロモーターを標的とする siRNA が、穂木において標的プロモーター配列のメチル化を誘導するのか、バイサルファイトシーケンスにより確認した。

さらに、35S プロモーターを標的にした siRNA を発現するタバコ (S44-end2) を台木とし、野生株を穂木とした接ぎ木個体 (穂木/台木 : WT/S44-end2) を作出し、穂木の葉のトランスクリプトームを解析した。

③ 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

GUS 遺伝子発現コンストラクトを導入したマイクロトマト (T-MT) を台木とし、食用品種である Stella トマトを穂木として接ぎ木を実施した。接ぎ木個体で得られた果実のトランスクリプトーム解析を実施した。

④ 接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析

台木にルシフェラーゼを発現する LUC タバコを用い、穂木にタバコ野生株を用いて接ぎ木を行った (穂木/台木 : WT/LUC)。接合部から穂木の茎、葉柄、葉にまで、細かく距離を測定しサンプリングを行った。採取した組織片からタンパク質を抽出し、ルシフェラーゼ活性を測定することで、台木から穂木へのルシフェラーゼタンパク質の移動を確認した。さらに、WT/LUC の穂木の葉柄および葉から total RNA を抽出して、mRNA シーケンスを行ない、LUC mRNA の存在の有無を調べた。

⑤ FT 遺伝子発現穂木を用いた同種間ジャガイモ可食部の解析

FT ジャガイモを穂木、非組換えジャガイモを台木として接ぎ木した個体 (TN 群) の塊茎、および非組換えジャガイモ同士を接ぎ木した個体 (NN 群) の塊茎、それぞれ 4 個体について、イモの皮を含む塊茎の外側の部分から total RNA を抽出し、mRNA シーケンスを行った。得られた mRNA-seq データは、公開されているジャガイモのトランスクリプトームデータ (https://solgenomics.net/organism/Solanum_tuberosum/genome) である

DM_1-3_516_R44_potato.v6.1.working_models.cdna.fa にマッピングを行い、各遺伝子の発現量を算出した。また、FT 遺伝子である SP6A 遺伝子の転写産物が移動する可能性について TN 群の塊茎で同遺伝子の転写産物配列が検出されているか、確認を行なった。

【研究成果】

① siRNA 産生導入遺伝子が排除された null segregant の解析

S44-end2株は、FAD3導入遺伝子が転写後発現抑制されたS44株に35Sプロモーターを標的と

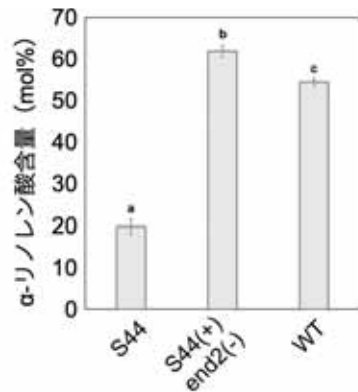


図1 S44(+)/end2(-)株のα-リノレン酸含量

FAD3遺伝子は、α-リノレン酸合成を触媒する。FAD3導入遺伝子のプロモーター配列のメチル化を誘導するend2ロカスが分離してもS44ロカスのDNAメチル化が維持され、FAD3遺伝子が過剰発現となる表現型が維持される。

するsiRNAを産生する転写抑制コンストラクト (end2) を導入することで、S44株で本来生じていた転写後発現抑制siRNAの産生が消失し、FAD3導入遺伝子が過剰発現した株である (Hirai et al. (2010) FEBS J. 277: 1695-1703)。S44-end2株に野生株を2度戻し交配することで、S44(+)-end2 (-)となった株とS44(-)-end2(-)である null segregantが得られる。S44(+)-end2(-)は、end2ロカスによる転写抑制siRNAが産生されないため、S44株本来の転写後発現抑制に戻ると予想されたが、実際にはプロモーター配列のメチル化が維持されて、FAD3遺伝子の過剰発現の表現型となる (Hirai et al. (2010); 図1)。DNAのメチル化を利用した null segregantの商業的利用は、まさにこのような導入遺伝子は存在しないが、標的遺伝子座のメチル化が維持された系統をnon-GM系統として利用するものである。本研究では、S44(-)-end2(-)の null segregant (Null群) と野生株 (WT群) の葉のトランスクリプトーム解析を行うことにより、宿主ゲノムの内在性

遺伝子発現に与える影響を明らかにし、意図せぬ宿主ゲノムのメチル化による DNA オフターゲット抑制の影響が生じるかどうかを検討した。mRNA-seq データから作成したコンティグ配列を元に発現量の算出を行った。階層クラスター解析の結果からNull群とWT群で遺伝子発現の状況に違いがあることが示された (図2)。Null群とWT群で発現量が有意に異なるDEGs の検出では、204 遺伝子が $P_{FDR} < 0.05$ として得られた。このうち、122 遺伝子が Null で発現量が2倍以上に促進 (Null > WT, $\log FC > 2$) され、7遺伝子が1/2倍以下に発現量が減少 (Null < WT, $\log FC > 2$) していた (図3)。また、DEGsのうち、Uniprot Accession 情報が付加された 152 遺伝子についてさらに解析を進めた。GO 解析の結果から、P value < 0.05の条件で、タンパク質リン酸化、防御応答、タンパク質輸送の機能に分類されるクラスターがNull 群で発現が向上しており、細胞内リン酸イオンの恒常性維持に分類される遺伝子は WT 群で発現が向上する結果が得られた。さらに、P value < 0.01の条件で、タンパク質脱ユビキチン化 (GO:0016579: protein deubiquitination) に関わる遺伝子が、Null群で発現が上昇していた。

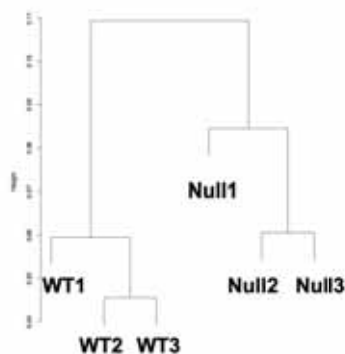


図2 siRNA産生ローカスのnull segregantと野生株タバコの階層クラスター解析によるデンドログラム

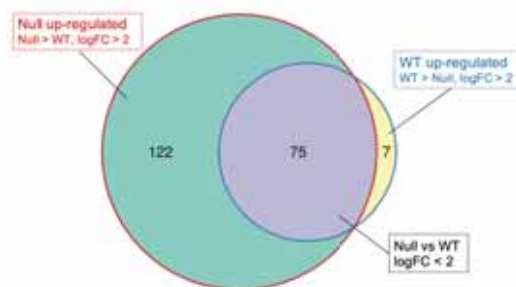
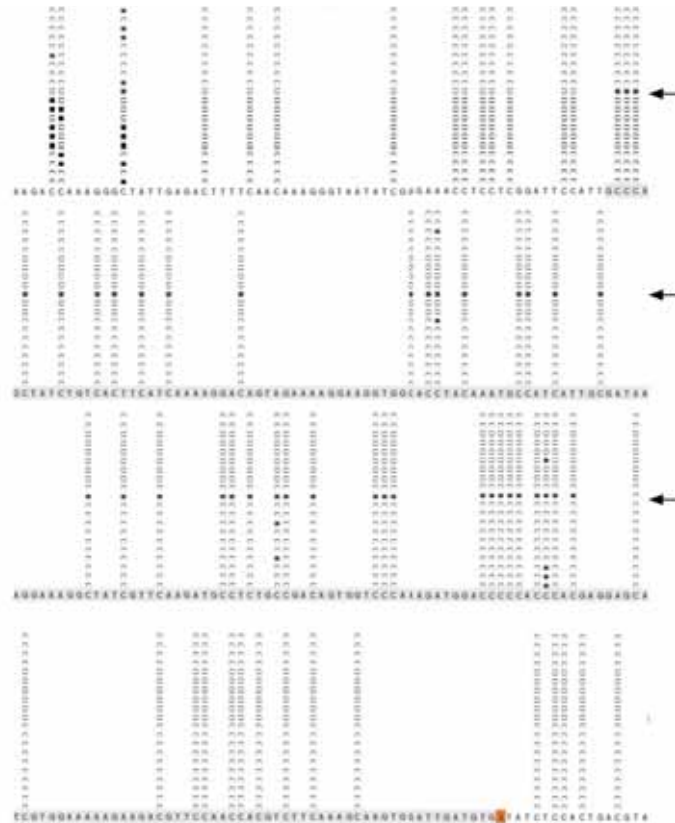


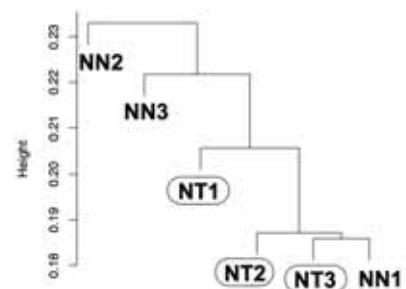
図3 siRNA産生ローカスのnull segregantと野生株タバコ間で検出されたDEGs
75遺伝子は変動幅が2倍以下であった。

35S プロモーターを標的にした siRNA を発現するタバコ (S44-end2) を台木とし、レポーター遺伝子として 35S プロモーターに接続したホタルルシフェラーゼ遺伝子による形質転換体 (LUC 株) を穂木とした接ぎ木を行った (穂木/台木: LUC/S44-end2)。穂木の葉と葉柄のルシフェラーゼ活性を測定したところ、接ぎ木個体ごとに変動の幅が大きく、特定の傾向を認めることができなかった。接ぎ木 2 個体の葉柄サンプルの siRNA シーケンスの結果、35S プロモーターと *LUC* 遺伝子配列についてそれぞれ siRNA を検出することができた。しかし、台木で発現している 35S プロモーター標的 siRNA に相当する siRNA は

また、35S プロモーターを標的にしたsiRNAを発現するタバコ (S44-end2) を台木とし、野生株を穂木した接ぎ木個体 (穂木/台木: WT/S44-end2 (NT群)) と野生株同士の接ぎ木個体 (WT/WT (NN群)) を作出し、穂木の葉のトランスクリプトーム解析を行った結果、遺伝子発



バイサルファイト処理後 標的プロモーター配列をPCRで増幅し、クローニングした。20クローンのうち、1クローンで標的配列部位がメチル化されていた(矢印のクローン)。メチル化シトシンは黒で、非メチル化シトシンは白のボックスで示している。標的配列はグレーで網掛けしてある。



5

現に2群間で明確な違いは見られなかった(図5)。さらに2群間でのDEGsを抽出したところ、 $P_{FDR} < 0.05$ を示す遺伝子が55遺伝子検出された。GO解析の結果では、NT群で発現が上昇している遺伝子群の中に“response to wounding”に関与する遺伝子が確認されたが、その他に特徴的なMolecular FunctionやBiological Processは確認されなかった。

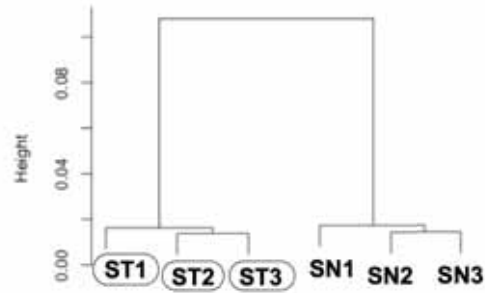


図6 GUS形質転換台木がStella品種トマト穂木の果実のトランスクリプトームに与える影響
階層クラスター解析によるデンドログラム

③ 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

GUS 遺伝子発現マイクロトムトマト (T-MT) を台木とし食用品種である Stella トマト (S) を穂木とした接ぎ木 (ST) と、非遺伝子組換えマイクロトム (N-MT) を台木とし S を穂木とした接ぎ木 (SN) で得られた果実のトランスクリプトーム解析を実施した。各接ぎ木3個体ずつから果実を採取し、発現している遺伝子群について階層クラスター解析を行ったところ、ST 群と SN 群に綺麗に分かれることが示されたため(図6)、二群間比較から発現変動が認められる遺伝子について調査した。その結果、5 遺伝子が SN 群で共通して発現が高く、1 遺伝子が ST 群で共通して発現が向上していることが示された(図7)。

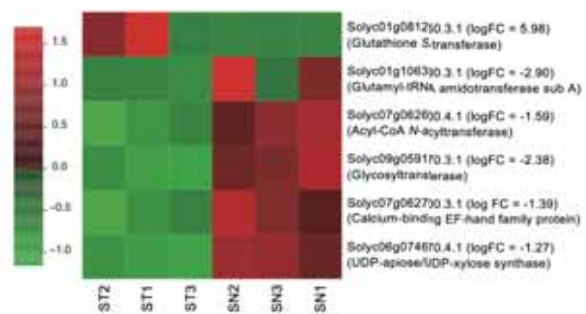


図7 GUS形質転換台木がStella品種トマト穂木の果実のトランスクリプトームに与える影響
DEGsの発現を示すヒートマップ

これらの遺伝子についてアノテーションを確認したが、共通する代謝経路など特定の機能についての関わりは示されなかった。また、2 群間でアレルゲン物質に関わる遺伝子の発現に変動はみられなかった。台木に導入されている GUS 遺伝子の転写産物が、非組換え体である穂木の果実からは検出されなかった。

④ 接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析

台木にルシフェラーゼを発現する LUC タバコ株を用い、穂木にタバコ野生株を用いて接ぎ木を行った(穂木/台木: WT/LUC)。接ぎ木後、3 週間から 11 週間にわたって茎、葉柄、葉身をサンプリングし、ルシフェラーゼ酵素活性を測定した。その結果、測定部位により検出されたルシフェラーゼ活性が異なり、葉柄のほうが葉身よりも高い比活性を示した。また graft junction から 8cm から 10cm 程度、離れた部位まででルシフェラーゼ活性が検出された(図8)。台木で産生された LUC mRNA が接ぎ木により穂木に移行するか確認した結果、得られた mRNA シーケンスデータには LUC 相同配列は確認されなかった。このことから、WT/LUC 接ぎ木個体の穂木で検出された LUC 活性は、LUC タンパク質が台木から穂木へ移行して活性が検出されたものと考えられた。

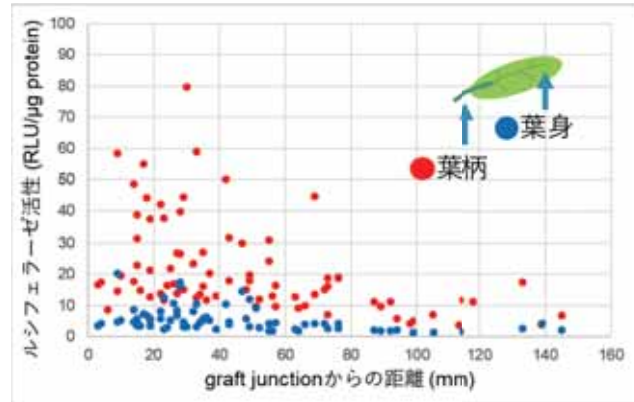


図8 ルシフェラーゼ発現台木に接ぎ木した野生株穂木で検出されるルシフェラーゼ活性
葉身での活性を青、葉柄での活性を赤で示した。

⑤ *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

ジャガイモのゲノム解読から得られているトランスクリプトームデータには、52,897 遺伝子が含まれており、今回塊茎から得られた mRNA-seq データをマッピングしたところ、各サンプルでのマッピング率は 80%程度であった。次に 6 サンプル中 1 つのサンプル以上で発現が検出された遺伝子群を対象として階層クラスター解析を実施した。その結果、TN 群と NN 群で遺伝子発現に明確な差はないことが示された（図 9）。また、TN 群と NN 群の遺伝子発現量の比較から DEGs の抽出を行なったが、 $P_{FDR} < 0.05$ を示す遺伝子は得られず、2 群間で発現が変動している遺伝子は得られなかった。また、穂木に導入されている *FT* 遺伝子である *SP6A* 遺伝子 (NP_001274897.1) の配列を、今回取得した mRNA-seq データをアセンブルしたデータから blast 検索を行なった。その結果、*FT* 様遺伝子として Flowering locus T-like (XP_006365460.1) が検出された。しかしながら、この *FT* 様遺伝子の発現量は TN 群と NN 群で発現量に変動がなく、穂木で過剰発現している *SP6A* 遺伝子の mRNA が台木の塊茎へ移行している可能性は低いことが考えられた。

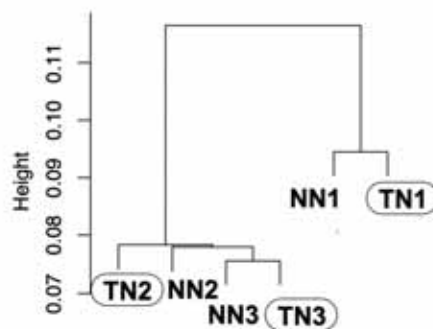


図9 *FT* 産生穂木が地下部台木の塊茎のトランスクリプトームに与える影響
階層クラスター解析によるデンドログラム

2) 個別課題名：導入遺伝子が存在しない表現型改変接ぎ木体および後代交配体におけるプロテオーム解析（研究担当者名：小関 良宏（所属機関名：国立大学法人 東京農工大学））

【研究内容】

下記の項目の中から②、③、⑤の項目についてプロテオーム分析を実施した。

- ① siRNA 産生導入遺伝子が排除された null segregant の解析
- ② 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
- ③ 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
- ④ 接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析
- ⑤ 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

【研究方法】

② 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

35S プロモーターを標的にした siRNA を発現するタバコ (S44/end2) を台木とし、野生株を穂木とした接ぎ木個体（穂木/台木：WT/S44-end2）、および台木、穂木ともに野生株タバコを用いた接ぎ木個体（WT/WT）から採取された穂木の葉（接ぎ木した位置から数えて 8 番目）を試料とし、粗抽出液を得た。この粗抽出液に対し (i) ジチオスレイトールによる還元、(ii) ヨードアセトアミドによるアルキル化、(iii) Lys-C およびトリプシンによる酵素消化を行い、評価検体とした。超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) とエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法によるタンデム型質量分析 (MS/MS) を組み合わせた (UHPLC-ESI-MS/MS) ペプチドフィンガープリンティングによるショットガン分析を行った。

③ 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

GUS 遺伝子発現マイクロトムトマト (T-MT) を台木とし、食用品種 Stella トマト (S) を穂木とした接ぎ木 (ST) と非遺伝子組換えマイクロトム (N-MT) を穂木とした接ぎ木 (SN) で得られた果実から粗抽出液を得た。G50 カラムによる低分子の除去ののち、タバコ葉と同様に前処理を行い、UHPLC-ESI-MS/MS によるショットガンプロテオーム分析を行った。

⑤ 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

FT 発現ジャガイモを穂木、非組換えジャガイモを台木として接ぎ木した個体由来の塊茎 (TN)、および対照実験区として、非組換えジャガイモ同士を接ぎ木した個体由来の塊茎 (NN) について、それぞれ 4 サンプルの UHPLC-ESI-MS/MS によるショットガンプロテオーム分析を行った。

【研究成果】

② 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

得られた UHPLC-ESI-MS クロマトグラムについて、ピーク強度の総和で規格化し、パレートスケーリングを用いて主成分分析 (principal component analysis, PCA) を行った。主成分分析の結果を、第一主成分と第二主成分を 2 軸とした二次元スコアプロットで図示し、遺伝子組換え植物体と非遺伝子組換え体との間で群間差を比較した (図 10)。その

結果、(+)-UHPLC/MS および (-)-UHPLC/MS のどちらの測定においても遺伝子組換え植物体および非遺伝子組み換え体との間で PCA スコアプロットにおいては明確な差異は認められなかった。すなわち、WT/S44-end2 群と WT/ WT 群の群間における明確なクラスター分離は認められなかった。また、両群について OPLS-DA による判別分析を試みたが、目的変数の説明度 (R^2Y) は (+)-UHPLC/MS において 0.821、(-)-UHPLC/MS において 0.799 と低く、予測度 (Q^2Y) も (+)-UHPLC/MS において 0.621、(-)-UHPLC/MS において 0.540 と低い値を示したため、この両群を使用した良好な判別モデルを構築するには至らなかった。このことは、両群間の差が見られないため、判別モデルの構築が困難であることを示している。これらの結果から、遺伝子組換えタバコ台木において 35S プロモーター標的 siRNA の産生は WT タバコ穂木のタンパク質プロファイルに与える影響は大きくはないと考えられた。

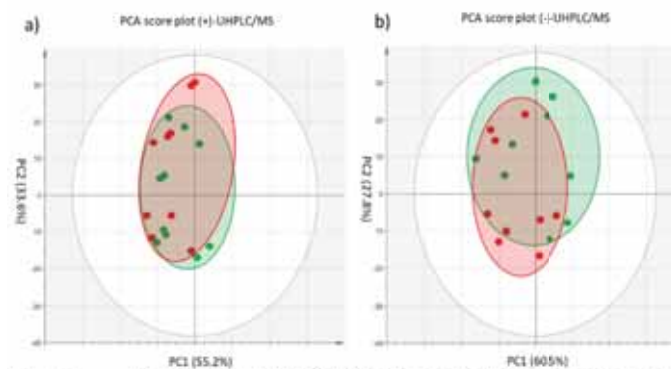


図 10 siRNA産生台木が穂木のプロテオームに与える影響

(a) ESI-(+)-UHPLC/MSによる主成分分析スコアプロット

(b) ESI-(-)-UHPLC/MSによる主成分分析スコアプロット

● NT群 ● NN群

③ 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

ST、SN 接ぎ木、それぞれ3個体、および市販ミニトマト3個の果実について PCA によるプロテオーム解析を実施した。この結果を横軸に第一主成分 (寄与率 45.2%、PC1)、縦軸に第二主成分 (寄与率 20.1%、PC2) をとり、二次元 PCA プロットを作成した (図 11)。その結果、ST と SN トマト果実に明確な差異は見られなかった。したがって GUS 発現遺伝子組換え台木が、Stella 品種トマト果実のタンパク質プロファイルに与える明確な影響はないと考えられた。

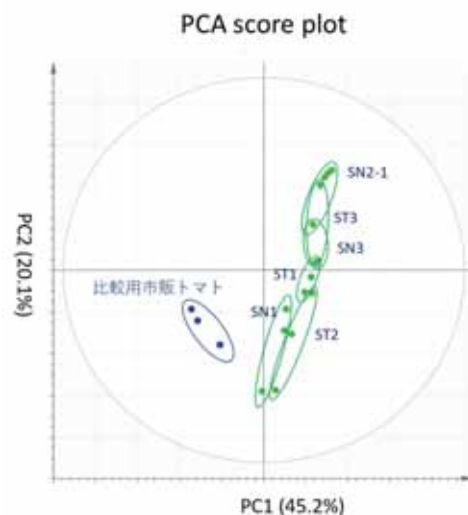


図 11 GUS形質転換台木がStella品種トマト穂木の果実のプロテオームに与える影響

UHPLC-ESI-MS/MSによる主成分分析スコアプロット

⑤ FT 遺伝子発現穂木を用いた同種間ジャガイモ可食部の解析

FT 発現ジャガイモ穂木／WT ジャガイモ台木 (TN 群) および WT ジャガイモ穂木／WT ジャガイモ台木 (NN 群) の塊茎から得た試料についても同様に UHPLC-MS による分析を行い、そのクロマトグラムを使用し PCA を行った。得られた結果を、第一主成分と第二主成分を2軸とした 2 次元スコアプロットで図示し群間差を比較した。その結果、(+)-UHPLC/MS、および (-)-UHPLC/MS のどちらの測定においても TN 群および NN 群との間で PCA スコアプロットにおいては明確な差異は認められず、群間における明確なクラスター分離は認められなかった (図 1 2)。また、両群についても OPLS-DA による判別分析を試みたが、タバコ葉をサンプルとした場合と同様に、目的変数の説明度 (R^2Y) は(+)-UHPLC/MS において 0.737、(-)-UHPLC/MS において 0.815 と低く、予測度 (Q^2Y) も (+)-UHPLC/MS において 0.495、(-)-UHPLC/MS において 0.537 と低く、ジャガイモ塊茎の両群を使用した良好な判別モデルを構築するには至らなかった。この結果から、地上部の穂木にて発現する FT タンパク質が、塊茎のタンパク質プロファイルに影響を与える可能性は低いものと考えられた。

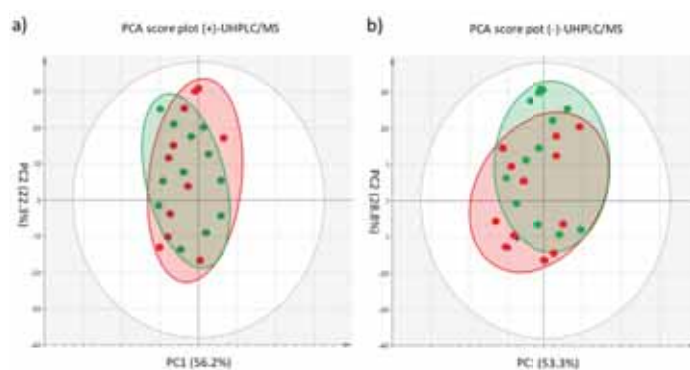


図 1 2 FT 産生穂木が地下部台木の塊茎のプロテオームに与える影響

(a) ESI-(+)-UHPLC/MS による主成分分析スコアプロット

(b) ESI-(-)-UHPLC/MS による主成分分析スコアプロット

● TN 群 ● NN 群

3) 個別課題名：新育種技術によって作出された作物のメタボローム解析（研究担当者名：太田 大策（所属機関名：大阪府立大学））

【研究内容】

下記の項目の中から②、③、⑤の項目についてメタボローム分析を実施した。

- ① siRNA 産生導入遺伝子が排除された null segregant の解析
- ② 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
- ③ 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
- ④ 接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析
- ⑤ 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

【研究方法】

② 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

35S プロモーターを標的にした siRNA を発現するタバコ (S44-end2) を台木とし、野生株を穂木とした接ぎ木個体（穂木/台木：WT/S44-end2）、および台木、穂木ともに野生株タバコを用いた接ぎ木個体（WT/WT）から採取された穂木の葉（接ぎ木した位置から数えて 8 番目）を試料とし、凍結乾燥後、75%メタノール抽出（質量分析用の内部標準物質として 20 mg/mL reserpine を添加）した。メタボローム解析には質量分析によって取得した情報を用いた。UHPLC-MS (Shimadzu LC-MS-8040) は、脂質の網羅的解析（同定・定量）に使用し、GC-TOF/MS (Waters GTC Premier MS) を用いて、脂肪酸、糖、有機酸、アミノ酸の分析を行った。質量分析データのピーク抽出・デコンボリューションには XCMS online (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) と Metaboanalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) を用いた。GC-TOF/MS データ解析は Protocol exchange (<https://www.nature.com/nprot/protocolexchange>) に公開した方法で行った。

③ GUS 遺伝子発現台木を用いた同種間トマト可食部の解析

GUS 遺伝子発現マイクロトムトマト (T-MT) を台木とし食用品種 Stella トマト (S) を穂木とした接ぎ木 (ST) と、非遺伝子組換えマイクロトム (N-MT) を穂木とした接ぎ木 (SN) で得られた果実を試料としてメタボローム解析をタバコ葉と同様の方法で実施した。

⑤ FT 遺伝子発現穂木を用いた同種間ジャガイモ可食部の解析

FT発現ジャガイモを穂木、非組換えジャガイモを台木として接ぎ木した個体由来の塊茎 (TN)、および対照実験区として、非組換えジャガイモ同士を接ぎ木した個体由来の塊茎 (NN) について、それぞれ 4 サンプルのメタボローム解析を実施した。質量分析には、LC-MS と GC-MS を用いた。LC-MS分析には、高速液体クロマトグラフUltimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) を接続した質量分析装置 Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)を用いた。GC-TOF/MS分析は、Kusano et al. (J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 855:71-79 (2007)) と Ogawa et al. (Sci. Rep. 7: 5196 (2017)) の方法に準じて行った。主成分分析及びStudent's t-testは、MetaboAnalyst (ver. 5.0) 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。

【研究成果】

② 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

実験には、WT/WT サンプル葉（#7、#8、#9）と WT/S44-end2 葉（#4、#6、#10）を供試した（接ぎ木した位置から数えて 8 番目の穂木の葉、 $n=3$ ）を試料とした。まず、GC-TOF/MS を用いて、極性画分の分析を行った（図 1 3）。サンプルは、メタノール：クロロホルム：水の混合溶媒を用いて溶媒抽出を行い、極性画分および非極性画分に分画し、トリメチルシリル誘導体化後に、GC-TOF/MS を用いて計測した。極性画分では、74 個の代謝物候補ピークを得た。極性画分の 74 個の代謝物候補ピークについて、主要イオンの内部標準に対する相対ピーク強度値を変数として主成分分析を行った。第一主成分（寄与率 41.8%）と第二主成分（寄与率 25.8%）の主成分スコアを基に、二次元プロット図を作成した（図 1 3）。WT/S44-end2 群と WT/WT 群の群間における明確なクラスター分離は認められなかった。この結果から、遺伝子組換えタバコ台木における 35S プロモーター標的 siRNA の発現が WT タバコ穂木の代謝に与える影響はないか、極めて限定されていることが示唆された。

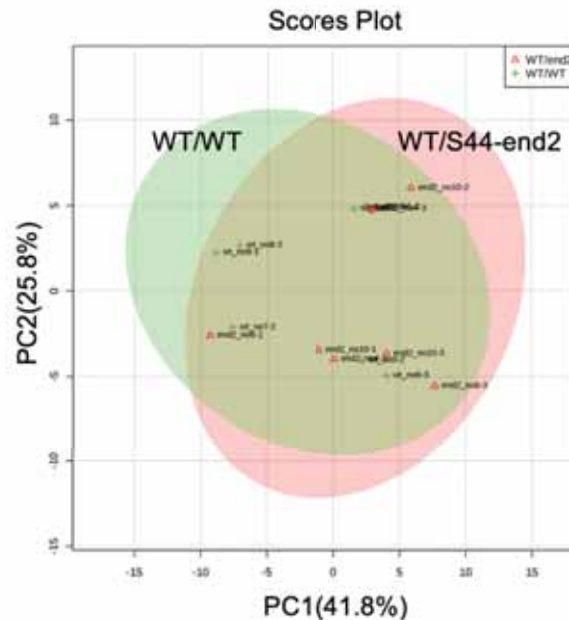


図 1 3 siRNA 産生台木が穂木の代謝物蓄積プロファイルに与える影響（GC-MS 分析）

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

次に、LC-MS/MS 分析結果を基にしてメタボローム解析を実施した（図 1 4）。Positive mode 分析によって得られた 74 種の代謝物ピークの相対的な存在量（reserpin を内部標準として添加）を主成分分析（図 1 4 A）によって比較した。PC1 で WT/WT と WT/S44-end2 のクラスター分離の傾向がある。その要因となる代謝物は、Loading plot（図 1 4 B）と Volcano Plot（図 1 4 C）（fold-change > 2、FDR < 0.05）の結果、未同定の peak54、peak75、peak82 の 3 種に起因することがわかった。これらの peak を精査したところ、peak54 と peak75 の蓄積量は、WT/WT と WT/S44-end2 の群間の差よりも供試サンプル間の変動が大きく、WT/S44-end2 の台木が原因とは断定できなかった。Peak82 は、WT/S44-end2 葉で WT/WT 葉よりも、

常に蓄積量が多いことがわかった（図 1 4 D）。Peak82は、検出された74種の代謝物ピーク中、存在量に対応するイオン強度は73番目、最大イオン強度の0.85%であることから、極微量に存在する代謝物であり、物質同定は容易ではないと考えられる。Negative modeでの分析で、44種の代謝物ピークを特定し、positive mode分析の場合と同様に、多変量解析によってメタボロームデータに変換した。その結果、質量値861.3の代謝物の蓄積量が、WT/S44-end2葉（#4、#6、#10）において多いことがわかった。Negative modeで検出された質量値861.3を持つピークについては、入手可能な文献情報や代謝物データベースからの同定には至らなかった。

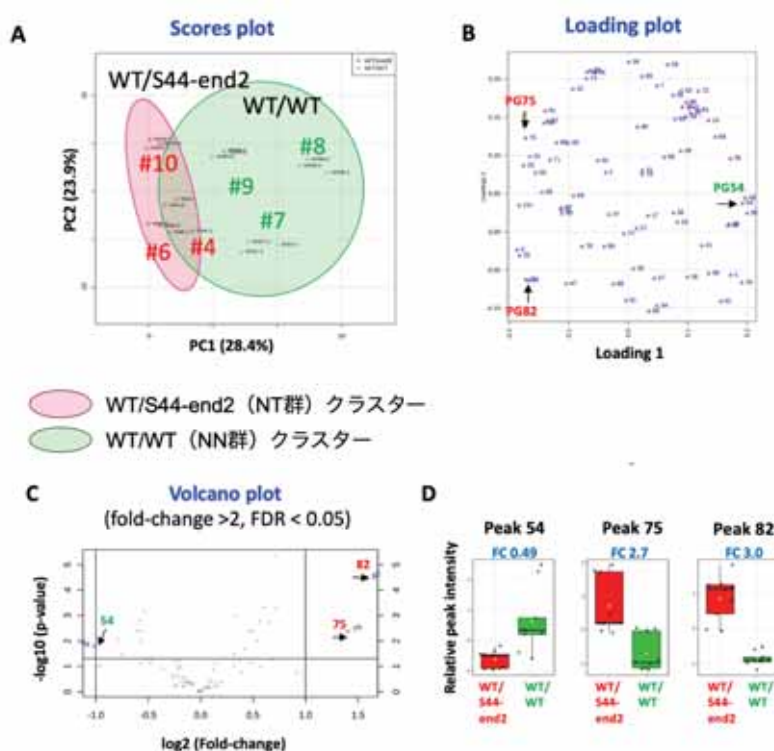


図 1 4 siRNA産生台木が穂木の代謝物蓄積プロファイルに与える影響（LC-MS/MS分析）

(A) 主成分分析によるメタボロームプロファイル比較。(B) 主成分分析のメタボロームクラスター分離に寄与する成分を示す。(C) False discovery rate (FDR < 0.05, Fold Change > 2.0)で検出された、サンプル間で蓄積量の異なる成分の特定。(D) 蓄積量に差が認められた未同定代謝物（peak 54, peak 75, Peak 82）の蓄積量の相対値比較。

③ 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

供試サンプルはSTを試験区とし、SNを対照区とした。Positive mode分析によって得られた74種の代謝物ピークの相対的な存在量（reserpineを内部標準として添加）を主成分分析（図 1 5 A）によって比較した。PC1でST とSNのメタボロームプロファイルに差は確認されず（図 1 5 B）、GUS発現マイクロトム台木が WT ステラ穂木の果実メタボロームに及ぼす影響は無いと判断される。また、トマトのステロイドアルカロイドであるesculeoside Aと α -tomatine含量にも統計的有意差は認められなかった（図 1 5 D）。

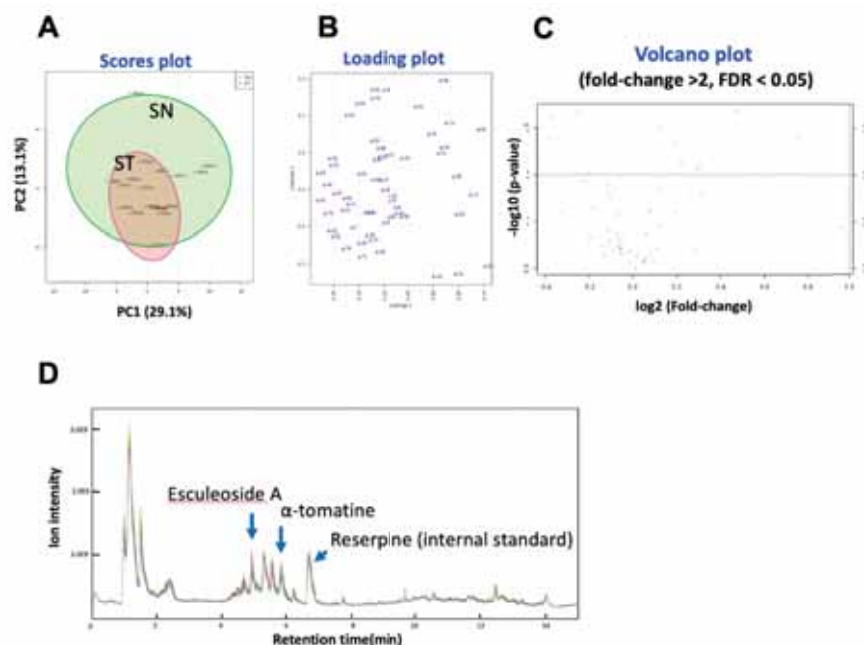


図 15 *GUS*形質転換台木がStella品種トマト穂木の代謝物蓄積プロファイルに与える影響 (LC-MS/MS分析)

(A) 主成分分析によるメタボロームプロファイル比較。(B) 主成分分析のメタボロームクラスター分離に寄与する成分を示すLoading plot。(C) Volcano plot (FDR < 0.05, Fold Change > 2.0) を用いた、サンプル間で蓄積量の異なる成分の特定。(D) LC-MS/MS分析によるトマトのステロイドアルカロイド含量の比較。物質同定は、Esculeoside Aとα-tomatineの標準物質を用いて行った。

⑤ *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

接ぎ木ジャガイモ塊茎のメタボロームを比較した。実験には、*FT* 発現ジャガイモ穂木/WT ジャガイモ台木 (TN1、TN2、TN3、TN4)、および WT ジャガイモ穂木/WT ジャガイモ台木 (NN1、NN2、NN3、NN4) の各 4 サンプルを供試した。

まず、ジャガイモ塊茎の 75%メタノール抽出液を LC-MS (ESI、positive mode) により分析し、メタボロームデータを取得した。得られた全 5798 個の代謝物シグナルのうち、検出頻度 50% 以上の 4075 個の代謝物シグナルを変数として主成分分析を行った(図 16)。第一主成分(寄与率 19.7%)と第二主成分(寄与率 13.2%)の主成分スコアを基に作成した二次元プロット図、および第二主成分と第三主成分(寄与率 9.7%)の主成分スコアを基に作成した二次元プロット図では、*FT* 発現ジャガイモ穂木/WT ジャガイモ台木群 (TN 群) と WT ジャガイモ穂木/WT ジャガイモ台木群 (NN 群) の群間における明確なクラスター分離は認められなかった。個々の代謝物シグナルについて TN 群と NN 群の群間でのシグナル強度の平均値の差の有無を調べたところ、15 個の代謝物シグナルにおいて有意なシグナル強度差が認められた (Fold-difference > 5、 $P_{FDR} < 0.05$; 表 1)。このうち 5 個 (No. 716、718、1114、4746、4857) は、NN 群より TN 群における蓄積量が多く、残り 10 個は NN 群より TN 群における蓄積量が少なかった。検出ピークの精密質量を基にして精密質量データベース検索を行った結果、15 個のうち 12 個は組成式を一つに絞り込むことができた (表 1)。これら 12 個のうち 6 個は KNApSAcK (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>) と Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>)

を統合したデータベースである UC2 データベースに収録されている代謝物レコードにヒットした。No.2820 については、候補化合物を 3 個 (HMDB0137670、HMDB0029286、HMDB0039157) まで絞り込むことができたが同定には至らなかった。

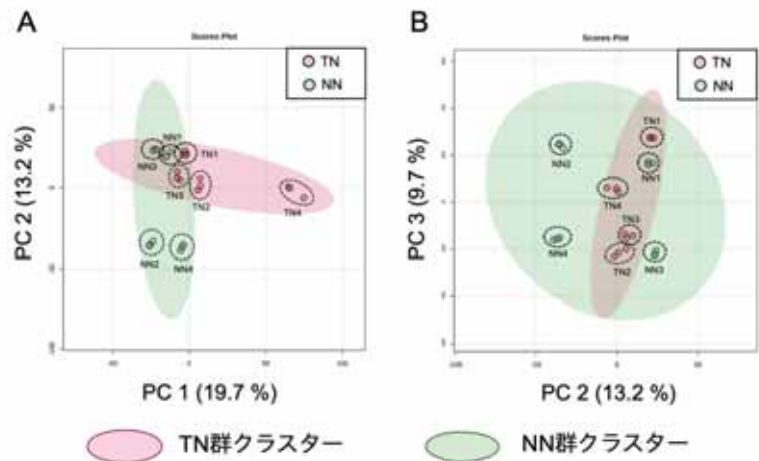


図 16 FT産生穂木が地下部台木の塊茎の代謝産物蓄積プロファイルに与える影響

供試サンプルの75%メタノール抽出液のLC-MS分析 (ESI, positive mode) によって得られた代謝物蓄積プロファイルの比較。主成分分析によるメタボロームプロファイル比較の結果を示す。(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。(B) 第二主成分 (PC2) と第三主成分 (PC3) の主成分スコアの二次元プロット図。各主成分の寄与率を括弧内に示す。

表 1. メタボローム解析において TN 群と NN 群の群間で有意なシグナル強度差が認められた 15 個の代謝物シグナル (Fold-difference > 5、 $P_{FDR} < 0.05$)

Peak group No.	R.T. (min)	<i>m/z</i> (Detected)	Exact Mass	Formula	Adduct	DB hit	Fold-difference (TN/NN)	P_{FDR}
716	8.53	439.0536	438.0463	C28H10O2N2S1	[M+H] ⁺	1	5.37	0.0051
718	8.54	226.0161	225.0088	Unknown	[M+H] ⁺	0	6.83	0.0451
1114	9.96	261.1211	260.1139	C7H21O6N2P1	[M+H] ⁺	1	6.56	0.0024
2013	11.95	150.0551	149.0479	C8H7O2N	[M+H] ⁺	5	0.18	0.0036
2820	13.76	360.1078	359.1005	C18H17O7N	[M+H] ⁺	3	0.10	0.0003
4746	20.55	274.2740	273.2668	C16H35O2N1	[M+H] ⁺	1	7.78	0.0009
4857	21.18	234.1489	233.1417	C14H19O2N	[M+H] ⁺	6	5.87	0.0251
5080	23.22	217.1584	216.1511	C15H20O	[M+H] ⁺	43	0.12	0.0019
5088	23.26	131.0857	130.0784	Unknown	[M+H] ⁺	0	0.12	0.0286
5165	23.99	140.9513	139.9440	Unknown	[M+H] ⁺	0	0.14	0.0069
5197	24.13	189.1122	188.1050	C9H16O4	[M+H] ⁺	16	0.15	0.0158
5341	25.24	329.2146	328.2073	C18H32O3S1	[M+H] ⁺	1	0.17	0.0012
5351	25.36	598.3261	597.3188	C30H52O3N3P1S2	[M+H] ⁺	1	0.12	0.0113
5425	26.22	203.1431	202.1358	C14H18O	[M+H] ⁺	10	0.20	0.0056
5597	27.46	645.3667	644.3594	C33H56O10S1	[M+H] ⁺	1	0.16	0.0070

脂質成分の網羅的解析（リピドーム解析）のため、ジャガイモ塊茎をメタノール：メチル *tert*-ブチルエーテル（3:10、v/v）抽出し、LC-MS（ESI、positive and negative mode）により分析した。Positive mode の分析では、得られた全 419 個の代謝物シグナルのうち検出頻度 50 % 以上の 367 個の代謝物シグナルを変数として、Negative mode の分析では、得られた全 96 個の代謝物シグナルのうち検出頻度 50 % 以上の 80 個の代謝物シグナルを変数として、それぞれ主成分分析を行った（図 1 7、 図 1 8）。

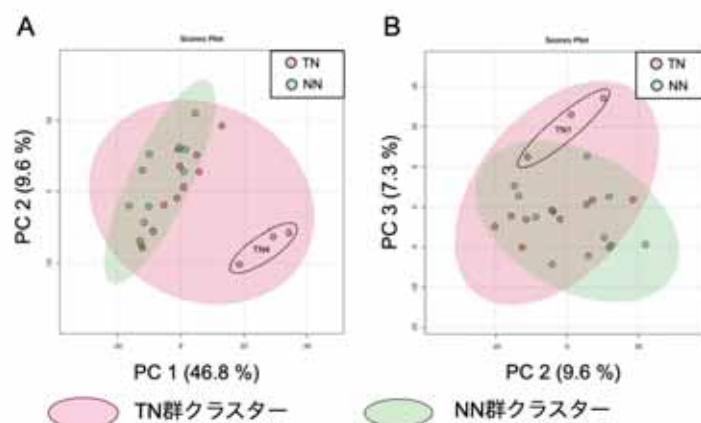


図 1 7 FT産生穂木が地下部台木の塊茎の代謝産物蓄積プロファイルに与える影響

供試サンプルのメタノール：メチル *tert*-ブチルエーテル（3:10、v/v）抽出液のLC-MS分析（ESI, positive mode）によって得られた代謝物蓄積プロファイルの比較。主成分分析によるメタボロームプロファイル比較の結果を示す。(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。(B) 第二主成分 (PC2) と第三主成分 (PC3) の主成分スコアの二次元プロット図。各主成分の寄与率を括弧内に示す。

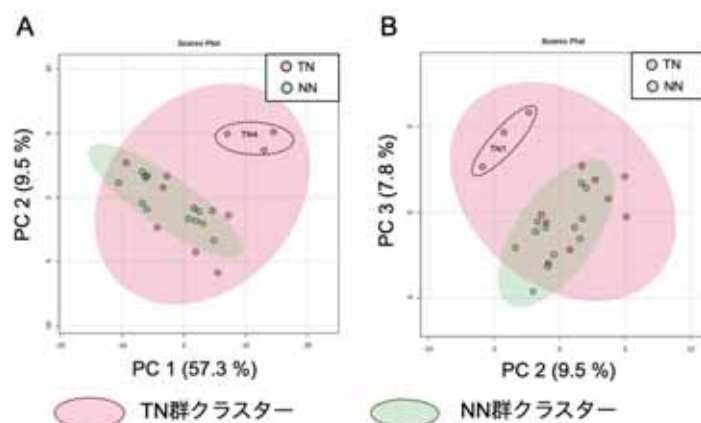


図 1 8 FT産生穂木が地下部台木の塊茎の代謝産物蓄積プロファイルに与える影響

供試サンプルのメタノール：メチル *tert*-ブチルエーテル（3:10、v/v）抽出液のLC-MS分析（ESI, negative mode）によって得られた代謝物蓄積プロファイルの比較。主成分分析によるメタボロームプロファイル比較の結果を示す。(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。(B) 第二主成分 (PC2) と第三主成分 (PC3) の主成分スコアの二次元プロット図。各主成分の寄与率を括弧内に示す。

その結果、Positive mode と negative mode のどちらについても、第一主成分と第二主成分の主成分スコアを基に作成した二次元プロット図、および第二主成分と第三主成分の主成分スコアを基に作成した二次元プロット図で、TN 群と NN 群の群間における明確なクラスター分離は認められなかった。個々の代謝物シグナルについて TN 群と NN 群の群間でのシグナル強度の平均値の差の有無を調べたところ、positive mode では 3 個、negative mode では 1 個の代謝物シグナルについて有意なシグナル強度差が認められ、すべて TN 群で NN 群より蓄積量が多かった (Fold-difference > 5、 $P_{FDR} < 0.05$; 表 2)。Lipid Search による同定結果では、これら 4 個の代謝物シグナル (No. pos_337、pos_589、pos_662、neg_93) の何れもグリセロ脂質であった (表 2)。

表 2. リピドーム解析において TN 群と NN 群の群間で有意なシグナル強度差が認められた 4 個の代謝物シグナル (Fold-difference > 5、 $P_{FDR} < 0.05$)

Peak group No.	R.T. (min)	m/z (Detected)	Annotation				Fold-difference (TN/NN)	P_{FDR}
			Lipid Class	Fatty Acid	Adduct	Formula		
pos_337	28.46	700.4917	PE	(18:0_13:0)	M+Na	C ₃₆ H ₇₂ O ₈ N ₁ P ₁ Na ₁	7.05	0.0084
pos_589	33.95	582.5098	DG	(10:0_22:2)	M+NH ₄	C ₃₅ H ₆₈ O ₅ N ₁	8.48	0.0098
pos_662	37.02	596.5255	DG	(11:0_22:2)	M+NH ₄	C ₃₆ H ₇₀ O ₅ N ₁	6.65	0.0095
neg_93	23.83	822.5311	PC	(18:3_18:3)	M+HCOO	C ₄₅ H ₇₇ O ₁₀ N ₁ P ₁	5.56	0.0324

ジャガイモ塊茎のステロイドグリコアルカロイド含量の比較を行った (図 19)。ジャガイモ塊茎の 75%メタノール抽出液を LC-MS (ESI, positive mode) により分析して得られた検出ピークの精密質量を基にして精密質量データベース検索し、ピーク No. 3848、3834、および 3899 を、それぞれ α -solanine、 β -solanine、および α -chaconine と同定できた。これらの代謝物シグナルは、TN 群と NN 群の違いと関連する有意なシグナル強度差は認められず、サンプル間の含量差の違いが大きかった (図 19)。

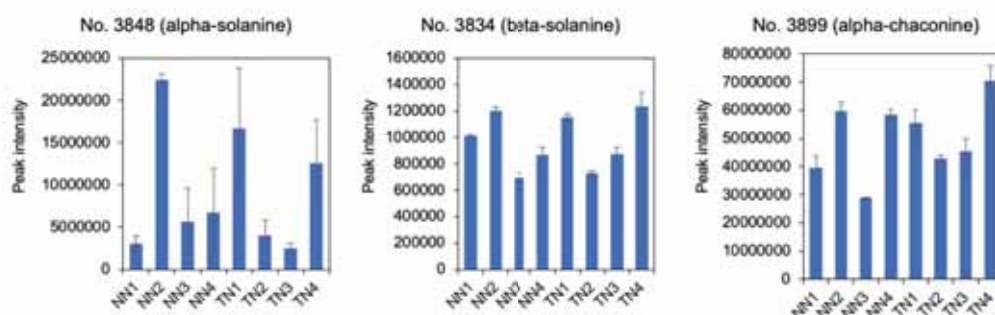


図 19 FT産生穂木が地下部台木の塊茎のステロイドグリコアルカロイド含量に与える影響
供試サンプルの75%メタノール抽出液をLC-MSにより分析し、検出ピークの精密質量を基にして組成式推定とデータベース検索を行った。グラフ枠上にピークNo.と化合物推定の結果を示した。同一抽出液の測定を3回反復して得られた測定値の平均値と標準誤差を示した。

GC-TOF/MS 分析では、Aloutput2 によるピークデコンボリューションにより極性画分では 95 個、非極性画分では 27 個の代謝産物候補が得られた。それぞれで得られたピークについて、主要イオンの相対ピーク強度値を変数にした主成分分析を行った。極性画分については、第一主成分（寄与率 41%）と第二主成分（寄与率 15.2%）の主成分スコアを基に作成した二次元プロット図から、TN2 と TN4 が NN 群と区別されたが、クラスターの分離は認められず、強度が 2 倍以上かつ FDR が 0.05 未満である代謝産物は無かった（図 20 A、B）。非極性画分については、第一主成分（寄与率 82.3%）と第二主成分（寄与率 6.6%）の主成分スコアを基にした二次元プロット図から、TN1-1 と TN3-1 が NN 群とは区別されたが、クラスターの分離は認められなかった（図 20 C）。TN1-2 と TN3-2 は NN クラスタ内および極近傍にプロットされたため、抽出や誘導体化操作によるバラツキである可能性が高い。また、非極性画分についてもピーク強度が 2 倍以上かつ FDR が 0.05 未満である代謝産物は無かった（図 20 D）。

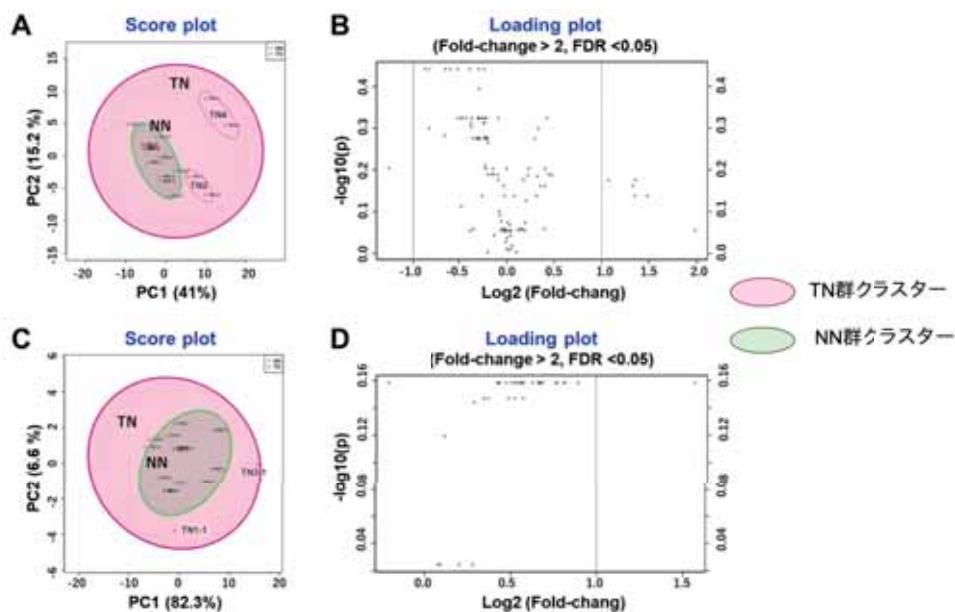


図 20 FT 産生穂木が地下部台木の塊茎の代謝産物蓄積プロファイルに与える影響

供試サンプルの GC-TOF/MS 分析によって得られた代謝物蓄積プロファイルの比較。抽出液は極性画分 (A と B) と非極性画分 (C と D) に分けて分析した。A と C、主成分分析によるメタボロームプロファイル比較。B と D、Volcano plot (Fold-change > 2, FDR < 0.05) を用いた、サンプル間で蓄積量の異なる成分の特定。

メタボローム解析の結果をまとめると、LC-MS 分析と GC-TOF/MS 分析では、ジャガイモ穂木における FT 発現が WT ジャガイモ台木の代謝に与える影響は認められなかった。GC-MS 分析においても、試験区 (TN) と対照区 (NN) の違いと連動する代謝物蓄積量の違いは検出されなかった。ジャガイモが産生するステロイドアルカロイド類、 α -solanine、 β -solanine、および α -chaconine の蓄積量は、試験群の違いとは無関係に、試料間で異なっていた。以上の結果から、地上部（穂木）で発現する移動性ホルモン FT が、野生型ジャガイモの台木（塊茎）の代謝物蓄積に影響を及ぼすことは無いと結論付けられる。

4) 個別課題名：同種間の遺伝子組換え体-非組換え体接ぎ木植物の作出と可食部の食品成分分析（研究担当者名：小口 太一（所属機関名：筑波大学））

【研究内容】

下記の項目の中から③、⑤の項目について接ぎ木個体の作出と農業形質の解析、食品成分分析を行った。

- ① siRNA 産生導入遺伝子が排除された null segregant の解析
- ② 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
- ③ 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
- ④ 接ぎ木植物におけるタンパク質移動の解析
- ⑤ 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

【研究方法】

③ 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

GUS 発現組換えトマト台木には、研究用モデル品種であるマイクロトムトマトを用いたが、非組換えトマト穂木には、マイクロトムトマトだけでなく、食用ミニトマト品種 (Stella トマト) も併用した。作出した接ぎ木トマトは特定網室で育成し、それぞれの可食部となる果実を得て、食品成分分析を実施した。果実の食品成分分析は、日本食品分析センター等の分析機関への委託によって実施した。採取した果実は、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、およびメタボローム解析の材料として調製し、共同研究者へ提供した。

⑤ 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

FT 発現ジャガイモを穂木、非組換えジャガイモを台木として接ぎ木個体 (TN)、および対照実験区として、非組換えジャガイモ同士を接ぎ木した個体 (NN) を特定網室で栽培し、可食部である塊茎を得る。得られ塊茎は、食品成分分析を実施するとともに、食品成分分析は、日本食品分析センターへの委託によって実施した。採取した塊茎は、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、およびメタボローム解析の材料として調製し、共同研究者へ提供した。

【研究成果】

③ GUS 遺伝子発現台木を用いた同種間トマト可食部の解析

事前準備として、研究期間以前の 2019 年 2 月中旬に非組換え Stella トマト、非組換えマイクロトム、及び GUS 発現組換えマイクロトムを播種、3 月上旬に接ぎ木し、その後約 1 か月間栽培室（蛍光灯下、25℃）で栽培した。



図2-1 トマト品種ステラの果実発達の例

着果後、約1か月程度で彩色期(Breaker)に達し、その後5日で果実表面全体が赤色を呈し、7日後には完熟となる。完熟期を過ぎると果実が開裂する。写真下の数字は、彩色期(Breaker)を起点とした日数。

4月中旬、特定網室にて、各接ぎ木トマト（Stella/組換えマイクロトム、Stella/非組換えマイクロトム、Stella/Stella）及び接ぎ木していない Stella トマト（対照）のそれぞれ3個体を直径約 15 cm ポットに移植した。いずれの接ぎ木トマト及び接ぎ木していないトマトも6月中旬より順次開花・結実した。トマト果実の採取は、果実の色着きが始まる彩色期（Breaker）からの経過日数を指標とした。先行研究で実施したマイクロトムの果実では、彩色期後 10 日で採取していたが、品種ステラでは、彩色期後 10 日では多くの果実で開裂が見られたため、彩色期後 7 日目を採取とした。Stella トマトにおける果実発達の一例を図 2-1 に示す。

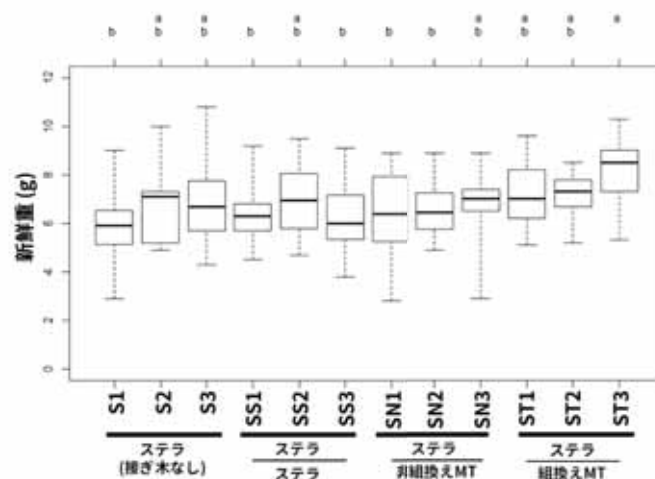


図2-2 GUS形質転換台木がStella品種トマト穂木の果実の新鮮重に与える影響

彩色期後7日目の果実の新鮮重を示す。グラフ枠上のアルファベットはTukey-HSD検定による有意差を示す ($\alpha=0.05$)。

果実の採取は、7月下旬まで順次行い、各個体約 20 果以上の果実を採取した。図 2-2 に彩色後 7 日目に収穫した各接ぎ木トマト及び接ぎ木していないトマトの果実の新鮮重を示したが、接ぎ木の有無、マイクロトムとの接ぎ木及び組換え体-非組換え体間の接ぎ木による果実の新鮮重への影響はなかった。果実の一部を、食品成分分析を実施した。その結果、接ぎ木の有無、マイクロトムとの接ぎ木及び組換え体-非組換え体間の接ぎ木による果実の分析した食品成分への影響はなかった（図 2-3）。

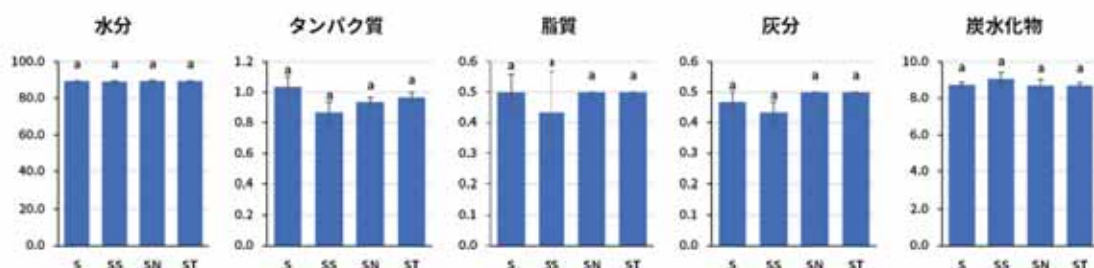


図 23 GUS形質転換トマトを台木として得られたStella品種トマト穂木の果実の食品成分分析
 彩色期後7日目の果実の栄養成分を日本食品分析センターに依頼分析した。S：接ぎ木なしステラ、SS：ステラ-ステラ台木、SN：ステラ穂木-非組換えマイクロトム台木、ST：ステラ穂木-組換えマイクロトム台木を示す。グラフは3点並行分析の平均値で、グラフ枠上のアルファベットはTukey-HSD検定による有意差を示す ($\alpha=0.05$)。

⑤ 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

接ぎ木面を介して積極的に移動するタンパク質を発現する組換え体（非可食部）と非組換え体（可食部）のモデルとして、ジャガイモのイモ形成促進に関与する *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 (SP6Aox#7 系統) を穂木、その宿主となった非組換えジャガイモ（品種サヤカ）との接ぎ木体を作成し、栽培室で馴化後、特定網室で植木鉢に移植し、2020 年 1 月下旬から約 3 か月間栽培し、4 月下旬から 5 月上旬に塊茎を収穫した。WT 穂木-WT 台木接ぎ木体 (NN) と FT 発現ジャガイモ穂木/WT ジャガイモ台 (TN) の間では、形成した塊茎数、形成した塊茎の平均重、及び形成した塊茎の平均比重に統計的有意差は検出されなかったが、個体あたりの総塊茎重は TN 接ぎ木体が NN 接ぎ木体に比べ有意に低かった（各 10 個体、有意水準 5%）（図 24）。また、収穫した塊茎の一部は収穫時に皮の一部の緑変が確認された。

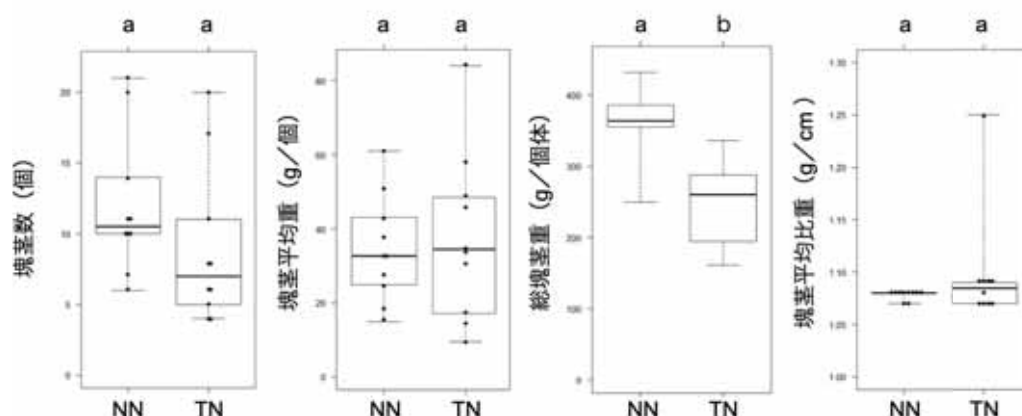


図 24 FT 産生穂木が地下部台木の塊茎プロファイルに与える影響
 グラフ枠上のアルファベットはTukey-HSD検定による有意差を示す ($\alpha=0.05$)。

最終的に皮の緑変がなく、比較的サイズがそろった塊茎を形成した TN 接ぎ木体 4 個体、NN 接ぎ木体 4 個体を選び、さらに選んだ各個体から 3 つの塊茎を選抜し、以降の分析に

供した。収穫後の塊茎は、室内暗所にて約1か月静置した後、およそ2mm厚にスライスしたうち、中心部に近いものをメタボローム分析及びプロテオーム分析用の試料として採取した。また、塊茎表面を約2mm厚にスライサーでそぎ落とした皮をトランスクリプトーム分析用の試料として採取した。その後残り部分は、同様に2mm厚のスライサーで裁断し、同様にパウチ袋に封入の上、液体窒素で凍結し、食品成分分析用の試料とした。

食品成分分析は、一般財団法人食品分析センターに依頼した。食品成分分析の結果を図25に示す。分析したTN接ぎ木体及びNN接ぎ木体の塊茎の水分、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物の値は、いずれも両者の間で有意な違いは見られなかった。日本食品標準成分表2015年度版(七訂)によると、「ジャガイモ塊茎、生」の水分、タンパク質、脂質、灰分、及び炭水化物の値は、79.8 g、1.6 g、0.1 g、0.9 g、及び17.6 gであり、今回のTN接ぎ木体及びNN接ぎ木体から収穫された塊茎の測定値と、概ね同等であった。このことから、食品成分分析の観点からは、TN接ぎ木体及びNN接ぎ木体から収穫された塊茎に有意な違いはないと結論した。

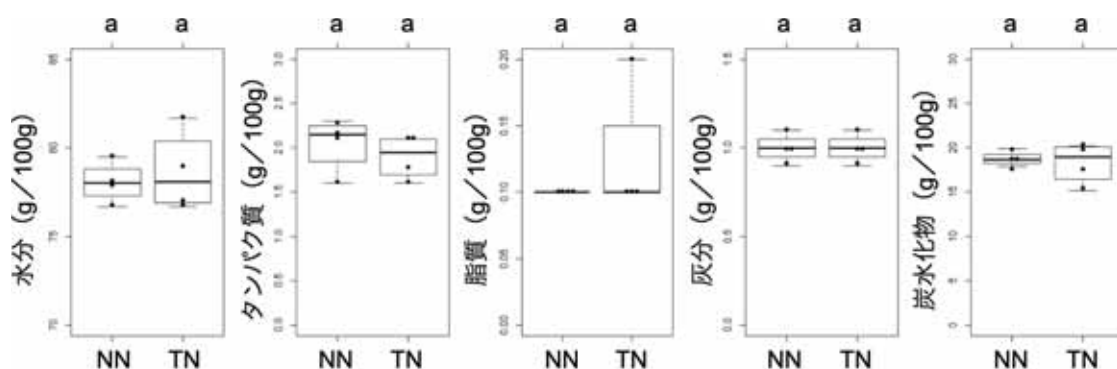


図25 FT産生穂木一栽培品種台木から得られた塊茎の食品成分分析値

グラフ枠上のアルファベットはTukey-HSD検定による有意差を示す ($\alpha=0.05$)。

(2)研究項目名:異種植物間の導入遺伝子を含まない接ぎ木形質改変食品および siRNA 技術応用食品の解析

1) 個別課題名: 異種植物間の接ぎ木形質改変体の作出およびプロテオーム解析 (研究担当者名: 児玉 浩明 (所属機関名: 国立大学法人 千葉大学))

【研究内容】

①ナス科植物タバコを台木とし、ウリ科植物キュウリを穂木とした接ぎ木植物個体の作出とプロテオーム解析

【研究方法】

①ナス科植物タバコを台木とし、ウリ科植物キュウリを穂木とした接ぎ木植物個体の作出とプロテオーム解析

異種植物間での接ぎ木の影響を確認するため、タバコを台木とし、穂木にキュウリを使用して接ぎ木の作成を行なった。野生株のタバコおよびキュウリ (*Cucumis sativus* きぬの輝き (株式会社トーホク)) を無菌播種し、MS培地にてシュートが10 cm 程度まで成長したものを接ぎ木に使用した。接ぎ木に成功した個体について、接合部から近い穂木の葉を葉柄および中肋と葉身に分けてサンプリングし、抽出したタンパク質溶液をショットガンプロテオーム解析に供した。

【研究成果】

タバコを台木として、穂木にキュウリを使用した接ぎ木から、接合部に一番近いキュウリの葉をサンプリングし、ショットガンプロテオーム解析を実施した。その結果、葉柄では1607 種類、葉身では 1096 種類のタンパク質がアノテートされた。そのうちタバコのタンパク質としてアノテートされたタンパク質は、葉柄 27 種類、葉身 16 種類、葉柄と葉身に共通して見られたタンパク質は 6 種類であった(表3~5)。タバコのタンパク質としてアノテートされているが、*Nicotiana tabacum* は全ゲノムが完全には解読されておらず、誤ってアノテートされている可能性が考えられるため、検出されたタバコのタンパク質を BLASTP にかけて。検索条件をキュウリが含まれるウリ科の植物に設定し、相同性を確認したところ、タバコのタンパク質としてアノテートされた 37 タンパク質中 20 タンパク質がウリ科植物との相同性を確認することができ、相同性の平均値は 86.1%であった。ウリ科植物のタンパク質との相同性が確認できなかった 17 タンパク質については、全データを対象とした BLASTP 検索において相同性が高いタンパク質上位 100 位にウリ科の植物由来のタンパク質が入っていなかったため、今回検出されたタバコのタンパク質と、キュウリホモログタンパク質との間での相同性はかなり低いものであることが考えられる。これらの結果から、検出されたタンパク質はキュウリタンパク質が誤ってアノテートされたものではないと考えられる。また、検出されたタンパク質には葉緑体に関連するタンパク質が多く含まれており、Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 や Ribulose biphosphate carboxylase large chain は葉柄と葉身の両方で確認された。キュウリの葉柄及び葉身で検出されたタバコのタンパク質の分子量は 30 kDa から 60 kDa

が多く、100 kDa 以上のタンパク質も見られた。

表3 タバコ台木に接ぎ木したキュウリの葉柄で検出されたタバコタンパク質

Petiole				
Accession	Description	MW (kDa)	Unique peptide(≦2)	
A0A1S4C6G3	Clathrin heavy chain	192.4		3
A0A1S4AI27	LOW QUALITY PROTEIN: DNA damage-binding protein 1-like	122.1		2
A0A140G1R3	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	83		2
A0A1S4AE85	heat shock 70 kDa protein	71.8		2
A0A1S3XW73	uncharacterized protein LOC107769424 isoform X1	66.2		2
A0A1S3XMX2	aspartic proteinase A1-like isoform X1	58		2
A0A1S4B2Z0	26S protease regulatory subunit 6A homolog	56.1		2
A0A140G1U3	Photosystem II CP47 reaction center protein	56		3
A0A0M4JIJ5	ATP synthase subunit alpha	55.2		4
A0A140G1S2	ATP synthase subunit beta	53.5		4
A0A140G1Q8	Photosystem II CP43 reaction center protein	50.3		2
A0A140G1P2	Photosystem II protein D1	38.9		2
A0A1S4AGW0	malate dehydrogenase, glyoxysomal	37.6		2
A0A1S3Y4M0	40S ribosomal protein SA	35.8		2
A0A140G1S8	Cytochrome f	35.2		3
A0A1S4AV90	60S acidic ribosomal protein P0	35		2
A0A1S3ZUL4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 homolog	34.8		2
A0A1S3XTE4	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, chloroplastic-like isoform X1	34.6		3
A0A1S4C1S1	Peptidylprolyl isomerase	24.7		2
A0A1S3YVD0	photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic-like	23.4		2
A0A1S3XPI1	ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	17.2		3

表4 タバコ台木に接ぎ木したキュウリの葉身で検出されたタバコタンパク質

Leaf blade				
Accession	Description	MW (kDa)	Unique peptide(≦2)	
A0A1S3YLL8	chaperone protein ClpB3, chloroplastic-like	109.6		2
A0A1S3WZQ8	Aconitate hydratase	108.7		2
A0A1S4CCB0	carotenoid 9,10(9',10')-cleavage dioxygenase 1-like isoform X1	61.9		2
A0A1S3ZMK6	Vacuolar proton pump subunit B	60.9		4
A0A1S3X9F6	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic	54.8		2
A0A1S4DLA7	uncharacterized protein LOC107830885 isoform X1	35.9		2
Q6QND3	Putative pyridoxine biosynthesis protein isoform A	33.1		2
A0A1S4CN29	uncharacterized protein LOC107820649 isoform X1	30.7		2
A0A140G1Y4	ribosomal protein L2	30		2
A0A1S4BYL5	Calmodulin	20.8		4

表5 タバコ台木に接ぎ木したキュウリの葉柄及び葉身で検出されたタバコタンパク質

Common			Leaf blade	Petiole
Accession	Description	MW (kDa)	Unique peptide(≦2)	
A0A140G1R2	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	82.4	2	2
A0A1S3XI60	T-complex protein 1 subunit delta	57.8	2	2
A0A140G1P7	ATP synthase subunit alpha	55.4	2	2
A0A140G1S3	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	52.9	9	11
A0A1S4C6W5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	40.6	3	3
A0A1S3X3J1	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein	34	2	2

（２）研究全体の成果、考察及び結論

新たな植物育種技術では、導入遺伝子による有用形質を、導入遺伝子が存在しない植物部位や植物個体へと伝搬させることが可能である。その代表的な栽培・育種技術が、交配により導入遺伝子が分離した植物個体（null segregant）を利用する育種技術と、接ぎ木技術による導入遺伝子が存在しない成果物を得る栽培技術である。本研究では、これらの新たな植物育種技術を用いて得られる成果物の食品としての安全性を評価する上での評価点を明らかにすることを目的とした。以下に研究内容の個別の成果、考察、および結論をまとめる。

１）ゲノム DNA のメチル化を伴う Null segregant の安全性評価点

DNA のメチル化は、世代を超えて引き継がれることが知られている。そのため、標的遺伝子座のメチル化を誘導する siRNA 産生導入遺伝子座を利用し、後代で null segregant を得ることで目的とする形質を持ち、導入遺伝子を持たない個体の利用が考えられている。実際に本研究においてもプロモーター配列のメチル化を誘導する end2 導入遺伝子座が後代で分離されてもプロモーターのメチル化による形質の変化が後代のタバコ植物で引き継がれることを確認した。この時、トランスクリプトーム解析により null segregant と野生株を比較すると、転写産物プロファイルは異なることが明らかになった（図 2）。また発現量が増えている転写産物が検出されたことから（図 3）、DNA のメチル化の影響予測は、遺伝子の発現を抑制するだけではないことを示している。この結果から DNA のメチル化サイトの正確な予測が可能な場合を除き、null segregant の利用においては、栄養阻害物質などの量的変動について明らかにすることが必要であることを示唆している。今後、プロテオーム解析やメタボローム解析により詳細な解析により、転写産物プロファイルの変動がどの程度、代謝系に影響を与えるのか明らかにする必要がある。

２）ゲノム DNA のメチル化を誘導する siRNA の移動を伴う接ぎ木個体の安全性評価点

プロモーター配列のメチル化を誘導する end2 導入遺伝子を持つ遺伝子組換え体を台木に、野生株を穂木にもつタバコを作出した。実際に、ごくわずかな量ではあるが siRNA が穂木に移動し、一部の細胞において標的プロモーター配列がメチル化された（図 4）。しかし転写産物（図 5）、タンパク質（図 10）、代謝物（図 13、14）の各プロファイルは、siRNA の移動に伴う変化が生じないことを示した。この結果は、移動する siRNA の量が限定的であることから、接ぎ木技術における siRNA の利用については、siRNA の配列特異性と改変を意図する形質を確認することで安全性を確保できると考えられる。

３）植物代謝系とは独立した翻訳産物を産生する遺伝子組換え体を利用した接ぎ木個体の安全性評価点

現在、上市されている遺伝子組換え品種の多くは、その導入遺伝子産物が植物の代謝系に影響を与えない除草剤耐性や害虫抵抗性を付与するものである。本研究項目では、植物代謝系とは独立した導入遺伝子の例として GUS 遺伝子を発現する、基礎研究のモデルとして頻用されるマイクロトマトを台木として、穂木に食用品種である Stella トマトを穂木とした接ぎ木個体を作成した（図 21、22）。得られたトマト果実における転写産物プロファイルは対照区とは異なることが示されたが（図 6、7）、変動を示した遺伝子はごくわずかであった。タンパク質（図 11）、代謝物（図 15）、トマトステロイドアルカロイド（図 15）、食品成分（図 23）の各プロファイルは対照区とは明瞭に区別され

ることはなかったことから、植物代謝系とは独立した作用機作をもつ導入遺伝子を有する遺伝子組換え植物を利用した接ぎ木個体では、後述する導入遺伝子の翻訳産物自体の安全性の観点での評価点を除き、食品安全性の評価に必要な評価点はない、と考えられた。

4) 導入遺伝子産物（タンパク質）の接ぎ木個体での移動

これまで、後述する積極的に移動することが知られている FT タンパク質などの例を除き、タンパク質が植物個体で長距離移動することはあまり想定されていない。今回、高感度な検出が可能なルシフェラーゼを発現するタバコ台木を用いて、接ぎ木個体でのタンパク質の移動について検討した。その結果、移動する距離は、比較的短く（約 10 cm；図 8）、その量も計算では台木で蓄積しているルシフェラーゼの 2 万分の 1 程度とごく微量であった。ただし、蓄積は葉柄のほうが葉身よりも多く、接ぎ木個体の穂木中で局在する可能性が示された。接ぎ木面を超えたタンパク質の移動において、タンパク質の分子量や種類によって違いがあるのかどうかを検討するために、タバコ台木、キュウリ穂木という科を超えた異種の接ぎ木個体を作成し、キュウリ葉におけるタバコタンパク質の検出を行ったところ（表 3～5）、100 kDa ほどの分子量と推定されるタンパク質が検出された。これらの結果は、接ぎ木技術においては遺伝子組換え植物で発現する導入遺伝子産物の安全性については、特にアレルギー性の観点から評価する必要があることを示唆している。

5) 積極的に移動することが知られているタンパク質を発現する遺伝子組換え体を利用した接ぎ木個体の安全性評価点

FT タンパク質は、開花にかかわる調節因子として植物体内を長距離移動することが知られている。接ぎ木個体においても同様に移動すると考えられる。そこで穂木に FT を発現する形質転換ジャガイモ、台木に食用品種ジャガイモからなる接ぎ木個体を作成した（図 24）。このような接ぎ木個体では、転写産物（図 9）、タンパク質（図 12）、代謝物（図 17、18）、脂質（表 2）、およびステロイドアルカロイド（図 19）、および食品成分（図 25）の解析結果から、FT 発現穂木が可食部である台木の塊茎には影響を与えないと考えられた。ただし、タンパク質が移動する可能性が高いため、タンパク質としての安全性評価（アレルギー性、毒性）が必要であると考えられた。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）
 - 1) Kodama, H., Miyahara, T., Oguchi, T., Tsujimoto, T., Ozeki, Y., Ogawa, T., Yamaguchi, Y., Ohta, D. (2021) Effect of transgenic rootstock grafting on the omics profiles in tomato. ◎**Food Safety** (in press)
 - 2 本研究を基にした学会発表の実績
 - 1) GM タバコ台木に接いだ非 GM タバコ穂木の葉における導入遺伝子の影響調査、宮原平、梅山幸子、辻本恭、小関良宏、小川拓水、山口夕、太田大策、小口太

- 一、 児玉浩明、日本食品化学学会 第 26 回総会・学術大会（誌上開催）
- 2) 非移行性 GUS 発現トマト台木に接いだ非 GM トマト穂木由来果実の代謝プロファイル解析、小川拓水、山口タ、小口太一、宮原平、辻本恭、小関良宏、児玉浩明、太田大策、日本食品化学学会 第 26 回総会・学術大会（誌上開催）
- 3) プロモーター配列を標的とする siRNA 産生台木が穂木に与える影響 梅山幸子、宮原平、小口太一、太田大策、小関良宏、児玉浩明、日本農芸化学会関東支部 2020 年度大会（オンライン開催） 2020 年 11 月 28 日

3 特許及び特許出願の数と概要
該当なし。

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）
該当なし。

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同品種、異品種さらに異種植物種の非遺伝子組換え植物の穂木に生る形質改変された食品の安全性評価ポイントを明らかにする。	5	タバコの接ぎ木では台木から穂木に導入遺伝子由来のタンパク質が移行する結果が得られている。一方で、トマトの接ぎ木では食品成分分析および各種オミクス解析で果実への台木に導入された遺伝子由来の影響は確認されなかった。ジャガイモを使った接ぎ木の解析では食品成分に大きな違いがないことが確認されている。タバコとキュウリの接ぎ木では台木に使用したタバコ由来のタンパク質が穂木に移動していることが示された。このため、接ぎ木によるタンパク質の移行についての安全性評価が必要であると考えられた。
（２）RNA 発現抑制型改変 siRNA 遺伝子導入植物体から得られた接ぎ木体および交配個体において導入遺伝子を含まない部位由来の食品の安全性評価ポイント、特に宿主転写産物 RNA オフターゲット分解の可能性を明らかにする。	3	RNA 発現抑制型改変 siRNA 遺伝子導入植物体の交配後代における null segregant については、RNA 発現抑制型 siRNA と DNA メチル化改変 siRNA が同時に分離した null segregant 個体での評価として実施した。転写産物プロファイルでは対照区と異なるデンドログラムとなった。今後、タンパク質と代謝物プロファイルについても詳細に解析を進める必要がある。

		なお、RNA 発現抑制型改変 siRNA を接ぎ木で利用する場合には、siRNA が移動しても非遺伝子組換え穂木もしくは台木の細胞内の内在性の遺伝子には作用しないことが報告されている。
(3) DNA メチル化改変 siRNA 遺伝子導入植物体から得られた接ぎ木体および交配個体において導入遺伝子を含まない食品の安全性評価ポイント、特に宿主ゲノム DNA 抑制オフターゲットの可能性を明らかにする。	4	DNA メチル化改変 siRNA 遺伝子導入植物体から得られた接ぎ木の解析では、台木から穂木への siRNA の移行はごくわずかであり、その結果、標的 DNA 配列へのメチル化もごく一部の細胞で生じたと推定された。各種オミクス解析の結果では、導入遺伝子の影響は確認されなかった。 DNA メチル化改変 siRNA 遺伝子導入個体の交配後代における null segregant については達成目標 (3) で前述したように転写産物プロファイルでは対照区と異なるデンドログラムとなった。今後、タンパク質と代謝物プロファイルについても詳細に解析を進める必要がある。
(4) 接ぎ木および siRNA による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。	4	siRNA を利用した DNA のメチル化による有用形質を得ることを目的とした接ぎ木技術、および植物の代謝系とは独立した作用機作を有する導入遺伝子を利用した接ぎ木技術によって得られた食品については、オミクス解析から予測と大きく異なる結果が得られた例はなかったため、従来の実質的同等性を演繹した食品の安全性評価は適用できると考えられる。特に接ぎ木技術の利用にあつては、接ぎ木技術そのものに食品安全性上の懸念はないことが明らかになったが、接ぎ木面を超えて多くのタンパク質が移動し、導入遺伝子産物であるタンパク質の移動も確認されたことから、この点を念頭においた評価が求められる。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

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	4	本研究により、siRNA を利用した後代品種、とくに null segregant の利用における評価点については、今後も詳細な研究が必要である。一方で、接ぎ木技術の利用における評価点については、タンパク質が台木から穂木に移行することが示されたことから評価点が明らかになったと考えられる。一方で台木から穂木への siRNA の移行は、表現型にほとんど影響しないと考えられる。同様に、台木から穂木への mRNA の移行も検出されていない。
(2) 研究成果の有用性	4	後代品種としての null segregant の利用や接ぎ木技術による新たな植物育種技術は、遺伝子組換え食品として該当することなく、導入遺伝子の有用な形質を利用することができる可能性があり、消費者にも受容される可能性が高い。本研究により、接ぎ木植物における安全性評価点が見えてきたことは、新たな植物育種技術の利用、普及にとって大きな意味を持つと考えられる。
総合コメント 新たな植物育種技術の中で、特に接ぎ木技術の安全性評価点について、タンパク質の移動を考慮した評価軸が必要であることが明らかになった。今後、環境要因がタンパク質の移動に与える影響、また、接ぎ木で用いる遺伝子組換え作物が、植物代謝系と相互作用する場合に、食品としての成果物の安全性にどのように影響するのか、検討していく必要がある。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

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。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。