

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860091

研究課題名(和文) 未承認GMの峻別を可能とするイネ種子エピゲノムの一粒子プロファイリング

研究課題名(英文) Individual seed epigenetics profiling for rice to detect unauthorized GM trait

研究代表者

中村 公亮(Nakamura, Kosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号：60570926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え(GM)イネの開発で汎用性の高いイネ由来Actin1プロモーター(Act1p)のDNAメチル化パターンを解析し、その結果、カルスの低再分化環境下においては、GM型Act1pは非GM型Act1pと比較して顕著にDNAがメチル化されることを示唆するデータを得た。また、多種多様なGM作物の有用遺伝子の発現に汎用性の高いカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNAプロモーター(P35S)を作物ゲノムに導入した後と作物に感染したCaMVゲノム由来のP35Sについて、DNAメチル化パターン解析し、その結果、食品に混入したGM作物とCaMVを判別できる新しい検知法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Rice callus developed from one grain was cultured under various stress conditions during cellular differentiation. Then, DNA methylation patterns in rice endogenous Actin1 promoter (Act1p) were analyzed in wild-type rice and genetically modified (GM) rice that has transgenic Act1p. The DNA methylation pattern of Act1p in the GM rice was found methylated as compared to that in the wild-type rice under low regeneration condition. Also, DNA methylation patterns of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S RNA promoter (P35S) in transgenic construct inserted into GM crop genomes and crop-infected CaMV genomes were analyzed. Multivariable statistical analysis of DNA methylation patterns indicated that the GM crops were grouped different from the crop-infected CaMV. Detection of the DNA methylation patterns in P35S could differentiate the presence of the GM crops for food ingredients and/or the CaMV in food commodities.

研究分野：食品化学

キーワード：作物 遺伝子組換え DNA 検知法 メチル化

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の生体は同一の塩基配列情報を持つ細胞により構成されているが、それぞれの細胞ごとに異なる表現型とその基盤となる遺伝子発現プロファイルを有する。この現象は、遺伝子発現やその制御機構を担うゲノム DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化・リン酸化などのゲノム修飾（エピゲノム）の影響に起因し、塩基配列に基づかない遺伝情報（エピゲノム情報）として細胞分裂や世代の壁を超えて伝達・維持される。乾燥種子については、発芽に伴って発現する遺伝子は活性化前のものであり、エピゲノムに関わる酵素は不活性状態であることから、エピゲノムのパターンは種子粒固有のものが保存されていると考えられる。イネ種子（玄米）については、一粒単位で各種ストレス（pH、浸透圧、温度、UV 照射、ウイルス感染）を与え細胞分裂させた際のエピゲノム情報に関する報告はない。本研究では、野生型と遺伝子組換え（GM）型 DNA のエピゲノムに及ぼす影響を調べた。ゲノム DNA のメチル化パターンが野生型と GM 型の塩基配列で異なる領域を見出し、その領域を基に両者を峻別する新しい方法の開発を試みた。

### 2. 研究の目的

(1) イネゲノムに導入されたイネ内在性 *Actin1* プロモーター（Act1p）の DNA メチル化パターンを多変量解析し、Act1p 制御下で GFP を発現する GM 型種子（KLB279）と野生型種子（日本晴）を峻別する方法の確立に向けた基礎データの収集を行う。

(2) 多種多様な GM 作物の作出に汎用されるカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）由来 35S RNA プロモーター（P35S）に着目し、様々な植物に感染させた CaMV の P35S 並びに GM 作物の目的遺伝子発現のためにゲノムへ挿入された P35S の DNA メチル化パターンを解析する。得られたデータを基に、CaMV と GM 作物由来の P35S を検知可能であるか検証する。

### 3. 研究の方法

(1) GM 型と野生型の玄米を使用した実験では、種子 1 粒より作成したカルスをストレスを付加する環境下（pH8.0/pH4.5、マンニトール 3%/マンニトール 6%、温度 20 /35、及び、UV 照射/非照射下）で再分化を誘導し 12

日間培養した。培養後、精製したゲノム DNA を鋳型に Act1p の DNA メチル化パターンをバイサルファイトシーケンシング法により解析した。

(2) P35S を含むトランスジェニック構造配列がゲノムに導入された GM 作物及び各種作物に感染させた CaMV ゲノムの P35S の DNA メチル化パターンをバイサルファイトシーケンシング法により解析した。

得られた DNA メチル化パターンは、サンプル別に多変量解析することによりプロファイリングし、GM 型と野生型を比較した。

### 4. 研究成果

(1) KLB279 のゲノムに存在する Act1p のコピー数をリアルタイム PCR を用いて概算した。その際、ゲノムに 1 コピーのみ存在する *sucrose phosphate synthase*（SPS）を定量試験のリファレンスに使用した。その結果、Act1p のコピー数は内在性のものと組換えにより導入したものを合わせて 2 コピー存在することが確認された（図 1、表 1）。

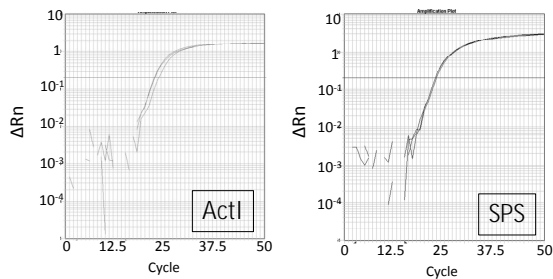


図1. 野生型（日本晴）とGM型（KLB279）のリアルタイムPCRパターン

表1. リアルタイムPCRより算出されたSPS及びAct1コピー数

	Ct value*		ΔCt	ΔΔCt	Act1 Copy number
	SPS	Act1			
Nihonbare	22.660	23.416	-0.756	0	1
KLB279	22.660	22.211	0.449	1.205	2.305

\*Ct values were calculated at threshold value 0.2 using ABI7900HT real-time PCR system.

KLB279 及び日本晴の種子 1 粒から作成したカルスをストレス環境下で再分化させた。再分化後、12 日間、各カルスに出現したグリーンスポット数を記録した（図 2）。その結果、KLB279 及び日本晴のカルス間において、再分化誘導の差は見られなかった。

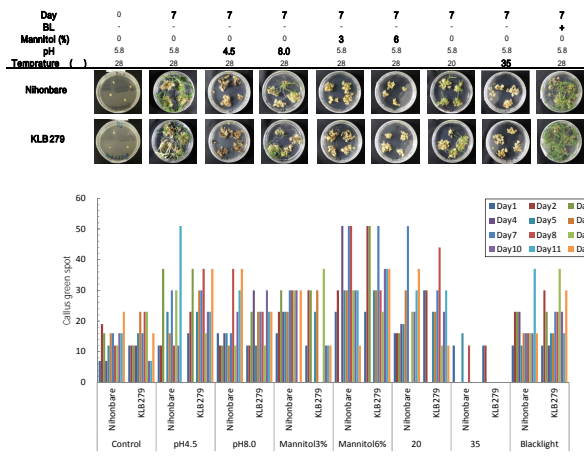


図2. 環境刺激下で培養したイネカス細胞の分化

ストレス環境下において、内在性と遺伝子導入された Act1p の DNA メチル化パターンの違いをバイサルファイトシーケンシング法により検出した。その結果、カルスの低再分化の環境（マンニトール 6% を添加し浸透圧ストレスを加えた条件）において、KLB279 の Act1p の DNA メチル化は野生型と比較して顕著な差を検出した（図 3）。

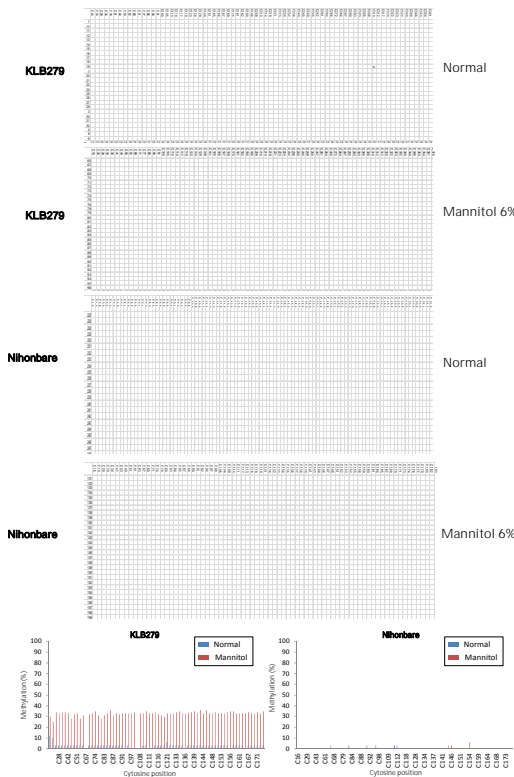


図3. 培養したイネカス細胞のAct1プロモーターのDNAメチル化パターン

(2) 真核生物の細胞に感染した DNA ウイルスのゲノム DNA は、宿主からメチル化されることが報告されている。そこで、CaMV の

感染を確認した  
ブロッコリー  
（アブラナ科）  
キャベツ（アブラナ科）  
コカブ  
（アブラナ科）  
チョウセンアサガ  
（ナス科）  
タバコ（ナス科）  
（表 2）から精製したゲノム DNA をバイサルファイトシーケンシングに供し、P35S のメチル化パターンを解析した。その結果、

表2. CaMV由来P35SのPCR検出結果

sample	infected leaf	Upper new leaf after infection	PCR
Datura metel	✓	✓	+
Solanum lycopersicum	✓	✓	+
Cryptotaenia canadensis subsp. japonica	✓	✓	+
Triticum aestivum	✓	✓	+
Petroselinum neapolitanum	✓	✓	-
Sesamum indicum	✓	✓	+
Phaseolus vulgaris	✓	✓	+
Lactuca sativa	✓	✓	-
Brassica rapa L. var. rapa	✓	✓	+
Brassica oleracea var. Italica	✓	✓	+
Brassica oleracea var. capitata	✓	✓	+
Oryza sativa	✓	✓	+
Triticum aestivum	✓	✓	-
Hordeum vulgare	✓	✓	+
Nicotiana tabacum	✓	✓	+

いずれの植物に感染した CaMV においても、P35S は高度にメチル化されていた。また、コカブに CaMV を感染後、7～24 日間の P35S メチル化を解析したところ、解析した配列の 83% 以上の DNA メチル化率を検出した（図 4, 5）。一方、GM 型作物（パパイヤやトマト）に導入された同

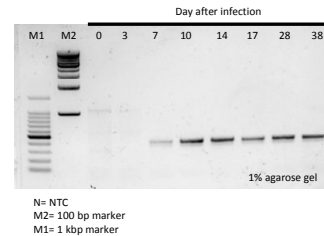


図4. CaMV感染後3～38日後のコカブより抽出したDNAを鋳型にPCRで検出されるP35S配列

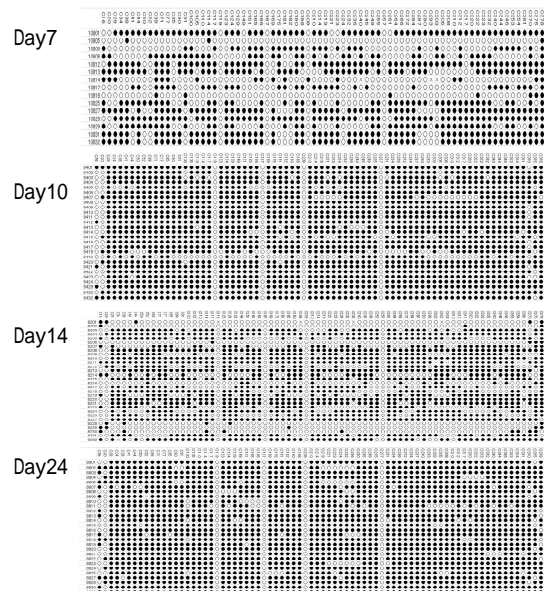


図5 CaMV感染後7, 10, 14, 24日後のP35S配列のDNAメチル化パターン

配列は、低メチル化されていた。解析を行った 339 bp のうち 67 か所のシトシン塩基のメチル化パターンの多変量解析の結果、CaMV ウイルス由来と GM 作物由来の P35S の DNA メチル化パターンをグループ化することができ、GM 型と非 GM 型作物を見分けることが可能であった ( 図 6 )。P35S のメチル化パ

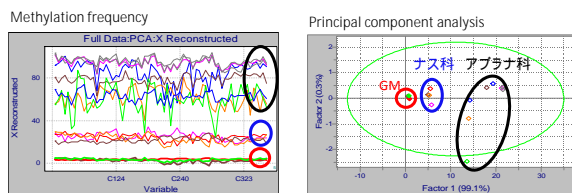


図6. メチル化量とメチル化塩基配列のデータを多変量解析した結果

ターンを解析した結果、組換え操作によって導入された P35S は非メチル化されており、一方で CaMV の P35S は高度にメチル化されていた。CaMV 由来 P35S 並びに GM 作物の目的遺伝子発現のために植物ゲノムに導入された P35S の DNA メチル化量と配列に明確な差が存在し、その差を検出することで CaMV と GM 作物由来の P35S を検知可能であることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., & Nishimaki-Mogami, T. Interlaboratory validation data on real-time polymerase chain reaction detection for unauthorized genetically modified papaya line PRSV-YK. *Data in Brief*, 7, 1165-1170, 2016.
2. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T. Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method. *Food Chemistry*, 205, 272-279, 2016.
3. Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H. Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via

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

4. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015.
5. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 240, 413-422, 2015.
6. 田中秀典、北崎康生、中村公亮、穂山浩、明石良：遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の簡易検出法の確立、*育種学研究*、16、158-161、2014.
7. 近藤一成、中村公亮：次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の現状と問題点、*食品衛生学雑誌*、55、231-246、2014.
8. 北川麻美子、中村公亮、近藤一成、生形省次、穂山浩：野菜加工食品中の遺伝子組換えトマトに汎用される組換え DNA 配列の検出について、*食品衛生学雑誌*、55、247-253、2014.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Nakamura, K., Ishigaki, T., Hanada, K., Akimoto, S., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. DNA methylation pattern analysis of common plant virus promoter used to develop genetically modified crops, *PacificChem2015, Hawaii, USA, 2015 年 12 月*
2. Kondo, K., Sakata, K., Noguchi, A., Nakamura, K., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. A new analytical methodology for unknown genetically modified organisms using linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR), *7th International Symposium on Recent*

- Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015 年 11 月
3. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014 年 9 月
  4. 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：汎用性ウィルスプロモーター導入によるクロマチンループ内の内在性遺伝子発現への影響、日本薬学会 第 136 年会、横浜、2016 年 3 月
  5. 中村公亮、近藤一成、穠山浩、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、布施谷実聡、川上浩、田中秀典、明石良、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：我が国における未承認遺伝子組換えパパイアの食品への混入に関する事例と検知法開発の現状、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015 年 12 月
  6. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の妥当性評価、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015 年 12 月
  7. 福田(佐藤)のぞみ、近藤一成、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、最上(西巻)知子：遺伝毒性試験および全ゲノム解析を用いた CRISPR/Cas9 の DNA2 本鎖切断ポテンシャル、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月
  8. 坂田こずえ、近藤一成、野口秋雄、中村公亮、福田のぞみ、石垣拓実、最上(西巻)知子、LAM-PCR を用いた組換え作物中の未知領域解析法の検討、第 110 回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015 年 10 月
  9. 野口秋雄、町井香苗、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発、第 110 回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015 年 10 月
  10. 中村公亮、近藤一成、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：安全性未承認遺伝子組換えパパイア (PRSV-HN 系統) の検出と検知法開発、第 110 回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015 年 10 月
  11. 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穠山浩、近藤一成、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：未承認遺伝子組換え食品検知法の開発：未承認遺伝子組換えジャガイモ検知を例に、第 1 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、千葉、2015 年 9 月
  12. 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：食品遺伝子検査を簡易化するダイレクトリアルタイム PCR、2015 年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2015 年 6 月
  13. 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：次世代ゲノム編集技術による遺伝子組換え食品の内在性遺伝子発現への影響、日本食品化学学会 第 21 回総会・学術大会、東京、2015 年 5 月
  14. 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えヒヨコマメ検査法確立に向けたヒヨコマメ内在性遺伝子 (CaNCED) 特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第 21 回総会・学術大会、東京、2015 年 5 月
  15. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：標的 DNA のメチル化の頻度およびパターン解析による新規 GM 検知法確立の試み、第 108 回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
  16. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第 108 回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
  17. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹：加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しい DNA 抽出精製法の検討、第 108

- 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
18. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵：食品中に含有する添加物のDNA精製効率に与える影響について、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
19. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
20. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
21. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子：2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
22. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度AOAC International日本セクション年次大会、東京、2014年6月
23. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内の遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会第20回総会・学術大会、東京、2014年5月
24. 中村公亮：未承認遺伝子組換え食品の検知法の開発に関する研究、日本食品化学学会第20回総会・学術大会、東京、2014年5月
25. 伊東篤志、田口朋之、田名網健雄、羽田聖治、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、何思巖、宮原平、

山田 晃世、小関 良宏：DNAマイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパパイアのスクリーニング検査法、日本食品化学学会第20回総会・学術大会、東京、2014年5月

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：遺伝子組換え植物の判定法

発明者：中村公亮、小林友子、近藤一成

権利者：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特開

番号：2016-019480

出願年月日：2016年2月4日

国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

名称：抗ウイルス剤

発明者：小川温子、中村公亮、坂上ひろみ、棚元憲一

権利者：国立大学法人お茶の水女子大学

種類：特許

番号：P5633717

取得年月日：2014年10月24日

国内外の別：国内

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村公亮 (KOSUKE NAKAMURA)

国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

研究者番号：60570926

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし