

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究(1)

研究分担者 小関 良宏 東京農工大学大学院 工学研究院 教授

研究要旨:

これまでの遺伝子組換え植物は害虫抵抗性や除草剤抵抗性といった比較的単純なものであったが、最近では、機能性を付与したものや遺伝子組換え植物同士の交配によって、複数の機能を持たせるなど、複雑かつ多様な植物が生み出されている。また、植物にとどまらず、バクテリア、魚、ニワトリなど植物以外の遺伝子組換え生物も実用化されつつある。これらのように多様化、複雑化しつつある遺伝子組換え生物を由来とする食品の安全性について評価する場合、その複雑性や多様性、また、安全性評価すべき観点もはっきりとしないといった問題点がある。そこで本研究では、これらの安全性を評価するうえでどのような評価が可能であるかについて探るために、遺伝子組換えアマゴと低アレルゲンコメについてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、遺伝子組換えアマゴでは非組換え体と比較してアレルゲン遺伝子発現の低下が認められ、低アレルゲンコメにおいても前回と同様にアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子の発現が顕著に低下していることが認められた。

協力研究者

宮原 平 東京農工大学大学院工学研究院

A. 研究目的

現在では遺伝子組換え植物が食品として非常に身近に流通している。これらの遺伝子組換え食品は安全性評価が科学的になされたうえで国の承認のもとに安全に流通しているものである。しかし、近年、さまざまな機能を付加した遺伝子組換え植物が開発され、また、組換える遺伝子も、従来のような害虫抵抗性や除草剤耐性などのシンプルな機能付加ではなく、もともとその宿主が持つ代謝経路を改変するものや、複合的な要因によって環境耐性を付加する等、それらの安全性を評価する場合に、その評価すべき観点が多様化、複雑化している。また、最近では遺伝子組換え植物

のみならず、遺伝子組換えニワトリやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実用化されつつある。これらはこれまでに存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討しておく必要があると考えられる。さらには、最近問題となっているのは、遺伝子組換え植物同士を交配して得られる後代種である。これらは遺伝子を組換えて付与された機能が‘スタック’することによって、生産性等の向上を図っているものであるが、これらのように遺伝子を組換えたものをさらに交配した後代において、形質にどのような変化が表れているかについて研究されている例は少ない。そのため、今後増えるであろうスタック品種についてもそれらの組換え遺伝子の検出技術や安全性評価基準について検定しておく必要が望まれる。今年度は代謝経路を変化させた遺伝

子組換え動物として、成長ホルモン遺伝子 (Growth hormone 1: GH1) 導入アマゴを用いたトランスクリプトーム解析と、前年度とは異なるロットのアレルゲンタンパク質の生産を低減させたコメを用いてサンプル間にトランスクリプトーム解析の結果に大きな差がないことの確認を行った。また、スタック品種の遺伝子や代謝物の変化を更に詳細に解析することを目的として、前年度、植物の中で最も研究が進んでいるシロイヌナズナを用いて作製したスタック品種のトランスクリプトーム解析を委託した。

B . 研究方法

B-1 植物材料

GH1 導入アマゴは生育段階を生重量 100, 125, 150g に分けたものをヘテロ GH1 組換えアマゴと非組み換えアマゴの2種について水産総合研究センター増養殖研究所名古屋博之育種グループ長に分与していただいた。

低アレルゲンコメ (14-16kDa knock out 体) は東京理科大島田浩章教授から前年度とは異なるロットのサンプルを分与していただいた。

シロイヌナズナスタック個体は、まず環境耐性遺伝子の例として、塩性植物であるシチメンソウ (*Suaeda japonica*) から大腸菌の耐塩性向上効果を持つ遺伝子として当研究室で単離された、fructose bisaldorase 相同遺伝子 (*SjFBA*) と *relA/spot* 相同遺伝子 (*SjRSH*) をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流に連結したベクターを構築し、アグロバクテリウムを介してフローラルディッピング法によってシロイヌナズナに導入して作成された系統を用いた。これらの系統を自家受粉して導入された遺伝子をホモで持つ系統を抗生物質耐性を指標として選抜した。*SjFBA* 組換え体と *SjRSH* 組換え体のホモの系統を交配し

てそれらのスタック系統を作出したものを使用した。

B-2 RNA 抽出方法

アマゴからの RNA 抽出は筋肉組織を液体窒素中で磨砕した後に、RNase-Free 水に懸濁しその上清から NucleoSpin RNA Blood Kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて RNA 抽出を行った。方法はそのマニュアルに従った。

コメからの RNA 抽出は、液体窒素中で磨砕したコメ粉末を Fruits Mate (タカラバイオ社) で処理した後に RNeasy Plant Mini Kit を用いて行い、方法はそれらのマニュアルに従った。

シロイヌナズナからの RNA 抽出は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて行い、方法はそのマニュアルに従った。

B-3 マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

GH1 遺伝子導入アマゴから抽出した RNA を DNA マイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイチップはアマゴと同じサケ科のサーモンの DNA マイクロアレイチップ (Salmon Gene Expression Microarray 4x44) を用いた。このチップ上には約 43,000 のプローブが固定化されている。

低アレルゲン化コメの DNA マイクロアレイ解析は、約 42,000 のイネの遺伝子が搭載された DNA マイクロアレイチップ (イネオリゴ DNA アレイ 4x44K RAP-DB) を用いて行った。

シロイヌナズナスタック品種のアレイ解析ではチップは Arabidopsis オリゴ DNA マイクロアレイ Ver. 4.0 を使用した。これはシロイヌナズナ的全遺伝子および転写産物をカバーしているものである。いずれの解析もタカラドラゴンジェノミクスセンターの委託解析を用いた。

C. 研究結果

C-1 GH1 導入アマゴのトランスクリプトーム解析

GH1 導入アマゴと非組み換えアマゴから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行うことができる品質であるかについて検査を行ったところ、RNA の分解は認められなかった (Fig. 1) ことから、このサンプルを使用してマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、検出された各遺伝子のスポットにおいて、十分信頼できる強度の蛍光が観測されたのは全体の 50% 程度であった (Table 1)。シグナルが観測された遺伝子についてそれらの発現量を同一の生重量間の組換え体と非組換え体で比較したところ (NT-100 vs GM-100、NT-125 vs GM-125、NT-150 vs GM150)、まず解析の指標として組換え体では GH1 遺伝子が成長に伴いその発現が増加していることが示された。この結果より解析が正しく行っていると判断し、他の遺伝子についても比較検討を行った (Table 2)。これまでの GH1 導入アマゴでの肝組織で発現比較の報告と同様に、組換え体のアマゴでは脂肪酸関連遺伝子の発現が低下していることが確認された。これは GH1 組換えアマゴでは脂肪組織の蓄積が少ないとする先の報告とも一致した結果である。またアレルギー物質である Parvalbumin は非組換え体と比較してどの成長ステージにおいても 3 割程度の発現量であったことから、組換え体では Parvalbumin の蓄積量は低下していることが示唆された。他にも糖代謝やサイトカイン関連遺伝子でも成長ステージに関わりなく組換え体において発現が変動していることが確認された。

C-2 低アレルギー化コメのトランスクリプトーム解析

遺伝子組換えコメと非組換えコメから RNA を

抽出し、その品質検査を行ったところ、両者において若干の RNA の分解が認められた (Fig. 2)。このサンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、約 50% 程度のスポットにおいて信頼性の高いシグナルが検出されていることが判明した (Table 3)。そこで、これらのコメにおける遺伝子発現量の変化を比較した。その結果、前年度の解析と同様に遺伝子組換えコメにおいてアレルギー関連遺伝子群の発現が低下していることが明らかとなった (Table 4)。また、発現の低下した割合も各遺伝子で前回と大きく変動しておらず、どの遺伝子においても非組換え体の 1 割以下まで発現が低下していることから、この低アレルギー化コメは安定的にアレルギー関連遺伝子群の発現が低下していることが示された。

C-3 遺伝子組換えスタッキングモデル植物のトランスクリプトーム解析

現在、委託解析中。

D. 考察

代謝変化や環境抵抗性が付与された新機能遺伝子組換え植物、さらにそれらの後代交配品種が実用化されている。また遺伝子組換え動物として成長ホルモン遺伝子導入サーモンが商品化されようとしている。新機能遺伝子組換え植物において、導入遺伝子が宿主の遺伝子発現や栄養成分に与える影響について解析したデータは少ない。また遺伝子組換え動物についても、それらデータの蓄積が乏しい。そこで、これらについてトランスクリプトーム解析および食品成分分析を行なって、安全性評価の上で必要とされる項目を明確化することを目的とした。まず、GH1 導入アマゴでは、信頼性の高いデータはマイクロアレイ上の遺伝子の約 50% 程度であったが、導入されている

GH1 遺伝子は組換え体において確かに発現が上昇しており、脂肪酸関連遺伝子およびアレルゲン遺伝子は発現が低下していることが示された。

低アレルゲン化コメのトランスクリプトーム解析では、約 5 割のスポットにおいて信頼性の高いデータが得られた。今回用いたサンプルでは遺伝子組換え体と非組換え体のどちらにおいても RNA の若干の分解が認められたことから、品質のよい RNA を用いることで、更に信頼性の高いデータが得られるものと予想された。組換えた遺伝子の効果によって発現が減少したと思われる遺伝子が複数検出され、それらのいずれも前回と同様にアレルゲンタンパク質をコードしているものであった。一方で、前回では β -グルコシダーゼ遺伝子の発現に変動が確認されていたが、今回の解析ではこれらの遺伝子発現に変化は見られなかったことから、これらに関しては個体や系統間の差であることが示唆された。

遺伝子組換えモデル植物のスタック個体の作出については前年度に得られていたスタック個体から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を委託した。

E. 結論

成長ホルモン遺伝子導入アマゴでは脂肪酸関連遺伝子とアレルゲン関連遺伝子の発現が非組換え体よりも低下していた。低アレルゲンコメにおいては、前年度と同様にアレルゲン関連遺伝子の発現が顕著に低下していることが示され、本研究で用いた組換え体は安定的にアレルゲン物質の蓄積が低下していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

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、佐々木伸大、山口友紀絵、山田晃世、小関良宏：DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会第 19 回学術大会（2013. 8. 30、名古屋・金城学院大学）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

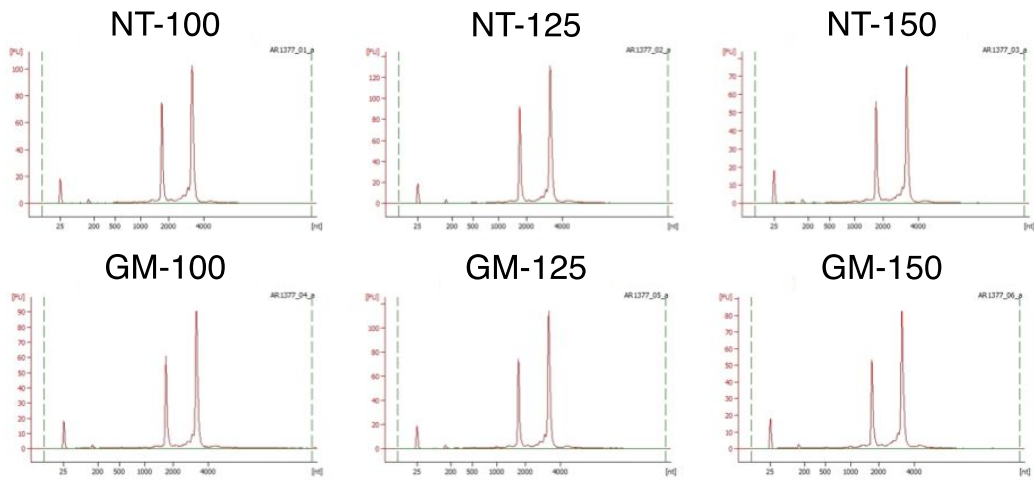


Figure 1 成長ホルモン遺伝子導入アマゴから抽出した RNA の品質検査結果

Table 1 成長ホルモン遺伝子導入アマゴのマイクロアレイ解析のスポット検出率

0: 信頼性が低いシグナル強度、1: 信頼性の高くないシグナル強度、2: 信頼性の高いシグナル強度

検体 No	0 (%)	1 (%)	2 (%)
NT-100	24.42	19.51	56.07
NT-125	23.80	18.71	57.49
NT-150	22.00	17.95	60.06
GM-100	33.64	18.17	48.19
GM-125	27.40	23.37	49.23
GM-150	21.22	18.50	60.28

Table 2 GH1 導入アマゴにおける遺伝子発現比較

成長ステージに関わりなく発現に変動があった遺伝子を抽出した。数値は組換え体での発現量/非組換え体での発現量から算出した。

Gene name	Accession No.	Fold difference		
		GM100/NT100	GM125/NT125	GM150/NT150
Up				
Insulin-like growth factor binding protein 4	TC204183	8.34	5.17	2.75
Interferon-inducible protein Gig2	TC176963	4.44	8.51	8.22
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 beta	BT049695	5.98	5.94	6.77
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 gamma	BT056971	17.15	5.86	2.57
Growth hormone 1 (GH1)	NM_001123676	1.60	2.45	21.26
6-phosphofructokinase type C	NM_001173694	2.23	2.58	5.98
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	TC178950	13.36	7.16	38.32
Down				
Interleukin-6 receptor subunit alpha	NM_001173710	0.13	0.17	0.35
Interleukin-10 receptor beta chain precursor	BT047745	0.32	0.30	0.34
Interferon-induced 35 kDa protein homolog	NM_001141821	0.26	0.38	0.34
Interferon-induced GTP-binding protein Mx	NM_001139918	0.25	0.40	0.18
Interferon regulatory factor 7	NM_001136548	0.17	0.31	0.18
Epidermal growth factor receptor 5	TC205748	0.40	0.18	0.41
Opioid growth factor receptor	AM259613	0.13	0.38	0.40
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	NM_001140391	0.42	0.70	0.67
Transforming growth factor-beta-inducible early growth response protein 3	NM_001139829	0.41	0.75	0.88
Transforming growth factor beta-1	TC176824	0.37	0.55	0.79
Very-long-chain acyl-CoA synthase	TC179203	0.15	0.07	0.21
Mid1-interacting protein 1	BT045165	0.05	0.44	0.20
Acyl-CoA desaturase	BT059328	0.26	0.21	0.37
Fatty acid-binding protein	BT047488	0.09	0.14	0.25
Liver-type fatty acid-binding protein	TC202180	0.05	0.23	0.67
Fatty acid-binding protein	BT049320	0.28	0.12	0.29
Fatty acid-binding protein	TC179933	0.05	0.01	0.22
Fatty acid-binding protein	BT057126	0.25	0.29	0.62
Muscle fatty acid binding protein	NM_001123578	0.12	0.21	0.11
Intestinal fatty acid binding protein	TC196919	0.15	0.09	0.41
6-phosphofructokinase, muscle type	TC208420	0.46	0.11	0.26
Enolase	TC173506	0.25	0.24	0.61
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	BT046468	0.15	0.03	0.67

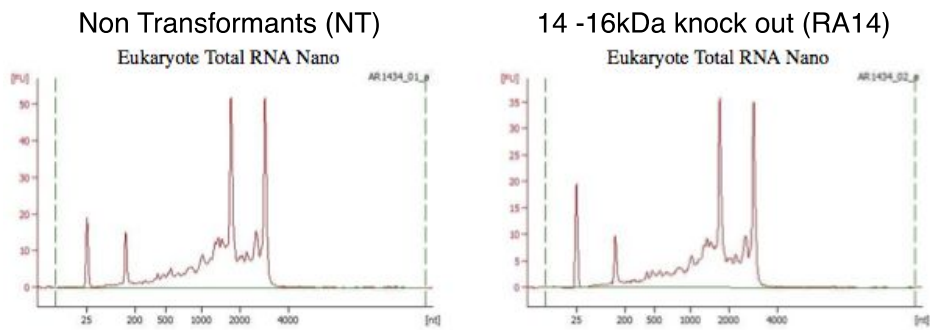


Figure 2. 低アレルゲン化コメから抽出した RNA の品質検査結果
 左：遺伝子非組み換えコメ、右：遺伝子組み換え低アレルゲン化コメ

Table 3 低アレルゲン化コメのマイクロアレイ解析のスポット検出率

0: 信頼性が低いシグナル強度、1: 信頼性の高くないシグナル強度、2: 信頼性の高いシグナル強度

検体 No	0 (%)	1 (%)	2 (%)
NT	31.57	24.39	44.04
RA14	26.83	23.40	49.77

Table 4 低アレルゲン化コメにおけるアレルゲン関連遺伝子の発現比較

前回 (Previous) と今回 (This time) の解析を比較した。数値は組換え体での発現量/非組換え体での発現量から算出した。

Gene name	Accession No.	Fold difference	
		Previous	This time
RA5 gene for allergenic protein	D11430	0.0064	0.0084
Allergenic protein, clone RA5b	D42142	0.0045	0.0077
RA14 gene for allergenic protein	D11432	0.0238	0.0308
Allergenic protein, clone RA14b	D42139	0.0185	0.0218
Allergenic protein, clone RA14c	D42140	0.0158	0.0201
Allergenic protein, clone RA14d	D43657	0.0140	0.0178
Allergenic protein, clone RA14f	D43659	0.0158	0.0202
Allergenic protein, clone RA16	D42141	0.0053	0.0098
RA17 gene for allergenic protein	D11431	0.0088	0.0094
Allergenic protein RA17 precursor	X66257	0.0097	0.0055
Seed allergenic protein RAG2 precursor	AK107328	0.0138	0.0050
Allergenic protein	AF042200	0.0061	0.0083
Similar to allergenic protein	AK107215	0.0102	0.0100
Low molecular weight globulin	X62091	0.0123	0.0172