

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究

分担課題 バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析（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）
研究協力者 宮原 平 （東京農工大学大学院工学研究院・助教）

研究要旨

近年の遺伝子組換え技術の発展により、ゲノム編集技術の開発が進められている。ゲノム編集技術では従来の外来遺伝子の導入による組換え生物の作出とは異なる技法で遺伝子改変が行われることから、これまでにない遺伝子改変がなされた生物由来の食品の安全性を評価する必要がある。

本研究では新規の遺伝子改変技術であるゲノム編集技術により作出された遺伝子改変ニワトリをモデルとし、遺伝子改変生物由来の食品の新たな安全性評価系の構築を目的としている。1 年目ではその基礎段階としてニワトリの雌雄の違いにおける白血球のトランスクリプトーム解析を行い、雌雄間での発現変動遺伝子を確認した。本年度は緑色蛍光タンパク質 (GFP) を従来の遺伝子組換え技術により導入した GFP ヘテロ導入ニワトリと非組換え体である野生種のトランスクリプトーム解析を行い、ニワトリでの遺伝子組換えによる遺伝子発現系への影響を調査した。

解析の結果、野生種と組換え体で発現変動のあった遺伝子群において、明確な遺伝子発現の差異を示す代謝系などのクラスターは確認されなかった。

A. 研究目的

従来の遺伝子組換え生物とは異なる、ゲノム編集技術と呼ばれる宿主生物体ゲノム内に外来遺伝子導入の痕跡がほとんど残らない遺伝子改変技術による遺伝子改変生物の開発が急速に進められている。この技術は近い将来に食品およびその加工原料としての使用が考えられることから、バイオテクノロジー応用食品としての安全性評価系の構築が必要とされている。これまでの研究から、遺伝子組換え生物では研究者が意図して導入した形質以外にも、研究者の意図しない遺伝子の発現や代謝フローの変化などの遺伝子組換えによる副次的な影響が起こっていることが示唆されている。このため、遺伝子改変生物においても同様に予期しない形質への影響が起こることが予想される。食品の安全性評価の点では、遺伝子改変生物の生体内での変化を網羅的に把握する必要があるが、遺伝子改変生物のオミクス解析を行った研究報告はまだ技術が新しいためほとんど見当たらない。

本研究ではゲノム編集技術による遺伝子改変生物のモデルとしてアレルゲンノックアウト

トニワトリを解析対象として、バイオテクノロジー応用食品の安全性評価基準のための基礎データの収集を目的に研究を行っている。平成 27 年度はニワトリの雌雄間でのトランスクリプトーム解析、平成 28 年度は遺伝子組換えニワトリと野生種でのトランスクリプトーム解析を行った。平成 29 年度には遺伝子改変ニワトリのトランスクリプトーム解析が予定されており、本研究においては本年度までの結果を元に遺伝子改変生物でのゲノム編集の影響を評価する基礎情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

広島大学の堀内教授より分与された 1-2 ヶ月齢のニワトリの白血球から抽出した total RNA をサンプルとしてトランスクリプトーム解析を行った。解析サンプルには、ウイルスベクター法により緑色蛍光タンパク質 (GFP) が導入された GFP ヘテロ導入ニワトリの雌を 3 個体、対照として雌の野生種を 3 個体使用した。

トランスクリプトーム解析は アジレント・テクノロジー社の Agilent Expression Array に

委託した。解析内容は、ラベリング方法 1 色法、DNA チップは Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color、Gene Expression Hybridization Kit、Gene Expression Wash Buffers Pack を使用し、方法はマニュアルに従い行われた。検出シグナルは専用解析ソフトウェア Agilent Feature Extraction により数値化された。

委託解析の結果により得られたデータにつき、正規化を行った各遺伝子の発現データから転写産物が検出されたことを示すシグナル強度 2 に該当する遺伝子を本研究での解析対象遺伝子とした。以降のデータ解析は、R 言語を使用し、Bioconductor および CRAN から提供されているパッケージを用いた。データ描写には R studio を使用した。

まず、データの全体像の把握および外れサンプルの有無を確認するため階層クラスター解析を行った。クラスタリングは (1-Pearson 相関係数) を距離として、平均連結法により行った。

散布図は、各遺伝子の発現量を対数変換後に野生種と組換え体それぞれの平均値を算出しプロットした。

解析対象遺伝子群から有意水準 1% ($p < 0.01$) としてサンプル間での発現変動遺伝子を抽出した。その後、同一サンプル内で共通して発現変動が 2 倍以上あった遺伝子について The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID: <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) によりクラスター解析を行った。

倫理面への配慮

該当しない

C. 研究結果

トランスクリプトーム解析に使用した Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 には 43,803 個のプロンプが搭載されており、すべてのサンプルで 6 割程度で十分なシグナル強度が検出される結果となった。このため、すべてのサンプルで共通して十分なシグナル強度を得られた 25,714 遺伝子を解析対象とした。

階層クラスター解析では野生種 3 個体、組換え体 3 個体がそれぞれのクレードを形成したことから外れサンプルはないと判断し、発現変動遺伝子の抽出には野生種 3 個体、組換え体 3 個体の計 6 サンプルをすべて使用する

こととした (Fig. 1)。

解析対象遺伝子について各サンプル間で発現量の平均値を算出し、散布図を描写した結果、野生種において組換え体よりも発現が上昇する遺伝子が多いことが示されたが、ほとんどの遺伝子については発現量の差は 2 倍以下に収まる結果となった (Fig. 2)。発現変動遺伝子の抽出では、解析対象とした 25,714 遺伝子のうち有意水準 1% とした場合 1,883 遺伝子が発現変動遺伝子として抽出された。このうち各サンプル間で共通して発現量の差が 2 倍以上あった遺伝子数は 326 遺伝子であり、野生種で発現量が 2 倍以上高くなる遺伝子が 299 遺伝子、組換え体で発現量が 2 倍以上高くなる遺伝子が 27 遺伝子抽出された (Table 1 にその一部を示した)。さらに発現変動遺伝子群とした 1,883 遺伝子について The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID) で各遺伝子の機能同定および翻訳産物の推定機能からクラスター解析を行ったところ、Enrichment score (サンプル間での遺伝子の偏りを数値化したもの) が高いクラスターはアミノ酸配列のドメインによる分類であり、代謝経路や免疫系など特定の機能に共通するクラスターは確認されなかった。

D. 考察

昨年度のニワトリの雌雄間によるトランスクリプトーム解析に引き続き、本年度では遺伝子組換えニワトリと野生種のニワトリでのトランスクリプトーム解析を行った。昨年度の結果では、性決定遺伝子などいくつかの機能が共通する遺伝子において雌雄間で遺伝子発現の変動が見られたが、今回の組換え体での解析では遺伝子の明確な発現の差異は確認されなかった。これは、導入されている遺伝子が GFP であり、本来ニワトリには存在しない遺伝子および代謝経路に関わらないタンパク質であることから、ニワトリ由来の遺伝子発現系にはほとんど影響を与えなかった可能性が考えられた。また、ヘテロ導入体であることも影響が少ない一因として考えられる。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH は今回の結果においても野生種、組換え体ともに発現量に差がないことが確認されており、階層クラスター解析においては野生種のクレードと組換え体のクレードが明確に分離されたため、サンプルおよび解析方法については適切であると考えられた。

次年度はゲノム編集技術により作出された

遺伝子改変ニワトリのトランスクリプトーム解析を行う予定である。予定されているサンプルはアレルゲンノックアウトニワトリであり、ニワトリ由来の代謝経路に影響を与える改変であることから、前年度および今年度よりも発現変動が著しく起こる可能性が高い。膨大な発現変動遺伝子群から真に変動のある遺伝子群を抽出する際に、前回および今回の発現変動遺伝子群を基礎データとして参照し考察に役立てたい。

E. 結論

野生種とウイルスベクター法による GFP 遺伝子ヘテロ導入組換え体のニワトリの 1-2 ヶ月齢の白血球におけるトランスクリプトーム解析では、両者の間に明確な発現変動が起こる遺伝子群は確認されなかった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)なし

2)なし

2. 学会発表

1)なし

2)なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

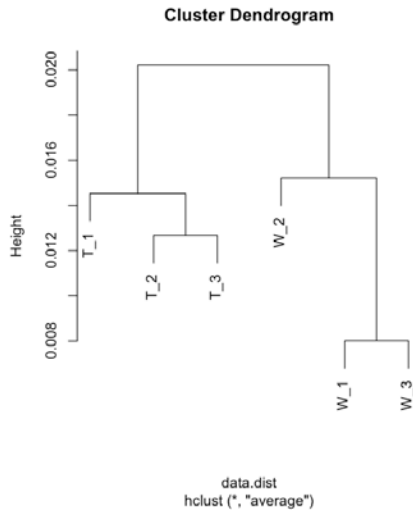


Fig. 1 階層クラスター解析結果
 野生種 W_1: W43、W_2: W51、W_3: W55、
 遺伝子組換え体 T_1: T45、T_2: T53、
 T_3: T54

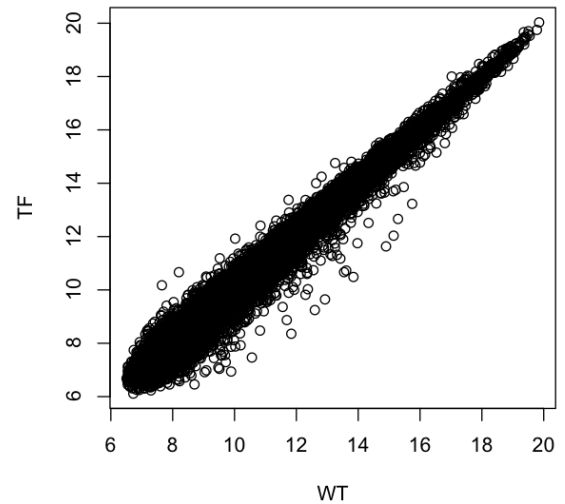


Fig. 2 散布図
 X 軸: 野生種の平均値、Y 軸: 遺伝子組換え体の平均値。

Gene Annotation		logFC
WT > TF		
Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1		3.48
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2		3.10
Adaptor related protein complex 2 mu 1 subunit		2.95
MHC class I glycoprotein		2.89
B-L beta chain mRNA		2.63
WT < TF		
Uncharacterized		-1.63
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor		-1.51
Lymphocyte antigen 6 complex		-1.50
Ankyrin repeat domain 42		-1.48
Uncharacterized		-1.38

Table 1 各サンプルにおいて 2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子について上位 5 位までのリスト

上: 野生種で遺伝子組換え体の発現を上回っていた遺伝子、下: 野生種で下回っていた遺伝子。

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究

分担課題 バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析(2)

研究分担者 小関 良宏 (東京農工大学大学院工学研究院研究科・教授)
研究協力者 小口 太一 (筑波大学生命環境系/遺伝子実験センター・助教)

研究要旨

近年、新しい植物育種技術 (New Plant Breeding Techniques; NBT) の農作物育種への利用に注目が集まっている。遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間の接ぎ木技術も NBT の 1 つである。今後、組換え台木に接いだ非組換え穂木の野菜・果樹等の育種が進み、それらに由来する農産物の食品としても利用も想定しなくてはならない。そこで、本研究では、トマトやジャガイモ等をモデルとし、組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析を実施し、食品としての利用に際する安全性評価基準や規制のあり方の議論を進めていく上での科学的知見の提供を目的とする。本年度は、*GUS* 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間で接ぎ木植物体を生育し、果実を得た。得られた果実の食品成分分析を実施し、組換えトマト、非組換えトマト及び組換え-非組換え接ぎトマトの間で比較したところ、いずれも有意な差は見出されないことを確認した。

A. 研究目的

地球規模の気候変動や地球人口の増大による食料需要の増大に対応するため、食料生産へのバイオテクノロジー利用の重要性は高まっている。新機能を付与した遺伝子組換え植物のみならず遺伝子組換え動物が開発され、さらに近年開発された New Plant Breeding Techniques (NBT) による新たな農作物の開発・研究が世界規模で進められている。NBT の一部は、最終産物には組換え遺伝子は含まないものの育種過程で遺伝子組換え操作を含む技術や組換え植物と非組換え植物を接ぎ木等、現在の法規制ではグレーゾーンにあたる技術が含まれる。NBT の技術開発が進めば、NBT 由来の農産物の食品としての利用も想定される。そこで、NBT 由来農作物を食品としての利用における安全性評価の基準や規制のあり方の議論を進めていく上で科学的エビデンスの蓄積不可欠である。そこで本研究では、NBT の 1 つである組換え体と非組換え体を接ぎ木した植物に関する生物学的・栄養学的知見創出を目的と

し、トマトやジャガイモ等をモデルとして組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析に基づく科学的知見を提示し、安全性評価手法の確立を目指す。

B. 研究方法

<植物材料>

植物材料は、実験用トマト品種であるマイクロトムを用いた。*GUS* 遺伝子導入マイクロトムは、筑波大学遺伝子実験センター野中助教より分与を受けた。播種後 5 週目の組換え (TG) 及び非組換え (NT) トマトを土面からおよそ 3 cm の箇所主茎を切断し、台木には切断面の中心に垂直にカミソリ刃で 2-3 mm 程度の切り込みを入れ、その間にカミソリで V 字型に削いだ穂木を挟み込み、内径 3 mm のビニル管で固定した。その後、1-2 週間、鉢を含む植物体全体をビニル袋で覆い、保湿状態で管理した。その後、1 週間程度をかけてビニル袋を外し、栽培室で

引き続き生育させた。結実後、成熟した果実を順次収穫・凍結保管した。

<食品成分分析>

組換え体 4 個体、非組換え体 4 個体（非組換え体同士の接ぎ木体 3 個体含む）、穂木組換え体/台木非組換え体となる接ぎ木体 5 個体、および穂木非組換え体/台木組換え体 6 個体より収穫した果実は、収穫後、分析に供するため凍結保管した。凍結保管した果実は、秤量後レトルトパウチ袋に封入、オートクレーブ処理した後に再度凍結し、日本食品分析センターに送付し、五成分（水分、たんぱく質、脂質、炭水化物、灰分）およびエネルギーの分析を依頼した。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質はケルダール法、脂質は酸分解法、灰分は灰化法により評価した。エネルギーと水分は下記の計算式により求めた。

$$\text{炭水化物} = 100 - (W + P + L + A)$$

W：水分、P：たんぱく質、L：脂質

C：炭水化物、A：灰分

倫理面への配慮

植物材料は組換え体を含むため、「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（カルタヘナ法）」及び関連省令や地方自治体の政令や指針、筑波大学遺伝子組換え実験安全管理規程等を十分に遵守して実施している。

C. 研究結果

非組換え体同士 3 例、穂木組換え体/台木非組換え体 10 例、穂木非組換え体/台木組換え体 9 例、合計 22 例のトマトの接ぎ木体を作成した。いずれの接ぎ木体の生育・結実性等には、個体間によるばらつきは認められるものの、接ぎ木していない植物及び穂木/台木の組み合わせの違いによって、生育・結実等に有意な違いはなかった（Tukey-HSD 検定、 $\alpha=0.05$ ）（図 1）。

作成した接ぎ木体及び対照植物（接ぎ木無施術の組換え体及び非組換え体）から、成熟した果実を順次収穫した。収穫した果実の食品成分分析の結果は図 2 に示す。五成分は、組換え体-非組換え体間、あるいは、組換え体-非組換

え体間の各接ぎ木体と組換え体、非組換え体の間に有意な違いはなかった（Tukey-HSD 検定、 $\alpha=0.05$ ）（図 2）。

D. 考察

材料としたマイクロトムは、接ぎ木も容易であることが確認された。また、非組換え体同士で接ぎ木を施術した個体は、接ぎ木施術直後は接ぎ木無施術の非組換え体と比べて、接ぎ木施術による成長への影響があったが、その後栽培を継続する過程で影響はほぼ見出されなくなった。さらに、果実の栄養分析にも差はなかった。

本研究で、モデルとした組換え体は、非組換え体と比較して果実の栄養成分に有意な差はない。組換え体/非組換え体間の接ぎ木体においても、非組換え体同士の接ぎ木体、接ぎ木無施術の非組換え体あるいは組換え体とも果実の栄養成分に有意な差はないことから、同種間の接ぎ木体と接ぎ木無施術の植物体間で新たな栄養成分の際は生じないことが確認された（図 2）。

E. 結論

組換え/非組換えマイクロトムを用いた、組換え/非組換え間の接ぎ木における影響を評価するためのモデル系を構築した。また、本実験系を用いて、トマト可食部である果実の食品栄養成分は、接ぎ木による影響を受けないことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

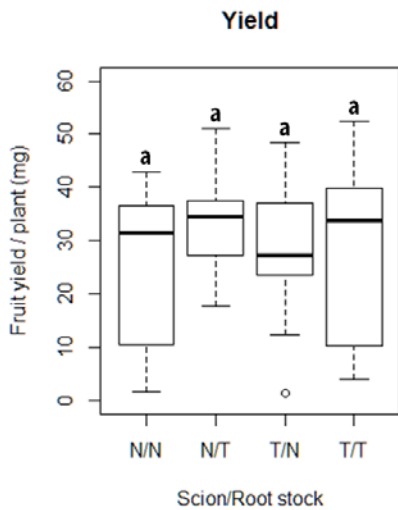


図1 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による果実収量の比較

N/N、N/T、T/N、T/T は、それぞれ非組換え体（一部は非組換え体同士の接ぎ木体）、穂木非組換え体/台木組換え体、穂木組換え体/台木非組換え体、組換え体の果実を示す。グラフ中の同ジアルファベットの付記は Tukey-HSD 検定により有意な違いが検出されなかったことを示す ($\alpha=0.05$)。

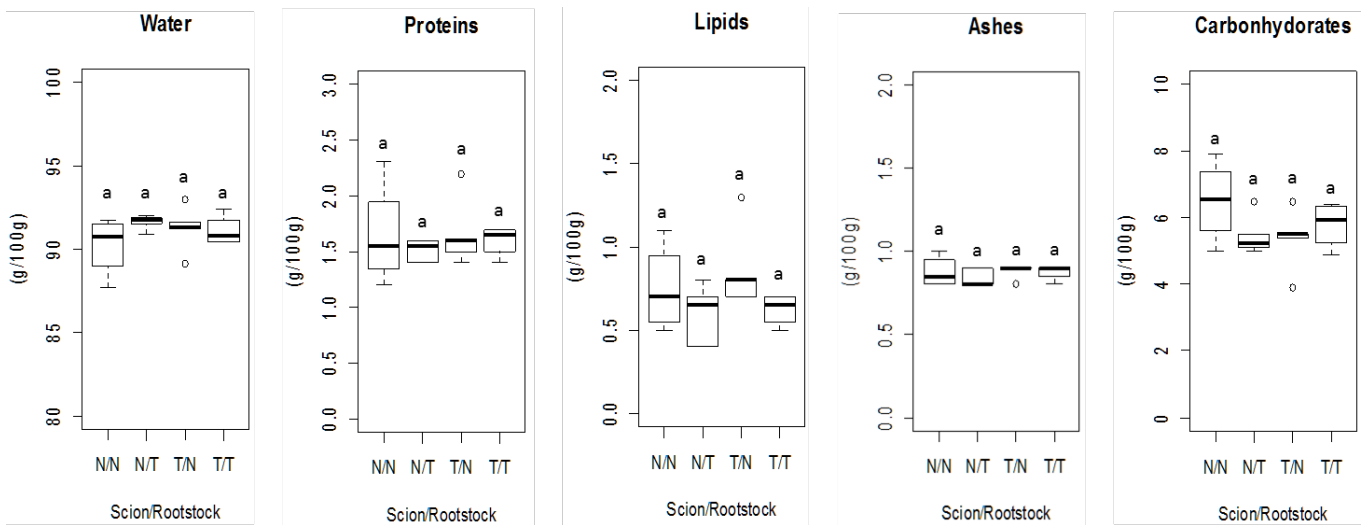


図2 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による食品成分の比較

N/N、N/T、T/N、T/T は、それぞれ非組換え体（一部は非組換え体同士の接ぎ木体）、穂木非組換え体/台木組換え体、穂木組換え体/台木非組換え体、組換え体の果実を示す。グラフ中の同ジアルファベットの付記は Tukey-HSD 検定により有意な違いが検出されなかったことを示す ($\alpha=0.05$)。

