

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

近年のゲノム編集技術の発展により、様々な生物種での遺伝子改変生物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遺伝子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、これまでで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ジャガイモを遺伝子改変作物のモデルとし、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。ジャガイモの有毒成分であるグリコアルカロイドを合成する酵素遺伝子 *SSR2* を欠損させたゲノム編集体と非ゲノム編集体での次世代シーケンサーを使用した RNA-seq によりトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、非ゲノム編集体とゲノム編集体で遺伝子の発現に差は見られなかった。

#### A. 研究目的

ゲノム編集技術と呼ばれる宿主生物の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の開発が進められており、様々な生物種において、遺伝子改変生物が作出されている。この技術は従来の遺伝子組み換え技術とは手法が異なることから、研究者が意図した目的の形質以外にどのような影響がその生物の代謝フローに出るのか経験に乏しい。しかし、外来遺伝子が組み込まれていなければ遺伝子組み換え生物にはあたらないため、近い将来に多くの遺伝子改変生物の食品およびその加工原料としての使用が考えられる。したがって、遺伝子改変生物に対する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急務とされている。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ため、遺伝子改変生物のオミクス解析を行い、評価系構築のための基礎データの集積を目的としている。

本研究ではゲノム編集技術による遺伝子改変作物のモデルとしてグリコアルカロイド合成酵素遺伝子である *Sterol side chain reductase 2 (SSR2)* を欠損させたジャガイモを解析対象として、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集積を目的に研究を行った。

#### B. 研究方法

理化学研究所の梅基先生より分与されたジャガイモ品種サッシーのゲノム編集体 (TG) と対照として非編集体 (NT) をそれぞれ 3 個体ずつ計 6 個体をサンプルとした。ゲノム編集体は *SSR2* 遺伝子を TALEN により欠損させたものを使用した (Sawai et al., 2014)。なお、使用したゲノム編集体は事前に *SSR2* 遺伝子が欠損していること、およびグリコアルカロイドの蓄積量が非編集体に比べて少ないことを確認してある。

塊茎の皮を厚めに剥いたものを 100 mg 程度使用し、RNA 抽出用前処理試薬 Fruit-Mate (タカラバイオ) と RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用して total RNA を抽出した。定量し各サンプルの total RNA 10 µg 程度をユーロフィンジェノミクス株式会社の mRNA-seq 解析に委託した。基本条件は HiSeq2500、HiSeq Control Software 2.2.58、RTA 1.18.64、bcl2fastq 1.8.4、HiSeq SBS Kit v4 を使用してシーケンスモード 2 × 125 bp のペアエンドリードとして行われた。納品されたデータ

はフィルタリングによりパラメータ  $q20p80$  を満たす 105 bp のペア配列のみを残した。精製した配列データはジャガイモゲノム解読の際のトランスクリプトームデータとして公開されており、PGSC\_DM\_v3.4\_transcript-update.fasta に Bowtie2 ver. 2.2.9 によりマッピングを行った。次に eXpress ver. 1.5.1 によりカウントデータとして FPKM 値を取得した。この発現量データを基にクラスター解析および散布図を作成した。また、それぞれの個体での遺伝子配列を確認するためアセンブリングを Trinity ver. 2.1.1 を使用して行った。

#### 倫理面への配慮

該当しない

### C. 研究結果

ジャガイモの塊茎からの total RNA 抽出では多糖類やポリフェノールを多く含むサンプルから RNA の抽出を行う際の前処理試薬として Fruit-Mate と RNA 抽出キット RNeasy Plant Mini Kit 使用することで、100 mg から 20  $\mu$ g 程度の純度の高い total RNA を得ることができた。

次世代シーケンサーによる委託解析から納品されたシーケンスデータはすでにある程度の質の高いデータのみによりフィルタリングされてあるものであったが、さらにトリミングとフィルタリングにより、納品データの 92.3% のデータをトランスクリプトーム解析に使用することとした。すでにネット上で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 (PGSC\_DM\_v3.4\_transcript-update.fasta) には構造遺伝子として 56,218 遺伝子が記されており、今回のシーケンスデータではそのうちの 45,576 遺伝子の配列を検出できた。これは全体の 81% 程度をカバーするものであった。各サンプルでのすべての遺伝子での発現量 (FPKM 値) に基づくクラスター解析では非ゲノム編集体 (NT) とゲノム編集体 (TG) で個別のクレードを形成することはなかった (Fig. 1)。また同様に各 NT と TG の 3 個体での遺伝子の発現量の平均値をプロットした散布図ではほとんどの遺伝子で発現量に大きな差は見られなかった。一部発現量が高く検出された遺伝子はプロテアーゼ阻害に関連するものであった (Fig. 2)。

ゲノム編集体のそれぞれの遺伝子配列をア

センブリングにより得たデータから *SSR2* 遺伝子の配列を確認したところ、すべて正常な配列であった。また、*SSR2* の遺伝子配列はトランスクリプトームデータには 3 種類 (PGSC0003DMT400054476-78) の配列が存在していたが NT と TG で有意な発現量の差は見られなかった。さらに、各 TG 個体には TAL エフェクターの 400-700 アミノ酸領域が導入されていることを確認した。

### D. 考察

ゲノム編集により遺伝子改変を行った作物のモデルとして、グリコアルカロイドの合成を抑制させる形質をもつジャガイモの塊茎におけるトランスクリプトーム解析を行った。

提供を受けたジャガイモサンプルはゲノム配列の解析から当該遺伝子である *SSR2* 遺伝子が欠損していること、およびグリコアルカロイドの蓄積量が非編集体と比較して大きく低下することが示されている (梅基先生より)。一方で、今回の RNA シーケンスデータでは *SSR2* 遺伝子の正常な配列のみがゲノム編集体 3 個体すべてから獲得され、その発現量は非編集体とは有意差が得られなかった。この結果より、今回のサンプルでは *SSR2* 欠損配列は転写されておらず、ごくわずかに存在する正常な配列が転写されていることが考えられた。これは、ゲノム編集により一部の遺伝子を欠損させた個体であってもわずかに正常な遺伝子も存在していることを示唆している。また、*SSR2* の発現量が非編集体と有意差がなかったのは、サンプリングを行った時期がそもそも非編集体でも *SSR2* 遺伝子の発現が低い状態であったためと考えられる。発現量が高い遺伝子には Protease inhibitor や Metallothionein などが確認され、これらは NT、TG の区別なくどちらの系統においても高い発現量を示していた。このことからこれらの遺伝子はサンプリングによるストレス誘導により発現が促進されたものと考えられた。これら以外には、クラスター解析や散布図からも有意に発現が変動した遺伝子は確認されなかった。

今後は *SSR2* 遺伝子の発現が活発になる時期での発現変動の比較など特定の条件下でのトランスクリプトーム解析も行う必要があると考えられる。

### E. 結論

ゲノム編集技術を使用した遺伝子改変作物のモデルとしてジャガイモの塊茎における遺伝子発現量を非編集体と比較した結果、当該遺伝子であるグリコアルカロイド合成酵素遺伝子の発現量に差異はなく、他の遺伝子においても発現量に変化は見られなかった。

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

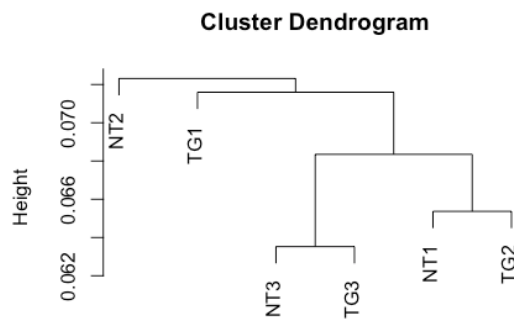


Fig. 1 クラスタ解析

NT: Non-transformant、TG: Transgenics

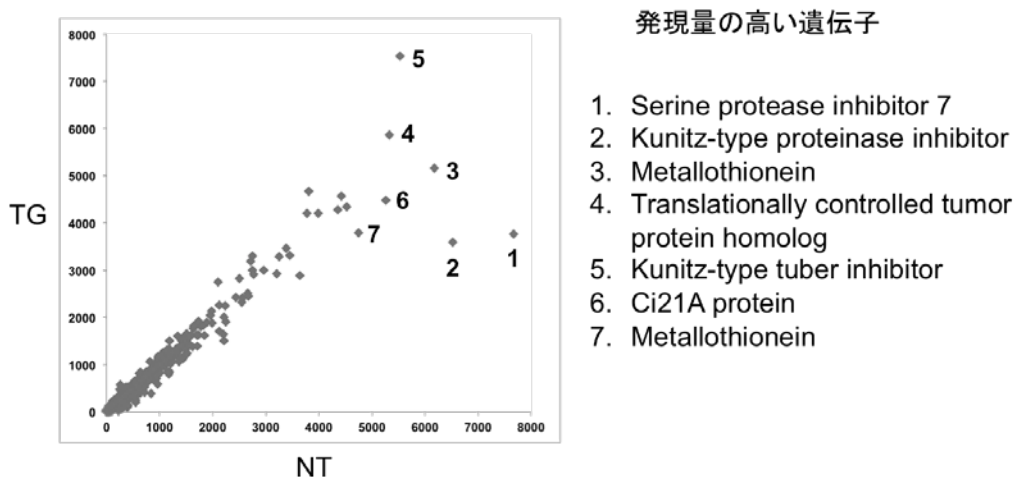


Fig.2 各系統3個体での FPKM 値の平均値をプロットした散布図