

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

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  
分担研究報告書(平成27-29年度)

(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、ゲノム編集技術の研究が盛んに進められている。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。本研究ではゲノム編集技術により作出された遺伝子改変ニワトリおよびジャガイモをモデルとし、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た。ニワトリではゲノム編集体の解析の前の基礎データの収集として雌雄、および外来遺伝子を導入した遺伝子組換え体での遺伝子発現量の比較を行った。ジャガイモでは実際にゲノム編集技術によりグリコアルカロイドを低減させた個体を使用してトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、ニワトリの雌雄では顕著な遺伝子発現の差は確認されず、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体では発現の変動はみられるものの、発現が変動する遺伝子に共通する代謝経路などは確認されなかった。ジャガイモでは、ゲノム編集体と非ゲノム編集体で発現の差は確認されなかった。

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

技術の発展により、現在、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、またさらには新しい技術としてゲノム編集技術による遺伝子組換えを伴わない遺伝子改変生物も開発され実用化されつつある。近年では、遺伝子組換えを伴わない遺伝子改変技術としてゲノム編集技術が急速に進展しており、ゲノム編集生物の評価系構築の必要性が高

まっている。今後、ゲノム編集生物由来の食品の安全性を評価する上で、ゲノム編集生物において意図しない遺伝子、およびタンパク質の発現による栄養成分の変化を調査するべく網羅的なオーム解析の必要がある。本研究事業では昨年度までにゲノム編集生物のモデルとして人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたアレルゲンノックアウトニワトリが作出されている。そこで本研究ではゲノム編集ニワトリのトランスクリプトーム解析を行う準備段階として、ゲノム編集ニワトリをモデルとしたトランスクリプトーム解析での評価のために必要な基礎データの収集を目的として、アレルゲンノックアウトニワトリ作出に使用し

たニワトリ品種の非遺伝子組換え体での雌雄およびヘテロ GFP 遺伝子組換え体でのトランスクリプトーム解析を行った。また、同様にゲノム編集体の代謝経路の網羅的な解析としてグリコアルカロイド合成酵素遺伝子をゲノム編集により欠損させた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。

## B. 研究方法

### B-1 実験材料

広島大学の堀内教授より分与していただいた、ニワトリ 1-2 ヶ月齢の非遺伝子組換え体の雄 3 個体、非遺伝子組換え体の雌 3 個体、雌のヘテロ GFP 遺伝子組換え体 3 個体の全部で 9 検体の白血球の total RNA をサンプルとした。

ジャガイモは理化学研究所の梅基先生より分与していただいたジャガイモ品種サッシーのゲノム編集体と非ゲノム編集体それぞれ 3 個体ずつをサンプルとした。

### B-2 RNA 抽出方法

ニワトリの血液は翼の静脈より採取し、EDTA-PBS バッファー pH 7.4 に混合した。採取した血液は Ficoll-Paque density gradient (Pharmacia Biotech) に積層し、740×g, 10 分間遠心分離を行った。表層の細胞を回収し、PBS バッファーで洗浄したものをニワトリの白血球細胞として使用した。白血球からの total RNA 抽出は RNeasy kit (QIAGEN) を使用して行った (広島大学、堀内教授)。

ジャガイモは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。

### B-3 ニワトリのマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

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 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。クラスターリングは (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非組換え体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。

### B-4 ジャガイモの次世代シーケンスによるトラ

## ンスクリプトーム解析

ジャガイモ各サンプルの 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いる 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。

## C. 研究結果

### C-1 非遺伝子組換えニワトリの雌雄のトランスクリプトーム解析

使用した Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 には 43,803 個のプロープが搭載されており、全てのサンプルにおいて全プロープの 8 割程度で十分な強度のシグナルが検出された。しかしながら、検出された十分なシグナル強度の全ての遺伝子群について、雌雄間での遺伝子の発現変動の有意水準を 1% ( $p < 0.01$ ) とした場合に、発現変動したと考えられる遺伝子の数が、FDR (false discovery rate: 偽陽性と判断される割合) から推定される偽陽性の遺伝子の数よりも少なかったため、今回、雌雄間で発現に変動がみられた遺伝

子については偽陽性の可能性が存在した。発現量に基づくクラスター解析においても雌雄が混在するクラスターが形成された (Fig. 1)。また、雄 3 個体での発現量の平均値と雌 3 個体での平均値を算出し、散布図にプロットしたところほとんどの遺伝子では雌雄間で 2 倍以上の発現変動はないことが分かった。念のため今回は雌雄間で遺伝子発現に差があると仮定して、発現に 2 倍以上の変動が確認された遺伝子のみを抽出し、さらに解析を進めた。雄で発現が 2 倍以上上昇していた遺伝子は 49 あり、Avidin、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの複数のプロープで発現の上昇が確認された (Table 1)。雌で発現が 2 倍以上上昇している遺伝子は 186 あり、性決定関連遺伝子、Histidin triad nucleotide binding protein W、Olfactory receptor などの複数のプロープで発現の上昇が確認された (Table 2)。今後の解析において内部標準となることが考えられる、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH は 2 遺伝子が検出されており、どちらも雌雄間で発現に変動は確認されなかった。また鶏卵アレルギーであるオボムコイド関連遺伝子は 1 遺伝子が検出されており、こちらも雌雄間で発現に変動は見られなかった。

### C-2 雌のニワトリの GFP ヘテロ導入体のトランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析には先の解析と同様に Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 を使用し、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。クラスター解析では非組換え体 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非組換え体 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. 2)。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、散布図を描画した結果、非遺伝子組換え体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。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、非組換え体で発現量が 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 3)。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。

### C-3 ゲノム編集ジャガイモのトランスクリプトーム解析

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、塊茎 100 mg から 20 µg 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) で系統別のクレードを形成することはなかった (Fig. 3)。また同様に各非ゲノム編集体とゲノム編集体の 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. 4)。

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して得られたデータから *SSR2* 遺伝子の配列を確認したところ、アミノ酸変異はみられるものの、すべてタンパク質として翻訳可能な配列であった (Fig. 5)。また、*SSR2* の遺伝子配列はトランスクリプトデータには 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、ゲノム編集体の 3 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 (Fig. 6)。

## D. 考察

### D-1. ニワトリのトランスクリプトーム解析

ゲノム編集技術により作出されたアレルゲノックアウトニワトリの評価系を構築するために、初年度は事前準備としてゲノム編集に使用するものと同品種の非遺伝子組換えニワトリにおける雌雄間でのトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、発現が検出された遺伝子のう

ち発現変動遺伝子として有意水準 1% を満たすものは存在せず、雌雄間ではほとんど遺伝子発現に差がないことが考えられた。今後は解析する個体数を増やすなどすることで発現に差がある遺伝子の絞り込みが可能になると考えられた。今回は雌雄間で遺伝子発現に差があると仮定した場合として、各雌雄の 3 個体で同様に発現に差がみられた遺伝子について着目して解析を行った。その結果、雄では主に卵白中に含まれる糖タンパク質である *Avidin* 遺伝子と、解糖系からクエン酸回路への反応を調整するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ遺伝子の上昇が見られた。雌では性決定関連遺伝子の発現に上昇に加え、ヒスチジン三連構造ヌクレオチドタンパク質、嗅覚受容体遺伝子 (Olfactory receptor) の発現上昇、また、2 倍程度の発現量の差ではあるが、卵アレルギーの原因物質であるオボアルブミン関連遺伝子においても上昇が見られた。また、内部標準であるハウスキーピング遺伝子として報告されている *GAPDH* 遺伝子については性差で変動がないことも確認できた。

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、遺伝子組換えニワトリと非組換えのニワトリでのトランスクリプトーム解析を行った。こちらの結果では、一部の遺伝子については発現に変動が認められるものの共通した代謝経路に関与するようなクラスター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ニワトリの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あまり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た。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非組換え体、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、クラスター解析においては非組換え体のクレードと組換え体のクレード

が分離されることも確認した。このため、非遺伝子組換え体と組換え体では遺伝子の発現に変動は確認されるものの、影響を受ける代謝経路などの特定には至らなかったことから、今回発現が変動していた遺伝子は *GFP* が導入されたことによる特異的な影響であるのか、または、遺伝子組換え方法による影響なのか、変動の原因は不明であった。

今後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、これまでの解析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、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。

## D-2. ジャガイモのトランスクリプトーム解析

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ゲノム編集体と比較して大きく低下することが示されている (理化学研究所、梅基先生)。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である 3 個体すべてから獲得され、その遺伝子の発現量は非ゲノム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、これらは非ゲノム編集体、ゲノム編集体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た。

#### E. 結論

ニワトリの雌雄の違いによる遺伝子の発現には顕著な違いはみられなかった。また雌における非遺伝子組換え体とヘテロ *GFP* 遺伝子組換え体での遺伝子の発現には、いくつかの遺伝子について発現に変動はみられるものの、変動した遺伝子に共通した代謝経路や免疫系などはなく、全体として大きな違いはみられなかった。また、ジャガイモにおけるグリコアルカロイド合成酵素遺伝子のゲノム編集による欠損体と非ゲノム編集体での遺伝子の発現に差はみられなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

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

| Feature Num. | Description                                 | Log2 Ratio  |
|--------------|---|-------------|
| 25808        | Avidin                                      | 2.31 ± 0.67 |
| 32598        | Avidin                                      | 2.50 ± 0.74 |
| 33888        | Avidin                                      | 2.47 ± 0.73 |
| 43390        | Avidin-like                                 | 2.47 ± 0.75 |
| 17089        | Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4     | 2.11 ± 0.72 |
| 32037        | Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4     | 4.11 ± 1.09 |
| 34000        | Histidin triad nucleotide binding protein W | 1.29 ± 0.16 |

Table 1 ニワトリの雄で発現が2倍以上上昇した遺伝子のリスト

| Feature Num. | Description                                 | Log2 Ratio   |
|--------------|---|--------------|
| 383          | Female associated factor FAF                | 7.49 ± 0.35  |
| 13194        | Female associated factor FAF                | 8.39 ± 0.44  |
| 32897        | Male hypermethylated (MHM) region           | 2.40 ± 0.35  |
| 34668        | Female expressed transcript 1 (FET1)        | 3.49 ± 0.41  |
| 18906        | Histidin triad nucleotide binding protein W | 10.43 ± 9.29 |
| 21580        | Histidin triad nucleotide binding protein W | 11.24 ± 0.14 |
| 24495        | Histidin triad nucleotide binding protein W | 2.71 ± 0.27  |
| 26546        | Histidin triad nucleotide binding protein W | 9.34 ± 0.25  |
| 98           | Olfactory receptor 14J1-ike                 | 2.05 ± 0.24  |
| 5437         | Olfactory receptor Olf1709                  | 3.92 ± 1.87  |
| 10043        | Olfactory receptor Olf1459                  | 3.19 ± 0.45  |
| 25605        | Fibroblast growth factor 1                  | 1.95 ± 0.21  |
| 8144         | Ovalbmin related protein Y                  | 1.18 ± 0.10  |

Table 2 ニワトリの雌で発現が2倍以上上昇した遺伝子のリスト

| 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 3 ニワトリの遺伝子組換え体における発現変動遺伝子のリスト

WT: 非遺伝子組換え体、TF: 遺伝子組換え体

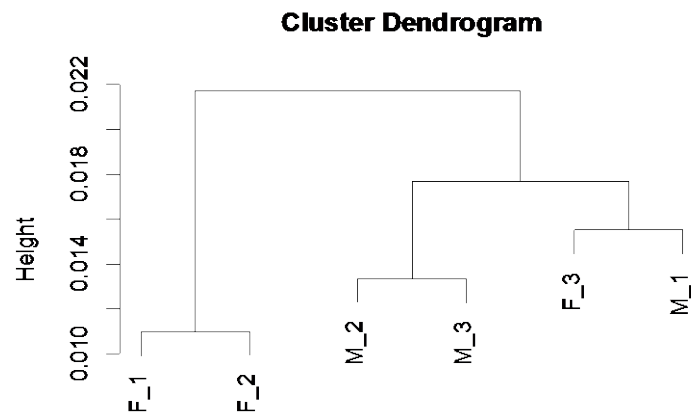


Fig. 1 ニワトリの雌雄間におけるクラスター解析  
F: 雌、M: 雄

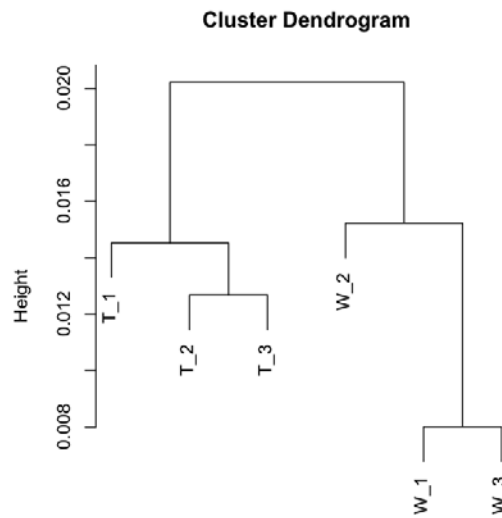


Fig. 2 ニワトリの遺伝子組換え体と非組換え体のクラスター解析  
data.dist  
hclust (\*, "average")  
T: 遺伝子組換え体、W: 非遺伝子組換え体



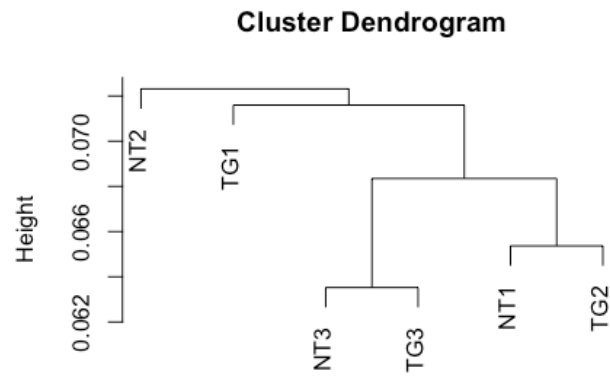


Fig. 3 ジャガイモにおけるゲノム編集個体と非遺伝子組換え体のクラスター解析  
 NT: 非遺伝子組換え体、TG: ゲノム編集個体

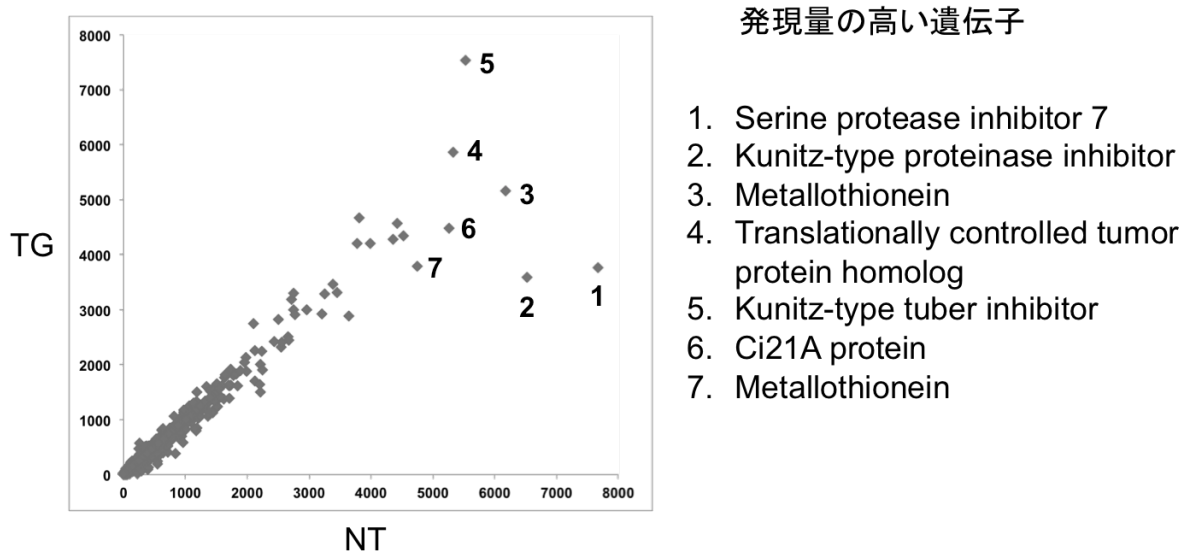


Fig. 4 ジャガイモにおけるゲノム編集個体と非組換え体での遺伝子発現量の散布図  
 NT: 非遺伝子組換え体、TG: ゲノム編集個体

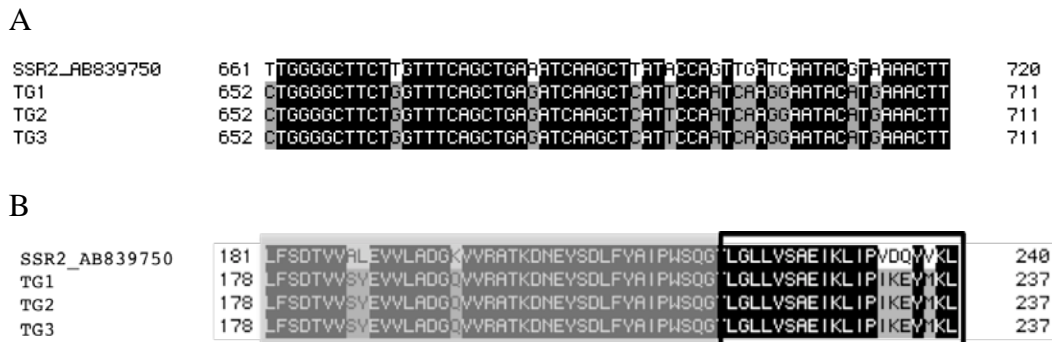


Fig. 5 各ゲノム編集個体における SSR2 編集部位のアライメント結果  
 TG1-3: ゲノム編集個体各ライン。A: ゲノム配列のアライメント結果、B: アミノ酸配列のアライメント結果。ゲノム編集箇所は黒枠の部分。

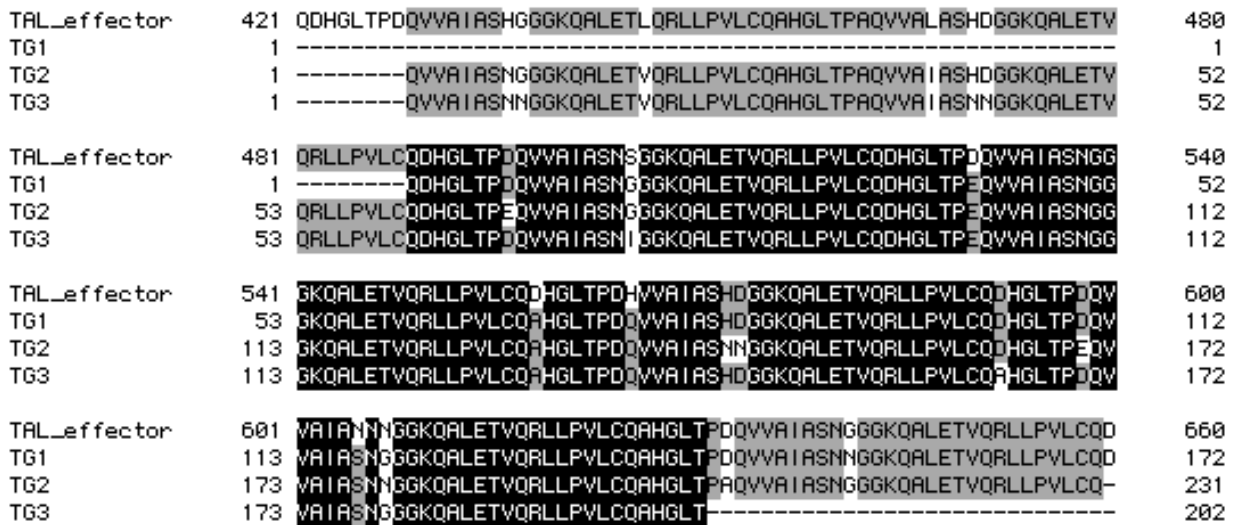


Fig. 6 各ゲノム編集個体から得られた TAL エフェクターの配列のアライメント結果  
 TG1-3: ゲノム編集個体各ライン