

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  
総合研究報告書（平成 27～29 年度：分担）

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析

研究分担者 太田大策（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・教授）

### 研究要旨

本研究は、メタボロミクスによって、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術によって生物機能が改変された家畜や農作物の代謝プロファイル解析を実施し、安全性評価のための基礎データを取得・公開することを目的としている。平成 27 年度および平成 28 年度は、モデル実験として遺伝子組換え技術を用いて外来タンパク質（緑色蛍光タンパク質）を発現させたニワトリ遺伝子組換え体の評価を実施した。まず平成 27 年度は、雄個体および雌個体から採取した血漿中代謝物質の比較解析を実施し、遺伝子組換え体の評価のための基礎データを取得した。続いて平成 28 年度は、遺伝子組換え体と母本品種の代謝プロファイル比較解析を実施し、血漿中代謝産物の蓄積状況に大きな差異は認められないことを確認した。平成 29 年度は、ゲノム編集技術の一種である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法によってステロール側鎖還元酵素 (sterol side chain reductase 2; SSR2) の遺伝子破壊を導入したジャガイモおよび母本品種の代謝プロファイル比較解析を実施し、両者間での代謝物蓄積傾向の類似点と相違点を評価した。

### A. 研究目的

食品安全は利用可能な科学技術の進歩に合わせて時代とともに変化が求められる分野である。バイオテクノロジーによる生物機能の改変技術は急激な進歩を続けており、現在では、動物、植物、微生物といったあらゆる生物の遺伝子機能を多面的に改変することが可能となりつつある。特に、ゲノム編集による生物機能改変が農作物や家畜などにも適用され、急速に実用化されつつある。一方で、人為的に遺伝子機能を改変した生物を食用に利用する際には、安全性に関わる品質管理や、生産段階での環境保全、社会受容の問題など、依然として多くの課題が残されている。生体成分の総体を解析対象とするオミクス解析は、遺伝子改変体を食用利用する上で懸念される生体成分の含量変化を調査するための強力なアプローチである。世界的にも、オミクス解析は食用利用を想定して開発された遺伝子改変体の安全性評価の第一歩として位置づけられており、各種

の遺伝子改変体を対象とした実証データの蓄積が求められている。本研究は、メタボロミクスによって、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術によって生物機能が改変された家畜や農作物の代謝プロファイル解析を実施し、安全性評価のための基礎データを取得・公開することを目的としている。

## B. 研究方法

### (1) メタボローム解析プラットフォームの整備

高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS), ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用い、生体組織由来の全成分を解析対象とするノンターゲットメタボローム解析のための実験プラットフォームを整備した。使用機器は、UHPLC-MS (Shimadzu LC-MS-8040), GC-TOF/MS (Waters GCT Premier MS), 極性脂質プロファイリングと極性化合物の分析は、LC-LIT-TOF/MS を用いた (Ion Trap TOF/MS; HITACHI NanoFrontier)。GC-TOF/MS トータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムからの全イオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには MetAlign<sup>1)</sup> (<https://www.wur.nl/en/show/MetAlign-1.htm>) を、ピークデコンボリューションとピーク自動同定には AIoutput<sup>2)</sup> ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/AIoutput/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/AIoutput/index.html)) を使用した。AIoutput によるピーク自動同定のためのマススペクトルライブラリは、標準品の実測データを格納したインハウスのマススペクトルライブラリを用いた。主成分分析および Student's t-test は、MetaboAnalyst 3.0 および 3.5<sup>3)</sup> (<http://www.Metaboanalyst.ca/>) を用いて行った。Student's t-test は、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。LC-MS で取得したデータ処理には Nano Frontier Data processing を用い、独自に整備した代謝物質データベース (標準化合物のカラム保持時間, 検出イオン種,  $m/z$  値のデータ, 開裂情報) を基にして同定・定量のプラットフォームとした。また, 本 LC-LIT-TOF/MS システムには, 質量分析装置に PDA 検出器 (photo diode array detector) を前置し, 抽出液中の化合物は LC 分離後に吸収スペクトルを計測することを可能にした。極性脂質プロファイリングでは, 極性脂質の開裂フラグメント情報に対する注釈付けのために LipidBlast ライブラリ<sup>4)</sup> (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast>) を用いた。LipidBlast ライブラリはインシリコで予測された脂質分子の開裂フラグメント情報のデータベースであり, 極性脂質を中心として約 12 万の脂質分子の開裂フラグメント情報が格納されている。

### (2) 供試試料

a) ニワトリ雌個体および雄個体の血漿試料

ニワトリ横斑プリマスロック種の雌個体および雄個体由来の血漿試料を供試した(広島大学大学院生物圏科学研究科の堀内浩幸教授から提供)。実験デザインは、雌個体と雄個体の2群間での比較とした。雌の3個体(個体番号 #111, #112, および #118), ならびに雄の3個体(個体番号 #113, #115, および #117)を用いた。各個体の月齢は一ヶ月齢に統一した。採血は、雄3個体(#115, #117, #113), 雌3個体(#111, #112, #118)の順に行った。採血反復回数は1回とした。血液の抗凝固剤は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)リン酸緩衝溶液を使用した。まず、注射器に抗凝固剤0.3 mLを加え、その注射器を使って、翼下静脈から2.7 mLの血液を採取した(EDTA 終濃度 7.7 mM)。血液試料を穏やかな条件で遠心分離することで上清(血漿)と沈殿(血球)に分離させ、上清1.5 mLを新しい2 mL容のサンプリングチューブに移し、これを血漿試料とした。

b) ニワトリ遺伝子組換え体の血漿試料

緑色蛍光タンパク質遺伝子をニワトリ横斑プリマスロック種に導入した遺伝子組換え体および対照個体(非遺伝子組換え体)由来の血漿試料を供試した(広島大学大学院生物圏科学研究科の堀内浩幸教授から提供)。実験デザインは、遺伝子組換え体由来の血漿試料と対照個体由来の血漿試料の2群間での比較とした。各個体の性別は雌、月齢は一ヶ月齢に統一した。遺伝子組換え体の4個体(個体番号: T45, T53, T54, および T75), ならびに対照の4個体(個体番号: W43, W51, W55, および W76)を用いた。採血前の1日間は絶食させた。採血および血漿調整の操作手順は平成27年度の実施内容に従った。

c) ジャガイモゲノム編集個体の塊茎試料

TALEN法によるゲノム編集でステロール側鎖還元酵素をコードするSSR2遺伝子を破壊したジャガイモゲノム編集個体および対照個体(非ゲノム編集個体)由来の塊茎試料を供試した(理化学研究所環境資源科学研究センターの梅基直行博士から提供)。実験デザインは、ゲノム編集試料(GE)と対照試料(Cont)の2群間での比較とした。GE群は、栽培品種サッシーをpYS026\_SSR2-TALEN-Cで形質転換した系統(#71)の独立3個体とした(GE-1, GE-2, および GE-3)。Cont群は、栽培品種サッシーの独立3個体とした(Cont-1, Cont-2, および Cont-3)。各個体から成熟した塊茎を採取し、2-3 mmの厚さで剥皮し、皮の部分を回収して速やかに液体窒素中で急速凍結させた。凍結試料をドライアイスで冷凍保存し、理化学研究所から大阪府立大学へと輸送した。試

料を凍結乾燥させ、液体窒素で十分に冷却した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素で冷却しながら磨砕した。磨砕した凍結乾燥試料は超低温フリーザー (-80°C) で保存した。

### (3) GC-MS によるメタボローム比較解析

#### a) ニワトリ雌雄個体間でのメタボローム比較解析

血漿試料に含まれるタンパク質を除去するために、まず、タンパク質変性沈殿法による除タンパク質操作を行った。その試料に対して、さらに、限外濾過法による除タンパク質操作を行い、限外濾過の有無が解析結果に与える影響を検討した。まず、タンパク質変性沈殿法による除タンパク操作を行った。新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに 1.8 mL のメタノール/超純水混合液 (55/45, v/v) を加え、-40°C に設定したフリーザー内で十分に冷却した。ここに血漿試料 0.2 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、-40°C に設定したフリーザー内で 30 分間静置した。その後、4°C, 14,000 ×g, 3 分間遠心し、上清を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに回収した。回収した上清を 2 本の新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに 850 μL ずつ分注し、その内の 1 本には、限外濾過による除タンパク操作を施した。限外濾過にはアミコンウルトラ遠心式フィルター (分画分子量 10,000) を用いた。遠心後の濾液を回収し、冷却遠心濃縮器にかけて乾固させた。限外濾過操作を行わなかった残りの一方は、そのまま冷却遠心濃縮器にかけて乾固させた。除タンパク操作後の血漿試料は乾固させ、-80°C フリーザー内で保存した。

乾固試料に対して 2.0 mL のメタノール/クロロホルム/2% 酢酸混合液 (5/2/1, v/v/v) を加え、ボルテックスミキサーで混合し再溶解させた。メタノール/クロロホルム/2% 酢酸の混合液には、内部標準物質として、テストステロン (20 μg/ml) とリビトール (5 μg/mL) を予め加えた。血漿溶液 800 μL を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに移した。分画操作、誘導体化の操作は、Furuhashi et al. (2015) の方法<sup>5)</sup>に従った。本方法では、試料中のエステル化脂肪酸と非エステル化脂肪酸を区別して検出可能である。グリセロ脂質などを構成するエステル化脂肪酸は脂肪酸メチルエステル誘導体として、非エステル化脂肪酸はトリメチルシリル誘導体として検出される。分析前処理の反復回数は 2 回とした。

分析用試料をガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析装置 (GC-TOF/MS) に注入し、GC 部では試料中化合物の分離を行い、MS 部では分離した化合物のイオン化と質量情報の取得を行なった。GC の試料注入口の温度は 230°C (cold trap splitless mode) に設定した。GC カラムは HP-5ms キャピラリーカラム (長さ 30 m × 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm) を使用した。GC キャリアガスはヘリウムを用いた (流量 1.0 mL/min)。GC オ

オーブンの昇温条件は、70°C (1 min) , 1°C/min, 76°C (0 min) , 6°C/min, 350°C (1 min) とした。トランスファーラインの温度は 250°C, イオン源の温度は 250°C とした。イオン化は electron-ionization モード (70 eV) で行った。検出器の電圧は 2850 V とした。スキャン範囲は  $m/z$  40-650 とした。試料注入量は 1  $\mu$ L とした。

GC-TOF/MS を用いて取得したトータルイオンカレントクロマトグラムからのイオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには MetAlign<sup>1)</sup> を、ピークデコンボリューションとピーク同定には AIoutput<sup>2)</sup> を使用した。ピーク同定には、標準品の実測データを格納したインハウスのマススペクトルライブラリを用いた。血漿を超純水に置き換えたブランク試料から検出されたピークは解析から除外した。

血漿試料の除タンパク質操作法を検討した。まず、限外濾過法による除タンパク質処理の有無が分析データの品質に及ぼす影響を調べた (図 1)。極性画分の TIC クロマトグラムを試験区間で比較したところ、限外濾過した試験区において、グリセロールや多数の未同定ピークが検出された。限外濾過フィルターに塗布されていたグリセロールが試料に混入したと考えられた。これらの多数の未同定ピークの由来は不明であった。非極性画分の TIC クロマトグラム比較では、タンパク質変性沈殿法のみ (限外濾過法なし) の試験区では、多数の生体成分由来のピークが検出されたのに対して、タンパク質変性沈殿法と限外濾過法を組み合わせた試験区では、これらの生体成分由来ピークがほとんど検出されなかった。一方、多数の未同定ピークがほぼ等間隔で検出された (図 1)。これらの未同定ピークは、限外濾過フィルターあるいは濾液回収用のチューブ由来の可塑剤である可能性が考えられた。そこで、以降の実験はタンパク質変性沈殿法による除タンパク質処理を行った試料を用いて進めた。リン酸, グルコース, コレステロールについては、検出シグナル強度が飽和していたため、今回の解析からは除外した。また、抗凝固剤として添加した EDTA は解析から除外した。個体番号 #115 の 1 回目の反復実験操作に由来する誘導体化試料の測定データ (#115-1) は、内部標準物質由来ピークの検出シグナル強度が著しく低かったため、解析から除外した。

主成分分析および Student's t-test は、MetaboAnalyst<sup>3)</sup> (ver. 3.0) を用いて行った。主成分分析のデータ標準化方法は auto scaling を選択した。Student's t-test は、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。

#### b) ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

血漿試料からの除タンパク質は、タンパク質変性沈殿法を用いた。溶媒抽出, 分画, 誘導体化, 誘導体化試料の計測, ピーク処理, ピーク同定, および統計解析の手順は平成 27 年度の実施内容に従った。

c) ジャガイモゲノム編集個体および非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

凍結乾燥試料からの低分子化合物の抽出は Shepherd et al. (2007) の方法<sup>6)</sup> に準じて行なった。抽出の試行回数は 1 試料につき 3 回とした。磨砕試料 50 mg を硬質ガラス製のねじ口試験管に移し、メタノール (1.5 mL) を加え、蓋をしてボルテックスミキサーを用いて内容物を混合した後、30°C で 30 分間保温しながら震盪抽出した。そこに超純水 (375 µL) とクロロホルム (3 mL) を加え、同様にして震盪抽出した。さらに超純水 (750 µL) を加え、蓋をして試験管の内容物を激しく振り混ぜ、室温で 10 分間遠心し (3000 rpm; RT3S3 スイングローターを使用), 2 層に分離した。上層 (2 mL) をガラス製パスツールピペットでポリプロピレン製のセーフロック付きチューブ (エッペンドルフ社製) に移し、これを極性画分とした。下層 (3 mL) を同様にして別のチューブに移し、これを非極性画分とした。非極性画分に含まれる不飽和脂肪酸の酸化を防ぐため、抗酸化剤ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) を加えた。非極性画分全量を遠心濃縮機で乾固させた後、そこに BHT を含有するヘキサン (100 mg/L) 1 mL を加え、再溶解させた。極性画分および BHT を含む非極性画分は低温フリーザー (-30°C) で保存した。

各画分に含まれる低分子化合物の誘導体化は Shepherd et al. (2007) の方法<sup>6)</sup> に準じて行なった。非極性画分に含まれる化合物の誘導体化は次のように進めた。BHT を含む非極性画分全量を遠心濃縮機で乾固させ、そこに 1% (v/v) 硫酸メタノール溶液 1 mL を加え、攪拌しながら (1,000 rpm), 50°C で 16 時間反応させ、脂肪酸をメチルエステル体に誘導体化した。別の試験管に反応液全量を移し、そこに 5% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液 2.5 mL とクロロホルム 1.5 mL を加え、蓋をして試験管の内容物を激しく振り混ぜ、静置して 2 層に分離した。下層 (1.5 mL) をガラス製パスツールピペットで別の試験管に移し、そこに 2% (w/v) 炭酸水素カリウム水溶液 1.5 mL を加え、蓋をして試験管の内容物を激しく振り混ぜ、静置して 2 層に分離した。下層 (1.5 mL) を同様にして新しいチューブに移し、遠心濃縮機で乾固させた。乾固試料にクロロホルム 50 µL とピリジン 10 µL を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌することで再溶解させた。続いて、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) 80 µL を加え、トリメチルシリル化を行った。反応液を室温で 3 分間遠心し (14,000 rpm), 上清をポリテトラフルオロエチレン製のメンブレンフィルターで濾過し、回収した濾液を分析用試料とした。極性画分に含まれる化合物の誘導体化は次のように進めた。極性画分 50 µL をチューブに移し、遠心濃縮機で乾固させ、そこにピリジンに溶解させたメトキシアミン塩酸塩 (20 mg/mL) 80 µL を加え、攪拌しながら (1,000 rpm), 50°C

で 4 時間反応させオキシム化を行なった。続いて、非極性画分と同様にしてトリメチルシリル化および反応液を濾過し、回収した濾液を分析用試料とした。

GC-TOF/MS による計測、ピーク処理、ピーク同定、および統計解析は基本的には平成 27 および 28 年度の実施内容を踏襲した。さらに、Shepherd et al. (2007) に記載されている化合物の保持指標と主要イオンピーク情報<sup>6)</sup> を基にしてピーク自動同定結果のキュレーションを行なった。

主成分分析および Student's t-test は、MetaboAnalyst<sup>5)</sup> (ver. 3.5) を用いて行った。主成分分析のデータ標準化方法は auto scaling を選択した。Student's t-test は、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。GE と Cont の群間で、個々のピークについて、主要イオンの相対ピーク強度値の平均値の差の有無を検定した。検定の多重性に起因する問題を考慮して、Benjamini-Hochberg 法<sup>7)</sup> により有意差が認められたピーク群の偽陽性率 (False Discovery Rate; FDR) を推定した。

#### (4) 質量分析関連データの一般公開

質量分析データおよび関連する実験メタデータをメタボロミクスデータリポジトリ MetaboLights<sup>8)</sup> (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/>) に登録し、データ再利用および解析結果の再検証が可能な形式で一般公開する。

### C. 結果

#### (1) ニワトリの雌雄個体間でのメタボローム比較解析

ニワトリの雌雄個体由来の血漿試料から再現性よく検出されたピーク数は、極性画分では 43 個 (表 1)、非極性画分では 54 個 (表 2) であった。このうち 70 個のピークを同定することができた。同定できたピークには、アミノ酸、有機酸、脂肪酸、糖をはじめとして、飼料に由来すると考えられる植物ステロールなど、多様な分類クラスに属する代謝物質が含まれていた。同定できなかった 27 個のピークは、それぞれを区別するために通し番号を付与した。

極性画分および非極性画分から検出された 97 個のピークのピーク面積値から相対蓄積量を算出し、多変量解析手法の一種である主成分分析を行った (図 2)。第一主成分から第四主成分までの累積寄与率は 79.5% であった。第一主成分 (寄与率 36.3%) では、#118 の個体は他 5 個体と明確に区別された。この理由としては、#118 の個体の代謝状態に何らかの異常があった可能性や、採血後の経過時間が影響した可能性 (#118 は 6 番目に採血した) などが考えられた。また、第一主成分スコアと第二主成分スコアの二次元プロット図 (図 2A) において、雌雄グループ間でのクラスター分離

の傾向が認められた。第三主成分（寄与率 14.5%）では、#115 の個体が他 5 個体と明確に区別された。第四主成分（寄与率 9.8%）では、#113 の個体と #117 の個体が明確に区別された。

次に、極性画分および非極性画分から検出された 97 個のピークについて、各グループ間での検出シグナル強度差の有無を t 検定により評価した。雌雄グループ間での検出シグナル強度差が有意なピークが 16 個あった。雄グループでは、脂肪酸 (20:4 FAME 誘導体, 20:0 脂肪酸 TMS 誘導体, 22:6 FAME 誘導体) や、有機酸 (succinate, malate, isocitrate, pentanedioic acid), アミノ酸 (proline), 糖 (glucitol, myo-inositol) を含む 14 個のピークの検出シグナル強度が雌グループと比較して高かった (図 3A)。雌グループでは、4 個のピーク (hydroxylamine, 16:1 FAME 誘導体, serine, 5-oxoproline) の検出シグナル強度が雄グループと比較して高かった (図 3B)。これら 16 種類のピークの中で、雌雄間で 2 倍以上の検出シグナル強度差があった代謝物質は、glucitol のみであり、その差は 2.1 倍であった。

## (2) ニワトリ遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

取得した GC-MS TIC クロマトグラムを遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体のグループ間で比較したところ、極性画分 (図 4)、非極性画分 (図 5) とともに主要なピークについて顕著な差異は認められなかった。MetAlign を用いて質量分析データを解析し、極性画分からは 8167 種類、非極性画分からは 3006 種類のイオンピークを抽出した。続いて、Aloutput を用いてこれらのイオンピークをデコンボリュートした。極性画分と非極性画分由来のイオンピークは、それぞれ、121 種類と 106 種類に統合された (代謝物質候補ピーク)。各代謝物質候補ピークのマススペクトルおよびカラム保持指標と、インハウスのマススペクトルライブラリに格納されている標準品の実測データ (マススペクトルおよびカラム保持指標) との類似性を基にして代謝物質由来ピークを特定した。内部標準物質として抽出溶媒に加えたリビトール、テストステロン、および、血液の抗凝固剤として使用した EDTA を代謝物質候補ピークのリストから除き、残りを代謝物質ピークとした。代謝物質ピーク数は、極性画分では 118 種類、非極性画分では 104 種類であった。これらのうち、極性画分では 77 種類 (表 3)、非極性画分では 48 種類 (表 4) の代謝物質を同定できた。各代謝物質ピークのピーク面積値を同一の TIC クロマトグラム中の内部標準物質 (リビトールあるいはテストステロン) のピーク面積値で割り、相対面積値を算出した。

多変量データが持つ特徴を要約するために、主成分分析を行った。主成分分析は、表 3 と表 4 に示した同定ピークに対して実施した。分析前処理の 2 回の反復操作に由来



する 2 種類の測定データは、平均化せずにそのまま用いた。第一主成分(寄与率 34.4%)と第二主成分(寄与率 11.7%)の主成分スコアの二次元プロットからは、群間での明確なクラスター分離は認められなかった(図 6)。

各代謝物質ピークの群間でのレベル差の有無を検定したところ、全ての代謝物質ピークにおいて 2 倍以上の有意差( $p < 0.05$ )は認められなかった。なお、非極性画分から検出された代謝物質ピークのうち 1 種類(ピーク番号 N102, 未同定ピーク)については、レベル差が 2 倍以下(ratio = 0.74, 遺伝子組換え体/非遺伝子組換え体)の有意差が認められた(表 5)。

### (3) ジャガイモゲノム編集個体と非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

非極性画分では 92 個の代謝物質候補ピークを得た。このうち 27 個は代謝物質として同定することができた。残り 65 個のうち 16 個には注釈情報を付記することができた。極性画分では 126 個の代謝物質候補ピークを得た。このうち 31 個は代謝物質として同定することができた。残り 95 個のうち 45 個には注釈情報を付記することができた。

非極性画分の 92 個のピークについて、主要イオンの相対ピーク強度値を変数にして主成分分析を実施した(図 7A)。第一主成分(寄与率 29.4%)と第二主成分(寄与率 25.1%)の主成分スコアを基にして二次元プロット図を作成した。第一主成分軸に沿ってゲノム編集(GE)試料の 1 個体(GE-2)は他の 5 個体とクラスター分離の傾向が認められた。第二主成分軸に沿って、GE 群と Cont 群の間でクラスター分離の傾向が認められた。極性画分の 126 個のピークについて、同様にして主成分分析を実施した(図 7B)。第一主成分(寄与率 24.0%)と第二主成分(寄与率 18.9%)の主成分スコアを基にして二次元プロット図を作成した。第二主成分軸に沿って、GE 群と Cont 群の間でのクラスター分離の傾向が認められた。特に、GE 群の 2 個体(GE1, GE-3)が他の 4 個体と明確に区別された。

非極性画分では、7 個のピークにおいて群間での有意差が認められた(表 6)。7 個目のピークの  $q$  値より、これらのうち偽陽性の割合は 31.4% (2.2 個)と見積もられた。これら 7 個のピークのうち、ピーク強度比が群間で 2 倍以上のピークは 3 個あった。これらのうち、GE 群で高いレベルであったのは、カンペステロール( $p = 0.0003$ , GE/Cont = 10.1)のみであった。一方、GE 群で低いレベルであったのは、コレステロール( $p = 0.0006$ , Cont/GE = 4.1)、およびソラニジン( $p = 0.0016$ , Cont/GE = 52.3)であった。なお、 $q$  値より、これら 3 個のピークのうち偽陽性の割合は 5% (0.15 個)と見積もられた。非極性画分の誘導体化試料の TIC クロマトグラムを群間で比較したとこ

ろ、これら 3 個のピークについて、明確なレベル差を確認できた (図 8)。ピーク強度比が群間で 2 倍未満の 4 個のピーク (N079, N085, N086, N087) は、いずれも GE 群で低いレベルであった (Cont/GE = 1.4–1.5)。

一方、極性画分では、16 個のピークにおいて群間での有意差が認められた (表 7)。16 個目のピークの q 値より、これらのうち偽陽性の割合は 35.8% (5.7 個) と見積もられた。これら 16 個のピークのうち、ピーク強度比が群間で 2 倍以上のピークは 4 個あり (イソロイシン, フェニルアラニン, トリプトファン, およびチロシン様化合物 1), いずれも Cont 群で低いレベルであった (Cont/GE = 0.37–0.50)。ピーク強度比が群間で 2 倍未満であった 12 個のピークのうち 10 個 (P056, グリシン, ロイシン, P036, P026, P055, バリン, P060, コハク酸様化合物 1, P059) は Cont 群で低いレベルであった (Cont/GE = 0.55–0.83)。残りの 2 個 (1-ケストース様化合物 1, キナ酸) は GE 群で低いレベルであった (Cont/GE = 1.4–1.9)。

#### D. 考察

##### (1) ニワトリの雌雄個体間でのメタボローム比較解析

一ヶ月齢のニワトリ個体由来の血漿中代謝物質レベルは、性別による差が比較的小さいと考えられた。また、性別による差と比較して、同性内の独立 3 個体の間での違いが比較的大きいことが明らかとなった。すなわち、遺伝子組換え体における代謝動態変化を評価する際に、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体のそれぞれについて、独立した複数個体を確保することで、再現性よく信頼性の高い分析結果が得られることが分かった。

##### (2) ニワトリ遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の一ヶ月齢の雌個体由来の血漿試料を用いて、含有代謝物質レベルの網羅的比較解析を行った。主成分分析では両グループを明確に区別するようなクラスター分離は見られず、また、グループ間で 2 倍以上の有意差を示す代謝物質ピークは認められなかった。これらの結果から、緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入する遺伝子組換え操作が一ヶ月齢の雌個体の血漿中の代謝物質含有量に与える影響は限定的であることが分かった。

##### (3) ジャガイモゲノム編集個体と非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

ゲノム編集技術の一種である TALEN 法の適用によりステロール側鎖還元酵素遺伝子 (SSR2) に変異を導入し有毒グリコアルカロイド含量を低減させた GE ジャガイモ

の評価を実施した。GE ジャガイモ試料では、3 種類の代謝物質（カンペステロール、コレステロール、およびソラニジン）において対照試料との差別的な蓄積が見られた。

GE ジャガイモにおけるコレステロールとソラニジンの減少については、ともに遺伝子操作と蓄積量減少との因果関係を代謝生化学の視点から説明できる。コレステロールとソラニジンは、標的遺伝子（*SSR2*）がコードする酵素が触媒する代謝反応の下流で生合成される代謝物質である<sup>7)</sup>。*SSR2* を欠損させた GE ジャガイモにおいて、コレステロールとソラニジンの蓄積レベルが低いという結果は、ジャガイモの *SGA* 生合成経路に関する知識と矛盾しない。

一方、GE ジャガイモにおけるカンペステロールの増加の原因については、複数の可能性が考えられる。一つ目は、標的遺伝子 *SSR2* の欠損によりステロイドグリコアルカロイド生合成経路が遮断されたことによって植物ステロール生合成経路への前駆体物質供給量が増加した可能性である（図 9）。二つ目は、*SSR2* の欠損がそのパラログ遺伝子 *SSR1* の機能発現に影響を及ぼした可能性である。GE ジャガイモでは *SSR1* が触媒する代謝反応の基質であるイソフコステロールが減少しており、その反応産物である  $\beta$ -シトステロールが増加傾向にあった（図 9）。上記の 2 つの可能性については、並行して進められているトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析の結果と合わせて総合的に考察する必要がある。三つ目は、変異導入に伴うフレームシフトやアミノ酸置換・欠損によって内生 *SSR2* とは異なる機能を獲得した変異タンパク質が発現している可能性である。GE ジャガイモの母本品種サッシーは 4 倍体であるため、4 個の *SSR2* 対立遺伝子が存在する。TALEN 法を適用してこれらの対立遺伝子の同時編集を試みた場合、個々の対立遺伝子が独立したイベントによって編集を受けるため、導入変異には多様性が生じることが予想される。一方、編集を受けた遺伝子の発現制御を司るプロモーター領域は保存されるため、本来の *SSR2* 発現条件下で、変異型 *SSR2* が発現する可能性がある。現在、#71 系統における *SSR2* 遺伝子の欠失状況の解析が進められている（梅基ら）。

## E. 結論

### (1) ニワトリ雌雄個体間でのメタボローム比較解析

本研究は、遺伝子組換え技術を用いて外来タンパク質を発現させたニワトリの代謝状態をメタボロミクスによって包括的に評価するための基礎的な知見を得ることが目的である。まず、雌雄個体間での平常時の代謝状態の差異を把握するために、一ヶ月齢の雌個体および雄個体の血漿試料を用い、試料間でのメタボローム比較解析を実施した。雌雄間で含有レベルに差がある代謝物質をリスト化した。得られた結果は、ニワトリ遺

伝子組換え体における代謝解析のための基礎データとして使用する。

### (2) ニワトリ遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間でのメタボローム比較解析

本研究は、外来タンパク質の発現がニワトリの血漿中代謝産物の蓄積状況に及ぼす影響を評価することが目的である。外来タンパク質発現ニワトリのモデルとして遺伝子組換え技術により緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入したニワトリを評価対象とした。緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の一ヶ月齢の雌個体由来の血漿試料を用いて、含有代謝物質レベルの網羅的比較解析を行った。その結果、血漿中代謝物質含有量については、今回の標本数 ( $n=4$ ) で検出できる差は認められなかった。今後、血漿に加え、細胞が含まれる臓器や組織を材料とし、多検体のプロファイリングによってさらに高い精度の代謝活性評価が可能である。

### (3) ジャガイモゲノム編集個体と非ゲノム編集個体間でのメタボローム比較解析

本研究は、植物の代謝改変を目的として実施されたゲノム編集操作が、目的以外の代謝機能に及ぼす影響をメタボロミクスによって包括的に評価することが目的である。実験には、毒性ステロイドアルカロイド (ソラニジン) 含量の減少を目的として、TALEN法によるゲノム編集でステロール側鎖還元酵素をコードする *SSR2* 遺伝子を破壊し、ステロイドアルカロイド生合成を遮断したジャガイモ塊茎、および母本品種塊茎を供試し、代謝物質蓄積の類似性と相違性を明らかにすることを目的とした。主成分分析および個々のピーク平均値の差の検定から、このゲノム編集による *SSR2* 遺伝子破壊では、目的としたステロール生合成経路以外の代謝機能に与える影響は限定的であることを明らかにした。ゲノム編集ジャガイモでは、ゲノム編集を反映して *SSR2* が触媒する代謝反応の下流の代謝物質 (コレステロール, ソラニジン) が減少していた。一方、植物主要ステロールの一種であるカンペステロール含量の顕著な増加を確認した。カンペステロールは作物を含む広範な植物種に普遍的に存在する代謝物質であり、これまでに毒性に関する報告はない。一方、極性画分の代謝物質にも差異が認められたが、ステロール生合成とアミノ酸代謝の関連は明らかではない。

#### 引用・参考文献リスト

- <sup>1)</sup> De Vos et al. *Nat. Protoc.* **2**, 778–91 (2007). DOI:10.1038/nprot.2007.95
- <sup>2)</sup> Tsugawa et al. *BMC Bioinform.* **12**, 131 (2011). DOI:10.1186/1471-2105-12-131
- <sup>3)</sup> Xia et al. *Nucl. Acids Res.* **43**, W251–7 (2015). DOI:10.1093/nar/gkv380
- <sup>4)</sup> Kind et al. *Nat. Methods* **10**, 755–758 (2013). DOI:10.1038/nmeth.2551

- <sup>5)</sup> Furuhashi et al. *Metabolomics* **11**, 175–183 (2015). DOI:10.1007/s11306-014-0687-1
- <sup>6)</sup> Shepherd et al. *Metabolomics* **3**, 475–488 (2007). DOI:10.1007/s11306-007-0058-2
- <sup>7)</sup> Benjamini & Hochberg *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **57**, 289–300 (1995). DOI: doi:10.2307/2346101
- <sup>8)</sup> Haug et al. *Nucl. Acids Res.* **41**, D781–786 (2013). DOI:10.1093/nar/gks1004
- <sup>9)</sup> Sawai and Ohyama et al. *Plant Cell* **26**, 3763–74 (2014). DOI:10.1105/tpc.114.130096

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

- 1) Takumi Ogawa, Takako Sasaki, Atsushi Okazawa, Reiko Teshima, Norihiko Misawa, Daisaku Ohta: Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **23**, 9 – 19, 2016, DOI: 10.18891/jjfc.23.1\_9.
- 2) Takumi Ogawa, Atsushi Okazawa, Daisaku Ohta: A protocol for GC–MS-based metabolomic analysis in mature seed of rice (*Oryza sativa* L.). *Protocol Exchange*, 2017, DOI: 10.1038/protex.2017.151.
- 3) Takumi Ogawa, Koji Kashima, Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Shiho Kurokawa, Masaharu Kuroda, Atsushi Okazawa, Hiroshi Kiyono, Daisaku Ohta: Seed Metabolome Analysis of a Transgenic Rice Line Expressing Cholera Toxin B-subunit. *Scientific Reports* **7**, 5196, 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-04701-w.

### (2) 学会発表

- 1) 小川拓水, 鹿島光司, 幸義和, 岡澤敦司, 清野宏, 太田大策, コメ型経口ワクチン MucoRice-CTB のメタボローム解析, 第34回日本植物細胞分子生物学会大会 2016年9月(上田)

## H. 知的所有権の出願・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

表 1. ニワトリ血漿抽出物の極性画分から検出されたピークリスト

Peak ID	カラム保持時間 (min)	Compound name
PP-I.S.1	24.93	ribitol (5TMS)-01
PP-I.S.2	25.25	ribitol (5TMS)-02
PP01	9.29	pyruvic acid (1MEOX 1TMS)
PP02	9.63	lactic acid (2TMS)
PP03	10.77	alanine (2TMS)
PP04	11.27	unidentified-01
PP05	12.41	3-hydroxybutanoic acid (2TMS)
PP06	15.92	proline (2TMS)
PP07	16.19	glycine (2TMS)
PP08	16.36	succinic acid (2TMS)
PP09	17.62	serine (3TMS)
PP10	18.24	threonine (3TMS)
PP11	20.00	amino malonic acid (3TMS)
PP12	20.44	malic acid (3TMS)
PP13	20.68	5-oxo proline (2TMS)-01
PP14	20.94	5-oxo proline (2TMS)-02
PP15	21.07	aspartic acid (3TMS)
PP16	21.16	proline (3TMS)
PP17	21.72	cysteine (3TMS)
PP18	22.16	pentanedioic acid (1MEOX 2TMS)
PP19	22.82	unidentified-02
PP20	22.88	unidentified-03
PP21	23.01	glutamine (3TMS)
PP22	23.86	unidentified-04
PP23	23.96	asparagine (3TMS)
PP24	24.86	unidentified-05
PP25	25.80	unidentified-06
PP26	26.60	ornithine (4TMS)
PP27	26.78	isocitric acid (4TMS)
PP28*	28.27	glucose (1MeOX 5TMS)
PP29	28.60	galactose (1MEOX 5TMS)
PP30	28.81	glucitol (6TMS)
PP31	28.93	ascorbic acid (4TMS)
PP32	29.14	maltose (1MEOX 8TMS)
PP33	29.62	talose (5TMS)-01
PP34	29.80	unidentified-07
PP35	30.38	gulose (5TMS)
PP36	31.24	myo-inositol (6TMS)
PP37	31.34	uric acid (4TMS)
PP38	32.86	tryptophan (3TMS)
PP39	33.06	inositol 1-phosphate (7TMS)
PP40	34.03	cystine (4TMS)
PP41	34.37	unidentified-08
PP42	34.65	unidentified-09
PP43	34.78	unidentified-10
PP44*	35.81	EDTA (4TMS)

\*: 解析から除外したピーク, PP: 極性画分, TMS: トリメチルシリル誘導体, MEOX: メトキシアミンによるオキシム化体

表 2. ニワトリ血漿抽出物の非極性画分から検出されたピークリスト

Peak ID	カラム保持時間 (min)	Compound name
LP-I.S.1	38.41	testosterone (1TMS)-01
LP-I.S.2	38.52	testosterone (1TMS)-02
LP01	8.49	unidentified-11
LP02	8.70	propionic acid (2TMS)
LP03	9.87	unidentified-12
LP04	10.16	hydroxylamine (3TMS)
LP05	11.03	unidentified-13
LP06	11.90	unidentified-14
LP07	13.52	unidentified-15
LP08	13.70	benzoic acid (1TMS)
LP09	14.23	unidentified-16
LP10	14.42	ethanilamine (3TMS)
LP11	14.74	phospholic acid (3TMS)
LP12	14.82	glycerol (3TMS)
LP13	18.14	unidentified-17
LP14	18.96	unidentified-18
LP15	19.43	unidentified-19
LP16	22.42	unidentified-20
LP17	25.07	phospholic acid (4TMS)
LP18	25.29	unidentified-21
LP19	25.62	15:0FAME
LP20	26.85	16:1FAME
LP21	26.93	16:1FAME
LP22	27.30	16:0FAME
LP23	27.68	unidentified-22
LP24	28.85	talose (5TMS)-02
LP25	29.24	16:0FA (1TMS)
LP26	29.95	18:2FAME
LP27	30.05	18:1FAME
LP28	30.43	18:0FAME
LP29	31.70	18:2FA (1TMS)
LP30	31.78	18:1FA (1TMS)-01
LP31	31.88	18:1FA (1TMS)-02
LP32	32.17	18:0FA (1TMS)
LP33	32.35	20:4FAME
LP34	32.44	20:3FAME-01
LP35	32.59	20:3FAME-02
LP36	32.86	20:2FAME
LP37	32.93	20:1FAME
LP38	33.29	20:0FAME
LP39	33.88	20:4FA (1TMS)-01
LP40	33.97	20:3FA (1TMS)
LP41	34.10	unidentified-23
LP42	34.16	20:4FA (1TMS)-02
LP43	34.45	20:2FA (1TMS)
LP44	34.51	20:1FA (1TMS)
LP45	34.86	20:0FA (1TMS)
LP46	34.97	22:6FAME-01
LP47	35.05	unidentified-24
LP48	36.35	22:6FAME-02
LP49	36.88	unidentified-25
LP50*	43.31	cholesterol (1TMS)
LP51	43.6	unidentified-26
LP52	44.27	campesterol (1TMS)
LP53	45.13	$\beta$ -sitosterol (1TMS)
LP54	48.46	unidentified-27

\*: 解析から除外したピーク。LP: 非極性画分, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester, TMS; トリメチルシリル誘導体



表 3. ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体の血漿抽出物の極性画分から検出されたピークの同定結果

Peak ID	カラム保持指標	主要イオンピークの $m/z$ 値	Compound name
P001	1100.2	73	Alanine
P002	1103.2	73	Alanine
P004	1183.9	75	7:0 FA
P008	1226.0	144	Valine
P009	1227.0	144	Valine
P010	1228.5	144	Valine
P011	1232.1	144	Valine
P014	1261.5	174	Beta-Alanine
P015	1265.1	174	Beta-Alanine
P016	1266.1	174	Beta-Alanine
P018	1276.8	299	Glucose-1-phosphate
P019	1277.8	174	Beta-Alanine
P020	1278.3	299	Phosphoric acid
P022	1279.9	174	Beta-Alanine
P023	1282.9	299	Glucose-1-phosphate
P024	1289.0	158	Leucine
P025	1289.5	299	Glucose-1-phosphate
P026	1294.1	299	Glucose-1-phosphate
P027	1297.1	73	Glycerol
P028	1297.6	147	Glycerol
P029	1298.6	158	Leucine
P030	1301.9	158	Isoleucine
P031	1302.5	73	Threonine
P032	1303.1	158	Isoleucine
P033	1306.5	158	Isoleucine
P034	1309.3	73	Threonine
P035	1309.9	158	Isoleucine
P036	1313.3	174	Glycine
P037	1315.0	73	Threonine
P038	1316.1	147	Succinate
P039	1319.6	174	Glycine
P040	1328.1	147	Succinate
P041	1353.8	147	Itaconate
P042	1361.1	245	Fumarate Acid
P045	1432.1	74	11:0 FAME
P054	1497.3	147	Malic Acid
P055	1499.8	73	Malic acid
P057	1512.1	73	Malic acid
P058	1514.1	156	5-Oxoproline
P059	1516.2	156	5-Oxoproline
P062	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid
P063	1528.4	156	5-Oxoproline
P066	1533.8	156	5-Oxoproline
P067	1534.5	232	Aspartic acid
P068	1542.7	232	Aspartic acid
P069	1550.2	232	Aspartic acid
P070	1576.0	73	Alpha-ketoglutaric acid
P071	1597.1	73	Alpha-ketoglutaric acid
P073	1621.0	218	Phenylalanine
P074	1630.5	218	Phenylalanine
P076	1639.3	218	Phenylalanine
P079	1771.3	147	Aconitic acid
P080	1793.6	156	Glutamine
P082	1830.7	142	Ornithine
P083	1834.7	142	Ornithine
P084	1840.5	142	Ornithine
P085	1851.9	273	Citric acid
P087	1930.4	73	Glucose
P088	1933.9	73	Glucose
P089	1936.3	319	Glucose
P091	1943.2	319	Glucose
P095	1959.3	73	Mannitol
P096	1980.5	73	Ascorbic acid
P097	1981.4	205	Ascorbic acid
P098	2040.2	313	Palmitic acid
P099	2044.7	313	Palmitic acid
P100	2051.0	117	16:0 FA
P104	2125.3	305	Myo-Inositol
P105	2130.0	73	Myo-Inositol
P106	2239.5	202	Tryptophan
P107	2249.1	117	18:0 FA
P114	2713.2	361	Sucrose
P115	2813.6	69	Squqlane
P116	2819.6	69	Squqlane
P117	2826.8	69	Squqlane
P118	2832.7	69	Squqlane
P119	2836.3	69	Squqlane

P; 極性画分, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

表 4. ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体の血漿抽出物の非極性画分から検出されたピークの同定結果

Peak ID	カラム保持指標	主要イオンピークの $m/z$ 値	Compound name
N001	1101.4	73	Alanine
N006	1172.9	75	7:0 FA
N012	1259.5	116	Serine
N013	1261.6	174	Beta-Alanine
N014	1266.1	174	Beta-Alanine
N015	1270.2	174	Beta-Alanine
N018	1279.9	174	Ethanol amine
N019	1281.4	299	Glucose-1-phosphate
N021	1283.9	299	Glucose-1-phosphate
N022	1290.0	299	Glucose-1-phosphate
N023	1293.6	299	Phosphoric acid
N024	1297.1	205	Glycerol
N026	1316.2	174	Glycine
N027	1319.6	174	Glycine
N031	1369.1	215	9:0 FA
N039	1497.3	85	Pentadecane
N041	1518.2	156	5-Oxoproline
N043	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid
N044	1533.8	156	5-Oxoproline
N046	1550.2	232	Aspartic acid
N049	1711.5	71	Heptadecane
N050	1799.8	71	Octadecane
N051	1854.3	285	14:0 FA
N053	1927.0	74	16:0 FAME
N055	1941.4	319	Glucose
N056	2000.0	71	Icosane
N058	2040.2	313	Palmitic acid
N059	2051.9	117	16:0 FA
N061	2095.6	81	18:2 FAME
N062	2101.0	71	Henicosane
N063	2101.9	74	18:1 FAME
N064	2107.6	74	18:1 FAME
N065	2122.6	74	18:0 FAME
N066	2129.1	74	18:0 FAME
N067	2150.7	327	17:0 FA
N068	2162.9	327	Margarate
N069	2216.6	75	Linoleic acid
N076	2250.9	341	18:0 FA
N077	2260.5	79	20:4 FAME
N078	2278.7	79	20:3 FAME
N079	2347.3	117	19:0 FA
N083	2446.3	117	20:0 FA
N084	2453.6	79	22:6 FAME
N085	2468.3	79	22:6 FAME
N098	3156.2	502	$\alpha$ -tocopherol
N101	3164.2	329	Cholesterol
N103	3266.0	129	Campesterol
N104	3355.4	129	Sitosterol

N; 非極性画分. FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

表 5. ニワトリ遺伝子組換え体および非遺伝子組換え体の群間比較において蓄積レベルに有意差が見られたピーク

Peak ID	Compound name	Student's t test (組換え体 vs 非組換え体)		ピーク強度比 (組換え体/非組換え体)
		p value	FDR	
N102	Unknown	0.0120	0.98	0.74

N; 非極性画分. FDR; false discovery rate

表 6. ジャガイモ GE 試料と Cont 試料から検出された非極性代謝物の群間比較の結果

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
N076	Campesterol	11286	1469	1123	152	<b>10.1</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0258</b>
N069	Cholesterol	1292	469	5357	564	<b>-4.1</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0258</b>
N071	Solanidine	1950	657	102032	20199	<b>-52.3</b>	<b>0.0016</b>	<b>0.0500</b>
N079	N079	4579	601	6649	356	-1.5	<b>0.0044</b>	0.1021
N087	N087	5347	627	7577	409	-1.4	<b>0.0063</b>	0.1158
N086	N086	20508	2812	28354	2341	-1.4	<b>0.0183</b>	0.2805
N085	N085	17527	2530	23979	1903	-1.4	<b>0.0244</b>	0.3144
N045	Heptacosane-like 1	2655	619	1947	348	1.4	0.0515	0.3144
N090	N090	6040	1087	4325	645	1.4	0.0522	0.3144
N020	C17:0FA-like 1	6203	1338	9028	1112	-1.5	0.0529	0.3144
N077	N077	4028	556	3193	259	1.3	0.0535	0.3144
N058	N058	3971	480	5066	864	-1.3	0.0577	0.3144
N007	C16:0FAME-like 1	72594	10026	57418	8911	1.3	0.0599	0.3144
N056	N056	5184	702	6667	1342	-1.3	0.0599	0.3144
N082	$\beta$ -Sitosterol	112932	14688	90025	7438	1.3	0.0619	0.3144
N060	C27:0FAIc	31645	3281	37244	2319	-1.2	0.0635	0.3144
N026	C20:0FAME	19864	1283	22692	1772	-1.1	0.0659	0.3144
N015	C18:1FAME-like 1	1327	262	873	404	1.5	0.0664	0.3144
N084	N084	3801	928	2426	179	1.6	0.0682	0.3144
N075	N075	237900	21314	208841	14512	1.1	0.0684	0.3144
N053	N053	8489	1429	11331	1265	-1.3	0.0736	0.3223
N044	N044	27757	5849	19719	1365	1.4	0.0944	0.3592
N050	C25:0FAIc	13941	3097	9554	823	1.5	0.0955	0.3592
N081	C30:0FAIc	142878	21120	113447	13845	1.3	0.0977	0.3592
N089	N089	14971	3590	13055	2389	1.1	0.1016	0.3592
N016	N016	43674	3057	47749	3340	-1.1	0.1041	0.3592
N078	N078	11587	1595	9381	634	1.2	0.1054	0.3592
N040	N040	3343	336	3581	351	-1.1	0.1128	0.3705
N017	C18:0FAME-like 1	51058	3616	55754	4542	-1.1	0.1313	0.4166
N029	C21:0FAIc	91383	14524	75177	4243	1.2	0.1529	0.4688
N080	C30:0FAME	101667	13469	89491	9404	1.1	0.1616	0.4796
N057	N057	3933	1240	3301	555	1.2	0.1755	0.5046
N009	C17:0FAME	1473	388	1092	137	1.3	0.1835	0.5117
N027	C19:0FA-like 1	5725	961	6739	582	-1.2	0.1981	0.5260
N021	C18:2FA-like 1	1563	349	1287	159	1.2	0.2001	0.5260
N074	N074	18088	1764	16606	733	1.1	0.2219	0.5670
N065	C28:0FAME	107275	13958	119715	6613	-1.1	0.2389	0.5845
N022	C18:0FA	9650	1216	10130	1024	-1.0	0.2495	0.5845
N008	C17:0FAME-like 1	650	207	514	132	1.3	0.2512	0.5845
N036	C22:1FAME-like 1	562	149	680	370	-1.2	0.2541	0.5845
N083	N083	12497	1481	11641	1097	1.1	0.2967	0.6501
N034	Pentacosane-like 1	4455	999	3772	1042	1.2	0.3008	0.6501
N054	C26:0FAME	16464	1992	17408	1196	-1.1	0.3038	0.6501
N037	C22:0FAME	9099	1673	10236	1562	-1.1	0.3247	0.6698
N025	Tricosane-like 1	2957	478	2556	579	1.2	0.3276	0.6698
N061	N061	4172	1153	4449	946	-1.1	0.3441	0.6807
N047	C24:0FAIc	42560	5941	38879	2025	1.1	0.3488	0.6807
N011	N011	12200	1893	10929	4135	1.1	0.3603	0.6807
N038	N038	17716	1887	20018	3253	-1.1	0.3640	0.6807
N010	C16:0FA	28852	5367	27593	3131	1.0	0.3699	0.6807
N046	C24:0FAME	15607	2099	17022	2015	-1.1	0.3963	0.7085
N039	N039	18297	1533	20893	4126	-1.1	0.4053	0.7085
N052	N052	32154	1292	31679	862	1.0	0.4155	0.7085
N001	N001	22514	6271	20817	4751	1.1	0.4158	0.7085
N019	N019	3532	817	3920	475	-1.1	0.4336	0.7252

(Continued)

表 6. (Continued)

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
N063	N063	6029	1415	6811	1625	-1.1	0.4853	0.7568
N002	Glucose-1-phosphate	859	524	731	336	1.2	0.4880	0.7568
N070	N070	10904	1428	10091	1813	1.1	0.4926	0.7568
N088	N088	62588	19255	52677	9428	1.2	0.4932	0.7568
N051	N051	12127	1998	13036	1053	-1.1	0.4936	0.7568
N030	N030	3752	1107	4417	937	-1.2	0.5045	0.7609
N033	N033	4933	1494	5785	1161	-1.2	0.5175	0.7679
N048	N048	3777	1429	3292	853	1.1	0.5270	0.7696
N062	N062	18548	2957	17317	874	1.1	0.5370	0.7719
N049	N049	4729	1147	4534	623	1.0	0.5631	0.7929
N003	N003	6997	1972	6590	1931	1.1	0.5695	0.7929
N073	C29:0FAIc	6516	1314	6095	1038	1.1	0.5774	0.7929
N031	N031	3184	1081	3559	498	-1.1	0.6293	0.8414
N035	N035	3434	1140	3847	629	-1.1	0.6311	0.8414
N059	N059	8854	2331	9605	2340	-1.1	0.6527	0.8458
N041	N041	2955	512	3107	259	-1.1	0.6617	0.8458
N068	N068	267175	28972	274459	19263	-1.0	0.6619	0.8458
N091	N091	5516	2971	4642	1415	1.2	0.6996	0.8817
N064	N064	4482	934	4614	654	-1.0	0.7177	0.8898
N005	C14:0FAME-like 1	556	112	535	121	1.0	0.7354	0.8898
N028	C21:0FAME	2336	482	2430	359	-1.0	0.7470	0.8898
N014	C18:2FAME-like 1	42452	4511	43549	3648	-1.0	0.7542	0.8898
N043	C23:0FAME	4806	1490	5113	1123	-1.1	0.7544	0.8898
N004	Malate-like 1	538	123	519	144	1.0	0.8166	0.9488
N042	C22:0FAIc	36759	5374	37428	2269	-1.0	0.8539	0.9488
N072	C29:0FAME	38917	2426	38638	3227	1.0	0.8647	0.9488
N066	N066	7544	1173	7616	1085	-1.0	0.8655	0.9488
N023	N023	3767	539	3726	268	1.0	0.8842	0.9488
N006	Octadecane-like 1	514	132	509	130	1.0	0.8944	0.9488
N055	C26:0FAIc	141264	19493	139660	6388	1.0	0.8960	0.9488
N012	C18:2FAME	55165	6385	55524	5593	-1.0	0.9000	0.9488
N013	N013	7026	1593	7128	1828	-1.0	0.9037	0.9488
N018	N018	25912	6905	25492	3421	1.0	0.9189	0.9488
N032	N032	3534	1357	3432	953	1.0	0.9251	0.9488
N067	C28:0FAIc	671457	105905	668179	89049	1.0	0.9310	0.9488
N092	N092	26507	7119	26199	6207	1.0	0.9469	0.9488
N024	C20:2FAME-like 1	548	131	546	144	1.0	0.9488	0.9488

<sup>a)</sup> N; 非極性画分。<sup>b)</sup> FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester。<sup>c)</sup> GE; ゲノム編集試料, Cont; 対照試料, SD; 標準偏差。<sup>d)</sup> GE と Cont 間でのピーク強度比 (GE/Cont) を示した。GE/Cont 比が 1 以下の場合には Cont/GE 比を計算し、その値に「-(マイナス)」を付した。値の絶対値が 2 以上の場合には太字で示した。<sup>e)</sup> 値が 0.05 より小さい場合は太字で示した。

表 7. ジャガイモ GE 試料と Cont 試料から検出された極性代謝物の群間比較の結果

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P056	P056	19015	3660	12365	2715	1.5	<b>0.0029</b>	0.2438
P017	Glycine	4593	312	3643	506	1.3	<b>0.0050</b>	0.2438
P007	Leucine	41845	6171	23013	4755	1.8	<b>0.0070</b>	0.2438
P125	1-Kestose-like 2	486	132	681	93	-1.4	<b>0.0090</b>	0.2438
P036	P036	107781	23150	77126	19468	1.4	<b>0.0128</b>	0.2438
P026	P026	31968	5677	21755	3261	1.5	<b>0.0144</b>	0.2438
P055	P055	124600	21890	83068	20978	1.5	<b>0.0145</b>	0.2438
P005	Valine	91723	17793	50893	7553	1.8	<b>0.0168</b>	0.2438
P014	Isoleucine	66301	14917	33400	5492	<b>2.0</b>	<b>0.0200</b>	0.2438
P060	P060	55534	11598	40300	8407	1.4	<b>0.0214</b>	0.2438
P016	Succinate-like 1	1197	44	1006	124	1.2	<b>0.0216</b>	0.2438
P059	P059	10797	2641	7131	1625	1.5	<b>0.0239</b>	0.2438
P061	Phenylalanine	41073	10375	15873	3936	<b>2.6</b>	<b>0.0252</b>	0.2438
P102	Tryptophan	32954	10250	12456	4115	<b>2.6</b>	<b>0.0337</b>	0.3037
P078	Quinate	135156	21638	251428	56039	-1.9	<b>0.0404</b>	0.3390
P090	Tyrosine-like 1	76671	28297	28534	9449	<b>2.7</b>	<b>0.0455</b>	0.3580
P088	Lysine	23223	2827	16488	2822	1.4	0.0523	0.3604
P069	Ribitol	60352	1220	59821	1525	1.0	0.0524	0.3604
P118	P118	13604	3935	25741	6700	-1.9	0.0543	0.3604
P010	Nicotinate-like 1	823	92	1032	144	-1.3	0.0634	0.3995
P063	P063	20359	4654	13368	2401	1.5	0.0798	0.4424
P050	γ-Aminobutyrate	69847	4668	77028	5112	-1.1	0.0803	0.4424
P052	P052	87936	28608	48359	3241	1.8	0.0855	0.4424
P084	P084	22416	6696	12835	2722	1.7	0.0901	0.4424
P029	P029	6591	1295	5385	743	1.2	0.0909	0.4424
P064	P064	103139	25866	66928	12352	1.5	0.0913	0.4424
P076	P076	3270	387	3682	196	-1.1	0.1158	0.5222
P075	Citrate-like 1	358618	42057	407053	25504	-1.1	0.1166	0.5222
P077	Quinate-like 1	6805	12631	486	132	<b>14.0</b>	0.1243	0.5222
P046	γ-Aminobutyrate-like 1	486	132	5206	9486	<b>-10.7</b>	0.1287	0.5222
P066	P066	165106	29922	132908	23838	1.2	0.1294	0.5222
P043	P043	13736	2717	9386	2811	1.5	0.1326	0.5222
P027	β-Cyanoalanine	2536	738	1831	615	1.4	0.1533	0.5854
P085	P085	6220	947	5130	1179	1.2	0.1733	0.6423
P111	P111	3573	1285	4327	983	-1.2	0.1925	0.6929
P024	Itaconate-like 1	737	302	998	266	-1.4	0.2047	0.7164
P072	Glutamine	1012	222	1354	571	-1.3	0.2146	0.7184
P109	P109	4749	884	5486	1128	-1.2	0.2167	0.7184
P091	Mannitol	6106	634	7462	1483	-1.2	0.2274	0.7307
P089	Tyrosine	3100	1633	1674	1309	1.9	0.2320	0.7307
P079	P079	24658	5415	20388	3643	1.2	0.2435	0.7482
P022	Fumarate-like 1	582	126	516	133	1.1	0.2505	0.7508
P053	Hexadecane	542	178	665	207	-1.2	0.2562	0.7508
P106	Glucose-6-phosphate	2400	644	2939	714	-1.2	0.2987	0.8338
P087	P087	5985	2043	4247	1212	1.4	0.3103	0.8338
P013	P013	83037	19061	58812	29714	1.4	0.3180	0.8338
P018	Succinate	528	147	623	105	-1.2	0.3282	0.8338
P012	Threonine-like 1	919	736	1422	1173	-1.5	0.3343	0.8338
P119	P119	3844	1313	3059	873	1.3	0.3433	0.8338
P105	Fructose 6-phosphate-like 1	970	256	1154	285	-1.2	0.3461	0.8338
P124	1-Kestose-like 1	737	333	1101	444	-1.5	0.3522	0.8338
P104	Glucose-6-phosphate-like 1	826	198	964	247	-1.2	0.3585	0.8338
P108	P108	9063	1943	7632	1977	1.2	0.3689	0.8338
P065	P065	89406	11279	82862	11168	1.1	0.3788	0.8338
P073	Ornithine-like 1	5270	1107	4515	1307	1.2	0.3803	0.8338

(Continued)

表 7. (Continued)

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P058	Phenylalanine-like 1	2372	3835	514	132	<b>4.6</b>	0.3866	0.8338
P054	$\alpha$ -Ketoglutaric acid-like 1	9865	11192	4381	6658	<b>2.3</b>	0.3877	0.8338
P030	P030	3940	105	3887	193	1.0	0.3965	0.8338
P051	$\alpha$ -Ketoglutaric acid-like 2	19162	15742	9463	10899	<b>2.0</b>	0.4048	0.8338
P096	P096	7002	1565	5845	1547	1.2	0.4091	0.8338
P040	Aspartic acid-like 2	5280	2600	3864	2307	1.4	0.4194	0.8338
P057	C13:0FAME-like 1	2179	1681	1355	1570	1.6	0.4199	0.8338
P068	Putrescine	555	106	523	116	1.1	0.4222	0.8338
P070	Aconitic acid-like 1	486	132	526	147	-1.1	0.4280	0.8338
P098	P098	4054	829	4918	1421	-1.2	0.4322	0.8338
P009	Glucose-1-phosphate	485323	48154	508970	54985	-1.0	0.4368	0.8338
P071	P071	3263	1478	4940	2620	-1.5	0.4470	0.8407
P002	P002	21592	6549	19406	6766	1.1	0.4606	0.8534
P121	P121	3798	1066	3068	1140	1.2	0.4923	0.8685
P011	Glycerol-like 1	2273	579	1965	549	1.2	0.4963	0.8685
P097	myo-Inositol	14208	3009	16898	5170	-1.2	0.4981	0.8685
P001	Undecane-like 1	1080	309	956	394	1.1	0.5038	0.8685
P074	P074	4441	2056	6176	2925	-1.4	0.5045	0.8685
P110	Sucrose-like 2	552	135	526	147	1.0	0.5203	0.8685
P100	P100	4025	816	4415	801	-1.1	0.5206	0.8685
P083	Glucose-like 1	9387	20845	4384	7082	<b>2.1</b>	0.5284	0.8685
P080	Fructose	96948	91164	59595	21372	1.6	0.5590	0.8685
P037	P037	8315	1520	7744	753	1.1	0.5608	0.8685
P095	P095	4805	4499	2929	924	1.6	0.5660	0.8685
P019	Succinate-like 2	523	143	545	132	-1.0	0.5663	0.8685
P031	Malate-like 2	7157	9483	4321	4542	1.7	0.5685	0.8685
P107	Glucose-6-phosphate-like 2	536	122	567	119	-1.1	0.5726	0.8685
P033	Malate-like 3	3195	5145	1863	1984	1.7	0.5788	0.8685
P116	Maltose	602	251	514	132	1.2	0.5790	0.8685
P047	P047	7732	936	7301	866	1.1	0.5894	0.8713
P122	P122	4079	2333	3229	980	1.3	0.5947	0.8713
P035	Malate-like 1	19183	19659	14436	19291	1.3	0.6131	0.8880
P094	C16:0FA	23525	2151	22994	2530	1.0	0.6264	0.8969
P086	Glucose	133491	108935	95923	31550	1.4	0.6410	0.9007
P003	P003	3880	1008	4205	1272	-1.1	0.6474	0.9007
P115	Sucrose-like 1	374962	363038	302488	375314	1.2	0.6505	0.9007
P081	P081	3935	3369	2851	1029	1.4	0.6626	0.9069
P082	Fructose-like 1	53192	40145	40439	14744	1.3	0.6724	0.9069
P062	P062	74690	11659	78158	18673	-1.0	0.6766	0.9069
P067	Heptadecane-like 1	578	117	546	128	1.1	0.6942	0.9101
P004	P004	4459	1461	4179	965	1.1	0.7068	0.9101
P126	P126	6314	796	6576	1323	-1.0	0.7085	0.9101
P123	P123	10946	1741	10460	2722	1.0	0.7132	0.9101
P034	Malate-like 5	3409	5226	2589	2448	1.3	0.7151	0.9101
P093	C16:0FA-like1	857	612	961	719	-1.1	0.7291	0.9187
P113	P113	98723	17584	103154	24401	-1.0	0.7422	0.9259
P044	5-Oxoproline	196279	27893	206076	35896	-1.0	0.7521	0.9290
P048	Aspartate	88729	11133	85756	12196	1.0	0.7747	0.9331
P101	Tryptophan-like 1	503	125	514	132	-1.0	0.7781	0.9331
P015	P015	4305	843	4178	665	1.0	0.7811	0.9331
P008	Glucose-1-phosphate-like 1	68141	31523	73430	37177	-1.1	0.7850	0.9331
P049	P049	27453	1872	27792	1366	-1.0	0.8000	0.9420
P103	C18:0FA	17644	2922	17188	3836	1.0	0.8224	0.9552
P028	Tetradecane-like 1	758	92	749	134	1.0	0.8380	0.9552
P025	Fumarate	2902	757	3060	988	-1.1	0.8424	0.9552
P041	$\gamma$ -Aminobutyrate-like 2	1094	434	1036	388	1.1	0.8520	0.9552

(Continued)

表 7. (Continued)

Peak ID <sup>a)</sup>	Compound name <sup>b)</sup>	相対ピーク強度 <sup>c)</sup>				ピーク強度比 <sup>d)</sup> (GE/Cont)	Student's t-test <sup>e)</sup>	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P020	Fumarate-like 2	583	261	560	161	1.0	0.8540	0.9552
P117	P117	19587	5998	20413	6023	-1.0	0.8567	0.9552
P039	5-Oxoproline-like 2	5950	5013	5427	5238	1.1	0.8756	0.9678
P032	Malate-like 4	4895	5954	4331	4800	1.1	0.8922	0.9735
P092	P092	14197	2887	13977	2358	1.0	0.9025	0.9735
P023	Itaconate-like 2	538	123	531	156	1.0	0.9206	0.9735
P038	Malate	66311	19812	65146	6874	1.0	0.9358	0.9735
P045	Aspartic acid-like 1	10290	8013	9833	6744	1.0	0.9387	0.9735
P021	Itaconate	541	125	547	129	-1.0	0.9418	0.9735
P120	P120	24581	6506	25088	9490	-1.0	0.9453	0.9735
P042	5-Oxoproline-like 1	14807	6716	15079	8549	-1.0	0.9458	0.9735
P112	Sucrose	608138	250718	618184	276920	-1.0	0.9503	0.9735
P099	P099	17164	2261	17240	2945	-1.0	0.9698	0.9854
P006	Glucose-1-phosphate-like 2	339567	158098	337371	207440	1.0	0.9813	0.9885
P114	P114	66320	15979	66417	15469	-1.0	0.9885	0.9885

<sup>a)</sup> P; 極性画分。 <sup>b)</sup> FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester。 <sup>c)</sup> GE; ゲノム編集試料, Cont; 対照試料, SD; 標準偏差。 <sup>d)</sup> GE と Cont 間でのピーク強度比 (GE/Cont) を示した。 GE/Cont 比が 1 以下の場合は Cont/GE 比を計算し, その値に「-(マイナス)」を付した。 値の絶対値が 2 以上の場合は太字で示した。 <sup>e)</sup> 値が 0.05 より小さい場合は太字で示した。

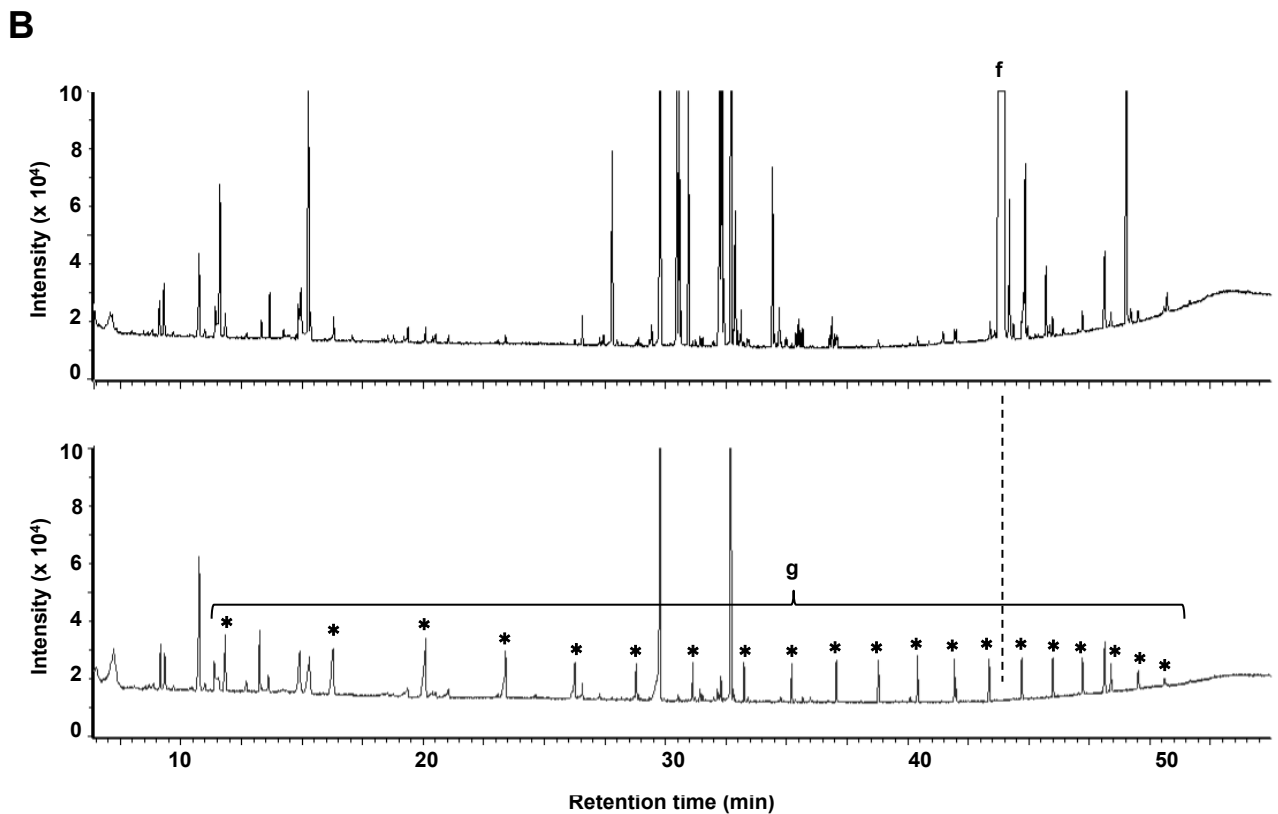
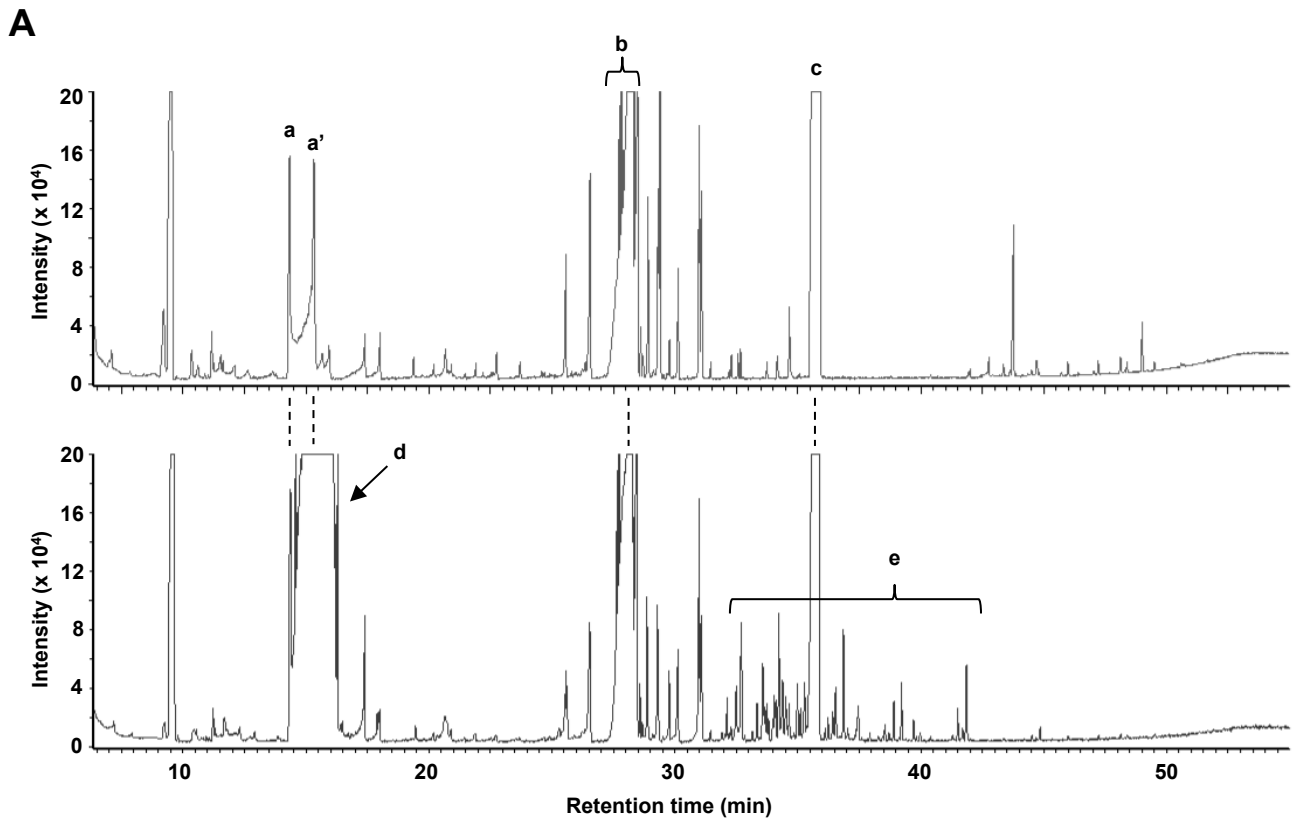
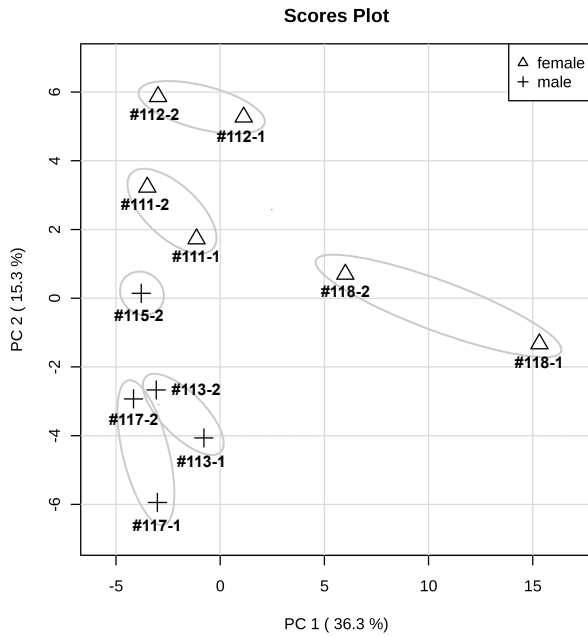
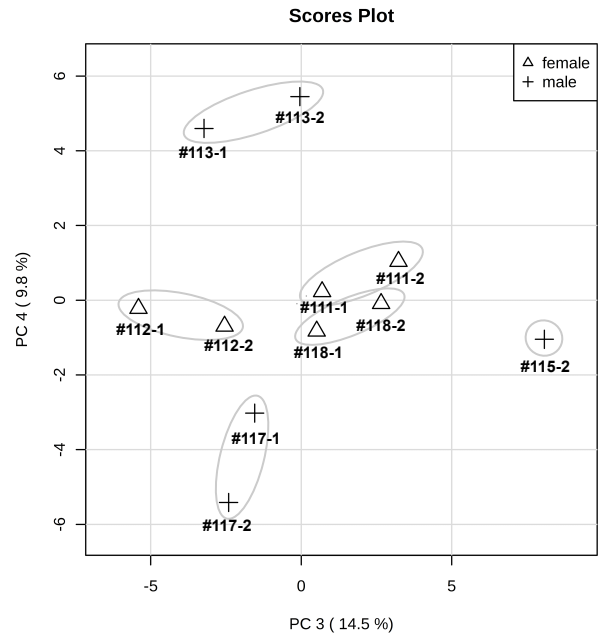


図 1. 限外濾過法による除タンパク質処理の適用が分析結果に及ぼす影響  
 (A)極性画分の GC-MS トータルイオンカレント(TIC)クロマトグラム。上段; 変性沈殿法のみ行った試験区, 下段; 変性沈殿法+限外濾過法を組み合わせた試験区。(B) 非極性画分の GC-MS TIC クロマトグラム。上段; 変性沈殿法のみ行った試験区, 下段; 変性沈殿法+限外濾過法を組み合わせた試験区。a, a'; phosphoric acid (3TMS), b; glucose (5TMS), c; EDTA (4TMS), d; glycerol (3TMS), e; 未同定ピーク群, f; cholesterol (1TMS), g; 未同定ピーク群(アスタリスクで示したピーク)。



**A****B**

## 図 2. 主成分分析

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。データの標準化として、エクセルで個々のピーク面積値を内部標準物質のピーク面積値に対する相対値に換算し、欠損値の補填(他サンプルの平均値の 1/2 の値)、スケーリング(auto scaling)を行った。(A)PC1 と PC2 の主成分スコアの二次元プロット図。(B)PC3 と PC4 の主成分スコアの二次元プロット図。雌個体(#111, #112, #118)は三角, 雄個体(#113, #115, #117)は十字で示した。

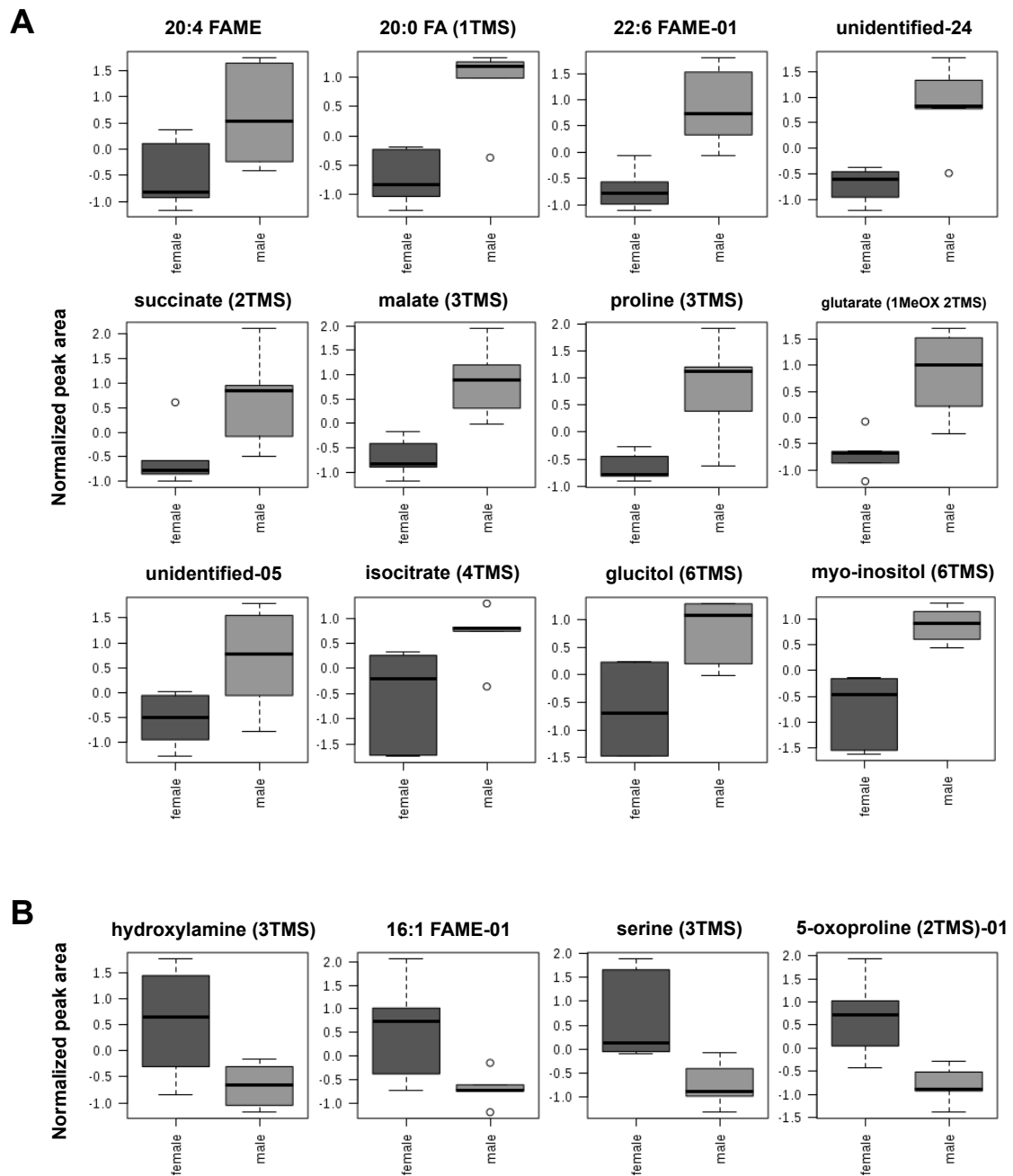


図 3. 雌雄間の比較において蓄積レベルに有意差がみられた代謝産物

(A) 雄グループにおいて蓄積レベルが高かった代謝物。(B) 雌グループにおいて蓄積レベルが高かった代謝物。

TMS; トリメチルシリル (TMS) 誘導体, FAME; 脂肪酸メチルエステル誘導体。

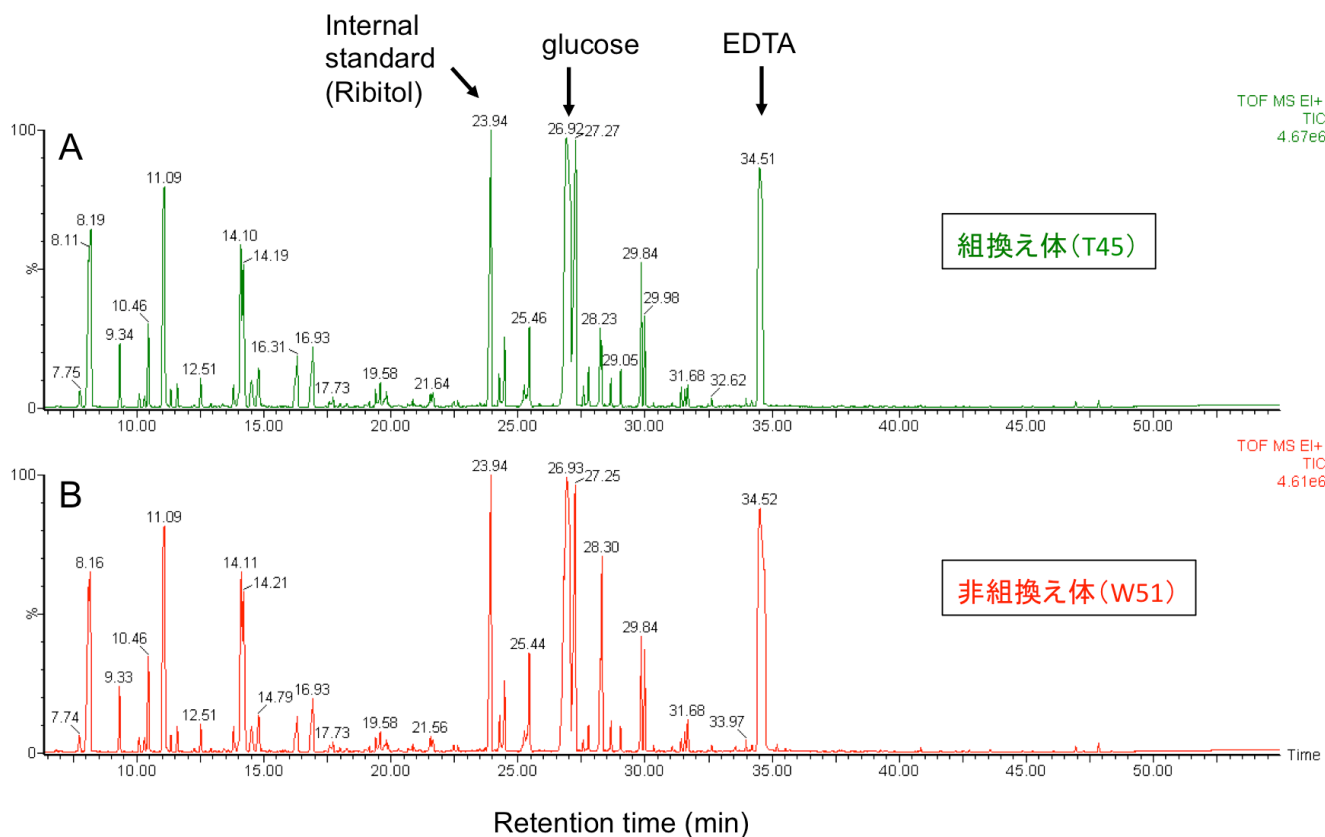


図 4. ニワトリ血漿から調製した極性画分の GC-MS TIC クロマトグラム

(A) 遺伝子組換え体(個体番号 T45)。(B) 非遺伝子組換え体(個体番号 W51)。EDTA; エチレンジアミン四酢酸。

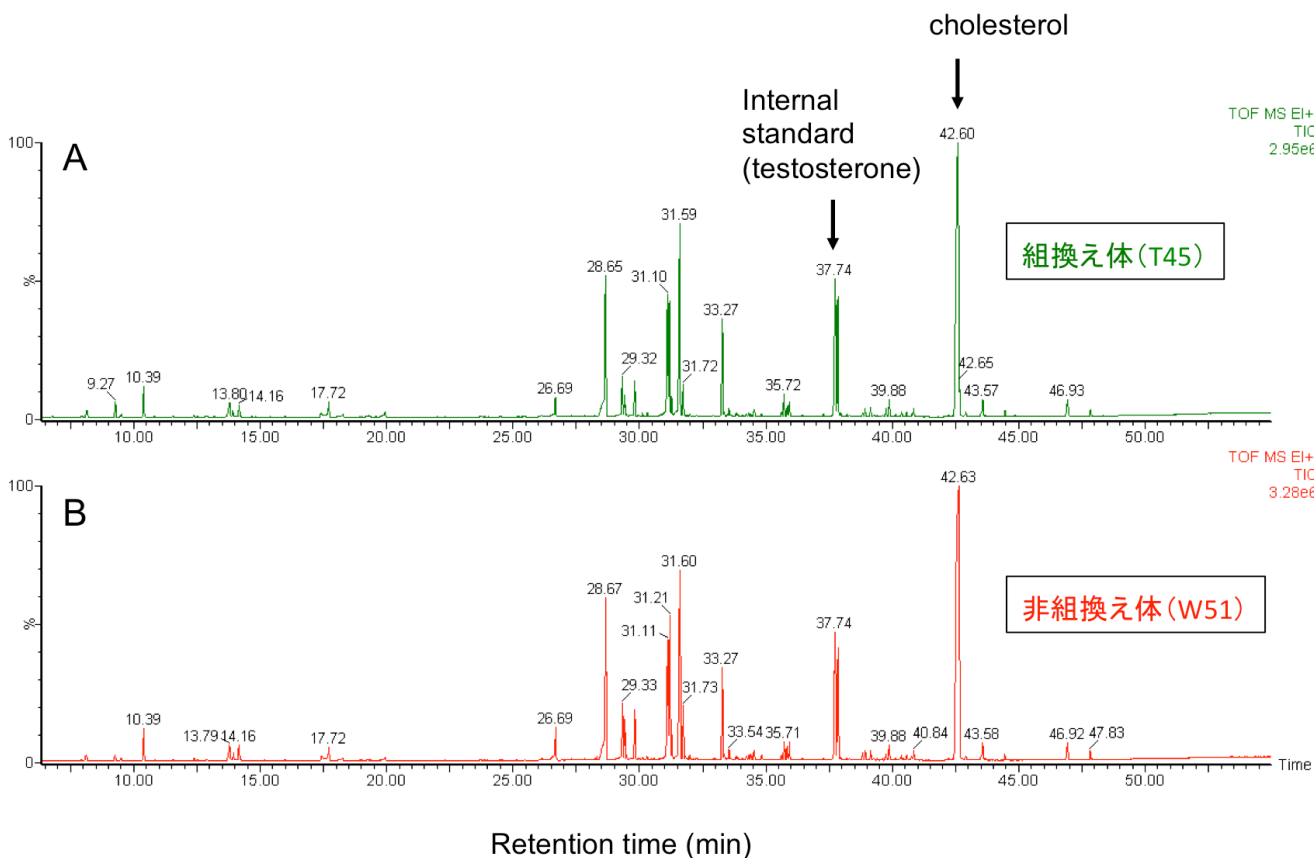


図 5. ニワトリ血漿から調製した非極性画分の GC-MS TIC クロマトグラム

(A) 遺伝子組換え体(個体番号 T45)。(B) 非遺伝子組換え体(個体番号 W51)。

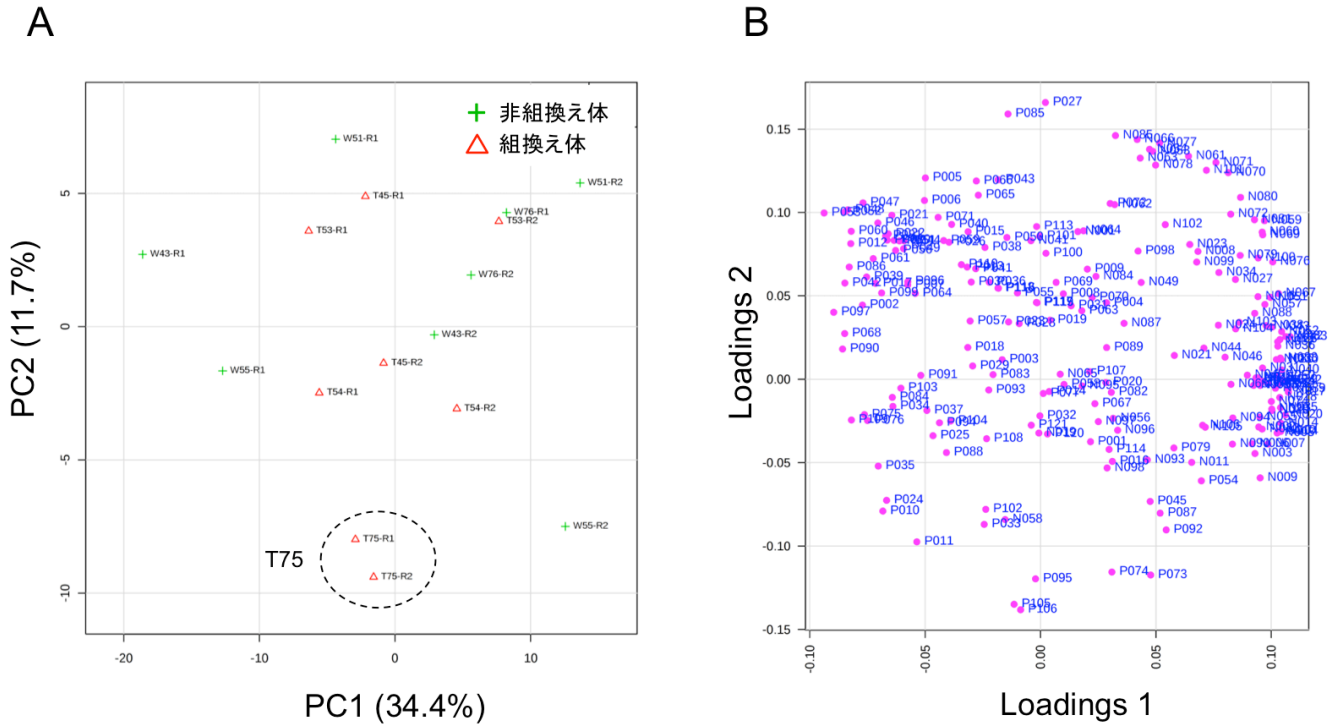


図 6. 主成分分析

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。データの標準化方法は auto scaling を選択した。(A) 第一主成分(PC1)と第二主成分(PC2)の主成分スコアの二次元プロット図。括弧内に各主成分の寄与率を示した。個体番号 T75 のプロットを点線で囲んだ。(B) PC1 と PC2 のローディングスコアの二次元プロット図。各プロットにピーク ID を付記した。P; 極性画分。N; 非極性画分。

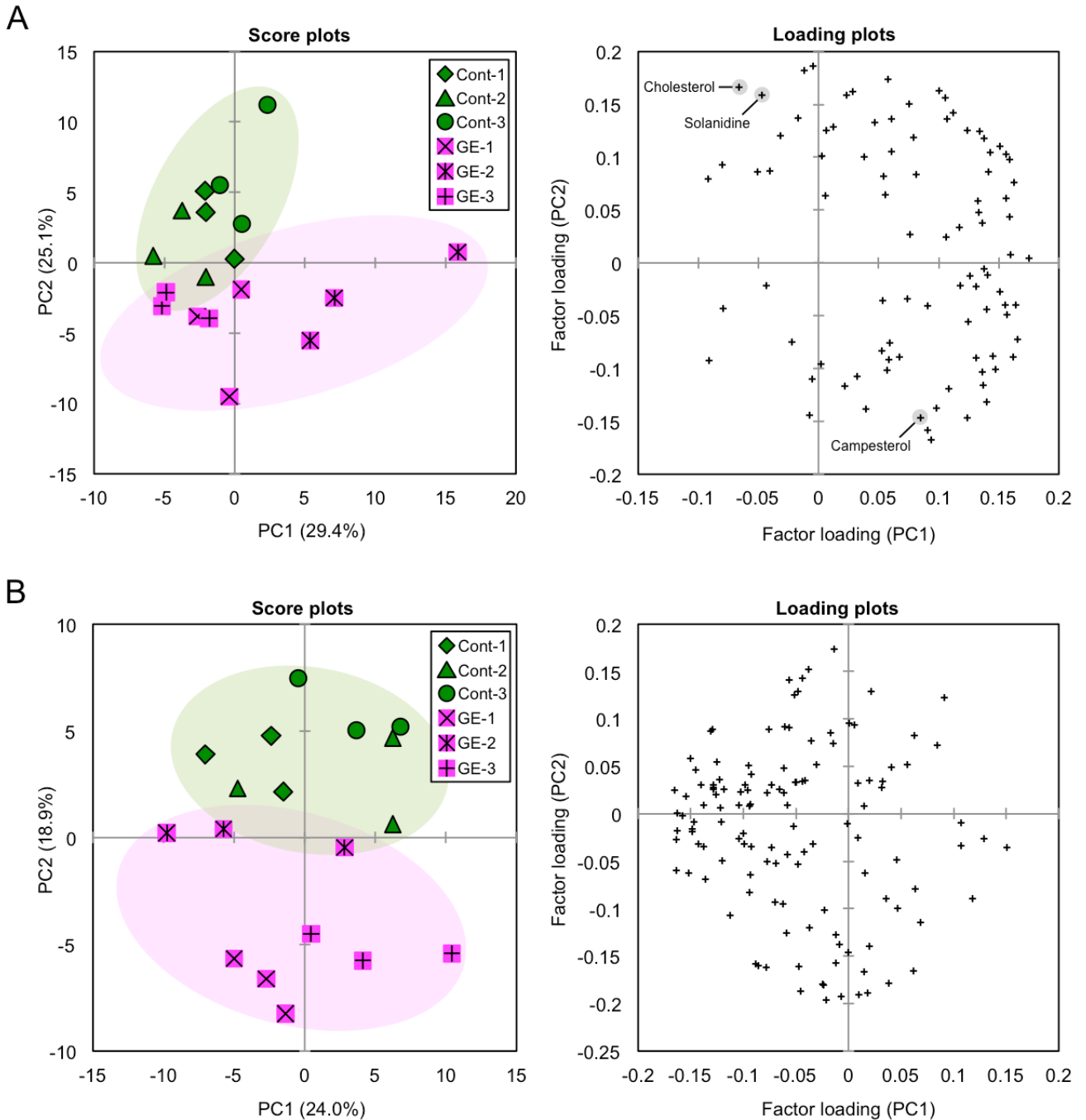


図 7. 主成分分析

ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1, GE-2, GE-3) と対照ジャガイモ試料 (Cont-1, Cont-2, Cont-3) の分析結果の主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いた。データ標準化方法は auto scaling を選択した。A および B にはそれぞれ非極性フラクションおよび極性フラクション由来の代謝物候補ピークの検出強度値をもとにした主成分分析の結果を示した。左側パネル: 第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) の主成分スコアをもとにして作成した二次元プロット図。各主成分の寄与率は図中の括弧内に記し、個々のプロットの注釈を図中に記した。右側のパネル: PC1 と PC2 のローディングスコアをもとにして作成した二次元プロット図。個々のプロットは検出された代謝物候補ピークに対応する。

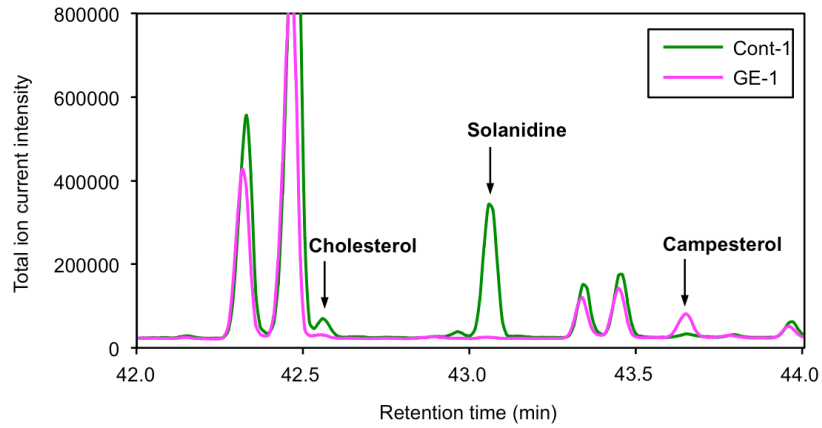


図 8. GC-MS TIC クロマトグラムの群間比較

対照ジャガイモ試料およびゲノム編集ジャガイモの各群の特徴を反映する平均的な TIC クロマトグラムを重ね、カラム保持時間 42 分から 44 分の部分を拡大して表示した。対照ジャガイモ試料 (Cont-1) および ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1) のクロマトグラムはそれぞれ緑色およびマゼンダで示した。ゲノム編集ジャガイモを特徴付けるコレステロール、ソラニジン、およびカンペステロールを矢印で示した。

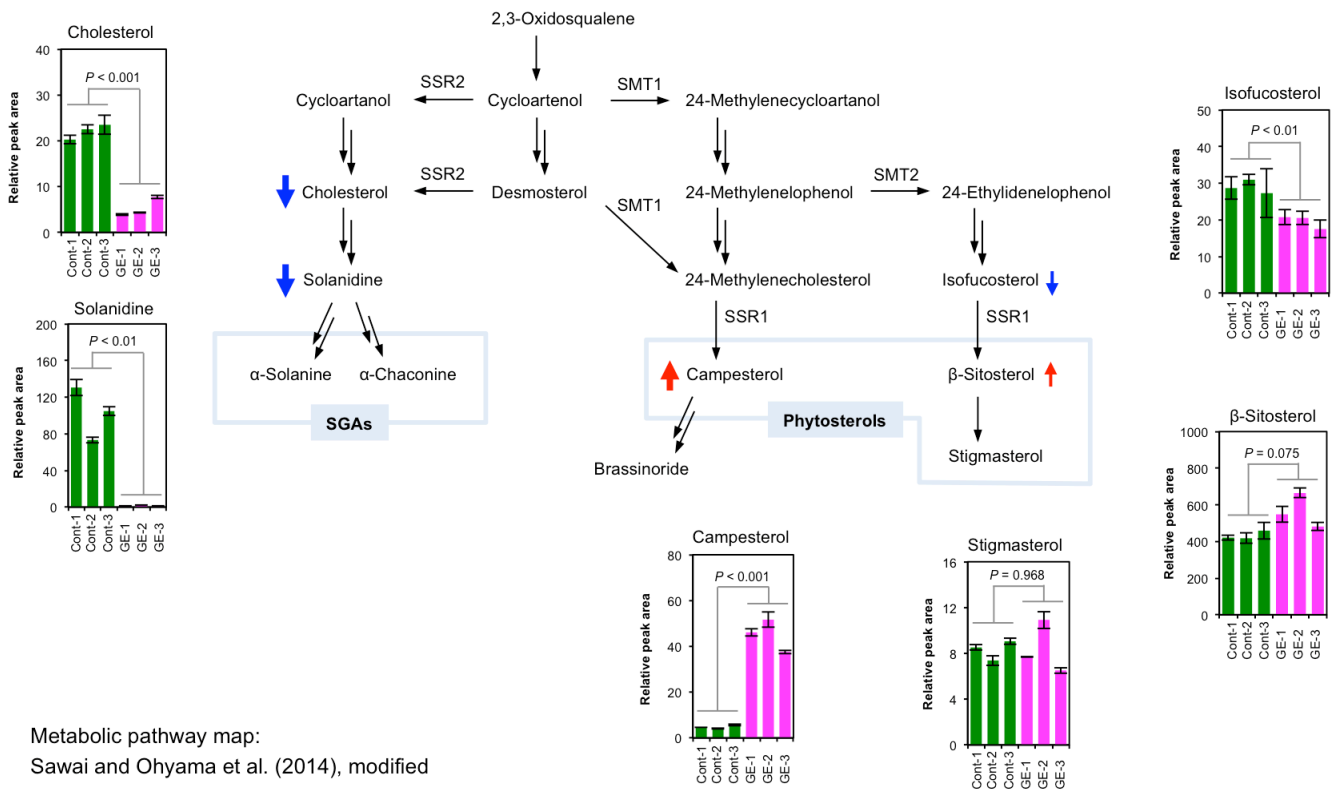


図 9. ジャガイモのステロイドグリコアルカロイド合成および植物ステロール合成に関わる代謝経路地図  
代謝経路地図は、Sawai and Ohshima et al. (2014) を参考にして一部を改変して作成した。Shepherd et al. (2007) に記載されていたカラム保持指標情報および検出 m/z 情報をもとにして同定した各成分について、内部標準物質との比較により得られた相対ピーク面積値の平均値を棒グラフで示した(エラーバーは 3 回の独立した抽出実験の標準偏差を示す)。群間の平均値の差の検定は Student's t-test を用い、検定結果は図中に記入した。ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1, GE-2, GE-3) と対照ジャガイモ試料 (Cont-1, Cont-2, Cont-3) を比較し、5%水準で有意差がみられた場合は、代謝経路地図中の成分名の脇に上向きの赤矢印(ゲノム編集ジャガイモ > 対照ジャガイモ試料)あるいは下向きの青矢印(ゲノム編集ジャガイモ < 対照ジャガイモ試料)を記入した。SGAs; ステロイドグリコアルカロイド。