

氏 名 (本 国 籍)	三浦 詩織 (新潟県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第672号
学 位 授 与 年 月 日	平成29年3月13日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	The Role of Transcriptomics: Physiological Equivalence Based on Gene Expression Profiles (トランスクリプトミクスの役割：遺伝子発プロファイルに基づく生理学的同等性)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 土 井 守 副査 岐阜大学 教授 岩 橋 均 副査 静岡大学 教授 河 合 真 吾 副査 静岡大学 准教授 徳 山 真 治 副査 岐阜大学 助 授 日 巻 武 裕

論 文 の 内 容 の 要 旨

DNA マイクロアレイや RNA シーケンスなどのプラットフォームによって、多数の遺伝子発現レベルを同時に測定することが可能である。これらのプラットフォームは個々の遺伝子発現解析や遺伝子プロファイリングの広範囲にわたるトランスクリプトーム解析のための新しい技術である。これらの技術は環境やストレス、生物の遺伝学的背景の評価など、様々な状況に応じて発現が変動する遺伝子の同定に寄与しており、生物学的反応を解析するツールとして一般的に用いられている。一方、広範囲での遺伝子発現の研究は実験モデルやデータの均一性を明確にするための生物学的実験においても役立つ。標準化や再現性などの証明によりデータの均一性を明らかにすることは、トランスクリプトーム解析の技術的な正確性や精度を証明し、生物学的バイアスのない実験条件の均一性を明確にする重要な手段となりうる。また、データの類似性、不変性を示すことで、生物学的特性を評価することも可能である。申請者は、遺伝子発現プロファイルを用いた多くの研究で言及される「変動性」だけでなく、「同等性」にも着目して生理学的評価におけるトランスクリプトミクスの役割を検討した。

「変動性」と「同等性」の評価の検討を目的とし、2つのマイクロアレイ実験をそれぞれ立案した。第1に、食餌誘導性の高脂血症ミニブタの遺伝子発現評価について実験を行った。高脂血症動物モデルは確立されているが、通常の脂質濃度から推移する遺伝子発

現プロファイルは得られていない。ミニブタは解剖学的、生理学的にヒトと類似しており、食餌誘導性高脂血症の遺伝子発現研究のための有用な動物である。また、ミニブタの血液サンプルは繰り返し得ることができる。本研究では SPF のクラウンミニブタを用いて、2 種類の食餌 [高脂肪・高コレステロール (HFCD)、高脂肪・高コレステロール・高スクロース (HFCSD)] により誘導された高脂血症モデルの生理学的な評価を行った。2 つの食餌モデルの発現プロファイルの推移を評価するために、食餌期間中および食餌期間終了時の血液サンプルおよび白血球サンプルを用いて、マイクロアレイ解析を行った。HFCD 群および HFCSD 群内の全血遺伝子発現の強度変化は、コントロール群における通常食で起こる変化と同程度であった。これは、食餌性高脂血症を誘発するプロトコルの均一性を示している。また、Gene ontology (GO) に基づく機能解析により HFCD 群と HFCSD 群の間に炎症反応と生殖に関与している遺伝子が発動していることが明らかになった。HFCSD 群の 27 週における全血と白血球の発現プロファイルの相関係数は、コントロール群および HFCD 群と比較して著しく低かった。これは、組織や器官に由来する RNA に起因していることが考えられる。HFCD 群と HFCSD 群間の絶食期間中の血漿脂質や血糖レベルに有意な差は認めなかった。しかし、血液 RNA 解析は、それぞれの食餌プロトコルに対応した異なる特徴を明らかにした。以上の結果より、ミニブタにおける食餌誘導性高脂血症の遺伝子発現プロファイルの推移を評価するために、全血 RNA 解析は有用なツールであることが証明された。

第 2 に、焼酎蒸留粕（以下、焼酎粕）の家畜飼料としての適用性の評価を目的として実験を行った。焼酎粕は焼酎生産の過程で産生する廃棄物であり、家畜の飼料として用いられてきた。本研究では、家畜飼料としての焼酎粕が生体の生理状態に与える影響についてミニブタモデルを用いて評価した。焼酎粕飼料はクラウンミニブタに与えられた。食餌期間終了時に血液サンプルを採取し、生化学試験とマイクロアレイ解析に供した。その結果、コントロール群と焼酎粕群の間に、身体的な差はみられず、生化学検査でも違いはみられなかった。また、遺伝子発現パターンも非常に類似していた。さらに、これらの 2 群の遺伝子プロファイリングを、高脂血症モデルおよび毒性モデルのプロファイリングと比較した結果、コントロール群と焼酎粕群の遺伝子発現プロファイリングは、高脂血症モデルおよび毒性モデルと著しく異なることがわかった。結論として、焼酎粕飼料はブタの生理状態に影響を及ぼすことはなく、通常飼料の代替飼料として利用可能であることが証明された。

以上の結果は、マイクロアレイ解析が食品の安全性評価に応用可能であることも示している。このことは、遺伝子発現プロファイルを用いた多くの研究で言及される「変動性」だけでなく、「同等性」にも着目した生理学的評価においてトランスクリプトミクスが役割を果たせることを示している。

審 査 結 果 の 要 旨

21 世紀に入ると、DNA マイクロアレイや RNA シーケンスなどのプラットフォームによって、多数の遺伝子発現レベルを同時に測定することが可能となった。これらの技術は環境、ストレス、生物の遺伝学的背景の評価など、様々な状況に応じて発現が変動する遺伝子の特定に寄与している。生理学的な変化を観察するには優れた技術であるため生物学的応答を解析するツールとして普及している。一方、トランスクリプトーム解析の技術的な正確性や精度を証明することで、生物学的バイアスのない実験条件の均一性を明確にする重要な手段となりうると考えた。そこで、本論文では、①「変化（食餌誘発性の高脂血症ミニブタの遺伝子発現を評価）」と②「同等性（焼酎蒸留粕の家畜飼料としての適用性を評価）」の評価のために 2 つのマイクロアレイ実験をそれぞれ行い、「トランスクリプミクスの役割」を考察、特に、遺伝子発現プロファイルに基づく「生理学的同等性」を示す方法を研究した。

①「変化（食餌誘発性の高脂血症ミニブタの遺伝子発現を評価）」

高脂血症動物モデルは確立されているが、通常の脂質濃度から推移する遺伝子発現変動のプロファイルは解析されていない。そこで、SPF のクラウンミニブタを用いて、2 種類の食餌「高脂肪・高コレステロール (HFCD)」 「高脂肪・高コレステロール・高スクロース (HFCSD)」により誘導された高脂血症モデルの生理学的な評価を行った。2 つの食餌モデルの発現プロファイルの推移を評価するために、食餌期間中および食餌期間終了時の血液サンプルを用いて、マイクロアレイ解析を行った。HFCD 群および HFCSD 群内の全血遺伝子発現の強度変化は、コントロール群における通常食で起こる変化と同程度であった。これは、食餌性高脂血症を誘発するプロトコルの均一性を示していると考えた。また、機能解析により HFCD 群と HFCSD 群共に炎症反応と生殖に関与する遺伝子発現が変動していた。さらに、それぞれの食餌プロトコルに対応した異なる特徴を示していた。本研究において、ミニブタにおける食餌誘導性高脂血症の遺伝子発現プロファイルの推移を評価するために、全血中の RNA 解析は有用なツールであることが確認された。

②「同等性（焼酎蒸留粕の家畜飼料としての適用性を評価）」

続いて、焼酎蒸留粕（以下、焼酎粕）の家畜飼料としての適用性を評価した。焼酎粕は焼酎生産の過程で産生する廃棄物であり、家畜の飼料として用いられてきた。本研究では、家畜飼料としての焼酎粕の適用性評価を、クラウンミニブタをモデル生物として、マイクロアレイ解析により行った。食餌期間終了時に血液サンプルを採取し、生化学試験とマイクロアレイ解析に供した。その結果、コントロール群と焼酎粕群の間で、身体的な差はみられず、生化学検査でも違いはみられなかった。また、遺伝子発現パターンも非常に類似していた。さらに、これらの 2 群の遺伝子プロファイリングを、高脂血症モデルおよび毒性モデルのプロファイリングと比較した結果、コントロール群と焼酎粕群の遺伝子発現プロファイリングは類似しているのに対して、高脂血症モデルおよび毒性モデル（アジ化ナトリウム）とは、著しく異なることがわかった。結論として、焼酎粕飼料はブタの生理状態に影響を及ぼすことはなく、通常飼料の代替飼料として利用可能であることが確認された。

これらの結果から、申請者は、ミニブタにおける全血中の遺伝子発現解析は、生理的な変化を評価する上で有用なツールであることを示すと共に、遺伝子発現プロファイルに基づく生理学的同等性にも利用できることを示した。研究内容と関連する項目に関する知識等も十分であると判断できたことから、本学研究科の学位論文として相応しい内容と判断した。

尚、この研究に関しては、以下の3つの学術論文が公開または受理されている。

1. Takahashi, J., Waki, S., Matsumoto, R., Odake J., Miyaji, T., Tottori, J., Iwanaga T., and Iwahashi, H. Oligonucleotide microarray analysis of dietary-induced hyperlipidemia gene expression profiles in miniature pigs. PLoS One. 7: e37581, 2012
2. Miura, S., Takahashi, J. and Iwahashi, H. Evaluation of the physiology of miniature swine fed a Shochu distillery using mRNA expression profiling. Journal of Material Cycles and Waste Management (in press)
3. Miura, S., Himaki, T., Takahashi, J. and Iwahashi, H. The role of transcriptomics: physiological equivalence based on gene expression profiles. Reviews in Agricultural Science (in press)