

Fig. 3 GMO ダイズおよび非 GMO ダイズの葉から調製したゲノム DNA をテンプレートとして CHM2 プライマーおよび 35S-c RV プライマーを用いて PCR を行い増幅された DNA 産物。LA, LA-Taq DNA polymerase (宝酒造); Ex, Ex-Taq DNA polymerase (サワデー)。G, GMO ダイズ DNA; N, 非 GMO ダイズ DNA; 123M, 123 bp DNA ラダー・マーカ。

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)  
(分担研究報告書)

PCR 法による導入 DNA の検出に関する研究  
分担研究者 石田寅夫 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部教授

研究要旨 組換えDNA食品の一般的検出法を開発するため、公表ベースの資料より安全性が検討された組換えDNA食品の導入DNAを調査し、導入DNAごとの遺伝子の種類、サイズ、制限酵素地図、塩基配列等のバンク化を図り、これらデータの相違を調べ、品種ごとに各遺伝子のPCR法による増幅DNAの電気泳動移動度比較法、制限酵素地図比較法、DNAチップ法等既存の方法及びその組み合わせでどれだけ区別できるかを検討した。

研究目的

本研究は組換えDNA食品の安全性確保の為にPCR法による導入DNAの検出法開発研究に関する。その目的は組換えDNA食品の一般的検出法を開発し、流通する食品の中から組換えDNA食品を検出可能にすることにより、組換えDNA食品の安全性をより確保し、国民の安全な生活の確保を図ることを目的とする。

近年、食品分野において、食品の高品質化や生産性の向上等を目的に「遺伝子組換え技術」を用いた商品が開発され、平成12年3月現在食品29品種、食品添加物6品種の組換えDNA食品について安全性評価指針に従って安全性評価が行われていることが厚生省により確認され、79品種の組換えDNA植物が農林水産省より一般ほ場での栽培又は輸入が認められている。厚生省の安全性評価は今まで任意の仕組みであったが、現在、法的義務化と遺伝子組換え食品の表示が検討されている。しかし、問題はこの安全性評価の確認が申請ベースでしか出来ず、安全性評価が行われていない組換えDNA食品が既存食品と混合され

て覆面的に市場に流通した場合、どうやって組換えDNA食品を検出し、その安全性評価を行うかが緊急かつ最大の重要課題である。

この問題に対し、大豆とトウモロコシに関し、特定の会社が開発した特定の組換えDNA食品に用いられている特定遺伝子または特定プロモーターの配列と電気泳動移動度に着目し、特定の配列のプライマーを用いてPCRで増幅した資料DNAが目的の電気泳動移動度を有するか否か、又は組換えDNAの特定産物に着目し、その抗体が資料タンパク質と抗原抗体反応を起こすか否かで組換えDNA食品の検定を行うことが一部で提唱されている。この方法の問題点は、資料が陰性反応の場合に予想した特定の組換えDNA食品でないと断定できるだけで、それ以外の組換えDNA食品なのか、それとも非組換えDNA食品なのか判断できないことであり、行政の検定としては役に立たない。資料が陰性反応の場合は非組換えDNA食品の可能性が強いと判断できる検定法の開発が強く望まれる。

A. 研究方法

厚生省生活衛生局報道発表資料、厚生省生活衛生局委託による社団法人日本食品衛生協会保存申請書公開部分、農林省農林水産技術会議事務局報道発表資料、同事務局保存申請書公開部分、OECD Biotech Product Database 等の公表ベースの資料より安全性が検討された組換え DNA 食品の導入 DNA を調査し、これを基に国立遺伝研究所の DNA Data Bank of Japan、日本と EU の公開特許公報、アメリカ特許公報、学術文献で必要資料を補足し、組換え DNA 食品の導入 DNA ごとの遺伝子の種類、サイズ、制限酵素地図、塩基配列等のバンク化を図り、これらデータの相違を調べ、品種ごとに各遺伝子の PCR 法による増幅 DNA の電気泳動移動度比較法、制限酵素地図比較法、DNA チップ法等既存の方法又はその組み合わせでどれだけ区別できるかを検討し、更に工夫を加えて全品種について簡便な方法で資料食品が組換え DNA 食品か否か、組換え DNA 食品である場合、どこの会社が開発したどの組換え DNA 食品であるかまで言える検出法を開発する。その際、コンピューターに基礎データを入力することにより検出結果が即座に出力できるようなプログラムソフトも開発する。

(倫理面への配慮)

本研究は組換え DNA 食品の総合的検出法を開発研究することであり、組換え DNA 食品そのものを開発したり、組換え DNA 食品の安全性を調べるわけではない。動物実験も行わないし、臨床試験をするわけでもない。従って、本研究は本質的に倫理面での問題は原則として発生しない。

## B. 研究結果

公表ベースの資料より安全性が検討され

た組換え DNA 食品の導入 DNA を調査した。結果を表 1 に示す。社団法人日本食品衛生協会と農林省農林水産技術会議事務局保存申請書公開部分は複写が禁じられており、閲覧による記憶によるため、時間と労力を要した。

申請書公開部分ベースでは導入 DNA に用いたベクターの名前、導入遺伝子の名前、大きさ、制限酵素地図、導入された DNA の制限酵素地図は概ね開示されているが、DNA の塩基配列はしばしば開示されていない。開示されていない部分については、文献等で内容を補足中であるが、確認実験を要する。確認実験に必要な設備を整備した。

1 例としてトウモロコシについて、導入された DNA のプロモーター、ターミナーター、構造遺伝子の配列順序、サイズ、制限酵素地図を比較検討した結果を表 2、図 1、図 2 に示す。この結果を踏まえ、各トウモロコシ相互を区別するために必要なプライマー、プローブを設計中である。

## C. 考察

公表された資料によれば、組換え DNA 食品中の導入 DNA は Agrobacterium 法または particle gun 法で宿主に導入されており、導入法に基づく導入 DNA の一般的検出法はない。

また、使用プロモーターは P-35S、P-mac、2xocs-p35S、P-nos、P-Kti3、P-r-act、RuBisCO、P-CmoV6、P-PEPC、P-CDPK、P-SsuAra、P-TA29、P-tml、P- $\beta$  conglycinin、P-lectin 等種々であり、かつ、例えば P-35S 一つとっても 0.2kbp、0.32kbp、0.40kbp、0.42kbp、0.51kbp、0.55kbp、0.6kbp、0.8kbp、0.815kbp、0.83kbp、0.9kbp、1.4kbp と種々の大きさの

P-35S が用いられている。使用ターミネータも T-35S、T-nos、T-ocs、T-Tr7、T-tml、T-mas、T-E9、T-Phaeolin、T-7S、T-Kti3、T-pinII、T-D8、Tp、T-Tr7、P-lectin 等種々であり、かつ、例えば T-nos 一つとっても 0.2kbp、0.22kbp、0.25kbp、0.256kbp、0.26kbp、0.27kbp、0.3kbp、0.77kbp と種々の大きさの T-nos が用いられている。従って、特定のプロモーターとターミネーターのプライマーを用いて PCR で増幅しても特定の組換え DNA 食品の特定導入 DNA しか検出できない。

組換え DNA 植物を選択するために npt II、bla、gent 等の抗生物質耐性マーカーを用いているが、組換え DNA 食品の中には組換え DNA 植物を選択後この選択マーカーを除去した例があり、選択マーカーの有無だけでは組換え DNA 食品と非組換え DNA 食品を完全には区別できない。

除草剤耐性、害虫抵抗性、ウイルス抵抗性、日持ち向上性等性質を変える導入遺伝子 pat、oxy、GOX、EPSPS、Bxn、CryIA(b)、CryIA(C)、GmFad2-1、DapA、FLA、RCC2 等の中、アミノ酸配列は変えずに DNA の塩基配列を変え、しかもそれを公表しない例がある。これらに関してはサンプルを取得し、実際に塩基配列を決めておく必要がある。

#### D. 結論

公表された資料からは今のところ、1 つの簡単な方法で組換え DNA 食品か、非組換え DNA 食品かを検出する一般的な方法はない。組換え DNA 食品の導入 DNA に関するデータを集め、データベース化し、幾つかの検出法を組み合わせるより簡単に検出できるシステムを作る必要がある。

次年度はデータベース化と検出システムの構築を行いたい。その過程で生ずる発明発見を特許出願後学会発表、論文発表したい。

#### E. 研究発表

1. 論文発表 無し。
2. 学会発表 無し。

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し。
2. 実用新案登録 無し。
3. その他

添付：表 1、表 2、図 1-1～-3、図 2a～m

表1 組換えDNA食品導入DNAリスト

- 番号・品種・開発者(申請者)[外国申請者]・OECD番号[厚生省番号][農水省番号](商品名)：性質：ベクター(由来)塩基数 bp(制限酵素切断部位)：導入DNA(由来)塩基数 kbp
1. Beet・Hoechst(アグレボ)・T120-7「25」[78](リバディリンクてんさい)：除草剤 Glufosinate 耐性：pOCA18/AC 25.6kbp：PNos/npt II (E.coli)/T'ocs, PCaMV35S /pat(S.viridochromogenesTu494)/T'CaMV35S、Agrobacterium 法
  2. Broccoli・タキイ・[77](BR891)：雄性不稔性、除草剤耐性：pTHW107：bar,barnase
  3. Cauliflower・タキイ・[76](CF156)：雄性不稔性、除草剤耐性：pTHW107：bar,barnase
  4. Chicory・Bejo・RM3-3,RM3-4,RM3-6:除草剤 Glufosinate 耐性、雄性不稔性、Kanamycin 耐性
  5. Corn・AgrEvo (アグレボ)・MS6[71]：除草剤 Glufosinate 耐性、雄性不稔：pVE136：bar, barnase
  6. Corn・Ciba-Geigi (チバガイギ)・Event176「7」[26]:Lepidopteran 昆虫抵抗性:pCIB4431 11043bp(*Bam*H I 1487, 6540,8719, *Eco*R I 1139, 6558, *Hind*III 1, *Kpn* I 3642, 6564)：Pollen Pro1.49/ CryIA(b)(Bt)1.94/Int9 0.11/35S term0.16, amp0.86, Ori0.5, PEPC Pro2.32/CryIA(b)(Bt) /Int90.11/35S term：pCIB3064 3986bp(*Bam*H I 3297,*Bgl* II 545, 3967,*Eco*R I 635,3737, *Hind*III 3276,*Kpn* I 513, 635,*Pst* II 3288)：35S Pro0.64/bar0.6/35S term,amp,Ori,lacZ0.04
  7. Corn・Dekalb (モンサント・東食)・DBT418「27」[29]：除草剤 Glufosinate 耐性・害虫 Lepidopteran 昆虫抵抗性：pDPG165(pUC19)4606bp(*Alw*N I 3837,*Eco*R I 1977,*Hind*III 1,*Scal*2877,*Sma* I 877, 1446,)：35Spro0.83/bar(*Str.hygroscopicus*) 0.55/Tr7 3'0.52, AmpR,Coliori：pDPG320(pBluescript II SK(-))5976bp(*Alw*N I 5174,*Eco*R I 3103,*Nae* I 3672,*Not* I 17,3115,*Pst* I 454, *Sca* I 1214,*Xpa* I 25,1036)：35S0.43/Adhint/pin II (*S.tuberosum*)1.51/Tr7-3' 0.32：pDPG699(pBluescript II SK(-))6282bp(*Afl* III 5888,*Alw*N I 5477, *Hae* I 3955,*Kpn* I 2440,3428,*Nco* I 596,*Not* I 3397, *Pst* I 3978, *Sad* I 1,*Sal* I 172, *Sca* I 4517,*Sma* I 2444)：2xOCS-35Spro0.15/Adhintron VI 0.42/cryIA(C) (Btk)1.85kbp/pin II 3' 0.934, fl(-)cri,AmpR,ColEori, particlegun 法
  8. Corn・Dekalb(モンサント・東食)・DLL25(B16)「26」[28]：除草剤 Glufosinate 耐性：pDPG165(pUC19)4.6kbp(*Alw*M12.90,Asp700 0.74,4.16,*Bam*H I 1.40, *Bgl* III 0.85,*Bsal*3.63,*Eco*R I 0.25, *Eco*R V0.64,1.50,*Hind* III 2.20, *Nco* I 1.90,*Sac* I 0.54, *Sca* I 2.05,4.04,*Sma* I 0.86,1.40,*Ssp* I 4.36)：CaMV35Spro0.86 /bar0.55(*St.hygro -scopicus*) /Tr7 の3'0.52(*A.tumefaciens*), bla 一部 0.86, lacZ0.50, ColE-ori0.55 kbp、particlegun 法
  9. Corn・Hoechst(ヘキスト)・T14, T25「11」[21]：除草剤 Glufosinate 耐性：pUC/AC 3933bp(*Bam*H I 877,1201, *Eco*R I 403,1747,*Hind* III 399, *Pst* II 625, *Sal* I 631,1189)：ampr0.86, ori-pUC0.55, P-35S0.52/PAT0.53/T-35S0.20kbp

10. Corn · Monsanto (モンサント) · Mon810 [8] [22](Yield Guard Corn) : Lepidopteran 昆虫抵抗性 : pV-ZMBK07 7794bp(*EcoR* I 5073, *Nco* I 1609,6874,*Not* I 144,5347) : E35S0.64/hsp7intron0.81/cryIA(b)(Btk)3.47/NOS3'0.27,LAC0.62,oripUC0.65,npt II (E.coli)1.14kbp、particlegun 法
11. Corn · Monsanto (モンサント) · GA21 [28] [51](Roundup Ready Corn) : 除草剤 Glufosinate 耐性 : pUC19, pDPG 434(pBluescript II SK(-)) 6,128bp(*Afl* III 2277, 5712, 5977,*Bgl* II 3848,3990,4557,*EcoR* I 3111,4128, *Hind* III 5862,*Not* I 2692, 6122,*Pst* I 2735,4126,4545,*Sac* I 2679, 3622,*Sph* I 2729,*Ssp* I 584,*Xba* I 2699, 5857) : ColE1ori(pBluescript II SK(-))0.65,bla(pBluescript II SK(-))一部 0.86, lacZ(pUC19)0.24, r-act5 1.37/OTP0.37/部位特異的突然変異 mEPSPS(*Zea mays*)1.34/NOS3'0.24kbp、particlegun 法
12. Corn · Monsanto (モンサント) · Mon802[23] : 除草剤 Glufosinate 耐性、Lepidopteran 昆虫抵抗性 : SM-CryIA(b)-Btk/Glyphosate oxidoreductase-Achromobacter/ SM-EPSPS-Agrobacterium/SM-npt II (E.coli)
13. Corn · Monsanto (モンサント) · Mon832[36] : 除草剤 Glufosinate 耐性 :
14. Corn · Northrup (モンサント) · Bt11 [4] [25](X4334CBR,X4734CBR 系) : 除草剤 Glufosinate 耐性、Lepidopteran 昆虫抵抗性 : pZO1502 : 35S/CryIA(b)(Btk)/Nos, 35S/IVS2/PAT/Nos, AMP<sup>r</sup>
15. Corn · Pioneer (パイオニア) · MON809[37] : 除草剤 Glufosinate 耐性 · Kanamycin 耐性 · Lepidopteran 昆虫抵抗性
16. Corn · Pioneer · PHI-CORN-IMI-IR(XA17,3751IR,3417IR 系) : 除草剤 Imidazolinone 耐性 : ALS 変異
17. Corn · Pioneer (パイオニア) · TC676, TC678, TC680 : 雄性不稔
18. Corn · Plant(プラント) · CBH351[40]除草剤 Glufosinate 耐性 : pDE110 : bar, cry9C、particlegun 法
19. Corn · Plant (ヘキスト) · MS3 : 除草剤 Glufosinate 耐性 · 雄性不稔(申請棄却)
20. Cotton · Calgene(モンサント) · BXN [17] : 除草剤 Bromoxynil 耐性 : pBrx75(A.tumefaciens pCGN1559) : tml/bxn(*K.pneumoniae* subsp.ozaenae)/35S2.7kbp, 35S/ npt II (E.coli)/tml2.512kbp、Agrobacterium 法
21. Cotton · Calgene(モンサント) · Bollgard with BXN Cotton [24] : 害虫オオタバコガ等鱗翅目昆虫抵抗性 · 除草剤 Bromoxynil 耐性 : pCGN4084(*A.tumefaciens* 由来両境界型)21.5kbp : bxn(*K.pneumoniae* subsp.ozaenae), 削除型 cryIA(C) (Btk), npt II (E.coli Tn5), gentr(非導入)
22. Cotton · Calgene(モンサント) · Events31807,31808[56] : Lepidopteran 昆虫抵抗性 · 除草剤 Bromoxynil 耐性 : pBR322 : cryIA, npt II
23. Cotton · DuPont · 19-51a : 除草剤 Sufonylurea 耐性 : SM-Acetolactate synthase -Tobacco
24. Cotton · Monsanto(モンサント) · 531,757,1076 [10] [30,31](Bollgard TM Insect Resistant

- Cotton, IngardCotton) : pBR322 ; P-E35S0.62/改変 CryIA(C) (Btk)3.5/β Conglycinin7S3' 0.43,SM-Amino glycoside3'-adenyltransferase-E.coli/SM-npt II (E.coli) Agrobacterium 法
25. Cotton · Monsanto(モンサント) · 1445,1698 [16] [41](RoundupReadyCotton) : 除草剤 Glyphosate 耐性 : pPV-GHGT07(A.tumefaciens) : E9/CP4EPSPS(Agrobacterium CP4)/CTP/CmoVb/aad/npt II (E.coli)/ori-V6.1kbp 未満、Agrobacterium 法
  26. Cotton · Monsanto(モンサント) · 1849 系[72] : 害虫抵抗性、除草剤耐性 : pBR322 : cryA, bxn, npt II
  27. Cucumber · 青森県 · [75](T1-7 系) : CMV 抵抗性 : p B I 121-Hm C P : CMVcp,npt II ,HPH,GUS、Agrobacterium 法
  28. Cucumber · 農業生物資源研究所 · [58](CR-29,32,33 系) : カビ抵抗性 : p B I 121 : CaMV35S0.6/chitinase0.8/, nos pro/npt II 0.8kbp/nos term, 35S pro/GUS/nos term
  29. Flax 亜麻 · Saskatchewan 大学 · FP967(CDCTriffid 系) : 除草剤 Sufonylurea 耐性、Kanamycin 耐性
  30. Oilseedrape · AgrEvo (ヘキスト) · [5] (イノベータ) : 除草剤 Glufosinate 耐性
  31. Oilseedrape · Calgene · pCGN3828-212/86-18, pCGN3828-212/86-23(High laurate canola23-198,23-18-17) : ACP thioesterase(U.californica),SM-npt II (E.coli)
  32. Oilseedrape · Hoechst(ヘキスト) · HCN10 [19] [18] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : pOCA(Klebsiella aerogenes pRK290 由来 pOCA/AC : NOSpromoter/npt II (E.coli) /OCStem1.7kbp, 35Spro/pat (Str.viridochromogenesTu494)/35Stem 1.3kbp, Agrobacterium 法
  33. Oilseedrape · Hoechst (ヘキスト) · HCN-28 : 除草剤 Glufosinate 耐性 :
  34. Oilseedrape · Hoechst (ヘキスト) · HCN-92[18] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : PAT, npt II
  35. Oilseedrape · Hoechst(ヘキスト) · T45 [15] [20] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : PAT
  36. Oilseedrape · Monsanto(モンサント) · GT73[13](RoundupReadyCanola) : 除草剤 Glyphosate 耐性、EPSPS 耐性 : Glyphosate Oxidoreductase
  37. Oilseedrape · Monsanto · ZSR500,ZSR502,ZSR503:除草剤 Glyphosate 耐性:Inter-specific cross with GT73(RoundupReadyCanola)
  38. Oilseedrape · Monsanto · GT200 (RoundupReadyCanolaGT200):除草剤 Glyphosate 耐性 : Glyphosate Oxidoreductase
  39. Oilseedrape · Pioneer · PHI-CAN-IMI-IR(lines-NS738,NS1471,NS1473) : 除草剤 Imidazolinone 耐性 : ALS 変異
  40. Oilseedrape · Plant(アグレボ) · PHY23 [29] [27] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : pTTM8RE (pGV825)8.2kbp : PNos/npt II (Escherichia coli)/3'ocs, PSsuAra/tp/bar (Streptomyces hygroscopicus)/3'g7 , PTA29/barnase(B. amyloliquefaciens)/3'nos , pTVE74RE(pGV825)8.1kbp : PNos/npt II /3'ocs , PSsuAra/tp/bar/3'g7 , PTA29

- /barstar(B.amyloliquefaciens)/3'nos、Agrobacterium 法
41. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ PGS1 [6] : 除草剤 Glyphosate 耐性
  42. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ PGS2 [13] : 除草剤 Glyphosate 耐性
  43. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ PHY14, PHY35 [12] [19] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : barnase, barstar, npt II
  44. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ PHY36 [14] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : bar, barnase, barstar, npt II
  45. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ MS8 [21] [61] : 除草剤 Glufosinate 耐性、雄性不稔性 : pTHW107(pGSV1) : PSsuAra/bar(Str.hygroscopicus)/3'g7 ; PTA29/ barnase (B.amyloliquefaciens)/3'nos、Agrobacterium 法
  46. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ RF3 [22] [62] : 除草剤 Glufosinate 耐性、稔性回復性 : pTHW118(pGSV1) : PSsuAra/bar(Str.hygroscopicus)/3'g7 , PTA29/ barstar (B.amyloliquefaciens)/3'nos、Agrobacterium 法
  47. Oilseedrape ・ Plant(ヘキスト) ・ MS8RF3[39] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : MS8 交雑種と RF3 交雑種の F1 : pTHW107 ・ pTHW118 (pGSV1) : PSsuAra/bar(Str. hygroscopicus)/3'g7
  48. Oilseedrape ・ Plant ・ MS1,RF1[19](PGS1=MS1 ・ RF1hybrid) : 雄性不稔性・稔性回復性、除草剤 Glufosinate 耐性 : bar, npt II
  49. Oilseedrape ・ Plant ・ MS1 ・ RF2[27](PGS2=MS1 ・ RF2hybrid) : 雄性不稔性・稔性回復性、除草剤 Glufosinate 耐性 : bar, barnase, barstar, npt II
  50. Oilseedrape ・ Rhone(ローヌ) ・ WESTAR-Oxy-235 [23] [38] : 除草剤 Bromoxynil 系耐性 : pRPA-BL-235 : pTiA6T-DNA 左境界配列 0.56/CaMV35S0.90 /RuBisCo5SU5'0.05/oxy(K.pneumoniae subsp.ozaenae)1.15/nos0.25,Lac2/Lac1 0.45/ pTiA6T-DNA 右境界配列 0.503kbp、Agrobacterium 法
  51. Papaya ・ Cornell 大学(マック) ・ 55-1,66-1[73] : Papaya Ringspot Virus 耐性 : pGA482GG : PRV-CMV16codon(Papaya Ringspot Virus Coat Protein)
  52. Potato ・ Monsanto(モンサント) ・ BT06,BT10,BT12,BT16,BT17,BT18,BT23 [3] (NewleafTM potato) : Coleopteran 昆虫抵抗性 : Cry III A(Btt), npt II
  53. Potato ・ Monsanto(モンサント) ・ ATBT04-6, ATBT04-27, ATBT04-30, ATBT04-31, ATBT04-36 [9] (NewleafTM Atlantic potato) : Coleopteran 昆虫抵抗性 : Cry III A(Btt), npt II
  54. Potato ・ 北海道 ・ [9] (メークイン) : ウイルス抵抗性 : ジャガイモ葉巻ウイルス外皮タンパク質
  55. Redbean ・ 農業研究センター ・ [57](AR-9) : 害虫抵抗性 : pBIN19 : lectin pro/amylase inhibitor/lectin term, Nos pro/npt II/Nos term
  56. Rice ・ 岩手生工研 ・ [50](4) : 除草剤ピアラフォス耐性
  57. Rice ・ 日本たばこ ・ [8]KA45,48,119,130 (アキヒカリ) : 低グルテリン : pSB1 : antisense,



guruterin

58. Rice ・日本たばこ ・[43] (月の光 H39,H75) : 低グルテリン : pSB1 : antisense, guruterin
59. Rice ・農業環技研センター ・[4](キヌヒカリ) : ウイルス病抵抗性 : イネ縞葉枯ウイルス外皮タンパク質
60. Rice ・農業研究センター ・[3](日本晴 16-2) : ウイルス病抵抗性 : イネ縞葉枯ウイルス外皮タンパク質
61. Rice ・農業研究センター ・[32](日本晴 20-2,20-3) : ウイルス病抵抗性 : イネ縞葉枯ウイルス外皮タンパク質
62. Rice ・三井東圧 ・[7] (キヌヒカリ) : 低アレルギー米 : rice allergy antisense
63. Rice ・AgrEvo (アグレボ) [67](LLRICE06) : 除草剤 Glufosinate 耐性 : pB5/35Sbar : bar
64. Rice ・AgrEvo (アグレボ) [68](LLRICE62) : 除草剤 Glufosinate 耐性 : pB5/35Sbar : bar
65. Rice ・Monsant (モンサント)[74]730, 1107, 1316, 1702, 1708, 1763 系 : 除草剤 Glyphosate 耐性 : pMON25497(pUC119) : arabEPSP CTP0.23/CP4EPEPS1.37/NOS3' 0.26kbp , particlegun 法
66. Soybean ・AgrEvo ・W62,W98,A2704-12, A2704-21,A5547-35[55] : 除草剤 Glufosinate 耐性 : pB2/35SacK : pat, Gus
67. Soybean ・AgrEvo ・A5547-127[69] : 除草剤耐性 : pB2/35SacK : pat
68. Soybean ・AgrEvo ・GU262[70] : 除草剤耐性 : pB2/35SacK : pat
69. Soybean ・Monsant (モンサント) ・[1] (RoundupReady Soybean) : 除草剤 Glyphosate 耐性 : pV-GMGT04 10511bp(*Bam*H I 436, 1624,3160, 5535,6593, 7781,*Bgl* II 2058, 5048, 6159, 10187,*Eco*R I 454, 3181, 5684, 6087, 7763, *Hind* III 155, 2707,*Nco* I 1513, 1636, 5042, 6581, 6704, 959,*Not* I 144, 8064,*Pst* I 993, 1215, 1513, 2705, 2717, 7010, 7232, 9978) : CMoVaE35S0.61/CTP0.22/CP4EPSPS1.36/NOS3'0.26, PMAS0.42/GUS1.81/7S3'0.43, CMVb0.57/CTP0.22/CP4EPSPS1.36/NOS3'0.26,Npt II 1.32, oripUC0.65,LAC0.24
70. Soybean ・Monsant(モンサント) ・40-3-2[10]: 除草剤 Glyphosate 耐性:CP4EPSPS, CPT4
71. Soybean ・OptimumQualityGrain(デュボン)G94-1,G94-19,G-168(260-05)[54] : 高オレイン酸 : pBS43 10303bp(*Bam*H I 3344,*Hind* III 1,3308,*Kpn* I 6618,*Nco*I4748,*Pst* I 2105,*Sal* I 3332,7403) : amp1.0,CaMV35Spro1.4/GUS1.8/NOS3'0.77,  $\beta$  Con -glycinin pro(Soy) 0.606/GmFad2-1(Soy) 1.46/Phaseolin3',ColEOri0.622kbp,lacZ : pML102 6247bp : amp1.0,Kti3pro 2.0/ dapA 1.096(*C.orynebacterium*)/ Kti3term 0.250、particlegun 法
72. Squash カボチャ ・Seminis [Upjohn] ・ZW20 : WMV2 ・ZYMV 抵抗性 : coat protein WMV2/ZYMV
73. Squash ・Seminis [Upjohn] ・CZW-3 CMV ・WMV2 ・ZYMV 抵抗性:SM- npt II (*E.coli*)
74. Tobacco ・日本たばこ : ウイルス病抵抗性 : キュウリモザイクウイルスのサテライト RNA の cDNA
75. Tobacco ・SEITA ・C/F/93/08-02 : 除草剤 Oxylin 耐性 : nitrilase(*K.ozanae*)

76. Tomato · Agritope · 341N : 日持ち性向上 : SM-S-adenosylmethionine transferase
77. Tomato · Calgene(麒麟麦酒) : FLAVR SAVR [20] (フフレーバーセーパートマト) : 日持ち性向上 : pCGN1436(A.tumefacienspCGN1547) : mas5'/npt II (E.coli)/mas3'/CaMV35S5'/CaMV35S/FLAVRS AVR/tlm3'1.6kbp、Agrobacterium 法
78. Tomato · DNA · 345-4 : 日持ち性向上 : ACCsynthase(Tomato)/ SM- npt II (E.coli)
79. Tomato · Monsanto · 8338 : 日持ち性向上 : ACCdeaminase(Ps.chlororaphis)/ SM- npt II (E.coli)
80. Tomato · Zeneca&Petoseed(ゼネカ、カゴメ) · B,Da,F(ICI13)[15] : 日持ち性向上 : Polygalacturonase(Tomato)/ Polygalacturonase antisense(Tomato)/SM- npt II (E.coli)
81. Tomato · Zeneca&Petoseed(ゼネカ、カゴメ) · B,Da,F(ICI19)[14] : 日持ち性向上 : Polygalacturonase(Tomato)/ Polygalacturonase antisense(Tomato)/SM- npt II (E.coli)
82. Tomato · 野菜 · 茶業試験場 · [11](405) : CMV 抵抗性 : CaMV35Spro0.85 /CMVcp0.391/Tnos0.3, Pnos0.3/Npt II 1.5/tnos0.3kbp
83. Tomato · 野菜 · 茶業試験場 · [12](707) : CMV 抵抗性 : CMVcp
84. Tomato · 野菜 · 茶業試験場 · [24](117,1046,1208) : CMV 抵抗性 : CMVcp
85. Tomato · 北海道農業試験場 · [59](no.47) : CMV 抵抗性 : CMV サテライト RNA
86. Wheat · Cyanamid · SWP965001 : Imidazolinone 耐性 : 変異

(注 : 厚生省生活衛生局報道発表資料、厚生省生活衛生局委託による社団法人日本食品衛生協会保存申請書公開部分、農林省農林水産技術会議事務局報道発表資料、同事務局保存申請書公開部分、OECD Biotech Product Database より abc 順に作成。本文、表、図中で用いた略語の意味は以下の通りである。アグレボ : アグレボジャパン(株) 色変わり : Modified flower colour キチナーゼ : 0.8kbp イネ由来キチナーゼ gene cDNA サテライト RNA cDNA : 391bp CMV 由来 (トマト CMV 抵抗性) 除草剤耐性 : herbicide tolerant タバコ産業 : 日本タバコ産業(株) デュポン : Du Pont Ag. 稔性回復性 : Fertility restorer パイオニア : パイオニアハイブレッッドジャパン(株) 日持ち向上 : Increased the vase life 日持ち性向上 : Fruit ripening altered ヘキスト : ヘキスト・シェーリング・アグレボ(株) 変異 Gox : Agrobacterium tumefaciens 由来 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 遺伝子 モンサント : 日本モンサント(株) ローヌ : ローヌ・プーラン油化アグロ(株) 雄性不稔性 : Male sterility 2xocs-p35S : 2 つの ocs エlement 逆向きと P35S90bp 連結キメラ promoter 7S3' : 大豆 7S 種子貯蔵タンパク質  $\beta$  Conglycinin  $\alpha$  サブユニット 3' 非翻訳領域 aad : 3''(9)-o-Amino glycoside3'-adenyltransferase-E.coli A.tumefaciens : Agrobacterium tumefaciens acc : l-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase Adh intron I : Zea mays 由来 Alcohol dehydrogenase のイントロン I ALS : acetolactate synthase Amp<sup>r</sup> 又は bla : pBR322 由来アンピシリン耐性  $\beta$  ラクタマーゼ  $\beta$  lactamase 遺伝子 An.majus : Anthirrhum majus arabEPSPS-CTP : Arabidopsis thaliana EPSPS 軌道遺伝子 B.amyloliquefaciens : Bacillus amyloliquefaciens B.licheniformis : Bacillus

licheniformis **B.stearothermophilus** : Bacillus stearothermophilus **B.subtilis** : Bacillus subtilis  
**Bar** : Streptomyces hygroscopicus 由来除草剤グルホシネート耐性 bialophos resistance, Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) 遺伝子 **barnase** : Bacillus amyloliquefaciens 由来雄性不稔遺伝子 **barstar** : B. amyloliquefaciens 由来稔性回復遺伝子 **Bt** : Bacillus thuringiensis **Btk** : Bacillus thuringiensis var. kurstaki 73-HD **Bejo** : Bejo Zaden BV (Netherlands) **bp40** : Flavanoid 3'5'hydroxylase(Viola sp.) **Bxn** : Klebsiella Pneumoniae subsp. Ozaenae 由来除草剤 Buctril プロモキシル(3,5-ジプロモ-4-ヒドロキシベンゾニトリル)耐性 nitrilase 遺伝子 **Cat** : chloramphenicol resistance **Chicory** : Radicchio rosso 代用コーヒー **CaMV35S, P-35S** : cauliflower mosaic virus 35SRNA promoter **CDPK** : calcium-dependent calmodulin-independent protein **CmoVaE35S** : cauliflower mosaic virus 35S promoter **CMoVb** : figwort mosaic virus 35S promoter **Cmv** : cauliflower mosaic virus **CMV** : Cucumber mosaic virus **CMVcp** : Cucumber mosaic virus coat protein **Coleopteran** : Colorado Potato Beetle  $\beta$  conglycinin promoter : 大豆由来 **ColE1ori** : pBR322 複製開始領域 **Corn** : Zea mays **Cotton** : Gossypium sp. **CP4EPSPS** : Agrobacterium CP4 株由来除草剤 glyphosate tolerance 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 gene の C 末端遺伝子 **CPT4** : chloroplast transit peptide **CryIA(b)** : B. thuringiensis var. Kurstaki **CryIA(b)** 欠落改変 : B. t. 由来 CryIA(b)C 末コード欠落・塩基配列改変 **CryIA(C)(Btk)** : Bacillus thuringiensis var. Kurstaki HD-73 由来アワノメイガ等鱗翅目昆虫抵抗性遺伝子 **CryIA(C)** 改変 : B. thuringiensis subsp. Kurstaki HD73 株由来害虫抵抗性 gene (Adang ら 1985) の 99.4% 同ジアミノ酸配列塩基配列改変 **CryIA(C)** 削除型 : Bacillus thuringiensis var. Kurstaki HS-73 由来オオタバコガ等鱗翅目昆虫抵抗性遺伝子 **Bt toxin** の N-terminal portion **CTP** : Petunia hybrida 由来プラスミド移行配列 **Cyanamid** : Cyanamid Crop Protection(USA) **DapA** : Corynebacterium 由来ジヒドロピロリン酸合成酵素遺伝子 **D.caryophyllusL** : Dianthus caryophyllus L. **Dekalb** : Dekalb Genetics Corporation(USA) **DFR** : dihydroflavonol reductase **DNA** : DNA Plant Technology Corporation(USA) **E35S** : P35S の二重ハンサー領域 **E.coli** : Escherichia coli **F3',5'H** : Flavanoid 3'5'hydroxylase **FLA** : FLAVRSAVR TM 遺伝子: アンチセンス・ポリガラクトクロナーゼ遺伝子 **Flax** 亜麻: Linum usitatissimum **Florigene E.** : Florigene Europe B.V.(the Netherlands) **Florigene Pty.** : Florigene Pty.Ltd(Australia) **Gent** : pPHIJI 由来ゲンタマイシン耐性 **GmFad2-1** : 大豆由来 GmFad2-1 遺伝子 **Glufosinate** : Glufosinate ammonium : Phosphinothricin **Gus** : E.coli 由来  $\beta$ -glucuronidase **GOX** : Achromobacter sp. LBAA の glyphosate oxidoreductase gene 由来の変異体 U247 の C 末 **GOX-CTP** : A. thaliana ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase(SSUTA/GP1) 由来 GOX 軌道遺伝子 **hsp70** : maize heat shock protein 70 **Hoechst** : Hoechst Schering AgrEvo GmbH **Increased the vase life** : 日持ち向上 **Int9** : PEPC intron#9 : Increase expression of cryIA(b) **IVS2** : トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ IS(AdhI-S)gene のイントロン **IVS6 or Adh intron VI** : Zea mays 由来 Alcohol dehydrogenase のイント

ロン *K.pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae* LacZ : *E.coli lac* のコード配列の一部で Plac promoter と pUC2 19 由来  $\beta$ -D-gal の lacZ の部分コード LB : pTiA6 の T-DNA 由来左境界配列 Lectin promoter と terminator:インゲンマメ由来 Lepidopteran:European corn borer アワノメイガ等鱗翅目 luxA, luxB : bioluminescent marker mEPSPS : トウモロコシ由来除草剤グルホシネート耐性 EPSPS 遺伝子部位特異的変異 Modified flower colour : 色変わり NOS3' , T-nos : nopaline synthase 3'非翻訳領域 Npt II : Kanamycin resistance, Tn5 neomycin phosphotransferase type II N.tabacum : *Nicotiana tabacum* Oilseedrape : *Brassica napus* L. Ori : *E.Col* 由来 pBR322Ori 配列 OriV : pK2 由来 replication origin Ori322/rop:pBR322 の断片で *E.coli* の pV-GHBK04 を維持するための replication origin と replication of primer(rop) region Ori-pUC : *E.coli* plasmid複製開始点 OTC : *Helianthus annuus* と *Zea mays* の RuBisCo の N 末端にある葉緑体輸送ペプチド配列の最適化 oxy : *Klebsiella Pneumoniae* subsp. *Ozaenae* 由来 oxy 遺伝子 Pat : *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 由来除草剤グルホシネート耐性 Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) 遺伝子 P-CDPK : calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase promoter PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase P-Kti3 : 大豆由来トリプシンインヒビター 3 遺伝子オープンフレームの上流 promoter P-nos : nopaline synthase promoter P-PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase promoter P-r-act : プロモータと第一イントロン含有 rice action 1 gene の 5'非翻訳領域 pRiori : Ri プラスミド pRiHRI 由来複製開始領域 P-tml : pTiA6 の tml gene promoter PAT : Phosphinothricin acetyl transferase Pioneer : Pioneer Hi-Bred International Plant : Plant Genetic Systems P-mac : mas promoter と 35S promoter のエンハンサーを連結 PMAS : TR2'mannopine synthase promoter Potato : *Solanum tuberosum* pro : promoter PRV : Pseudo Rabiees Virus ブタ Aujeszky's 病 Ps.chlororaphis : *Pseudomonas chlororaphis* RB : nopaline type T-DNA の right border 24bp 含有 pTi37 由来 DNA 右境界, pTiA6 の T-DNA 由来右境界配列 RCC2 : イネ由来キチナーゼ (イチゴ C-5 うどん粉病抵抗性) Rhone : Rhone-Poulenc Agrochimie RuBisCO : トウモロコシ由来 SSU の非翻訳領域エンハンサー SEITA : Société National d' Exploitation des Tabacs et Allumettes(France) Seminis : Seminis Vegetable Inc. S.tuberosum : *Solanum tuberosum* ポテト Soybean : *Glycin max* Squash : *Cucurbita pepo* カボチャ Sta.aureus : *Staphylococcus aureus* Sta.faecalis : *Staphylococcus faecalis* Streptoc.thermophilus : *Streptococcus thermophilus* Str. hygrosopicus : *Streptomyces hygrosopicus* Str.viridochromogenes : *Streptomyces viridochromogenes* surB : acetolactate synthase T-7S : soybean の  $\beta$  conglycinin gene の  $\alpha$  subnit の 3'非翻訳領域 T-E9 : エンドウの nbcSE9 gene の 3' T-Kti3 : 大豆由来トリプシンインヒビター 3 遺伝子終止コドン 3'側 Kti3 転写 terminator 配列 T-mas : pTiA6 の T-DNA 由来マンソピン合成酵素 mas(Transcript7)gene の polyadenylator region Tn5 : transposon segment T-ocs : octopine synthase terminator T-Phaeolin : インゲン由来ファゼオリン terminator T-pinII : ばれいしょ *Solanum tuberosum*

の pRJ15 由来プロテアーゼインヒビター II 遺伝子、18bp の 3'末端非翻訳領域、イントロンを含む pinII たんぱく質コード領域、3'末端非翻訳領域と推定転写終結領域からなる 3'末端配列 934bp を含む、プロテアーゼインヒビター II 遺伝子の最後の 10bp と 3'末端非翻訳領域と推定転写終結領域からなる 3'末端配列 934bp T-tml : pTiA6 の tml gene の polyadenylator region T-Tr7, Tr7-3' : A.tumefaciens T-DNA 転写 7 の 3'非翻訳領域 Tobacco : Nicotiana tabacum L. Tomato : Lycopersicon esculentum Term : terminator U.californica : Umbellularia californica Valio : Valio Ltd(Finland) Vemie : VemieVeterinar Chemie GmbH(Germany) Wheat : Triticum aestivum WMV2 : Watermelon mosaic virus ZYMV : Zucchini yellow mosaic virus)

表-2. トウモロコシへの導入 DNA の各種制限酵素により切断されるバンドの本数予測

	4	7-1	7-2	8	11	26	27-1	27-2	27-3	28
<i>Bam</i> H I	4	3	1	1	3	2	1	1	1	1
<i>Bgl</i> II	3	1	3	1	1	2	1	1	1	4
<i>Kpn</i> I	2	1	2	1	3	1	1	1	2	1
<i>Nco</i> I	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
<i>Pst</i> I	2	1	1	1	2	1	1	3	1	3
<i>Sma</i> I	3	1	1	1	1	3	3	1	2	1
<i>Eco</i> R I	1	2	1	2	1	1	1	1	1	3
<i>Eco</i> R V	1	1	2	1	2	3	1	1	1	1
<i>Hind</i> III	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2
<i>Sac</i> I	3	1	1	1	1	2	1	1	1	2
<i>Sal</i> I	5	1	1	1	3	1	1	1	2	1
<i>Xba</i> I	4	1	1	1	1	1	1	2	1	2
<i>Afl</i> II	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
<i>Asp</i> 700	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
<i>Sca</i> I	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
<i>Pvu</i> II	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1

No.4 Bt11, No.7 Event176, No. Mon810, No.11 T14,T25, No.26 D1125,

No.27 DBT418, No.28 GA21

図1-1 組換トウモロコシの導入遺伝子(1)

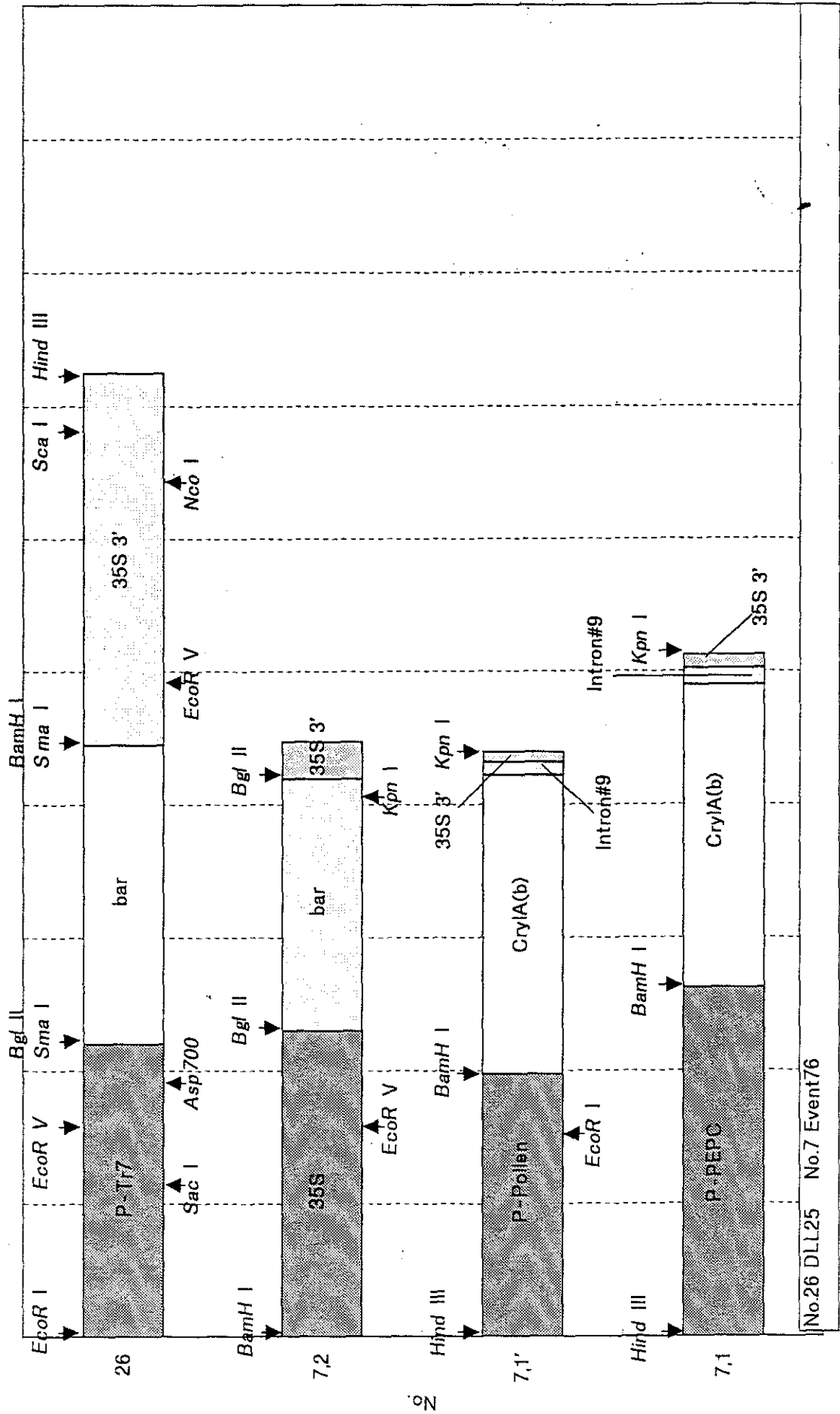


図1-2 組換トウモロコシの導入遺伝子(2)

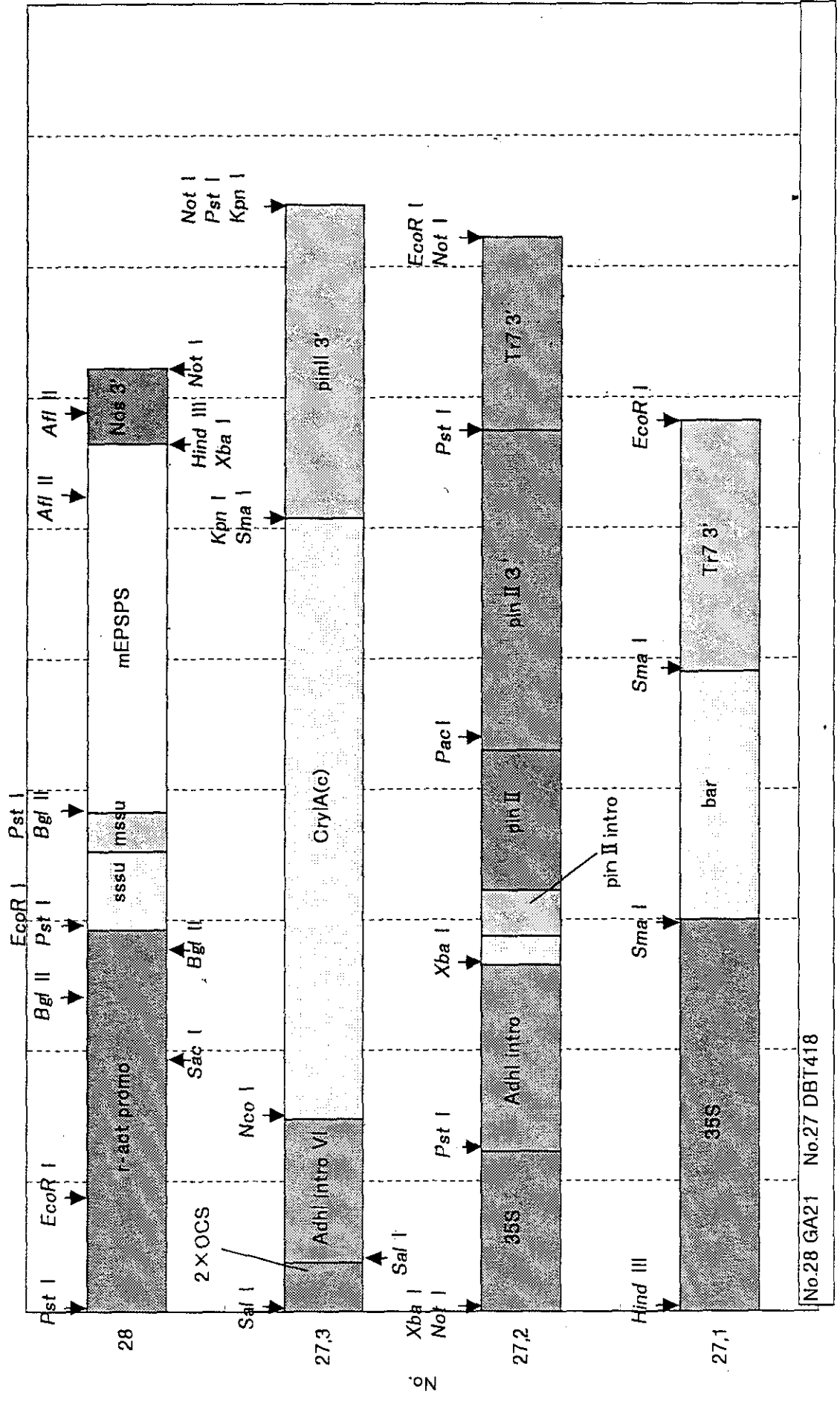




図1-3 組換トウモロコシの導入遺伝子(3)

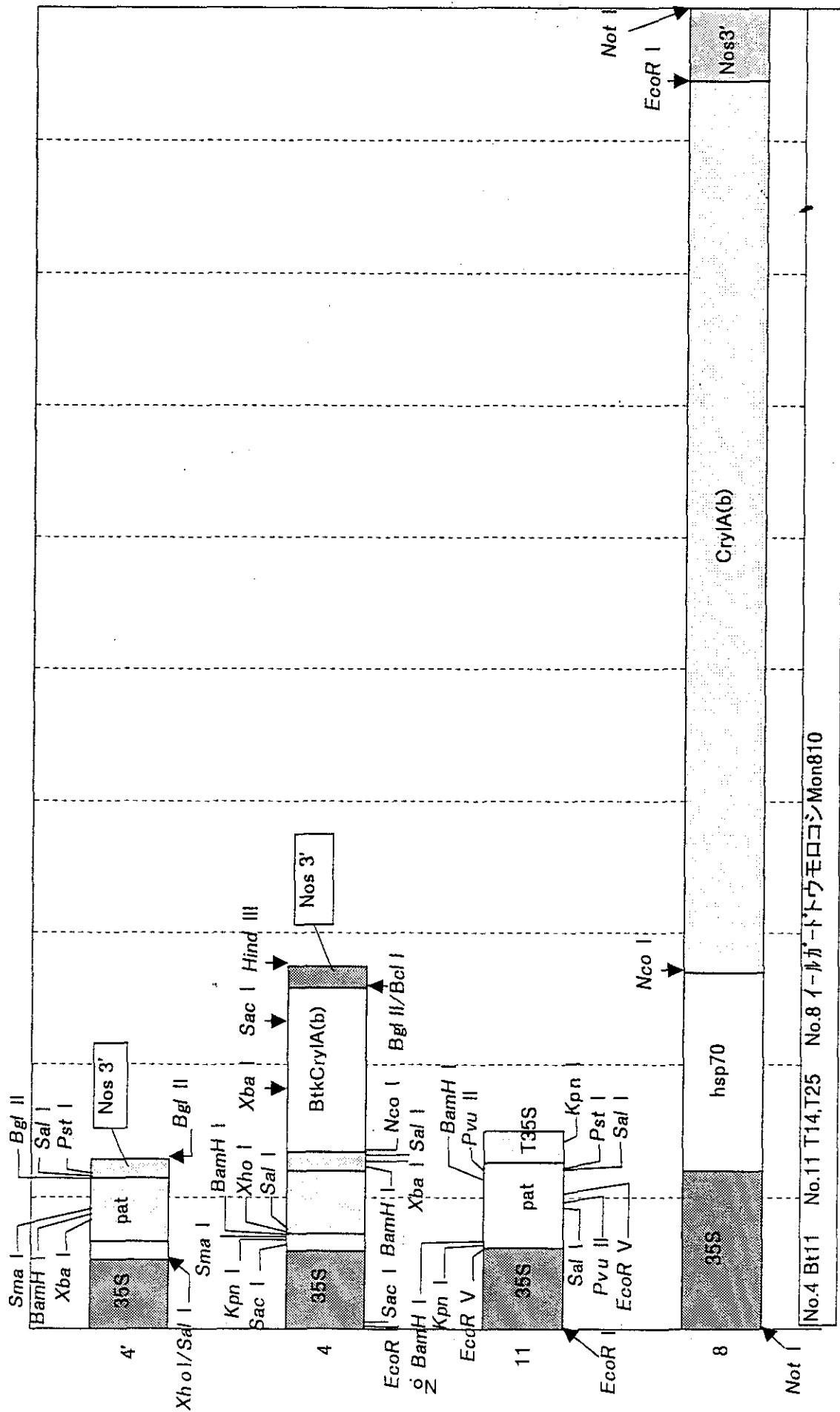


図 2-a. トウモロコシの導入遺伝子のBamHIによる切断

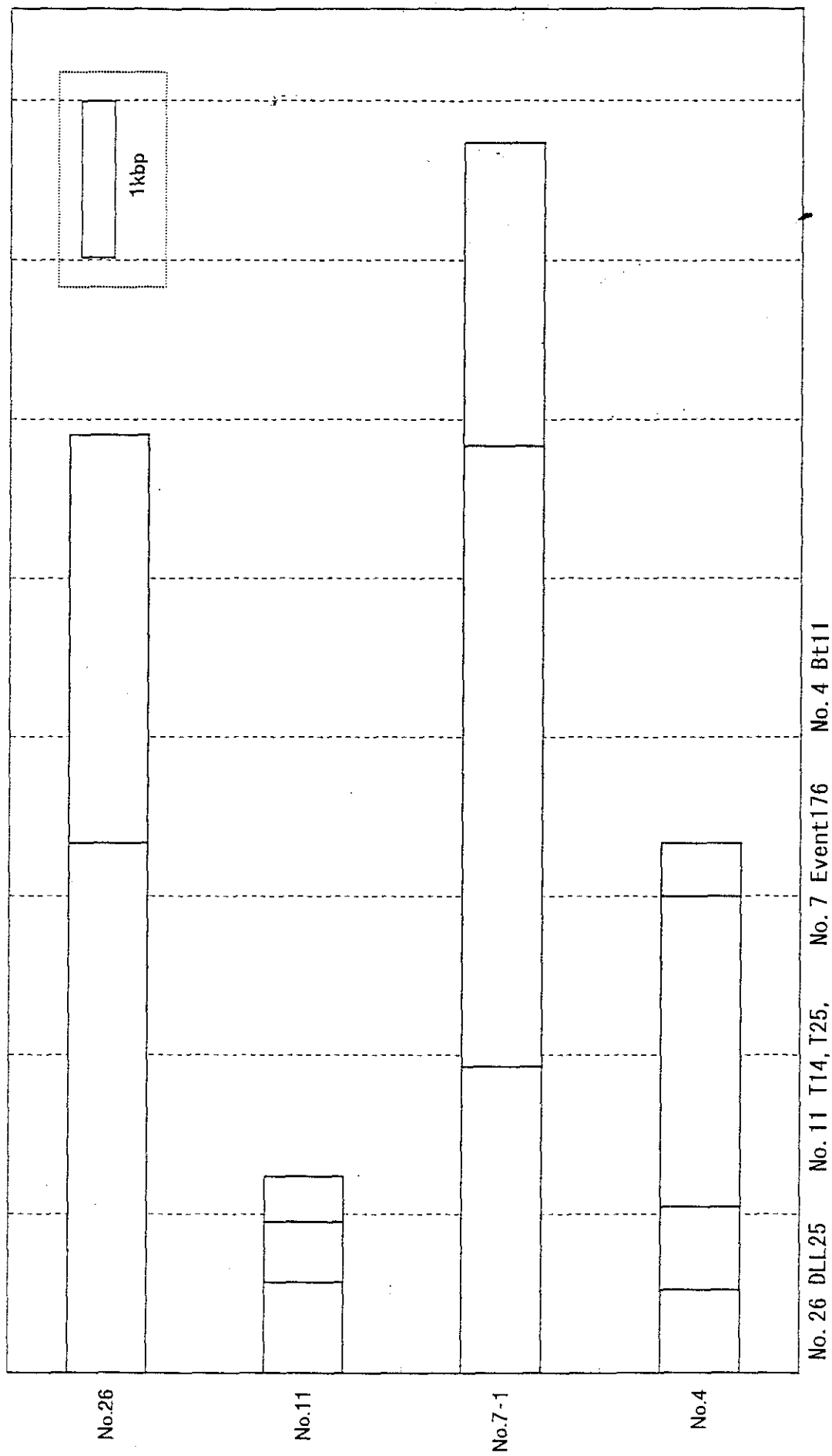


図 2-e. トウモロコンの導入遺伝子のPstIによる切断

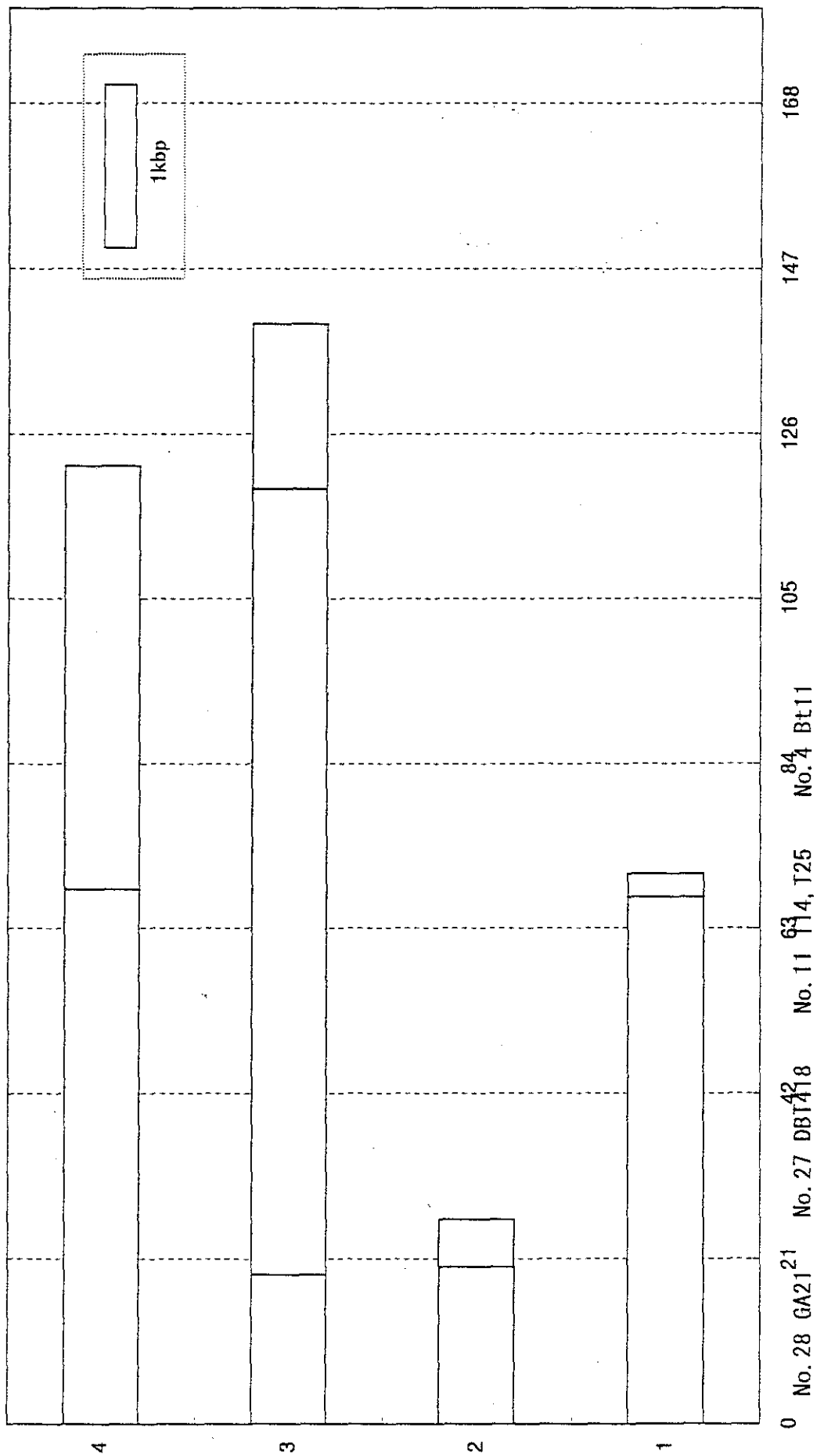


図 2-1. トウモロコシの導入遺伝子の SmaI による切断

