

表2. 食品分野に於ける遺伝子組換えの目的に関するキーワード

No.2

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
生体防御	5	栄養強化	3
耐寒性	5	固定化酵素	3
耐性菌	5	抗ウイルス薬	3
微生物汚染	5	酵素活性化	3
病害防除	5	酵素蛋白質	3
不定はい	5	殺虫作用	3
ウイルス	4	酸化防止剤	3
ウイルス感染	4	食害	3
外膜蛋白質	4	耐塩性	3
基質特異性	4	耐薬性	3
抗ウイルス作用	4	廃物利用	3
根粒	4	防御物質	3
雑草防除	4	立枯病	3
種子蛋白質	4	アワノメイガ	2
植物繊維	4	イネウイルス	2
植物油脂	4	ウイルス抗原	2
食肉	4	オオタバコガ	2
食品汚染	4	カイコガ	2
生物的防除	4	カメムシ科	2
耐冷性	4	灰色かび病	2
貯穀害虫	4	黒さび病	2
直播栽培	4	黒斑病	2
熱安定性	4	昆虫成長調整剤	2
農業廃棄物	4	いもち病	1
雄性不稔	4	ウイルスワクチン	1
コロラドハムシ	3	ホルモン調節	1
ルテオウイルス	3		

表3. 食品分野に於ける植物組織培養(含遺伝子組換え)に関するキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
細胞融合	49	カルス培養	12
花	37	やく培養	11
組織培養	33	培養細胞	11
はい	31	バイオアッセイ	9
カルス	30	わい性	9
葉	29	植物細胞	8
色	27	植物生理	8
交雑	23	花粉	7
再生	23	塊茎	6
栽培品種	22	細胞増殖	6
細胞培養	19	細胞壁	6
品種差	17	はい発生	4
植物体再生	15	葉緑体	4
はい培養	14	液体培地	3
やく	13	倍数体	3
茎頂培養	13	培養条件	3
交雑育種	13	不定はい形成	3
植物成長	13	分離育種	3
生合成	13	はい芽	2
突然変異体	13		

表4. 食品分野に於ける微生物(含遺伝子組換え)に関するキーワード

キーワード	使用頻度
微生物	84
<i>Agrobacterium</i>	36
酵母	25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
<i>Bacillus thuringiensis</i>	19
細菌	12
大腸菌	12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5
土壌細菌	5
土壌微生物	5
乳酸菌	5
連鎖球菌属	5
<i>Arabidopsis</i>	4
<i>Pseudomonas</i>	4
かん菌属	4
枯草菌	3
酵母菌属	3
根粒菌属	3
サルモネラ属	2
<i>Erwinia</i>	3
<i>Botrytis cinerea</i>	2
<i>Clostridium</i>	2
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	2
<i>Clostridium thermocellum</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2
<i>Peptococcaceae</i>	2
<i>Puccinia</i>	2
VA菌根菌	2
<i>Aspergillus</i>	1
<i>Azospirillum</i>	1
<i>Candida utilis</i>	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	1
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1
<i>Trichoderma reesei</i>	1

表5. 食品分野に於ける遺伝子組換え文献中の農作物に関するキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
トマト	99	キクイモ	4
ダイズ	88	キャベツ	4
トウモロコシ	84	チャ	4
イネ	54	ナシ	4
サツマイモ	25	ネギ	4
ジャガイモ	25	ハクサイ	4
コムギ	24	コシヒカリ	3
リンゴ	17	サトウキビ	3
イチゴ	14	シイタケ	3
オオムギ	14	スギ	3
ミカン	13	アスパラガス	2
水稲	12	エンバク	2
モモ	11	カボチャ	2
インゲンマメ	10	キウイフルーツ	2
キク	8	クリ	2
キュウリ	8	コマツナ	2
バラ	8	パイナップル	2
メロン	8	ヒヨコマメ	2
ワタ	8	プラム	2
綿	8	ブロッコリ	2
サトウダイコン	7	ベニバナ	2
ブドウ	7	ホウレンソウ	2
アズキ	6	マンナン	2
アブラナ	6	レンズマメ	2
エンドウ	6	ワサビダイコン	2
トルコギキョウ	6	アカツメクサ	1
ナス	6	カプシド	1
ペチュニア	6	コンブ	1
カーネーション	5	ソマトメジン	1
ソラマメ	5	ふすま	1
ワサビ	5		
オレンジ	4		
カキ	4		
カノーラ	4		
カラタチ	4		

表6. 食品分野に於ける遺伝子組換えに関する文献中の食品関連のキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
食品	343	シロップ	4
菜種	20	チーズ(食品)	4
ビール	19	プロイラ	4
醸造	17	玄米	4
食品加工	17	砂糖	3
穀類	16	産卵鶏	3
野菜	16	食用きのこ	3
果樹	14	製麦	3
機能性食品	10	大豆粉	3
豆腐	10	畜産食品	3
発酵食品	10	調味料	2
牛乳	9	澱粉粒	2
大豆製品	9	豆類	2
味噌	9	納豆	2
アルコール飲料	7	ほ乳類	2
醤油	7	食酢	2
油料植物	7	清酒	4
とうもろこし製品	6	油料種子	4
芋類澱粉	6	酪農	4
果物	6	卵白アルブミン	4
小麦粉	6	オレンジジュース	4
配合飼料	6	カード(乳)	4
鶏卵	5	カカオ製品	4
焼酎	5	ひまわり油	4
食用油脂	5	ぶどう酒	4
豆粉	5	ヨーグルト	4
コーンミール	4		

表7. 遺伝子組換えに関する農産物（農作物）のキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
植物	384	カキ類	2
農作物	86	キバガ科	2
栽培	63	スギタケ属	2
品種	58	ナス属	2
成長	47	ヒユ科	2
種子	24	ヒラメ科	2
果実(器官)	22	ヤマナラシ属	2
家畜	11	ユリ科	2
ウシ	8	アマノリ属	1
栽培試験	6	アリマキ科	1
乳牛	6	カバノキ科	1
野生植物	6	サケ科	1
ウリ科	4	シャクナゲ属	1
ラン科	4	スミレ科	1
ユリ属	3	ヒノキ属	1
リンドウ科	3	ヒラタケ属	1
インゲンマメ属	2	マツ属	1

7 62

表8. 食品分野に於ける遺伝子組換え文献中の酵素に関するキーワード（含遺伝子組換えおよび製造用酵素等）

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
酵素	86	ペルオキシダーゼ	5
発酵	29	インベルターゼ	4
パン	20	グリコシドヒドロラーゼ	4
アルファアミラーゼ	14	グルコシダーゼ	4
ペクチナーゼ	14	セルラーゼ	4
製パン	12	パン酵母	4
レンニン	11	プロテイナーゼ	4
酵素的分解	9	ヘキソシルトランスフェラーゼ	4
酵素利用反応	9	蛋白質キナーゼ	4
グルカナーゼ	8	微生物酵素剤	4
トランスフェラーゼ	8	グルタチオンレダクターゼ	3
ビール酵母	8	ホスホトランスフェラーゼ	3
キチナーゼ	7	リパーゼ	3
チーズ製造	7	C - S リアーゼ	2
酵素生産	7	アデノシンデアミナーゼ	2
麴	7	アミドヒドロラーゼ	2
オキシドレダクターゼ	6	アミノ酸オキシドレダクターゼ	2
ビール醸造	6	(EC 1. 4. )	
酵素阻害剤	6	アルコールオキシドレダクター	1
製パン性	6	ゼ	
C - S リアーゼ	5	アミノ酸発酵	1
RNアーゼ	5	アルコール発酵	1
キシラナーゼ	5	イソくえん酸デヒドロゲナーゼ	1

表9. 食品分野に於ける遺伝子組換え文献中の化合物に関するキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
蛋白質	112	ピラノシド	4
アミノ酸	48	ラクトン	4
カルボン酸	38	脂環式アルコール	4
脂肪族カルボン酸	25	水溶性ビタミン	4
アルケン	24	多価フェノール	4
アミロース	22	第一アミン	4
芳香	22	第二アミン	4
成長ホルモン	18	炭水化物	4
ビタミン	15	二糖類	4
脂肪族アミン	13	アルコール	3
ペクチン	9	イノシトールりん酸	3
脂肪酸	8	インターロイキン	3
窒素複素環化合物	8	カルボン酸エステル	3
糖アルコール	8	シクロデキストリン	3
セルロース	7	スルフィド	3
ホスフィン酸	7	フェノール類	3
脂肪族アルコール	7	フラノシド	3
芳香族縮合化合物	7	フルクトオリゴ糖	3
オレフィン化合物	6	ポリエー	3
ケトン	6	含硫アミノ酸	3
不飽和カルボン酸	6	脂肪族アルデヒド	3
分解性高分子	6	脂肪族塩素化合物	3
カロチノイド	5	脂肪族化合物	3
ケトース	5	飼料添加物	3
ヘキソース	5	生理活性ペプチド	3
ホスホン酸	5	芳香成分	3
脂環式化合物	5	アセトンプタノール発酵	2
脂肪酸組成	5	アミン	2
アミノカルボン酸	4	アルカロイド	2
アミロペクチン	4	アルカン	2
アントシアニン	4	アルブミン	2
インターフェロン	4	イミン	2
カルシウム	4	カゼイン	2
グルコシド	4	カノーラ油	2
クロロフィル	4	アミノ酸残基	1
サイトカイニン	4	アルドース	1
トリグリセリド	4		



表10. 食品分野に於ける遺伝子組換え文献中の規制等に関するキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
品質	69	クアクセプタンス	5
規制	65	製品責任	5
表示	58	規格	4
品質表示	55	規則	4
食品規制	48	国際市場	4
食品衛生	35	制度	4
食品検査	29	特許法	4
消費者志向	15	バイオハザード	3
法規制	15	国際規格	3
JAS(規格)	13	政府	3
行政機関	10	HACCP	2
特許	10	JAS(規格)	2
健康食品	7		

472

表11. 食品分野に於ける遺伝子組換えの分析法に関するキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
PCR法	55	生物ルミネセンス	3
食品分析	21	微量分析	3
検出	8	品質検査	3
免疫学的試験	7	Ame s 試験	2
定量分析	6	LC-MS分析	2
リスク分析	5	ウェスタンブロット法	2
RT-PCR法	4	サザンブロット法	2
アイソザイム	4	ノーザンブロット法	2
フィンガープリント法	4	Limulus 試験	1
微生物検査	4	NMR(磁気共鳴)	1

139

表12. 食品分野に於ける遺伝子組換えに関する諸外国のキーワード

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
アメリカ	30	カナダ	3
ヨーロッパ	22	EEC(欧州)	2
ヨーロッパ連合	15	EPA(米国)	2
イギリス	9	アイオワ	2
FDA(米国)	7	インドネシア	2
OECD	4	イタリア	1
アルゼンチン	4		

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

安全性評価に関する研究（1）

後代交配種の検知と導入遺伝子の後代における発現の安定性

分担研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授

研究要旨

昨年度開発した組換えダイズの検知法を用いて、輸入ダイズに含まれる遺伝子組換えダイズを選別し、それぞれについて ELISA 法により EPSPS タンパク質の発現を調査し、後代における導入遺伝子の発現の安定性を検討した。

昨年度開発した組換えトウモロコシ（Bt11, Event176）の検知法に加え、Mon810 及び Liberty(T25)の導入遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR により検知が可能であることを明らかにし、輸入トウモロコシに含まれる遺伝子組換えトウモロコシの検知を行い、それぞれの増幅断片の塩基配列を検討した。また、ELISA 法により、CryIA(b)タンパク質と Cry9C タンパク質の検知を行った。

さらに、発現遺伝子全体のパターン変化を検出する新たな方法としてマイクロアレーを用いる方法の可能性を検討した。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀（青森大学工学部）

日野明寛、松岡猛（農水省食総研）

A. 研究目的

遺伝子組換え農作物およびそれらを利用して作出された加工食品の検知法については、遺伝子組換え食品の表示問題とも絡み、世界各国で技術開発が行われているが、導入遺伝子や導入遺伝子産物を検出するための一般的な方法は未だ確立されておらず、このような検知方法が開発されなければ、遺伝子組換え食品の表示に問題が残る。日本においては、JAS 法及び食品衛生法の下に遺伝子組換え食品の表示が義務付けられるため、遺伝子組換え食品の検知技術が早急に開発されることが不可欠な現状となっている。そこで、昨年度までに、除草剤耐性遺伝子を導入した組換えダイズや害虫抵抗性・除草剤耐性遺伝子を導入したトウモロコシから、導入した遺伝子を検知する方法を開発してきた。本年度は、この技術を利用し、海外から輸入されたトウモロコシを用いて遺伝子組換えトウモ

ロコシのモニタリングへの適用を検証した。さらに、輸入トウモロコシを用い、ELISA 法による CryIA(b)および Cry9C タンパク質の検知を行った。また、タンパク質レベルでの後代における安定性を調査するために、輸入ダイズより除草剤耐性ダイズを PCR 法により選別し、ELISA 法により EPSPS タンパク質の検出を行った。

さらに、遺伝子導入によって宿主（親）植物が本来持っていた遺伝子の発現が大きく変化していないかどうかを検出する新たな方法として、最近開発された技術であるマイクロアレーを用いることが可能か否かについて検討することとした。

B. 研究方法

＜試料＞

Mon810, Liberty(T25)の種子は、厚生労働省国立衛生研究所合田博士より供与された。

輸入ダイズ及び輸入トウモロコシは、モニ

タリング用に昨年度検疫所より供与されたものを用いた。

#### <方法>

#### ダイズおよびトウモロコシからの DNA の抽出

昨年度報告した、改変 CTAB 法により抽出を行った。

#### PCR

PCR 反応液は、1×PCR 緩衝液(宝酒造(株))、0.2mM dNTP、0.2μl プライマーおよび 1unit Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、DNA 溶液 1μl を加え、全量を 25μl にした。ダイズの導入遺伝子の増幅は、95℃に 5 分間保った後、95℃で 30 秒間、57℃で 30 秒間、74℃で 1 分間に設定し、30 サイクルの増幅反応を行った後、74℃で 5 分間終了反応を行った。トウモロコシの導入遺伝子の増幅は、95℃に 3 分間保った後、95℃で 30 秒間、62℃で 30 秒間、74℃で 30 秒間に設定し、45 サイクルの増幅反応を行った後、74℃で 5 分間終了反応を行った。

PCR のプライマーは、ダイズについては Yamaguchi *et al.* (2000) に報告されているプライマーを用い、トウモロコシについては Matsuoka *et al.* (2000) に報告されているプライマーを用いた (図 1)。

#### 電気泳動

PCR 反応液 5μl を 1.5% のアガロースゲルにアプライし、100V の電圧下 TAE 緩衝液で約 30 分間泳動を行った。次いで、ゲルをエチジウムブロマイド溶液で 10 分間処理し、青色 LED (470nm) により励起された PCR 増幅バンドを、CCD カメラを用いて撮影した。

#### ELISA 法によるタンパク質の検出

組換えダイズについては、Strategic Diagnostics Inc. (Newark, DE, USA) 製を用い、組換えトウモロコシについては、Neogen Co. (Lansing, MI, USA) 製を用いた。

#### マイクロアレーによる発現遺伝子の解析

現在市販されている利用可能な植物のマイクロアレーはシロイヌナズナのもののみであるため、それを利用し、植物材料が異なるヘテロな系における発現解析が可能か否かを本年度は検討した。シロイヌナズナのマイクロアレーはクラボウの GEM 解析サービ

ス、シロイヌナズナ Arabidopsis GEM Ver1. を利用した。植物材料としては、本分担研究者達が遺伝子組換え植物の育成を進めているニンジン実生を材料とし、ストレス処理前後における発現解析を行った。

#### C. 結果・考察

##### C.1. Mon810 及び Liberty (T25) の導入遺伝子の検知

Mon810 及び Liberty (T25) の種子を発芽させ生育した葉より CTAB 法によってゲノム DNA を抽出し、これをテンプレートとして PCR を行ったところ、Mon810 に導入された CryIA(b) 遺伝子と Liberty (T25) に導入された PAT 遺伝子が、Matsuoka *et al.* (2000) のプライマーを用いることによって検出された (図 2、3)。

##### C.2. 輸入トウモロコシにおける検知

検疫所より供与された輸入トウモロコシは、各ロットより 25 粒をサンプリングし、1 粒ずつ DNA を抽出し、PCR によって導入遺伝子の検知を行った。これまでに、Bt11 に由来する CryIA(b) 及び PAT 遺伝子、Event176 に由来する CryIA(b) 遺伝子、Mon810 に由来する CryIA(b) 遺伝子、Liberty に由来する PAT 遺伝子が検出された (表 1)。Event176 に由来する CryIA(b) 遺伝子、Liberty に由来する PAT 遺伝子、Mon810 に由来する CryIA(b) 遺伝子の増幅断片の塩基配列を検討したところ、配列に変化は認められなかった。

##### C.3. ELISA 法による CryIA(b) および Cry9C タンパク質の検知

昨年度輸入されたトウモロコシ 20 ロットについて、ELISA 法によって CryIA(b) および Cry9C タンパク質の検知を行ったところ、8 ロットにおいて CryIA(b) タンパク質が検知された。また、1 つのロットより Cry9C が検知された (表 2)。Cry9C が検出されたロットについては、さらに PCR による遺伝子レベルでの検知が必要であると思われる。

##### C.4. 輸入組換えダイズにおける EPSPS タンパク質の発現の検討

昨年度輸入されたダイズにおいて、PCR に

より EPSPS 遺伝子が検知されたダイズについて、ELISA 法によってタンパク質の検出を行ったところ、EPSPS 遺伝子が検出された 52 個体中、51 個体においてタンパク質が検出され、1 個体では ELISA に供するサンプルのタンパク質濃度を上げても、EPSPS タンパク質は検出されなかった (表 3)。このことより、EPSPS 遺伝子が存在していても、ダイズ穀粒中でほとんど発現していない場合があると考えられる。このことが、後代において導入された EPSPS 遺伝子が増加することにより起こっているのかどうかは、さらに検討する必要がある。

#### C. 5. マイクロアレーを用いた発現解析

ニンジン実生にストレス処理を施す前後において発現変動したクローンは極めて多く、その全てを一律に評価することは困難であった。そこで、発現変動量を一定の値以上として検索したところ、検索されてきた遺伝子の大部分については、その機能から考えて確かにストレス処理によって発現変動すると予想されるものであった。このため、植物材料が異なるヘテロな系であってもシロイヌナズナのマイクロアレーを使うことで大幅な発現変動については検出可能であると考えられる。しかし、発現量をどの値以上とするかによって検索結果は大きく変化することから、今後は、どのようなパラメーターを用いて検索するかの検索ソフトの改良が必要である。

#### D. 研究発表

(論文発表)

- 1) H. Yamaguchi, K. Sasaki, Y. Kidachi, K. Shirama, S. Kiyokawa, K. Ryoyama, T. Matsuoka, A. Hino, H. Umetsu and H. Kamada, "Detection of recombinant DNA

in genetically modified soybean and tofu", *Jpn. J. Food Chem.*, 7; 112-116 (2000)

- 2) 鎌田博 植物バイオテクノロジーの食品への応用. *食品衛生研究*, 50; 45-65 (2000)
- 3) 鎌田博 21世紀に花開く植物バイオテクノロジー. *郵政* 2000.1, pp. 16-19 (2000)
- 4) 鎌田博 21世紀に託された遺伝子組換え植物の未来. *FFIジャーナル*, 185; 2-4 (2000)
- 5) 鎌田博 遺伝子組換え植物の現状と未来. *遺伝*, 54; 44-50 (2000)
- 6) 鎌田博 遺伝子組換えによる育種の実際. *農学大事典*, 印刷中 (2001)
- 7) 鎌田博 遺伝子組換え植物の安全性研究の現状と展望. *研究ジャーナル*, 印刷中 (2001)

(学会発表)

- 1) 佐々木和生、山口秀明、木立由美、白間和志、清川繁人、狩山一雄、松岡猛、日野明寛、梅津博紀、鎌田博「ダイズおよび豆腐における導入組換え遺伝子の検出」日本食品化学学会第6回学術大会、東京、2000年5月。
- 2) 山口秀明、佐々木和生、木立由美、白間和志、清川繁人、狩山一雄、松岡猛、日野明寛、梅津博紀、鎌田博「遺伝子組換えダイズおよび豆腐における組換え遺伝子の簡易検知法の開発」日本植物細胞分子生物学会第18回大会、静岡、2000年7月。

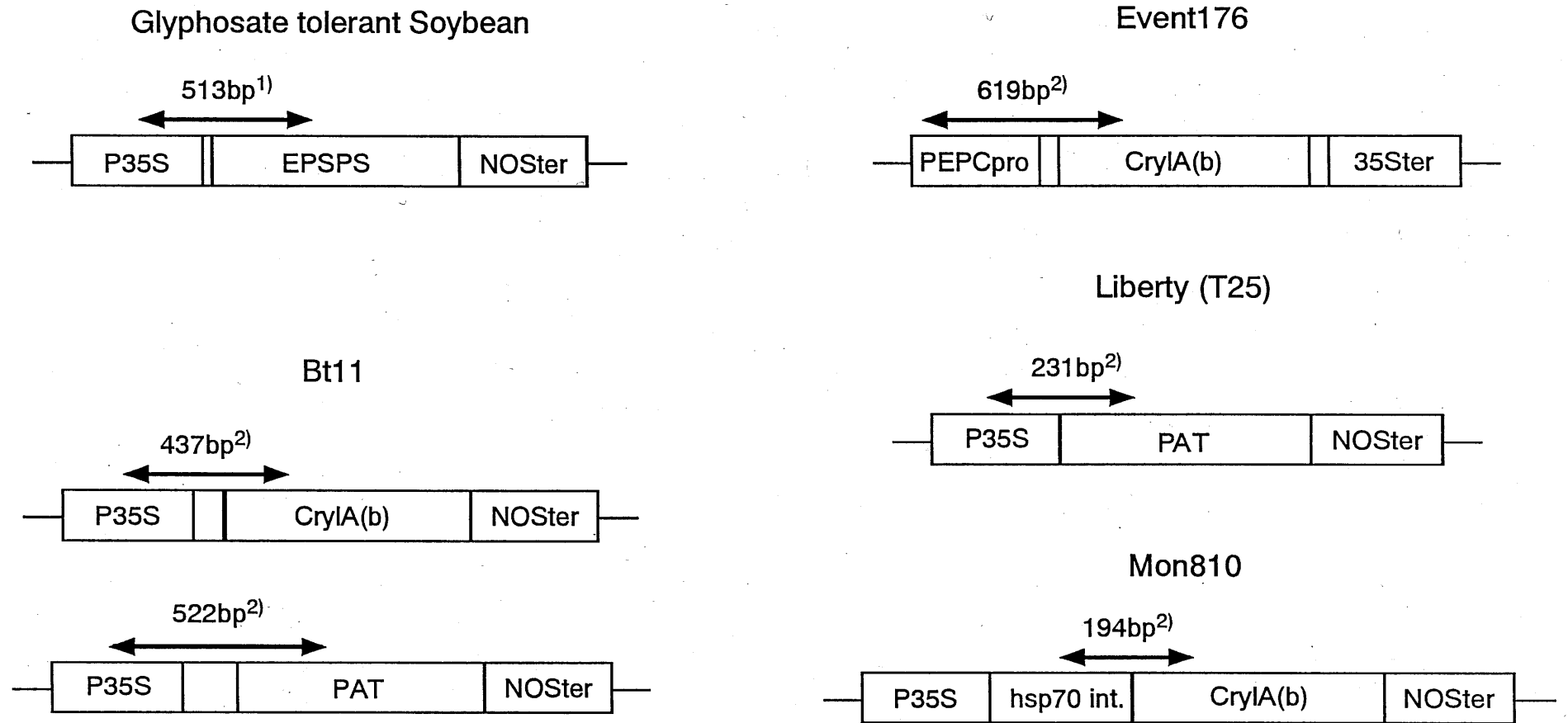


図1 検知に用いた遺伝子と検知用プライマーのサイト  
 ◄► は、PCRに用いたプライマーとその増幅長  
 1) Yamaguchi *et al.* (2000) 2) Matusoka *et al.* (2000)

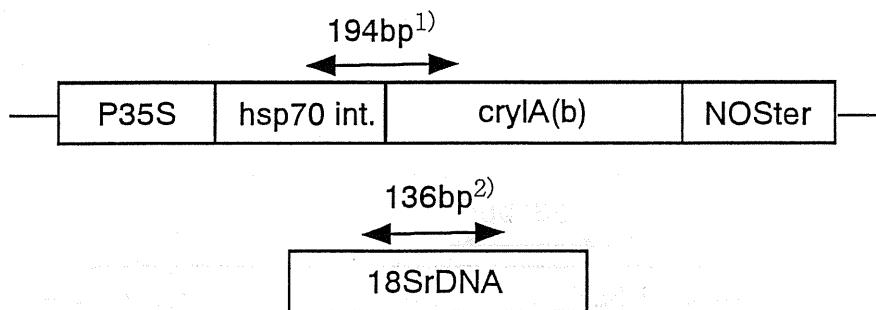
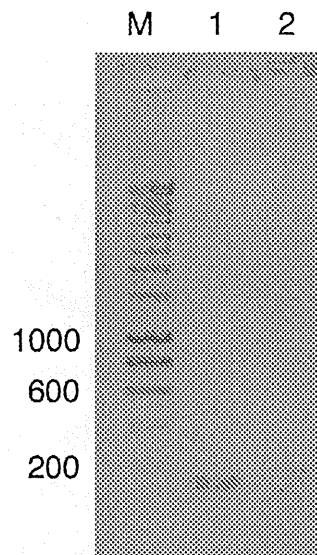


図 2 Mon810における組換え遺伝子の検知  
 M, Marker; 1, 18SrDNA; 2, CryIA(b)  
 ¹)Matsuoka *et al.* (2000)  
 ²)Studer *et al.* (?)

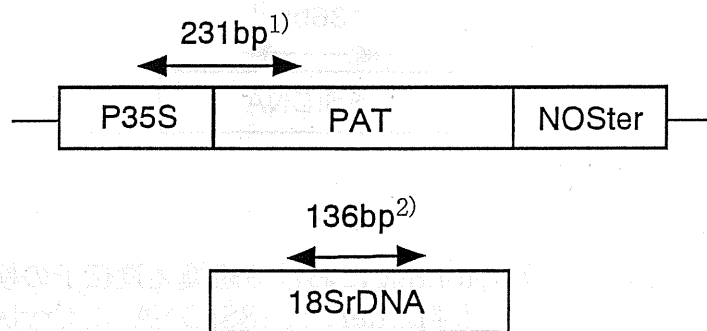
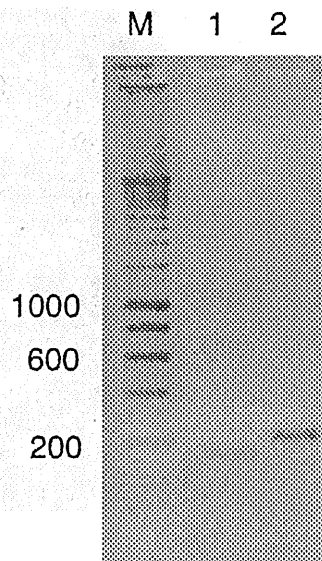


図 3 Liberty(T25)における組換え遺伝子の検知  
M, Marker; 1, 18SrDNA; 2, PAT

<sup>1)</sup>Matsuoka *et al.* (2000)

<sup>2)</sup>Studer *et al.* (?)

表1 輸入トウモロコシのモニタリング（個体調査）

No.	品名	生産国	検体採取地	採取日	Bt1 CryIA(b)	Event176 CryIA(b)	Bt11 PAT	Mon810 CryIA(b)	Liberty(T25) PAT
TC-1	US Corn	アメリカ合衆国	東京	H12.2.18	5/25*	1/25	1/25	14/25	0/25
TC-2	とうもろこし	アメリカ合衆国	東京	H12.3.23	NE**	NE	NE	7/25	0/25
TC-3	とうもろこし	アメリカ合衆国	東京	H12.3.30	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
TC-4	とうもろこし	アメリカ合衆国	東京	H12.3.31	NE	NE	NE	6/25	0/25
YC-1	とうもろこし	アメリカ合衆国	横浜	H12.2.10	0/22	0/22	0/22	22/25	0/25
NC-1	とうもろこし	オーストラリア	名古屋	H12.2.9	0/23	0/23	0/23	18/25	0/25
NC-2	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.13	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
NC-3	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.23	0/24	0/24	0/24	11/25	0/25
NC-4	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.23	0/25	1/25	0/25	NE	2/25
NC-5	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.23	0/25	0/25	0/25	NE	1/25
NC-6	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
NC-7	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
NC-8	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	1/24	0/24	1/24	NE	0/24
NC-9	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
NC-10	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
SC-1	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.3.2	0/24	0/24	0/24	NE	0/24
SC-2	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.3.2	NE	NE	NE	NE	NE
SC-3	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.2.17	0/23	0/23	0/23	NE	0/23
SC-4	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.2.17	0/25	0/25	0/25	NE	0/25
KC-1	ジャイアントコーン	ペルー	神戸	H12.3.13	NE	NE	NE	0/6	0/6

\*検出個体数／試験個体数

\*\*NE: not examined



表2 輸入トウモロコシのモニタリング (ロット調査)

No.	品名	生産国	検体採取地	採取日	ELISA test (Bt)	ELISA test (Cry9C)	備考
TC-1	US Corn	アメリカ合衆国	東京	H12.2.18	+	-	
TC-2	とうもろこし	アメリカ合衆国	東京	H12.3.23	±	±	
TC-3	とうもろこし	アメリカ合衆国	東京	H12.3.30	-	-	
TC-4	とうもろこし	アメリカ合衆国	東京	H12.3.31	-	-	
YC-1	とうもろこし	アメリカ合衆国	横浜	H12.2.10	-	-	
NC-1	とうもろこし	オーストラリア	名古屋	H12.2.9	-	-	
NC-2	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋 (四日市)	H12.3.13	+	-	GMO表示
NC-3	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋 (四日市)	H12.3.23	+	-	GMO表示
NC-4	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋 (四日市)	H12.3.23	+	-	GMO表示
NC-5	US NO. 3 Yellow Corn	アメリカ合衆国	名古屋 (四日市)	H12.3.23	+	-	GMO表示
NC-6	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	-	-	
NC-7	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	-	-	
NC-8	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	+	-	
NC-9	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	-	-	
NC-10	とうもろこし	アメリカ合衆国	名古屋	H12.3.31	-	-	
SC-1	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.3.2	-	-	
SC-2	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.3.2	-	-	
SC-3	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.2.17	-	-	
SC-4	デントコーン	アメリカ合衆国	清水	H12.2.17	+	-	
KC-1	ジャイアントコーン	ペルー	神戸	H12.3.13	-	-	

表3 ダイズ抽出液中のタンパク質量とELISAの結果

No.	Protein conc. (mg/ml)	EPSPS タンパク質	No.	Protein conc. (mg/ml)	EPSPS タンパク質
1	8.3	+	27	11.9	+
2	8.5	+	28	12.0	+
3	8.7	+	29	12.1	+
4	8.8	+	30	12.1	+
5	9.0	+	31	12.1	+
6	9.2	+	32	12.2	+
7	9.9	+	33	12.3	+
8	10.4	+	34	12.6	+
9	10.4	+	35	12.8	+
10	10.5	+	36	12.9	+
11	10.6	+	37	13.2	+
12	10.7	-	38	13.5	+
13	10.7	+	39	13.9	+
14	10.7	+	40	14.1	+
15	10.7	+	41	14.2	+
16	10.8	+	42	14.2	+
17	11.2	+	43	14.8	+
18	11.3	+	44	14.9	+
19	11.3	+	45	15.0	+
20	11.3	+	46	15.4	+
21	11.4	+	47	15.9	+
22	11.5	+	48	16.6	+
23	11.6	+	49	16.8	+
24	11.7	+	50	16.9	+
25	11.8	+	51	17.6	+
26	11.8	+	52	19.0	+

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

安全性評価に関する研究（2）  
後代交配種における導入遺伝子配列の安定性  
分担研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授

研究要旨

遺伝子組換え食品に含まれる遺伝子組換え植物の後代交配品種における遺伝子配列の安定性を調べるために PCR 法を用いてトウモロコシの後代交配品種から導入された外来遺伝子を含む DNA 断片を増幅し、これをクローニングしてその塩基配列を決定した。その結果、塩基配列を決定した 443 bp の中で 2 bp の点変異が見られた。しかし、この変異によって新たなアミノ酸配列が生じるものではないことがわかった。

協力研究者

小関良宏（東京農工大学工学部）

合田幸広（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進められ、商品化され栽培されている。しかし、よく知られているように、植物において、世代を重ねるに従って、遺伝子に塩基配列の置換や配列の重複、欠失などの変異が生じる。このことは、外来の遺伝子が導入され、それが安定な表現型として発現して除草剤耐性や害虫抵抗性を獲得した遺伝子組換え植物においても起こり得ることである。

これまでの研究において、このような遺伝子組換え植物において、果たして導入された遺伝子の安定性はどのようなものか、点突然変異などが生じているのかどうかについて、全く調べられていない。もしも導入された遺伝子に点突然変異が生じ、そのためにアミノ酸置換が生じるような場合には、導入した遺伝子から生じるタンパク質のアミノ酸配列

が変化してしまうため、目的とした除草剤耐性や害虫抵抗性の形質が失われてしまう可能性とともに、新たなアミノ酸配列を有したタンパク質が生産されてしまうため、新たなアレルギー性を生じせしめてしまう可能性が出てくる。

そこで、今回、遺伝子組換えトウモロコシにおいて導入した遺伝子およびその近傍領域の塩基配列を1個体ごとにPCRによって増幅し、その塩基配列に変異が起きているかどうかを調べることを目的とした。

B. 研究方法

<DNA 試料>

遺伝子組換えトウモロコシ MON 810 の穀粒を試料とした。この1個ずつの穀粒を液体窒素で凍結させ、液体窒素で冷却した乳棒と乳鉢で破碎した後、これを FastDNA kit の抽出用チューブに入れ、FastPrep FP120

を用いて破碎し DNA を抽出した。得られた DNA 抽出液から FastDNA kit の説明書に従って、核 DNA を精製し、これを PCR のテンプレートとした。独立の 12 個体から核 DNA を抽出し、各々を独立のテンプレートとして用いた。

#### <遺伝子挿入領域の増幅>

Fig. 1 に示す MON810 の塩基配列に対応する PCR 用プライマーとして、5' 側について 8105-1, 8105-2, 8105-3 の 3 本を合成した。また、3' 側について 8103-1, 8103-2, 8103-3 の 3 本を合成した。このプライマー各々 7 pmol, および上記で抽出した核 DNA 約 100 ng をテンプレートとし、これに 3.5  $\mu$ l の  $\times 10$  LATAq 緩衝液 (宝酒造), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTP を含む反応液 34  $\mu$ l を作り、これに 50  $\mu$ l のミネラル・オイルを重層し、PCR 機にセットした。98°C で 2 分間処理によって 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に解離した後、92°C 30 秒処理し、1  $\mu$ l の TaKaRa LA Taq (0.3 units) を加えた。その後、92°C 30 秒  $\Rightarrow$  55°C 40 秒  $\Rightarrow$  72°C 90 秒の反応サイクルを 35 回繰り返す。最後に 72°C 10 分反応させた。反応終了後、100  $\mu$ l のクロロホルムを加えてミネラル・オイルを除去し、水層を取って 1.5% アガロース電気泳動で増幅産物を分離し、エチジウムブロマイド染色後、トランスイルミネーターで増幅されたバンドを検出した。

#### <遺伝子挿入領域のクローニング>

得られた増幅産物について、その DNA 断片を含むアガロースをカミソリで切り出し、これからガラス・ミルク法を用いて DNA を抽出した。この DNA 断片について、T4 ポリヌクレオチド・キナーゼによる 5' リン酸化、T4 DNA ポリメラーゼによる末端平滑化を行った後、フェノール/クロロホルム、

クロロホルム処理を行って DNA を精製し、エタノール沈澱によって回収した。この DNA 断片を SmaI 切断した pBluescript SK とライゲーションを行い、これを大腸菌に形質転換し、得られたポジティブ・コロニーを液体培地に接種して増殖させ、これからプラスミドを抽出した。得られたプラスミドに対して、T7 および T3 プライマーを用いて Thermo Sequence Cycle Sequencing Kit (Amersham) によって反応を行い、DNA シーケンサー LIC-4000L (LI-COR 社) によって解析した。

#### C. 結果

今回作成した PCR プライマーにおいて、まず 8105-1 および 8103-1 の組み合わせで PCR を行ったところ、Fig. 2 に示すように複数本のバンドが得られた。そこで、Fig. 2 に示す 1 (約 0.9 kbp) および 2 (約 0.6 kbp) のバンドを切り出し、クローニングしてその塩基配列を決定したところ、1 のバンドは *Zea mays* W-22 clone PREM-1E retroelement (1675 nt) (accession number U03684), および 2 のバンドは *Z. diploperennis* DNA for Grandel-4 retrotransposon (13779 nt) (accession number X97604) と高い相同性を有することがわかった。すなわち、これらのバンドは、トウモロコシ核内に非常に数多く存在するレトロトランスポゾンに対し、ここで設計したプライマーがアニールして増幅されてきたバンドであることがわかる。このことから、ここで設計した 8105-1 および 8103-1 プライマーは、組み込まれた遺伝子を特異的に増幅できないことがわかった。

そこで、次にこの近傍の塩基配列に対するプライマーとして、5' 側について 8105-2 と 8105-3 の 2 本を、また、3' 側につい