

て 8103-2 と 8103-3 の 2 本を合成した。これら 2 本ずつを組み合わせて、合計 4 通りの組み合わせで PCR を行ったところ、いずれの組み合わせにおいてもほぼ 1 本のバンドが特異的に増幅されること (Fig. 3), さらに Fig. 4 に示すように、いずれの組み合わせにおいても予想される長さの DNA 断片が増幅されてくることがわかった。また Fig. 3 においては独立の MON810 2 個体についての結果のみを示したが、その他の独立の MON810 10 個体についても全く同様な DNA 断片が増幅されてくることがわかった。

そこで、これらの中から 8105-2 および 8103-2 プライマーで増幅されてきた DNA 断片について、クローニングして塩基配列を決定した。その結果、アガロース電気泳動上、両者とも DNA 断片の長さは一致し、また塩基配列を決定したところにおいても両者の長さは 443 bp で一致したが、その塩基配列において 2 カ所異なっていることがわかった。1 つは CryIA(b) のオープン・リーディング・フレームの下流の非翻訳領域であった。しかし、もう 1 カ所については CryIA(b) のオープン・リーディング・フレームの中で変異が生じており、このため、本来ならばこのコドンがアミノ酸を指定しているところがストップ・コドンになってしまっており、この植物体においては本来の CryIA(b) タンパク質よりアミノ酸配列の短いタンパク質が合成されている可能性が示唆された。

#### D. 考察

今回の結果から、遺伝子組換え植物においても、その他多くの非組み換え植物と同様に、後代を経ていく過程において塩基配列に変異が生じることがわかった。今回見いだされ

たケースにおいては、その変異によってストップ・コドンになってしまい、生合成されるであろうタンパク質の長さが短くなってしまっていた。おそらくこの C 末側の欠失は、CryI タンパク質としての害虫抵抗性の活性領域に関係しない領域であるために、この変異を有するトウモロコシにおいても害虫抵抗性の表現型は保たれており、畑において害虫に食されることなく生存し、個体として存在してきたものと考えられる。

もしもこのような変異がアミノ酸配列を変えてしまい、それから合成された CryI タンパク質の構造が変化してしまう、あるいは害虫抵抗性としての活性に必要な領域が変異してしまうことがあるとするならば、そのような変異が生じたトウモロコシは害虫抵抗性の表現型を消失するため、畑において害虫に食され、個体として消失してしまう可能性が考えられる。従って、この研究結果から、遺伝子組換え植物において、導入した遺伝子に由来する表現型が常に保たれているかどうかを確認していくことが、後代品種において導入した遺伝子に変異が生じていない可能性を示す 1 つの基準として重要であることが示されたものと言える。

#### E. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし

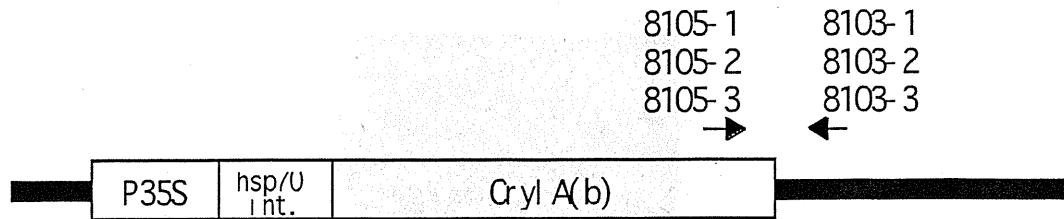


Fig. 1 遺伝子組換えトウモロコシ MON810 の後代交配植物体の塩基配列を検出するために用いたプライマー領域。



Fig. 2 遺伝子組換えトウモロコシ MON810 の後代交配植物体 4 個体から抽出した核 DNA をテンプレートとして 8105-1 と 8103-1 プライマーを用いて PCR を行って増幅されたバンド。1~4 は独立個体を示す。矢印で示した 1 および 2 のバンドはクローニングして塩基配列を決定したバンド。M, 123 bp DNA ラダー・マーカ。

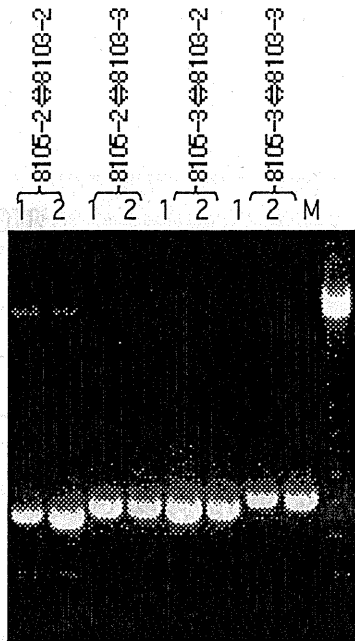


Fig.3 遺伝子組換えトウモロコシ MON810 の後代交配植物体 2 個体から抽出した核 DNA をテンプレートとして 8105-2 と 8103-2 プライマー, 8105-2 と 8103-3 プライマー, 8105-3 と 8103-2 プライマー, 8105-3 と 8103-3 プライマー, 各々のプライマーの組み合わせで PCR を行って増幅されたバンド。1 および 2 は独立個体を示す。M, 123 bp DNA ラダー・マーカ。

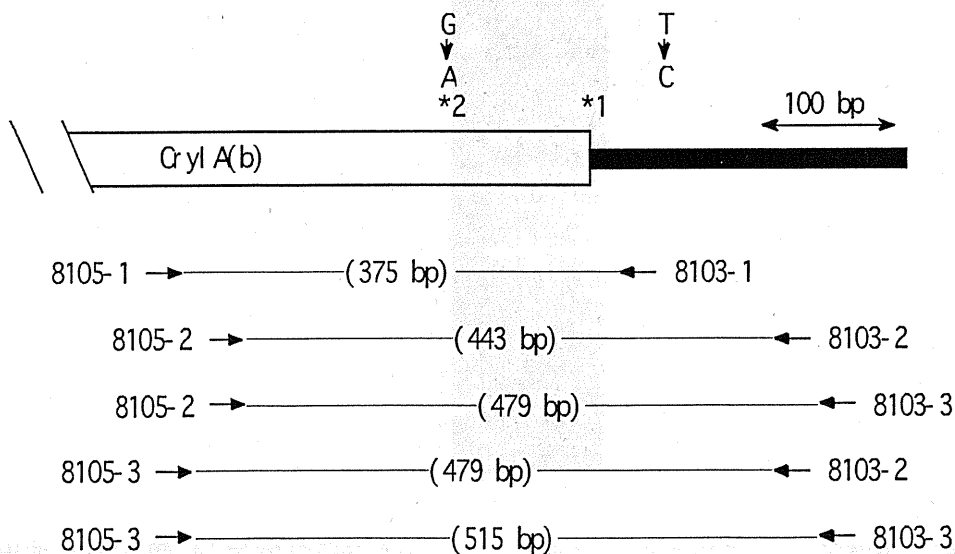


Fig. 4 遺伝子組換えトウモロコシ MON810 の後代交配植物体の塩基配列を増幅するために用いたプライマーと増幅されるバンドの長さ。図中, \*1 は本来のストップ・コドンの位置。G→A および T→C は検出された塩基配列の置換。\*2 は G→A への塩基配列の置換によって生じたストップ・コドンの位置。

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（3）

導入遺伝子の発現安定性

分担研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授

研究要旨

タバコに導入した外来遺伝子発現量の経時的減少と再分化に伴う発現の回復について検討した。*Nicotiana plumbaginifolia* にシロイヌナズナの熱ショック蛋白質のプロモーターを結合させた GUS 遺伝子を導入したところ、導入直後の再分化葉では熱ショックにより発現し、GUS 活性が検出されたが、栽培期間の経過とともに減少し、18 ヶ月後には検出されなくなった。しかし、この葉の切片からシュートを再分化させたところ GUS 遺伝子発現量は導入直後と同程度まで回復した。

協力研究者

山川 隆（東京大学大学院農学生命科学研究科）

A. 研究目的

遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物では組込まれた遺伝子が、望まれる時期に、望まれる部位で、適切な強さで発現することが重要である。それは作物に有用な性質を付与するだけでなく、適切な発現は不要な、あるいは有害な成分が植物体内で合成されないためにも必要である。

しかし、外から導入された遺伝子は、コサプレッション、ジーンサイレンシングなどによって発現が抑制されたり、また、ストレス等によって予期せぬ発現が見られることもある。アンチセンス法のように発現が抑制されることを利用した組換え農作物もあることから、導入遺伝子の安定な発現は作物の特性を維持するためにも、作物の成分の変化を起こさないためにも重要な課題である。

本研究は、外から導入された遺伝子が果たして安定に発現し続けるかどうかを明らかにすると共に、種子繁殖後代においてその性

質は伝わるとされているが、挿し木などの栄養繁殖でも安定であるか否かについて、モデル植物としてタバコを用いて検討した。

本年度は、形質転換タバコの長期栽培による導入遺伝子の発現量の減少と再分化によるその回復を、熱ショックという外部からの物理的ストレスで発現するプロモーターを利用して検討した。

B. 研究方法

<試料>

*Nicotiana plumbaginifolia*（タバコの野生種）を材料として用いた。

導入遺伝子は、バイナリーベクターシステムの pBI121 の CaMV 35S プロモーターの部分をシロイヌナズナの熱ショックタンパク質のプロモーター（HSP-18.2）に交換したものを、熱ショックによって発現する  $\beta$ -glucuronidase（GUS）遺伝子を作成して導入した。なお、熱ショックタンパク質の

プロモーター (HSP-18.2) は北海道大学理学部米田好文教授から分譲していただいたものである。

#### <方法>

タバコへの遺伝子導入は、前述のように改変した pBI121 のバイナリーベクターシステムを利用してリーフディスク法により *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いて行った。

これにより、熱ショックで GUS 遺伝子が発現する組換え体を作成し、得られた形質転換タバコの葉を用いて熱ショック (42℃、2時間) によって誘導される GUS の酵素活性を測定することにより、タバコに導入した GUS 遺伝子発現量を定量した。

#### <結果>

得られた形質転換タバコの中から GUS 活性の高い4つのセルラインを選抜して実験に用いたが、タバコの開花期の葉は植物体の上部と下部で葉の長さが異なり、花穂が伸長する時期には植物体の上部ほど葉が小さく、長さが短くなっていった。これらの葉の長さと GUS 誘導活性を比較してみると図1に示すように葉の長さが長いほど GUS 誘導活性が大きく、植物の器官の位置によって導入遺伝子の発現が異なることが分かった。これらの結果を踏まえ、これから後の実験には多量に入手できる5-8cmの葉長のものを用いた。

経時的变化と再分化に伴う発現の回復について検討した結果、熱ショックによる GUS 誘導活性は時間の経過とともに減少し、18ヶ月後にはついに検出されなくなった (図2参照)。

しかし、この GUS 誘導活性の見られなくなった葉の切片から、植物ホルモンを調節してシュートを再分化させたところ、GUS 遺

伝子発現量は導入直後と同程度にまで回復し、シュートの発生によって活性が回復したと考えられた。しかし、この現象は再分化では観察されたが、挿し木では GUS 誘導活性は回復しなかった。

#### D. 考察

遺伝子組換え作物の特性、たとえば除草剤耐性、病害虫耐性というような性質を遺伝子導入で獲得しても、それらの遺伝子発現が見られなくなればもはやその作物は生存にも不利になる上に、作物としての価値が大きく減少する。導入した遺伝子の安定発現はこのように大きな問題であるが、これと同様に抑制されていた遺伝子発現の回復も、植物の成分の変化などを引き起こす可能性があるため無視できない現象であり、遺伝子組換え作物の評価に際し、今後さらに詳細に検討する必要がある。

#### E. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし

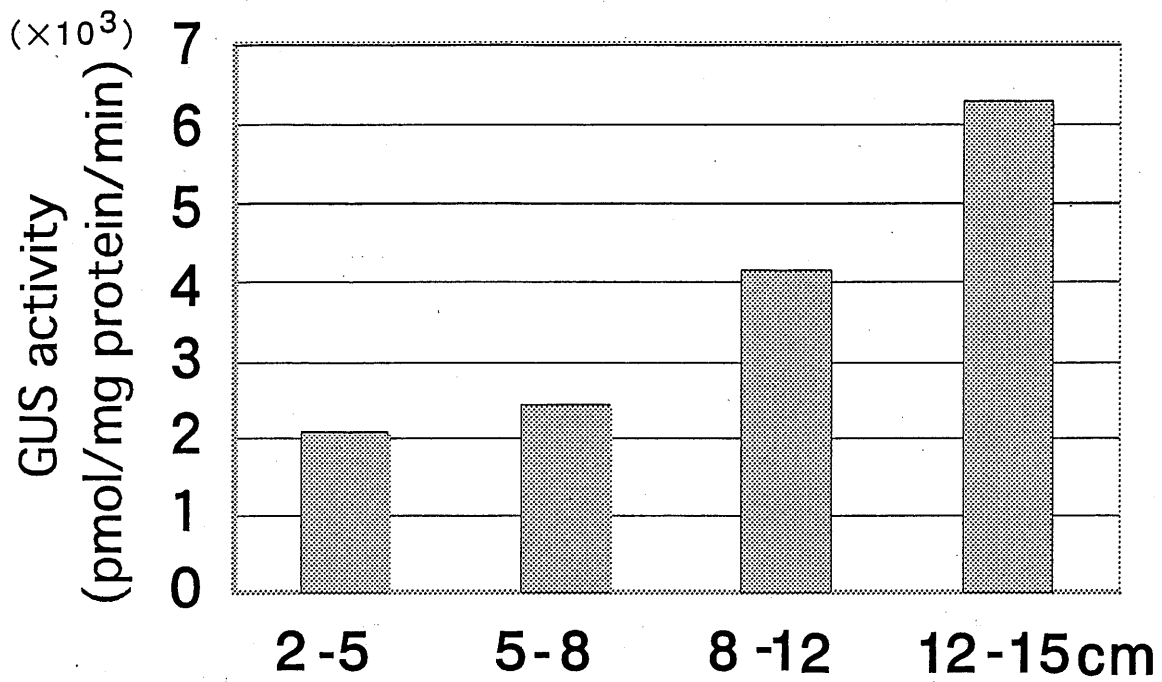


図1 形質転換 *Nicotiana plumbaginifolia* 葉長に伴うGUS誘導活性

葉の長さa-bは、a cm以上b cm未満を示す。

実験はそれぞれ3回測定し、その標準偏差は10%以内であった。

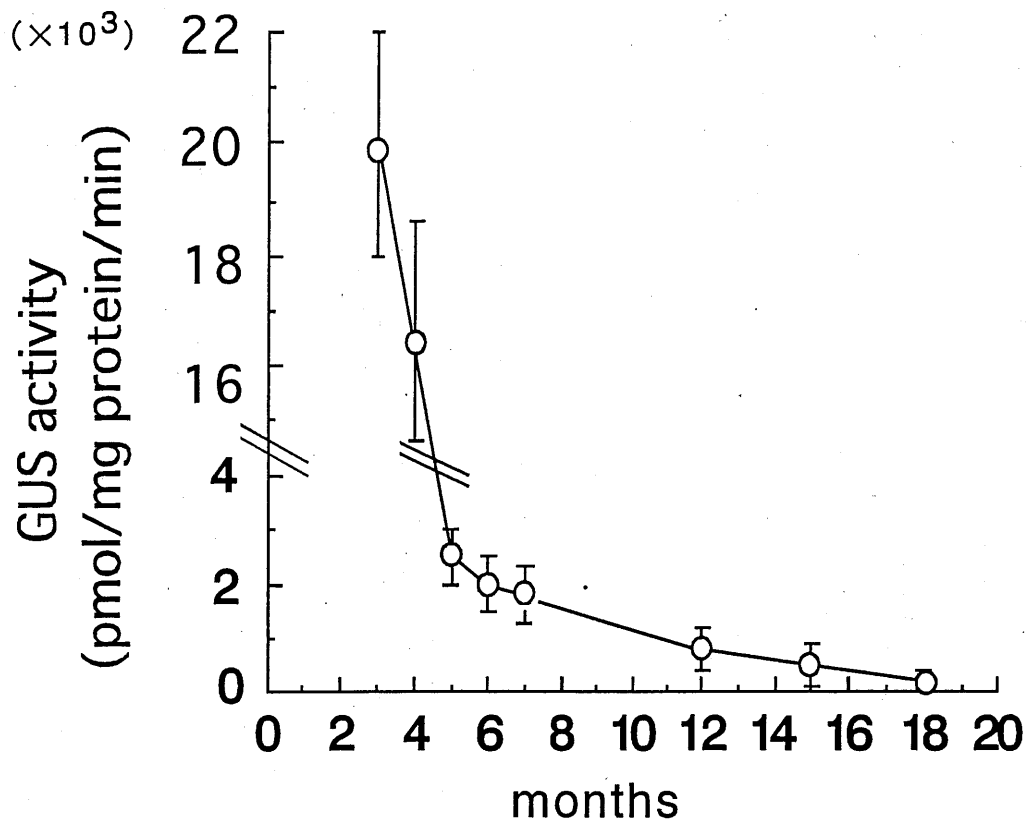


図2 成長に伴うGUS活性の変化

形質転換株 (line HP-7) の長さ5-8 cmの葉を使用し、40℃・2時間後のGUS活性を測定した。

実験はそれぞれ3回測定し、エラーバーはその標準偏差を示している。

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（４）

導入遺伝子のジーンサイレンシング

分担研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授

研究要旨

新規なウイルス抵抗性品種を開発するために、特定の農作物に別種の植物由来の遺伝子を導入して有用形質を付与する研究を行っている。遺伝子組換え作物の後代において植物に異常な性質が発生したり、ジーンサイレンシングによって遺伝子発現が抑制を受けたりする可能性について調査を行う。今年度は、タバコをモデル植物とし、これに各種遺伝子を導入した形質転換植物体を多数作出して種子を得た。

協力研究者

丹生谷 博，松下保彦  
（東京農工大学・遺伝子実験施設）

A. 研究目的

遺伝子組換え植物における導入遺伝子の発現状況や導入遺伝子が宿主（親）植物に与える影響を解析するため、既存の組換え農作物を利用せず、新規なウイルス抵抗性農作物を作出する研究から開始した。ウイルス抵抗性農作物には、ウイルス遺伝子を導入してコサプレッション等を誘導する例が多く知られているが、本研究ではウイルス遺伝子産物と相互作用（結合）する宿主タンパク質の遺伝子を導入する戦略を選んだ。このような結合タンパク質の cDNA を過剰発現させ、ウイルスタンパク質の機能阻害の程度を調べてウイルス抵抗性を検定した。

このように、特定の農作物に別種の植物由来の遺伝子を導入して有用形質を付与する場合、遺伝子組換え作物の後代において植物に異常な形質が表れたり、ジーンサイレンシングによって遺伝子発現が抑制を受けたりする可能性がある。タバコをモデル植物とし、これに各種遺伝子を導入した形質転換植物

体を多数作出して種子を得たので、トランスジーンの後代に及ぼす影響について解析を行う。

B. 研究方法

<試料>

植物としては、植物体がある程度の大きさを持ち、世代時間も実験材料として適当であるという理由から、タバコを用いることとした。タバコにはタバコモザイクウイルス（TMV）やトマトモザイクウイルス（ToMV）に対する抵抗性遺伝子 *N* を持つ種類があるが、抵抗性検定の目的には *N* 遺伝子を持たない品種を選んだ。導入する遺伝子としては、植物ウイルスに対する抵抗性を期待して、植物ウイルス遺伝子由来の蛋白質と結合する植物蛋白質の cDNA を用いることとした。

<方法>

これらの cDNA をタバコに導入し、次世代、次々世代の個体を、PCR 法で解析することにより、導入された cDNA のコピー数を調べ、cDNA が 1 箇所導入されたホモ



個体を選ぶ。それらの個体を出発材料とし、後代における遺伝子組換え植物の形質の変化を解析する。調べる形質には、植物の形態の変化がないかどうか、花芽形成までの時間、得られる種子の数、種子の発芽率、導入遺伝子の蛋白質の発現状況、ウイルスに対する抵抗性の状況等を予定している。また、目的蛋白質の発現量を推定し、発現量と形質との相関関係やジーンサイレンシングの状況について調べる。

### C. 結果・考察

ToMV の遺伝子産物のうち、隣接細胞への感染拡大に必要な移行蛋白質 (MP) を大腸菌で発現して精製した。これをプローブとして、ウエストウエスタン法で MP-interacting protein (MIP) の cDNA をスクリーニングした。複数の陽性クローンを得たが、MIP102, MIP204 はいずれも転写関連因子をコードする cDNA であった。MIP102 のシロイヌナズナホモログは感染応答タンパク質の誘導に関与する転写コアクチベーターで KELP と命名されている。

アグロバクテリウムを用いてタバコに MIP102 の cDNA を導入し、多数の形質転換個体を得た。これらにおける MIP102

のタンパク質発現をウエスタンブロット法で解析した結果、いくつかの株においてタンパク質発現が検出された。これらの形質転換植物のうち、導入遺伝子の高発現が認められた系統においてウイルス抵抗性が観察された。また、形質転換株の種子を多数保存したので、後代の解析を来年度に実施する。

### D. 研究発表

(論文発表)

- 1) Y. Matsushita, M. Deguchi, M. Youda, M. Nishiguchi, and H. Nyunoya, "The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP", *Mol. Cells* (in press)

(学会発表)

- 1) Y. Matsushita, M. Deguchi, O. Miyakawa, K. Yoshioka, M. Nishiguchi, and H. Nyunoya, "cDNA cloning for host factors that interact with gene products of plant RNA viruses. Proceedings of the 2000 Japan-Korea joint symposium of plant Science (2000, Shizuoka Japan)"

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」  
分担研究報告書

DNA組換え体の検知に関する研究

分担研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

(1) 組換え食品及びその加工品の検知法の開発

安全性の確認されたダイズ並びにトウモロコシについて、TaqMan Chemistry を利用した定量 PCR 分析法の検討を行い、RoundupReady ダイズ (RRS) について定量分析法を開発し、さらに Mon 810, GA21, T25, Bt11, Event176 の5系統の組換えトウモロコシについて、スクリーニング法並びに品種特異的な定量分析法を確立した。また、品種が明確な組換え品種の穀粒及び非組換え穀粒について、PCR を利用した品種特定型の検知法を利用し、当該穀粒で標示されている品種と、実際の検知結果の差違について検討し、トウモロコシ穀粒における組換え体の定量はF1 hybridの種子を基準にして行う必要があることを示した。さらに、企業や厚生労働省を通じ、入手したトウモロコシ試料について、GM含有率の実態調査を行った結果、IP ハンドリングされたトウモロコシの組換え混入率は5%以下であることが判明した。さらに、RRS について ELISA 法と定量 PCR 法の相関を調べた。また、安全性審査中の CBH351 トウモロコシ、パパイヤ(55-1)、New leaf Plus ジャガイモの定性的検知法を開発を行った。

(2) 遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験

遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験として、in vitro での分解性の検討を行った。2種の新規産生蛋白質 (CP4-EPSPS及びCry1Ab) は、いずれも人工胃液 (SGF) による分解が非常に早く、GM食品抽出物を用いての分解試験も可能であった。また、人工腸液 (SIF) による分解は、加熱前処理により、著しく短縮された。さらに、安全性審査中のCry9C蛋白質についても、加熱前処理による消化酵素による分解性の促進が確認された。

協力研究者

合田幸広、手島玲子、穂山浩 (国立医薬品食品衛生研究所)

日野明寛、松岡猛 (農林水産省食品総合研究所)

渋谷雅明 (東京大学薬学部)

小関良宏 (東京農工大学)

紀雅美 (大阪市立環境科学研究所)

梶原淳睦 (福岡県保健環境研究所)

A. 研究目的

1. 組換え食品及びその加工品の検知法の開発

近年バイオテクノロジー技術を応用した遺伝子組換え食品の開発が進み、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきた。消費食品の相当の部分が輸入に依存している我が国においては、今後より不可逆的に、広範囲な組換え食品が流通し、国民の食生活に浸透するものと考えられる。厚生労働省では遺伝子組換え食品について平成13年から食品衛生法に基づく安全性審査を義務づけるとこととし、あ

わせてその表示についても法的に義務化することとした。また、平成13年4月から、安全性審査を受けていない遺伝子組換え食品又はこれを原材料を用いた食品は、輸入、販売等が法的に禁止されることになった。このことを踏まえ、表示の制度化に伴い、表示内容について検証する方法が求められている。

本研究では表示内容を検証するための遺伝子組換え食品の検知法の開発及び、安全性審査中の組換え食品及びその加工品を定性的に検知する方法を開発することを目的として検討を行った。

## 2. 遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験

近年、食糧需要増加に伴い、世界的に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んでいるが、導入された組換え蛋白質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性研究のうえでの重要な判断基準となる。私共が、遺伝子組換え食品のアレルゲン性に関して研究的に行っていることとして、(1) *in vitro*での分解性の検討、(2) 患者血清を用いるアレルゲン性の検討、(3) 亜急性毒性試験の期間投与した動物における抗体産生の検討がある。

今年度は、*in vitro*での分解性の検討を主体に研究を行った。新規産生蛋白質としては、すでに安全性の確認された大豆等の遺伝子組換え食品に組み込まれている除草剤耐性CP4-EPSPS (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase)蛋白質、並びにとうもろこしに組み込まれている *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 (*B. t. k.* HD-1) 菌由来害虫毒素 Cry1Ab、並びに現在安全性の検討されている *Bacillus thuringiensis* 菌由来害虫毒素Cry9Cを対象に、それら蛋

白質の調製を行い、人工胃腸液による *in vitro* での分解性を調べた。さらに、食物として摂取する時には、加熱処理後に摂取することが大部分であるため、新規産生蛋白質の加熱処理後の人工胃腸液による分解性の変化についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 組換え食品及びその加工品の検知法の開発

#### 1) 組換え遺伝子食品の定量PCRの開発

試料は、米国産ダイズ、トウモロコシの組換え系統、非組換え系統を用いた。検知用プライマーは、各組換え体に広く使用されているCaM35Sプロモーター、NOSターミネーターのDNA配列内、及び各組換え体の特異的にもつ遺伝子の配列からプライマーを作製した。組換え体定量用の標準分子として、上記の各プライマー対で増幅されるDNA配列を含んだプラスミドDNAを作製した (Fig.1)。

#### 2) トウモロコシ穀粒からの組換え遺伝子検知

実験に使用した穀粒は、厚生省を通じて1999年に種子developerより入手したものをを用いた。穀粒を1% SDS Naで洗浄したのち一粒粉碎し、粉碎物80 mgをとり、QIAGEN DNeasy Plant Mini を用いてDNAを抽出、精製し、PCR法により組換え遺伝子の検知を行った。PCR条件は以下の通りである。PE AmpliTaq Goldを用いたホットスタート法；前熱変性95°C 10 min；熱変性95°C 0.5 min, アニーリング60°C 0.5 min, 伸長72°C 0.5 min, 繰り返し40回；終了反応72°C 7min。Mon 810特異的primer (増幅バンド長279 bp) : hsp70int. 中に上流primerを、Cry1A (b) 配列中に下流primerを設計。Bt 11

特異的primer (同522bp) : CaM35S promoter中に上流primerを、PAT配列中に下流primerを設計。Event 176特異的primer (同635bp) : CDPK promoter中に上流primerを、Cry1A(b) 配列中に下流primerを設計。なお、トウモロコシゲノムに内在的に含まれる遺伝子であるZein遺伝子を認識するprimerを、DNA検知の陽性対照として用いた。また、表示と異なる結果が得られた時には、組換え遺伝子の別な部位を認識する他のプライマーを用いて、増幅されるかどうか確認を行った。定量的検知は、ABI PRIZM 7700を用いたTaqMan Chemistry法で行い、CaM 35S promoter遺伝子の定量を行った。

乾燥種子は、粉砕器で粉末にした。DNAの抽出は、粉末サンプルを500 mg量り、キアゲン社DNeasy Plant Maxi Kitを、プロトコールを一部改変して使用した。プライマーの合成は、グライナージャパンに委託し、逆相カートリッジ精製品を用いた。プライマーは、水で50 mol/Lになるように希釈して、-20°Cにて保存した。トウモロコシの内在性遺伝子であるツェイン遺伝子を検知するプライマー(ZE01、ZE02)を用いた。真核生物の共通DNA配列を検知するプライマー(TRO3及びTR04)は、Allmannらの報告を元にして設計した。

### 3) 輸入トウモロコシ試料の組換え品種別含量

トウモロコシ試料は、厚生省を通じ国内の検疫所より入手した。粉砕物80 mgをとり、QIAGEN DNeasy Plant Mini を用いてDNAを抽出精製し、得られたDNAについて、品種特異的定性PCRを行った。次いで、品種特異的プライマー並びにプローブを用いMon810, Bt11, Event176, GA21について分別定量を行った。また、

CaM 35S promoter (CaM) 遺伝子及びNOS terminator (NOS) 遺伝子についても定量を行った。定量値はF1 hybridの種子を基準として算出した。また、CaM及びNOS遺伝子の定量値はMon810及びGA21換算で算出した。

### 4) ELISAと定量PCRの比較

GM0大豆とnon-GM0大豆を6種類の割合で混合粉砕したもの及びEU標準品(5種)、ELISA標準品(3種)並びに検疫所より入手した分別流通品(1種)を用いた。ELISAによるGM0の定量にはGM0 Soya Test Kitを用いた。定量PCRにおけるDNAの抽出精製はQIAGEN DNeasy Plant Miniを用いた。定量PCRの反応液25 mLの組成はUniversal PCR Master Mix 12.5 mL、対象プライマー0.5 mmol/L、対象プローブ0.2 mmol/L、20ng/mL DNA試料溶液2.5 mLまたは検量線用標準液2.5 mL。定量PCRにはABI PRISM 7700を用いた。

### 5) 安全性審査中CBH351トウモロコシの定性検知法

CBH351系統に導入された遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*由来の*cry9C*遺伝子であり、これはcauliflower mosaic virus (CMV)由来の35Sプロモーター(P-35S)と、CMV由来35Sターミネーター(T-35S)に制御されている。また、*cry9C*遺伝子の5'末端には、*P. hybrida*由来の*cab22L*のリーダー配列が導入されている。シークエンス用のプライマーとして、P-35S領域から、既報で報告したCM01を選択するとともに、Genbank<sup>TM</sup> Accession No. J02046および文献を元に、T35S領域からT35S2-3'プライマーを作成した。シークエンス用プライマーを用いて、PCRを行った。合成された増幅産物は、日本製粉(株)にダイレクトシークエンスを委託した。CBH351検知のためのPCR

の条件は、次のとおりである。反応液は、DNAポリメラーゼを0.625 unitsとした。その他の組成は、シーケンス用の反応液と同様である。95°Cに10分間保った後、95°C0.5分間、60°C0.5分間、72°C0.5分間を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行った後、72°Cに7分間保った。反応液は、電気泳動を行い、予想される長さのDNAの増幅を確認するとともに、ダイレクトシーケンスによりPCR産物のDNA塩基配列を決定した。電気泳動に関して、抽出したゲノムDNAの純度確認のためには、0.8%、またPCR産物の増幅確認のためには、3%のゲルを使用した。電気泳動後は、画像解析装置を使用し、DNA Stain Gel-Ethidiumbromide-Low intensityによりゲルを撮影した。

#### 6) 安全性審査中組換えパパイヤ (55-1) の定性的検知

遺伝子非組み換え (Non-GM) パパイヤ (Sunset) およびGMパパイヤ (55-1系統、Sunup) は、厚生省生活衛生局食品保健課を通じ入手した。サーマルサイクラーは、PERKIN ELMER製GeneAmp PCR System 9600を用いた。

パパイヤ果実は、果肉部分を小片にして切り出し、凍結乾燥後粉砕機を用いて粉砕した。粉砕試料80 mgを2 mL容試料管に量り採り、Plant Mini Kitに記載された手法を改変してDNAを抽出精製した。

缶詰パパイヤは、果肉小片を滅菌水で洗浄し、凍結乾燥後粉砕機を用いて粉砕した。2 gを50 mL容試料管に量り採り、Genomic-tip systemに記載された手法を改変してDNAを抽出精製した。プライマーの合成は、Amersham Pharmacia Biotechに委託した。全て脱塩精製品を用いた。

PCR反応液は、1×PCR緩衝液 (宝酒造)、0.20 mmol/L dNTP、3.0 mmol/L塩化マグ

ネシウム、0.5 μmol/Lプライマー及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼになるように混合し、DNA溶液2.5 μLを氷中で加え、全量を25 μLにした。反応条件は以下の通りである。95°Cで10分間反応後、95°C 30秒間、60°C 30秒間、72°C 30秒間を1サイクルとして40サイクルのPCR増幅を行う。次いで72°Cで7分間保った後、4°Cで保存した。

電気泳動後、ゲルイメージ解析装置を使用し、増幅されるDNAの検知を行った。また、予想される長さのDNAが増幅された場合は、該当するPCR産物のダイレクトシーケンスをグライナージャパンに依頼し行った。

#### 2. 遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験

##### 1) 新規産生蛋白質の調製

CP4-EPSPS 蛋白質はCP4-EPSPS遺伝子組換え大豆 (GM大豆) から、PCRで増幅した遺伝子を大腸菌に組み込み、大量発現後 FPLC 精製した分子量 47kDaのものを用いた。GM大豆抽出物は、破碎、アセトンでの脱脂を行った後のリン酸緩衝液 (PBS) 抽出物を用いた。Cry1Ab 蛋白質に関しては、*B. t. k.* HD-1 菌から結晶毒素として単離、精製した分子量130 kDaの蛋白質を用いた。Cry9C蛋白質に関しては、Aventis社から供与された毒性発現部位 (69kDa) を大腸菌に発現させた後精製したものを用いた。

##### 2) 人工胃腸液の調製

USP の定義に基づき<sup>1)</sup>、人工胃液 (simulated gastric fluid (SGF)) 及び人工腸液 (simulated intestinal fluid (SIF)) を調製した。具体的にはSGFは、塩化ナトリウム 1 g、ペプシン 1.6 g、塩酸 3.5 mL を加え、精製水で全量を 500 mL に調製し、SIFは、リン酸二水素カ

リウム 3.4 gを精製水 125 mLに溶解後、95 mLの 0.2 N水酸化ナトリウム溶液、精製水 200mLを加えた後、5.0 gのパンクレアチン (USP grade, Sigma) を加え、0.2 N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.5 に調製し、全量を 500 mLに調製した。

### 3) ウェスタンブロット法による *in vitro* における分解性の確認

あらかじめ 37°Cに加温しておいた SGF 及び SIF と上記蛋白質 (100°Cで 5 分間煮沸処理をしたもの、及び処理をしないもの。) を 50 mg/L-100mg/L になるように混和し、37°Cで反応させた。混和後0 秒から 3 分 (SGF)、0 秒から 240 分 (SIF) までの反応液をそれぞれの間隔をおいて 100  $\mu$ L ずつ回収し、SGF 反応液においては 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を 30  $\mu$ L 加えることで、SIF 反応液においては 100°Cで 5 分間煮沸することで酵素による分解反応を停止させた。この溶液中の蛋白質を SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体として抗 CP4-EPSPS ウサギ血清、抗 Cry1Ab マウス血清、又は抗Cry9Cウサギ血清、次いで二次抗体として HRP 標識ロバ抗ウサギ Ig 抗体、又はHRP 標識ヒツジ抗マウス Ig 抗体を反応させ、目的蛋白質のバンドをHRP 基質溶液で発色させた。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 組換え食品及びその加工品の検知法の開発

#### 1) 組換え遺伝子食品の定量PCRの開発

標準分子を用い、個々の組換え体に関して、(内在性遺伝子数) / (組換え体が有するDNA配列の数) を求め、実際のサンプル比とを比較することにより組換え体の混入率の測定を行った。本法により、5系統の組換えトウモロコシ及び1系統の

組換えダイズを個別に定量することができ、0.1%程度の混入まで信頼性の高い測定が可能となった。

### 2) トウモロコシ穀粒からの組換え遺伝子検知

定性的検知：非組換え表示穀粒30粒中からBt11の特異的遺伝子が2粒より、Event 176の特異的遺伝子が別の2粒より検知され、Mon810の特異的遺伝子は検知されなかった。Bt11表示穀粒30粒中、Bt11の特異的遺伝子のみが25粒より検知され、Event176及び Mon810の特異的遺伝子は全ての粒から検知されなかった。Event176表示穀粒30粒中、Event176の特異的遺伝子が22粒から検知され、このうちさらに3粒からMon810の特異的遺伝子が検知された。また、残りの8粒のうち、1粒からBt11の特異的遺伝子が、別の1粒からMon810の特異的遺伝子が検知され、他の6粒からは、Bt11、Event176、Mon810の特異的遺伝子は検知されなかった (Table 1)。

定量的検知：Event 176の30粒について実験を行った結果、組換え遺伝子の検知量が多く、組換え遺伝子がホモで存在すると考えられるもの6粒、種子と同程度の検知量でヘテロで存在すると考えられるもの16粒、検知されなかったもの1粒であった (Table 2)。

### 3) 輸入トウモロコシ試料の組換え品種別含量

トウモロコシ試料について組換え品種別定量値を合計したところ、20%以上組換え品種を含んでいるもの、組換え品種を5%以下含んでいるもの、組換え品種が検出されないものの3グループに分類された。組換え品種が検出された試料では、1試料を除き組換え品種の70%以上がMon810であった。また、分別定量値の

合計とMon810換算されたCaM遺伝子の定量値には、高い相関が認められた (Fig. 2)。従ってCaM遺伝子を検知するスクリーニング法は、有効であるものと考えられた。

#### 4) ELISAと定量PCRの比較

ELISAと定量PCRによるGM0含有量 (%) の相関は、GM0含量約10%までの範囲において、相関係数 ( $R^2$ ) 0.9614、 $y=0.7359x+0.2559$ の直線性が得られた (Fig. 3)。

#### 5) 安全性審査中CBH351トウモロコシの定性検知法

CBH351より抽出されたDNAを鋳型にして、シークエンス用プライマー対によりPCRを行いシークエンスしたところ、約2.4 kbpのDNA塩基配列の情報を得た。この配列情報と、cauliflower mosaic virus genome (Genbank™ Accession No. J02046)、petunia gene for chlorophyll a/b binding protein *cab22L* (同 X02359) および、De Roeckらの特許文書中の improved *cry9C* coding regionのSEQ ID No. 3とを比較した。シークエンスの結果から、*cry9C*遺伝子は、長さが1878 bpと予想され、これは improved *cry9C* coding regionのSEQ ID No. 3とDNA塩基配列が一致した。また、*cry9C*遺伝子のN末端側には、No. X02359のDNA塩基配列の第171-231塩基と、同一な領域があった。以上の結果をもとに、CBH351検知用に、P-35S領域から既に報告したCM03を5'側プライマーとして選択するとともに、*cab22L*のリーダー配列領域より5'側プライマーとしてCBH1-5'を設計した。また、*cry9C*遺伝子より3'側プライマーとして、CBH1-3'を設計した。CBH351検知用プライマーの位置をFig. 4に、プライマーのシークエンス配列をTable 3に示す。設計したプライマーの特異性を調べるため

に、トウモロコシ (non-GM、Event176、Bt11、T25、MON810およびGA21) とダイズ (non-GMダイズおよびGMダイズ)、コメ、コムギ、オオムギの各種子から抽出したDNAを鋳型として、PCRを行った。CM03-CBH1-3'プライマー対及びCBH1-5'-CBH1-3'プライマー対を用いた場合とも、CBH351より抽出した試料にのみ予想される長さの増幅産物が得られた。本研究で開発したプライマー対を用いたPCRでは、2生物または、3生物の異なった生物種由来のDNA配列部分を増幅している。従って、偽陽性のないCBH351系統に特異的な検知を行うことが出来たものと考えられる。次に、本法の検知下限を調べるためにCBH351粉末とnon-GMトウモロコシ粉末を混合し、CBH351を5, 1, 0.5, 0.1, 0.05%含有したトウモロコシ含有試料を調製し、DNAを抽出後、PCRを行った。その結果、CM03-CBH1-3'プライマー対を用いた場合には0.05%、CBH1-5'-CBH1-3'プライマー対を用いた場合には0.1%混合したのみまで検知可能であった。Fig. 5に示す。0.05%混合試料における組換えトウモロコシ由来のゲノムDNA量は、約0.025 ng/tube含むことになり、トウモロコシのゲノムサイズ $3.9 \times 10^8$  bp/haploid genomeから計算すると、数コピーとなる。

#### 6) 安全性審査中組換えパパイヤの定性検知法

パパイヤに普遍的な遺伝子として、パパイヤゲノムに内在するパpain遺伝子を選択し、PCRの陽性対照プライマー対として同遺伝子の塩基配列情報をもとに、211bpの増幅バンド長が得られるpapain 1-5' およびpapain 1-3'を設計した。GMパパイヤは、パパイヤリングスポットウイルス (RRSV) の外被タンパク質遺伝子が目的遺伝子として導入されてい

る。同遺伝子は、ウイルスに自然感染したパパイヤ中にも存在するため、遺伝子導入用ベクターpGA482GG/cpRRV-4に含まれる*Escherichia coli*由来の $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子、*Escherichia coli*由来のneomycin phosphotransferase I I (NPT II) 遺伝子、cauliflower mosaic virus 35S promoter (CaMV35S) 遺伝子、*Agrobacterium tumefaciens*由来のnopaline synthase terminator (NOS) 遺伝子の塩基配列情報を元に、以下の通り検出用プライマー対を用意した。まず、GUSの遺伝情報 (GenBank<sup>TM</sup>Accession No. A00196) をもとに、同遺伝子を認識するプライマーとして、GUS -5', GUS -3', GUS n-3' を設計した。さらに、NPT II 遺伝子情報 (GenBank<sup>TM</sup>Accession No. M35007) をもとに、同遺伝子を認識するプライマー対として、NPT II 1-5' とNPT II 1-3' を設計した。次に、検出の特異性を高めるため、2生物に由来する遺伝子領域を増幅するプライマー対の設計を行った。まず、NPT II 遺伝子の下流に存在するNOS遺伝子を認識する5' -プライマーとCaMV35S遺伝子を認識する3' 側プライマーを用いてPCRにより増幅後、シークエンスし塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報をもとに、遺伝子の大部分が分解されている加工食品でも使用が可能であることを考慮し、250bp以下の増幅バンドが得られるよう、NOS遺伝子上に新たにプライマーNOS C-5' を、CaMV35S遺伝子上にプライマーCaM N-3' を設計した。さらに、確認試験として、CaMV35S配列からGUS配列に架かる領域を増幅することを想定し、CaMV35S配列を認識する既知のプライマーCaM 03-5' を上流プライマーに、GUS領域を認識するプライマーGUS n-3' を下流プライマー

に選択した。各プライマーを組み合わせたプライマー対の番号 (No. 1-6) と増幅バンド長をそれぞれTable 4に示す。次に、non-GM、GMパパイヤから抽出したDNAを鋳型とし、プライマー対No. 1-6を用いてPCRを行った。その結果、Non-GMパパイヤでは、陽性対照プライマー対を用いた場合にのみ増幅バンドが検出されるのに対し、GMパパイヤでは、どのプライマー対を用いたレーンでも、それぞれ予想される増幅バンド長の増幅産物が得られ、これらのプライマー対が検知に有効であることが明らかとなった (Fig. 6)。

プライマー対No. 2、4を用いて、東京都内で購入した4栽培品種のパパイヤについてGM品種であるかどうか検知を行った。その結果、全ての品種ともGM特異的なプライマー対を用いたレーンで増幅バンドが検知されず、陽性対照プライマー対を用いたレーンでのみバンドが検知され、これらのパパイヤがnon-GM種であることが明らかとなった。市販フルーツミックス缶詰よりシラップ付けのパパイヤを取り出し、これらのパパイヤからDNAが抽出可能か検討した。No. 5、6のプライマー対は、検出の特異性を高めるため、GMパパイヤに組み込まれた遺伝子領域上、別な2生物に由来する連続した遺伝子領域を増幅するプライマー対である。このような特異性の高いプライマー対を用いると、缶詰由来のパパイヤでも、擬陽性を示す増幅バンドが検知されないことが明らかとなった。

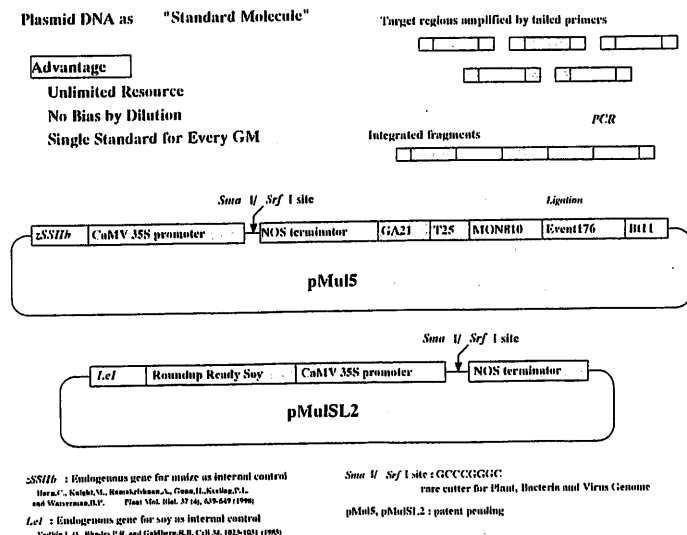
#### 7) 安全性審査中組換えジャガイモの定性検知法

陽性対照プライマー対として216bpの増幅バンドが検出されるPssプライマー対を用い、New leaf Plus 検出プライマー対とし



Fig.1

Standard Molecule



Correlation between specific quantification and CaM screening quantification

Fig.2

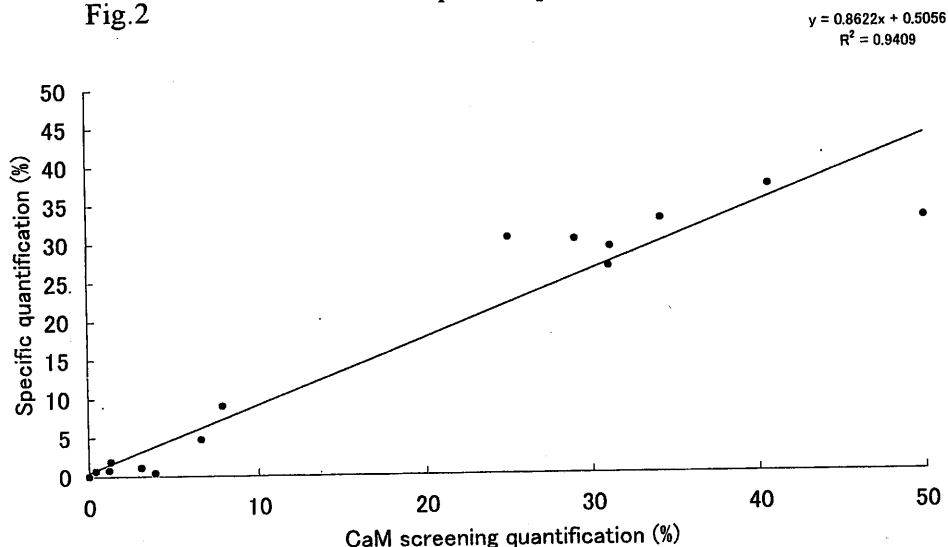
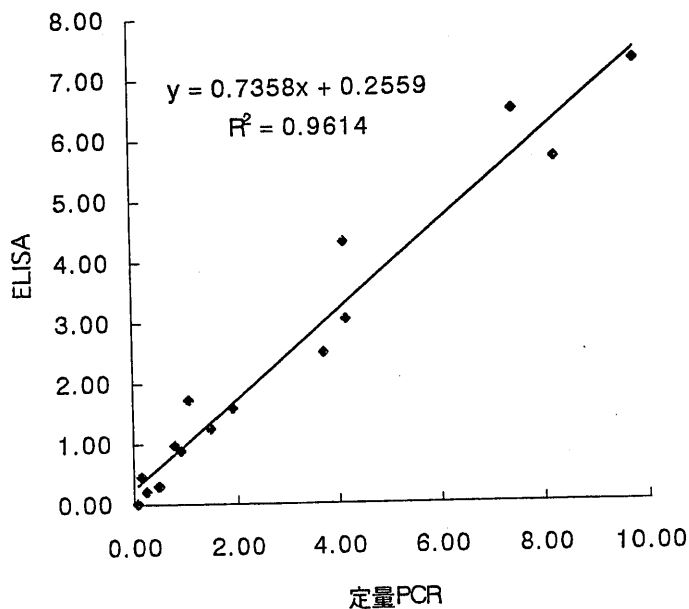


Fig.3 Correlation between EIISA method and quantitative PCR method



**Table 1** Number of detection on the specific exogenous genes in grains of Bt 11, Event 176 and Non-GM lines of maize

Line	Total	Detection				Non-detection	
		Bt 11 (B) specific	Event 176 (E) specific	Mon 810 (M) specific	Heterogeny B+E E+M		
Bt 11	100 (100)	70	11	0	7	0	26
Event 176	30 (100)	1 (3)	22 (73)	4 (13)	0 (0)	3 (10)	6 (20)
Non-GM	30 (100)	2 (7)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	26 (87)

Percent ratios to the total number are given in parentheses.

**Table 2** Estimated Genotype of Event 176 grains

Total number	Homozygous		Heterozygous			
	EE	NN	EM	EN	BN	MN
30 (100)	6 (20)	6 (20)	3 (10)	13 (43)	1 (3)	1(3)

E: Event 176, N: Non-GM, M: Monsanto 810, B: Bt 11

Percent ratios to the total number are given in parentheses.

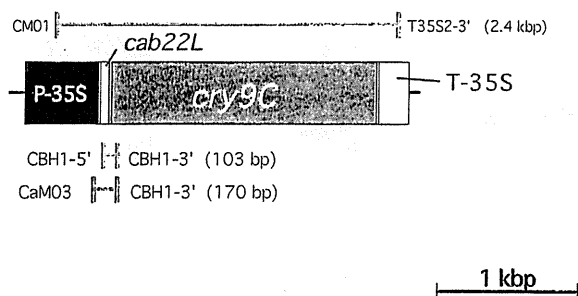
**Table 3** List of primers

Name	Sequence (5' → 3')	specifity	Amplicon	reference
A: CM01	5' -CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A-3'	CMV /sense	CMV	2.4 kbp
T35S2-3'	5' -GGA TTT TAG TACT GGA TTT TGG T-3'	CMV /anti-sense		
B: ZE01	5' -TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG-3'	10kDa <i>Zel</i> /sense	maize	329 bp
ZE02	5' -GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT-3'	10kDa <i>Zel</i> /anti-sense		
TR03	5' -TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A-3'	Eukaryote /sense	Eukaryote	137 bp
TR04	5' -AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T-3'	Eukaryote /anti-sense		
C: CM03	5' -CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'	CMV /sense	CBH351	170 bp
CBH1-3'	5' -GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'	<i>cry9C</i> /anti-sense		
CBH1-5'	5' -CTA TTA CTT CAG CCA TAA CAA AAG AAC TCT-3'	<i>cab22L</i> /sense	CBH351	103 bp
CBH1-3'	5' -GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'	<i>cry9C</i> /anti-sense		

A: for DNA sequencing

B: for confirmation of feasibility of the DNA extracted from maize soy, rice, wheat and barley

C: for detecting CBH351



**Fig. 4** Schematic diagram of designed PCR primers in relation to the *cry9C* unit introduced into CBH351 maize.

The two pairs of PCR primers were designed to detect CBH351.

The expected lengths of PCR products are indicated in parentheses.

The segments of CM01-T35S2-3' was sequenced.

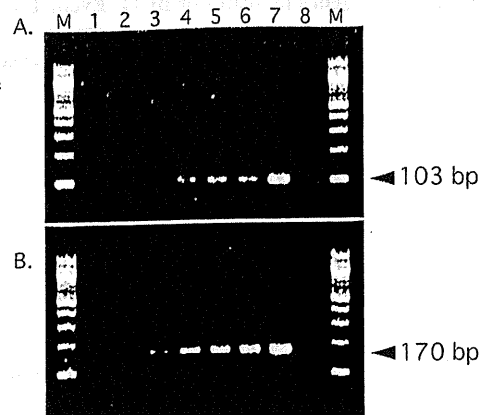


Fig.5 Sensitivity of a PCR method using the specific primer pairs designed for CBH351.

Genomic DNAs extracted from the mixture containing the various amount of CBH351 maize in non-GM maize were amplified.

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.

The primer pairs, CM03-CBH1-3' (A) and CBH1-5'-CBH1-3' (B).

Lane 1: amplification of non-GM maize; lanes 2-7: amplification of maize containing 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 20 % of CBH351 maize, respectively; lane 8: negative control (no DNA); M: 100 bp ladder size standard.

Table 4 No. of Primer Pair and size of amplicon obtained by PCR

No.	Primer Pair	Size
1	papain 1-5' + papain 1-3'	211 bp
2	GUS -5' + GUS -3'	715 bp
3	GUS -5' + GUS n-3'	155 bp
4	NPTII 1-5' + NPTII 1-3'	151 bp
5	Nos C -5' + CaM N -3'	207 bp
6	CaM 03-5'+ GUSn-3'	250 bp

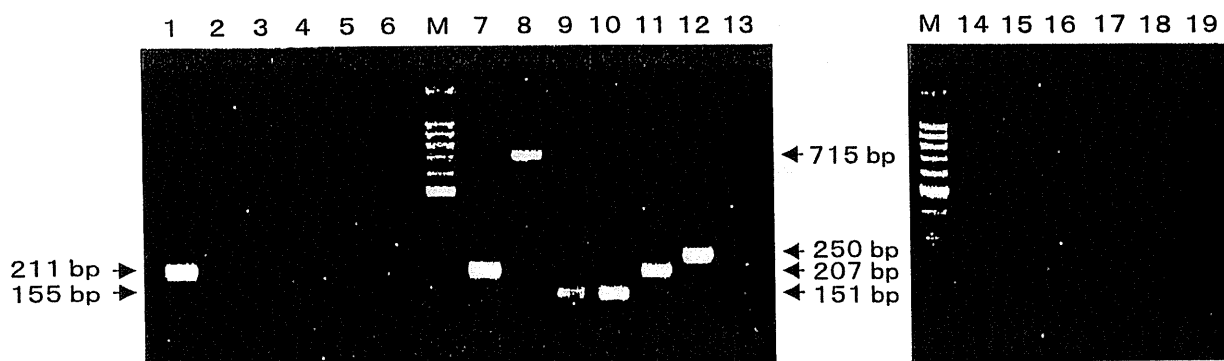


Fig.6 PCR products amplified from non-GM and GM papaya DNA with each primer-pairs.

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

Lanes 1-6: non-GM papaya DNA, lanes 7-13: GM papaya DNA, lanes 14-19: negative control (no papaya DNA). M: 100 bp ladder size standard.

The following primer pairs were used. Lanes 1, 7 and 14: No. 1, lanes 2, 8 and 15: No. 2, lanes 3, 9 and 16: No. 3, lanes 4, 10 and 17: No. 4, lanes 5, 11 and 18: No. 5, lanes 6, 12 and 19: No. 6, lane 13: negative control (no primer).

て 172 bp の増幅バンドが検出される PLRV-rep 遺伝子検出用プライマー対を用いて New leaf Plus ジャガイモの特異的定性検知が可能になった。

## 2. 遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験

### 1) CP4-EPSPS蛋白質の分解性

大腸菌で発現させた精製CP4-EPSPSは、SGF 中では非常に分解が早く、反応開始から 5 秒後に半量になり、20 秒後にはウェスタンブロット法による検出限界以下となった。又、SIF 中では、30分後で半量になり、240 分後には検出限界以下となった。なお、精製CP4-EPSPSの加熱処理によって、SIF中での分解がはやまり5秒以下で、検出限界以下となった。

### 2) GM大豆中 CP4-EPSPS 抽出物の分解性

GM大豆中での CP4-EPSPS の分解性を検討するために、GM大豆抽出液を上記の精製した CP4-EPSPS を用いた場合と同様、人工胃腸液と反応させたところ、SGF 中での分解は早く、20 秒後には検出限界以下となった。又、SIF 中では10倍量のSIFを用いた時、240 分で検出限界以下となり、1の結果とほぼ同様であった。なおSIF の分解において、大豆抽出物の煮沸前処理により、CP4-EPSPS 蛋白質の分解時間が 20 分に短縮された。

### 3) Cry1Ab 蛋白質の分解性

結晶毒素として精製されたCry1Ab 蛋白質は、SGF による分解は早く 90 秒で検出限界以下となった。なお、煮沸前処理での分解時間は60 秒に短縮された (Table 1)。又、SIF 中では、非加熱では、240分でもほとんど分解されないが、加熱処理でSIF中での分解が顕著となり5秒以下で、検出限界以下となった (Table

e 2)。

Table 1. Digestion of Cry1Ab by SGF

Incubation time (sec)	Digestive ratio	
	no-boil	boil
0	1.000	1.000
10	0.854	0.768
30	0.107	0.098
60	0.019	N.D.
90	N.D.	

Optical density of 130 kDa band in each incubation time was determined. Digestive ratio of each incubation time to before degestion was calculated. N.D.: not detected

Table 2. Digestion of Cry1Ab by SIF

incubation time (min)	Digestive ratio	
	no-boil	boil
0	1.000	N.D. (<5 sec)
240	N.D.	

Optical density of 130 kDa band in each incubation time was determined. Digestive ratio of each incubation time to before degestion was calculated. N.D.: not detected

### 4) Cry9C蛋白質の分解性

Cry9C蛋白質のSGF中での分解性は、前述の2種の蛋白質よりは遅く、6分後に半量になり、10分後に検出限界以下となった。このSGFによる分解は、加熱処理でより早くなり、2分で半量に、5分で検出限界以下となった (Table 3)。なお、蛋白質の途中分解物として、分子量1万以上の蛋白質断片は検出されなかった。