

図3 導入遺伝子の後半部分 (E5'450⇔NOS) の検知
M:分子量マーカー
12:タンパク質の発現が認められなかった個体
7, 8:タンパク質の発現が認められた個体

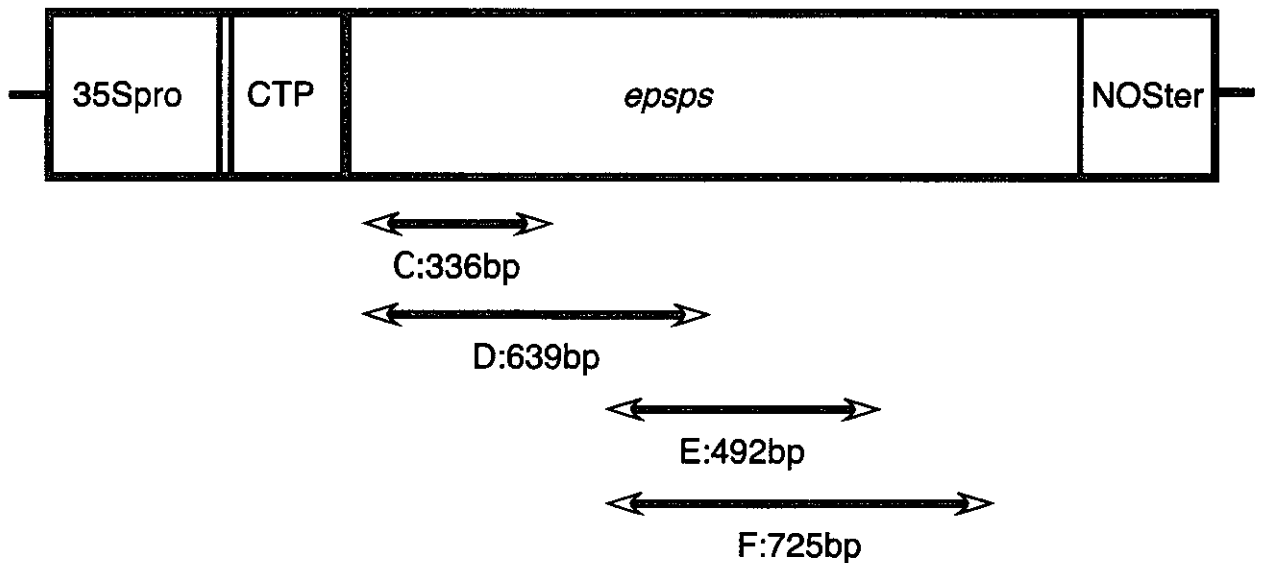
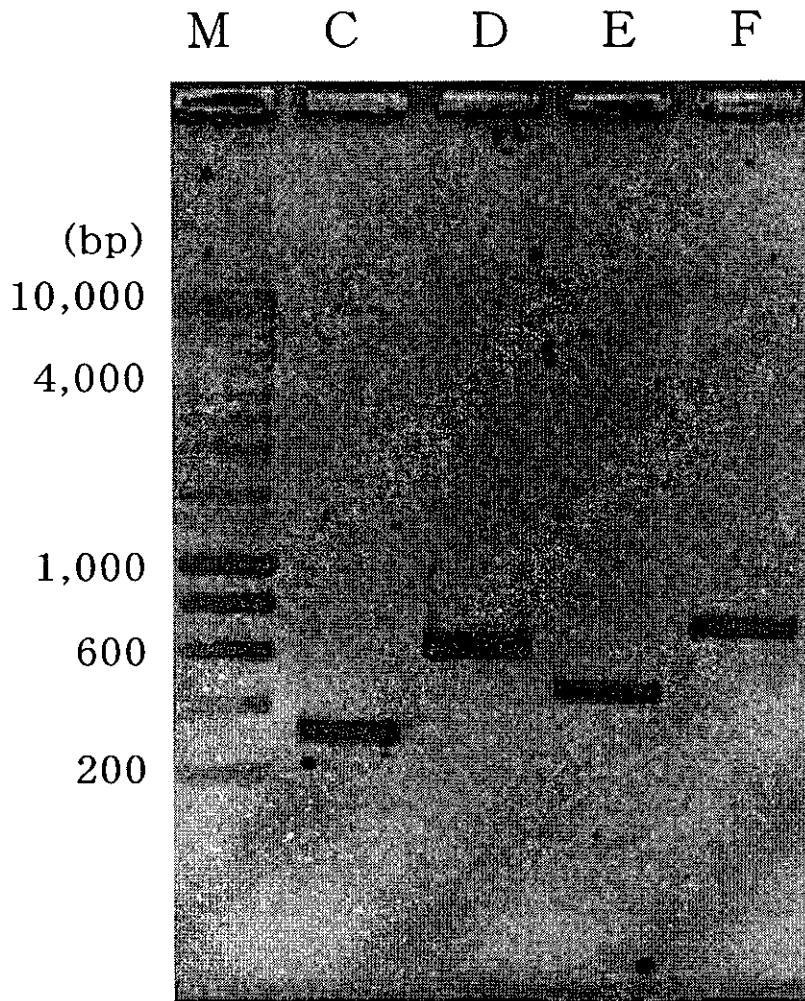


図4 各プライマーの組合わせによるPCR増幅断片
M:分子量マーカー
C:E5'-31⇔E3'-366
D:E5'-31⇔E3'-669
E:E5'-450⇔E3'-921
F:E5'-450⇔E3'-1154

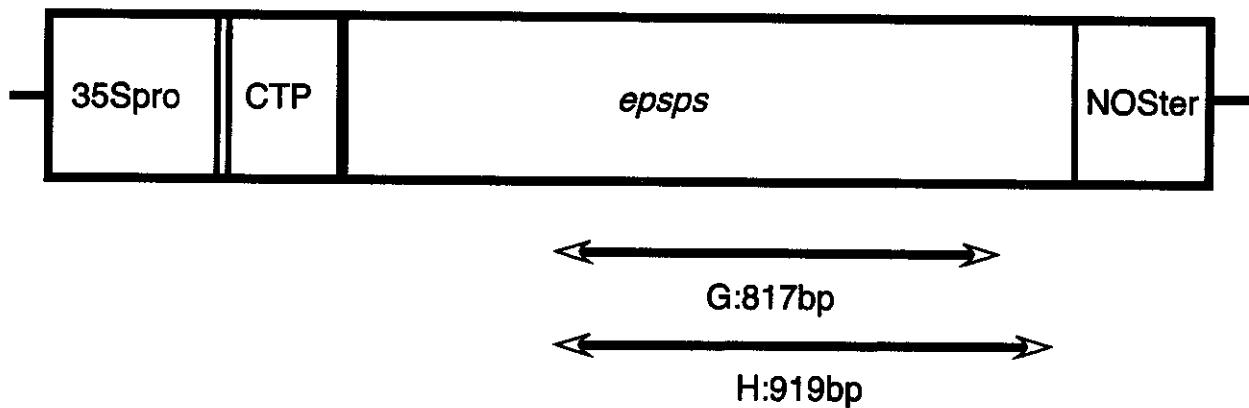
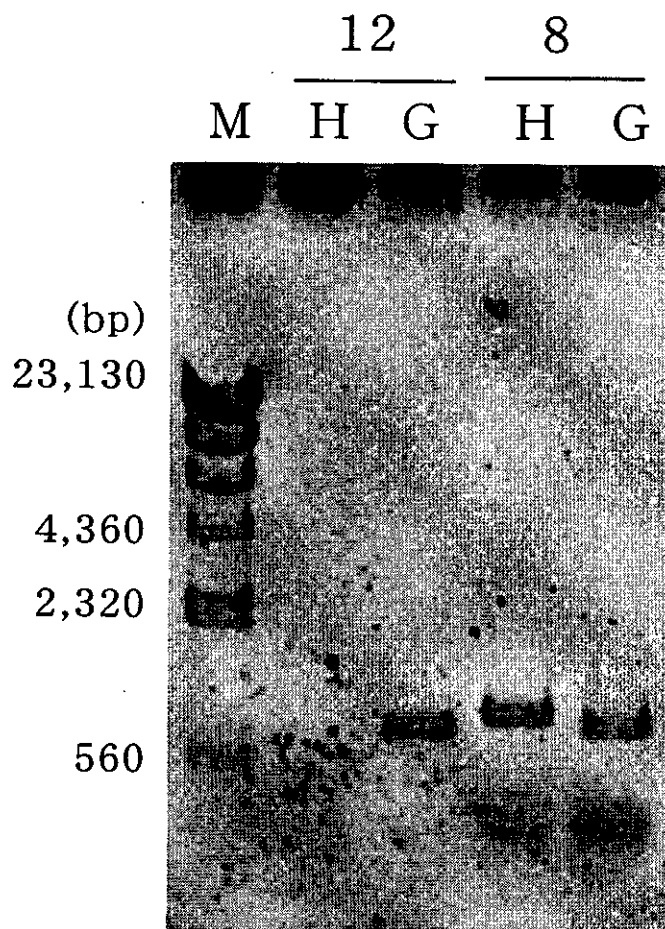


図5 各プライマーの組合わせによるPCR増幅断片
 M:分子量マーカー
 G:E5'-450⇔E3'-1266
 H:E5'-450⇔E3'-1368
 12:タンパク質の発現が認められなかった個体
 8:タンパク質の発現が認められた個体

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種における遺伝子配列の安定性を調べるため、日本に輸入されてきたダイズの中に含まれていた遺伝子組換えダイズのプロモーター領域に対する DNA 断片を PCR によって増幅し、電気泳動で調べたところ、塩基配列に個体ごとの多型が生じていることが示された。

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生薬部）

佐々木和生（青森大学工学部）

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、多数の系統が栽培・商品化されている。そのうち、我が国の安全性審査によって食品としての安全性が確認されたものについては、日本に輸入されてきている。その中で、例えばダイズの場合、1つの遺伝子組換え体を作成するにあたっては、同一の遺伝子を導入した遺伝子組換えダイズ個体を多数作成し、これを実験室内、閉鎖系温室、隔離圃場、そして一般の圃場において段階的に栽培しつつ育種される。そこでは、自家交配もしくは様々な在来品種との交配を繰り返しながら商品化できる品種を育種していくが、その過程において、導入した遺伝子の発現が不安定なもの、あるいはその発現は強くとも、たとえば実りが悪い、病虫害に弱いなど、商品価値の低いものは廃棄され、最終的にはその中から1本～数本のみが品種として固定され、商品化される。そ

して、その品種から、さらなる交配によって種子が生産され、販売される。すなわち、商品としての種子が販売されるまでには数多くの交配が重ねられている。

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、遺伝子塩基配列の置換や点突然変異はもとより、塩基配列の重複、欠失などの変異が生じる。このことは、外来遺伝子が導入され、それが安定な表現型として発現し、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ける導入遺伝子の安定性はどのようなになっているのかについての情報は非常に少ない。昨年度の当研究者の研究により、遺伝子組換えトウモロコシの後代交配種において、443 bp の中で 2 bp の点変異が見いだされたが、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

が判明した。

昨年, Windels らによって遺伝子組換えダイズにおいて, 導入した遺伝子のターミネーター側に配列の重複があることが報告された(Eur. Food Res. Technol. (2001) 213: 107-112)。しかし, この重複は, この論文の報告以前に既に開発者によって見いだされており, このことにつき, 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品衛生バイオテクノロジー部会に開発者側から報告があり, 審査の結果, この重複によって新たなアミノ酸配列が生じるなどの変化はなく, 安全性に問題がないことが示された。また, 開発者の報告により, この重複は後代交配種において生じたものではなく, 遺伝子導入時に生じたイベントであり, 当代において既に重複が見られたことが示された。しかし, はたして後代交配種においてこのような塩基配列の重複, 欠失などの変異が生じるか否かについて数多くの個々の個体に対して調べた研究例はない。

そこで, 今回は, EPSPS 遺伝子を導入した遺伝子組換えダイズにおける導入遺伝子のプロモーター領域に注目し, 個々の個体間で変異等が見られるか否か, すなわち多型を示すか否かを調べた。

B. 研究方法

<ラウンド・アップ・レディ・ダイズの核 DNA の調製>

研究協力者である青森大学の佐々木和生博士が, 輸入されてきた多数のダイズ粒由来植物体から核 DNA を抽出し, これをテンプレートとしてラウンド・アップ・レディ・ダイズ検出用プライマーを用いて PCR を行い, その結果, 陽性であった個体の核 DNA を分与してもらい, これをテンプレート用核 DNA とした。

<35S プロモーター領域の PCR による増幅>

PCR プライマーの位置については既報の 35S プロモーターの塩基配列をもとに, Fig. 1 の当該位置に相当する部分の塩基配列に対して合成を行った。

個体毎に独立に抽出・精製された 200 ng の核 DNA を取り, 2 μ l の 10 \times LA Taq 緩衝液 (宝酒造), 2.5 mM MgCl₂, 250 μ M dNTP mix, 10 pmol ずつの 35S-cRV プライマー と 35S-b プライマーを含む 19 μ l の反応液を 50 μ l の PCR 反応チューブ中に作った。なお, PCR 反応のポジティブ・コントロールとして, 上記のプライマーの代わりに 35S-b プライマーと CP4-RV プライマーを用いた。反応液を良く混合した後, 遠心して反応液をチューブ底に集め, これに 30 μ l のミネラルオイルを重層した。これを PCR (MiniCycler™, MJ Research 社製) にかけて, 98 $^{\circ}$ C 1 分間 denature させた後, 92 $^{\circ}$ C まで温度を下げた。ここで反応チューブのフタを開け, 1 unit/ μ l の LA Taq polymerase (宝酒造) を 1 μ l ミクロ・ピペットマンで取り, これを重層したオイル層を突き通して下の反応液に直接加え, ピペッティングすることによって混合し; ホット・スタートした。反応チューブのフタを閉じ, 92 $^{\circ}$ C, 30 秒 \Rightarrow 61 $^{\circ}$ C, 40 秒 \Rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 2 分のサイクルを 35 回繰り返した。最後に 72 $^{\circ}$ C, 10 分のサイクルを行った後, 4 $^{\circ}$ C とした。この反応液に 50 μ l のクロロホルムを加え, 軽く遠心した後, 水層を取った。この水層 10 μ l に 2 μ l の電気泳動用緩衝液を加え, これを 1.5% アガロースゲル電気泳動にかけて増幅産物を分離し, エチジウムブロマイドで DNA を染色し, トランスイルミネーター上で写真を撮った。

Nested PCR は, 35S-cRV プライマー

と 35S-b プライマーの組み合わせで PCR を行った反応液から 1 μ l を取り、これを 50 μ l の水で希釈し、これから 2 μ l を取り、上記反応液の核 DNA の代わりに加え、さらに、プライマーとして 35S-b プライマーの代わりに 35S-y プライマーを 10 pmol 用い、全量で 20 μ l の反応液とし、上記と同じ条件で PCR 反応を行った。

C. 結果

GMO ダイズから調製した核 DNA をテンプレートとして 35S-cRV プライマーと 35S-b プライマーの組み合わせで PCR を行ったところ、増幅産物はほとんど見られなかった(Fig. 2)。Fig. 2 においては、9 個体分のみしか示していないが、これらを含む独立の 70 個体について調べてみた結果、いずれからも増幅産物は検出されなかった。また、Fig. 2 の 9' に示したように、いずれの個体からも PCR 反応のポジティブ・コントロールとして用いた 35S-b プライマーと CP4-RV プライマーを用いた場合には増幅産物が検出され、PCR 反応上の問題はないことが明らかとなった。

そこで、より感度を上げるため、上記の核 DNA をテンプレートとして 35S-cRV プライマーと 35S-b プライマーの組み合わせで PCR を行った反応液から一部を取り、これを希釈してテンプレートとし、35S-cRV プライマーと 35S-y プライマーの組み合わせで nested PCR を行った。その結果、Fig. 3 に示すように、12 個体全てに共通して A および B のバンドが検出された。しかし、個体番号 11 においては、白抜きの矢印で示したように、この個体特異的な X のバンドが検出された。このことから、個体番号 11 においては、他の個体とは異なった塩基配列を有することが判明した。さらに、その他の 58 個体について調べた結果、さ

らに 3 個体において個体特異的なバンドが検出された。すなわち、個体毎に異なる塩基配列を有する多型が生じていることが示された。

D. 考察

35S プロモーター領域の塩基配列に対するプライマーを用いた遺伝子組換えダイズ核 DNA に対する PCR において、1 回目の PCR 反応では増幅産物は検出されなかった。しかし、nested PCR を行った結果、各ダイズ粒由来個体から何本かのバンドが検出された。ほとんど全てのダイズ粒由来個体から A および B の 2 本のバンドが見られたが、これはおそらくダイズゲノム内に存在するレトロトランスポソンの部分配列と考えられる。ここで用いたものは 35S プロモーター領域に対するプライマー対であるが、このプライマーの設計において、プライマーの候補となる塩基配列を DNA データ・ベースに対して相同性検索を行ったところ、ダイズを含め、様々な植物種のレトロトランスポソンとの相同性がヒットしてきた。これは、35S プロモーターがカリフラワー・モザイク・ウイルス由来であるため、植物に感染するウイルスが核ゲノム内に入り込んだ時、その塩基配列の一部が欠失したために生じたとされているレトロトランスポソンと、塩基配列上において相同性のある部分が存在しているためと考えられる。このため、なるべく既知のレトロトランスポソン由来の配列にヒットしないようにプライマーを設計したが、やはり多少の相同性があるため、nested PCR を行うことによってダイズ・ゲノム内のレトロトランスポソンの配列が増幅されてきたと考えられる。

今後、これらの各ダイズ粒由来個体に共通に見られるバンドとともに、4 個体から見い

だされた個体特異的に見られるバンドをクローニングし、その塩基配列を決定することにより、どのような塩基配列によって多型が生じているかを決定していく必要がある。

E. 研究発表
(論文発表) なし
(学会発表) なし

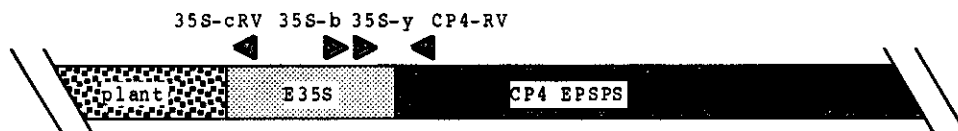


Fig. 1. GMO ダイズにおける個体間での遺伝子多型を検出するために用いたプライマー。まず、35S-cRV と 35S-b の組み合わせで増幅した。PCR 反応のコントロールとして、35S-b と CP4-RV の組み合わせを用いた。さらに検出感度を上げるため、35S-cRV と 35S-b の組み合わせで増幅したものをテンプレートとして、35S-cRV と 35S-y の組み合わせで PCR を行った。

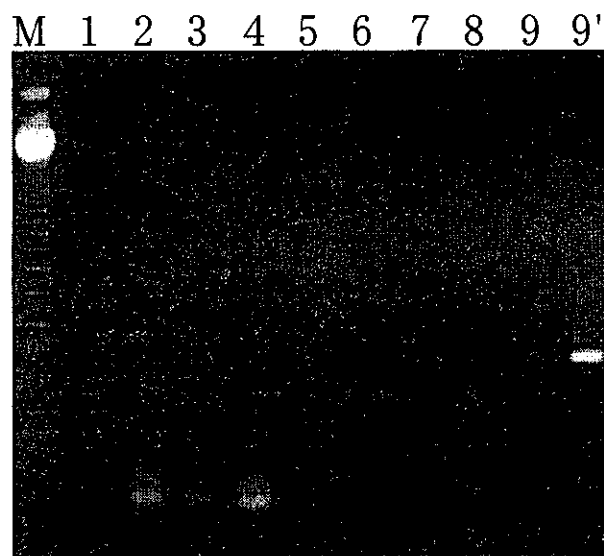


Fig. 2. GMO ダイズ粒由来の9個体から調製した核 DNA をテンプレートとし、35S-cRV と 35S-b プライマーの組み合わせで PCR を行い、増幅された DNA 産物。PCR 反応のコントロールとして、個体番号 9 の核 DNA について、35S-b と CP4-RV プライマーの組み合わせで PCR 反応を行った (9')。
M, 123bp DNA ラダー・マーカ。

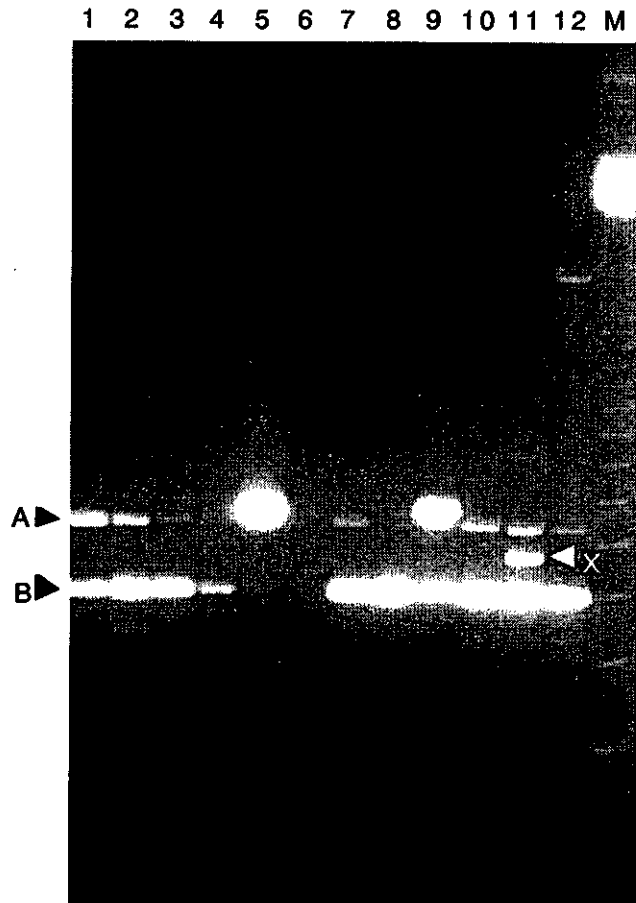


Fig. 3. GMO ダイズ粒由来 12 個体から調製した核 DNA をテンプレートとし, 35S-cRV と 35S-b プライマーの組み合わせで PCR を行い, この増幅反応液の希釈液をさらに 35S-cRV と 35S-y プライマーの組み合わせで nested PCR を行い, 増幅された DNA 産物。
M, 123 bp DNA ラダー・マーカ。

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）
導入遺伝子の栄養繁殖後代における発現安定性
分担研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授

研究要旨

栄養繁殖する作物に導入された外来遺伝子の安定性を検討するため、ジャガイモとサツマイモについて、遺伝子導入、個体再分化系の確立をめざした。ジャガイモでは *Agrobacterium tumefaciens* で、サツマイモでは *A. rhizogenes* で形質転換が可能となった。ジャガイモでは、形質転換から3ヶ月で試験管内にミニチューバーが形成された。サツマイモの再分化率は著しく低く、改善の余地がある。

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においては、導入さ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ためばかりでなく、適切な発現によって、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重要である。

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遺伝子組換え農作物も開発されていることから、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、また、種

子繁殖後代植物では導入遺伝子の性質がメンデル遺伝によって安定に伝達されるとされているが、挿し木などの栄養繁殖においても安定に伝達されるかどうかを検討することを目的としている。そこで、遺伝子組換え農作物として既に実用化されているあるいは実用間近な栄養繁殖作物であるジャガイモとサツマイモをとりあげ、外来遺伝子の安定性を検討するため、これらの作物への遺伝子導入、個体再分化系の確立をめざした。

B. 研究方法

<試料>

ジャガイモは、日本の栽培品種の中で最も形質転換効率が高いと報告されているメークインを用いた。サツマイモは、効率のよい個体再分化と形質転換の報告がある高系14号およびアントシアニンを塊根に著量蓄積するアヤマラサキを用いた。

<方法>

ジャガイモは、無菌植物を試験管内で

Murashige-Skoog 培地 (ゲルライト 0.2%、サッカロース 3%) を用いて育成し、大川らの方法に従い、サッカロース 9% を含む試験管内の液体培地にシュートを移し、暗所で約 1 ヶ月培養することにより、塊茎を誘導した。形質転換は、3C5ZR 培地 (Murashige-Skoog 培地の無機塩、1 mg/l チアミン塩酸塩、0.5mg/l ニコチン酸、0.5mg/l ピリドキシン塩酸塩、100mg/l イノシトール、3% サッカロース、5 μ M *tr*-ゼアチンリボシド、5 μ M IAA、pH 5.9、0.8% 寒天) を用い、ジャガイモの茎葉片または塊茎片を、20℃、16 時間日長条件下で培養し、GUS 遺伝子をレポーターとする pBI121 系のバイナリーベクター系プラスミドを有する *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株をこれらの切片に感染させることで形質転換体を育成した。

サツマイモの個体再分化は、大谷らの方法に従い、embryogenic callus を誘導し、再分化培地に植え継いで個体再分化を誘導した。形質転換においては、*Agrobacterium rhizogenes* を用い、毛状根を誘導した。

C. 結果

ジャガイモでは、茎葉片および塊茎片から 3 ヶ月程度で再分化個体が誘導された。この再分化個体からの塊茎形成は、誘導培地を用いて 1 ヶ月程度暗所下で培養することによって達成された。形質転換は、カナマイシン耐性遺伝子を PCR で増幅することによって確認した。

サツマイモでは、高系 14 号の embryogenic callus を用いることで、個体再分化に成功した。*Agrobacterium tumefaciens* を用いた形質転換には至っていないが、*Agrobacterium rhizogenes* A13 株を用いた毛状根の誘導はアヤマラサキで成功し、

外来遺伝子の導入も確認した。

D. 考察

代表的な栄養繁殖作物であるジャガイモとサツマイモについて、植物個体再分化系が確立され、外来遺伝子を導入した形質転換体を得ることができた。なお、サツマイモについてはさらに効率のよい形質転換系への改良が必要と思われる。今後は、得られた形質転換体について、塊茎や塊根などによる栄養繁殖を行い、その栄養繁殖後代植物における外来遺伝子の発現安定性とその成分変化を検討する予定である。

E. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし

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

アブラナ科野菜から有用遺伝子を単離し、これをモデル植物に導入して新しいウイルス耐性品種を開発し、その形質転換植物の後代における導入遺伝子の保持および発現に関する安定性を調査した。ウイルスは感染細胞から隣接細胞へと感染を拡大させるための移行タンパク質を宿主で発現させる。この移行タンパク質と結合してその機能をブロックするような有用遺伝子を開発した。この遺伝子をモデル植物であるタバコに導入したところ、ウイルスの移行は阻害され、感染の拡大は起こらなかった。導入遺伝子は後代に安定に受け継がれたが、その発現は第二世代でジーンサイレンシングを受けた。今後は、ジーンサイレンシング機構を解明し、後代においても安定に導入遺伝子の発現させる技術を開発することが重要である。

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

遺伝子組換え技術を用いたウイルス耐性植物開発の実用化レベルの現状では、植物にあらかじめウイルスのコートタンパク質遺伝子等を導入することによってコサプレッションを誘導し、ウイルスに対する「免疫」をもたらす方法が主流である。これは有効な方法ではあるが、ウイルス遺伝子を導入している点で、消費者側の不安を払拭できない欠点がある。我々の方法は、人間にとって長年の食経験のあるアブラナ科野菜から有用遺伝子を単離し、この遺伝子またはドミナント変異型としたものを実験対象の植物内で過剰発現させることにより、ウイルス耐

性を付与するものである。

トマトモザイクウイルス（ToMV）等のゲノムには移行タンパク質（MP: movement protein）の遺伝子がコードされており、その遺伝子産物は宿主の各種タンパク質と相互作用し、感染拡大に必須であることが知られている。我々は、これらの宿主タンパク質のcDNAを網羅的にクローニングした結果、アブラナ科野菜のcDNAライブラリーから、シロイヌナズナで KELP と命名された転写コアクチベーターのホモログを単離した。KELP はシロイヌナズナでは、病原体応答遺伝子の転写を誘導すると推定されている。MPがタバコで KELP と結合し、その核移行を阻害することにより、MPはタバコの病原体応答遺伝子の転写誘導を抑制すると考えられる。そこで、

C末端を欠損させたドミナントネガティブタイプの変異型 KELP を植物で過剰発現させると、変異型 KELP が今度はウイルスのMPと結合してMPの機能阻害をもたらし、ウイルスの感染拡大が抑制され、植物はウイルス耐性になることが期待された。本研究では、タバコをモデル植物とし、実際にウイルス耐性植物が得られるか否かについて検討し。また、導入遺伝子の後代での安定性を検討した。

B. 研究方法

1. KELP の一過性発現による移行阻害

ToMV のコートタンパク質遺伝子の代わりに GFP 遺伝子を組み込んだウイルスゲノムを含むプラスミド piL.erG3 をパーティクルガンでタバコ葉に導入すると、多くの標的細胞では、複製したウイルスゲノムが隣接細胞に移行して周辺の複数細胞も蛍光を発する。一方、ドミナントネガティブ変異型 KELP を過剰発現するプラスミド pART7-Bc2dC を作製し、2種のプラスミドを割合を変えながら共導入し、変異型 KELP の発現がウイルスゲノムの移行に及ぼす影響を調べた。実際には、隣接細胞を含めた複数細胞が蛍光を発する部位と単一細胞のみが蛍光を発する部位を数えて評価した。

2. ToMV 粒子感染実験による移行阻害

タバコ (*Nicotiana tabacum* SR1) を用い、アグロバクテリウム法により、ドミナントネガティブ変異型 KELP を安定に発現する形質転換タバコを作出した。タバコに ToMV 粒子を感染させ、数日後

に感染葉と上位葉からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 法でタンパク質染色を行うことにより、コートタンパク質を検出した。感染葉から上位葉へのウイルスゲノムの移行については、上位葉におけるコートタンパク質の蓄積量で評価した。

3. 形質転換後代植物における発現の安定性

変異型 KELP を導入したタバコリーフディスクからの再生個体を形質転換植物第一世代とし、それらから得られた種子を育てて第二世代とした。導入遺伝子が後代に安定に保持されているかについてPCRで確認した。また、後代での発現を調べるため、抗 KELP 抗体を用いてウエスタンブロット法で調査した。

C. 結果・考察

1. KELP の一過性発現による移行阻害

GFP を発現させるウイルスゲノムを含むプラスミド(piL.erG3)のみをパーティクルガンでタバコの葉に導入した場合、85%の標的細胞においてウイルスゲノムの移行を示す複数細胞への GFP 蛍光の拡大が認められ、15%の標的細胞においては単一細胞のみが GFP 蛍光を発した。piL.erG3 の10分の1量の変異型 KELP 発現プラスミド(pART7-Bc2dC)を混合して導入した場合、複数細胞への GFP 蛍光の拡大は40%となり、60%が単一細胞型となった。さらに、piL.erG3 と pART7-Bc2dC を等量混合した場合、複数細胞型は20%に減少した。この結果より、ドミナントネガティブ変異型 KELP を発現させると、ToMV の隣接細胞へのゲノ

ム移行が阻害されることが明らかとなり、*in vitro* で我々が証明した KERP とウイルス移行タンパク質との相互作用が *in vivo* でも起こることが示された (図 2)。このことは、ドミナントネガティブ型 KERP がウイルス耐性植物開発において有用遺伝子となりうる可能性を示唆している。

2. ToMV 粒子感染実験による移行阻害

タバコ非形質転換植物 (SR1 株) に ToMV を接種すると、ウイルスゲノムの隣接細胞への移行能力により、ウイルス感染が植物体全身に拡大する。感染細胞内でのウイルスコートタンパク質の生産量は顕著で、細胞抽出液を SDS-PAGE により分離したゲルをクーマシー染色することにより明瞭に検出された。一方、ドミナントネガティブ変異型 KERP を導入した形質転換植物 4 系統に ToMV を接種すると、感染細胞ではコートタンパク質の若干の発現が認められた系統 (103r) もあったが、その他の系統 (101r, 118r) では、感染細胞でもコートタンパク質の蓄積は認められず、上位葉については、これら何れの系統においてもコートタンパク質は検出されなかった。例外的に 105r 系統では、感染葉と上位葉のそれぞれにおいてコートタンパク質の蓄積が認められた (図 3)。これらの形質転換植物での導入遺伝子 KERP の発現をウエスタンブロット法によって調べたところ、101r, 103r, 108r 系統では KERP の発現が確認されたが、105r 系統では確認できなかった。105r 系統での発現抑制の原因は不明であるが、これらの結果より、形質転換植物では KERP の発現によって感染葉から上位葉へのウ

イルスゲノム移行が阻害された可能性が示された。従って、ドミナントネガティブ変異型 KERP の導入は、ウイルス耐性植物の作出に応用できる極めて有望な方法であると結論された。

3. 導入遺伝子の後代植物での安定性

変異型 KERP を導入した形質転換植物の第二世代における導入遺伝子の有無と導入遺伝子の発現を調べた。表 1 に示すように、第一世代である AJS18-3 と AJS18-103 の 2 系統および第二世代の各 7 系統について PCR により導入遺伝子の有無を調べた結果、全ての系統において導入遺伝子は安定に保持されていた。しかし、これらの系統における導入遺伝子の発現についてウエスタンブロット法で調べた結果、第一世代では抗体に反応する明瞭なタンパク質バンドが確認できたが、第二世代ではいずれの系統でもタンパク質バンドが確認されなかった。第一世代の葉からリーフディスクを作製し、個体再生した系統では 4 系統のうち 3 系統においてタンパク質バンドが確認された。第二世代において遺伝子発現が抑制されるジーンサイレンシングのメカニズムについては今後の課題となったが、サイレンシングが転写レベルか転写後レベルであるのかについては現在調査中である。

D. 研究発表 (論文発表)

Y. Matsushita, M. Deguchi, M. Youda, M. Nishiguchi and H. Nyunoya. The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KERP. *Mol. Cells*, 12: 57-66 (2001).

丹生谷 博. 遺伝子組換え植物の開発. *IPEJ Journal* 2001 年 7 月号 pp.

104-105.

(学会発表)

H. Nyunoya and Y. Matsushita.
「cDNA cloning for host factors interacting with the movement protein of tomato mosaic virus」
Abstract Book of 15th Conference of Plant Genomics and Molecular Breeding. pp. 7, Pohang, Korea, Aug. 2001.

松下保彦, 出口雅一, 永井晶子, 吉村和馬, 玉井淳史, 飯 哲夫, 川上茂樹, 渡辺雄一郎, 西口正通, 丹生谷 博「トマトモザイクウイルスの移行蛋白質と結合する植物側蛋白質 MIP102 を利用したウイルス抵抗性植物作出の試み」
日本植物病理学会, 2001年.

出口雅一, 玉井淳史, 飯 哲夫, 西口正

通, 松下保彦, 丹生谷 博「植物ウイルスの移行蛋白質と結合する転写コアクチベーターKELP の機能解析」
日本分子生物学会, 2001年.

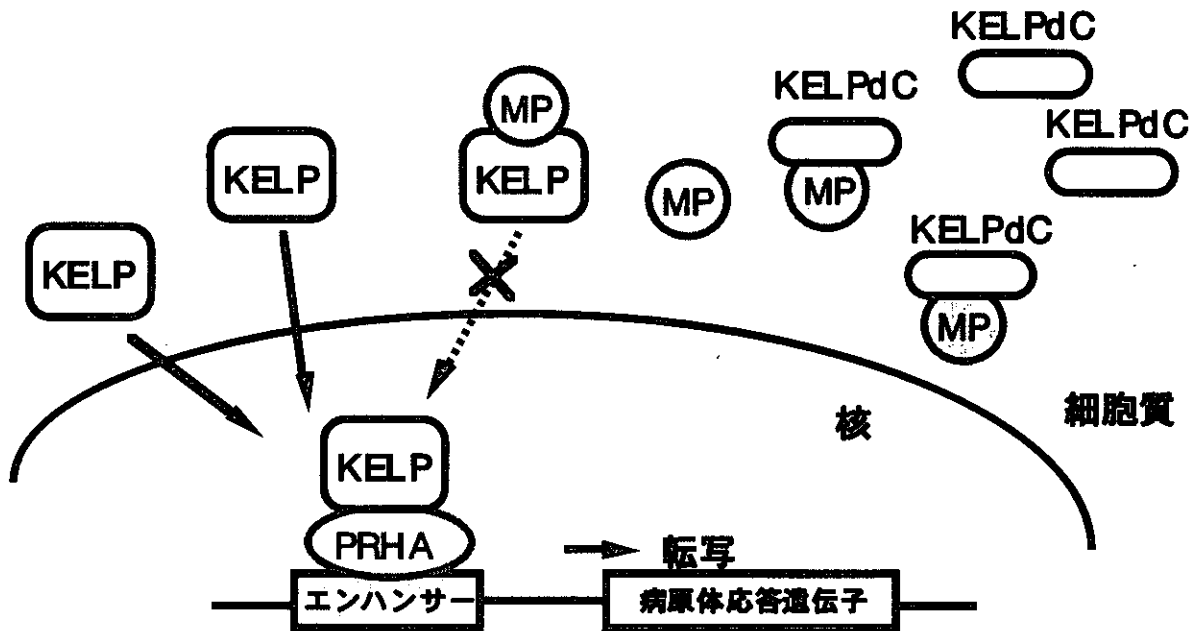
吉岡邦晃, 松下保彦, 丹生谷 博「植物RNAウイルスの移行蛋白質と相互作用する宿主因子の検索」
日本分子生物学会, 2001年.

小長谷賢一, 松下保彦, 丹生谷 博「タバコモザイクウイルス抵抗性 N 遺伝子産物と相互作用する宿主因子の検索」
日本分子生物学会, 2001年.

宮川織恵, 松下保彦, 出口雅一, 永井晶子, 西口正通, 丹生谷 博「トバモウウイルスの移行蛋白質と特異的に結合する MIP204 の解析」
日本分子生物学会, 2001年.

MP と KELP の相互作用

C末欠損変異型 KELP



MP: 移行タンパク質 (Movement Protein)

KELP: 転写コアクチベーター

PRHA: 転写因子

図1. MP と KELP の相互作用

病原体応答遺伝子の転写調節に関与するエンハンサーには DNA 結合タンパク質 PRHA が結合し、転写コアクチベーター KELP は PRHA と結合すると考えられる。KELP が細胞質で翻訳されると、ウイルス移行タンパク質 MP がこれに結合し、KELP の核移行を阻害すると推定される。C末を欠損したドミナントネガティブ変異型 KELP (KELPdC) を過剰発現させると、KELPdC が MP と結合して MP の機能をブロックするものと考えられる。

変異型 KELP 発現によるウイルス移行阻害

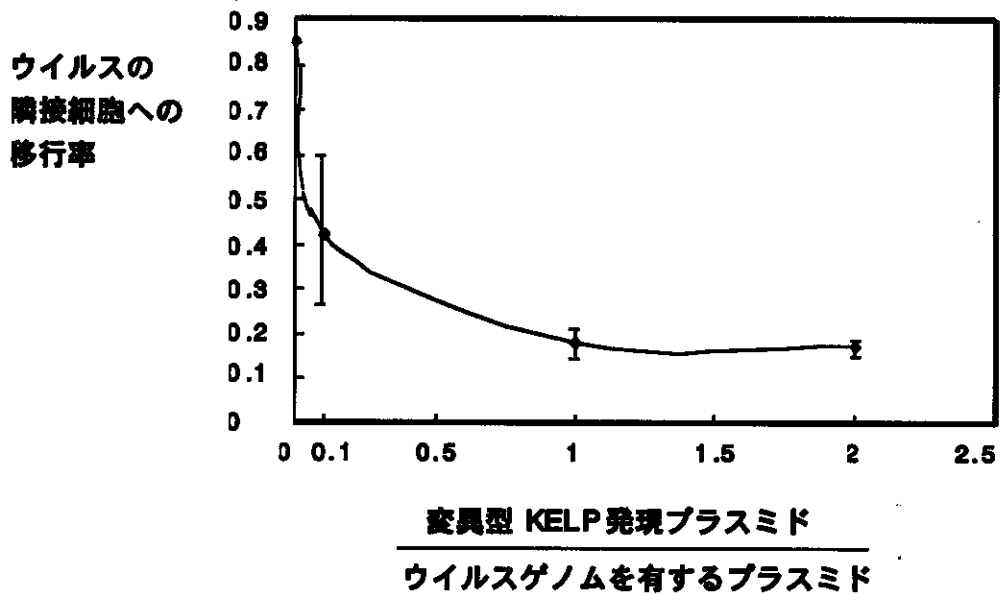


図2. 変異型 KELP 発現によるウイルス移行阻害

ToMV 粒子感染によるウイルス抵抗性の検定

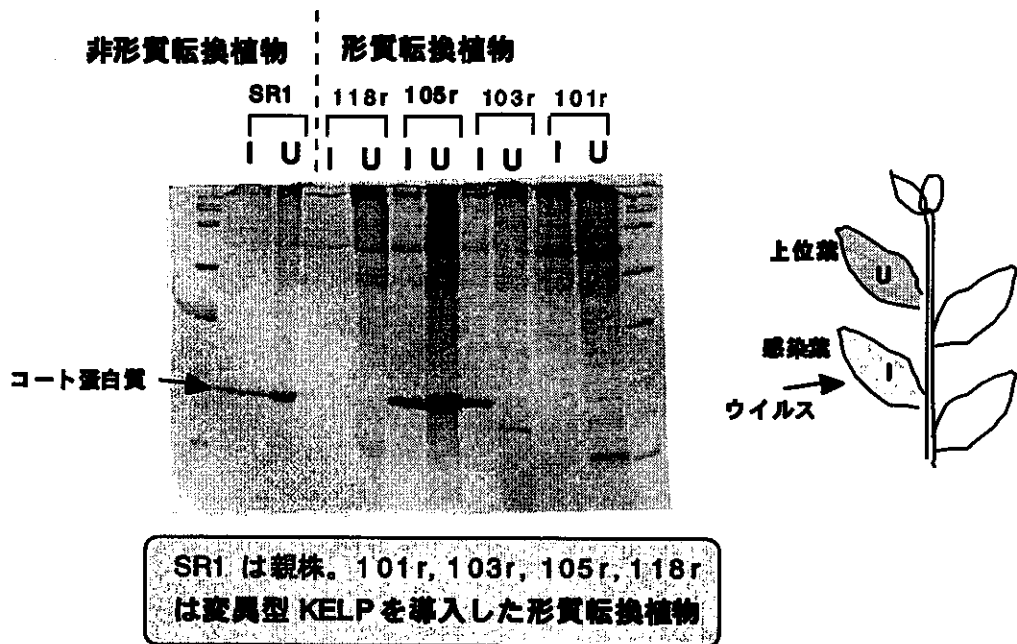


図3. ToMV 粒子感染によるウイルス抵抗性の検定

表 1. KELPdC による形質転換タバコにおける後代での発現安定性¹⁾

第一世代	第二世代	導入遺伝子	ウエスタンブロット
AJS18-3		+	+
	AJS18-3T6	+	-
	AJS18-3T7	+	-
	AJS18-3T10	+	-
	AJS18-3T14	+	-
	AJS18-3T16	+	-
	AJS18-3T19	+	-
	AJS18-3T20	+	-
AJS18-103		+	+
	AJS18-103T33	+	-
	AJS18-103T42	+	-
	AJS18-103T49	+	-
	AJS18-103T50	+	-
	AJS18-103T52	+	-
	AJS18-103T62	+	-
AJS18-103T65	+	-	

- 1) 導入遺伝子の検出はタバコ葉から抽出した DNA を鋳型として PCR によって行った。遺伝子発現はタバコ葉の抽出物と抗 KELP 抗体を用いたウエスタンブロット法によって行った。

平成13年度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) 遺伝子組換えジャガイモならびにその加工品の検知法の開発

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモNewleaf Plus、ならびに審査中遺伝子組換えジャガイモNewleaf Yのそれぞれについて、定性PCR法を用いた分析法確立のための検討を行い、上記2品種を特異的に検知することが可能な定性PCR検知法を開発した。当検知法を用いジャガイモ加工原材料について調査を行った結果、調査に供した54検体については当該遺伝子組換えジャガイモの混入している検体がないことを示した。また、安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ（上記Newleaf Plus ならびにNewleaf）についてはTaqMan Chemistryを利用した定量分析法開発のための検討を行った。

(2) マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムを用いた遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

食発第110号により通知された定量的PCR法に同等の別法を開発するため、マイクロキャピラリー型リアルタイム定量PCRシステムであるライトサイクラーシステム（ロッシュ・ダイアグノスティック社製）を用いた定量分析法開発のための検討を行った。また、確立した分析法を用いて8分析機関による内標比測定試験およびブラインドテストを実施し、本分析法により前記の定量的PCR法に同等の良好な結果が得られた。

(3) 遺伝子組換え食品とその加工品を対象とした検知技術の妥当性の評価

食発第110号により通知されたDNA技術応用食品の検査方法には、定量分析法として酵素免疫検定（ELISA）法ならびに定量的PCR法が採用されている。これら2種の方法を用いて遺伝子組換えダイズを検体とした測定を行った場合の測定値比較を行った。その結果、ダイズ穀粒を検体とした場合には両測定法により得られる結果に高い相関性が認められるが、脱脂ダイズを検体とした場合には両測定法により得られる結果に相関性がなく、定量的PCR法を用いることで信頼性の高い値が得られることを明らかにした。また、表示義務制度施行以前、ならびに以後の市販豆腐を検体とし、定性PCR法ならびに定量的PCR法を用いた調査を行い、表示義務制度の与える影響についての検討を行った。

(4) 遺伝子組換え食品の定性ならびに定量検知法における加工処理の影響の評価

平成13年4月からの遺伝子組換え食品の表示制度に対応し、厚生労働省では、食発第110号を告示し、組換え食品の検査方法を定めた。本通知において記載されている検査方法は、穀粒での含有率を算出する目的で開発された方法であるため、遺伝子が断片化すると考えられる加工食品に応用可能かどうかの検証をおこなった。

協力研究者

品衛生研究所)

合田幸広、渡邊敬浩、穂山浩（国立医薬品食

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)

松木容彦、笠間菊子(食品薬品安全センター秦野研究所)

A. 研究目的

1. 遺伝子組換えジャガイモならびに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開発された遺伝子組換え食品、ならびにそれらを原材料とする加工食品が流通するようになってきている。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ものとし、それに合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月からは、安全性審査を受けていない遺伝子組換え食品またはこれを原材料とする食品については、輸入ならびに販売等が法的に禁止されることとなっている。これらのことを背景とし、安全性未承認の遺伝子組換え食品等の定性的検知法、また承認済みの遺伝子組換え食品等についてはその表示内容の検証を行うための定量分析法が必要とされている。すでに安全性審査の終了した遺伝子組換え食品のうち、トウモロコシ、ダイズにそれぞれ対応する検知法が開発されているが、今後新たな遺伝子組換え食品が開発されることが予測され、それら新規開発食品についても検知法を開発することが必要とされる。

本研究では、平成13年以前に安全性審査を通過していたNewleaf、ならびに13年7月に審査を通過したNewleaf Plus、また、現在審査中のNewleaf Y、これら遺伝子組換えジャガイモ3品種に対する定性的検知法ならびに、定量分析法を開発することを目的

として検討を行った。

2. マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムを用いた遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

平成13年3月27日に厚生労働省では遺伝子組換え食品の定量分析法として定量的PCR法を用いた検知法を食発第110号として通知した。通知に示された定量的PCR法は、マイクロプレート型定量PCR装置(ABI PRISM 7700)を使用することを前提として作成されている。そこで、通知に示された定量PCR装置に比較して小型であり、安価なマイクロキャピラリー型リアルタイム定量PCR装置であるライトサイクラーシステム(ロッシュ・ダイアグノスティック社製)を用いた定量分析法の検討を行った。また、開発された定量分析法を評価するため、当該分析法を用いて8分析機関による内標比試験ならびにブラインドテストを実施した。

3. 遺伝子組換え食品とその加工品を対象とした検知技術の妥当性の評価

食発第110号として通知された遺伝子組換えダイズの定量分析法には、導入遺伝子の産物として産生される組換えタンパク質を検出、定量する酵素免疫検定(ELISA)法ならびにTaqMan Chemistryを応用し、導入遺伝子の標的配列を特異的に増幅し定量化する定量的PCR法が記載されている。ELISA法と定量的PCR法とを比較すると、ELISA法は安価な装置を用いて簡便に行うことができるという利点を持つが、検体間でのタンパク質抽出効率を同一にしなければならない、加熱処理によるタンパク質の分解により検出が不可能となるといった欠点を持っている。一方、定量的PCR法は使用する装置、試薬等が高価でありランニングコストが高いといった欠点を持つが、DNAがタンパク質に比べて熱安定性が高いため、比較的広範囲の加工食品を検体とした定量が可能であ