

ことが決定的に重要であることが示された。組換えパパイア、組換えジャガイモのいずれも、0.1 μ g の DNA を用いると最適化された受容菌の形質転換体 2-3 個を得ることができたが、0.01 μ g の DNA では形質転換体を得ることができなかった。1 $\times 10^9$ kb の DNA 0.1 μ g は 1.6×10^{-2} モルで、分子数としては $(6.06 \times 10^{23}) \times (1.6 \times 10^{-22}) =$ 約 97 分子となり、組換え植物由来 DNA 32-49 分子あたり 1 個の形質転換体が生じる可能性があるということになるが、この実験系は極めて高頻度で形質転換体が生じるように最適化されており、最適化されていない受容菌では形質転換頻度が 3×10^5 分の 1 になること (pNEO による形質転換頻度の比較から) を考えると、約 $1-1.5 \times 10^7$ 分子 ($1.6-2.5 \times 10^{-17}$ モル) あたり 1 個 (約 10mg DNA あたり 1 個) の形質転換体が生じる計算になる。これらの実験から、組換え植物にマーカーとして用いられる Km 耐性遺伝子によって自然界の細菌が形質転換される可能性は否定できないが、その頻度は極めて低いと考えられる。

D. 結論

1) 達成度について

3 年計画の当初の予定では、多種類の細菌を用いて自然形質転換実験を行なう予定であったが、組換え植物の入手が遅れたこともあり、扱いやすい *Acinetobacter* sp. に実験が集約された。そのように制限された条件の中で、組換え植物由来 DNA による形質転換に成功し、また形質転換を起こすことのできる最小の組換え植物 DNA 量に関する知見が得られたことで、組換え植物により懸念される危険を考えるうえで極めて貴重な情報を提供することができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

組換え植物 DNA により *Acinetobacter* sp. が形質転換されうることはすでに外国のグループにより論文上で発表されている [1, 2, 3]。今回我々が行なった研究は、その実験の追試という意味で意義深いだけでなく、実際に日本国内で流通している、あるいはしようとしている組換え植物の DNA を用いて実験を行ない形質転換体を得ることができたという点で大変意義深い。しかしながら、自然界でそのような形質転換が起こるとしてもその頻度は極めて低く、社会的に、必要のない混乱を招かないように注意が必要である。

3) 今後の展望について

市場に流通する組換え植物の種類は今後増大することが予想されるが、抗生物質耐性マーカーを使用した新規組換え植物の作成はむしろ減少していくと考えられる。したがって抗生物質耐性遺伝子の漏出という観点から注目すべき対象は、市場に流通している中では古い世代の組換え植物に限定されていくと思われる。

4) 本研究のまとめ

自然形質転換能を持つ代表的な細菌である *Acinetobacter* sp. が、遺伝子組換えパパイアと遺伝子組換えジャガイモ由来の DNA で形質転換されカナマイシン耐性を獲得することが示された。しかしこれらの実験は高頻度の自然形質転換のために最適化された受容菌を用い実験室内の条件下で行なわれたものであり、自然界での条件を完全に反映したものではない。実際に、最適化されていない *Acinetobacter* sp. を用いた実験では形質転換頻度はその 3×10^5 分の 1 である。組換え植物にマーカーとして用いられる Km 耐性遺伝子によって自然界の細菌が形質転換される可能性は否定できないが、その頻度は極めて低いと考えられる。

E. 参考文献

- 1 Gebhard, F., and Smalla, K. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 64, 1550-1554.
- 2 de Vries, J. et al. (2001) FEMS Microbiol. Lett. 195, 211-215.
- 3 de Vries, J. and Wackernagel, W. (1998) Mol. Gen. Genet. 257, 606-613.
- 4 Bagdasarian, M. et al. (1981) Gene 16, 237-247.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

投稿準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表 1. *Acinetobacter* sp. BD413 株の自然形質転換

受容菌	DNA	出現コロニー数	形質転換頻度
BD413/pKT230NEOKm ^s	SunUp 1 μg	31	31/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	SunUp 0.1 μg	2	20/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	SunUp 0.01 μg	0	0/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	SunSet 1 μg	0	0/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	NewLeafPlus 1 μg	10	10/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	NewLeafPlus 0.1 μg	3	30/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	NewLeafPlus 0.01 μg	0	0/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	nonGM potato 1 μg	2	2/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	<i>nptII</i> fragment 1 μg	1477000	1.4×10 ⁶ /μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	pNEO 1 μg	2740000	2.7×10 ⁶ /μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	pNEO 0.1 μg	615000	6.2×10 ⁶ /μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	pUC19 1 μg	0	0/μgDNA
BD413/pKT230NEOKm ^s	-	1	-
BD413	SunUp 1 μg	0	0/μgDNA
BD413	NewLeafPlus 1 μg	0	0/μgDNA
BD413	pNEO 1 μg	23	23/μgDNA
BD413	-	0	-

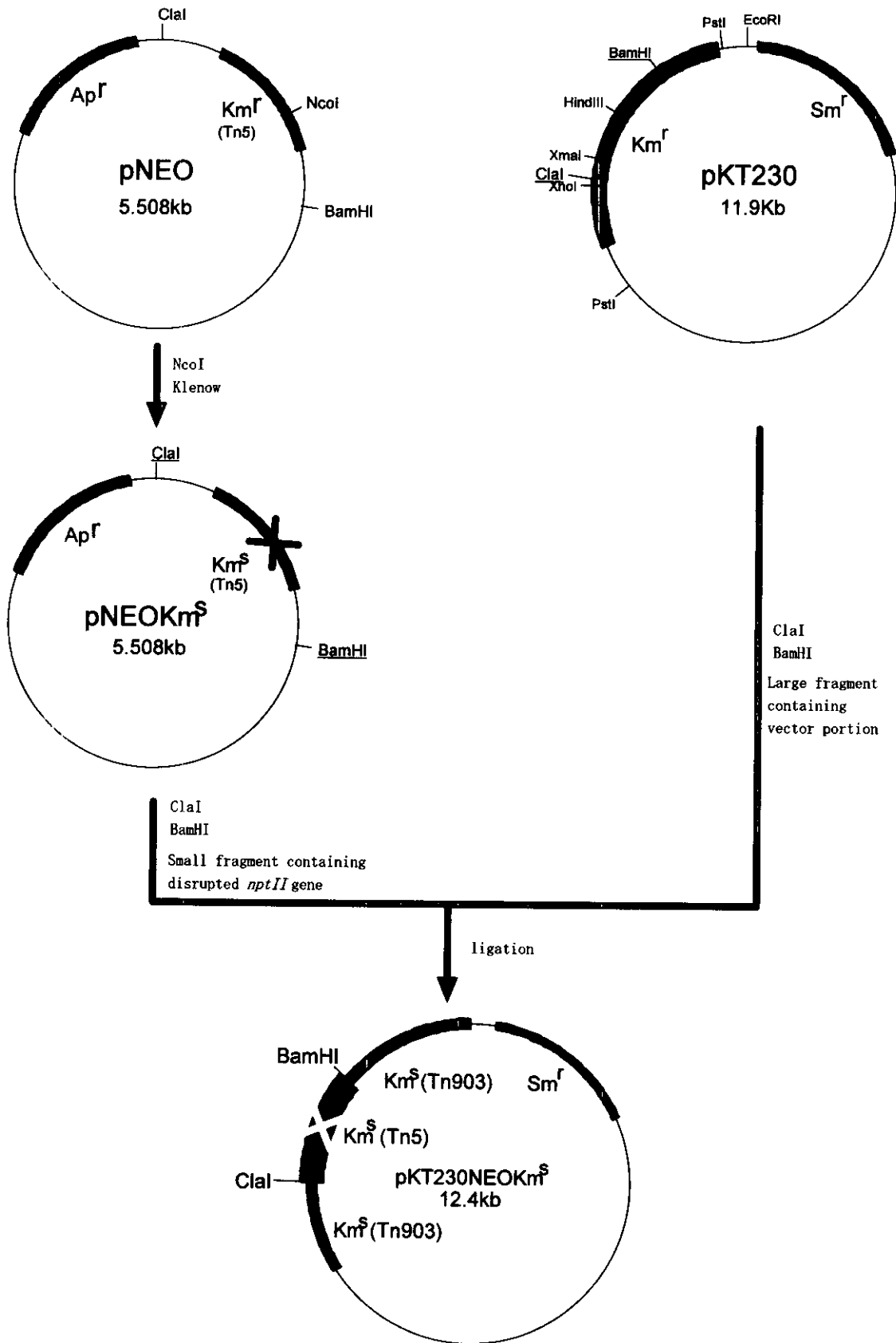


図 1 . pKT230NEOKm^S の構築

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

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
組換え微生物の国際動向等に関する研究

分担研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品の安全性、特に遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向に関する情報を収集すると共に、国際機関により開催される関連会議に出席し、その議論に参加した。CODEX バイオテクノロジー特別部会（2003年3月 横浜）で、吉倉は、議長として進行と取りまとめを行い、組換え微生物のガイドラインを最終合意（step8）とした。これにより吉倉が議長として担当した部会では、「モダンバイオテクノロジーに由来する食品のリスク分析」、「植物組換え体食品の安全性に関するガイドライン（アレルギー評価法を含む）」および「組換え微生物応用食品の安全性に関するガイドライン」の3つについて、最終合意に達することができた。研究としては、遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に特に重要と思われ、かつその試験法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いた検討を試みた。本年度は、マウス腸管内での遺伝子の移行について検討を行い、通常の組換えに用いるプラスミドが、自然界に分布する接合伝達性プラスミドの働きにより、マウス腸内生息菌に伝達されることをその試験法を示すと共に、*in vivo*で実証した。

協力研究者

吉倉 廣 国立感染症研究所 所長
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部 室長

部会の議長として参加国の意見の調整と議事進行を行う。さらに、組換え微生物応用食品の安全性確保に必要な検査法について、モデル組換え微生物を用い検討する。

A. 研究目的

遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向に関する情報を収集すると共に、国際機関により開催される関連会議に出席し、その議論に参加し、バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する要件を明らかにする。吉倉は、CODEX

B. 研究方法

国際機関により開催される遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する関連会議に出席し、情報収集および情報交換を行う。この議論で明らかとなったバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に必要な要件

のうち、その試験検査法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いて検査法の検討を試みる。モデル乳酸菌としては、*Lactococcus lactis*を用い、Table.1のような3種類を作出した。基礎培地は、GM17培地を用いた。*in vitro*での伝達は、Sasakiらの方法に従い、最も高頻度に伝達が観察できるフィルターメーティング法で行った。動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行については、BALB/cマウスを用い、Igimiらの方法に従い、供与菌を胃内投与後、肛門閉鎖処置を行った。供与菌である *Lc. lactis* (pAM β 1)と受容菌である *Enterococcus faecalis* をマウスへ胃内投与し、肛門を手術用接着剤で閉鎖し、一晩飼育した後、マウスを安楽死させ、その直腸内容物について、菌数を測定した。同様な手法を用い組換えプラスミドが腸内生息菌へ移行する頻度を、定量的に調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要となる部分は含まれない。

C.研究結果 (実験結果には考察を含む)

国際的な動向は、遺伝子組換え微生物食品の安全性に関する会議に参加し、討論及びドラフト作成に関わった。CODEX 部会 (2003年3月日本、横浜)では、微生物組換え体応用食品の安全性に関するガイドラインは、最終合意 (step8)に達した。これにより吉倉が議長として担当した部会では、「モダンバイオテクノロジーに由来する食品のリスク分析」、「植物組換え体食品の安全性に関するガイドライン(アレルギー評価法を含む)」および「組換え微生

物応用食品の安全性に関するガイドライン」の4つのガイドラインについて、最終合意 (step8)に達することができた。

研究の成果としては、以下のような結果が得られた。接合伝達性プラスミド pAM β 1は、当初 *Ec. faecalis* から分離されており、*in vitro* 実験のフィルターメーティング法では、乳酸菌 *Lc.lactis* から、この菌には高頻度に伝達される。その伝達頻度は、 10^3 程度である。BALB/c マウスの腸内での同菌の生息菌数は $10^{4.5}$ CFU/g であると推定される。マウス腸管内で *in vitro* と同程度の頻度で伝達していると仮定すれば、マウスの全糞便を用いて分離を試みるならば、伝達受容株がかりうじて検出される。もし、マウス腸管内での伝達頻度が *in vitro* の伝達頻度より低いとすると、その検出は困難であると推定された。このため、伝達受容株の腸内菌数は人工的に検出限界以上に保つ必要がある。

腸内に存在する *Ec. faecalis* の菌数を高くすれば、受容菌の検出される可能性は、上昇する。そこで、マウスから分離した *Ec. faecalis* 株をあらかじめ増菌し、投与菌と共にマウスに胃内投与することとした。この条件で、接合伝達性プラスミド pAM β 1 について、腸内棲息菌への移行を調べると、マウス個体差が激しく、プラスミドの伝達頻度を定量的に測定することは、困難であった。マーカーであるエリスロマイシンを飲水中に加え、実験を行えば定性ではあるが、*in vivo* におけるプラスミドの移行を検出することは可能である。

腸管内での供与菌と受容菌の菌数を確保したうえで、腸管内での伝達に適する条件を整える必要がある。そこで、便秘のように糞便が腸管内に停留し、圧力のかかっている状態

を実験的に再現することができないかと考えた。Igimi らの報告した肛門閉鎖マウスは、あらかじめ供与菌と受容菌を投与し、人工的に肛門閉鎖を行ったのち、マウスを一晩飼育することにより、直腸内に糞便が圧縮状態で蓄積する。したがって、*in vitro*のフィルターメーティング法と同様な理由で、接合伝達に適する状態が期待される実験法である。

プラスミドを持たない *Lc. lactis* では、腸内生息菌への伝達はみられないが、*Lc. lactis* (pAM β 1) を供与菌とすると、受容菌あたり 1.2×10^{-3} の頻度で、*Ec. faecalis* への伝達が観察できた。この頻度は、*in vitro* で最も高頻度で伝達が起こるとされているフィルターメーティングで得られた伝達頻度とほぼ同じであった。

以上の実験結果を基に、その実験手法を用いて、モデル組換え乳酸菌における組換え用プラスミドベクターのマウス腸管内での挙動について検討した。*in vitro* のフィルターメーティング法により、*Lc. lactis* (pDL278) から、腸内生息菌 *Ec. faecalis* への移行を調べたところ、組換えプラスミド pDL278 の移行は全く検出されなかった。5頭のマウスを用いて、3日間 *Lc. lactis* (pDL278) と *Ec. faecalis* を投与し、pDL278 のマーカーであるスペクチノマイシン耐性を獲得した糞便中の *Ec. faecalis* 株を分離し、pDL278 特異的なプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったが、pDL278 移行株は検出されなかった。肛門閉鎖検出法においても組換えプラスミドの移行は検出されなかった。以上から、*Lc. lactis* (pDL278) は、プラスミドの移行頻度は非常に低く、これらすべての実験系の検出限界以下であると思われた。

さて、伝達能を持たないように設計されているプラスミドベクターを導入した組換え乳酸菌の腸内生息菌への移行は非常に稀で、ここで用いた実験系で検出される頻度では起こらないことを実証した訳であるが、以下の点を確認する必要がある。生きたままの組換え体を経口的に摂取するという事は、腸内フローラという多種類の菌の共存する環境中に組換え体を曝すことになる。この中には当然、自然界に分布する伝達能を持つ菌が生息しており、これらの菌の影響を考えなければならない。実験で用いてきた pAM β 1 はその代表であるので、Fig.1 の様なプラスミドの移行を考えた。

組換え乳酸菌 *Lc. lactis* (pDL278) が、動物腸管内に多量に入ってきたときに、自然界に存在する接合伝達性プラスミドをもつ菌(たとえば *Ec. faecalis* (pAM β 1)) が、腸内に生息していると、この菌から接合伝達により *Lc. lactis* (pDL278) へのプラスミドの接合伝達が起こる。以前の実験から pAM β 1 であれば、*Ec. faecalis* (pAM β 1) から *Lc. lactis* への伝達頻度は、約 10^{-3} 程度であるので、1000 個以上の *Ec. faecalis* (pAM β 1) が存在すれば、条件さえ整えば、動物腸管内で *Lc. lactis* (pDL278, pAM β 1) が生成することになる。2つのプラスミドの共存する *Lc. lactis* (pDL278, pAM β 1) から、pAM β 1 は再び、*Lc. lactis* (pAM β 1) から *Ec. faecalis* への伝達頻度である 10^{-3} 程度の頻度で腸内生息菌 *Ec. faecalis* へ伝達して行く。このとき pDL278 は pAM β 1 の影響を受け伝達される可能性がある。大腸菌の R 因子では、非伝達性のプラスミドが伝達性プラスミドに伴って受容菌に移ったと報告されており、この現象をトリペアレンタルトランスファーと呼んでいる。グラム陰性菌である大腸菌とグ

ラム陽性菌の接合伝達はかなり異なるが、これに類似するプラスミドの移行は充分考えられる。そこで、*Lc. lactis* (pDL278, pAM β 1)について、プラスミド pDL278 の移行について検討してみた。*in vitro*のフィルターメーティング法による *Lc. lactis* (pDL278, pAM β 1)から、マウス腸内生息菌 *Ec. faecalis* へのプラスミドの移行頻度をまとめたのが Table.2 である。

Lc. lactis (pDL278, pAM β 1)から、マウス腸内生息菌 *Ec. faecalis* への pAM β 1 の接合伝達頻度は供与菌あたり平均 2.6×10^{-2} で、ほぼ予想した頻度である。このとき非伝達性の組換えベクター pDL278 は、供与菌あたり平均 2.4×10^{-8} の頻度で伝達されていることが示された。接合伝達性プラスミド pAM β 1 が同一菌内に存在すると、それ自身には伝達能のない組換えプラスミド pDL278 も伝達されるのである。Table.3 は、*in vivo*のマウス肛門閉鎖検出法によるプラスミドの移行頻度である。マウス肛門閉鎖検出法では、*Lc. lactis* (pDL278, pAM β 1)からマウス腸内生息菌 *Ec. faecalis* への pAM β 1 の接合伝達頻度は供与菌あたり平均 2.6×10^{-2} で、組換えプラスミド pDL278 の移行が、供与菌あたり平均 3.5×10^{-8} の頻度で起こることが示された。それぞれの頻度を受容菌あたりで計算するとそれぞれ、 2.2×10^{-4} と 3.0×10^{-10} となる。肛門閉鎖マウス腸管内でも定量的に移行が確認された。

従って、乳酸菌 *Lc. lactis* (pDL278) を経口的に接種した場合の腸内フローラ構成菌への移行は、マウスでの肛門閉鎖検出法での移行頻度を基に、Fig.2 のように推定される。

D. 考察

CODEX 部会は、組換え微生物を用いた食品に関するガイドライン作成は必要であるというコンセンサスがあり、具体的なガイドライン作りが行われた。既に議論が進んでいる植物ガイドラインと同様、その安全性評価は、実質的同等性の考え方を適用することにより行うことが同意された。組換え微生物においては、生きたまま摂取することにより、動物あるいはヒト消化管内で増殖することから、これまでの組換え食品と異なり、微生物に固有と考えられるいくつかの問題点が指摘された。同時に多くの重要な項目において、安全性評価法が未だ確立されていないことが示された。ガイドラインでは、今後そのような方面の研究が進むことにより、早急にもその評価手法が確立されることが必要であることが明記された。特に、消化管内での組換え遺伝子の伝達、腸内フローラへの影響、免疫系への刺激等の問題について研究される必要があると結論された。実質的同等性の考え方の適用方法、免疫系への刺激、組換え微生物からの遺伝子の漏出の問題は重要と思われた。そこで、この中から、組換え微生物からの遺伝子漏出に関する評価系の検討を試みた。まず、高頻度に接合伝達を起こす接合伝達性プラスミドを用いて、マウス腸管内において定量的にかつ高感度で遺伝子伝達を検出できる肛門閉鎖マウスの実験系を確立した。この実験系を用いて、自らは伝達能を持たない乳酸菌組換え用プラスミド pDL278 の遺伝子の移行を評価した。このプラスミドは相同性を持たない自然界に分布する接合伝達性プラスミド pAM β 1 により、マウス腸内棲息菌である *Ec. faecalis* に移されることを定量的に実証した。これまで、

*in vivo*でのこのような移行は、ノトバイオートなどの特殊な動物を用いたり、抗生物質による増菌を行った上で定性的に移行を検出する例がいくつか報告されている。伝達能を持たないプラスミドを使って、通常の腸内菌叢をもつ動物腸管内で、定量的に遺伝子の移行を示した例は恐らく初めてであると思われる。今回示した移行は、移行する遺伝子に相同性を持たない自然界に存在する接合伝達性プラスミドによることから、その意義は大きい。すなわち、プラスミドのように宿主のゲノムから比較的容易に分離できる遺伝子は、動物腸管内で他の生息菌へ、その頻度の差こそあれ移行すると考えられる。今後は、遺伝子の移行は常に起こりうるという前提の基に、安全性の議論を行うべきであると思う。今回示した実験系は、その移行頻度を確認する有用な手法となりうると思う。

E. 結論

吉倉は、CODEX 部会の議長として、その責務を果たし、組換え微生物応用食品の安全性に関するガイドラインなど3つのガイドラインを最終合意(step8)とした。

遺伝子漏出に関する実験と実験結果をまとめると、

1. マウス腸管内で乳酸菌から腸内生息菌への遺伝子移行を調べる肛門閉鎖マウスの実験系を確立した。
2. 肛門閉鎖検出法は、*in vivo*で遺伝子の移行を高感度かつ定量的に検出できる実験法である。
3. この実験系を用い、乳酸菌の組換えに用いるプラスミド pDL278 が、マウス腸内生息菌に伝達されることを実証

した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahashi T, Yoshida Y, Hatano S, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yajima M, Kojima T, Kanno T, Yonekubo A, Yajima T, and Kuwata T. (2002) Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. *Biology of the Neonate*. 82:238-242.
- (2) 五十君静信訳。(2002) サベッジ著21世紀の腸内細菌学。腸内細菌学会誌。16:105-113.
- (3) 五十君静信。(2002) 細菌を抗原運搬体とする経口ワクチンによる腸管感染症の予防。総合臨床。51:2944-2949
- (4) Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. (2003) Effect of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Bioscience Microflora*. 22:21-25.
- (5) Xin KQ, Hashino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, Ohba K, Kushiro A, Kiwaki M, Hamajima K, Klinman D and Okuda K. (2003) Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood*. in press.

2. 学会発表

- (1)河野享子、五十君静信、加納康正。
*Bifidobacterium longum*に導入した志賀毒素1型Bサブユニット (Stx 1B) 遺伝子の発現。第75回日本細菌学会総会。2002年4月4日横浜。
- (2)浅井美里、佐藤英一、山崎学、山本茂貴、五十君静信。Listeriolysin O関連遺伝子を発現させた組換え乳酸菌によるマウスへの免疫。第75回日本細菌学会総会。2002年4月5日横浜。
- (3)五十君静信、近藤美佳、浅井美里、村上和雄、佐藤英一、山崎学、天野富美夫、山本茂貴。乳酸菌の菌体表層に発現したリステリオリジンOのJA-4細胞の食作用に与える影響。第6回腸内細菌学会。2002年5月31日東京。

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
活性酸素除去酵素及びその遺伝子（平成15年1月申請）
2. 実用新案登録
なし
3. その他
専門家会議の報告および CODEX 関連の情報は、以下のアドレスに日本語仮訳を含め公開されています。
<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/code/codex.html>

Table. 1 実験に用いたモデル乳酸菌の特徴

モデル乳酸菌	表現型	接合伝達能	遺伝子組換え
<i>Lc. lactis</i> IL1403 (pAM β 1)	Sp ^S , Em ^R	+	-
<i>Lc. lactis</i> IL1403 (pDL278)	Sp ^R , Em ^S	-	+
<i>Lc. lactis</i> IL1403 (pDL278, pAM β 1)	Sp ^R , Em ^R	+	+

Sp: スペクチノマイシン Em: エリスロマイシン

Table 2 Effect of pAMB1(EM Γ) on transfer of nonconjugative plasmid pDL278 (SPCM Γ) from *L.lactis* to *E. faecalis* during filter-mating on membrane filter in TS broth containing 0.4 M sucrose and 25 % PEG at 37 °C

Exp. no.	no. of donor ^a		no. of recipient ^a		no. of transconjugant ^b				Frequency of c:	
	<i>L.lactis</i> (pDL278, pAMB1)	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (EM Γ)	<i>E. faecalis</i> (EM Γ)	<i>E. faecalis</i> (SPCM Γ)	<i>E. faecalis</i> (SPCM Γ , EM Γ)	<i>E. faecalis</i> (EM Γ)	<i>E. faecalis</i> (SPCM Γ)	<i>E. faecalis</i> (SPCM Γ , EM Γ)	<i>E. faecalis</i> (SPCM Γ , EM Γ)
1	1.2 x 10 ⁹	2.6 x 10 ⁹	1.5 x 10 ⁷	1.9 x 10 ²	1.3 x 10 ¹	1.3 x 10 ²	1.3 x 10 ⁻²	1.6 x 10 ⁻⁸	1.1 x 10 ⁻⁸	1.1 x 10 ⁻⁸
2	4.3 x 10 ⁹	1.7 x 10 ⁹	1.3 x 10 ⁸	2.5 x 10 ¹	8.3 x 10 ⁰	3.2 x 10 ¹	3.2 x 10 ⁻²	5.9 x 10 ⁻⁹	2.0 x 10 ⁻⁹	2.0 x 10 ⁻⁹
3	3.8 x 10 ⁸	1.8 x 10 ⁹	1.7 x 10 ⁷	1.0 x 10 ²	4.0 x 10 ¹	4.4 x 10 ¹	4.4 x 10 ⁻²	2.7 x 10 ⁻⁷	1.1 x 10 ⁻⁷	1.1 x 10 ⁻⁷
4	4.8 x 10 ⁹	2.8 x 10 ⁹	-	6.3 x 10 ²	7.5 x 10 ²	-	-	1.3 x 10 ⁻⁷	1.6 x 10 ⁻⁷	1.6 x 10 ⁻⁷
Meand	1.7 x 10 ⁹	3.9 x 10 ⁹	3.2 x 10 ⁷	1.3 x 10 ²	4.2 x 10 ²	2.6 x 10 ²	2.6 x 10 ⁻²	7.6 x 10 ⁻⁸	2.4 x 10 ⁻⁸	2.4 x 10 ⁻⁸
95% CIe,f										
L1	4.3 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁹	4.0 x 10 ⁶	2.7 x 10 ¹	3.9 x 10 ⁰	8.6 x 10 ⁻³	8.6 x 10 ⁻³	9.9 x 10 ⁻⁹	2.2 x 10 ⁻⁹	2.2 x 10 ⁻⁹
L2	7.1 x 10 ⁹	2.9 x 10 ⁹	2.6 x 10 ⁸	6.4 x 10 ²	4.6 x 10 ²	7.7 x 10 ⁻²	7.7 x 10 ⁻²	5.6 x 10 ⁻⁷	2.7 x 10 ⁻⁷	2.7 x 10 ⁻⁷

^a Determined after 24 h of incubation of the filter-mating on membrane filter.

^b Determined after 2 day on TATAC containing antibiotics.

^c Ratio to the donor.

^d Antilog of mean log number of colony or frequency.

^e CI, Confidence interval; L1, lower limit of CI; L2, upper limit of CI.

^f Determined as follow:

$$L1 = \text{antilog} [\overline{\log Y} - t_{0.05(n-1)} \sqrt{S^2 / n - 1}] \text{ and } L2 = \text{antilog} [\overline{\log Y} + t_{0.05(n-1)} \sqrt{S^2 / n - 1}], \text{ where } Y = \text{number of colony,}$$

S^2 =standard deviation, and n = number of experiment.

Table 3. Transfer of nonconjugative plasmid pDL278 (SPCM^r) from *L.lactis* to *E. faecalis* by pAMB1 (EM^r) in sealed mouse.

Exp. no.	no. of donors ^a		no. of recipients ^a		no. of transconjugants ^b		Frequency of: (Ratio to donor)		Frequency of: (Ratio to recipient)	
	<i>L.lactis</i> (pDL278, pAMB1)	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (EM ^r)	<i>E. faecalis</i> (SPCM ^r , EM ^r)	<i>E. faecalis</i> (EM ^r)	<i>E. faecalis</i> (SPCM ^r , EM ^r)	<i>E. faecalis</i> (EM ^r)	<i>E. faecalis</i> (SPCM ^r , EM ^r)
1	2.6 x 10 ¹⁰	9.3 x 10 ¹¹	4.8 x 10 ⁵	3.7 x 10 ¹	1.9 x 10 ⁻⁵	1.4 x 10 ⁻⁹	5.2 x 10 ⁻⁷	3.9 x 10 ⁻¹¹		
2	1.0 x 10 ⁸	2.0 x 10 ¹⁰	8.6 x 10 ⁷	1.0 x 10 ¹	8.6 x 10 ⁻¹	1.0 x 10 ⁻⁷	4.3 x 10 ⁻³	1.5 x 10 ⁻¹⁰		
3	5.6 x 10 ¹⁰	1.5 x 10 ¹¹	2.8 x 10 ⁷	1.5 x 10 ²	5.0 x 10 ⁻⁴	2.6 x 10 ⁻⁹	1.9 x 10 ⁻⁴	1.0 x 10 ⁻⁹		
4	1.4 x 10 ⁹	8.0 x 10 ¹⁰	2.0 x 10 ⁸	2.1 x 10 ²	1.5 x 10 ⁻¹	1.5 x 10 ⁻⁷	2.5 x 10 ⁻³	2.6 x 10 ⁻⁹		
5	1.4 x 10 ⁷	2.7 x 10 ¹¹	1.4 x 10 ⁸	1.3 x 10 ¹	1.0 x 10 ¹	9.5 x 10 ⁻⁷	5.2 x 10 ⁻⁴	4.9 x 10 ⁻¹¹		
Mean ^c	1.2 x 10 ⁹	1.4 x 10 ¹¹	3.2 x 10 ⁷	4.3 x 10 ¹	2.6 x 10 ⁻²	3.5 x 10 ⁻⁸	2.2 x 10 ⁻⁴	3.0 x 10 ⁻¹⁰		
95% CI ^{d,e}										
L1	1.9 x 10 ⁸	6.7 x 10 ¹⁰	8.6 x 10 ⁶	2.1 x 10 ¹	1.4 x 10 ⁻³	7.9 x 10 ⁻⁹	3.3 x 10 ⁻⁵	1.1 x 10 ⁻¹⁰		
L2	8.1 x 10 ⁹	3.1 x 10 ¹¹	1.2 x 10 ⁸	8.9 x 10 ¹	4.7 x 10 ⁻¹	1.6 x 10 ⁻⁷	1.5 x 10 ⁻³	8.1 x 10 ⁻¹⁰		

^a Determined at 20 hrs after mouse have been force-fed on 0.5 ml of suspension containing 1.6 x 10¹¹/ml of *L.lactis* IL1403(pAMB1, pDL278) and 2.0 x 10¹¹/ml of *E.faecalis* HS32.

^b Determined after 2 days on TATAC containing antibiotics.

^c Antilog of mean log number of colony or frequency.

^d CI, Confidence interval; L1, lower limit of CI; L2, upper limit of CI.

^e Determined as follow:

$$L1 = \text{antilog} [\overline{\log Y} - t_{0.05}(n-1) \sqrt{S^2 / n - 1}] \text{ and } L2 = \text{antilog} [\overline{\log Y} + t_{0.05}(n-1) \sqrt{S^2 / n - 1}], \text{ where } Y = \text{number of colony,}$$

S^2 = standard deviation, and n = number of experiment.

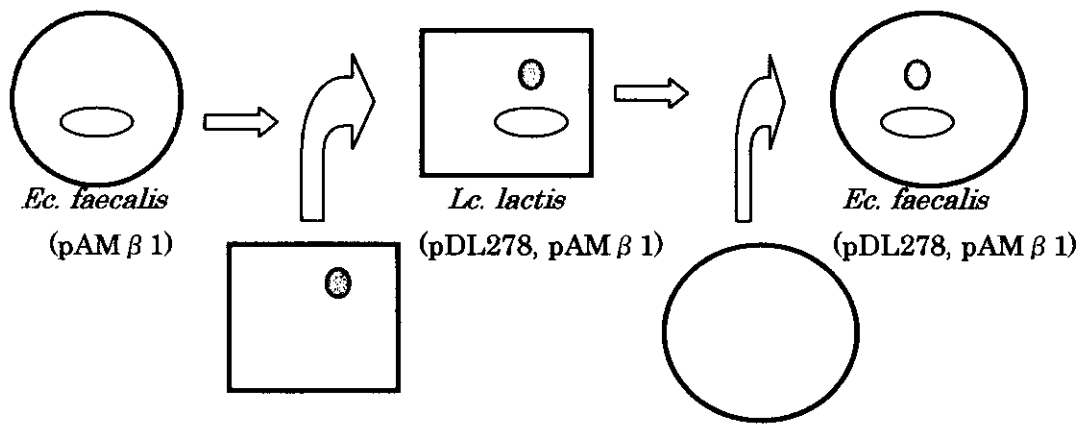


Fig.1 トリペアレンタルトランスファーの模式図

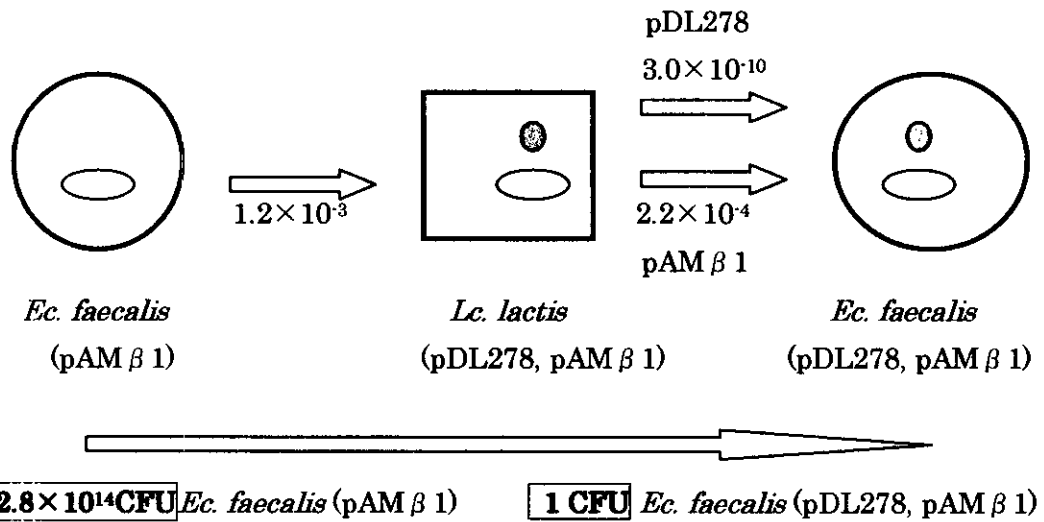


Fig.2 肛門閉鎖マウスにおける遺伝子組換え用 pDL278 プラスミドの移行に関する考察

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

遺伝子組換え魚に関する文献調査

分担研究者 長尾拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

遺伝子組換え魚に関する情報を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行った。前回調査した以降に、組換え体に関して報告された文献を調べた結果、新たに海産魚を用いた報告（和名：ヘダイ）があったが、それ以外は今まで報告されている魚種を用いたものであった。実験内容では、今まで成長ホルモン遺伝子を導入し、成長促進効果をねらったものが多かったが、新たに、耐病性を付与する組換え体を作成し、細菌性疾病に対し、効果があった報告が出てきた。また、人のラクトフェリン遺伝子をコイに導入して特定のウイルス病に対して抵抗性を増したという論文があった。基礎的研究としてメダカ、ゼブラフィッシュを用いた実験は前回同様、多数の報告例があった。組換え体作出法として、魚類ではほとんどマイクロインジェクション法であったが、精子にエレクトロポレーション法・リボソーム法を用いて遺伝子を導入した報告がなされ、それらの子供に高率（50～70%）で遺伝子が導入されたという報告が出てきた。また、マウスなどで用いられている遺伝子ノックアウト法をニジマスで試み、特定の遺伝子の働きを阻害することに成功した報告もなされた。

特許関係ではゼブラフィッシュを用いて、組織特異的あるいは発生の特定時期に遺伝子を発現させる手法について特許をとった例が出てきた(US Patent No. 6380458)。

インターネット情報では、引き続き、アメリカにおける組換え体動物を許可する権限のある米国医薬品局(FDA)、組換え体魚類の販売に反対している団体 Center for food safety (CFS)および組換え体魚類を最初に販売するであろう A/F Protein社のホームページを調べた。未だに販売の許可は下りていないが、A/F Protein社は2004年までに結論が出ると予測しているとのことである。

最近、組換え体魚類の出荷が近づきつつあるという状況を反映してか、比較的一般の人にもめにとまる雑誌で組換え体について報道がなされた（例：フランケンフード無表示で市場に。AERA 02.12.2日号）。

また、アメリカでは遺伝子組換え魚は自然の生息環境から隔離された施設で養殖されているが、メリーランド州では、他の水路とつながっていない池や湖において遺伝子組換え魚の養殖を認めたとあり、同州では基準が緩和された。反対にカルフォルニア州やオレゴン州は規制強化に動いているようである。また、ワシントン州では州内で組換え体魚を取り扱うことを禁止した。

組換え体の安全性に関する論文は導入遺伝子が拡散するシミュレーション実験やモデル動物を用いた報告がでている。また、組換え体魚とコントロールの筋肉中で発現しているRNAの差をみた報告がされた。

協力研究者
名古屋博之
独立行政法人水産総合研究センター
養殖研究所遺伝育種部細胞工学研究室
主任研究官

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え魚の作出に関する研究が各国から報告されるようになった。組換え体魚類は一度作出されると、精子の数や卵の数が多いことから、組換え体動物で最初の食品になるのではないかとされている。そこで、遺伝子組換え魚に関する各国の情勢等を文献、インターネット等で調査し、研究の現状を把握することを目的とする。

本研究の趣旨から、いわゆる実験動物としての組換え体魚介類に関しては、この調査から除外する。ただし、現在は実験段階でも、水産食品対象物となり得る魚介類を扱っている研究は調査対象とした。

B. 研究方法

遺伝子組換え魚に関する情報を文献データベースによる文献調査、インターネット、特許情報、新聞等を用いて調査した。

C. 研究結果

1. 水産魚介類の組換え体作出の現状

魚類の組換え体作出に関する研究は1980年中頃から始まるようになった。はじめはマウスやウイルスなどのプロモーターの下流にレポーター遺伝子や他の動物の成長ホルモン cDNA をつなげ

たベクターを使用していたが、近年では水産生物の遺伝子の研究が進み、魚由来のプロモーター、遺伝子が使用される傾向にある。しかし、昨年度(2002年)、ヒトのラクトフェリン遺伝子をコイに導入してコイの耐病性を高めたという論文が出た。魚類組換え体の研究開始当初は魚の遺伝子の研究が進んでいないこともあって、多の動物由来のプロモーター、遺伝子を用いたことは前述したが、今後は特定の形質を水産生物に導入するために意図的に水産生物以外の遺伝子を導入する報告が出てくる可能性がある。

Dr. Rebecca Goldberg によってインターネット上で公開されている組換え魚介類に、今回調べた魚種も含めると下記ようになる。各種類に対応する論文として1から46までの論文を参考にあげた。論文番号が記入されていないのは、今回の調査で該当する論文が見つからなかった種類(アマゴ、Bluntnose bream、Gilthead bream、オオクチバス、Mud carp、Sea bream、Stripped bass、Walleye)と、今回、調査対象としない実験動物として作出されたキンギョ、Killifish、メダカ、ゼブラフィッシュは参考論文を載せていない。

今までに作出されている水産生物

1) 実験動物として

キンギョ、Killifish、メダカ、Mummichog、ゼブラフィッシュ

2) 観賞魚として利用可能

キンギョ、ゼブラフィッシュ

3) 食品として利用可能

アワビ、大西洋サケ、Bluntnose bream、アメリカナマズ、マスノスケ、ギンザケ、コイ、

Gilthead bream、オオクチバス、ドジョウ、Mud carp、Northern pike、カキ、Penaeid shrimp、ニジマス、Sea bream、Striped bass、ティラピア、Walleye、ヘダイ

観賞魚として利用可能な種としてキンギョやゼブラフィッシュをあげたが、これらの種は現在の論文では実験動物として利用すると記入されていて、観賞魚として利用するといった論文ではない。しかし、現在シンガポール大学のDr. Gong Zhiyuanによって作出された自然界には存在しない色をしたゼブラフィッシュをアメリカに輸出しようとする計画があるとの情報があつた。

また、食品として利用可能な種としてあげた論文でも、実験段階のレベルのものから、産業対象種として生産できるものまで多種多様である。

2. 組換え体を作成して期待される形質

水産魚介類で組換え体を作成して期待される効果としては次の3つが考えられる。

- 1) 高成長（成長を早くする）
- 2) 耐病性付与（病気にかかりにくくする）
- 3) 肉質の改善

3の肉質の改善に関する研究はまだ無いといってよい。2の耐病性を付与する研究は始まったばかりであるが、報告がなされるようになってきた。2002年にはヒトのラクトフェリン遺伝子を草魚に導入してウイルス病に対する抵抗性を増した論文が出された。表1に、このような研究の例を挙げる。

1の高成長に関する研究は魚類において多くの研究者が取り組んでいる研究である。

成長ホルモン遺伝子を組み込んだ研究はサケ・マス類、ティラピア、アメリカナマズ等で盛んに

行われている。研究当初はプロモーターにはウイルス由来のSV40やCMV、RSVのプロモーターの下流にヒト、ラット、牛の成長ホルモンcDNAをつなげたプラスミッドを用いていた。1990年中頃から魚由来のプロモーター、ゲノム遺伝子に変わっていく傾向がわかる。サケ・マス類に成長ホルモン遺伝子を導入した組換え体の特徴はその成長促進効果がほかの動物やほかの魚と比べても強いことである。高成長を目的とした論文は2002年度も数報出ているが、今までと魚種が異なるか、遺伝子導入法をマイクロインジェクション法ではなく、精子に遺伝子を導入し、その精子と受精させ、高率で遺伝子導入魚を作成したという論文が出てきた。

3. 組換え体作出に関する情報

このように、成長ホルモン遺伝子を魚類に導入することで成長促進の効果が期待できることから、すでに民間機関によっても研究が進められている。研究の進捗状況は昨年度と同様であり、もっとも研究が進み、また、実際に米国食品医薬品局(FDA)に食品として組換え体魚類を出荷する許可を申請中となっているのがA/F Protein社という会社である。この会社に関する情報は次のインターネット上のホームページから参照可能である。

1). A/F Protein社ホームページ

<http://www.afprotein.com/>

2). 実際に生産している現場（同社が生産している組換え体大西洋サケに関する情報も掲載）

<http://www.aquabounty.com/>

3). 同社がまとめた組換え体魚類に関する文献

<http://www.aquabounty.com/>

上記ホームページに入り reference の項

目をチェック

4). A/F Protein 社が所属する会社

<http://www.genesis.mun.ca/>
http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af_protein.html§ion=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone

一方、このような組換え体食品に対して懸念を表している関連ホームページも多数存在する。その中でもっとも組換え体魚類に関する情報が充実していると思われるホームページは下記の通りである。

5). The center for food safety ホームページ

<http://www.centerforfoodsafety.org/gefish/index.html>

4. 組換え体に関する特許情報

組換え体に関する特許状況をインターネットを用いてアメリカ及びヨーロッパの特許の検索を行った。

ヨーロッパにおいては2001年に前述した Genesis 社が申請したサケ組み換え技術に関する特許を欧州連合特許局が承認したと新聞で報道された(2001年9月13日付、みなと新聞)。

アメリカにおいても組換え体魚類の作出に関する特許がいくつか承認されている。昨年度新たに認められた特許は6) のゼブラフィッシュにおいて組織特異的、発現時期特異的に発現させるプラスミッドで特許を取得した。

関連する特許を以下に示す。

1) Isolation and Characterization of an Actin Gene from Abalone

U.S. Patent Number 5,675,061

Powers *et al.*

Oct. 7, 1997

2) Lycopene Cyclase Gene

U.S. Patent Number 5,792,903

Hirschberg *et al.*

August 11, 1998

3) Transgenic Salmonid Fish Expressing Exogenous Salmonid Growth Hormone

U.S. Patent Number 5,545,808

Hew *et al.*

August 13, 1996

4) Transgenic Fish and Vectors Therefor...

U.S. Patent Number 5,998,697

Devlin, Robert H.

Dec. 7, 1999

5) Transgenic fish and a method of harvesting islet cells therefrom,

U.S. Patent 6,015,713

Wright Jr. *et al.*

Jan. 18, 2000

6) Cell-lineage specific expression in transgenic Zebrafish.

U.S. Patent Number 6,380,458

Lin Shuo

June 9, 1997

これらのうち、A/F Protein 社が取得している特許が3)の特許である。この特許情報によれば使用したプラスミッドの構成は ocean pout antifreeze promoter の下流にマスノスケ成長ホ

ルモン cDNA をつなげ、これをプラスミッド pUC18 に挿入したものとある。これらのシーケンスに関する情報を下記に示す。

Ocean pout antifreeze protein gene sequence
Genebank accession No. J03923, J03924

Chinook salmon growth hormone gene sequence
Genebank accession No. S50867

なお、A/F Protein 社の申請に対し FDA は未だに許可を出していないが、同社ホームページからの情報によると同社は 2004 年度中に許可を得られるだろうとしている。

5. 組換え体魚介類の研究を行っている国

組換え体に関する論文の著者から、かれらの所属する国を挙げると次のようになる。昨年度報告した国以外に新しく報告された論文をみても変更はなかった。

アジア・オセアニア

韓国, 中国, イスラエル, 日本, インド,
台湾, シンガポール, フィリッピン,
ニュージーランド

ヨーロッパ

フランス, イギリス, フィンランド,
スウェーデン, スコットランド, ノルウェー,
スペイン, ドイツ

南北アメリカ

アメリカ, カナダ, キューバ

6. その他

遺伝子組換え食品に一番近い動物としてサケ・マス類について詳細に調べた。しかし、実際はサケ・マス類以外にもティラピア、アメリカナマスでも実用化されつつある現状は昨年度とあまり変わっていない。

ティラピアに関しては発展途上国において重要な蛋白源となることからインドやバングラディッシュの研究者がイギリスと共同研究で成果を上げている。また、キューバにおいても成果が上がっていると思われるが、論文で報告される以外は情報に乏しい。イギリスにおいてもティラピア組換え体の研究は進んでいる。彼らは自国で消費するためでなく、発展途上国に対する技術支援を目的に研究を行っている。

これらの国以外に中国で組換え体の作出は行われているが、情報に乏しく、論文は出るが、原文が中国語で書かれており、抄録から情報を得るだけである。

また、アメリカでは遺伝子組換え魚は自然の生息環境から隔離された施設で養殖されているが、メリーランド州では、他の水路とつながっていない池や湖において遺伝子組換え魚の養殖を認めたとあり、同州では基準が緩和された。反対にカリフォルニア州やオレゴン州は規制強化に動いているようである。また、ワシントン州では州内で組換え体魚を取り扱うことを禁止した。

D. 考察

魚類組換え体に関する研究は 1990 年中頃にはすでに完成しており、現在はその子孫を継代飼育している状況である。魚介類は一般に卵や精子の数が膨大で、一度、組換え体が作出されると次の世代に一度にたくさんの組換え体を生産できる。それ故に、最初に人が食べる可能性のある組み換え動物食品であろうといわれている。しかし、インターネット上の情報を見る限り、現状では組換え体魚類に対する姿勢はアメリカの消費者においても拒否感を示して

いるようである。1999年の記事でA/F Protein社が成長ホルモン遺伝子を組み込んだ大西洋サケを食品としてFDAに許可を申請中であつたのに、4年後の2003年2月においても未だ許可されていない。

研究内容の変化としては当初、魚類以外の遺伝子を導入した実験から、魚類由来のプロモーター、同遺伝子を導入する研究が多くなつた。しかし、最近、人のラクトフェリン遺伝子をコイに導入して耐病性を高めた論文も出てきたことから、これからは導入遺伝子に魚類以外の遺伝子も導入する報告が多くなることも考えられる。

A/F Protein社によって、今すぐにも出荷できると報告している大西洋サケについて詳しく紹介してきたが、これ以外にもティラピア、アメリカナマズ、コイ等でもすでに組換え体が作出されている。これらの情報は論文以外にはインターネット上で断片的な情報を入手できるのみである。

E. 結論

以上のことから、結論はほぼ昨年度と同様である。

- 1) 現在までに組換え体魚類は淡水魚、海産魚両方で報告されており、20数種作出されている。
- 2) 魚類以外にも貝類、エビ類で組換え体作出の報告がある。
- 3) 遺伝子導入方法がこれまでのマイクロインジェクション法でなく、精子に導入し、その精子と受精させることによって、高率に組換え体を作成する方法が報告された。
- 4) これらの研究は実験室レベルのものとしてすでに大量に飼育されているものがある。
- 5) アメリカにおいて、民間企業が組換え体大西

洋サケを食品として利用する許可をFDAに申請中であるが、現段階で許可されていない。同企業のホームページによると2004年度中には許可が得られるだろうとある。

- 6) 遺伝子組換え体ティラピアは発展途上国で技術が進んでおり、食品として利用されるのは、これらの国の方が早い可能性がある。しかし、これらの国の組換え体に関する情報は論文以外には乏しいのが現状である。
- 7) 食品としての組換え体以外に、観賞魚として組換え体を利用しようとする動きが出てきた。

表1 . 魚類における耐病性付与のための組換え体を利用したアプローチ

実験手法	原 理	文 献
antisense technology	The production of complementary RNA to complex with foreign or viral RNA	47
Ribozyme	The production of specific RNA -based enzyme to destroy foreign or viral RNA	47
Expression of viral coat protein	The expression of viral coat protein to occupy the receptor binding sites, thus competing with normal viral binding	
Expression antibacterial, antimicrobial substances and peptides	The expression of lysozyme and other cationic peptides to boost the host defense against a broad spectrum of pathogens	48 49 50 51

下記インターネット情報による情報を一部改変

<http://ci.mond.ort/9708/970812.html>