

参考文献 (昨年度に続き, 新たな論文を追加)

組換え体作出・生物特性に関する論文 (主に最近の論文から)

1. Gomez-Chiarri, M. *et al.* (1999) Isolation and characterization of an actin promoter from the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Marine biotechnology* 1(3), 269-278
2. Cook, J.T. *et al.* (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility / conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188(1-2), 15-32
3. Cook, J. T., *et al.* (2000) Metabolic rate of pre-smelt growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188(1-2), 33-45
4. Cook, J.T. *et al.* (2000) Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188(1-2), 47-63
5. Stevens, E. D. and Devlin, R. H. (2000) Gill morphometry in growth hormone transgenic Pacific coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, differs markedly from that in GH transgenic Atlantic salmon. *Environmental biology of fishes* 58(1), 11-17
6. Hew, C. *et al.* (1999) Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic research* 8(6), 405-414
7. Abrahams, M. V. and Sutterlin, A. (1999) The foraging and antipredator behaviour of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon. *Animal behavior* 58, 933-942
8. Stevens, E. D. *et al.* (1999) Gut morphology in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Journal of fish biology* 55(3), 517-526
9. Stevens, E. D. and Sutterlin, A. (1999) Gill morphometry in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Environmental biology of fishes* 54(4), 409-411
10. Sauders, R. L. *et al.* (1998) Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Aquaculture* 168(1-4), 177-193
11. Stevens, E. D. *et al.* (1998) Respiratory metabolism and swimming performance in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 55(9), 2028-2035
12. Dunham, R. A. *et al.* (1999) Predator avoidance of transgenic channel catfish containing salmonid growth hormone genes. *Marine biotechnology* 1(6), 545-551
13. Sin, F. Y. T. *et al.* (1993) Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence. *Aquaculture* 117(2), 57-69
14. Dunham, R. A. and Devlin, R. H. (1999) Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. *Transgenic animals in agriculture*, 209-229.
15. Devlin, R. H. *et al.* (2000) Seawater adaptability and hormone levels in growth-enhanced transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 191(4), 367-385
16. Hill, J. A. *et al.* (2000) Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 57(5), 939-950
17. Stevens, E. D. and Devlin, R. H. (2000) Intestinal morphology in growth hormone transgenic coho salmon. *Journal of fish biology* 56(1), 191-198

18. Devlin, R. H. *et al.* (1999) Increased ability to compete for food by growth hormone-transgenic coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Aquaculture research* 30(7), 479-482
19. Stevens, E. D. and Devlin, R. H. (2000) Gill morphometry in growth hormone-transgenic Pacific coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, differs markedly from that in GH-transgenic Atlantic salmon. *Environmental biology of fishes* 58(1), 113-117
20. Zeng, Z. Q. and Zhu, Z. Y. (2001) Transgenes in F4 pMThGH-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.) are highly polymorphic. *Chinese science bulletin* 47(2), 143-148
21. Fu, C. H. *et al.* (2000) Whole-body amino acid pattern of F4 human growth hormone gene-transgenic red common carp (*Cyprinus carpio*) fed diets with different protein levels. *Aquaculture* 189(34)
22. Hinitz, Y. and Moav, B. (1999) Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 173(1-4), 285-296
23. Fu, C. *et al.* (1998) Growth and feed utilization by F4 human growth hormone-transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of fish biology* 53(1), 115-129
24. Nam, Y. K. *et al.* (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic research* 10(4), 353-362
25. Nam, Y. K. *et al.* (1999) Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* 172(34), 229-245
26. Nam, Y. K. (2000) Isogenic transgenic homozygous fish induced by artificial parthenogenesis. *Transgenic research* 9(6), 463-469
27. Gross, M. L. *et al.* (1992) Molecular analysis and growth evaluation of northern pike *Esox lucius* microinjected with growth hormone genes. *Aquaculture* 103(3)
28. Tseng, F. S. *et al.* (2000) Introducing foreign DNA into tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by electroporation. *Theriogenology* 54(9), 1421-1432
29. Li, S. S. and Bai, H. J. (2000) Transfer of foreign gene to giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by spermatophore-microinfection. *Molecular reproduction and development* 56(2), 149-154
30. Uzbekova, S. *et al.* (2000) Transgenic rainbow trout expressed sGnRH antisense RNA under control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of molecular endocrinology* 25(3), 337-350
31. Yoshizaki, G. *et al.* (2000) Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasalike gene promoter. *International journal of developmental biology* 44(3), 323-326
32. Takeuchi, Y. *et al.* (1999) Green fluorescent protein as a cell labeling tool and a reporter of gene expression in transgenic rainbow trout. *Marine biotechnology*, 1:544-548, 1999.
33. Rahman, M. A. *et al.* (2001) Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *Journal of fish biology* 59(1), 62-68
34. Rahman, M. A. *et al.* (2000) Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic research* 9(6), 417-427
35. Martinez, R. *et al.* (2000) Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone. *Biochemical and biophysical research communications* 267(1), 466-472
36. Razak, S. A. *et al.* (1999) Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) following heatshock-induced triploidy. *Marine*

- biotechnology1(6), 533-544
37. Guillenn, I. *et al.* (1999) Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. *Marine biotechnology* 1(1), 214
 38. Martinez, R. *et al.* (1999) Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture* 173(14), 271-283
 39. Rahman, M. A. and Maclean, N. (1999) Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* 173(14), 333-346
 40. Rahman, M. A. *et al.* (1998) Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic research* 7(5), 357-369
 41. Rahman, A. and Maclean, N. (1998) Production of lines of growth enhanced transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing an novel piscine growth hormone gene. *New developments in marine biotechnology* 1928
 42. Rahman, M. A. *et al.* (1997) Co-injection strategy improves integration efficiency of a growth hormone gene construct, resulting in lines of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing an exogenous growth hormone gene. *Transgenic research* 6(6), 363-378
 43. Hernandez, O. *et al.* (1997) Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular marine biology and biotechnology* 6(4), 364-375
 44. Hernandez, O. *et al.* (1997) Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular marine biology and biotechnology* 6(4), 364-375
 45. de la Fuente *et al.* (1999) Growth regulation and enhancement in tilapia basic research findings and their applications. *Genetic analysis and molecular engineering* 15(35), 85-90
 46. Buchanan, J. T. *et al.* (2001) Transfection of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) embryos. *Marine biotechnology* 3(4), 322-335

耐病性付与に関する論文

47. Hackett, P. B. (1993) The molecular biology of transgenic biochemistry and molecular biology of fishes. *Molecular biology frontiers*. Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, pp. 202-240
48. Hew, C.L. *et al.* (1995) Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology* 47 (Supplement A) 1-19
49. Jia, X. *et al.* (2000) Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5), 1928-1932
50. Zhong, J.Y. *et al.* (2002) Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) to increase resistance against GCH virus. *Aquaculture* 214(1), 93-101.
51. Sarmasik, A. *et al.* (2002) Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.* 4, 310-322.

組換え体魚類に関するレビュー

52. Maclean, N. and Penman, D. (1990) The application of gene manipulation to aquaculture.

Aquaculture 85, 1-20

53. Chen, T. and Powers, D. A. (1990) Transgenic fish. Trends in biotechnology 8, 209-215
54. Houdebine, L. M. and Chourrout, D. (1991) Transgenesis in fish. Experientia 47, 898-897
55. Fletcher, G. and Davies, P. L. (1991) Transgenic fish for aquaculture. Genetic engineering 13, 331-369
56. Hackett, P. B. (1993) The molecular biology of transgenic biochemistry and molecular biology of fishes. Molecular biology frontiers. Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, pp. 202-240
57. Pandian, T. J., and Marian, L. A. (1994) Problems and prospects of transgenic fish production. Current science 66, 635-649
58. Gong, Z. and Hew, C. L. (1995) Transgenic fish in aquaculture and developmental biology. In R. A. Pederson and G. P. Schatten (eds.), Current topics in developmental biology. Academic press, San Diego, CA, Vol. 30, pp. 17-214
59. Devlin, R. H. (1977) Transgenic salmonids. In L. M. Houdebine (eds.), Transgenic animals, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 105-115

参考インターネットホームページ

1. Dr. Rebecca Goldbergによる組換え体魚介類作出の現状を紹介したホームページ
http://www2.environmentaldefense.org/documents/463_Something%20Fishy%2Ehtm
2. A/F Protein社の組換え体サケを紹介した記事（上）（1999年WIRED NEWS 日本訳）
<http://www.hotwired.co.jp/news/news/Technology/story/3091.html>
3. A/F Protein社の組換え体サケを紹介した記事（下）（1999年WIRED NEWS 日本訳）
<http://www.hotwired.co.jp/news/news/Technology/story/3100.html>
4. A/F Protein社の組換え体サケを紹介した記事（上）（2002年WIRED NEWS 日本訳）
<http://www.hotwired.co.jp/news/news/20020312302.html>
5. A/F Protein社の組換え体サケを紹介した記事（下）（2002年WIRED NEWS 日本訳）
<http://www.hotwired.co.jp/news/news/technology/story/20020313306.html>
6. 上記2, 3の原文記事
<http://www.wired.com/news/politics/0,1283,50928,00.html>
7. 上記2, 3の原文記事
<http://www.wired.com/news/technology/0,1282,21831,00.htm>(原文)
8. A/F Protein社ホームページ
<http://www.afprotein.com/>
9. 実際に生産している現場（組換え体大西洋サケに関する情報も掲載）
<http://www.aquabounty.com/>
10. 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

11. A/F Protein 社が所属する会社 (Genesis group)

<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

12. The center for food safety ホームページ

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

13. 組換え体特許情報

Isolation and Characterization of an Actin Gene from Abalone

U.S. Patent Number 5,675,061

Powers *et al.*

Oct. 7, 1997

Lycopene Cyclase Gene

U.S. Patent Number 5,792,903

Hirschberg *et al.*

August 11, 1998

Transgenic Salmonid Fish Expressing Exogenous Salmonid Growth Homone

U.S. Patent Number 5,545,808

Hew *et al.*

August 13, 1996

Transgenic Fish and Vectors Therefor..

U.S. Patent Number 5,998,697

Devlin, Robert H.

Dec. 7, 1999

Transgenic fish and a method of harvesting islet cells therefrom,

US Patent 6,015,713

Wright Jr. *et al.*

Jan. 18, 2000

Cell-lineage specific expression in transgenic Zebrafish.

U.S. Patent Number 6,380,458

Lin Shuo

June 9, 1997

14. アメリカ食品医薬品局ホームページ

<http://www.fda.gov/>

15. 同獣医学センターホームページ

<http://www.fda.gov/cvm/>

16. 同センターが消費者の組換え体魚類に関する質問に答えているページ
<http://www.fda.gov/cvm/index/consumer/transgen.htm>

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）

後代交配種等の安全性に関する研究（1）

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

遺伝子組換え農作物における導入遺伝子の塩基配列上の安定性を調べるため、輸入ダイズに含まれていたラウンドアップ・レディー・ダイズ（RR ダイズ）からそこに含まれる 35S-プロモーター :: CTP :: *epsps* 遺伝子領域とその挿入領域を含むダイズ・ゲノム DNA 断片をクローニングしてその塩基配列を決定した。そこで得られた塩基配列情報をもとに、この領域を増幅する PCR プライマーを作成し、輸入ダイズに含まれていた RR ダイズ 18 粒から抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行い、その塩基配列を決定した。その結果、18 粒の中で 7 箇所から点突然変異が検出された。しかし、この結果はコントロールとして同時に調べた α 型 β -コングルシニン サブユニット（ β -con α ）遺伝子における点突然変異率とほぼ同等であることがわかり、導入された遺伝子と内生の遺伝子とにおいて、ほぼ同じ頻度で点突然変異が起きていると考えられた。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀（青森大学工学部）

A. 研究目的

現在、遺伝子組換え農作物はその安全性審査が義務付けられ、安全性に問題のないことが確認されたもののみが輸入・販売され、食卓にのぼっている。その安全性審査において、導入遺伝子の塩基配列が検討され、その塩基配列由来のタンパク質において毒性やアレルギー性のないことが審査され、安全性が確認されている。一方、植物において、世代を経ることによって核 DNA の塩基配列に点突然変異が生じることは一般的であり、広く認められている。しかし、この点突然変異の生じる頻度が導入された遺伝子と内生の遺伝子とで同一であるのか、ということについての研究はなされていない。そこで、本年度は、輸入ダイズに含まれていたラウンドアップ・レディー・ダイズ（RR ダイズ）から、導入された遺伝子とその周辺塩基配列をクローニングして塩基配列を決定し、そこで決定した塩基配列をもとに作成した PCR プ

ライマーを用いて、輸入ダイズに含まれていた RR ダイズ一粒ごとから抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行い、増幅されてきた DNA 断片の塩基配列を決定し、どの程度の頻度で点突然変異が生じているのか、コントロールとして内生遺伝子である α 型 β -コングルシニン サブユニット（ β -con α ）遺伝子における点突然変異の頻度と比較することを行った。

B. 研究方法

<試料>

輸入ダイズは、検疫所においてモニタリング用に採取されたものを用いた。

<方法>

RR ダイズ核 DNA からの

35S::CTP::epsps 領域のクローニング

RR ダイズ核 DNA をテンプレートとして、35S プロモーター領域の塩基配列をもとに外向き方向に増幅するプライマー対（図1）

を作成した。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 反応チューブに作った。これに 30 μ l のミネラルオイルを重層し、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、0.5 units/ μ l の LA Taq polymerase (宝酒造) を 1 μ l を加え、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 分のサイクルを行なった後、4 $^{\circ}$ C とした。次に nested PCR のために、反応液から 1 μ l をとり、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 反応を行なった。反応終了後、PCR 反応液に 10 \times 電気泳動用色素を 2 μ l 加え、さらに 100 μ l クロロホルムを加え、反応液を 1.5% アガロース電気泳動にて分離した。検出されたバンドについてアガロースから切り出しグラスミルク法によって DNA 断片を回収し、常法に従って Bluescript SK にクローニングし、塩基配列を決定した。

ダイズ粒からの 35S::CTP::epsps 遺伝子領域および β -con α 遺伝子領域の PCR による増幅と塩基配列の決定

上記で決定した塩基配列をもとに PCR プライマー対 (図 3) を作成し、またコントロール用として内生遺伝子である β -con α 遺伝子に対するプライマー対 (図 5) を作成した。これらのプライマー対を用いて、RR ダイズ一粒から抽出した核 DNA をテンプレートとして上記の 2.5 倍容の反応溶液で PCR 反応を行なった。反応終了後、反応液をカラムで精製し、これを上記で用いたプライマーの片方ずつを用いて、常法にしたがって双方向にダイレクト・シーケンスを行い、塩基配列を決定した。

C. 結果・考察

C.1. RR ダイズ核 DNA からの 35S::CTP::epsps 領域のクローニング

RR ダイズ核 DNA を各種制限酵素で切断し、これをライゲーションして環状化させたものをテンプレートとして、図 1 で示したプライマーを用いて inverse PCR 法によって RR ダイズ核 DNA からの 35S::CTP::epsps 領域のクローニングを試みた際に、コントロールとして環状化させていない核 DNA をテンプレートとして PCR を行なったところ、本来ならば図 1 に示すような外向きに増幅させるように合成したプライマーであるため PCR によって DNA は増幅されてこないはずにもかかわらず、環状化していないコントロールからも PCR によって増幅されてくるバンドが検出され、そこにおいて多型が生じていることを昨年度見いだした。そこで、さらにこの多型がどの程度の個体で生じているのかを明らかにするために、89 の RR ダイズ穀粒から得た核 DNA をテンプレートとして PCR を行なったところ、図 2 に示すように様々なバンドが検出された。このうち、ほとんどの RR ダイズ穀粒から検出される約 0.36 kbp のバンド (図 2 中、黒矢印で示したバンド) についてクローニングしてその塩基配列を決定したところ、ダイズのレトロトランスポゾンの塩基配列と高い相同性が見られた。この結果は、今回用いたプライマーの塩基配列がカリフラワー・モザイク・ウイルスの 35S プロモーターの部分であり、レトロトランスポゾンの起源が、ウイルスが植物体に感染した時、核 DNA 内に逆転写されたウイルス・ゲノム DNA が挿入されるというイベントの時にミスが生じ、挿入は生じたがウイルス粒子を作れなくなったものがレトロトランスポゾンの起源である、ということから考えて、ダイズのレトロトランスポゾンがプロモーターの塩基配列を進化の過程において保存してきており、その塩基配列がカリフラワー・モザイク・ウイルスの 35S プロモーターと相同性を有していたため、その部分にプライマーが結合して PCR によって DNA が増幅されてきたものと考えられた。

その他のバンドについてクローニングしてその塩基配列を決定したところ、図 3 に示すように、1つのバンド(図 2 中、白矢印で示したバンド)からダイズ・ゲノムの挿入近傍領域と考えられる塩基配列と導入遺伝子の 35S::CTP::epsps 領域が重複組換えをおこした形で増幅されたものが検出された。この重複組換えについて、ダイズ・ゲノム内で本当に生じているのか、図 3 に示すプライマー対を用いて調べたが、どのプライマー対からも DNA 断片は増幅されてこなかった。従って、ここで増幅された DNA 断片は、PCR 反応において、伸長反応が途中で停止してしまったフラグメントが次の PCR 反応のプライマーとなってミス・アニールしたために増幅されてきたバンドであると考えられた。しかし、ここで得られた DNA 断片の塩基配列から、35S::CTP::epsps が挿入されたダイズ・ゲノムの近傍の塩基配列を決定することができた。実際に、この塩基配列から PCR プライマー対を図 3 に示すような部分の塩基配列に対して作成して PCR を行ったところ、DNA が増幅されてきたことから、この塩基配列が 35S::CTP::epsps が挿入されたダイズ・ゲノムの近傍の塩基配列であることが確定できた(図 4)。従って、この塩基配列を用いることで、検知のための RR ダイズ特異的プライマーを作成することが可能となった。

C.2. RR ダイズにおける epsps 遺伝子および β -con α 遺伝子塩基配列に生じた点突然変異の検出

上記の結果から得られた epsps 遺伝子の塩基配列および β -con α 遺伝子の塩基配列(アクセション番号 AB051865 および M13759)をもとに、各々のプロモーターからオープン・リーディング・フレーム(ORF)にわたる領域(図 5)を増幅するプライマー対を合成し、epsps 遺伝子については 15 粒、 β -con α 遺伝子については 8 粒の RR ダイズから得た核 DNA をテンプレートとして PCR を行い、そこで増幅されてきた DNA 断片の塩基配列を決定した。その結果、図 5 に示すように、epsps 遺伝子については 18 粒の核 DNA において、5 個体にお

いて 1 箇所点突然変異が生じていることがわかった。またそのうちの 2 個体においては 2 箇所点突然変異が生じていることがわかった。その中でもサンプル番号 6 番については ORF 中の塩基配列に生じた A から G への点突然変異によって、アミノ酸配列がグリシン(G)からグルタミン酸(Q)に変化していることがわかった。これに対し、 β -con α 遺伝子については、その塩基配列を決定したところ、既報のアクセション番号 AB051865 とほぼ同一の塩基配列を有するもの(図 6、 β -con α -1)と、既報のアクセション番号 M13759 とほぼ同一の塩基配列を有するもの(図 6、 β -con α -2)の 2 種類のうちのどちらかが検出された。この 2 種類のものについて、相互に比較したところ、 β -con α -1 の塩基配列を有する 5 個体において 1 個体の 1 ヶ所で、 β -con α -2 の塩基配列を有する 3 個体において 1 個体の 2 箇所点突然変異が生じていることがわかった。 β -con α -2 の塩基配列における点突然変異の 1 つは ORF 中の塩基配列に生じていたが、A から G への点突然変異によっても、アミノ酸配列はグリシン(G)のままであることがわかった。8 個体中の β -con α 遺伝子において見られた 3 箇所の点突然変異の生じる確率を約 35% とみると、18 個体中の epsps 遺伝子において見られた 7 箇所の点突然変異の確率は約 40% となり、点突然変異の生じる頻度は内生の遺伝子においても導入された遺伝子においても大きな差はないと考えられた。

今後、さらに個体数を増やして PCR 反応と塩基配列の決定を行ない、導入された遺伝子に起こる点突然変異の頻度が内生の遺伝子のそれと統計学的に同一であるかどうかを決定いく予定である。

D. 研究発表 (学会発表)

佐々木和生、寺島多恵子、安達秀雄、梅津博紀、小関良宏、鎌田博「遺伝子組換えダイズにおける導入遺伝子の変化について」日本食品化学学会第 8 回学術大会、兵庫、2002 年 6 月。



図1 RR ダイズ粒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。この反応液を希釈したものを、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 を行なった。

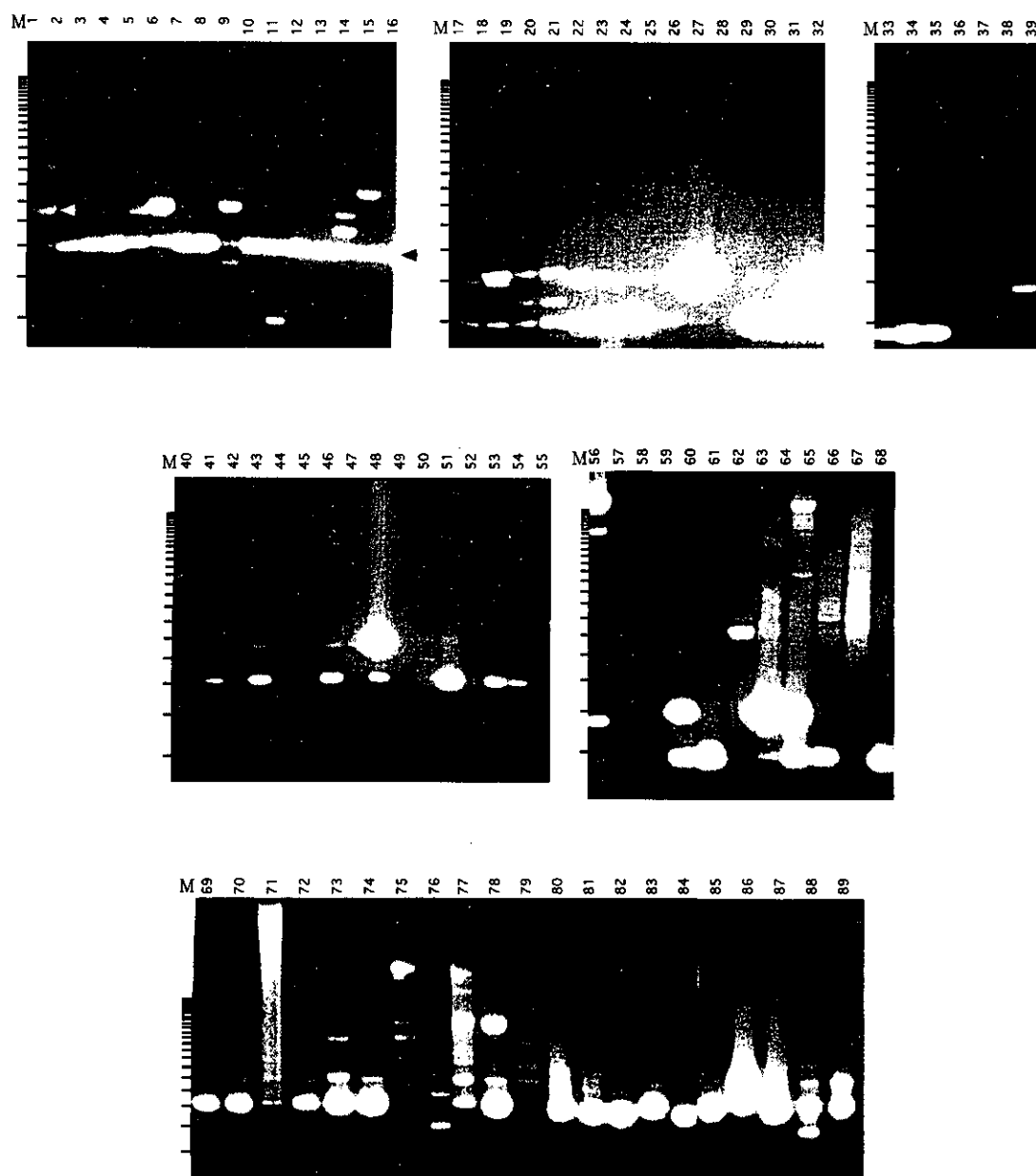


図2 RR ダイズ粒 89 個体から調製した核 DNA をテンプレートとして 35S-cRV と 35S-b プライマーの組み合わせで PCR を行い、この反応液を希釈してさらに 35S-cRV と 35S-y プライマーの組み合わせで nested PCR を行い増幅された DNA 産物。M, 123 bp DNA ラダー・マーカー。

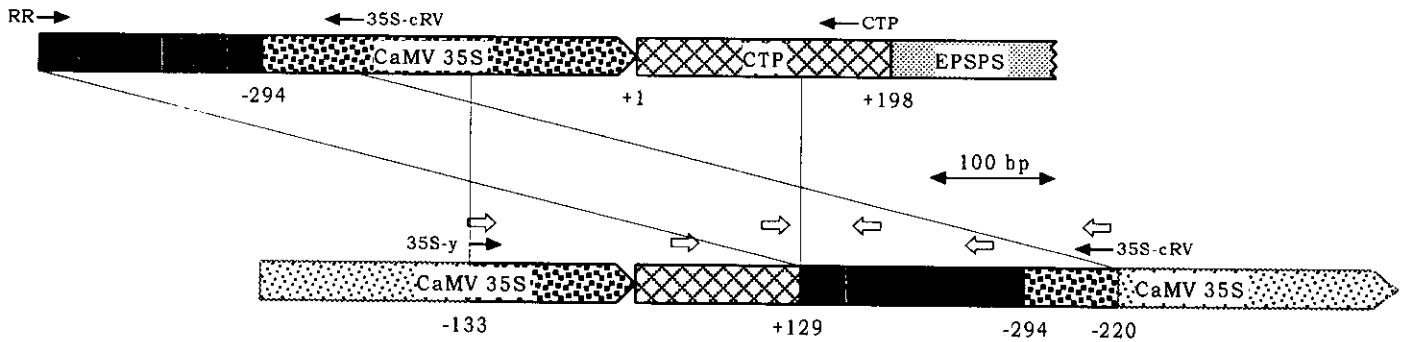


図3 図2の白矢印で示したバンドにコードされていた遺伝子の構造(下)。35S-yおよび35S-cRVのプライマーによって増幅された。RRは図4の実験において用いたプライマー位置。白抜き矢印はダイズ・ゲノム内で重複組換えが生じているかどうかを決定するために用いたプライマーの結合位置。



図4 *epsps* 遺伝子挿入近傍ダイズ核ゲノム DNA 領域の塩基配列をもとに作成したプライマー(RR)と35S-cRVプライマーを用いてPCRを行い増幅されたDNA産物。G, GMOダイズDNA; N, 非GMOダイズDNA; 123M, 123bp DNAラダー・マーカー。矢印で示したバンドがGMOダイズ特異的に検出されたバンドにあたる。

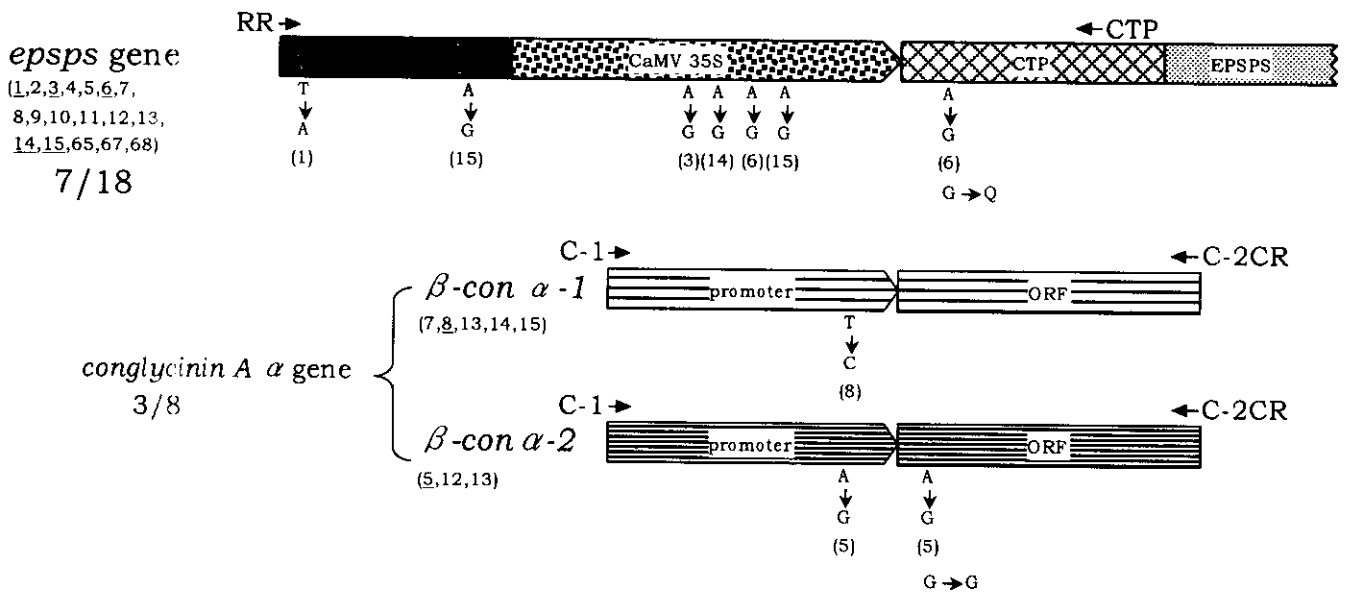


図5 *epsps* 遺伝子およびその近傍配列と α 型 β -コングルシニン サブユニット(β -con α) 遺伝子に見られた点突然変異。各々の領域を増幅するプライマー対としてRR \leftrightarrow CTPおよびC1 \leftrightarrow C-2CRを用いた。カッコ内の番号は個体番号。下向きの矢印で示した部分において塩基配列の置換が見られた。

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）

後代交配種等の安全性に関する研究（2）

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

昨年度、輸入ダイズに含まれていた遺伝子組換えダイズについて ELISA 法により EPSPS タンパク質の発現を調査することで、後代における導入遺伝子の発現の安定性を検討したところ、PCR により *epsps* 遺伝子が検出されても、ELISA により EPSPS タンパク質が検出されない個体が見つかり、この個体では導入されている *epsps* 遺伝子の末端部分が欠損していることを明らかにした。また、引き続き同様の調査を行ったところ、新たに発現タンパク質が検出されない個体が確認された。本年度は、この個体の導入遺伝子の解析を行ったところ、数ヶ所の塩基置換を確認した。これらの塩基置換が直接タンパク質が発現しない原因である可能性は低く、さらに詳細な検討が必要である。さらに、*epsps* 遺伝子と同時に導入されている *nptII* 遺伝子の発現を調べるための NPTII タンパク質に対する抗体の調製を行った。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀（青森大学工学部）

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、食品衛生法および JAS 法の下に遺伝子組換えの表示が義務付けられたことにより、厚生労働省および農林水産省が、それぞれ検知の公定法を定めるに至った。我々は、公定法を踏まえた方法で、これまでに、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を用いて PCR による遺伝子の検知と、ELISA による発現タンパク質の検知を同じ個体に対して行い、後代における導入遺伝子のタンパク質レベルでの安定性を調査した。昨年度、導入遺伝子に変化が生じタンパク質の発現が認められないダイズ個体について報告したが、本年度は、新たに見つかったタンパク質の発現が認められない個体について、導入されている *epsps* 遺伝子の解析を行った。また、*epsps* 遺伝子と同時に導入されている *nptII* 遺伝子についても発現の有無を

調べるために、*nptII* 遺伝子を発現ベクターに組み込み大量発現させ、得られた発現タンパク質をもとに抗体調製を行った。

B. 研究方法

<試料>

輸入ダイズは、検疫所においてモニタリング用に採取されたものを用いた。

<方法>

ダイズからの DNA 抽出

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、0.2μM 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。

PCR のプライマーとしては、Yamaguchi et

al. (2000)に報告されている検知用のプライマーの他に、35S プロモーターと NOS ターミネーターをそれぞれ増幅するプライマーおよび EPSPS の内部を増幅するプライマーを用いた (図 1)。

電気泳動

PCR 反応液 5 μ l 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。

PCR 増幅産物のクローニングとシークエンス

PCR による増幅産物のクローニングは、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた。クローニングした PCR 産物のシークエンスは、オートシークエンサー(Gene Rapid, アマシャムファルマシアバイオテック (株)、東京)を用いて行った。

ELISA 法によるタンパク質の検出

Strategic Diagnostics Inc. (Newark, DE, USA)製を用いた。

nptII 遺伝子の発現ベクターへの導入 (図 2)

クローニングベクター pBI121 をテンプレートとして、*nptII* 遺伝子全長を増幅するように新たに設計したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 増幅産物は、TOPO TA Cloning Kit を用いてクローニングを行った。挿入方向を制限酵素処理により確認し、正方向に挿入されたプラスミドより NdeI 及び XhoI を用いて *nptII* 遺伝子を切り出した。また、pET14b ベクターを同じ制限酵素処理により開環した。両者をライゲーションし、T7 RNA ポリメラーゼを保持する大腸菌に導入し、IPTG を用いて NPTII タンパク質の発現を誘導した。誘導したタンパク質は、His-Tag を利用して Ni²⁺キレートカラムを用いて精製した。精製タンパク質より thrombin を用いて His-Tag を除去したものを最終精製物とし、タカラバイオ株式会社に抗体の作製を依頼した。

C. 結果・考察

C.1. 発現タンパク質が検出されない遺伝子組換えダイズの導入遺伝子の解析

昨年度新たに確認された ELISA により発現タンパク質が検出されなかった遺伝子組換え個体について、PCR により欠損部位の有無を調べたが、PCR で増幅した断片は、全ての領域で予想されるサイズの断片が確認された。そこで、それぞれの増幅断片をクローニングし塩基配列の決定を行ったところ、プロモーター領域において 2 ケ所の塩基置換 (図 3)、*epsps* 遺伝子の終止コドン近傍において 1 ケ所 (図 4) の塩基置換が確認された。これら塩基置換がタンパク質の発現に影響するかはさらに詳細な調査が必要であり、現在 RT-PCR 法により mRNA への転写が起こっているかを検討している。

C.2. *nptII* 遺伝子の発現ベクターへの導入

pBI121 をテンプレートとし、PCR により *nptII* 遺伝子の増幅を行った。増幅に用いた 5'側のプライマー上に付加した NdeI のサイトとベクター上の XhoI サイトを用いて *nptII* 遺伝子を切り出し、発現ベクター pET14b の NdeI-XhoI サイトに組込んだ。構築したプラスミドのクローニングサイト周辺の塩基配列を決定したところ、設計通りのフレームになっていることが確認された (図 5)。構築したプラスミドを T7 RNA ポリメラーゼをゲノムに保持している大腸菌 BL21(DE3)株に導入し、IPTG による発現誘導 (0.4mM、2 時間) を行ったところ、SDS-PAGE により 31kD の発現タンパク質が確認された。このタンパク質を N 末端側に付加した His-Tag を利用して、Ni²⁺をキレートしたカラムに吸着させ、60mM のイミダゾールを含むバッファーで溶出し、精製タンパク質とした (図 6 a)。精製タンパク質から Thrombin を用いて His-Tag を切り離し、His-Tag フリーの精製タンパク質を得た (図 6 b)。次に、この精製タンパク質を用いて抗体を作製した (タカラバイオ株式会社)。現在、得られた抗体の抗原である NPTII タンパク質に対する特異性を調べており、さらに NPTII タンパク質の発現を調べる ELISA の構築を行う予定である。

D. 研究発表

(学会発表)

佐々木和生、寺島多恵子、安達秀雄、梅津博紀、小関良宏、鎌田博「遺伝子組換えダイズにおける導入遺伝子の変化について」日本食品化学学会第8回学術大会、兵庫、2002年6月.

(論文発表)

H. Yamaguchi, K. Sasaki, H. Umetsu and H. Kamada, "Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan", Food Control, 14(3); 201-206 (2003).

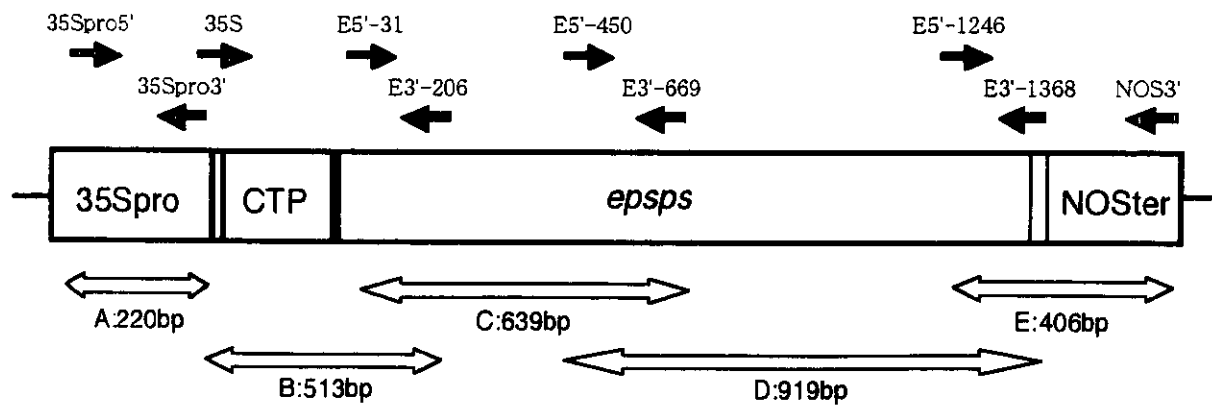


図1 PCR に用いたプライマーサイトと増幅断片のサイズ

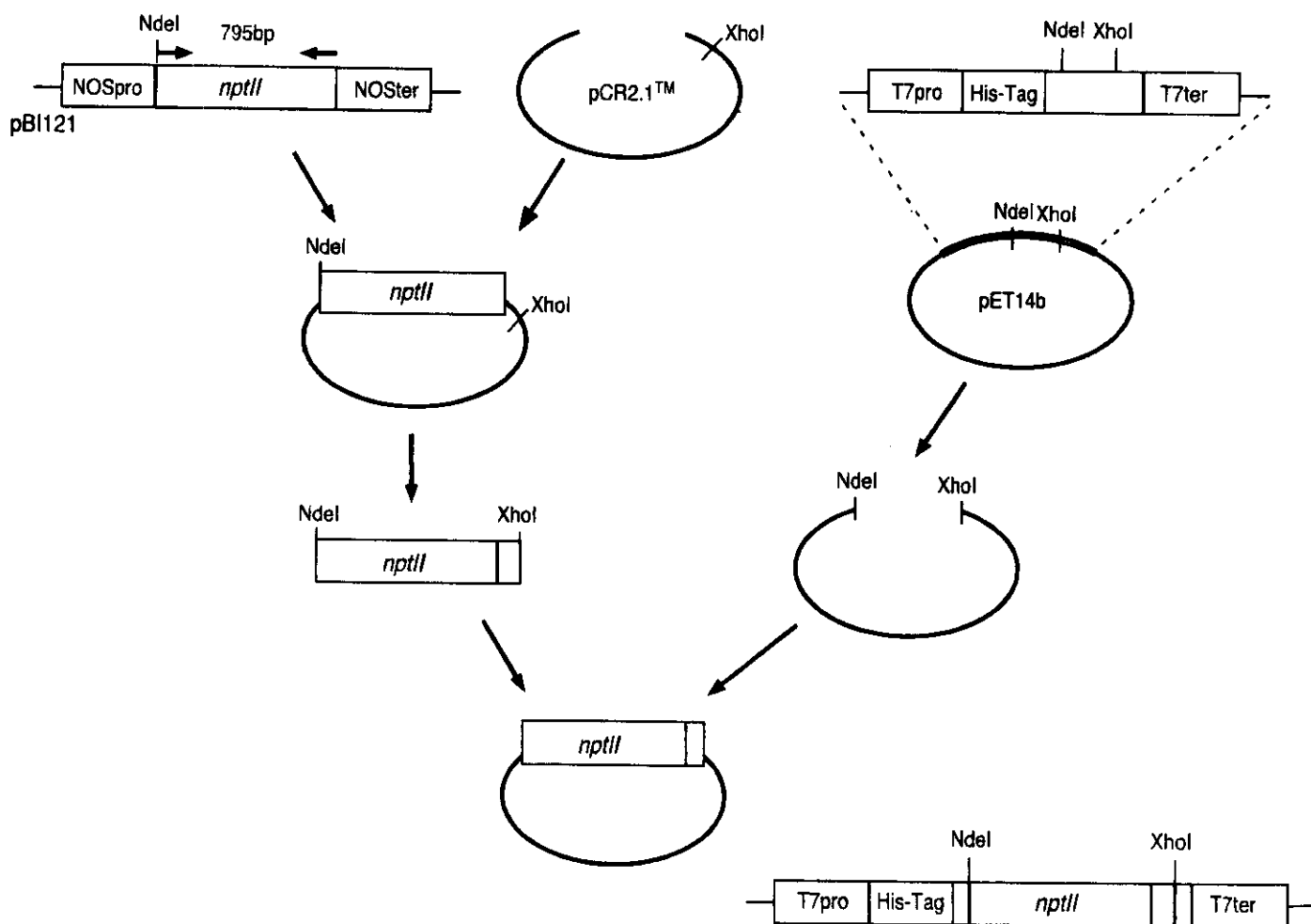


図2 *nptII*遺伝子のクローニングと発現ベクターへの導入方法の概略

CACTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCG⁴⁰
 (T)⁸⁰
 TTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACC
 (C)¹²⁰
 CCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
¹⁶⁰
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCA
²⁰⁰
 CTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA
AGACCCTTCCTCTATATAAG

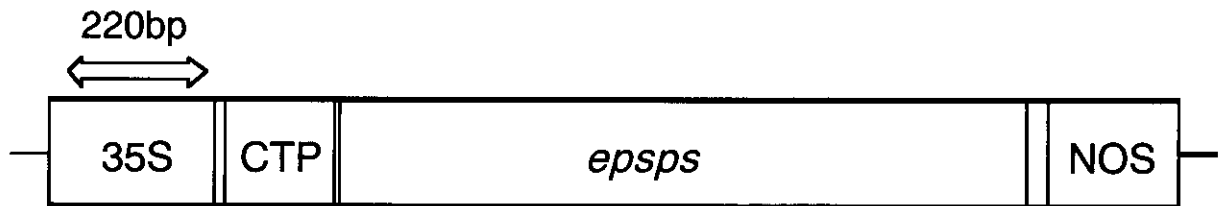


図3 35S プロモーター領域 (図1A) の塩基配列
 () はデータベースに登録されている配列
 下線は PCR に用いたプライマーサイト (図1 : 35Spro5', 35Spro3')

GAGACGGATGCGGACGGCGTGCGCACCATCCGCCTGGAAGGCCGCGGCAAGCTCACCGGCCAAGTCATCG⁷⁰
 ACGTGCCGGGGCACCCTCCTCGACGGCCTTCCCGCTGGTTGCGGCCCTGCTTGTTCCGGGCTCCGACGT¹⁴⁰
 CACCATCCTCAACGTGCTGATGAACCCACCCGCACCGGCCTCATCCTGACGCTGCAGGAAATGGGCGCC²¹⁰
 GACATCGAAGTCATCAACCCGCGCCTTGCCGGCGGGGAAGACGTGGCGGACCTGCGCGTTCGCTCCTCCA²⁸⁰
 CGCTGAAGGGCGTCACGGTGCCGGAAGACCGCGCGCCTTCGATGATCGACGAATATCCGATTCTCGCTGT³⁵⁰
 CGCCGCCGCTTCGCGGAAGGGGGCACCCTGATGAACGGTCTGGAAGAACTCCGCGTCAAGGAAAGCGAC⁴²⁰
 CGCCTCTCGGCCGTGCCAATGGCCTCAAGCTCAATGGCGTGGATTGCGATGAGGGCGAGACGTCGCTCG⁴⁹⁰
 TCGTGCGTGGCCGCCCTGACGGCAAGGGGCTCGGCAACGCCTCGGGCGCCGCGTCCGCCACCCATCTCGA⁵⁶⁰
 TCACCGCATGCCATGAGCTTCCTCGTCATGGGCCTCGTGTGCGAAAACCCTGTACGGTGGACGATGCC⁶³⁰
 ACGATGATCGCCACGAGCTTCCGGAGTTCATGGACCTGATGGCCGAGCTGGGCGCGAAGATCGAACTCT⁷⁰⁰
 CCGATACGAAGGCTGCCTGA
 (T)

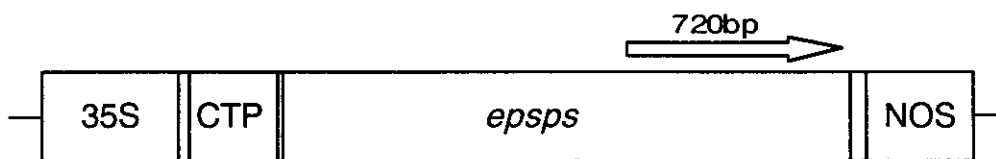


図4 *epsps* 遺伝子の終止コドンまでの 720bp (図 1 D の一部) の塩基配列
 () はデータベースに登録されている配列
 下線は PCR に用いたプライマーサイト (図 1 : E3'-1368)

ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGC

NcoI

His-Tag

CATATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTA

NdeI

⋮
⋮
⋮
⋮
⋮

CTTGACGAGTTCTTCTGAAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCG

Stop codon

XhoI

AGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGC

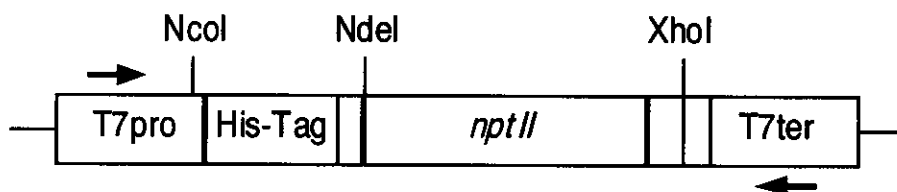


図5 構築したプラスミドのクローニングサイト周辺の塩基配列
nptII の構造遺伝子の配列は省略してある
矢印は塩基配列の決定に用いたプライマーサイトを示してある

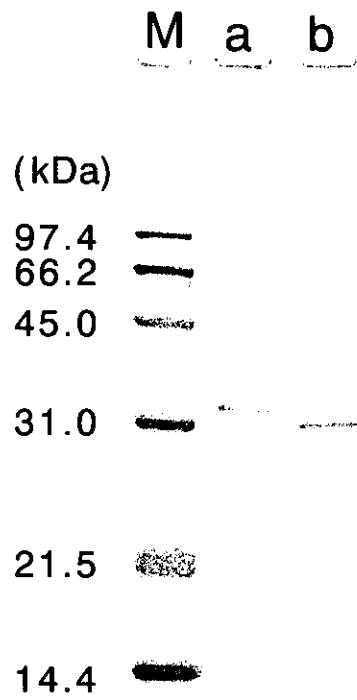


図6 *nptII* 遺伝子の発現産物の SDS-PAGE による分離
 a: Ni^{2+} キレートカラムにより精製した発現産物
 b: 精製タンパク質を thrombin で処理し His-Tag を切り離した発現産物
 M: 分子量マーカー

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）

後代交配種等の安全性に関する研究（3）

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

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レポーター遺伝子（GUS）を導入し、その発現安定性の検討を開始した。昨年度までに確立した方法でジャガイモは *Agrobacterium tumefaciens*, サツマイモは *A. rhizogenes* を利用して形質転換をおこなった。ジャガイモの形質転換体は生育が思わしくなかったが、サツマイモは毛状根を利用して GUS 遺伝子の発現を検討したところ、毛状根の誘導直後は個体ごと、実験ごとに発現量が大きく異なった。現在培養を継続中である。

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押さえられたり、またストレス等により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押さえら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さ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検討するため、昨年度遺伝子導入系をつくったジャガイモ、サツマイモについて、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ものである。

B. 研究方法

<試料>

昨年度に引き続き、ジャガイモは形質転換効率が高いと報告されたメークインを、サツマイモは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。導入するレポーター遺伝子は β -グルクロニダーゼ遺伝子（GUS）を採用した。

<方法>

ジャガイモについては *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を葉切片に感染させ、レポーター遺伝子（GUS）（図 1-1）が組み込まれた形質転換体を葉切片から再分化させて、これらを試験管内で無菌的に培養した。

サツマイモは再分化が困難であったため、*Agrobacterium rhizogenes* を用いた外来遺伝子導入系を採用し、毛状根を誘導する