

際に GUS 遺伝子を導入した。特にサツマイモでは塊根の貯蔵タンパク質であるスポラミンのプロモーター、SD221 (名古屋大学中村教授より分譲していただいた) にレポーターとして GUS 遺伝子を結合 (図 1-3)、これをサツマイモの毛状根に導入して形質転換体を培養し、経時的な発現の検討を開始した。なお、このプロモーターは、糖誘導性であり、GUS 遺伝子の導入された毛状根に対する高糖濃度処理による発現も検討した。

C. 結果

ジャガイモの形質転換体はカナマイシン含有選択培地で3ヶ月かかって再分化させ、その後は選択マーカーとなっているカナマイシンを培地から抜いて培養したが、いずれも生育が思わしくなかった。サツマイモは毛状根を利用して GUS 遺伝子を導入し、その発現を検討したところ、得られた 12 系統の形質転換根のうち 5 系統は野生株と比較して高い GUS 活性が見られ、GUS 遺伝子の発現が確認された。しかし、毛状根の誘導直後は個体ごと、また実験ごとに GUS 遺伝子の発現量が大きく異なった。このため糖濃度を上げてその GUS 遺伝子発現の誘導性は確認できず、現在は遺伝子の発現が安定するまで継代培養を行なっている。

D. 考察

ジャガイモの形質転換体は生育が思わしくなかったため、実験を継続中であるが、サツマイモの毛状根については GUS 遺伝子の誘導発現を今後は糖誘導性のスポラミンのプロモーターである SD221 を結合した GUS 遺伝子を利用して検討してゆく予定である。これまでタバコを用いて検討してきたように普段は大きく発現しないが、特定の条件下で発現する遺伝子 (たとえば熱ショック誘導

性プロモーターを用いた場合、図 1-2) でも発現量が生育期間や植物体の状態で変化すること分っている。本研究により、栄養器官によって繁殖する作物に導入された外来遺伝子でもその発現安定性とその結果として成分変化が見られるかどうか検討できると期待される。

E. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし

1



常時発現

2



熱ショック誘導性

3



高糖濃度誘導性

図1 導入した融合遺伝子の構造

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（４）

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

従来の方法によるウイルス抵抗性植物作出ではコートタンパク質などのウイルス遺伝子が導入されていたが、本研究においてはアブラナ科野菜から植物が持つ有用遺伝子を単離し、新規なウイルス耐性植物の開発を行った。ウイルス抵抗性の検定には、ウイルスゲノムのコートタンパク質遺伝子を GFP マーカー遺伝子に置換したプラスミドを利用して植物細胞に導入し、ウイルスゲノム移行を GFP 蛍光で追跡した。形質転換植物およびその後代株については、導入遺伝子の保持および発現に関する安定性を調査し、抵抗性形質の安定性を評価した。一部の形質転換株において、感染の拡大が抑制されるウイルス抵抗性の形質が見出された。しかし、そのメカニズムについては、ウイルスゲノム移行の抑制かウイルス複製の阻害によるものかは確定できなかった。後代株での形質発現は個体差が大きいことが判明したが、その原因は転写後ジーンサイレンシングやDNAメチル化などの要因による可能性が考えられた。

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

植物ウイルスは植物組織の傷口から侵入して全身に移行して感染を拡大させようとする。一方、植物も各種機能を駆使して感染拡大を阻止しようとする戦略を進化させた。トマトモザイクウイルス（ToMV）等の植物RNAウイルス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、ウイルスゲノム移行による感染拡大に必須であることが知られている。

我々は、新規ウイルス抵抗性植物の開発を目指して、アブラナ科野菜の発現型cDNAライブラリーを利用して、プローブとして用いたToMVの移行タンパク質と相互作用する宿主タンパク質のcDNAをファーウエスタンプロッチング法によりスクリーニングした。その結果、複数のcDNAが単離され、シロイヌナズナのKELPやMBF1

と命名された転写コアクチベーターのホモログが含まれていた。

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と結合して、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た。そこで、相互作用に必要なN末端側を残し、調節機能を有する可能性のあるC末端側を欠損させたドミナントネガティブタイプの変異型KELPを植物で発現させ、過剰の変異型KELPがウイルスのMPと結合してMPの機能阻害をもたらす、ウイルスの感染拡大が抑制され、植物がウイルス耐性になることを期待した。

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遺伝子を導入するなどして、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、限界がある。我々の方法は、人間にとって長年の食経験の

あるアブラナ科の野菜から有用遺伝子を単離して、この遺伝子または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ところに新規性がある。

本研究では、タバコの2品種をモデル植物として、導入遺伝子の発現とウイルス耐性の程度の検討を行った。また、導入遺伝子の後代における発現の安定性についても追跡調査した。

B. 研究方法

1. 形質転換植物の作製

タバコの3品種、*Nicotiana tabacum* cv. SR1, *N. tabacum* cv. Samsun NN および *N. benthamiana* を用い、形質転換作製には pART27 ベクターに目的遺伝子を導入したプラスミドを運ぶ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を使用した。

2. ウイルス抵抗性の検定

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 *in vitro* で合成した RNA の形で導入したり、プラスミド piL.erG3 の形でパーティクルガンでタバコ葉に導入することにより細胞内でのウイルス複製が起こり、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。蛍光を発する細胞群の拡大速度を評価することにより、ウイルスゲノムの移行能を検定することができる。実際には、隣接細胞を含めた複数細胞が蛍光を発する領域と移行が阻害されて単一細胞のみが蛍光を発する領域を数えてその割合で評価した(図1)。これらの方法以外に、野生型のウイルス粒子を感染させて、葉における壊死斑のサイズを調べ、ウイルス感染拡大の評価を行った。

3. 形質転換植物後代での発現安定性

目的遺伝子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に、RT-PCR および抗 KELP 抗体を用いたウエスタ

ンブロット法で調査した。

C. 結果と考察

1. BcKELPdC のタバコへの導入

スクリーニングで単離した cDNA (BcKELP) の C 末端側に欠失変異を導入して作製した BcKELPdC は、MP 結合能を持つ N 末端側半分のタンパク質を発現させるために用いられた。BcKELPdC の発現プラスミドを *Agrobacterium* に導入し、タバコに感染させて形質転換株を得た。*N. tabacum* cv. SR1 では、4 系統の過剰発現株と 2 系統の発現量の低い株が見つかり、それらの後代系統を育てた。さらに *N. tabacum* cv. Samsun NN では 50 系統、*N. benthamiana* では 27 系統の形質転換株を得た。

2. *N. tabacum* cv. SR1 形質転換株でのウイルス抵抗性

T7 ポリメラーゼを用いて *in vitro* で合成した RNA を導入してウイルス抵抗性を検定した。形質転換株 SR1-101T および SR1-103T の次世代株を用いた実験では、7 個体でウイルスゲノム移行の阻害が観察されたが、10 個体で非形質転換株との差が見られなかった。また、導入遺伝子が検出されなくなった 3 個体においても移行阻害傾向が見られたことから、統計的有意差を出すにはさらに多数の個体について調べる必要が生じた。

3. *N. tabacum* cv. Samsun NN 形質転換株でのウイルス抵抗性

4 系統の形質転換株とそれらを組織培養して得られた再生個体を用いて、ウイルス粒子感染法による抵抗性の検定を行った。その結果、これらの形質転換株と非形質転換株では壊死斑サイズには顕著な差は認められず、最もサイズの小さかった形質転換株もその次世代では逆にサイズが大きくなった。また、ウエスタンブロット法により推定された BcKELPdC の発現量とウイルス抵抗性の程度には相関が得られなかった。

4. *N. benthamiana* 形質転換株でのウイ

ルス抵抗性

7系統の形質転換株の葉にパーティクルガン法によりプラスミド piLerG3 を導入し、ウイルスゲノム移行のマーカである GFP の蛍光の拡がりを観察し、隣接細胞に移行しない1細胞型と周辺細胞に移行して GFP が複数細胞に広がる複数型の割合を調べた。図2に示すように、複数型の数を複数型と1細胞型の合計で割った比の値は、B-1, B-2, B-3, B-8, B-11, B-12 株については非形質転換株と顕著な差はなかったが、B-6 株では低かった(図2A)。また、複数型と1細胞型の総数を比較すると、個体間の差は大きいですが、B-6 株は顕著に少なかった(図2B)。この結果より、B-6 株の BcKELPdC 発現量は中程度であったが、この株ではウイルス複製またはウイルスタンパク質の発現が抑制されている可能性があると考えられ、B-6 の次世代株の解析が緊急の課題となった。

D. 研究発表

(論文発表)

1. Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M., Nyunoya, H. Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *Journal of Experimental Botany* 53: 1531-1532 (2002)
2. Matsushita, Y., Yoshioka, K., Shigyo, T., Takahashi, H., Nyunoya, H. Phosphorylation of the movement protein of Cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Virus Genes* 24: 231-234 (2002)
3. Matsushita, Y., Suzuki, T., Kubota, R., Mori, M., Shimosato, H., Watanabe, M., Kayano, T., Nishio, T., Nyunoya, H. Isolation of a cDNA for a nucleoside diphosphate kinase capable of phosphorylating the kinase domain of the self-incompatibility factor SRK of *Brassica campestris*. *Journal of*

Experimental Botany 53: 765-767 (2002)

4. Matsushita, Y., Ohshima, M., Yoshioka, K., Nishiguchi, M., Nyunoya, H. The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates *in vitro* the movement protein of Tomato mosaic virus. *Journal of General Virology* 84: 497-505 (2003)

(学会発表)

1. 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遺伝子産物 N と相互作用する 14-3-3 タンパク質の各種アイソフォームの同定, 日本植物病理学会大会, オオサカサンパレス, 2002 年 4 月
2. 内山徹・吉岡邦晃・松下保彦・丹生谷博・高橋英樹・長谷修・江原淑夫：キュウリモザイクウイルス外被タンパク質と特異的に結合するプロテインキナーゼの病徴発現における役割, 日本植物病理学会大会, オオサカサンパレス, 2002 年 4 月
3. 高橋英樹・内山徹・吉岡邦晃・松下保彦・丹生谷博・長谷修・池上正人：キュウリモザイクウイルス外被タンパク質と特異的に結合するプロテインキナーゼの過敏感反応における役割, 日本植物病理学会東北部会, 盛岡, 2002 年 9 月
4. 永井晶子・出口雅一・滝沢香・森寿弘・玉井淳史・飯哲夫・西口正通・松下保彦・丹生谷博：GFP 遺伝子を利用した ToMV 移行蛋白質と宿主因子の相互作用の解析, 日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2002 年 12 月
5. 小路唯以・岡野陽介・林尚美・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遺伝子 N の類似遺伝子の cDNA 単離と選択的スプライシングの解析, 日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2002 年 12 月

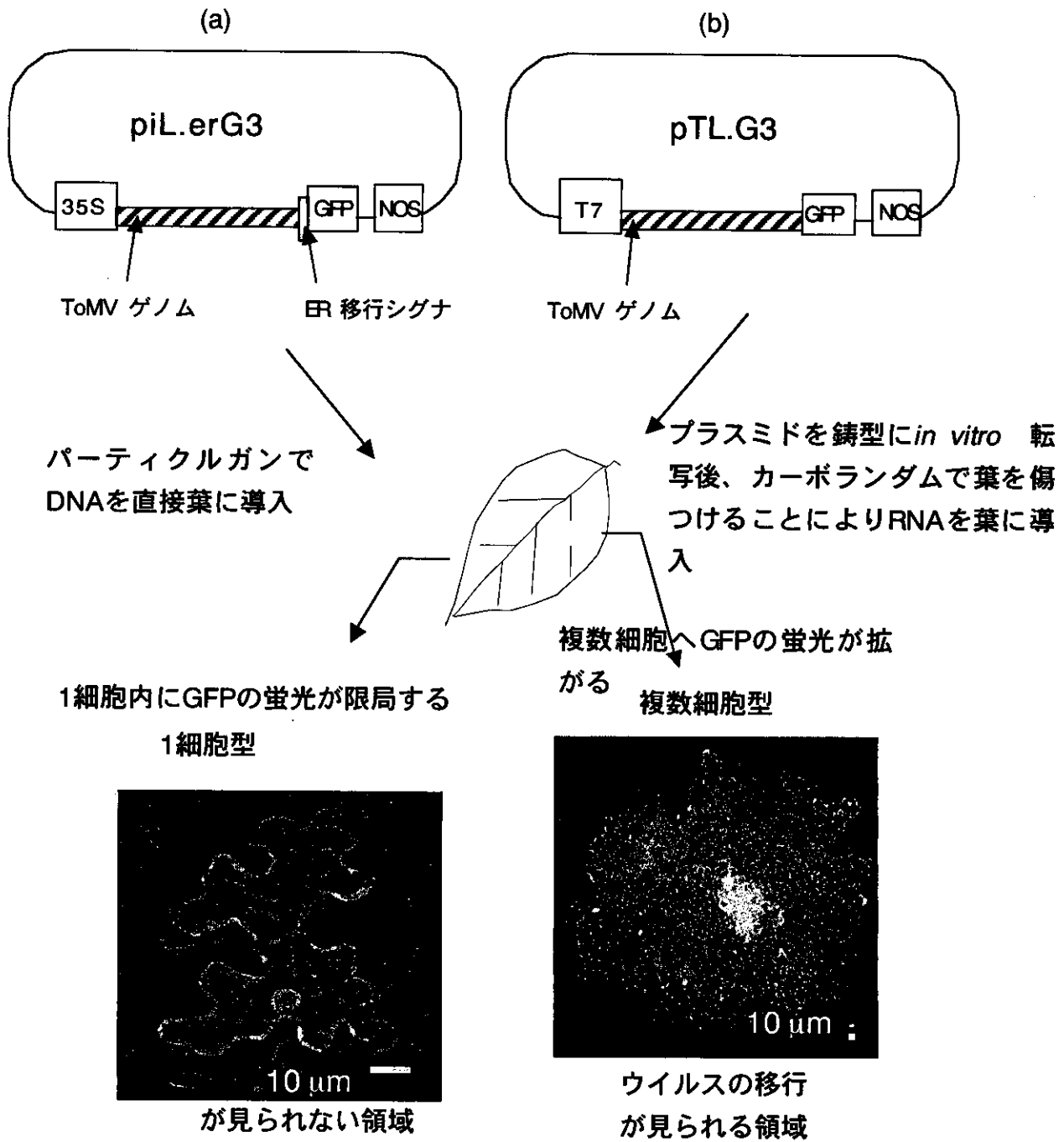


図1 GFPマーカーを利用したウイルス抵抗性検定

piL.erG3のDNAをパーティクルガンにより導入する方法または(b) pTL.G3を鋳型とする *in vitro* 転写産物を形質転換植物の葉組織に傷をつけて導入する方法により、細胞内で増殖するウイルス感染の拡大をGFPの蛍光の拡がりとして観察した。

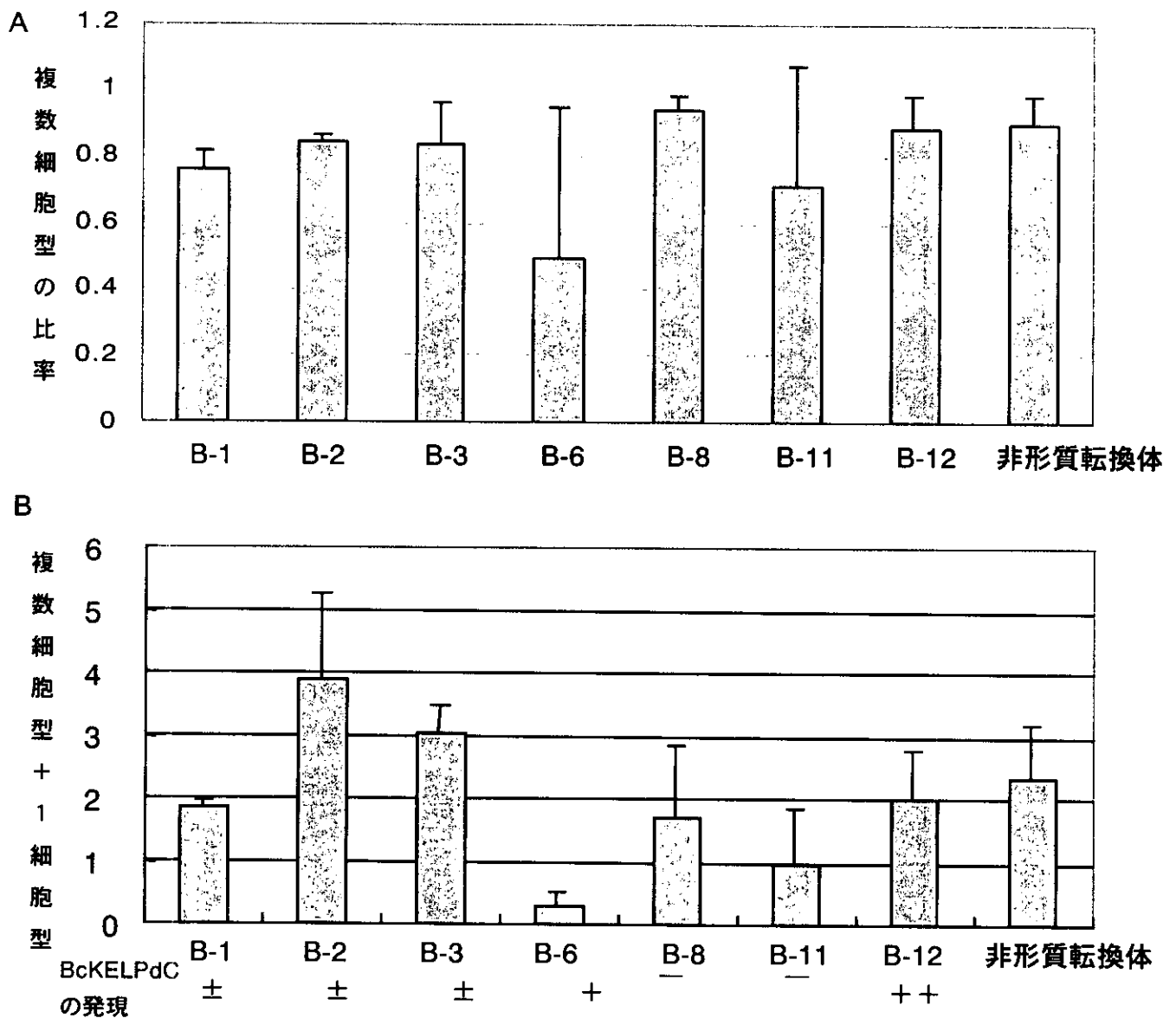


図 2 *N. benthamiana*を用いたBcKELPdC形質転換体でのウイルス抵抗性検定
 形質転換体および非形質転換体にpiL.erG3を導入し、2日後に蛍光顕微鏡で複数細胞型と1細胞型の数を数えた。縦軸に複数細胞型と1細胞型の合計に占める複数細胞型の割合 (A) または、複数細胞型と1細胞型の合計 (B) を示した。BcKELPdCの発現量は+, -および±で示した。

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（5）

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

これまでに微生物において開発・適用されてきた遺伝子組換え法について調査し、その結果として作出された微生物の塩基配列と自然突然変異もしくは人為突然変異によって作出された微生物の塩基配列と比較検討した。これによって、遺伝子組換えによって作出された微生物の塩基配列が、自然突然変異もしくは人為突然変異によっても作出されるケースがあり、このような場合、遺伝子組換えによって作出された微生物のリスクは自然突然変異もしくは人為突然変異によって作出された微生物のリスクと同等と見なし得ると考えられた。

A. 研究目的

現在、遺伝子組換え食品添加物はその安全性審査が義務付けられ、安全性に問題が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。特に、微生物を用いた生産において、自然突然変異によって生産量が高くなった、あるいは毒性物質やアレルゲン物質などの生産が低下・消失した微生物を自然界から探索するのみならず、突然変異原を用いて人為突然変異を起こし、その中から生産量が高くなった、あるいは毒性物質やアレルゲン物質などの生産が低下・消失した微生物を探し出す、という育種方法が、従来から用いられてきた。このような自然突然変異もしくは人為突然変異によって得られた微生物の安全性については、製造者が行うこと、万一、突然変異によって得られた微生物を用いて生産を行なおうとしたところ、毒性物質やアレルゲン物質などの生産が起こる、というリスクが発生した場合には、このリスクについて製造者が精査・管理することが求められた。

現在、1970年代から爆発的に進歩した遺伝子組換え技術は、微生物の遺伝子組換え技術を著しく進歩させた。すでにこの技術は実用化され、遺伝子組換え微生物を用いた食品添加物等の利用が行われている。日本におい

ては平成13年4月より、遺伝子組換え微生物を用いた食品添加物を利用しようとする場合、この遺伝子組換え微生物の安全性評価が義務化されている。その安全性審査において導入する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ゲン性のないことが審査され、安全性が確認されている。しかし、現在の審査基準において、遺伝子組換え微生物がセルフクローニングもしくはナチュラルオカレンスに相当する場合には、育種途中において遺伝子組換え技術が用いられたとしても、結果として生じた遺伝子組換え微生物について、天然に起こり得ること、天然に存在する可能性があることから、そのような場合には審査の対象とならないことになっている。しかし、当面の間は、組換えDNA技術を応用した食品及び添加物がセルフクローニング及びナチュラルオカレンスに該当するか否かについては、個別事例毎に厚生省（現厚生労働省）が判断することとされている¹⁾。

セルフクローニングとは、一般的には、DNA供与体として用いられる生物が、宿主として用いられる生物と分類学上同一の種に属する場合を指す。「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」においては、宿主、ベクター及び挿入DNAの供与体が同一の

種に属する場合と規定している。また、ナチュラルオカレンスは、組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合としている。しかし、これらの定義は厳密なものではなく、異なる解釈を招く原因ともなっている。

遺伝子組換えによって作成された微生物において、結果として作成された微生物の塩基配列が天然に起こり得る、天然に存在すると考えられる形（ナチュラルオカレンス）になるのは以下のようなカテゴリーに分けられる^{2), 3)}。

I. 突然変異

もともと微生物が有していた塩基配列の数 bp 以内の範囲で生じる突然変異（染色体 DNA およびプラスミド DNA の両方を含む）

I-1. 点突然変異

もともとその微生物が有していた DNA 断片の一カ所に 1 bp の塩基置換、すなわち点突然変異による塩基置換が生じた塩基配列となるもの（DNA 複製時における複製ミスなどによって生じる）

I-2. 挿入

もともとその微生物が有していた DNA 断片の一カ所に 1～3 bp 以下の挿入が生じた塩基配列となるもの（エチジウムブロミド、アクリジン色素などの挿入剤によって引き起こされる）

I-3. 欠失

もともとその微生物が有していた DNA 断片の一カ所に 1～3 bp 以下の欠失が生じた塩基配列となるもの。（もっとも簡単な例として熱処理による欠失があげられる）

I-4. 塩基配列逆位（染色体レベルで生じるものと区別するために塩基配列逆位と呼ぶ）

もともとその微生物が有していた DNA 断片の一カ所が 2～3 bp 以下の範囲で塩基配列の逆転が生じた塩基配列となるもの。

I-5. 上記 I-1. から I-4. にわたる突然

変異と同等に見なされる変異は注目している遺伝子のみならず、染色体上のすべての塩基配列上において複数箇所ですでに生じることは起こりえる。

II. 組換え

相同組換えおよび非相同組換え（変則的組換え）および可動性遺伝因子（トランスポゾン、挿入因子など）の転移によって起こる遺伝的変異

II-1. 相同組換えによって、高い相同性が見られる DNA 塩基配列を有した遺伝子領域が染色体ゲノム内のみならず、染色体ゲノムと染色体外ゲノム（プラスミド）との間で入れ変わることが生じる。前者の場合、遺伝子の重複あるいは欠失などのコピー数の変化が起こることがある。また後者の場合、染色体外プラスミドの DNA 配列が染色体ゲノム内に組み込まれること、あるいはその逆が生じることがある。

II-2. 非相同性組換え（変則的組換え）によって、もともとのプロモーター・コーディング領域（オープンリーディングフレーム（ORF））・ターミネーターの各パーツが別種の遺伝子間で組み変わることが天然に起こる可能性は否定できない。さらに、ORF において、ある遺伝子 ORF に別種もしくは機能の類似した遺伝子 ORF が非相同的組換えによって結合したキメラ遺伝子 ORF が生じることは否定できない。

II-3. 可動性遺伝因子の挿入によって数百 bp をこえる塩基配列の挿入が天然において起こっている。また非相同性組換えによっても同様なことが天然において起きている。しかもその挿入位置は、部位特異的相同組換えの場合を除き、ランダムであり、染色体のどこに挿入されるか予想できない

II-4. 可動性遺伝因子の脱離等の際に、挿入されていた場所から 2 bp から数百 bp 程度の欠失が天然において起こり得る。さらに染色体のリアレンジメントの場合においては数百 bp を越え

る欠失が天然において起こっている。

II-5. 上記 II-1. から II-4. にわたる突然変異と同等に見なされる変異は注目している遺伝子のみならず、染色体上のすべての塩基配列上において複数箇所で見られることは天然に起こりえる。

III. 属・種を越えて DNA の交換・伝搬が報告されている微生物間においては染色体ゲノムのみならず染色体外ゲノム（プラスミド等）の属・種を越えた DNA 断片の組換え、挿入が天然において起こっている。

これらの事実を考えたとき、添加物等の製造に利用される遺伝子組換え微生物の作出において用いられている方法について調査・評価を行った。

B. 研究方法

微生物における遺伝子組換え法について、文献調査ならびに公開特許公報等の情報を用いて調査・評価を行った。

C. 結果

C. 1. 染色体外ゲノム（プラスミド）を用いた方法

染色体外環状ゲノムであるプラスミドは古くから実験上利用され、またこれにヒトのホルモン遺伝子を組み込んで大腸菌に導入し、1979 年に人工合成した DNA を用いてホルモン合成に成功させた研究において日本人研究者が活躍しており⁴⁾、以来、タンパク質やペプチドホルモンの生産に古くから用いられてきており、医薬品としての効果ならびに安全性評価がなされたものについて、すでに製品化され、実用化されている。そこで用いられているプラスミドの塩基配列は、そのほとんどの部分はもともと大腸菌が有していた ColE1 因子などのプラスミドを人工的に制限酵素で切断し再結合して改変されてきたものである。これらプラスミド DNA 自体はもともと大腸菌が有していたものであり、ヒトの大腸内にも存在するわけであるから、プラスミド DNA 自体の安全性自体についての問題はほとんどない。しかし、それだけでは発現性ベクターとして遺伝子プロ

モーターや遺伝子 ORF の DNA をクローニングするために利用できる制限酵素部位が少ないため、pUC 系プラスミドに代表される特定の部分にそのプラスミドを一カ所のみで切断する制限酵素部位を集めたポリリンカー（マルチクローニングサイト）が人為的に導入され、遺伝子操作しやすいベクターがプラスミドとして開発されている⁵⁾。さらに発現性ベクターにおいては、大腸菌の中の遺伝子の中で非常に強いプロモーターを切り出し、そのマルチクローニングサイトの直上に組み込み、マルチクローニングサイトに遺伝子 ORF の DNA 断片を制限酵素で切断して導入できるようにしてあり、すぐに高発現性を得ることがすでに実用化されており、遺伝子組換え技術を用いた医薬品生産において用いられてきた長い歴史がある。また、世界で最初に食品添加物として大腸菌プラスミド・ベクター上に遺伝子導入したキモシン遺伝子によって生産された遺伝子組換えキモシンについて、その安全性について解析されており⁶⁾、さらに日本においても安全性審査がなされ、大腸菌プラスミドを用いたキモシン遺伝子によるキモシンの製造上の安全性について認められている⁷⁾。このような生産に使いやすいプラスミドの人為的構築は大腸菌のみならず、酵母、枯草菌、放線菌などにおいても同様に古くから多種類開発されてきており、実用化されている。すでに枯草菌において古くから開発されて広く用いられている pUB110⁸⁾ 由来のプラスミドに導入した α -アミラーゼ遺伝子によって生産された遺伝子組換え α -アミラーゼについて、その安全性は動物実験において証明されており^{9), 10)}、この pUB110 を用いて、染色体外プラスミドとしてではなく、枯草菌ゲノム中に挿入されたものについて、日本において安全性審査がなされ、 α -アミラーゼ遺伝子ともども枯草菌プラスミドの安全性が確認されている¹¹⁾。このような事例から、各種微生物が有しているプラスミドを人為的に改変して使いやすくしたプラスミドについて、そこで構築されたプラスミドが異種生物からの遺伝子 DNA を含んでいない場合には、セ

ルフクローニングと見なせると考えられ、その安全性は非組換え体と同等であると考えられる。ただし、上記の遺伝子組換えキモシン及び遺伝子組換え α -アミラーゼについては、各々のプラスミドを保持できる宿主微生物内での生産という意味において、プラスミドの安全性に問題はなく、それら導入したキモシンもしくは α -アミラーゼ遺伝子が別種の生物種の遺伝子 DNA であり、しかも遺伝子交換した報告がないため、安全性評価審査がなされた¹⁴⁾。

以上を整理すると；

- 1) これらプラスミドはもともとの生物種から得られたものを断片化および再結合によって構築されていること。このためにセルフクローニングと考えられており、安全性上の問題はないと考えられ、事実、これまでの長年の研究・生産実績からも認められている。
- 2) プラスミド・ベクターとしての改良について、1970年代後半からすでに精力的に行われてきており、その中において、最初に行われたのは、導入しようとしている遺伝子のプロモーター、ORF、ターミネーターのパーツを組み合わせるために必要とされる制限酵素認識部位の配列を人為的に合成したポリリンカーとして導入すること（マルチクローニングサイトを作ること）である。この開発の中でも、メッシングらによって開発された pUC プラスミド・シリーズはその代表例であり⁵⁾、現在使われている大腸菌プラスミドの多くは、これから派生している。すでにこの pUC プラスミドを源流とするプラスミドは医薬品生産において、従前からすでに用いられてきた歴史がある。従って、そのポリリンカーにプロモーター活性を増強させる、あるいは新たなアミノ酸配列を結果として付加させることになるなどの新たな機能を付与するものでなく、もっぱら制限酵素による切断と再結合のための「のりしろ」であるならば、安全性に問題を生じる可能性はないと考えられる。

- 3) 上記のマルチクローニングサイトを利用して、同種の生物の別の遺伝子プロモーター、別の遺伝子 ORF、別の遺伝子ターミネーターが組換えられたものについてはセルフクローニングであり、安全性が認められること。

さらに上記3点について、大腸菌以外の酵母、枯草菌、放線菌などのベクター系においても、DNA 供与体が同種である場合には、セルフクローニングと考えられる。しかし、例えば酵母と大腸菌の双方で複製可能な大腸菌と酵母の複製開始点の配列を有するシャトル・ベクターなどについては、ある生物種でのみ増殖する複製開始点を有したプラスミドに、別種の生物種から複製開始点の塩基配列をクローニングして組み込むことによって人為的に作成されたものであり、天然には生じることはないので、このようなベクターはセルフクローニングによって構築されたものとは考えられない。また、たとえば酵母のベクターでありながら、選抜マーカーとして大腸菌の抗生物質耐性遺伝子を組み込んだベクターなど、ある生物種のプラスミドに別種の生物種の抗生物質耐性遺伝子や栄養要求性を相補するための遺伝子を組み込んだものについても、別種の生物種からこれらの遺伝子をクローニングして人為的に組み込まなければ構築できないので、セルフクローニングとは考えられない。

また、食品・食品添加物という視点から見た時、遺伝子組換え農作物においては可食部が植物体の一部の組織・器官に限定されている、例えばトウモロコシなら穀粒のみであり、このため、遺伝子組換え農作物の作出においては、器官特異的発現プロモーターの利用が行われており、農作物のどの組織・器官で導入された遺伝子が発現しているのかを含めて安全性評価が必要とされている。これに対し、微生物を用いた食品・食品添加物の生産においては、微生物全体を食する、あるいは微生物全体から抽出・精製を行う、ということであり、そこにおけるプロモーターは、遺伝子発現のオン・オフ、もしくは発現の強さ、すなわち転写量の多さを決定しているもの

であり、遺伝子組換え農作物におけるプロモーターの役割とは大きく異なる。

また、プラスミドによっては属間内で種をこえて伝達することが知られている。たとえば、*Streptomyces* 属における pIJ シリーズのプラスミドは種をこえて伝達され、しかも pIJ シリーズの一部のプラスミドが天然の遺伝子伝達ベクターとして作用して、*Streptomyces* 属の間で遺伝子導入（交換）を行っていることが示されている^{12), 13)}。さらに、pUB110 は当初 *Staphylococcus aureus* において作成されたが、属をこえて、枯草菌においても複製・保持されることが証明された⁷⁾。このことから pUB110 は枯草菌と *Staphylococcus aureus* の間で遺伝子交換していると考えられている。このような1つのプラスミドの宿主レンジが広く、もともと自然条件下で種をまたいでプラスミド交換および DNA 交換をするのであれば、その種間での DNA 断片、遺伝子を組換えたプラスミドについてはナチュラルオカレンスと考えられる。このような属をこえる遺伝子交換は、他にも知られており、例えば大腸菌を代表例とする *Escherichia* 属と *Enterobacter* 属との間でも遺伝子交換は見られ¹⁴⁾、このことは *Enterobacter* 属の有する DNA 断片が大腸菌をはじめとした *Escherichia* 属に組み込まれることは天然に起こり得ることを示している。このため、*Enterobacter* 属の遺伝子が大腸菌のプラスミドに組み込まれたものは天然に起こり得ることであり、このようなものはナチュラルオカレンスと考えられる。

これらのプラスミドにおいて組み込まれるプロモーター、ORF、ターミネーターの塩基配列において、「A. 研究目的」において整理した I-1. から I-5. のイベントが生じているものについて、これは天然においても起こりうることであり、ナチュラルオカレンスと考えられる。

C. 2. 微生物染色体ゲノム内に外来遺伝子の挿入・置換を行った微生物を用いた方法

C. 2. 1. 相同組換え

相同組換えを用いた遺伝子組換え技術は現在、微生物のみならず高等生物にまで広く利用されている。この技術のポイントは改変しようとしている遺伝子について、染色体上のその位置でその遺伝子の塩基配列のみに変異を加える、もしくは遺伝子重複によるコピー数増加を生じさせることが出来る、という点で、非相同組換えによる未知の染色体 DNA 領域の挿入による意図しない遺伝子破壊が生じることがなく、狙った遺伝子のみを組換えてしまう方法である（図1）。特に動物において、この方法は現在非常に進化してきており、遺伝子ターゲッティングによるノックアウトと遺伝子重複を組み合わせることで、2n の染色体内に遺伝子型として 0, 1, 2, 3, 4 コピーを有する動物を作出するジーンタイトレーション法が確立されている¹⁵⁾。酵母において、この相同組換え法は YIp 型ベクターの構築されたことから始まり、開発が進められている¹⁶⁾（図2）。この方法において、YIp プラスミドは酵母内で複製にかかわる *ori* はないが、このコンストラクトを大腸菌において構築するために、大腸菌の *ori* や大腸菌において発現する抗生物質耐性遺伝子が組み込まれているため、1回の相同組換えによってできた微生物の染色体ゲノム DNA 配列は天然に存在するものとは言えない（図2（2））。この方法で標的遺伝子のみに変異が入った（図2では「遺」が「い」になっている）形であり、その他の領域には外来の異種 DNA 塩基配列が挿入されていない形、すなわち図2（4）のようになった微生物を選抜しうれば、「標的遺伝子」に組み込まれた変異が、「A. 研究目的」の I で整理した天然に起こりうる変異であった場合、天然にこのような遺伝子の変異が生じている可能性があり、ナチュラルオカレンスであるとともにセルフクロニングである。しかし、（4）のようになった微生物を探し出すのが非常に困難であり、実用化が遅れていた。それでも、（2）のようになった微生物を、抗生物質などの選択圧を掛けない状態で培養すると、ある確率で染色体内での（3）の相同遺伝子組換えが生じ、

(4)のように1コピーとなった微生物が、低頻度ではあるが、出現する。これを人海戦術的にサザン解析法や PCR 法を用いて、多数の組換え微生物から(4)のようになった微生物をスクリーニングして見つけ出す、という方法によって成功した例はある。またループアウトした DNA は環状化する可能性があるが、宿主内微生物内における複製開始点の配列を有していなければ、プラスミドとして複製されないため、微生物内から脱落する。さらに、この方法を改良し、より高効率で(4)の微生物をスクリーニングする方法として、この組換え方法において、選択遺伝子として、抗生物質耐性遺伝子とともにガラクトース誘導型生長抑制配列¹⁷⁾の2つを導入することによって、まず(2)の状態になった酵母を抗生物質を含む培地においてスクリーニングし、次にそこで得られた酵母を今度はガラクトースを含む培地においてスクリーニングすることによって、抗生物質耐性遺伝子とともにガラクトース誘導型生長抑制配列を含む領域において(3)の相同組換えが生じ、結果として(4)の状態になったものだけがガラクトースを含む培地で生育する、という2段階遺伝子置換法がある。実際に清酒酵母において行われた結果、導入された遺伝子は(4)のような形で清酒酵母内に存在し、(2)および(3)において存在する外来の塩基配列は(4)の清酒酵母内にないことが確認されている¹⁸⁾。さらに、この方法によって、これら論文の著者と山口県産業技術センターによって作出された清酒酵母について、山口県産業技術センターから厚生労働省にセルフクロニングとして該当するかの判断が求められ、平成13年4月27日の食品衛生分科会食品衛生バイオテクノロジー一部会組換え DNA 技術応用食品安全評価調査会において、セルフクロニング/ナチュラルオカレンスの範疇である旨確認されたことが、これら論文の著者によって明らかにされている¹⁹⁾。

この相同組換えをさらに改良した方法として、プラスミドの複製開始が温度感受性になったものを利用することが考えられた。こ

れは上記の相同組換えにおいて最後のステップでベクター部分の切り出しが生じた時、ここで用いたプラスミドが宿主微生物において増殖可能であれば、ループアウトした DNA が環状化した時、プラスミドとして微生物内に残存して増殖していく可能性がある。しかし、ここで複製開始が温度感受性であれば、制限温度よりも高い温度で遺伝子組換えした微生物を培養することによって、プラスミドは複製できないため、微生物から脱落することになる。実際にコリネ型細菌において温度感受性プラスミドの開発²⁰⁾、それを用いたグルタミン酸の生産のための相同遺伝子組換え法によるセルフクロニング/ナチュラルオカレンスとなる微生物の作出法についての特許が公開されている²¹⁾。

このような方法によって置換をする際に、別の天然に存在する同属・同種の微生物から遺伝子をクロニングして微生物に入れ変えるということとともに、PCR 法などを用いて点突然変異、挿入、欠失などを生じさせたもの遺伝子を人工的に構築することが、現在は可能になっている。「A. 研究目的」において整理した I-1. から I-5. のイベントが生じているものについて、これは天然においても起こりうることであり、ナチュラルオカレンスと考えられ、相同組換えによって得られた微生物の染色体ゲノムの標的遺伝子の塩基配列に結果として I-1. から I-5. のイベントが生じた塩基配列になったものは天然に存在する可能性があり、ナチュラルオカレンスと考えられる。ただし、このような方法によって作成された場合においても、自然突然変異もしくは人為突然変異によってこのような塩基配列を生じうるということは、このようにして作出された微生物のリスクは自然突然変異もしくは人為突然変異によって作出されたものと同等と見なすことができ、たとえば、意図した通りに遺伝子の相同組換えが起こっており、新たな ORF が生じたりしていないことなどは安全性確保のために確認しておくべきである。

また、図2においては相同組換えを生じさせる部分が標的遺伝子内のみでしか例示さ

れていないが、これが複数の標的遺伝子をまたぐ形であれば、遺伝子の欠失を生じさせることが可能となる(図3)。このようなことは天然に起こりえることであり、セルフクローニング/ナチュラルオカレンスと考えることが出来る。ただし、この場合においても、このようにして作出された微生物のリスクは、自然突然変異もしくは人為突然変異によって作出されたものと同等と見なすことができ、このような方法によって作成された場合、遺伝子の途中で別の遺伝子が挿入された形になっていないなど、予期せぬ ORF が生じていないことの確認を、安全性確保のために製造者の責任で行っておくべきである。

「C.1. 染色体外ゲノム(プラスミド)を用いた方法」において、微生物における染色体外ゲノムであるプラスミドにおける事項としてあげた2) および3) について、染色体外ゲノムであるプラスミドで安全性が認められていることから考えれば、少なくとも2) について、微生物における染色体ゲノムにおける遺伝子組換えにおいても、全く同様に安全性に問題はないと考えられる。しかし、3) について、プロモーター、ORF、ターミネーターの DNA 配列がユニットとして同種の全く別の遺伝子から組み込まれた場合においては、相同組換えが生じなくなる可能性が高いため、天然に生じる可能性は非常に低く、確率的にもほぼゼロに等しいと考えられ、定義の上でセルフクローニングであったとしても、ナチュラルオカレンスとは考えられない非相同組換えにより入れ替わっている可能性が高い。しかし、遺伝子断片の一部のみ、たとえば ORF のみを変えて、プロモーターおよびターミネーターが同じであれば、相同組換えは起こるので、このような場合は3) においても安全性が認められているので問題はないと考えられる。

また、食品・食品添加物という視点から見た時、遺伝子組換え農作物においては可食部が植物体の一部の組織・器官に限定されている、例えばトウモロコシなら穀粒のみであり、このため、遺伝子組換え農作物の作出においては、器官特異的発現プロモーターの利用が

行われており、農作物のどの組織・器官で導入された遺伝子が発現しているのかを含めて安全性評価が必要とされている。これに対し、微生物を用いた食品・食品添加物の生産においては、微生物全体を食する、あるいは微生物全体から抽出・精製を行う、ということであり、そこにおけるプロモーターは、遺伝子発現のオン・オフ、もしくは発現の強さ、すなわち転写量の多さを決定しているものであり、遺伝子組換え農作物におけるプロモーターの役割とは大きく異なる。このため、微生物プロモーターの DNA 配列がユニットとして同種の全く別の遺伝子から組み込まれたものについては、天然に生じる可能性は非常に低く、確率的にもほぼゼロに等しいと考えられるが、添加物・食品として見た場合、安全性に問題を生じさせるようなリスクは遺伝子組換え農作物の場合とは全く異なり、低いと考えられる。

C.2.2. 非相同組換えによる遺伝子挿入

有用遺伝子を染色体ゲノム内に挿入するにあたって、もう1つ行われている方法は有用遺伝子に抗生物質合成遺伝子もしくは栄養要求性を相補する遺伝子をマーカーとして連結し、遺伝子導入し、マーカー遺伝子の発現によって遺伝子挿入された微生物を選抜する、という方法である。遺伝子組換え植物においてこの方法は広く用いられており、導入したい遺伝子とともに大腸菌由来のカナマイシン耐性遺伝子を導入してカナマイシンを含む培地で遺伝子が導入された植物個体を選抜する方法が用いられている。この方法において、非相同組換えによる挿入であるため、導入された遺伝子が宿主微生物染色体ゲノムのどの領域に挿入されているのか、また挿入の際にどのようなイベントが生じ、挿入領域での塩基配列が改変されているのかはわからない。特に遺伝子組換え植物を用いた遺伝子組換え食品においては、用いられている抗生物質合成遺伝子や、除草剤耐性遺伝子、害虫抵抗性遺伝子などは、すべて主に微生物由来の異種生物に由来しているため、このようなことは天然に起こり得ない。この

ため、各遺伝子組換え個体ごとに十分な安全性審査が必要とされる。しかし、導入した有用遺伝子および選抜マーカー遺伝子が、宿主そのものが有する塩基配列もしくは遺伝子交換がおこることがわかっている属・種間の塩基配列を用いたものであり、さらにこのコンストラクトを作成するのに用いたプラスミドが、宿主そのものが有するプラスミドもしくは遺伝子交換がおこることがわかっている属・種間のプラスミドであれば、結果として挿入されたものは、天然において生じる確率は非常に低いとはいえ、自然界で起こり得ないと言い切ることはできない。しかし、通常、このことが起こる可能性は確率的に考えて非常に低い。「C. 1. 染色体外ゲノム(プラスミド)を用いた方法」において、微生物における染色体外ゲノムであるプラスミドにおける事項としてあげた 3) について、同種の生物の別の遺伝子プロモーター、別の遺伝子 ORF、別の遺伝子ターミネーターが組換えられたものについて、DNA 配列が、ユニットとして全く別の遺伝子から非相同組換えで入れ変わってこのようなコンストラクトがナチュラルにできあがるのは、同上の理由によって可能性はほぼゼロに近いと考えられる。プラスミドにおいてはこれまでの長年の実績から、別の遺伝子プロモーター、別の遺伝子 ORF、別の遺伝子ターミネーターの DNA 配列が、ユニットとして全く別の遺伝子から非相同組換えで入れ変わった形であっても安全であることが検証されてきている。従って、プラスミド以外の、このような非相同性組換えのイベントによって生じる形の遺伝子組換え微生物については、今後とも事例を積み重ねながら、十分慎重な安全性評価を行っていくことが必要である。

D. 考察

当研究において調査・評価したことは、これまでの厚生労働省におけるセルフクロニング/ナチュラルオカレンスの確認事例等を踏まえて、遺伝子組換え技術を用いて作出した微生物の塩基配列が、結果として自然突然変異もしくは人為突然変異によって生

じうること、人為的に遺伝子組換え技術を用いて作出した微生物と同じ塩基配列を有する微生物が天然に存在しうること、そしてそのような可能性が生じるのはどのような突然変異の機構もしくは相同・非相同組換えの機構によるのか、という点であり、このような塩基配列はセルフクロニング/ナチュラルオカレンスとして生じうるという可能性を明らかにしたものである。しかし、その可能性がどの程度の確率で生じうるのか、という点については全く別の問題である。たとえば、大腸菌を抗生物質を含む培地に塗布すると、必ず約 10^7 に 1 個、その抗生物質に抵抗性を示す大腸菌が突然変異によって生じ、コロニーを形成する。このことから、3 種類の抗生物質に同時に抵抗性を示す大腸菌の出現頻度は約 10^{21} に 1 個であり、確率論的にこれはゼロに近似される、と考えられた。今回の結果において述べたケースについても同様であり、遺伝子組換え技術を利用して作出された微生物の塩基配列が結果としてセルフクロニング/ナチュラルオカレンスとして生じうるが、その可能性は、上述の例のように確率論的にゼロに近似される、と考えられる場合がある。しかし、このような確率論も単純には当てはまらない。なぜならば、3 種類の抗生物質耐性大腸菌の出現頻度は、自然界において実際は約 10^{21} に 1 個ではなく、はるかに高い頻度で生じている、すなわち確率論的にゼロに近似されない、という事実がある。これは個々の抗生物質抵抗性遺伝子を微生物が遺伝子交換して取り込んでいるためであり、これが多剤耐性菌を生み出していることは衆知の事実である。従って、遺伝子組換え技術を利用して作出された微生物の塩基配列が、結果としてセルフクロニング/ナチュラルオカレンスであり、自然界においてこれと同一の塩基配列を有した微生物は存在しうる、ということとは否定できない。しかし、このセルフクロニング/ナチュラルオカレンスの確率論の問題と生産菌の安全性の問題とは全く別の次元の問題であると認識すべきである。確率論の問題だけを考えるのであれば、生産菌が突然変異

などによって、ある日、突然、毒性物質やアレルギー物質を生産するようになる、という可能性の確率はゼロではない、ということと等価である。しかし現実において、これまでの微生物を用いた食品添加物生産の長い歴史において、生産者の常日頃の生産菌に対する精査・管理の努力もあって、このような事故とも言える事態は起きていないのが現実である。

従来の微生物育種において、自然突然変異もしくは人為的突然変異処理によって、これまでより高い生育能力、より高い食品添加物生産力、より高い安全性を有する微生物が選抜され、育種されてきた。しかし、その過程の中で、作出した微生物が、結果として改悪にしかならず、微生物の生育が低下する、あるいは生産力が低下するのみならず、毒性物質やアレルギー物質の生産が生じてしまう場合もしくはそれら物質の生産量が高まってしまいうというリスクがあり、そのような微生物は育種の過程の中で、その生産性および安全性をすべて精査することによって排除されてきた。このリスクについては開発者・製造者が精査・管理することによって、微生物における食品添加物の生産性と安全性は高まってきた。遺伝子組換えによって作出された微生物において、上記のような点突然変異、挿入、欠失、遺伝子重複、DNA交換、相同組換えなどをセルフクロニング/ナチュラルオカレンスとして生じさせた場合、設計通りにできているから即座に安全であるというのは誤りであり、これらの方法によって作出した遺伝子組換え微生物の有するリスクは、従来の自然突然変異あるいは人為的突然変異におけるリスクと同等と見なされるものであり、その安全性とリスクについては従来の育種法で作出された微生物と同様に生産に用いてよいかどうかを開発者・製造者が精査・管理する必要がある。

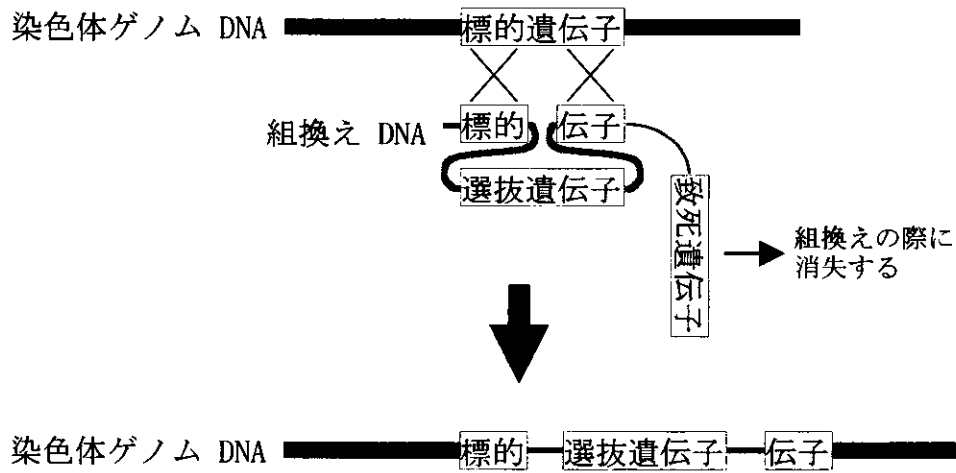
E. 参考文献

- 1) 平成12年5月1日生活衛生局長通知 (生発第825号-1)
- 2) Drake, J.W., Glickman, B.W.,

- Ripley, L.S. (1983) Updating the theory of mutation. *Am. Sci.* 71: 621-630.
- 3) Brown, T.A. (1998) *Genetics: A molecular approach*. 3rd ed. Stanley Thornes, UK.
- 4) Goeddel, D., Heyneker, H., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D., Ross, M., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P. (1979) Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281: 544-548.
- 5) Vieira, J., Messing, J. (1982) The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- 6) Pfizer, Inc. (1988) Food additive petition 8A4048 proposing amendment of the food additive regulations to provide for the safe use of a genetically modified *E. coli* K-12 as a source of chymosin for use in food. Notice of Filing. *Fed. Regist.* 53: 3792.
- 7) キモシン (マキシレン) 平成13年3月30日付け官報掲載
- 8) Gryczan, T., Contente, S., Dubnau, D. (1978) Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 134: 318-329.
- 9) MaCkenzie, K.M., Petsel, S.R.W., Weltman, R.H., Zeman, N.W. (1989) Subchronic toxicity studies in dogs and *in-utero*-Exposed rats fed diets containing *Bacillus megaterium* amylase derived from a recombinant DNA organism. *Food Chem. Toxicol.* 27: 301-305.
- 10) MaCkenzie, K.M., Petsel, S.R.W., Weltman, R.H., Zeman, N.W. (1989)

- Subchronic toxicity studies in dogs and *in-utero* - Exposed rats fed diets containing *Bacillus stearotherophilus* alpha-amylase from a natural or recombinant DNA host. *Food Chem. Toxicol.* 27: 599-606.
- 11) α -アミラーゼ (TMG-アミラーゼ) 平成13年3月30日付け官報掲載, α -アミラーゼ (SP961) 平成14年2月21日付け官報掲載
- 12) Rafii, F., Crawford, D.L. (1988) Transfer of conjugative plasmids and mobilization of a nonconjugative plasmid between *Streptomyces* strains on agar and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1334-1340.
- 13) Wellington, E.M.H., Cresswell, N., Saunders, V.A. (1990) Growth and survival of *Streptomyces* inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1413-1419.
- 14) Michaeli, S., Ron, E.Z. (1983) Gene transfer between *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. *Mol. Gen. Genet.* 190: 179-181.
- 15) Kim, H.S., Lee, G., John, S.W., Maeda, N., Smithies, O. (2002) Molecular phenotyping for analyzing subtle genetic effects in mice: application to an angiotensinogen gene titration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4602-4607.
- 16) Orr-Weaver, T., Szostak, J.W., Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6354-6358.
- 17) Kawahata, M., Amari, S., Nishizawa, Y., Akada, R. (1999) A positive selection for plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* using galactose-inducible growth inhibitory sequences. *Yeast* 15: 1-10.
- 18) Akada, R., Matsuo, K., Aritomi, K., Nishizawa, Y. (1999) Construction of recombinant sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 43-48.
- 19) 赤田倫治 (2003) 食品微生物の組換え審査事情。バイオサイエンスとインダストリー 61: 52-55.
- 20) 中村 純, 菅野 壮平 (2000) コリネ型細菌の温度感受性プラスミド。特開 2000-262288.
- 21) 中村 純, 森口 嘉代 (2002) 発酵法による L-グルタミンの製造法及び L-グルタミン生産菌。特開 2002-300887.
- F. 研究発表
1. (論文発表)
なし
 2. (学会発表)
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. (特許取得)
なし
 2. (実用新案登録)
なし

(A)



(B)

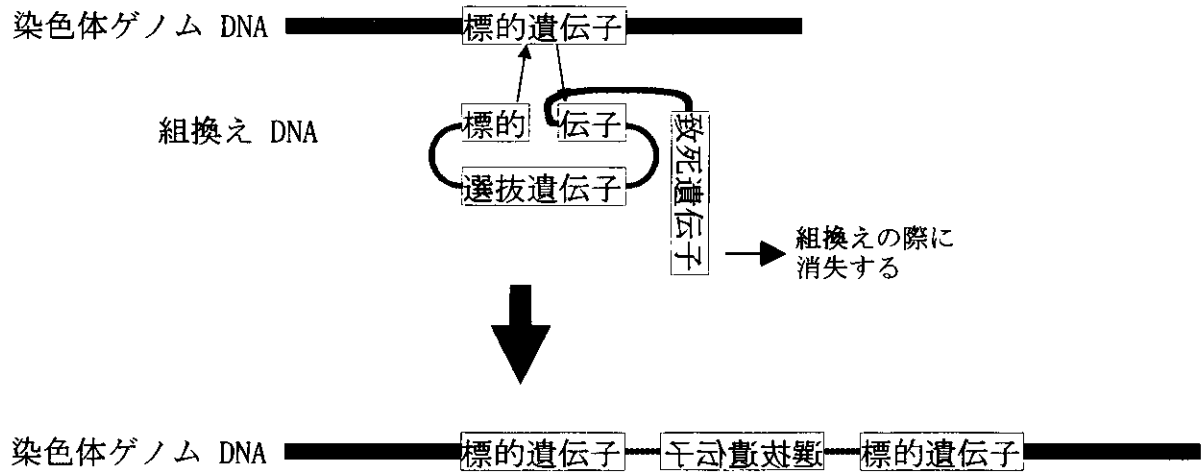


図1 遺伝子ターゲッティング (A) と遺伝子重複 (B)。

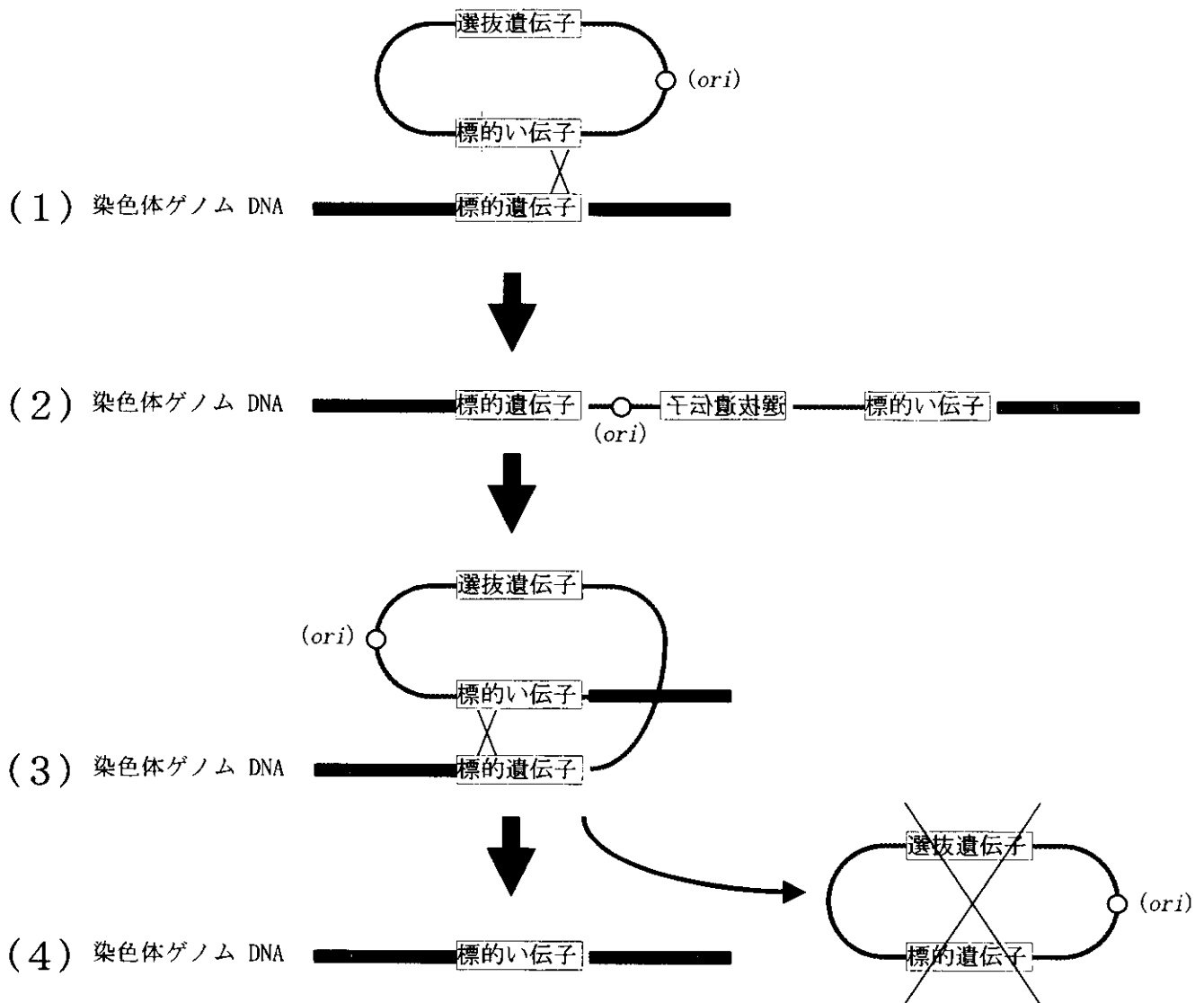


図2 プラスミドを用いた染色体ゲノム DNA への遺伝子相同組換え。(1) 相同組換えしようとする標的遺伝子に対し、これに変異を生じさせた遺伝子(「標的い伝子」)を含むプラスミドを作成し、これを宿主微生物に導入する(染色体ゲノム DNA は便宜上、線で記してあるが、これは原核生物においては環状ゲノム DNA の一部を意味する)。導入されたプラスミドが複製の際に標的遺伝子の近傍に存在して、複製がプラスミドに乗り代わって起こった時、(2)に示すように、その部位で組み込みが起こる。(3)さらにこのようにして組みかえた微生物において、今度はある確率で、染色体上で相同組換えが生じる。(3)のような領域で組換えが生じると、(4)のように染色体ゲノム中の標的遺伝子が組み変わった形になる。酵母における YIp 型プラスミドにおいて酵母内で働く *ori* の配列が入っていない(大腸菌の *ori* の配列は入っている)ため、(4)においてループアウトしたプラスミドは宿主酵母内で複製されないため、消失する。なお(1)の標的遺伝子のところに記した破線は酵母の組換えにおいて、相同組換えの頻度を高くするため、制限酵素で切断して直鎖状にした DNA を導入することが一般的である。

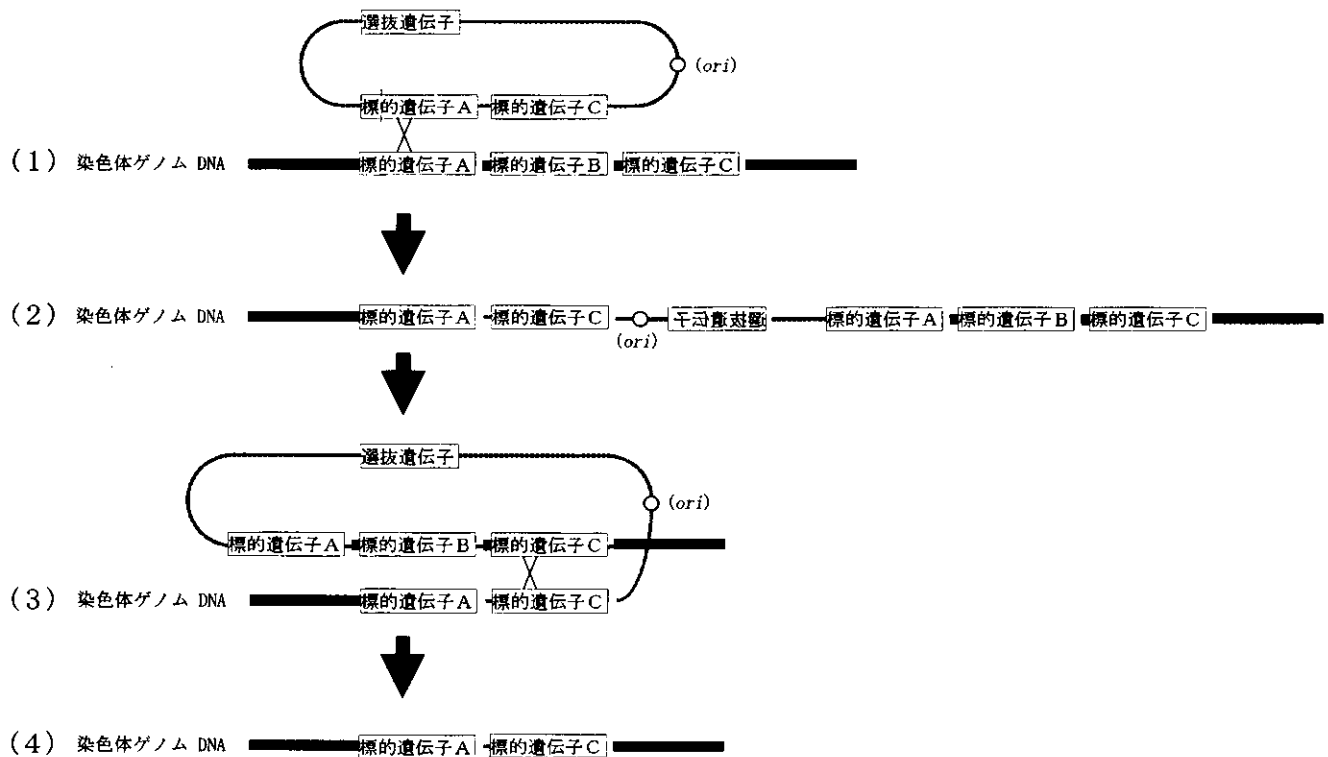


図3 プラスミドを用いた遺伝子間での染色体ゲノム DNA への遺伝子相同組換えによる遺伝子欠失。
 (1) 相同組換えしようとする標的遺伝子 A, B, C に対し、これに欠失を生じさせたい標的遺伝子
 を含まない標的遺伝子 A, C を含むプラスミドを作成し、これを宿主微生物に導入する。導入され
 たプラスミドが複製の際に標的遺伝子の近傍に存在して、複製がプラスミドに乗り代わって起こ
 った時、(2) に示すように、その部位で組み込みが起こる。(3) さらにこのようにして組みか
 えた微生物において、今度はある確率で、染色体上で相同組換えが生じる。(3) のような領域で組
 換えが生じると、(4) のように染色体ゲノム中の標的遺伝子 B が欠失した形になる。(4) にお
 いてループ・アウトしたプラスミドについては図中省略してある。