

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

遺伝子改変植物の作出に関する研究

分担研究者 吉松嘉代 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場

遺伝子組換え植物が環境へ与える影響を評価するための実験系開発のため、日本産アグロバクテリウム・リゾゲネスにより形質転換した植物組織培養物からの個体再生を行った。また、再生した植物個体を人工光室内で栽培し、非形質転換体との比較を行った。

A. 研究の目的

遺伝子組換え植物は、食糧増産、健康維持増進、環境浄化への多大な貢献が期待されているだけでなく、新規あるいは復興創薬リード化合物探索のための資源としても有用であると考えられる。しかしながら、世論では未だ遺伝子組換え植物への不安や疑念が根強く、長期的視点からの人体に対する安全性や生物多様性に及ぼす影響が懸念されている。遺伝子組換え植物を有用かつ有効に活用するためには、遺伝子組換え植物が生物圏へ及ぼす影響を適切に評価し、十分な方策を執った上で利用することが必要不可欠である。そのため本研究では、自然界においても植物のゲノムDNA中に自身のプラスミドDNAの一部を挿入する日本産 *Rhizobium* 属細菌により形質転換植物体を作成して遺伝子組換え植物モデルとし、環境へ与える影響を評価するための実験系開発を行う。

B. 研究方法

1) 材料植物

日本産 *Rhizobium* 属細菌である *Rhizobium rhizogenes* MAFF03-01724株により形質転換したトウキ

(*Angelica acutiloba* Kitagewa) 毛状根およびケシ (*Papaver somniferum* L. var. *Ikkanshu*) 形質転換不定胚からの再生植物体を組換え体モデルとした。同様に、トウキおよびケシの非形質転換植物体を材料とした。

2) 組織培養

トウキ形質転換体は、ホルモンフリーMS固形培地、20℃、14時間照明下で培養し、発根した植物体を用いた。ケシは、ホルモンフリーMS固形培地、20℃、暗所で継代培養を行っている不定胚を14時間照明下で培養し、再生させた植物体を用いた。

3) 土壌への移植と栽培

発根した植物体を培養容器から取り出し、水流下で培地をよく洗い流した後、5寸鉢（赤玉土－腐葉土－クレハ培養土＝3：1：1）に移植し、人工光室にて栽培した。条件は、温度20℃/明（16時間）、17℃/暗（8時間）とした。

4) ケシアルカロイドの分析

開花後の未熟果実にアヘン採取用の切傷刀を用いて傷を付け、浸出

する乳液を採取した。60℃で温風乾燥後、適量の50%メタノール溶液に溶解した。抽出液を遠心後、上清を直接HPLCに注入した。

HPLC 分析は、多波長分析 HPLC システム(オートサンプラー:TOSOH AS8020、カラムオープン:TOSOH CO-8020、マルチポンプ:TOSOH CCPM-II、多波長検出器:TOSOH PD-8020、データ処理:COMPAQ DESKPRO)を用い、カラム:TSKgel ODS 120A(5  $\mu$ m、4.6 mm i.d. x 250 mm)、移動層:アセトニトリル-10 mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム(pH 3.5)、溶媒グラジエントプログラム:0分-アセトニトリル20%(以下同様にアセトニトリル%で示す)、15分-30%、20分-40%(25分まで保持)、30分-50%、35分-20%、流速:1ml/分、温度:40℃、検出:UV 200-400 nm(化合物の同定)、284 nm(定量)とした。

### C. 研究結果

ケシ(一貫種)の形質転換体及び非形質転換体は、ファイトトロンで正常に生育し、開花が認められた(図1)。しかし、開花までの日数および草丈が大きく異なっており、非形質転換体では移植後47日後に開花し草丈が60cmであったのに対し、形質転換体では71日後に開花し草丈38cmであった(表1)。また、形質転換体の花卉には深い切れ込みが認められた(図1)。さらに、アヘン中のアルカロイド成分の構成及び含量に顕著な差が認められた。非形質転換体の主アルカロイドはモルヒネ(10.9%乾燥重量)であったのに対し、形質転換体の主アルカロイドはデバイン(16.3%乾燥重量)であった(表1、図2)。

一方、トウキの形質転換体及び非形質転換体は、地上部の生育と葉の形態が著しく異なっており、形質転換体の生育の方が旺盛であった(図3、図4)。形質転換体及び非形質転換体ともに、1年以上栽培した株においても開花は認められなかった(図4)。

### D. 考察

日本産 *Rhizobium* 属細菌は日本の土壤に生息する植物病原菌であり、植物防疫上規制対象とならない微生物である。また、この細菌によって植物ゲノム中に挿入されるDNAは、細胞外で加工する過程を経していないため、自然界でも起こる現象として認知されており、組換え生物の規制を受けない。しかしながら、植物の遺伝子に細菌由来の外来遺伝子が挿入される点は遺伝子組換え現象と同一である。また、挿入されるDNAの配列は既知であるため、PCR 法等による遺伝子伝搬の解析が容易で、世論に認められやすい評価系の確立に適していると思われる。今年度においては、*Rhizobium* 属により形質転換された植物体を組換え植物のモデルとするため、その特性を調べ、非形質転換体との比較を行った。

ケシ形質転換体は、不定胚培養及びシュート培養時において、モルヒネを生合成する能力が非形質転換体に比べて非常に低く、モルヒネ以外のアルカロイドの生産性が高いことを既に報告している<sup>1)</sup>。この性質が土壤での栽培時にも認められたことから、形質転換体に認められたアルカロイド生合成能の改変は、挿入されたT-DNAの影響によるものと推察される。今回の改変した性質及びT-DNAの伝搬を精査することにより、非形質転換体との交配時に生じる影

響のモニタリングが可能と考えられる。

トウキでは、形質転換体、非形質転換体のいずれも開花が認められず、開花特性を調べることが出来なかった。交配による影響を調べる実験系開発のためには、開花誘導条件を検討する必要がある。

#### E. 結論

*Rhizobium* 属により形質転換された植物体を組換え植物のモデルとするため、ケンおよびトウキ形質転換体の特性を調べ、非形質転換体との比較を行った。その結果、ケン形質

転換体は、開花期、形態、アルカロイドの組成および含量が非形質転換体と大きく異なることから、交配時に生じる影響のモニタリングに適していることが示唆された。

#### F. 研究発表 特になし

#### G. 参考文献

- 1) Yoshimatsu K & Shimomura K, 2001, Bull. Natl. Inst. Health Sci., 119:52-56.



図1. ケシ再生植物体の開花（非形質転換体：A、C；形質転換体：B、D、E）

表1. ケシ再生植物体の生育、開花及びアヘン中のアルカロイド

植物	開花 日数	アヘン採取（開 花後日数）	草 丈 cm	アヘン中のアルカロイド含量%				
				モルヒネ	コデイン	テバイン	パパベリン	ノスカピン
非形質転換体	47	22	60	10.877	1.310	-	2.021	9.152
形質転換体	71	15	38	1.278	4.171	16.295	2.298	10.245

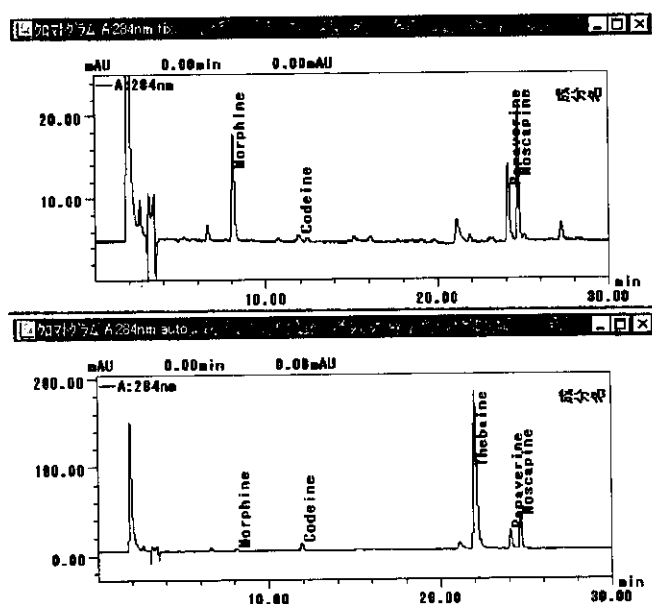


図2. ケシ非形質転換体（上）及び形質転換体（下）アヘンのHPLCチャート

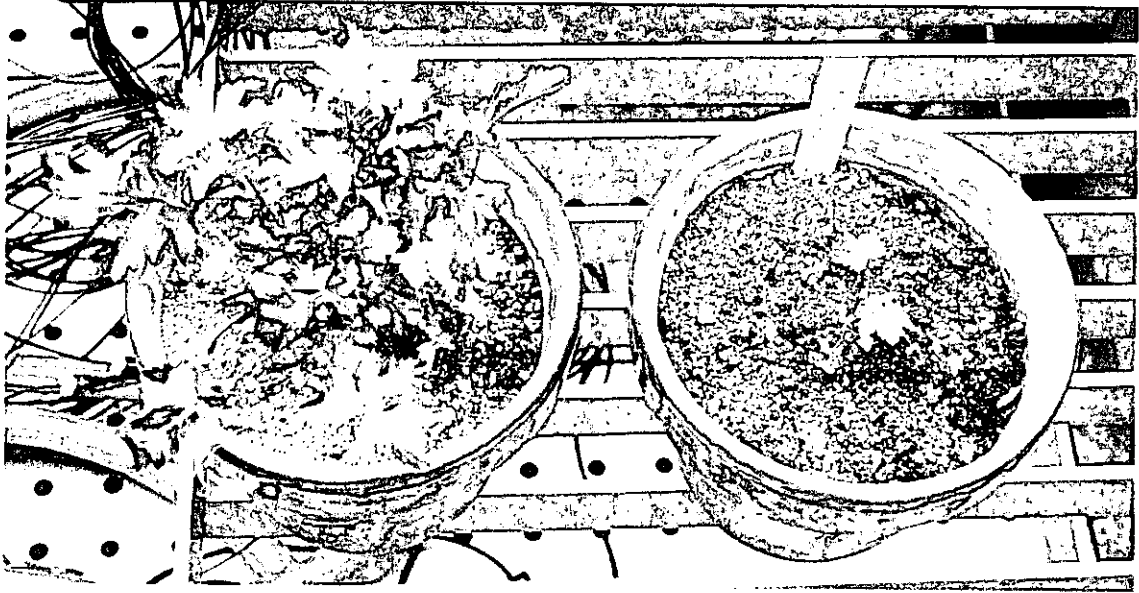


図3. 土壤移植2ヶ月後のトウキ形質転換体（左）と非形質転換体（右）

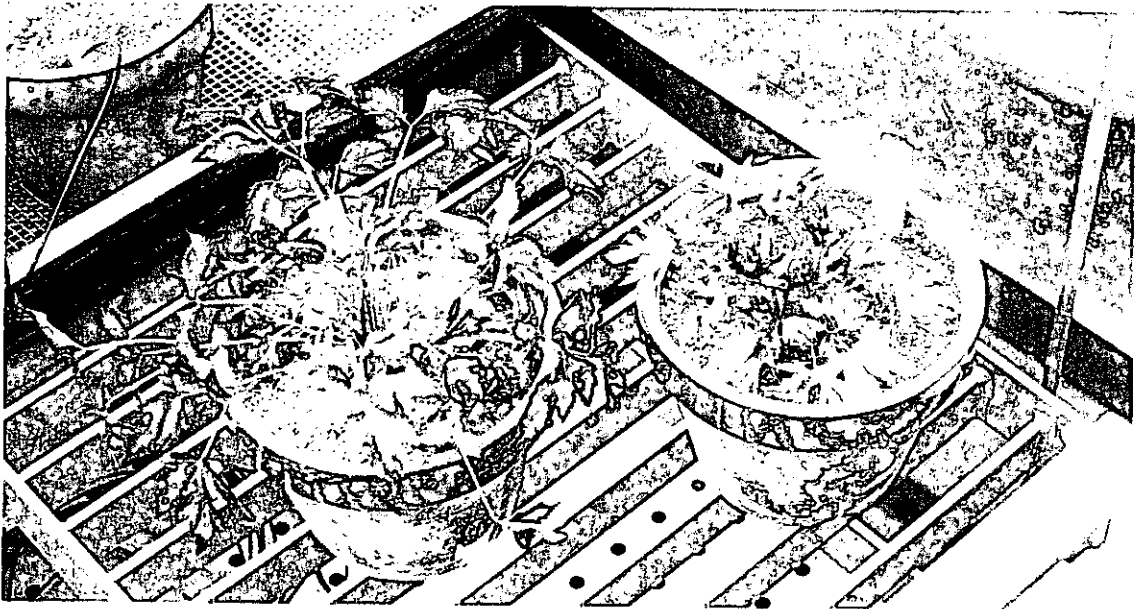


図4. 土壤移植後14ヶ月後のトウキ形質転換体（左）と非形質転換体（右）

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

遺伝子組み替え薬用植物の環境に与える影響に関する研究

分担者 大塚 譲 お茶の水女子大学生生活環境研究センター

パン酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）遺伝子を薬用植物に組みこむために以下の研究を行った。PDI の全長遺伝子が組みこまれている pMATE6 プラスミドから PCR 法により全長遺伝子を増幅し、pGEM-T easy ベクターに組みこんだ。得られた株を培養し、プラスミドを単離し、制限酵素 Spe I と Not I で切って、コウジカビと大腸菌の両方で使えるベクター pNAN8142 プラスミドのマルチクローニングサイトにつなぎ変えた。このプラスミドをクロロプラストにしたコウジカビにカルシウム法によりトランスフォーメーションし、PDI 遺伝子をコウジカビに導入した。得られた株の菌体から DNA を抽出し PCR により酵母 PDI 遺伝子が組みこまれているかを確認した所、間違い無く組みこまれていた。菌体を培養し、菌体から RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA を作成した。この cDNA に酵母 PDI が含まれているかを PCR により確認した所、酵母 PDI の遺伝子が発現し、mRNA が作られていることが確認できた。次に菌体を培養後、菌体からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行った。水永らを作った抗酵母 PDI 抗体を用いて検出した所、酵母抽出液で認められた位置に組み替え麹カビのサンプルでも反応が認められ、少量ながらタンパク質も発現していることが求められた。

#### A. 研究目的

遺伝子組み替え植物が数多く作られているが薬用植物での組み替えの例はほとんど無いものの薬用植物に様々な遺伝子を組み込み新規の薬用植物を作るとは今後幅広く行われるものと考えられる。しかしながら薬用植物を宿主とする遺伝子組み替え植物を実験室外に持ち出して栽培することは生理活性物質を持っているがために通常の植物より危険性が高いことも予想されその環境への影響を十分に把握しておかなければならない。

植物個体に遺伝子を挿入する方法としてパーティクルガンによる金コロイド法やアグロバクテリウムを用いる方法がある。特殊な装置の必要の無いアグロバクテリウムを用

いる方法にはクラウンゴールを形成させる Ti プラスミドを用いる方法と毛状根を形成させる Ri プラスミドを用いる方法がある。Ri プラスミドを用いる方法はすでに薬用植物ベラドンナへの遺伝子導入で用いられているが形質転換植物の様々な性質については調べられていない。

これまでパンの商業生産には生地を膨張させ、焼き上がりを良くするために小麦粉の品質改良剤として臭素酸カリウムが使用されてきたが、1976 年に染色体異常を引き起こす遺伝子毒性を示す物質であることが判明し、1982 年にはラットの腎臓で発ガン性が確認され、さらに臭素酸カリウムによって、中枢神経麻痺、遺伝子損傷、眼球破壊などが生じることが明らかになり、国際ガ

ン研究機関 (IARC) の基準で「ヒトに対して発ガン性がある可能性がある」とするグループ 2B に指定された。現在では、最終食品に臭素酸カリウムが残存しないことを条件に、パン用小麦粉にのみ使用が許可されているが、使用を自粛しているメーカーも多い。そのため臭素酸カリウムの代わりにアスコルビン酸が膨化剤としてもちいられているが、生地伸びが悪く、焼き上がりが硬いなどの問題点がある。

Protein Disulfide Isomerase (PDI EC 5.3.4.1) は、小胞体内腔に存在する約 55kDa のタンパク質で、翻訳後タンパク質のジスルフィド結合を正しく架け替えることでそのタンパク質の高次構造形成と機能の発現を促進させる働きをもち、また、近年ではシャペロニンとしての機能も注目されている酵素である。このジスルフィド結合を架け替えるという性質から、食品への添加により、食品中タンパク質の構造を変化させ、新たな物性を生み出すことなどが期待されパン製造への応用も考えられる。しかし現在市販されている、牛の筋肉から精製したものなどは極めて高価なため、工業使用には不適と考えられる。そこで、遺伝子組換えによつての生産が期待される。すでに酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から PDI 遺伝子は、水永らによって 1991 年に全長遺伝子がクローニングされているのでこのクローニングされた cDNA を植物に導入するための基礎研究を行った。

## 実験方法

### プラスミド

酵母 (*S.cerevisiae*) の全長 PDI 遺伝子 (D00842) をクローニングした pMTY17 のインサート DNA を pUC18 に挿入した p

MTE 6 をサンプルとしてもちいた。

### PCR による目的遺伝子の増幅

PCR の反応条件は以下の通りである。

94°C	4min	} ×25cycles
94°C	30sec	
65.5°C	2sec	
74°C	30sec	
4°C	∞	

### プライマー配列

```
PDI      -      1      F      :
CGGGATCCCATCTATCCCGTTATGAAG
PDI      -      1      F      :
CGGGATCCCATCTATCCCGTTATGAAG
```

### ライゲーション

抽出・調製した DNA 断片と pGEM-T Easy ベクターをキット (pGEM-T Easy Vector System) をもちいて、添付の標準プロトコールに従い、4°C で一晩ライゲーションした。

### トランスフォーメーション

ライゲーション液 3 μl と *E.coli* JM109 菌 50 μl を混合して、1 時間氷中に静置し、42°C で 30 秒ヒートショックをかけて形質転換した。SOC 培地 400 μl を加えて、37°C で 1 時間インキュベートし、アンピシリン (50 μg/ml) を添加した Luria-Bertani (LB) 寒天培地に塗布し、37°C で一晩インキュベートした。pGEM-T Easy ベクターは LacZ 発現系を保持しているため、IPTG (200mg/ml) 5 μl、X-gal (20mg/ml) 50 μl をプレートに添加して、インサートの有無を青白判定できるようにした。

### シーケンス

単離したプラスミドについて、ABI373S オートシーケンサーと M13 Forward プライマー、キット (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit) をもちいて、標準のプロトコールに従い、ダイデオキシリボヌクレオチド法によるシーケンスを行った。

## 実験結果

### I. 酵母 PDI のサブクローニング

①インサート断片と pGEM-T easy ベクターをライゲーションし、JM109 菌にトランスフォーメーションした結果、計 3 個のホワイトコロニーを得た。得られたコロニーについて、コロニー PCR を行い、1.0% アガロースゲルで電気泳動し、インサートが目的方向に挿入されていると考えられるコロニー③をプラスミド単離し、PCR 法を用いて確認を行った。さらに制限酵素処理を行い確認した。単離したプラスミドを 2 通りの制限酵素で処理し、1.0% アガロースゲルで電気泳動した結果を図 1 に示す。

Fig. 1 Results of RE-digestion

### II. pNAN8142 への組み込み

①トランスフォーメーション  
制限酵素処理したインサート断片と

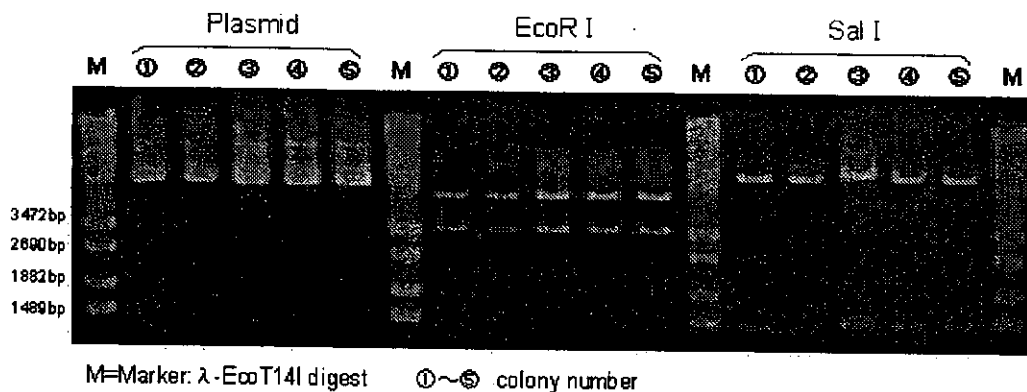


Fig. 2 Results of RE-digestion

pNAN8142 ベクター断片をライゲーションし、JM109 菌にトランスフォーメーションした結果、計 4 個のコロニーを得た。コロニー PCR の結果より、全てのコロニーでインサートが理論通りに挿入されていると考えられる。そこで 4 コロニー全てをプラスミド単離し、PCR 法を用いて確認を行った。さらに制限酵素処理して確認した。単離したプラスミドを 2 通りの制限酵素で処理し、1.0% アガロースゲルで電気泳動した結果を図 2 に示す。

### III. コウジカビによるタンパク質の発現

薬用植物に組み込む前にコウジカビの系を用いてタンパク質の発現を試みた。構築した HDEL 配列を除いた酵母 PDI 断片を含むプラスミドベクター MasyPDI/pNAN8142 を

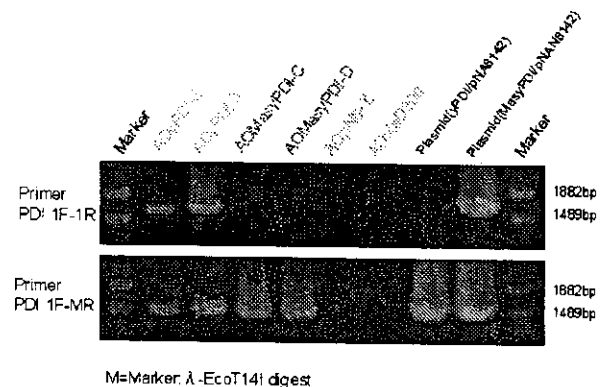
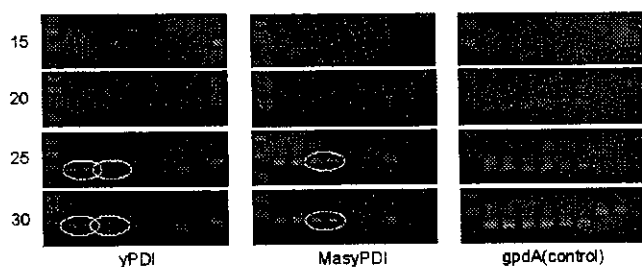


Fig. 3 Results of PCR

*A.oryzae* に形質転換し、3つの形質転換体を得た。



①まず目的配列がゲノム DNA に組込まれているかを PCR で確認した。PCR産物を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し確認した(図3)。②mRNA の発現確認を次に行った。RNA を抽出し、RT 反応を行って作製した cDNA を PCR につけ、目的遺伝子が発現しているかどうかを大まかに検討した。PCR産物を 1.0%アガロースゲルで電気泳動した結果を図4に示す。③PDI タンパク質の発現確認を SDS-PAGE とウエスタンブロッティングで行った。抽出した総タンパク質・菌体培養液をポリアクリルアミド 7.5%ゲルで SDS-PAGE 電気泳動を行い、株間の比較を行った。コントロールとしては、Yeast w303 株抽出液や *A.oryzae* pSAPD 形質転換体



AOpSAPD/NS4 を用いたが、親株との差はほとんど見られなかった。そこで次に抗酵母 PDI タンパク質を用いたウエスタンブロッティング(直接染色法)を行い発現を確認した。SDS-PAGE 電気泳動を行った 7.5%ゲルをニトロセルロースメンブレンにブロッティングし、ウエスタンブロッティング法によって株間の比較を行った。染色をしたメンブレンを図5に示す。



### 考察

本研究ではまず、全長 PDI をクローニングした p MTE 6 から作製された PDI/ p UC118 から目的配列をサブクローニングし、p GEM-T Easy ベクターの MCS に存在する制限酵素を用いて p NAN8142 への組込みに利用できるようにした。p NAN8142 への組

込みの際には 2 つの異なる制限酵素を用いることで、インサート DNA の方向をコントロールして p NAN8142 の高発現プロモーターの下流に開始コドン配置させることが可能になった。Xba I と Spe I の切断面の配列が同じであることを利用して、Not I とこれらとの組み合わせを使用した。全長配列を大量発現させた場合、出来上がった yPDI が組換え体の小胞体内膜に付着し小胞体ストレスとなって、生産量を抑えることを考え、HDEL 配列を除いて発現させ生産された PDI が培地中に分泌され、生産量の増加を期待し HDEL 配列を除いた領域をインサートとして形質転換体を作った。ゲノム DNA や mRNA を検討した所 amyA には至らないものの、*A.oryzae* 本来の PDI を code する pdiA よりは明らかに多く発現していた。しかしタンパク質を Western blotting で確認したところ、yPDI および MasPDI 組換え体と、親株である niaD300 株などとの間に発現タンパク質の差はみられなかった。原因としては、yPDI および MasPDI が異種タンパク質であることがもっとも大きな原因と考えられる。活性のある PDI の大量生産に向けて、また、タンパク質発現機構の解明において、必要かつ重要な課題であるといえよう。

分担研究者 正山征洋 九州大学大学院薬学研究院

研究要旨 漢方方剤に繁用される生薬の内、オウレン、オウゴン等の薬理活性成分に対するモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、それらを用いた高感度アッセイ系を構築した。また、ニンジン (人参) の ginsenoside Rb1, Rg1(G-Rb1, G-Rg1) に対する MAb を用いて両者を一度に検出可能なキットの開発に成功した。

#### A. 研究目的

植物に組み換え技術を導入する場合、意図的または非意図的に薬用成分に影響をあたえることが予測される。非意図的な微量の成分の発現を測定するには、従来は HPLC 法が多用されてきたが、我々はより簡便・高感度であり、高い再現性を有する分析法として免疫化学的な手法に着目し、マーカー成分に対する MAb を用いた環境に優しい Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の開発を企図した。加えて、本研究ではフィールドでも使用可能な分析キットの開発についても研究を行った。

#### A. 研究方法

##### 1. MAb の作製と高感度アッセイ系の構築

オウレンの berberine から熱処理により berberrubine を誘導し、得られた berberrubine とモノクロル酢酸を反応させることで carboxymethyl-berberrubine を調製した。本化合物をハプテンとしてカルボジイミド法により免疫原であるコンジュゲートを作製した。オウゴンの baicalin については、カルボジイミド法により直接キャリアタンパクに結合し、免疫原を作製した。いずれのコンジュゲートも、免疫原のキャリアタンパクとして BSA を用い、ELISA 用固相化抗原では ovalbumin を用いた。得られた免疫原をマウス腹腔に投与し血中抗体価上昇を確認した後、脾臓を摘出、脾細胞を調製した。調製した脾細胞とミエ

ローマ細胞を混合し、PEG を滴下することで細胞融合を行った。続いて、HAT (hypoxanthine, aminopterin, thimizine) 培地で細胞を培養することで選択的にハイブリドーマを得た後に、限界希釈法により目的の抗体産生ハイブリドーマをクローニングした。クローニングの終えたハイブリドーマを無血清培地で大量培養した後、培地中に分泌された MAb を protein G アフィニティーカラムを用いて精製し、これを ELISA 用一次抗体として用いた。ELISA としては、イムプレート上での固相化抗原と遊離抗原との競合による競合的 ELISA を採用した。

##### 2. Ginsenoside Rb1, Rg1 に対する MAb を用いた同時分析キットの開発

膜へのトラップ用の G-Rb1-HSA, G-Rg1-HSA をそれぞれニトロセルロース膜上の適当な位置に塗布し、吸着させた。続いて、抗 G-Rb1 MAb, 抗 G-Rg1 MAb を金コロイド標識し、コンジュゲーションパッドに装着することでスティック状キットを作製した。ニンジンエキスをスティック下部に浸すことで、膜上をサンプルが移動し、その過程でサンプルと金コロイド標識抗体が複合体を形成する。この複合体並びにサンプル中の g insenoside と複合体を形成しなかった標識抗体が、膜状の固相化抗原上を通過する際、遊離の標識抗体が補足されることで生じる赤紫色のスポットの発色強度を測定し、g insenoside 含量を算出した。

## B. 研究結果と考察

オウレンの berberine, coptisine, parmatine に対して親和性を有する MAb が得られた。本 MAb を用いて競合的 ELISA を確立した結果、1.56  $\mu\text{g/ml}$  ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で正確な分析が可能なが判明した。また、旧来の HPLC 法による分析結果と良好な相関が得られ、信頼性の高い分析法であることを確認した。本法を用いて、オウレン並びにオウレン配合漢方製剤中の berberine 関連化合物の含量を分析した結果、本手法により極めて多種類の成分の混在したサンプルについても高い精度を持って分析可能であることを証明した。

オウゴンの baicalin に対する MAb は、baicalin のアグリコンである baicalein に対して高い親和性を示すことが判明した。

さらに、Ginsenoside Rb1, Rg1 分析用キットを作出し、その性能を評価した。本キットは、競合的 ELISA を応用しており、スポットの発色強度の低下の度合いが、サンプル中の ginsenoside 含量を反映することとなる。本キットの検出限界について調査した結果、2  $\mu\text{g/ml}$  の検出感度を有することが明らかとなり、続いて各種ニンジンエキスを分析した結果、発色強度から算出されるエキス中の含量と ELISA の定量値に高い相関性を認めることが出来た。

## C. 結論

オウレンとオウゴンの薬理活性成分に対する MAb を作製し、本抗体を活用して、簡便・高感度な分析法を確立した。本法は、生薬オウレン・オウゴンの複数の成分含有量の測定法として有用であり、有機溶媒を必要としない環境に優しい次世代型の分析法である。

ニンジンの有効成分である G-Rb1, G-

Rg1 の分析キットを完成させた。本キットの検出限界は 2  $\mu\text{g/ml}$  であり、極めて簡便であり、目視判定が容易な現場測定に適した手法である。

D. 健康危険情報  
特になし。

## E. 研究発表

### 1. 発表論文

1. Putalun W, Taura F, Qing W, Matsushita H, Tanaka H, Shoyama Y, Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants, *Plant Cell Rep.*, **22** (5): 344-349, 2003,
2. Lu ZH, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y, A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines, *Biol. Pharm. Bull.*, **26** (6): 862-866, 2003.
3. Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y, A one-step immunochromatographic assay for detecting ginsenosides Rb1 and Rg1, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378** (5): 1338-1341, 2004.
4. Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis, *Neurochem. Int.*, **44** (5): 321-330, 2004.
5. Zhu SH, Shimokawa S, Tanaka H, Shoyama Y, Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies, *Biol. Pharm. Bull.*, **27** (1): 66-71, 2004.
6. Kim JS, Tanaka H, Shoyama Y, Immunoquantitative analysis for berberine

and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines, *Analyst*, **129** (1): 87-91, 2004.

7. Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y, A one-step immunochromatographic assay for detecting glycyrrhizin, submitted.
8. Tanaka H, Fukuda N, Shoyama Y, Identification and Differentiation of *Panax* Species by Using ELISA, RAPD and Eastern Blotting, submitted.
9. Kim JS, Tanaka H, Shoyama Y, Development of the monoclonal antibody-based ELISA for the isoquinoline alkaloid coptisine and its application to the screening in medicinal plants, submitted.

## 2. 学会発表

1. Zhaohua Lu, Tadashi Masaki, Hiroyuki Tanaka and Yukihiro Shoyama, Expression, purification and characterization of a functional anti-paeoniflorin single-chain Fv in *Escherchia coli*, 日本薬学会第123年会 (長崎)、27 【P1】 I-137
2. 正木 雅、田浦太志、田中宏幸、正山征洋、Glycyrrhizin 特異的scFv の作製と大腸菌での発現日本薬学会第123年会 (長崎)、27 【P1】 I-138
3. 来海温子、西里洋平、山門亜喜代、吉田瑞樹、田中宏幸、平山総良、正山征洋、免疫化学的手法による黄精品質評価法の開発、日本薬学会第123年会 (長崎)、27 【P1】 II-142
4. 森永 紀、田中宏幸、正山征洋、Sorasak Lhieochaiphant、Waraporn Putalun、抗sennoside A、B モノクローナル抗体によるconcurrent ELISA およびイムノクロマトグラフ法を用いた迅速分析キットの開発 (長崎)、日本薬学会第123年会、28 【P1】 \_-124

5. Waraporn Putalun、森永 紀、Sorasak Lhieochaiphant、田中宏幸、正山征洋、免疫化学的手法によるセンノシド迅速分析キットの開発、(社)日本植物園協会第38回大会・総会(群馬)第10回研究発表会 研究発表要旨 p.9
6. 金俊植、田中宏幸、正山征洋、抗ベルベリンモノクローナル抗体を用いたELISA と HPLC 法の相関、日本生薬学会第50回年会(東京)、要旨集 p.188

## G. 特許出願

特になし。

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

組換え植物の作出に関する研究及び生態系に及ぼす影響解析

分担研究者 鎌田 博

所属・職 筑波大学生物科学系・教授

研究要旨

有用な2次代謝物質の生産を改善する遺伝子組換え薬用植物を育成し、カルタヘナ担保法に基づく環境影響評価を実施するため、モデル系として *Agrobacterium rhizogenes* を用いた形質転換を行い、本年度はペラドンナにおいて毛状根を誘導した。今後、この毛状根から植物個体を誘導し、特定網室での栽培、隔離圃場栽培を行い、花粉飛散性、交雑性、土壌微生物への影響等の環境影響評価を実施する。また、環境影響評価項目の設定とデータの取得・解析方法を検討するため、ペラドンナ及びニンジンモデル材料とし、生態特性や遺伝子多様性について調査を行った。ペラドンナにおいては、風媒性は認められず、虫媒を主とすることが明らかとなった。また、野生ニンジンについて、生態特性（生息域、繁殖特性等）や虫媒性・交雑性に関するデータを取得・解析した。

A. 研究目的

1970年代半ばに開発された遺伝子操作技術の発展に伴い、高等植物においても、自然の遺伝子組換え現象である *Agrobacterium* 菌を活用した遺伝子導入技術が一般化し、各種農作物において有用な遺伝子組換え植物が育成され、その栽培の拡大と共に、食品としての利用が拡大している。このような遺伝子操作技術や分子生物学技術の急速な発展に伴い、各種薬用植物が生産する多様な有用2次代謝物の合成酵素遺伝子が単離されつつあり、当該遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物の育成が進められており、2次代謝物の生合成経路の解明ばかりでなく、有用2次代謝物の効率的生産や新規な化合物の生産を目指した研究も活発に行われるようになってきた。

一方、多様な遺伝子組換え生物の開

発・利用に伴い、食品としての安全性ばかりでなく、環境への影響についてもさまざまな議論がなされるようになり、有用な生物資源の減少をくい止めることを目的とした生物多様性条約の中で、遺伝子組換え生物の国境を越える移動に関する国際条約（カルタヘナバイオセーフティ議定書）が締結され、我が国においても平成15年3月にその担保法としての遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（通称、カルタヘナ担保法）が制定された。

このような国内外の情勢に鑑み、開発が進められつつある遺伝子組換え薬用植物についても、効率的かつ安全性の高い育成技術の開発ばかりでなく、環境への影響を調査・検討する研究を実施する必要が生じた。そこで、本研究では、ペラドンナを中心とする数種ナス科植物を中

心に、*Agrobacterium* 菌を用いた遺伝子組換え植物育成技術の開発を進めつつ、環境への影響を評価する際に必要となる項目の検討ならびにデータの取得・解析方法を検討することとした。

## B. 研究方法

### 1. 薬用植物における遺伝子組換え体の作出および環境影響評価

ベラドンナを中心に、数種ナス科植物を材料とし、*Agrobacterium rhizogenes*を感染させて毛状根を発生させ、毛状根から組織培養技術によって植物個体を再生させて遺伝子組換え植物を得る。この植物体は自然界でも生じるものであるため、カルタヘナ担保法上の規制は受けないものの、モデルケースとして同法上の取り扱いに則って実験室内で栽培し、特性解析や2次代謝物（トロパンアルカロイド）の定性・定量分析等を行う。その後、カルタヘナ担保法で定められている特定網室において自然光下での栽培試験を行い、その特性解析、土壌微生物への影響、花粉飛散性、他植物との交配の有無、他植物の生育への影響等、カルタヘナ担保法上の第1種使用の申請の際に求められる環境影響評価項目についてデータの取得とデータ解析手法を検討する。最終的には、自然界でも生じうるものであることから大臣承認は必要ではないものの、隔離圃場試験を行い、法律上定められている項目に関する環境影響評価試験をモデルケースとして実施する。なお、本年度は、遺伝子組換え植物の育成に時間がかかる制約上、毛状根の作成までを実施し、その後の試験は次年度以降、遺伝子

組換え植物の生育状況に応じて順次実施する。

一方、他の分担研究者が単離する有用2次代謝物合成酵素遺伝子について、植物個体中での発現を可能とするプロモーターへの連結、植物への遺伝子導入ベクターへの組み込み、*Agrobacterium*菌への導入を行い、当該分担研究者に渡して遺伝子組換え薬用植物の作出を支援する。

### 2. 環境影響評価項目の検討

3年の限定された期間内に、有用遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物を実際に作出し、特定網室試験を経て隔離圃場試験を実施し、環境影響評価を実施することは不可能なことから、カロチノイド合成酵素遺伝子の解析が進んでおり、我が国に交配可能な野生植物が自生し、かつ、有用な遺伝子組換え体が既に育成されているニンジン (*Daucus carota*)、および、薬用植物のモデルとして栽培が容易なベラドンナを材料とし、非遺伝子組換え植物の生態特性（生息地や生育特性、繁殖特性、他種植物との競合性等）、花粉飛散性（風媒性、虫媒性等）、交雑特性、遺伝子多様性等、環境影響評価を実施する際に必要となる各種項目について調査し、基盤となるデータの蓄積およびデータの解析手法の検討を行う。なお、このような環境影響評価に必要な項目については単年度でのデータ取得は不可能であることから、年度毎に取得できる項目から順次データを蓄積・解析する。

## C. 研究結果

## 1. 薬用植物における遺伝子組換え体の作出および環境影響評価

ベラドンナの種子を滅菌後、ジベレリンを含むMS固形培地上に播種し、発芽個体を得た。この実生および無菌のスコポリア植物体から単離した葉の切片に*A. rhizogenes*1724株及び*A. rhizogenes*A4株を感染させ、MS固形培地上で培養し、毛状根を発生させた。この毛状根を抗生物質（クラホラン）を含むMS固形培地上で培養し、無菌の毛状根を得た。この毛状根については、現在MS培地で増殖を行っており、T-DNAが導入されていることを確認次第、サイトカイニンを含むMS固形培地に移植して植物個体を再分化させる予定である。

一方、他の分担研究者が単離・解析した2次代謝物合成酵素遺伝子としてダイオウ (*Rheum palmatum*) から単離されたベンザルアセトン合成酵素遺伝子及びピーナッツ (*Arachis hypogea*) から単離されたスチルベン合成酵素遺伝子の各々について、CaMV35Sプロモーターの下流に配置したコンストラクトを構築し、植物への遺伝子導入ベクターであるpBI121系のベクターに挿入し、*A. tumefaciens*4404株に導入した。現在、ベクターが導入された菌株の最終確認を行っており、確認が終了次第、当該分担研究者に送付する予定である。

## 2. 環境影響評価項目の検討

ベラドンナについては、現在実験室内で複数の植物個体を育成中であり、次年度以降、圃場栽培における特性解析を実施する予定である。なお、試験的に栽培していた1個体について、人工的な風（扇風機による風）による花粉の飛散性を調査した結果、強風下においても風による飛散は認められず、花の構造から判断し、ベラドンナは虫媒性であり、自花受粉性もあると判断された。

ニンジンについては、文献調査の結果、

日本には野生種（ノラニンジン）が存在し、日本海側を中心とする各地に自生することが明らかとなった。そこで、北海道の自生地を中心に、生態調査を実施し、人の手が恒常的に入る道路端（除草作業が行われたり、道路工事が行われている場所）や瓦礫の多い海岸に生息し、他の植物との競合が起きにくい場所を生息地とすることが明らかとなった。また、多くの種子は春から夏にかけて発芽し、順調に生育した個体が冬の低温にさらされることで抽苔（花芽が形成される）し、春から伸長生長を開始し、夏前頃から開花することも明らかとなった。さらに、自殖弱性が極めて強く、虫媒による交雑によって種子繁殖し、農作物として栽培されている栽培ニンジン（同種である）との交雑も容易に起こることが明らかとなった。現在、遺伝子多様性を解析する方法についてPCR法を基盤とする方法を検討しており、次年度は遺伝子多様性の解析を中心に、訪花昆虫の種類と花粉媒介昆虫の同定等を実施する予定である。

## D. 考察

高等植物への遺伝子導入法としては、*Agrobacterium*菌を用いる方法ばかりでなく、直接導入法としてボンバードメント法やプロトプラストへのエレクトロポレーション法等があるが、直接遺伝子導入法においては、多数コピーが同時に導入される例や断片化した遺伝子がタンデムにつながった形で導入される例が多いことが知られており、このような導入形態は安全性の観点及び遺伝子組換え系統毎の検知の観点からは好ましくない特徴であり、*Agrobacterium*菌を用いて1コピーが導入されている系統を探索する方法がより望ましいと考えられる。そこで、本研究では、*Agrobacterium*菌を用いる方法を採用することとした。現在、得られた毛状根について、導入遺伝子のコピー数や構造等を検討しており、完全な形

で1コピーのみ導入された系統を選抜中である。

有用な2次代謝物合成酵素遺伝子の導入については、本研究では、機能領域の解析が進んでいる構成的な発現を誘導する強いプロモーターを用いたが、発現部位や発現量を人為的に制御することが今後は重要である。組織特異性や発現量を制御する植物プロモーターの解析は近年活発に行われているが、植物の2次代謝物合成についてはほとんど解析が進んでおらず、薬用植物は生薬原料として利用されることが多い点を考えると、安全性の観点からは、2次代謝物の合成・蓄積部位を適切に把握し、人為的に制御する方策を検討することが必須であり、2次代謝物合成酵素遺伝子を中心に、そのプロモーター解析を実施することが今後の重要な課題であろう。

遺伝子組換え生物の環境影響評価については、国際条約である生物多様性条約カルタヘナ議定書が締結され、それを担保する国内法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）が制定され、本年2月19日より施行された。この法律に基づく環境影響評価については、概念的な評価項目は設定されているものの、具体的な評価項目やデータの取得・解析方法が定まっておらず、具体的な事例をもとに今後の検討が待たれるところである。本研究では、3年の研究期間が定められており、実用的な遺伝子組換え薬用植物を育成し、実験室内実験、特定網室実験、隔離圃場実験、一般圃場実験と順を追って試験を実施する（各段階毎に2年程度かかる）ためには時間的な制約が大きいので、モデルケースとして、自然の遺伝子組換え現象である*Agrobacterium rhizogenes*菌の感染によって生じる形質転換器官である毛状根、および、毛状根から生じる再分化植物個体（形質転換植物）を用い、カルタヘナ担保法に準拠した形で環境影響

評価を実施することとした。この毛状根系を用いれば、自然現象としての遺伝子組換え体（ナチュラルオカレンス）であるため、カルタヘナ担保法の適用は受けず、大臣確認や大臣承認を受けずに実験を実施することができる。本年度は、薬用植物のモデルとしてペラドンナを用い、毛状根の誘導を行っており、次年度以降の環境安全性評価のため、非遺伝子組換えペラドンナの栽培を開始した。現在、花粉飛散性について調査を開始しており、その花の構造から推測されたとおり、風媒性はなく、主に昆虫によって受粉が媒介される（虫媒性）ことが明らかとなった。次年度以降は、繁殖特性や花粉媒介昆虫の同定などを進める予定である。また、生物多様性条約で最も重視されている生物多様性や遺伝子多様性への影響を評価するためには、我が国に野生種が存在することが条件となり、本研究では、カロチノイド合成に関する研究の主材料となっており、野生植物（ノラニンジン）が存在するニンジンを用い、環境影響評価を実施することとした。初年度であることから、自生地の環境、繁殖特性、虫媒性、交雑性等の調査を行い、基礎データの取得を行った。しかし、生態特性の解析・決定には数年のデータ蓄積が必要であり、次年度以降も調査を続ける必要がある。また、これまでほとんど解析手法が決定されていない、遺伝子多様性を解析することが重要であり、現在、PCR法を基盤とする解析手法を検討中であり、次年度以降、実際の野生集団における遺伝子多様性を評価する予定である。

## E. 研究発表

1. 論文発表  
該当無し
2. 学会発表  
該当無し



F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し