

## 遺伝子組換え食品 Q&A

### <現在の目次>

#### A 組換えDNA技術の知識～基礎編

- A 1 「ハイオテクノロジー」とはどのようなものですか
- A 2 DNA や遺伝子とはどのようなものですか。
- A 3 遺伝子組換え技術（組換えDNA技術）とはどのような技術ですか。
- A 4 遺伝子組換え技術と従来の品種改良との違いを教えてください。
- A 5 遺伝子組換え技術はどのような食品に応用されていますか。
- A 6 遺伝子組換え技術を応用して、組換え体そのものを食べない食品添加物を作る場合とは、どのようなものですか。

#### B バイオテクノロジーの知識～応用編

- B 1 除草剤に枯れない仕組みとはどのようなものですか。
- B 2 雄性不稔性（ゆうせいふねんせい）、稔性回復性（ねんせいかいふくせい）とはどのような性質ですか。

#### C 遺伝子組換え食品の安全性審査の手続き

- C 1 今までに安全性審査を経た遺伝子組み換え食品を教えてください。
- C 2 遺伝子組換え食品の安全性審査はどのような手続きで行われるのですか。
- C 3 遺伝子組換え食品の安全性審査はどのように行われるのですか。
- C 4 申請業者が作成した資料のみに基づいて審査を行っても大丈夫なのですか。
- C 5 遺伝子組換え食品の安全性の審査は安全性審査基準の内容で十分であると考えられるのですか。
- C 6 安全性審査を受けずに遺伝子組換え食品を国内で販売することはできるのですか。
- C 7 安全性審査が適切になされていないと判断した場合には、厚生労働省はどのような措置を取るのですか。

#### D 遺伝子組換え食品の安全性

- D 1 「生産物が既存のものと同等と見なし得る」「実質的同等性」とは、ということですか。
- D 2 安全性評価のポイントは何ですか？
- D 3 遺伝子組換え食品がアレルギーを引き起こすかどうかについては、どのような確認をしたのですか。

- D・4 遺伝子組換え食品でアレルギーを起こした例があると聞きましたが、本当ですか。
- D・5 毎日食べる食品に用いられる遺伝子組換え食品は、高い安全性を確保する必要ありますか、長期の毒性試験（慢性毒性試験）を行っていないのはなぜですか。
- D・6 作物中に新たな有害物質が作られることはありませんか。
- D・7 作物に含まれる既存の有害物質の量が増えることはありませんか。
- D・8 害虫抵抗性の遺伝子組換え食品には、害虫を殺す蛋白質が入っていると聞きましたか、ヒトが食へても問題はないのですか。
- D・9 英国で遺伝子組換えのジャガイモをラットに食べさせたところ、免疫力の低下が見られたという報告があったそうですか、本当ですか。（パスタ博士の報告）
- D・10 害虫抵抗性の Bt コーンの花粉で目的とする害虫以外の昆虫が死んだという報告があったそうですか、本当ですか。
- D・11 抗生物質耐性マーカー遺伝子が入っている作物があると聞きましたが、大丈夫なのですか。
- D・12 大腸菌由来の遺伝子が用いられていると聞きましたが、病原性大腸菌 O（オー）157 のような病原性はないのですか。
- D・13 在来植物など、環境への影響はないのですか。
- D・14 トリプトファン事件の経緯やその後の経過、原因（遺伝子組換えであったことによるものなのか）などについて教えてください。
- D・15 後代交配種について、個別に安全性審査が必要になるのはどのような場合ですか。
- D・16 本年5月以降、安全性未審査の遺伝子組換えしゃかいもか混入していたスナック菓子が発見されていますか、調査結果を教えてください。

## E 諸外国の状況

- E・1 諸外国での規制の状況はどのようになっているのですか。
- E・2 EU では新たな遺伝子組換え食品の承認を凍結していますか、なぜですか。

## F 情報公開

- F・1 安全性審査に用いた資料等については公開されているのですか。
- F・2 薬事・食品衛生審議会は傍聴できますか。

## G 行政の取り組み、その他

- G・1 国は安全性確保のために、モニタリング検査（抜き取り検査）をすべきではないでしょうか。
- G・2 国として、安全性確保のためにどのような研究を行っているのですか。

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
（分担研究報告）

ハイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究  
諸外国におけるリスク管理、ポストマーケティングに関する研究  
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

遺伝子組み換え作物・食品（GMO）の安全性は、究極的には市場で消費された結果を慎重にトレースすることで評価される。従って、生産 販売・消費実績が先行している、欧米の事例の状況調査は、我が国の対応を考える上で有益である。そこで欧米諸国の現状調査および国内の GMO 関係者に対しインタビューを行った。

その結果 GMO を原料とした食品に関して、ポストマーケティングモニタリング（PMM）を組織的 継続的に実行している国・地域はまたなく、また具体的な実施計画を策定している事例も調査範囲内で見出せなかった。例外として米国でスターリンク（Aventis 社が開発した飼料用害虫抵抗性 GM トウモロコシ）が 2000 年に食料に混入したため、追跡調査を限定的に行なったか有害事象は発見されなかった。そもそも欧米での GMO 利用は現状では大部分が飼料用や食用油であるため、直接人への影響は想定していないと見る向きが多いようである。

今後の課題として、特に EU では NGO などが独自調査を行っている可能性があり、更なる調査が必要である。また近々米国で GM 小麦の生産・販売が許可される予定であり、GMO 由来蛋白質が大規模に人に摂取されることになり、PMM 論議の見直しも予想される。最近日本でも限定的ながら GMO 食品が販売されており、追跡調査が可能であるかを評価することも重要である。

協力研究者

木村 廣道（東京大学大学院薬学系研究科  
ファーマコビジネス・イノベーション教室  
客員教授）

しかし依然として一般消費者の行動は慎重で、一部の例外を除いて国内の消費実績は限定的である。

これらの食品は科学的根拠に基づいた研究 評価の結果、安全性を担保して行政府が生産販売を承認するというプロセスを経た上で消費者に届くわけで、それ以上のことをする必要はないとの意見が主流である。しかしながらその一方、一部の消費者を中心に、現代の科学では発見できない問題や、予想がつかない毒性、長期にわたる摂取

A 研究目的

遺伝子組み換え食品の安全性については、さまざまな議論があるか、現実に厚生労働省はそれらの輸入販売の許可を与え、一定の表示義務のもと日本国内で販売されている。

初めて発生する問題があるかもしれないというような漠然とした不安を持つ人が多くいることも事実であり、どのようにして安心を求めるかは議論が分かれている。究極的には医薬品同様、上市以降市場での状況を長期間疫学的に観察しその結果何か問題となる有害事象が見出せるかで評価されると考えられる。この遺伝子組み換え作物の生産・販売実績のある欧米で、この問題に対しどのように考え取り組んでいるかの状況を調査することは、今後日本がとるべき判断の参考となるばかりでなく、将来の世界統一基準作りを模索する必要性が出てきた場合に有用であると考えられる。無論農業や食品の問題は、その国や地域のローカルな生活習慣、食習慣、価値観に大きく依存しており、日本での関係者、特に欧米の事情に詳しい人たちの見解は今後の政策立案の過程で欠くべからざるものであり今回の調査研究に同時取り上げた。

## B 研究方法

文献検索は主にインターネット検索により進め、アメリカ、EU、主なヨーロッパの現状を調査した。検索の結果あがってきた関係する文献、報告書、あるいは記事などについて内容を分析、評価すると同時に、その内容に関係する専門家を探し出しインタビューを申し入れた。

インタビューは2、3のアメリカの例外を除き、国内の関係者に対し面談を申し入れて行った。匿名を希望という場合は匿名を約束した。直接会えない場合は電話でのインタビューに代えた。

インタビューを受け入れ、話ができたのは

以下のとおりである。

- (1) 日本政府関係者
- (2) 外資系農業企業日本人
- (3) 日本食品企業大手数社
- (4) 外資系食品企業
- (5) ハイオベンチャー企業
- (6) GMO検知サービス企業
- (7) 学識経験者、研究者

今回の調査は問題の性格上インタビューはほとんど匿名希望であり、データも公開できないとされた。そのため調査研究の結果は、あまり具体的にならずデータも添付できないため第三者が検証できるような形式を取れないものにならざるを得ず、問題の難しさを改めて認識した次第である。

## C 研究結果

### (1) 概観

遺伝子組み換え食物を原料にした食品について、その安全性を確認する目的で市場での追跡調査をする必要があると考えている人たちは、現在のところ極めて少数派であると考えられる。特にアメリカでは組み換え作物開発会社と行政が安全性については科学的な根拠に基づいて必要十分な検討を行って審査・承認をしているという自信と一般消費者からの信頼感は厚く、一般消費者から念のためさらに何かをすへきであるという要求は顕在化していないようである。

方ヨーロッパではイギリスなどGMO反対運動が根強い国があるが、環境に対する影響など生産に焦点をあてた反対運動が主流のようだ。上市後もヒトへの安全性の追跡調査を行うべきであるという意見は一部であるようだが具体的な提案になっている

とはいえない。

今回の調査範囲では、ポストマーケティングモニタリング（PMM）を現在組織的に実行している国・地域は発見できていない。無論一部の組織（NPOなど）や個人がこのようなPMMを実施している可能性を否定できないが、一般にはある程度の集団を相手にする必要があるので現在進行中のPMMの情報が外に流れるのを防ぐのは困難であると考えられる。さらに、具体的なPMMの計画を策定・提案している事例も今回発見されていないが、これについては、また特定はされていないか議論しているグループもあるといわれている。PMMを実施するには多くの人たちの協力とコストが必要であり簡単には実現しないと想定しているか、とこかで政府に対し実施要求が出てきてもおかしくない状況である。

（2） スターリンクトウモロコシの例  
遺伝子組み換え作物が直接人の食料となって問題となり追跡調査が行われた唯一の例としてアメリカで実施された。

スターリンクは Aventis 社の前身である、Hoechst Schering AgrEvo 社が開発した害虫抵抗性遺伝子組み換えトウモロコシであるか、アメリカでは飼料用としてのみ販売が許可されていた。しかしながら、これか人の食料に混入したことが後に発見され問題となった。アメリカでは生産される大部分のトウモロコシは飼料用であるか、一部は食料として消費される。実際にこのトウモロコシは加工されコーンチップなどの原料となりヒトの食料に供されたことが判明、有害事象が発生したかどうかの追跡調査が行われた初めてのケースとなった。

結果の詳細は、米国食品医薬品局（FDA）疾病管理 予防センター（CDC）が 2001 年 6 月 11 日付けて発行したレポート、

「Investigation of Human Health Effects Associated with Potential Exposure to Genetically Modified Corn」に記述されている。これによると、FDA の初期の対応は以下の通り。

- ① 報告された有害事象が食物摂取によるものであったかどうかを検討する。
- ② 別途設定した対象症例に当てはまる症状を示した個人から後々の検査に必要な血清を得る。
- ③ Cry9c（スターリンクに導入された害虫抵抗性遺伝子由来の蛋白質）に特異的な血清学的検査法の確立とその評価

以上にに基づき、FDA は 2000 年 7 月 1 日から 2000 年 11 月 30 日までに届出のあった有害事象全てを対象に、トウモロコシを含む食品摂取があった事例に対して、報告に基づいて順位付けをして、CDC に送付した。この初期報告では、個人情報を含まない形で通告を行った。

報告を受けた CDC では、調査対象を下記の判断基準を用いて絞り込んだ。

- ① アナフィラキシーショックの疑い例（食物摂取から 1 時間以内の事象）
- ② 皮膚もしくは口腔咽頭系の症状を示した例（食物摂取から 12 時間以内の事象）
- ③ 消化器系の症状を示した事例（食物摂取から 12 時間以内の事象）
- ④ 既往歴などからは説明できない突発事象

FDA は有害事象報告を行った全ての個人へ CDC への個人情報の通知を打診した。

CDCは有害事象報告を評価後、対象となった個人に対し、聞き取り調査を行い、血清採取の協力を依頼した。

経緯

- 51人の有害事象報告をFDAから取得
- 23人は対象例に該当せず
- 28人が該当
  - 25人についてFDAからの個人情報取得
  - うち1人については接触するも応答なし
- 24人の内訳 年齢5-74歳(平均36歳)、男13人、女11人で、17人から血清を採取

症例分析結果(24人)

- 10例 急性症状(多くは複合的)
  - 1例 意識喪失
  - 2例 脱力感もしくはめまい
- 24例中19例は手当てを受けた(自己手当ても含む)
- 2例が入院

血清分析手法

検査目的 アレルギー症状の指標である特異的IgEの抗体価とアレルギー症状との相関を検討する。

検査対象 Cry9c蛋白質特異的なIgE

検査方法 ELISA法(FDAにより確立)

検査グループ

- A 対象症例17人から得た血清
- B アレルギー体質患者からの血清6例
- C StarLink作付け認可(1996年)以前の血清21例

結果

A, B, Cいずれのサンプルともに、ネガティ

ブであった。このとき、Cry9c蛋白質を免疫したヤキから採取したIgG等をポジティブコントロールとしたが、これらは本方法で検出可能であった。

結論

Cry9c抗体価と有害事象の相関は検出不能であった。

問題点

- Cry9cに関して直接のポジティブコントロールとなるヒト血清が存在しない
- IgEのみを対象とした検査であり、他の抗体については未知数である。
- IgEの検出を伴わない食物アレルギーの症例が報告されている。

(3) 遺伝子組み換え納豆(日本)

北海道のハイオベンチャー、有限会社A-HITB10(本社 札幌市中央区、代表者 他田順子社長)が、2003年11月28日より、日本で初めて「遺伝子組換え」表示を付けた納豆の生産販売を開始した。このDr.富ちゃんの『納豆のススメ』は、北海道大学名誉教授の富田房男氏により開発された納豆で、原料にはモンサント社が開発した米国産除草剤ラウンドアップ耐性遺伝子組換え大豆を95%使用している。

この製品発表のプレスリリースにおいて、富田氏は、「遺伝子組換え作物は、安全性が十分に立証されているにもかかわらず、日本の消費者が口にする機会がないため、実際に消費者が遺伝子組換え食品を食べられる機会を作りたい」と正面から取り組む姿勢を鮮明にしている。実際インタビューでの会話においても、製品が消費者の支持を得ている点や、問い合わせも好意的なものが中心で、有害事象などのトラブルの報告

や批判的なものや妨害するような動きはほとんどないようだ。一般の納豆よりかなり割高であるが売れ行きも好調ということで自信を深めている。この商品の狙いは無論遺伝子組み換え食品についての不安心理を少しでも軽減することに役立ちたいということであり、マスメディアの反響はものめずらしさも手伝って大きいものがあるが、一時の流行がさめたときにどのように消費者のニーズにこたえられるか課題である。すなわち、この遺伝子組み換え大豆はあくまでも生産者のヘネフィットのために開発されたものであり、消費者の利益とうたっている食味のよさはGMOとまったく関係かない。さらに本来生産コストを下げるはずのこの種の遺伝子組み換え作物は、末端価格に反映されて始めて消費者の支持を受けることになる。この納豆のススメは高価格戦略をとっているようにその点で矛盾があり、遺伝子組み換えという話題性が一転マイナスになるリスクを抱えているため心配する向きもある。一方、現在のところ販売方法は注文をファックスかインターネットでのみ受け付けるということで、消費者に対して直販をしていることは注目に値する。ほぼ完全な消費者のデータヘースを管理していることになるので、技術的には追跡調査ができる体制をもっていることになる。今のところ会社として積極的に追跡調査をしている形跡はなくその計画もないようだか、世界で唯一の遺伝子組み換え大豆タンパクを摂取している集団のリストであることはほぼ間違いのないと考えられる。

#### (4) 米国の小麦の動き

モンサント社は既に害虫抵抗性遺伝子組み換え春小麦の商業生産の申請をしておりこれは近々認可される模様である。また、ヨーロッパにおいても許可が下りるとされていて、ヨーロッパ、日本の反対派も警戒感を強めている。世界的に見て小麦は大豆より人が直接摂取する比率が高い作物でありこの遺伝子組み換えタンパクにより多くの人かさらされることになり影響度はより大きいと考えられる。広範囲に大量に摂取されるということアメリカでも慎重な対応を求める声が上がっているようである。日本は小麦の90%以上を主にアメリカからの輸入に頼っていることから直接の影響を受けることは避けられない。

#### (5) 第二世代遺伝子組み換え作物

新しい機能・栄養などを付加することを目的に遺伝子組み換えをする作物については、この組み換え新規タンパク質の存在がより濃厚であるという観点から、長期的な安全性を追跡すへきてあるという議論をする専門家が見受けられた。

同時に、特定な栄養素などを特定の作物から長期間にわたり摂取するという新たな食習慣を形成した場合に栄養のバランスが変わり別次元の予期していない問題を抱えることになりかねないと警鐘を鳴らす専門家もいた。

#### D 考察

遺伝子組み換え作物についてその安全性を議論しているのは、大別すると主に(1)生産地域における花粉などの飛来に基づき、環境の遺伝子汚染(2)遺伝子組み換え作物を飼料として用いた際の動物を経由した

人への間接的影響。(3) 人が遺伝子組み換え作物を食品として直接摂取することで生じうる毒性、などがある。

根本的には遺伝子組み換え作物が大規模に商品として人の食料として供された場合に予測しきれなかった有害事象が発生し、問題がコントロール不能なまでに発展してしまう、というリスクをどのように予知・防止できるかであろう。これらの有害事象は直接的には遺伝子組み換えによる外来異種 変異タンパクの作用、あるいはペプチド断片が原因になりうると考えられる。ただしよく知られているように、現在の遺伝子組み換え作物は欧米の場合多くは動物の飼料として、または食料油に加工され市場にでるため、タンパク質が直接食料となる機会は限定的である。従って、このGMOが短期的に人の健康に悪影響をもたらすという深刻な問題に発展すると考えられていない。

ところが日本では事情が異なる。日本では1996-1998 までGMトウモロコシ、大豆がアメリカより輸入され一般の流通に乗り表示なしに一般の人たちの食料として消費されていた。当時の大豆、トウモロコシは平均20% - 30%がGMであったと推定（食用ハイグレードトウモロコシは50%程度がGM）されている。国産非GMOの大豆、トウモロコシは微量であることから、表示が義務化された1998年以降は組み換え食品は事実上市場から消えたため、大部分の国民がこの一定期間に限りGMOを摂取していたと考えられる。したがって1996年以前と以降1996-1998年の2群について過去にさかのぼって疫学的比較調査をすることは理論上可能であり、調査母集

団を十分大きくすれば何らかのことを科学的根拠に基づきいえる可能性かててくるので興味を持つグループも出てくる可能性がある。

日本の食習慣は欧米化されてきたというものの、まだ食品の中での穀物、豆類の摂取量は加工品を含めて欧米の人と比較して有意に多い。遺伝子組み換え技術かまずは植物体に応用され、穀類、豆類が商品化されている現状では欧米の事例や安全基準をそのまま日本に持ってくるのは疑問視するという立場もありうるであろう。

特に大豆はその豊富なタンパク質含有量から日本人にとっては重要なタンパク源となっているが、この大豆は世界の作付面積の60%が既にGMOとなっており、日本の食用大豆の75%は輸入に頼っている。現在の大豆製品である豆腐、納豆などはほとんどが遺伝子組み換えでないという表示をしていてこれが現在の消費者の判断であるとする、今後の供給に不安が募る。

## E 結論

今日本がすぐに行動に移るべく市販後調査のモデルは無く、当面は諸外国の動きを注意深く見守ることになろう。ただ、今後の展開によっては以下のことが重要になろう。

(1) アメリカ、ヨーロッパでは、GM小麦の許可・上市に伴い、従来作物より厳しい安全性基準の策定が議論される可能性があり、また、第二世代のGMOの動きとあいまってPMM論議の見直しが予想される。この周辺の動きを注意深く継続調査する必要がある。



(2) 日本においては、遺伝子組み換え大豆を原料として製造した豆腐、納豆、豆乳などの製品の発売状況を継続調査し、それぞれの製品についての販売方法を性格に把握する。また、消費者の状況を追跡調査が可能かどうかを判断し、さらにこのような調査が消費者の同意を得られるか考察が必要である。

(3) GMOの環境に対する影響や、飼料としての利用等については世界共通の課題が主流である一方、人の食料に供する面では、地域性を十分に考慮する必要がある。すなわち日本はその食習慣から、欧米に比してより穀物などを直接食料として摂取する傾向があり、そのため現状ではGMOの影響を欧米よりも受けやすいと考えられている。従って、PMMなど安心・安全を担保する基準や手法もその一部は日本で独自に準備をする努力が必要であるかどうかを評価すべきであろう。

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
（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、輸入タイズに含まれていたラウンドアップ・レディー・タイズ（RR タイズ）72粒から抽出した核 DNA について、そこに含まれる導入遺伝子である 35S-プロモーター CTP epsps 遺伝子領域を増幅する PCR プライマーと、ダイスの内生コントロール遺伝子である  $\alpha$  型  $\beta$ -コングルシニン サブユニット ( $\beta$ -con $\alpha$ ) 遺伝子領域を増幅するプライマーを作成し、これらの領域を PCR によって増幅し、その塩基配列を決定した。その結果、シーケンスを確定してきた導入遺伝子由来の増幅 DNA 断片 68 個において 34 カ所の変異が認められた。これに対し、 $\beta$ -con $\alpha$  遺伝子由来の増幅 DNA 断片 65 個において 37 カ所の変異が認められ、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こと、しかしタンパク質のオープン・リーディング・フレーム領域について調べたところ、導入遺伝子においてアミノ酸置換を生じさしめるような突然変異は非常に少なく、安定性が高いことがわかった。

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

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かどの程度であるのか、特に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。これまでの研究において、輸入タイズに含まれていたラウンドアップ・レディー・タイズ（RR タイズ）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た。そこで、本年度においては、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、輸入タイズに含まれていた 72 粒のラウンドアップ・レディー・タイズ（RR タイズ）一粒ことから抽出した核 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  $\alpha$  型  $\beta$ -コングルシニン サブユニット ( $\beta$ -con $\alpha$ ) 遺伝子における点突然変異の頻度と比較することをを行った。

B 研究方法

<試料>

輸入タイズは、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 ダイス核 DNA の抽出

RR ダイス核 DNA については、協力研究者の青森大学工学部・佐々木和生博士が検疫所においてモニタリング用に採取されたダイズから抽出し、公定法にある方法で RR ダイスであることが確認された核 DNA の譲渡を受けた。

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

これまでの研究において輸入ダイズに含まれていた RR ダイスから、導入遺伝子である 35S CTP epsps 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、その領域から 600 bp の長さの DNA 断片が増幅されるプライマー対、CHM-1 (27 mer) と CTP (25 mer) (図 1) を作成し、またコントロール用として内生遺伝子である  $\beta$ -con  $\alpha$  遺伝子に対して 610 bp の長さの DNA 断片が増幅されるプライマー対、C-1 と C-2CR (図 1) を作成した。RR ダイス各粒由来の核 DNA をテンプレートとして、5  $\mu$ l の 10 $\times$ Ex Taq 緩衝液 (Mg<sup>2+</sup> 入)、250  $\mu$ M dNTP mix、2 pmol ずつのプライマーを含む 50  $\mu$ l の反応液を 500  $\mu$ l の PCR 反応チューブに作った。これに 30  $\mu$ l のミネラルオイルを重層し、PCR にかけて、95  $^{\circ}$ C 1 分間 denature させた後、反応チューブのフタを開け、0.5 units/ $\mu$ l の Taq polymerase を 1  $\mu$ l を加え、ホット・スタートした。反応チューブのフタを閉し、95 $^{\circ}$ C 30 秒  $\Rightarrow$  60 $^{\circ}$ C 45 秒  $\Rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分反応させ、4 $^{\circ}$ C とした。反応液から 10  $\mu$ l を取ってアガロース電気泳動で PCR 反応産物を確認した。反応産物について、epsps 遺伝子由来の増幅 DNA 断片については CHM-1 プライマーを用いて ABI シーケンス・キットによりダイレクト・シーケンスを行った。また、同時に epsps 遺伝子由来の増幅 DNA 断片および  $\beta$ -con  $\alpha$  遺伝子由来の増幅 DNA 断片について、ともにプラスミドにクローニングし、両方向から塩基配列の決定を行った。

#### C 結果・考察

##### C 1 RR ダイス核 DNA からの epsps 遺伝子断片および $\beta$ -con $\alpha$ 遺伝子断片の PCR による増幅

RR ダイス核 DNA に対して、CHM-1 と CTP をプライマーとして epsps 遺伝子領域とその周辺塩基配列部分を PCR によって増幅した。その結果、図 2 A に示すように予想される 600 bp のハンドのみが増幅されていることがわかった。そこで、これらについては、ダイレクト・シーケンスを行なうとともに、プラスミドにクローニングを行った。これに対し、 $\beta$ -con  $\alpha$  遺伝子領域を PCR によって増幅したところ、図 2 B に示すように予想される 610 bp の長さのハンドの他に約 300 bp の長さの DNA 断片が増幅されてくることがわかった。そこで、こちらについてはアガロース電気泳動後、610 bp の長さの DNA 断片のみを切り出してプラスミドにクローニングを行った。72 粒の核 DNA に対し、CHM-1 と CTP のプライマーによって DNA 断片が増幅されたのは 68 粒であり、4 粒からは増幅されてこなかった。同様に C-1 と C-2CR をプライマーとして  $\beta$ -con  $\alpha$  遺伝子領域を PCR によって増幅したところ、72 粒の核 DNA から DNA 断片が増幅されたのは 65 粒であり、7 粒からは増幅されてこなかった。この結果において、核 DNA が抽出の際に分解されて両者のプライマー対で DNA 断片が増幅されてこなかったケースもあったか、1 つの粒から抽出した核 DNA に対し、両方のプライマー対に対して DNA 断片が増幅されなかったのではなく、どちらか一方のプライマー対について DNA 断片が増幅されてこなかったものもあり、このことは抽出した核 DNA が分解されていたというのではなく、今回用いたプライマーに対する塩基配列に突然変異が導入されたケースもあると考えられる。一般的に PCR プライマーの 3' 端の数 bp の配列の 1 つに突然変異が入ると、アニーリング温度を極端に低くしないと DNA 断片が増幅されてこない、あるいは場合によっては全く増幅されてこなくなる。今回用いた PCR の条件は厳しい反応

条件であり、アニーリング温度を 60℃としており、プライマーの 3' 端の 6 bp 程度に当たる部分のダイス核 DNA の塩基配列の 1 つに突然変異が入っても DNA 断片が増幅されてこない条件となっている。この結果は以下に示すダイス・ゲノム DNA において予想外に高頻度の点突然変異が入っていることの 1 つの現れてあると考えられる。

#### C2 RR ダイスにおける *epsps* 遺伝子および $\beta$ -*con a* 遺伝子塩基配列に生じた点突然変異の検出

上記の PCR によって増幅されてきた DNA 断片の塩基配列を決定した。その結果、図 3 に示すように、*epsps* 遺伝子については、68 粒由来の核 DNA において、34 カ所に点突然変異が生じていることがわかった。その突然変異の結果として、4 カ所のアミノ酸に置換が見られることがわかった(図 4)。同様に  $\beta$ -*con a* 遺伝子については、65 粒由来の核 DNA において、37 カ所に点突然変異が生じていることがわかった。その突然変異の結果として、25 カ所のアミノ酸に置換が見られることがわかった。これらについて考察すると、まず塩基配列レベルで、*epsps* 遺伝子について、68 個体  $\times$  600 bp = 40 8 kbp 当たりに 34 カ所の突然変異、すなわち 12 kbp 当たりに 1 カ所の確率で突然変異が導入されていることがわかった(表 1)。これに対し、塩基配列レベルで、 $\beta$ -*con a* 遺伝子について、65 個体  $\times$  610 bp = 39 65 kbp 当たりに 37 カ所の突然変異、すなわち 107 kbp 当たりに 1 カ所の確率で突然変異が導入されていること、すなわち、塩基配列の突然変異率については、導入された *epsps* 遺伝子よりも内生の  $\beta$ -*con a* 遺伝子の方が突然変異率が若干高くなっていることが明らかになった(表 1)。またアミノ酸配列レベルで比較すると、今回塩基配列を決定した *epsps* 遺伝子のオープン・リーディング・フレームのアミノ酸配列は 49 残基であり、68 個体  $\times$  49 アミノ酸残基 = 3,332 アミノ酸残基当たりに 4 カ所のアミノ酸置換、すなわち 833 アミノ酸残基当たりに 1 カ所の確率でアミノ酸置

換を生じる塩基配列の突然変異が導入されていることがわかった(表 1)。これに対し、アミノ酸配列レベルで、今回塩基配列を決定した  $\beta$ -*con a* 遺伝子のオープン・リーディング・フレームのアミノ酸配列は 124 残基であり、65 個体  $\times$  124 アミノ酸残基 = 8,060 アミノ酸残基当たりに 25 カ所のアミノ酸置換、すなわち 322 アミノ酸残基当たりに 1 カ所の確率でアミノ酸置換を生じる塩基配列の突然変異が生じていること、すなわち、アミノ酸配列のアミノ酸置換を引き起こす突然変異率については、導入された *epsps* 遺伝子よりも内生の  $\beta$ -*con a* 遺伝子の方が突然変異率ははるかに高く、約 2.6 倍であることが明らかになった。

この結果について、塩基配列レベルで見た場合、*epsps* 遺伝子について 12 kbp 当たりに 1 カ所の突然変異率、 $\beta$ -*con a* 遺伝子について 107 kbp 当たりに 1 カ所の突然変異率であり、内生遺伝子の方が導入遺伝子よりも有為に突然変異率が高いかどうかについては、さらにその他の内生遺伝子における突然変異率を調べなければ断言できないが、少なくともオープン・リーディング・フレームの部分については、*epsps* 遺伝子は 833 アミノ酸残基当たりに 1 カ所の突然変異率であるのに対し、内生の  $\beta$ -*con a* 遺伝子は 322 アミノ酸残基当たりに 1 カ所の突然変異率で *epsps* 遺伝子の約 2.6 倍であり、内生の遺伝子の方がアミノ酸置換を生じる塩基配列の突然変異率が高有為に高いと言える。これは、導入された遺伝子である *epsps* 遺伝子は除草剤耐性遺伝子であり、この種子の開発生産者は、間違いなく導入されたこの遺伝子による除草剤耐性という表現型が変化しないように非常に強い選択圧(選抜)をかけており、また種子生産においても、その「除草剤耐性」という表現型=商品価値に変化がないことを最も注意し、強い選択圧(選抜)をかけている。このために、この *epsps* 遺伝子にかけられている人為的選択圧は非常に高く、内生の  $\beta$ -*con a* 遺伝子にかかる自然界からの弱い選択圧とは比較にならず、このため *epsps* 遺伝子のオープン・リーディング・フレームにおけるアミノ酸置換を生じる突然変異率が内生の  $\beta$ -

*con α* 遺伝子のオープン・リーディング・フレームにおけるそれよりも非常に低く抑えられているものと考えられる。

#### D 研究発表

(論文発表)

Ogasawara, T, Arakawa, F, Akiyama, H, Goda, Y and Ozeki, Y  
Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans Jpn J Food Chem, **10** 155-160 (2003)

(学会発表)

佐々木 和生、梅津 博紀、小関 良宏「遺伝子組換え食品における NPTII 発現産物の ELISA 法による検知」日本食品化学学会第 9 回総会・学術大会、千葉、2003 年 6 月。

荒川史博、小笠原 健、小関良宏、高畑能久、森松文毅、穂山 浩、米谷民雄「食品中の特定原材料の分析について(1)」日本食品化学学会第 9 回総会・学術大会、千葉、2003 年 6 月。

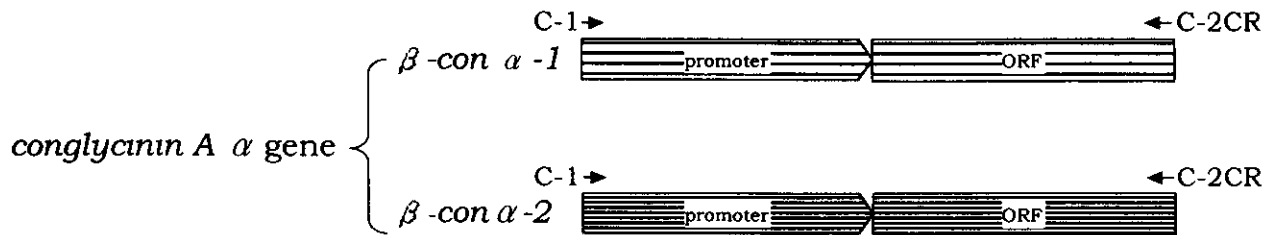
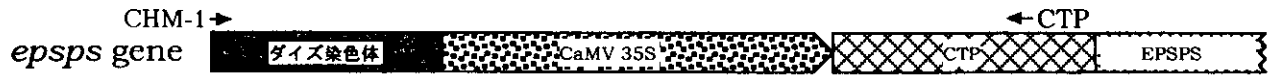


図1 *epsps* 遺伝子およびその近傍配列と  $\beta$ -*con*  $\alpha$  遺伝子を増幅するために作成したプライマー。各々の領域を増幅するプライマー対として CHM-1 ⇄ CTP および C1 ⇄ C-2CR を用いた。

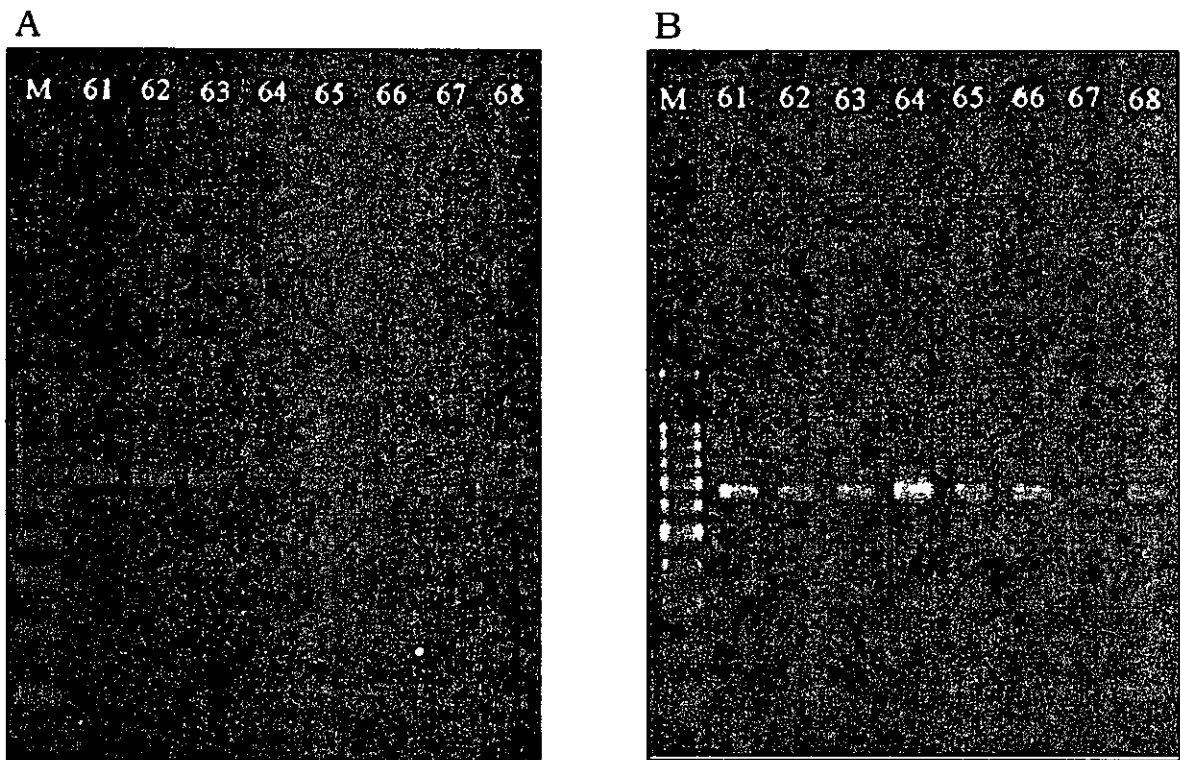


図2 RR ダイス粒体から調製した核 DNA をテンプレートとして、*epsps* 遺伝子領域を増幅する CHM-1 ⇄ CTP プライマー対 (A) および  $\beta$ -*con*  $\alpha$  遺伝子を増幅する C1 ⇄ C-2CR プライマー対 (B) を用いて PCR を行った反応産物の電気泳動像の一例。M, 100 bp DNA ラダー・マーカー。

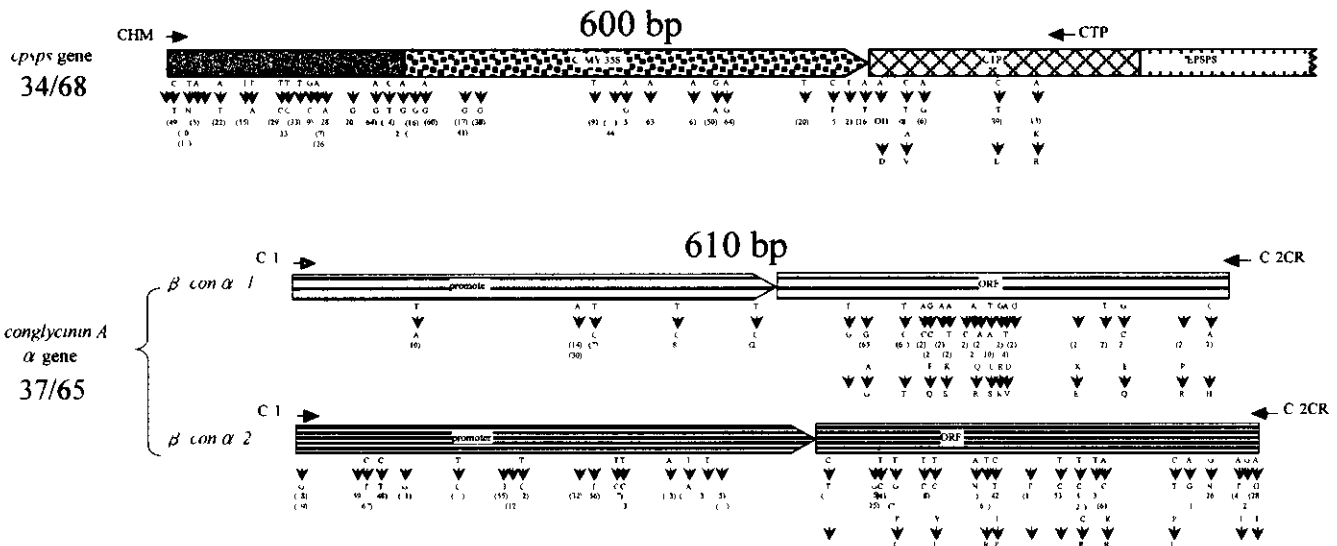


図3 *epsps* 遺伝子およびその近傍配列と  $\beta$ -*con α* 遺伝子に見られた塩基配列の点突然変異。各々の領域を増幅するプライマー対として CHM ⇄ CTP および C1 ⇄ C-2CR を用いた。カッコ内の番号は個体番号。下向きの矢印で示した部分において塩基配列の置換が見られた。

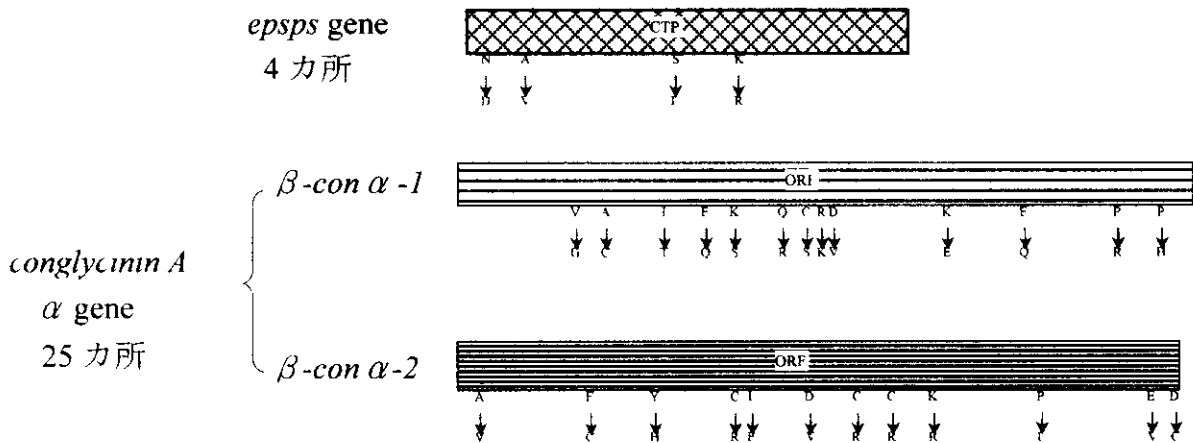


図4 *epsps* 遺伝子オープン・リーディング・フレームおよび  $\beta$ -*con α* 遺伝子オープン・リーディング・フレームに見られたアミノ酸配列の変異下向きの矢印で示した部分においてアミノ酸配列の置換が見られた。

表1 *epsps* 遺伝子および  $\beta$ -*con α* 遺伝子における塩基配列突然変異率と ORF におけるアミノ酸配列の置換を生じる突然変異率の比較

	シーケンス数	DNA 断片の塩基配列数 (bp)	総 DNA 配列数 (bp)	突然変異数 (カ所)	突然変異出現率 (bp / カ所)	<i>epsps</i> 遺伝子 / $\beta$ - <i>con α</i> 遺伝子
塩基配列突然変異	<i>epsps</i> 遺伝子	68	600	40800	34	1200
	$\beta$ - <i>con α</i> 遺伝子	65	610	39650	37	1072
						1 120
	シーケンス数	ORF のアミノ酸配列数 (残基)	総アミノ酸配列数 (残基)	突然変異数 (カ所)	突然変異出現率 (bp / カ所)	<i>epsps</i> 遺伝子 / $\beta$ - <i>con α</i> 遺伝子
アミノ酸配列突然変異	<i>epsps</i> 遺伝子	68	49	3332	4	833
	$\beta$ - <i>con α</i> 遺伝子	65	124	8060	25	322.4
						2 584

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
（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

プロテオーム及びメタボローム解析による大豆の遺伝子発現の分析の可能性を検討するために、その第一段階にあたるトランスクリプトーム解析の予備的な調査として、解析の障害となる大豆種子から RNA の抽出とその RNA の質的量的ばらつきの検討を行なった。はじめに無菌的な発芽大豆から 2 種類の方法で RNA を抽出し、その量的、質的な相違の有無を DNA マイクロアレイ解析によって検討した。その結果、同一の大豆品種からも相違が見られ、大豆の個体差と抽出法の差異の 2 つの要素が入っているものの、トランスクリプトームレベルでも個々の大豆種子分析によって大きな差があることが示唆された。

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

将来、植物の遺伝子改変は種間組換えを複数起こすなど、より複雑になると考えられる。このような場合、プロファイリング技術により、既存種との差異が認められたときは、その差異が健康に及ぼしうる影響について検討されなければならない。

遺伝子組換え作物の後代交配種では導入された遺伝子と宿主固有の遺伝子か、既存種との差異が認められるほど変化するか検討するために、構造レベル、発現レベル、タンパク質レベル、あるいは代謝産物レベルでおこる非意図的な変化の評価としてプロファイリング技術（図 1）が個々の標的を定めた化学分析の代替方法として考えられる。

本研究は第一世代の遺伝子組換え農作物の後代交配種における導入された遺伝子塩基配列の安定性および遺伝子発現量の安定性の調査することを目的としたものであ

る。

平成 15 年度はプロテオームおよびメタボローム解析による大豆の遺伝子発現の分析の可能性を検討するために、その第一段階にあたるトランスクリプトーム解析の予備的な調査として、大豆種子から RNA の抽出とそのトランスクリプトーム解析の障害となる抽出 RNA の質的および量的なばらつきの検討を DNA マイクロアレイ解析によって行なった。

B 研究方法

<試料>

第一世代の遺伝子組換え大豆（米国産、輸入直後）およびと国産の非組換え大豆種子（品種 万成白鳥、タキイ種苗市販品、枝豆用）を用いた。

<方法>

大豆そのものから RNA の抽出は困難であ



ったため、大豆を殺菌後、植物組織培養用の Murashige-Skoog 培地に浸して 25℃で発芽処理を行なった。発芽大豆から RNA の抽出は、フェノール、クロロホルムを用いる CTAB 法と、これらを用いないで抽出する市販キット (QIAGEN RNeasy 植物 RNA 抽出キット) による方法を用いた。

なお、大豆は発芽前に 95%エタノールで油分を除いた後、10%アンチホルミン液に漬け、5~10 分間震盪して殺菌を行ない、滅菌水で 3 回洗浄してから無菌的に発芽させ、大豆の直径の半分程度まで発根したものを RNA 抽出試料とした。

DNA マイクロアレイ解析は抽出した大豆 RNA をもとにシロイヌナズナの 4282 種類の遺伝子を使用した IntelliGene Arabidopsis CHIP I を用いた発現解析によって検討した。

#### <結果>

輸入された遺伝子組換え大豆は乾燥が激しく、そのままでは RNA は抽出が困難であった。しかも、前述の方法で殺菌しても試料の発芽処理の際に細菌に汚染され、純粋の大豆由来の RNA 抽出が困難であった。そのため、国産の大豆 (非組換えの枝豆用品種) の市販種子を用いたところ、無菌的な発芽大豆が得られたため、代替として国産の大豆を用いた。

発芽大豆 1 粒 (1 粒は約 500mg) から CTAB 法では約 400  $\mu$ g、RNA 抽出用キットで約 70  $\mu$ g の RNA が抽出された。

IntelliGene Arabidopsis CHIP I を用いた発現解析 (マイクロアレイ) は、上記の RNA のうち RNA 抽出用キットで抽出した RNA を対照とし、CTAB 法で抽出した RNA の解析をしたところ、表 1 にその一部を示すような発現の差が見られた。

#### D 考察

大豆の RNA 抽出にあたって、細菌由来の RNA の混入を防ぐため、大豆を殺菌後、無菌で発芽を行なったか、遺伝子組換えの輸入大豆は長期間の輸送、貯蔵のため、発芽能力が低下していると考えられる。DNA マイクロアレイ解析実験には栽培を目的とした市販の播種用の大豆種子を用いてきたが、実際の応用には大豆の無菌処理、発芽にもさらなる工夫が必要となろう。今回の実験は予備的なものであるか、同一の品種でも、大豆の一粒ごとに RNA 発現レベルで差が大きいことが示唆された。プロテオーム及びメタボローム解析による大豆の遺伝子発現の分析の可能性を検討するにあたり、個体ことばらつきの大きさか示唆されたことから今後、このプロテオーム及びメタボローム解析についてはさらなる検討が必要であると思われる。

#### E 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし

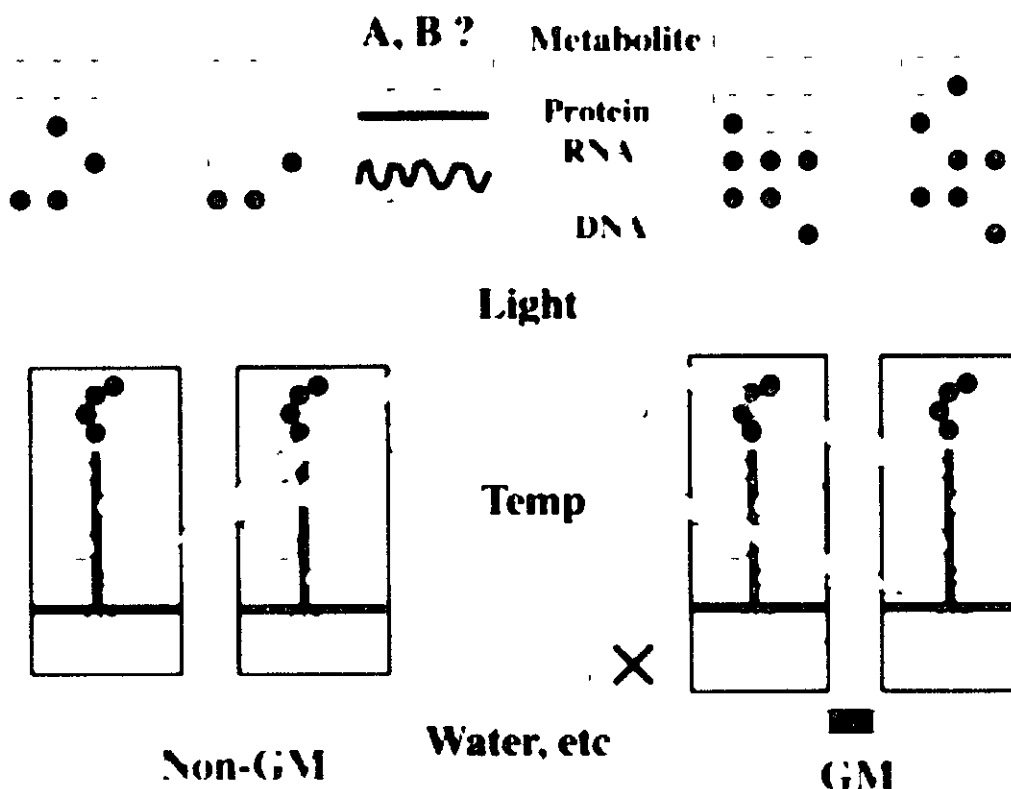


図1 プロファイリング技術による個々の植物による遺伝子発現の差

表1 DNAチップによる発芽サイズのm-RNA発現の個体差  
(2試料の発現差をcy3およびcy5の発光強度で測定)

Gene_name	Title	Cy3_S-B	Cy5_S-B
At3g47800	aldose_1-epimerase_-_like_protein	223	76
At4g22260	IMMUTANS_(IM)	204	85
At4g37040	methionine_aminopeptidase_like_protein	200	-28
At5g11070	unknown_protein	197	142
At5g12250	tubulin_beta-6_chain (spiP29514)	196	88
At4g26640	putative_protein	194	20
At2g19940	putative_N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate_reductase	193	77
At3g27010	unknown_protein	191	69
At1g15490	putative_protein	189	69
At5g10460	unknown_protein	187	41
At5g50750	UDP-glucose_protein_transglucosylase,_reversibly_glycos	186	57
At1g71010	unknown_protein_(At1g71010)	182	39
At5g40760	glucose-6-phosphate_dehydrogenase	182	108
At3g47520	chloroplast_NAD-dependent_malate_dehydrogenase	181	104
At1g30600	putative_serine_proteinase	180	79
At3g49065	unknown_protein	179	77
At4g04860	predicted_protein_of_unknown_function	176	73
At3g54540	ABC_transporter_-_like_protein	175	70
At1g19600	ribokinase	174	80

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
（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

遺伝子組換え作物の後代交配種における導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現産物の変動と変動の幅を解析することを目的として、本年度は二次元電気泳動法を利用したプロテオーム解析を行うための条件検討を行った

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の国際的な流通が広まり、我が国においても安全性審査を済ませた農作物が輸入され、食品として利用されている。これら食品の安全性を確保するためには、継続的な科学的知見の集約が必要であり、特に、遺伝子組換え農作物の後代交配種における導入遺伝子の安定性、発現産物であるタンパク質の変動および種々の要因による発現タンパク質の変動を詳しく調査することが必要である。これらの知見は次世代の遺伝子組換え農作物の安全性を評価する上でも重要であると考えられる。本研究では、既に食品としての安全性審査を済ませている第一世代の遺伝子組換え農作物の後代交配種について、導入遺伝子の発現産物であるタンパク質の発現量の変動とその変動幅および内在性遺伝子の発現量とその変動幅を二次元電気泳動法を利用して網羅的にタンパク質を解析するプロテオーム解析により調査することを目的としている。本年度は、遺伝子組換えダイスのプロテオーム解析を行うための各種条件の検討を行い、解析法の確立を行った。

B 研究方法

<試料>

遺伝子組換えダイス種子は、国立医薬品食品衛生研究所合田博士より供与して頂いた。

<方法>

タンパク質抽出

乳鉢ですりつぶした乾燥種子をマイクロチューブにとり、10mg/100mlの割合で抽出ハフター（8M Urea, 4%(W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl (pH8.8), 2% IPG buffer (Amersham Pharmacia Biotech)）を加え、氷上でさらにすりつぶした。15,000rpmで20分間遠心分離し、上清を別のマイクロチューブに移し、再度15,000rpmで20分間遠心分離して得られた上清を粗抽出物とした。

電気泳動用サンプル調製

粗抽出物から2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて電気泳動用サンプルを調製した。さらに20~80%飽和硫酸で硫酸塩析した後、泳動ハフターに懸濁し電気泳動に供した。または、2-D Clean-Up Kit を用いて調製したサンプルを限外濾過膜 (Ultrafree, Millipore) により低分子性物質を除去し電気泳動に供した。

電気泳動

・1次元目電気泳動 (IEF)

Immobiline DryStrip pH3-10 または pH3-10NL (Amersham Pharmacia Biotech) を2% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて膨潤させ、Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて泳動した。500V で1時間、1000V で1時間通電した後、8000V で4時間泳動した。

#### ・ 2次元目電気泳動 (SDS-PAGE)

IEF 終了後の Immobiline DryStrip を SDS を含むハフファーで平衡化し、ExcelGel SDS XL Gradient 12-14 (Amersham Pharmacia Biotech) 上で、Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて泳動した。1000V 20mA で 45 分間通電した後、1000V 40mA で 2 時間 40 分間泳動した。

#### タンパク質の検出

PhastGel Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて銀染色により、タンパク質を検出した。染色後、ゲルを室温で乾燥させ、スキャナを用いてコンピュータに画像を取り込んだ。

#### C 結果・考察

Immobiline DryStrip pH3-10 を一次元目の展開に用いた 2 次元電気泳動 (図 1) では、タンパク質のスポットが多数存在する領域での展開幅が少なく、十分にタンパク質を展開できていなかった。また、低分子領域において銀染色にポジティブな夾雑物が認められた。そこで、Immobiline DryStrip pH3-10NL を用いてタンパク質のスポットが多数存在する領域での分離幅が広くなるようにし、さらに低分子領域の夾雑物を除くために、硫酸

塩析または限外濾過膜による電気泳動用サンプルの精製を行った。硫酸塩析での精製の場合 (図 3) は、高分子側のタンパク質のスポットが鮮明ではなく、全体として解像度が低い泳動像であることに比べ、限外濾過膜を用いて精製したサンプル (図 4) では、全体的に解像度の高い泳動像が得られた。このことから、2-D Clean-Up Kit および限外濾過膜を利用してサンプルを精製することでプロテオーム解析に適した電気泳動像が得られると考えられる。今後、ダイスの品種間による泳動像の差異や電気泳動に供するサンプル中のタンパク質量などの条件検討を引き続き行い、プロテオーム解析に最適な分析条件を確立する。

#### D 研究発表

(学会発表)

佐々木和生、梅津博紀、小関良宏「遺伝子組換え食品における NPTII 発現産物の ELISA 法による検知」日本食品化学学会第 9 回学術大会、東京、2003 年 6 月

(論文発表)

なし