

- TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. Designated States  
 RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG.  
 Patent written in English.  
 Application: WO 2004-CN1419  
 20041206. Priority: US  
 2003-527637 20031205. CAN  
 143:58500 AN 2005:523633
- 23) Pujol, M., Ramirez, N. I., Ayala, M., Gavilondo, J. V., Valdes, R., Rodriguez, M., Brito, J., Padilla, S., Gomez, L., Reyes, B., Peral, R., Perez, M., Marcelo, J. L., Mila, L., Sanchez, R. F., Paez, R., Cremata, J. A., Enriquez, G., Mendoza, O., Ortega, M., Borroto, C. (2005) An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine*, 23 : 1833-1837
- 24) Liu, L., Canizares, M. C., Monger, W., Perrin, Y., Tsakiris, E., Porta, C., Shariat, N., Nicholson, L., Lomonosoff, G. P. (2005) Cowpea mosaic virus-based systems for the production of antigens and antibodies in plants. *Vaccine*, 23: 1788-1792
- 25) Galeffi, P.; Lombardi, A.; Di Donato, M.; Latini, A.; Sperandei, M.; Cantale, C.; Giacomini, P. (2005) Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine* (2005), 23(15), 1823-1827
- 26) Baur, A., Reski, R., Gorr, G. (2005) Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 331-340
- 27) Huether, C. M., Lienhart, O., Baur, A., Stemmer, C., Gorr, G., Reski, R., Decker, E. L. (2005) Glyco-engineering of moss lacking plant-specific sugar residues. *Plant Biology* : 7: 292-299
- 28) Schinkel, H., Schiermeyer, A., Soeur, R., Fischer, R., Schillberg, S. (2005) Production of an active recombinant thrombomodulin derivative in transgenic tobacco plants and suspension cells. *Transgenic Research*, 14 : 251-259
- 29) Schiermeyer, A., Schinkel, H., Apel, S., Fischer, R., Schillberg, S. (2005) Production of *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator a1 (DSPAa1) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 89: 848-858
- 30) Berberich, T., Takagi, T., Miyazaki, A., Otani, M., Shimada, T., Kusano, T. (2005) Production of mouse adiponectin, an anti-diabetic protein, in transgenic sweet potato plants. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1169-1176
- 31) Conkling, M. (2005) Reduced nicotine transgenic *Nicotiana tabacum* for use in nicotine withdrawal therapy. *PCT Int. Appl.* (2005), 43 pp. CODEN: PIXXD2 WO 2005000352 A1 20050106 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG,

- ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2004-US16958 20040527. Priority: US 2003-475945 20030604. CAN 142:107441 AN 2005:14254
- 32) Wang, M.-L., Goldstein, C., Su, W., Moore, P. H., Albert, H. H. (2005) Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. *Transgenic Research*, 14 : 167-178
- 33) Hennegan, K., Yang, D., Nguyen, D., Wu, L., Goding, J., Huang, J., Guo, F., Huang, N., Watkins, S. C. (2005) Improvement of Human lysozyme Expression in Transgenic Rice Grain by Combining Wheat (*Triticum aestivum*) puroindoline b and Rice (*Oryza sativa*) Gt1 Promoters and Signal Peptides. *Transgenic Research*, 14 : 583-592
- 34) Daniel, H. (2005) Methods for production of human serum albumin in transgenic plant chloroplasts. *PCT Int. Appl.* (2005), 58 pp. CODEN: PIXXD2 WO 2005011367 A1 20050210 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2003-US21158 20030703. Priority: . CAN 142:171123 AN 2005:120630
- 35) Azzoni, A. R., Takahashi, K., Woodard, S. L., Miranda, E. A., Nikolov, Z. L. (2005) Purification of recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: Separation from cti utilizing ion-exchange chromatography. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22 : 323-330

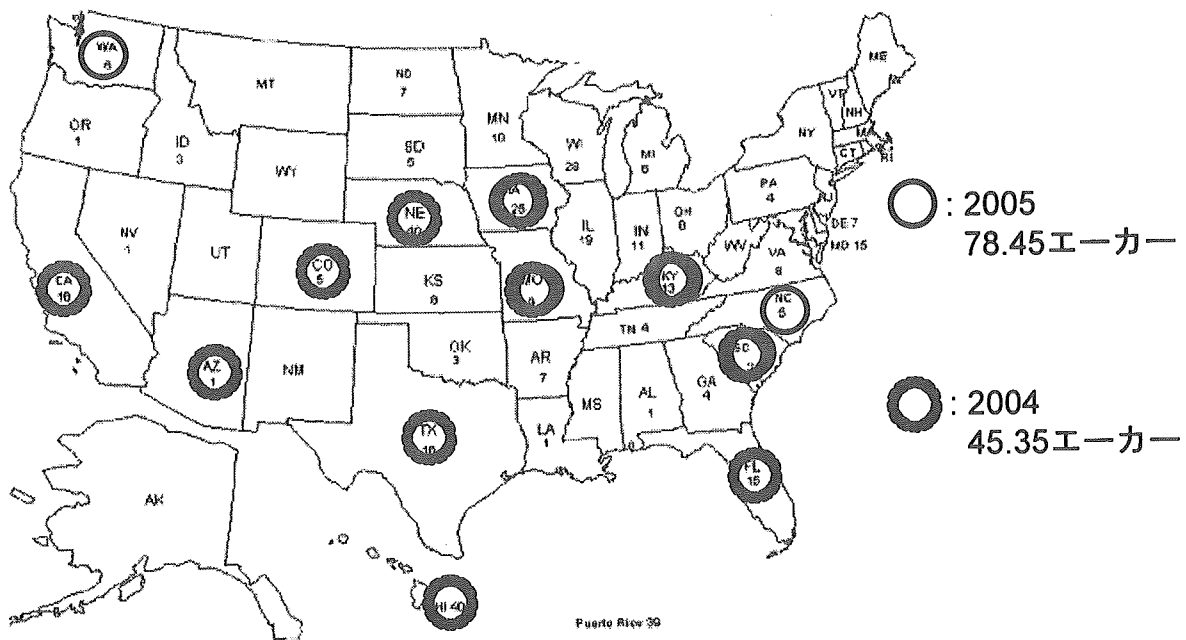


図1. 2004-2005年の米国における薬用GM植物野外圃場作付け状況

地図は Union of Concerned Scientists; Pharma Crop Approvals in the United States<sup>1)</sup> より引用。地図上の数字は1991年以降、the U.S. Department of Agriculture (USDA) により認可され、植付けされた薬用GM作物数を示す。地図上の丸（実線及び点線）はそれぞれ、2005年及び2004年に the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), USDA により薬用GM植物（産業用及び環境修復用GM植物を含む）圃場栽培の認可を受け、作付けされた州を示す。地図右の面積は、それぞれの年の合計作付け面積を示す<sup>2)</sup>。

表 1. 2005 年の米国における薬用 GM 植物の野外圃場栽培許可状況<sup>2)</sup>

企業等	作物	生産物	州	作付け状況
Chlorogen, Inc	タバコ (葉緑体)	社外秘	ケンタッキー、ミズーリー、サウスカロライナ	作付け完了
Iowa State U	トウモロコシ	大腸菌易熱性腸管毒素 B サブユニット	アイオワ	作付け完了
Large Scale Biology	TMV <sup>*1</sup> /タバコ	アプロチニン (医薬用)	フロリダ	作付け未完了
Planet Biotechnology	タバコ	抗虫菌抗体	ケンタッキー	作付け完了
		抗風邪ウイルス抗体		作付け完了
SemBioSys Genetics	ベニバナ	社外秘 (酵素)	ワシントン	作付け完了
		1 IgG 結合ドメイン (Protein A)		作付け完了
		5 IgG 結合ドメイン (Protein A)		作付け完了
Univ. of Kentucky	タバコ (葉緑体)	フェニルアラニンアンモニアリアーゼ <sup>*2</sup>	ケンタッキー	作付け完了
Ventria Bioscience <sup>*3</sup>	イネ	ラクトフェリン	ノースカロライナ	作付け完了
		ヒトラクトフェリン		作付け完了
		ヒトリゾチーム		作付け完了
Washington State U	オオムギ	詳細不明	ワシントン	作付け完了
Iowa State U	トウモロコシ	組換えゼラチン (機能性食品)	アイオワ	申請取下
Planet Biotechnology	タバコ	詳細不明	ケンタッキー	申請取下
SemBioSys Genetics	ベニバナ	詳細不明	アリゾナ	申請取下
Ventria Bioscience	イネ	ヒトラクトフェリン、ヒトリゾチーム	ミズーリー	申請取下

\*1 TMV : タバコモザイクウイルス 非組換えのタバコに組換えタバコモザイクウイルスを感染させて医薬品類を生産

\*2 フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL、シロイヌナズナ由来) はフェニルケトン尿症治療薬として開発

\*3 Ventria の ExpressTec は自殖性のイネ、コムギ、オオムギを用い、種子の貯蔵タンパク質として組換えタンパク質を生産するシステムで、種子以外の部分には、組換えタンパク質が発現されないと説明されている。

表 2. 2004 年の米国における薬用 GM 植物の野外圃場栽培許可状況<sup>2)</sup>

企業等	作物	生産物	州	作付け状況
Chlogogen, Inc	タバコ (葉緑体)	ヒト血清アルブミン	ケンタッキー、サウスカロライナ	作付け完了
		インスリン様成長因子		作付け完了
		インターフェロン		作付け完了
		詳細不明		作付け完了
Chlogogen, Inc	タバコ (葉緑体)	上記 4 種	ミズーリー	作付け未完了
Garst	トウモロコシ	詳細不明	ハワイ	作付け完了
Iowa State U	トウモロコシ	大腸菌易熱性腸管毒素 B サブユニット	コロラド	作付け完了
Large Scale Biology	TMV <sup>*1</sup> /タバコ	詳細不明	フロリダ	作付け完了
		アプロチニン	ケンタッキー	作付け未完了
Planet Biotechnology	タバコ	抗虫菌抗体	ケンタッキー	作付け完了
Prodigene	トウモロコシ	トリプシノゲン	ネブラスカ	作付け完了
		ブラゼイン (機能性食品)	テキサス	作付け未完了
		ワクチン (詳細不明)		作付け未完了
		詳細不明		作付け未完了
SemBioSys Genetics	ベニバナ	詳細不明	アリゾナ	作付け完了
Ventria Bioscience	イネ	ラクトフェリン、リゾチーム	カリフォルニア	作付け完了
Ventria Bioscience	オオムギ	ラクトフェリン	アイオワ	作付け完了
Chlogogen, Inc	タバコ (葉緑体)	詳細不明	ケンタッキー、ミズーリー、サウスカロライナ	申請取下
Iowa State U	トウモロコシ	詳細不明	アイオワ	申請取下
Prodigene	トウモロコシ	トリプシノゲン、アプロチニン	テキサス	申請取下

\*1 TMV : タバコモザイクウイルス 非組換えのタバコに組換えタバコモザイクウイルスを感染させて医薬品類を生産

表 3. Conference on PMP 2005 のホスト企業等一覧

種別	企業名	国名
Grand Hosts	Bayer CropScience, BioScience	France
	Dow AgroSciences LLC	USA
	NEXGEN Biotechnologies, Inc.	Korea
	Syngenta	Switzerland
Hosts	Agrisoma Biosciences Inc.	Canada
	Chlorogen	USA
	Dow BioPharma	USA
	ERA Plantech	Spain
	Fraunhofer USA	USA
	GENEART GmbH	Germany
	Icon Genetics AG	Germany
	Large Scale Biology Corporation	USA
	MEDICAGO, INC.	Canada
	MERISTEM Therapeutics	France
	ORF Genetics	Iceland
	Planet Biotechnology, Inc.	USA
	SemBioSys Genetics	Canada
	UniCrop Ltd.	Finland

表 4. 植物工場グループ企業等 (plant-factory groups) 一覧：米国

企業名	作物	生産物及び特徴	HP アドレス
Biolex	ウキクサ	インターフェロン $\alpha$ (C型慢性肝炎治療薬)、NK4 (制癌、血管新生抑制タンパク質) 等、6社の製薬/バイオ企業と提携し、計16種類の蛋白質について商業用水生植物系統の構築	<a href="http://www.biolex.com/company.html">http://www.biolex.com/company.html</a>
Chlorogen	タバコ (葉緑体)	コレラワクチン、ヒト血清アルブミン (医薬用及び試薬用)、インターフェロン $\alpha$ (C型肝炎治療)、インスリン様成長因子1 (糖尿病治療)、炭疽菌ワクチン抗原 (バイオテロ対策)、抗体医薬、治療用タンパク質 (卵巣癌、膵臓癌) 等を生産、中央フロリダ大学の研究チームに資金を提供し研究開発	<a href="http://www.chlorogen.com/">http://www.chlorogen.com/</a>
Chromatin Inc.	ダイズ、ナタネ、トウモロコシ、トマト	人工染色体 (mini chromosomes) 技術により、高栄養、高機能作物や医薬品を生産する植物を作成	<a href="http://www.chromatini.nc.com/index.php">http://www.chromatini.nc.com/index.php</a>
Controlled Pharming Ventures	トウモロコシ、トマト、タバコ、イネ、オオムギ、アルファルファなど	石灰岩採掘場跡 (地下) に閉鎖植物生育施設を建設し、薬用 GM 植物の栽培を請け負う、BL2-P、BL3-P の安全性施設まで可能	<a href="http://www.controlledpharming.com/">http://www.controlledpharming.com/</a>
Dowpharma	ササゲ (ササゲモザイクウイルス、ササゲ退緑斑紋ウイルス)	契約生産、キメラウイルス粒子 (chimeric plant virus particles、CVPs) をワクチン抗原として製造	<a href="http://pharma.dow.com/index.htm">http://pharma.dow.com/index.htm</a>
Kentucky Tobacco Research and Development Center	タバコ、その他	ケンタッキー大学と共同で PMP 生産	<a href="http://www.uky.edu/KTRDC/">http://www.uky.edu/KTRDC/</a>
Large Scale Biology Corporation	タバコ (タバコモザイクウイルス)	$\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (AGaI) (ENZAGAL <sup>TM</sup> ) (ファブリー病治療薬)、ヒト組換えリソソーム酸リパーゼ (LAL) (アテローム性動脈硬化症治療薬)、アプロチニン (APRONEXIN <sup>TM</sup> ) (タンパク質分解酵素阻害剤、研究用試薬としては既に商品化し、2004年にSigma-Aldrichより販売)、非ホジキンリンパ腫カスタムワクチン、ヒトパピローマウイルスワクチン (子宮頸癌予防および治療薬) など	<a href="http://www.lsbcc.com/">http://www.lsbcc.com/</a>
Phycotransgenics, LLC	単細胞緑藻	動物薬 (ワクチン)、高栄養飼料など	<a href="http://www.phycotransgenics.com/">http://www.phycotransgenics.com/</a>
Phytomedics	タバコ	組換えタバコの水耕栽培で、根から組換えタンパク質を分泌させ培地を回収して精製、その他植物薬 (botanical drug) も開発	<a href="http://www.phytomedics.com">http://www.phytomedics.com</a>
Planet Biotechnology, Inc.	タバコ	分泌型 IgA、レセプター結合 SIgA 等の抗体、CaroRX <sup>TM</sup> (抗虫歯抗体 SIgA、フェーズ II 試験中)、RhinoRX <sup>TM</sup> (Protected-SIgA <sup>TM</sup> 、ライノウイルス感染防止、フェーズ I/II 試験中)、DoxoRX <sup>TM</sup> (抗ドキシソルピシン単抗体、フェーズ I 試験中) など	<a href="http://www.planetbiotchnology.com">http://www.planetbiotchnology.com</a>
Prodigene	トウモロコシ	組換え植物由来のタンパク質を世界で初めて商品化、食用ワクチンとして、B型肝炎ワクチン、毒素原性大腸菌ワクチン、ブタ伝染性胃腸炎ウイルスワクチン (家畜用)、医薬品としてアプロチニン (AproliZean <sup>TM</sup> ) を開発中、試薬類としてトリプシン、AproliZean <sup>TM</sup> 、アビジンを商品化、契約により家畜用食用ワクチン、医薬用タンパク質、酵素等を開発中	<a href="http://www.prodigene.com">http://www.prodigene.com</a>
Solazyme, Inc.	光合成細菌	組換え光合成細菌の培養により、医薬品、機能性食品 ( $\beta$ -カロテン等) を生産	<a href="http://www.solazyme.com">http://www.solazyme.com</a>
Altor BioScience Corporation	レタス	抗体医薬 (ヒト型抗組織因子抗体、癌治療薬) など	<a href="http://www.sunolmolecular.com">http://www.sunolmolecular.com</a>
Ventria Bioscience	イネ、オオムギ	ヒトラクトフェリン、ヒトリゾチームは試薬として商品化、ヒト血清アルブミン生産米 (医薬用)、ヒトラクトフェリン生産米 (機能性食品及び食用医薬用)、ヒトリゾチーム生産米 (機能性食品及び食用医薬用)、マタイレシノール含有米 (機能性食品) 等を生産	<a href="http://www.ventria.com">http://www.ventria.com</a>

表 5. 植物工場グループ企業等 (plant-factory groups) 一覧：カナダ

企業名	作物	生産物及び特徴	HP アドレス
Agrisoma Biosciences Inc.		Chromosome-based gene delivery and expression technology (ACE system)により、薬用 GM 作物を作出	<a href="http://www.agrisoma.com">http://www.agrisoma.com</a>
Bevo Farms		契約栽培農場	<a href="http://www.bevofarms.com/index.html">http://www.bevofarms.com/index.html</a>
Linnaeus Plant Sciences Inc.	シロイヌナズナ	石油の代用として有用なひまし油を組換えシロイヌナズナで生産	<a href="http://www.linnaeus.net">http://www.linnaeus.net</a>
MEDICAGO INC.	アルファルファ	単クローン抗体、血漿タンパク質、2種の生産物は2005年に前臨床試験開始予定	<a href="http://www.medicago.com">http://www.medicago.com</a>
Plantigen	タバコ	グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) + インターロイキン-4 (IL-4) (I型糖尿病治療)、インターロイキン-10 (潰瘍性大腸炎治療)、インターロイキン-4 (免疫増強)、主要組織適合性抗原 (major histocompatible complex, MHC) + サイトカイン (臓器移植用) など	<a href="http://www.lhsc.on.ca/plantigen">http://www.lhsc.on.ca/plantigen</a>
Prairie Plant Systems, Inc		銅および亜鉛採掘の使用されていない地下坑道に温室を整備し、さまざまな植物 (C3) の栽培法を確立、医薬用アサの包括的栽培および製造が2000年12月に許可	<a href="http://www.prairieplant.com">http://www.prairieplant.com</a>
SemBioSys Genetics	シロイヌナズナ、ベニバナ	ヒトインスリン、アポリポ蛋白質 AI、高 DHA 含有ベニバナ油、高γ-リノレン酸 (GLA) 含有ベニバナ油、家畜用ワクチン、IgG 結合ドメイン (抗体医薬精製用試薬) など	<a href="http://www.sembiosys.com">http://www.sembiosys.com</a>



表 6. 植物工場グループ企業等 (plant-factory groups) 一覧 : EU

国名・企業名	作物	生産物及び特徴	HP アドレス
デンマーク・Cobento Biotech	シロイヌナズナ	組換え human intrinsic factor (rhIF) (2004 年 37 名の患者による臨床試験終了)、組換え human transcobalamin (rhTC)、組換え human haptocorrin (rhHC) (全てビタミン B12 欠乏症治療薬)	<a href="http://www.cobento.dk">http://www.cobento.dk</a>
フィンランド・UniCrop Ltd	アマナズナ	培養器の中で発芽した組換えアマナズナで、単クローン抗体等の医薬用タンパク質を生産	<a href="http://www.unicrop.fi">http://www.unicrop.fi</a>
仏・Bayer CropScience, BioScience	ナタネ、ワタ、イネ	2006 年 1 月 11 日ドイツ・Icon Genetics 社が保有する PMP 生産技術を獲得し、PMP 生産体制を強化	<a href="http://www.bayercropscience.com">http://www.bayercropscience.com</a>
仏・LemnaGene	ウキクサ	ワクチン (ヒト、家畜)、食品添加物 (酵素、プロバイオティックスなど)、診断薬・試薬 (酵素、単クローン抗体など)、機能性食品など ウキクサは、乾燥品は粉末あるいはカプセルとして販売されており、生はサラダや家畜の飼料として既に販売されているため、組換えウキクサ由来の PMP は食用用途で使用可能 2005 年 7 月より Biolex Therapeutics 社の完全子会社	<a href="http://www.lemnagene.com">http://www.lemnagene.com</a>
仏・MERISTEM Therapeutics	トウモロコシ、タバコ	胃リパーゼ (Merispase®、嚢胞性繊維症治療薬 2004. 7 フェーズ II 臨床試験終了、2005. 4. 27 仏農業省より 20ha の野外圃場での組換えトウモロコシ栽培認可)、腓リパーゼ (Cter)、ラクトフェリン、ヒトヘモグロビン、ヒト血清アルブミン、コラーゲン、抗体 (IgA、抗癌剤、2005 年 4 月初の野外圃場栽培認可) (IgG、IgM)、狂犬病ウイルス抗原モノマー、マラリアエピトープ、タンパク質分解酵素阻害剤など	<a href="http://www.meristem-therapeutics.com">http://www.meristem-therapeutics.com</a>
独・Fraunhofer IME	タバコ、イネ	Solulin (thrombomodulin 誘導体、血栓症治療薬)、desmoteplase (急性虚血性脳卒中治療薬)、transglutaminases (試薬) など	<a href="http://www.ime.fraunhofer.de/">http://www.ime.fraunhofer.de/</a>
独・Icon Genetics AG	タバコ	インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、ソマトトロピン、制限酵素、単鎖抗体、単クローン抗体、抗原、グルコセレブロシド、ソーマチン、アルブミン、DNase、RNase inhibitor、インスリン	<a href="http://www.icongenetics.com">http://www.icongenetics.com</a>
独・Maltagen Forschung GmbH	オオムギ	ヒト血清アルブミン (医薬品、試薬)、ヒトラクトフェリン (機能性食品、試薬)、ヒトリソチーム (機能性食品、試薬)、ソーマチン (天然甘味料)、バカブレルミン (糖尿病性潰瘍治療薬)、ヒト $\beta$ -ディフェンシン-2 (炭疽病治療)、ワクチン (接種用及び食用) など	<a href="http://www.maltagen.de/index-english.htm">http://www.maltagen.de/index-english.htm</a>
独・Novoplant GmbH	ジャガイモ、ナタネ、アマ、エンドウ	家畜用経口抗体医薬	<a href="http://www.novoplant.de">http://www.novoplant.de</a>
独・Planton	ジャガイモ	契約により PMP 生産	<a href="http://www.planton.de">http://www.planton.de</a>
独・SunGene	ナタネ他	代謝工学により高カロテン、高ビタミン、高タンパク質の作物を作出	<a href="http://www.sungene.de">http://www.sungene.de</a>
独・greenovation Biotech GmbH	コケ	IgG (深部静脈血栓症、DVT、エコノミークラス症候群予防)、ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF) など	<a href="http://www.greenovation.com">http://www.greenovation.com</a>
アイスランド・ORF Genetics	オオムギ	顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、インターロイキン-3、幹細胞成長因子 (SCF)、エリスロポエチン、インターフェロン- $\beta$ 1 など	<a href="http://www.orfgenetics.com">http://www.orfgenetics.com</a>
スペイン・Agrenvec	アブラナ科植物 (カブモザイクウイルス TuMV)	契約生産	<a href="http://www.agrenvec.com">http://www.agrenvec.com</a>
スイス・Syngenta	ベニバナ	呼吸器薬、皮膚病薬、抗菌薬、抗体医薬、抗癌薬など	<a href="http://www.syngenta.com/en/index.aspx">http://www.syngenta.com/en/index.aspx</a>
オランダ・Plant Research International	タバコ、ジャガイモ、トマト、イネ、イチゴなど	粘膜免疫用ワクチン、糖鎖工学	<a href="http://www.pri.wur.nl/uk/">http://www.pri.wur.nl/uk/</a>

表 7. 植物工場グループ企業等 (plant-factory groups) 一覧：その他

企業名	作物	生産物及び特徴	HP アドレス
アルゼンチン・Instituto de Virologia	アルファルファ	ワクチン (口蹄疫、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス、コロナウイルス、ウシロタウイルス) など	<a href="http://www.inta.gov.ar">http://www.inta.gov.ar</a>
オーストラリア・Farmacule BioIndustries Australia	タバコ、バナナ、サトウキギ	食用ワクチン、高機能タンパク質など	<a href="http://www.farmacule.com">http://www.farmacule.com</a>
イスラエル・Evogene Ltd.	ワタ、トマト、シロイヌナズナ	契約生産	<a href="http://www.evogene.com">http://www.evogene.com</a>
韓国・NEXGEN Biotechnologies, Inc.	タバコ、マクワウリ、キュウリ	医療用タンパク質 (インシュリン、インターフェロン、成長ホルモン、各種医療用人体酵素など)、飼料 (フィターゼ添加)、動物用経口ワクチン、食用ワクチン、診断用抗原、化粧品素材など	<a href="http://www.nexgenbiotech.com">http://www.nexgenbiotech.com</a>

表 8. 国内の薬用 GM 植物開発研究所

企業名	作物	生産物及び特徴	HP アドレス
日本・(独) 農業生物資源研究所 (茨城)	イネ	花粉症緩和米 (動物試験で効果を確認、2006 年第 I 種使用予定)、糖尿病治療米、CoQ10 含有米、グリシニン含有米、フェリンチン含有米	<a href="http://www.nias.affrc.go.jp/">http://www.nias.affrc.go.jp/</a>
日本・(独) 産業技術総合研究所 (北海道)	タバコ、ジャガイモ、イチゴ	機能性食品、ワクチン (接種用及び食用)、サイトカインなど	<a href="http://unit.aist.go.jp/ri gb/japanese/">http://unit.aist.go.jp/ri gb/japanese/</a>

表 9. 臨床段階にある薬用 GM 植物製品<sup>5、6)</sup>

企業等	作物	生産物 (適応症)	開発段階
仏・MERISTEM Therapeutics	トウモロコシ	胃リパーゼ (嚢胞性繊維症)	2004年7月フェーズII終了
仏・MERISTEM Therapeutics	トウモロコシ	ラクトフェリン (ドライアイ)	フェーズII終了 (2002年)
仏・MERISTEM Therapeutics	トウモロコシ	ラクトフェリン (感染性胃腸炎)	フェーズI (2005年現在)
米・Monsanto	トウモロコシ	アビジン, IgG (結腸癌)	フェーズII (2004年現在)
米・Planet Biotechnology	タバコ	IgGs (CaroRx™、虫歯)	フェーズII
米・Planet Biotechnology	タバコ	sIgA (RhinoRx™、ライノウイルス鼻風邪)	フェーズI/II (2005年現在)
米・Large Scale Biology	タバコ	非ホジキンリンパ腫カスタムワクチン	フェーズI/II (2005年現在)
米・Prodigene	トウモロコシ	毒素原性大腸菌食用ワクチン (下痢)	フェーズI (2005年現在)
米・Texas A & M University	ジャガイモ	毒素原性大腸菌食用ワクチン (下痢)	フェーズI/II (2005年現在)
米・Texas A & M University	ジャガイモ	B型肝炎食用ワクチン	フェーズI/II (2005年現在)
米・Texas A & M University	ジャガイモ	ノーウォークウイルス食用ワクチン	フェーズI/II (2005年現在)
米・Arizona State University	ジャガイモ	ノーウォークウイルス食用ワクチン	フェーズI (2004年現在)
米・Thomas Jefferson University	ホウレンソウ	狂犬病食用ワクチン	フェーズI (2005年現在)
ポーランド・Polish Academy of Sciences / 米・Thomas Jefferson University	レタス	B型肝炎食用ワクチン	フェーズI (2005年現在)
デンマーク・Cobento Biotech	シロイヌナズナ	Human intrinsic factor (ビタミンB12欠乏症)	フェーズII (2005年現在)

表 10. 2005 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する特許及び論文

区分	導入遺伝子	作物	生産物及び特徴	研究・開発国	文献等
機能性食品	$\omega$ 3-デサチュレース	ナタネ	$\omega$ 3 不飽和脂肪酸含量の増加	独・BASF Plant Science GmbH, Germany	14
機能性食品	脂肪酸コンジュゲース	ナタネ、イネ	ブニカ酸含量の増加、動物摂餌実験で内臓脂肪蓄積抑制作用	日本・(株)植物工学研究所	15
食用ワクチン	B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg)、ノーウォークウイルス外殻タンパク質 (NVCP)	タバコ (細胞培養)、ダイズ、ジャガイモ、トマト	HBsAg ジャガイモ、NVCP ジャガイモ、NVCP トマトはマウスで経口免疫誘導を確認	米・Arizona State University	16
食用ワクチン	B型肝炎ウイルスエンベロープ M タンパク質		ヒト、哺乳動物で免疫誘導を確認	中国・Chinese Academy of Agricultural Sciences	17
食用医薬	インターフェロン-a/b (IFN-a/b)	ジャガイモ	マウスへの経口投与でリステリア菌感染阻止効果確認	日本・北海道大学	18
食用医薬	ダニアレルゲン (DerfI)	ミヤコグサ		日本・(独) 科学技術振興機構	19
食用医薬	スギアレルゲンエпитオプ (Cry j I, Cry j II) + ダイズグリシニン (AlaB1b)	イネ	AlaB1b-Cry j I-AlaB1b-Cry j II 融合タンパク質、マウスモデルを用い、経口投与で免疫寛容によるアレルギー緩和機能を確認	日本・(独) 農業生物資源研 & 東京大学 & 島根大学	20
ワクチン抗原	抗原	ササゲモザイクウイルス (CPMV)		英・John Innes Centre	21
ワクチン抗原	SARS (重症急性呼吸器症候群) コロナウイルス S タンパク質、M タンパク質			中国・The University of Hong Kong	22
抗体医薬	単鎖抗体 v 鎖 (scFv), 抗 B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) マウス単クローン抗体			キューバ・Centre for Genetic Engineering and Biotechnology	23
抗体医薬	抗体			英・John Innes Centre	24
抗体医薬	抗ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) 単鎖抗体 v 鎖	タバコ	乳癌細胞の増殖抑制	伊・ENEA CR Casaccia-BIOTEC-GEN	25
治療薬	ヒト血清アルブミン (HSA), ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF)	コケ		独・Greenovation Biotechnologie GmbH	26
治療薬	$\alpha$ (1,3)-フコース転移酵素, $\beta$ (1,2)-キシロース転移酵素ノックアウト、ヒト $\beta$ (1,4)-ガラクトース転移酵素ノックイン、ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF)	コケ	ヒト型糖鎖の結合	独・University of Freiburg	27
治療薬	Solulin (human thrombomodulin 誘導体)	タバコ (植物体、培養細胞)	血栓症治療薬	独・Fraunhofer-Institut fuer Molekularbiologie & Angewandte Oekologie, IME	28
治療薬	チスイコウモリ唾液プラスミノゲンアクティベーター- $\alpha$ 1 (DSPA $\alpha$ 1、デスモプラナーゼ)	タバコ	急性虚血性脳卒中治療	独・Fraunhofer-Institut fuer Molekularbiologie & Angewandte Oekologie (IME) & Institut fuer Biologie VII, RWTH	29
治療薬	アディポネクチン (Adiponectin)	サツマイモ	II型糖尿病治療	日本・東北大学	30
治療薬	ニコチンホスホリボシル転移酵素 (NtQPT1) アンチセンス	タバコ	ニコチン及びニトロソアミン含量の低下、煙草を用いた禁煙治療	バミューダ・Vector Tobacco Ltd.	31
治療薬、試薬	ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)	サトウキビ	造血因子	米・Hawaii Agriculture Research Center	32

表 10. 続き

区分	導入遺伝子	作物	生産物及び特徴	研究・開発国	文献等
	ヒトリゾチーム	イネ	プロモーター、シグナル配列の改変による生産性の向上	米・Ventria Bioscience	33
	ヒト血清アルブミン (HSA),			米・University of Central Florida	34
	アプロチニン	トウモロコシ	トウモロコシからのアプロチニン抽出・精製法	ブラジル・LEBp: Laboratorio de Engenharia de Bioprocessos, Departamento de Processos Biotecnologicos, FEQ, UNICAMP	35

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
（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  
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

後代交配種における導入遺伝子の安定性を調査するため、MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列情報および内生遺伝子である starch synthase isoform zSTSII-2 (*SSIIb*) 遺伝子の 3' 側塩基配列情報をもとに作成したプライマー対を用いて、MON810 穀粒から一個体ずつ抽出したゲノム DNA をテンプレートと 3' オープン・リーディング・フレームから 3' 非翻訳領域の塩基配列の増幅を試みた。その結果、*SSIIb* 遺伝子においては、MON810 に塩基配列の異なる 2 つの遺伝子がヘテロの状態で入っているために、塩基配列の解読ができなかった。これに対して、導入遺伝子について、68 個の穀粒から増幅された DNA 断片について塩基配列を決定したところ、ラウンドアップ・レディー・ダイズよりもさらに安定に変異率が低いことがわかった。

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

後代交配種における導入遺伝子の安定性を明らかにするために、これまでにラウンドアップ・レディー（RR）ダイズにおける導入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列をクロニングし、「不分別」として輸入されてきたダイズから RR ダイズを 72 粒検出し、それらにおける導入遺伝子の安定性を調べた。その結果、内生遺伝子よりも導入遺伝子のアミノ酸配列における突然変異率は低く抑えられていることが明らかになった。この結果は、導入遺伝子に突然変異が導入され、その活性が失われると除草剤耐性という商品価値が全くなくなるため、突然変異が導入された個体を排除するような人為的なバイアスが育種および種子管理の上で強くかけられているためであると考えられた。そこで、さらにこのことを検証するために、遺伝子組換えトウモロコシの中でも最も輸入量も多い MON810 トウモロコシに焦点をあて、導入遺伝子および内生遺伝子の 3' 側（アミノ酸配列の C 末側）と 3' 非翻訳領域につい

て、1 穀粒ずつから抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行ない、得られた DNA 断片の塩基配列を決定して比較することを試みた。

B. 研究方法

＜方法＞

MON810 トウモロコシ種子からの核 DNA の抽出

MON810 の種子は国立医薬品食品衛生試験所より分与されたものを用いた。その種子を 1 粒ずつ、マルチビーズショッカー（安井器械製）で粉砕した。この粉砕物から厚生労働省から出された通知の方法により核 DNA を抽出した。

MON810 核 DNA をテンプレートとした導入遺伝子および内生遺伝子に対する PCR

Hernandez ら (Hernandez, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P. and Ferrando, A. (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard<sup>R</sup> based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic*

Res., 12: 179-189.) によって報告された MON810 トウモロコシの 3' 挿入近傍塩基配列情報を用いて、導入遺伝子の 3' 側 (アミノ酸配列の C 末側) と 3' 非翻訳領域を増幅するプライマーとして以下のプライマーを設計・合成した; 810-1, 5'-AGGTGAA-GCATGCCAAGCGTCTCAGCG-3'; 810-2, 5'-TTTCCGCGGCATCAACAGGCAGCTCGA-3'; 810-1R, 5'-TGACTTCAGGTCTTAGTGCTCTGGCTC-3'; 810-2R, 5'-TATTGTGCT-TATCGACCCATTTGCTAG-3' (図 1)。また内生遺伝子について、公定法において定量 PCR のための内生コントロール遺伝子として用いられている starch synthase isoform zSTSII-2 (SSIIb) について、データベースに登録されている塩基配列 (アクセション番号 AF019297) を元に、3' 側 (アミノ酸配列の C 末側) と 3' 非翻訳領域を増幅するプライマーとして以下のプライマーを設計・合成した; SS-1, 5'-GACGTGCAGCTCGTGATGCTGGGCACC-3'; SS-2, 5'-CGGCGGTTTCGAGTCGGAGCACAGCGAC-3'; SS-3, 5'-TCAATATAAATACTAACAGGAGTGGCG-3'; SS-1R, 5'-TGACTTCAGGTCTTAGTGCTCTGGCTC-3'; SS-2R, 5'-TAACAGGAGTGGCGATATTAAGTAGC-3'; SS-3R, 5'-TATCAGTGGGAAAATGCCATGCGCCTC-3'; SS-4R, 5'-TGCCCAGTGGCATCATCGTGCCCG-3'; SS-5R, 5'-AATTCCCAGGGCACGCAGCCGACG-3' (図 1)。MON810 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 Ex 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じ、95  $^{\circ}$ C 30 秒  $\diamond$  56  $^{\circ}$ C 45 秒  $\diamond$  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・ゲル電気泳動で PCR 反応産物を確認した。反応産物について、PCR に用いた片側のプライマーを用いて ABI シーケンス・キットを用いてダイレクト・シーケンスを行った。

### C. 結果・考察

#### C.1. MON810 トウモロコシの内生遺伝子 *SSIIb* のオープン・リーディング・フレームの 3' 側の塩基配列と 3' 非翻訳領域の塩基配列における塩基置換

まず内生遺伝子 *SSIIb* に対して合成した SS-1, SS-2, SS-3 のプライマーとこれに対となる SS-1R, SS-2R, SS-3R を用いて MON810 ゲノム DNA を用いて PCR を行ったところ、SS-3 と SS-3R の組み合わせのみ DNA 断片が増幅された (図 2)。そこで、この組み合わせを用いて MON810 68 穀粒から独立に抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、すべてから DNA 断片が増幅されてきた (図 3 右側、68 穀粒のうちの 8 穀粒を例として示した)。そこで、これをテンプレートとしてダイレクト・シーケンス反応を行ったが、得られたシーケンス結果において解読できない N が多数カ所入り、解析できなかった。そこで、この原因を明らかにするために、この断片をゲルから切り出し、クローニングして得られた独立クローンの塩基配列を決定したところ、2 種類の塩基配列が得られた。この結果は、MON810 は *SSIIb* 遺伝子として 2 つの塩基配列の異なった遺伝子をヘテロで含んでおり、一方の塩基配列が他方の塩基配列に対する PCR 反応と競合し、得られた増幅産物において、これら 2 つが混在し、これをダイレクトに PCR によってシーケンス反応を行なうと、その相異なる塩基配列のところから反応産物が 2 つ生じ、これがシーケンサーにおいて両方がともにシグナルとして出てしまうために解読不能となっていると考えられた。

#### C.2. MON810 の導入遺伝子の塩基配列置換

Hernandez ら (2003) によって報告された MON810 トウモロコシの 3' 挿入近傍の塩基配列をもとに作成した 810-1 および 810-2 とこれに対となる 810-1R および 810-2R を用いて MON810 ゲノム DNA を用いて PCR を行ったところ、810-2 と 810-2R の組み合わせの場合に最も高い増幅率で DNA 断片が増幅され、この組み合わせを用いて MON810 68 穀粒から独立に抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、すべてから DNA 断片が増幅されてきた (図 2 左側、68 穀粒のうちの 8 穀粒を例として示した)。そこで、こ

れをテンプレートとしてダイレクト・シーケンス反応を行なったところ、内生の *SSIIb* 遺伝子の場合とは異なり、両方向からシーケンス反応がうまくいき、完全に解析できることが明らかになった。*SSIIb* 遺伝子の塩基配列が決定に至らなかったのに対し、導入遺伝子の配列が決定できた原因として、おそらくここで用いた種子が MON810 ホモ個体と非遺伝子組換えトウモロコシの間の F1 雑種であり、MON810 導入遺伝子が 1 個体の中に 1 個のみ入っている状態であるためと考えられた。

そこで、塩基配列が決定できた 68 穀粒の塩基配列を比較したところ、図 4 に示すように、オープン・リーディング・フレームの 3' 末端と 3' 非翻訳領域のジャンクション近傍では全く塩基配列に違いは見られなかった。これに対し塩基配列を決定したオープン・リーディング・フレームの 3' 側のプライマー近傍において、2 個体で同一位置の G が T へと塩基置換しており、2 個体で異なった位置への 1 塩基の挿入、2 個体で異なった位置への 1 塩基の欠失が見られた。塩基置換の結果、これらの部分でのアミノ酸配列が変わっていること、さらに 1 塩基の挿入および欠失の結果、4 個体においてその部分のアミノ酸配列が変わるとともにアミノ酸の読み枠がフレーム・シフトを起こし、直下にストップ・コドンが挿入されることが明らかになった。これに対し、3' 非翻訳領域においては、プライマー近傍において、5 個体で塩基置換と 9 個体で 1 塩基の挿入、1 個体で 1 塩基の欠失が見られた。4 個体における A から C への塩基置換および 3 個体と 6 個体における G もしくは A の塩基挿入は同一カ所に同じ塩基となっていることから、この部分は交配親の MON810 の個体群の中に、これら 3 カ所の変異を有した個体が混在していて、これらを F1 親として掛け合わせている可能性が考えられた。シーケンスを決定した総塩基配列に対する変異率はオープン・リーディング・フレームの 3' 側については、総塩基数 26,520 bp に 5 カ所、すなわち 5,304 bp に 1 カ所の頻度であり、これに対し、3' 非翻訳領域においては、総塩基数 20,536 bp に 5 カ所、すなわち 4,107 bp に 1 カ所の頻度であることがわかり、MON810 において、3' 非翻訳領

域よりもオープン・リーディング・フレーム側の方が塩基配列の保存性がやや高くなっていることが明らかになった。この値について、RR ダイズにおける導入遺伝子は約 1,200 bp に 1 カ所の塩基変異率であったことと比較すると、MON810 においてはより安定で変異率が低いことが明らかになった。この原因は、RR ダイズについては、日本各地の検疫所で抜き取り検査用にとられたものであり、米国各地で栽培された広範囲から得た集団を用いて解析したのに対し、今回用いた MON810 トウモロコシが撒種用の種子であり、同一カ所の狭い範囲で育成された個体由来であったために、変異率が低かったものと考えられた。

#### D. 研究発表

(論文発表)

Ogasawara, T., Chikagawa, Y., Arakawa, F., Nozaki, A., Itoh, Y., Sasaki, K., Umetsu, H., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Toyada, M., Kamada, H., Goda, Y. and Ozeki, Y. Mutations of the transgene of Roundup Ready<sup>®</sup> soybeans, which could result in the loss of the glyphosate-tolerant phenotype, might be reduced using an artificial selection bias. *J. Health Sci.*, **51**: 197-201 (2005).

Sasaki, K., Umetsu, H., Yamada, A., Kamada, H. and Ozeki, Y. Construction of ELISA system to detect NTPII protein in genetically modified foods. *Jpn. J. Food Chem.*, **12**: 140-144 (2005).

(学会発表)

小笠原健、荒川史博、佐々木和生、梅津博紀、渡邊敬浩、穉山 浩、米谷民雄、合田幸広、豊田正武、鎌田 博、近川幸恵、野崎亜沙美、伊藤佳央、小関良宏：遺伝子組換えダイズの導入遺伝子の突然変異について、日本食品化学学会第 11 回総会・学術大会、東京、2005 年 4 月。

佐々木和生、梅津博紀、山川隆、太田大策、小関良宏：プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用 2. 国産ダイズおよび輸入ダイズのプロファイリング、日本食品化学学会第 11 回総会・学術大会、東京、2005 年 4 月。



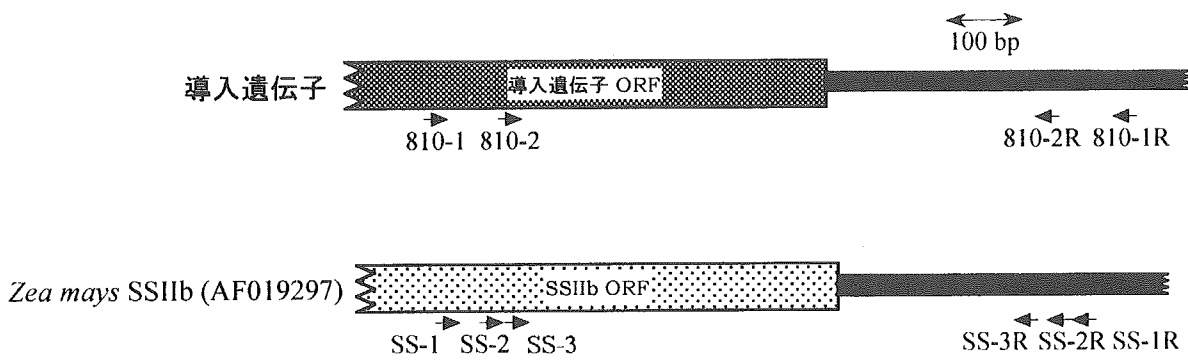


図 1. MON810 導入遺伝子および内生 *SSIIb* 遺伝子のオープン・リーディング・フレーム 3' 端から非翻訳領域の塩基配列に対して作成したプライマーの位置。

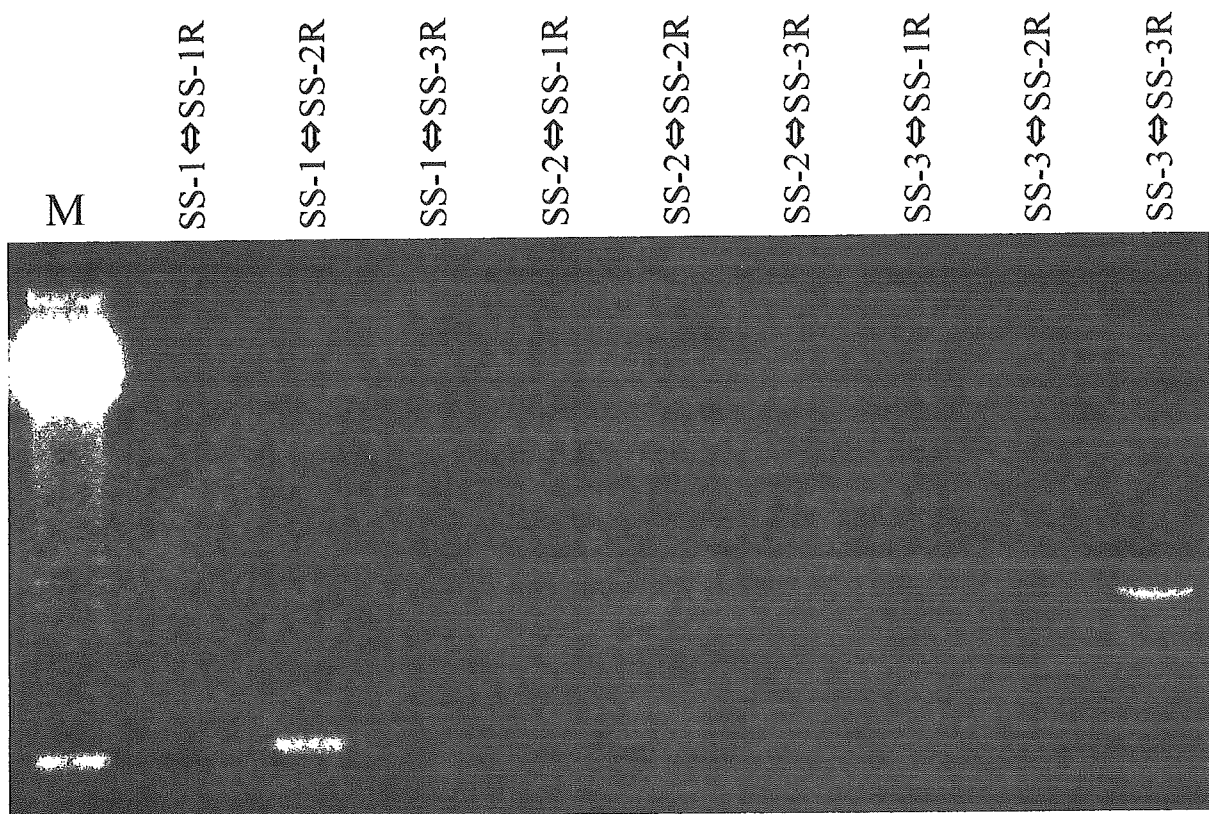


図 2. 内生 *SSIIb* 遺伝子に対する各種プライマーの組み合わせを用いて、MON810 トウモロコシ核 DNA をテンプレートとして PCR を行った時に増幅された DNA 断片。M, DNA 分子量マーカー。

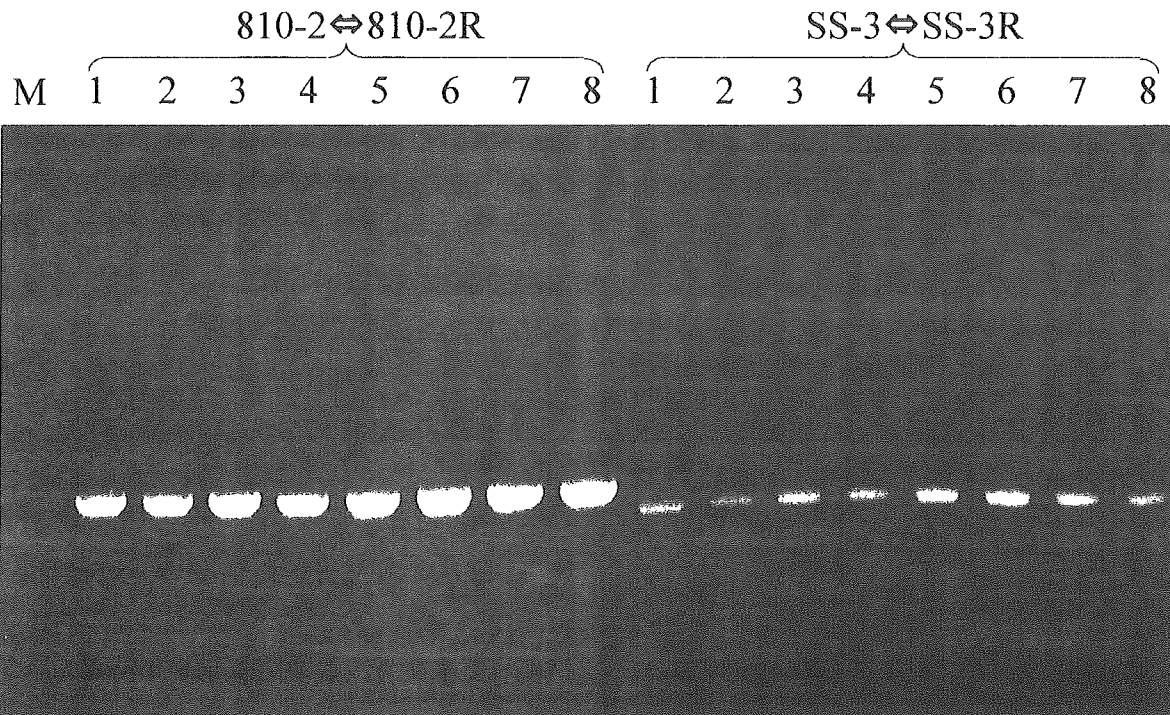


図 3. 8 個体のトウモロコシ穀粒から得た核 DNA をテンプレートとして MON810 導入遺伝子および内生 *SSI1b* 遺伝子のオープン・リーディング・フレーム 3' 端から非翻訳領域の塩基配列を増幅して得られた DNA 断片。M, DNA 分子量マーカー。

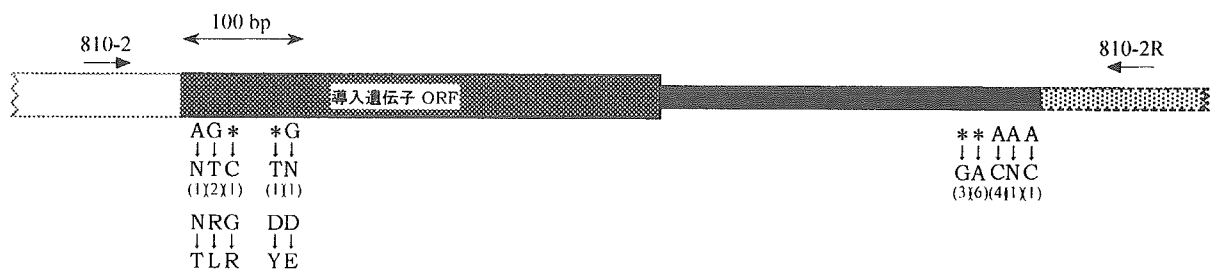


図 4. 68 個体のトウモロコシ穀粒から得た核 DNA をテンプレートとして MON810 導入遺伝子のオープン・リーディング・フレーム 3' 端から非翻訳領域の塩基配列を増幅して得られた DNA 断片において見られた塩基配列置換。上段が塩基配列の変異、左側下段がその変異に伴うアミノ酸配列の変異。→N は塩基配列の欠失、\*→ は塩基配列の挿入を表す。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
（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  
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

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、大豆種子からの RNA 発現について解析の障害となる質的量的ばらつきの検討を一昨年から継続して行なった。今年度は輸入した遺伝子組換え品種を用いて個体間でどの程度 RNA 発現にばらつきがあるか検討した。大豆の RNA 抽出にあたっては破砕機を使用し、市販キットによる RNA 抽出の後、大豆遺伝子の DNA アレイを用いて種子毎に RNA 発現を解析した結果、同一品種内でも個体により大豆遺伝子の発現にかなりのばらつきがあることが分かった。

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が、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いて、導入された遺伝子塩基配列の安定性、およびその遺伝子発現量の安定性を調査することを目的としたものである。

平成 17 年度は一昨年度から続いて、トランスクリプト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ことを目標にした。昨年度は国産の非組換え大豆で多数の大豆種子から安価にそれぞれの RNA を簡便に抽出できる条件を検討したが、品種によって RNA 抽出量に差がみられた。今年度は輸入組換え大豆の同一品種内で種子毎の RNA 抽出量とその発現のばらつきについて検討を行った。

B. 研究方法

< 試料 >

輸入の組換え大豆種子（品種はラウンド・アップ・レディー）を用いた。

< 方法 >

大豆を一粒ずつ粉砕し、導入された EPSP 遺伝子の発現をラテラルフローストリップで確認したものを採用してキット試薬による RNA 抽出の後、DNA マイクロアレイ解析を行った。RNA 抽出にはナカライテスク社製の試薬キット Total RNA 抽出試薬 Sepasol-RNA を用いた。RNA 発現を検討す

るための DNA チップによるマイクロアレイ解析 (AFFYMERIX、GeneChip Soybean Genome Array による) は、大豆 DNA のプローブ (約 37,500 種類) を用いて行った。

(論文発表)  
なし  
(学会発表)  
なし

### C. 結果

3 粒の大豆種子からそれぞれ RNA を抽出し、お互いの遺伝子発現の差を調べたところ、述べ 61,170 のプローブに対して、いずれも約 1/3 の遺伝子で転写産物が検出された。このうち全体の 5% 程度に 2 倍以上 (あるいは 1/2 以下) の発現レベルの変化が見られた。

実験に供した 3 粒のうち 2 粒は発現変動の見られる遺伝子が一致する傾向があり、グルーピングにもよるが相互の比較で 20-70% が一致する一方、他の 1 粒では 10-50% の一致にとどまった。これら発現変動の見られる遺伝子群の特徴を検討したが、現在のところ特に特定のグループに属することは見い出されていない。

### D. 考察

実験操作上、大豆の RNA 抽出にあたっては、検体大豆を -80°C の冷凍庫から取り出して瞬時に抽出用の緩衝液中で破碎しないと RNA が分解されて発現解析が困難になるため、転写産物の分析には DNA、タンパク質の扱いと比較して迅速に行なう必要があった。大豆の DNA チップで転写産物の発現が確認された遺伝子は調べたうちの約 1/3 ではあるが、同一品種を用いた今回の実験でも 5% 程度は有意に 2 倍以上 (あるいは 1/2 以下) の発現変動が見られたが、これらの遺伝子群には共通の特徴が見あたらないため、遺伝子発現には全体的なばらつきがあるものと考えられた。

### E. 研究発表