

た植物製品そのものを病気の予防や治療に利用しようとする試みがなされるようになってきた。このような医薬品類を生産する作物（薬用GM植物）も、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃場での栽培も行われている。したがって、以上のような意図的に成分を変化させた作物や医薬品類を生産する作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。本研究では、薬用GM植物の開発・生産・商品化に関する情報を収集整理し、開発企業等の現状を調査するとともに、カテゴリー別の分類を行い、食品の安全性評価基準作成の一助とする。

B. 研究方法

まず薬用GM植物の範囲を、遺伝子組換え植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物と位置づけた。また、近年、牛、豚、鶏等の家畜は、人畜共通の感染症の報告があることから、これらの家畜の健康に影響を与える植物も、薬用GM植物の範囲とした。薬用GM植物に関する情報を文献データベース（Entrez PubMed、Chemical Abstracts）、インターネット検索（Google）、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、分類した。なお、カテゴリーはあくまでも便宜的に設けたものであり、絶対的な範疇ではない。

C. 研究結果

1. 薬用GM植物の分類

情報収集の結果、開発・研究中の薬用GM植物は、種類が多く、その開発方法も多様であった。したがって、まず便宜的に設けたカテゴリーに従った分類を試みた。はじめに、薬用GM植物を、利用方法あるいは利用物質を基準に分類した。利用方法を基準とした場合、そのまま食用としての利用を目的とするもの

に、1) 機能性食品、2) 食用ワクチン、3) 食用医薬の3種があった。また、抽出・精製物の利用を目的とするものとして、1) ワクチン抗原、2) 抗体医薬、3) 治療薬、4) 診断薬・試薬の4種があった。

一方、利用物質を基準とした場合、導入遺伝子産物を利用物質としているものには、1) 酵素、2) 抗原（ワクチン）、3) 抗体、4) オータコイド、5) ホルモン、6) その他のタンパク質あるいはペプチド類があった。遺伝子産物（酵素）の代謝物を利用物質とするものに、1) ビタミン類、2) 脂質、3) その他の成分（植物二次代謝物など）があった。

2. 薬用GM植物開発理由

薬用GM植物が開発されている主な理由として、1) 安価な生産コスト、2) 高い安全性、3) 簡便性の3つがあげられている¹⁾。

1) 安価な生産コスト：薬用GM植物による医薬品類の生産は、GM植物作出までは設備投資が必要であるが、一旦種子が得られてしまえば通常の作物の増産と同様であるため、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞のように培養のための設備や培養液が不要である。薬用GM植物の栽培に必要なのは日光、空気、水、土、肥料などである。Subramanian(2004)¹⁾は、純タンパク質1gを哺乳動物細胞で生産する時のコストは\$200（年200kg生産時）であるが、これと同じタンパク質である単クローン抗体を遺伝子組換えトウモロコシで生産する時のコストは1gあたり\$50（年100kg生産時）であり、さらに生産量を増加させると1gあたり\$4.5（年100,000kg生産時）まで下げることが可能であると報告している。

2) 高い安全性：薬用GM植物による医薬品類の生産は、通常の作物の栽培でありながら、大腸菌のように内毒素混入の恐

れない。また、動物細胞のように感染性因子の混入の恐れがない。そのため、生産現場および使用現場の両方の安全性が確保できると期待されている^{2, 3)}。最近、BSE（ウシ海綿状脳症）の人への感染例が報告され、医薬品、化粧品及び食品として広く利用されていた牛由来ゼラチン、コラーゲン等の代替品を如何に確保するかが問題となった。植物によるタンパク質生産は、動物由来の感染性因子の混入を避けられるため、薬用GM植物によるこれらのタンパク質生産も研究されている⁴⁾。

3) 簡便性：一旦医薬品等を生産する組換え植物の種子が得られれば、あとの操作は通常の作物の栽培と同様である。すなわち、医薬品原料（GM薬用植物）の輸送、保存、長期保存が簡便な上、種子で簡単に増産できる。また、交配で簡単に物質の再構築が可能で、実際に交配により分泌型IgAの再構築⁵⁾ や糖鎖修飾が行われている⁶⁾。さらに、薬用GM植物開発材料として食用作物を用いた場合、目的とする成分以外の成分に変化がなければ、その他の成分等については長い食習慣から十分に安全であると判断出来るため、医薬等の抽出・精製過程が不要もしくは簡素化が可能であると考えられている。医薬品等を生産する食用GM作物を通常の食品と同様に摂取する食用ワクチンや食用医薬は、投与方法が簡単（食べるだけ）であるだけでなく、注射を必要としないため、痛みがなく、また注射針による医療従事者の感染リスクを排除できる。また、植物細胞内のワクチン抗原やペプチド等は単離されたものよりも安定であるため、保存のための冷蔵装置が不要といわれており、特に発展途上国での応用が期待されている²⁾。

以上のような利点から、組換え植物を栽培して医薬品等を生産する研究開発は、最近、急速に増加しており、この手

法はmolecular farming、bio-farming、bio-pharmingあるいはpharm-farmingと呼ばれている。また、この手法で作られた製品も含めてバイオテクノロジーで生産された医薬品等はbio-pharmaceuticalsと呼ばれているが、特に組換え植物が利用された場合、plant-made pharmaceuticalsと呼ばれている。このうち、特に組換え植物で生産された抗体はplantibodyと呼ばれているが、PlantibodyTMは、エピサイト社（現在は、バイオレックス社に買収されている）の登録商標である。さらに、食用ワクチンは、edible vaccineと呼ばれている。

3. 薬用GM植物開発・生産方法

薬用GM植物を作成するための外来遺伝子導入法は、既に食用として流通しているGM作物と同様に、主にパーティクルガン法（Particle bombardment）とリゾビウム（アグロバクテリウム）法が用いられている¹⁾。最近、日本で報告された薬用GM植物「花粉症予防米」⁷⁾ 及び「糖尿病治療米」⁸⁾ は、MATベクター法⁹⁾ と呼ばれるリゾビウム法の改変法が使われており、組換え体の選抜に用いた抗生物質耐性遺伝子が育成されたGM植物から除去されるよう工夫されている。

薬用GM植物は、直接ヒトの健康へ影響を与える物質を生産するため、その栽培にあたってのガイドラインは、除草剤耐性や害虫抵抗性などの農業上重要な性質を付与した作物とは別の観点から作成されている^{10, 11)}。これらのガイドラインでは、当然、組換え遺伝子の環境への放出を回避するよう求められているが、一方、開発企業側においても組換え遺伝子の環境への放出を回避するための方法がいくつか工夫されている。その例を以下に示した。

1) 組換え植物ウイルスの利用

Large Scale Biology Corporationの

GeneWare[®]は、TMV（タバコモザイクウイルス）ベクターに組換え遺伝子を挿入してタバコ植物体に感染させ、タバコの葉から目的タンパク質を精製するシステムである。植物への遺伝子組換えは行わないため、交雑による遺伝子の拡散が回避できるとされている¹²⁾。

2) 傷害誘導プロモーターの利用

CropTech Corporation のMeGA-PharM[™]は、傷害誘導プロモーター制御下で組換え遺伝子をタバコに遺伝子導入するシステムである。タバコ生育時は組換えタンパク質を生産しないが、葉を収穫し、裁断すると組換えタンパク質が生産される¹³⁾。

3) 葉緑体への遺伝子導入

Chlorogen, Inc. は、組換え遺伝子をパーティクルガンで葉緑体中に導入し、医薬用タンパク質をタバコで生産している。染色体ゲノムへの組換えを行わないため、交雑による遺伝子拡散を回避できるとされている¹⁴⁾。

4) 組換えタバコの水耕栽培

Phytomedics社のTobacco-based REPOST/GAT protein expression system は、根から組換えタンパク質を放出させ、培地を回収して精製するシステムである。閉鎖系で栽培・生産を行うとされている¹⁵⁾。

5) 組換えウキクサ (*Lemna*) の室内栽培
Bioplex社のLEX system[™]は、組換えウキクサで医薬品等を生産するシステムである¹⁶⁾。このシステムで製品化したBioplex社初の治療薬インターフェロン α (INF α -2b) が2004年12月に申請され、フェーズI試験 (Q1) を2005年1月から開始 (最終報告書Q3は2005年終了予定) と紹介されている。

4. 薬用GM植物として開発されている植

物 (米・カナダの例)

米国、カナダにおいて薬用GM植物として開発されている植物として、食用作物はトウモロコシ、コムギ、ダイズ、イネ、ナタネ、ジャガイモ、トマト、ベニバナ、サトウキビ、豆類 (beans及びpeas)、野菜類、家畜飼料用作物はアルファルファ (食用ともなる)、牧草 (イネ科植物)、食用以外の作物はワタ (食用ともなる)、アサ、タバコ、水生植物はウキクサ、その他観賞植物、樹木が報告されている^{17, 18)}。

5. 2004-2005年の米国における薬用GM植物圃場栽培申請・認可及び作付け状況
Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of February 21, 2006¹⁹⁾によると、薬用GM植物 (産業用及び環境修復用GM植物を含む) の野外圃場栽培は、2004年においては276.61エーカーの栽培が申請され、実際には45.35エーカーに作付けられた。このうち、米国において2004年度に野外圃場栽培試験の申請・承認が行われた作物で件数が多かったのは、トウモロコシ7件次いでタバコ5件 (ただしTMVも含む) であった¹⁹⁾。2005年においては、456.24エーカーの野外圃場栽培が申請され、取下により申請面積が減少したため122.74エーカーの許可があり、実際には78.45エーカーに作付けされている。2005年の作物別申請件数は、ベニバナ6件、イネ6件、タバコ5件 (TMVも含む)、トウモロコシ2件、オオムギ1件である。

Chlorogen, Iowa State University, Large Scale Biology, Planet Biotechnology, SemBioSys Genetics, Ventria Bioscienceの5社1大学は、両年ともに野外圃場栽培を行っており、薬用GM植物開発研究が活発に行われていると推察される。両年に栽培された薬用

GM植物のうち、トウモロコシ、ベニバナ、イネ、オオムギが食用作物であるが、そのいくつかは、生産物が社外秘となっているため、生産物の詳細は不明である。2005年10月20日以降にAPHISへ提出された薬用GM植物野外圃場栽培の申請の多くは2006年3月9日現在で審査中になっているが、Ventria Bioscienceが6件のイネ（うち3件は申請取下）、SemBioSys Geneticsが2件のベニバナ、Washington State Universityが1件のオオムギ、Planet Biotechnologyが3件のタバコ、MacIntosh & Associatesが1件のエンドウを申請している。

米国のUnion of Concerned Scientistsは、米国農務省（U. S. D. A.）が2004年7月2日までに承認した薬用GM植物圃場栽培試験のデータベース（Pharma Crop Database）をインターネット上で公開している²⁰⁾。それによると、それぞれの作物の認可件数は、アルファルファ：4件、大麦：5件、トウモロコシ：144件（うち86件はプロディジーン社によるもの）、ナタネ：3件、イネ：11件、ベニバナ：2件、ダイズ：26件、サトウキビ：1件、タバコ（組換えウイルス）：12件、タバコ：11件、トマト：1件、小麦：2件であった。

6. 薬用GM植物に関する国際学会

Society for moleculture²¹⁾（旧名称：International Association of Molecular Farming）は、「Conference on Plant-made Pharmaceuticals」（1997年から開催）を主催するためにPlant factoryでBiopharmaceuticalsを生産している機関により設立された団体である。最近の「Conference on Plant-made Pharmaceuticals (PMP) 2005」²²⁾は、2005年1月30日～2月2日にカナダ・モントリオールで開かれ、380人の参加者に対し、29のPMP企業等が最新の開発状況の発表を行った。なお同団体では、「Moleculture」を「ヒトや動物の健康

に役立つ組換え分子や、産業、栄養強化、環境浄化に役立つ組換え分子を生産するために、植物、動物等の高等生物を利用すること」と定義している。

7. 植物工場グループ企業

「Conference on PMP 2005」のHP²²⁾で紹介されている植物工場グループ企業等（plant-factory groups）と、各社のHP、公表論文、学会講演内容から研究・開発内容に関する情報を調べた。それぞれの企業等が、独自に開発した医薬品等の生産を指向しているのではなく、それぞれの企業等がもつシステム（植物による生産システム）と植物を用いて、共通の医薬品等の生産を行っている例が多い。ほとんどの場合、ターゲットとしている医薬品等は、特許切れや特許が切れそうなもの（ジェネリック薬）である。それぞれの薬用GM植物開発企業は、製薬会社等と共同開発を行っている。いくつかの例を次項に示す。

8. 米国植物工場グループ企業

Biorex、Chlorogen、Chromatin Inc.、Controlled Pharming Ventures、Dowpharma、Kentucky Tobacco Research and Development Center、Large Scale Biology Corporation、Phycotransgenics、LLC、Phytomedics、Planet Biotechnology、Inc.、Prodigene、Solazyme、Inc.、Altor BioScience Corporation、Ventria Bioscienceの14社が植物工場グループとして紹介されている。そのうち5社は食用作物（ダイズ、ナタネ、トウモロコシ、トマト、イネ、オオムギ、ササゲ、レタス）を用いた薬用GM植物開発を行っている。特に、プロディジーン社のトウモロコシ及びベントリアバイオサイエンス社のイネは、試薬としては既に薬用GM植物由来の商品が市場に出ており、その他治療薬、機能性食品、食用医薬、食用ワクチンの開発が進んでいる。

BIOLEX：組換えウキクサ (*Lemna*) を室内栽培 (LEX systemTM) し、製薬会社等 (バイエル社、セントコア社、デビオ社等) と提携しながら、あるいは独自で、プラスミノゲン (血漿中のタンパク質分解酵素プラスミン前駆体)、抗体等の様々な医薬用タンパク質を生産している。Biolex 社初の治療薬インターフェロン α (INF α -2b) が 2004 年 12 月に申請され、フェーズ I 試験 (Q1) が 2005 年 1 月から開始された (最終報告書 Q3 は 2005 年終了予定)。BIOLEX は、2004 年 3 月 6 日に Epicyte Pharmaceutical, Inc. の買収を発表し、同社が保有する、組換え植物による抗体生産システム (PlantibodiesTM) を獲得している²³⁾。

Chlorogen, Inc.：葉緑体中で組換え遺伝子を発現させ、医薬用タンパク質をタバコで生産している²⁴⁾。これらのタンパク質には、コレラワクチン、ヒト血清アルブミン (医薬用及び試薬)、インターフェロン α (C 型肝炎治療)、インスリン様成長因子 (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) などがある。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を行っている。

Large Scale Biology Corporation：タバコモザイクウイルス (TMV) ベクターに組換え遺伝子を挿入してタバコ植物体に感染させ (植物への遺伝子組換えは行わない)、タバコの葉から組換えタンパク質を精製するシステム GeneWare[®]により、種々の医薬用タンパク質を生産している。商品化をめざしている生産物として、以下が紹介されている²⁵⁾。

α ガラクトシダーゼ A (AGa1A) (ENZAGALTM)：ファブリー病治療薬。2003 年 1 月 FDA によりオーファンドラッグとして認められ、商品化をめざしている。

前臨床の動物モデル試験で効果を確認している。

ヒト組換えリソソーム酸リパーゼ (lysosomal acid lipase, LAL)：アテローム性動脈硬化症治療薬。LAL は、前臨床の動物試験で、効果が認められている、これを治療薬として共同開発する権利を得、LAL の効率的生産に着手している。

アプロチニン (aprotinin) (APRONEXINTM)：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 より販売されている。現在、医療用 (心肺バイパス手術時の出血量の減少) としても開発中である。

非ホジキンリンパ腫カスタムワクチン (Non-Hodgkin's lymphoma personalized cancer vaccines)：個々人で病状が異なる NHL の治療のため、患者特異的な治療用ワクチンを 6-10 週間で生産するとしている。臨床試験の初期段階が終了し、安全性と免疫効果を確認している。

ヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチン：子宮頸癌予防及び治療薬 (HPV は子宮頸癌の原因ウイルスとされている)。University of Louisville's James G. Brown Cancer Center と共同開発中で、現在前臨床段階である。

その他の生産物として、インターフェロン α -2a、インターフェロン α -2b、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、B 型肝炎ワクチン抗原、その他サイトカイン、増殖因子、酵素、酵素阻害剤等があげられている。

Planet Biotechnology：組換えタバコにより、分泌型 IgA、レセプター結合 SIgA

等の抗体医薬を生産している。同社が、虫歯予防・治療薬としてガイ病院と共同開発開発した CaroRx™（抗虫歯菌抗体：SIgA）は、3年以内の商品化を目指し、現在フェーズ II 臨床試験中である。また同社は、風邪の主な原因であるライノウイルス（ハナカゼウイルス）のヒトへの感染を防止する初期治療薬として、ヴァージニア大学と共同で、ライノウイルス受容体タンパク質 ICAM-1 と SIgA 複合体（Protected-SIgA™）RhinoRx™を開発した。RhinoRx™は、2005年四半期に前臨床安全性試験が終了し、フェーズ I/II 試験最終報告が提出される予定である。さらに、アントラサイクリン系抗悪性腫瘍性抗生物質ドキシソルピシンによる化学療法時の主な副作用である脱毛症を予防する医薬品として、抗ドキシソルピシン単抗体 DoxoRx™を開発した。DoxoRx™はフェーズ I 試験中である²⁶⁾。

ProdiGene, Inc. : 組換えトウモロコシにより、様々な医薬用タンパク質の他、食用ワクチンを生産している²⁷⁾。同社が既に商品化あるいは5年以内の商品化を目指したものとして、以下が紹介されている²⁸⁾。

トリプシン（医薬中間体）、β-グルクロニダーゼ（診断薬）、アビジン（免疫試薬）、アプロチニン（抗炎症、出血減少、創傷治療、哺乳細胞培養）、コラーゲン（ゲルカプセル剤、スキンシーラント、やけど治療薬）、ブラゼイン（甘味料、西アフリカイチゴ *Pentadiplandra brazzeana* から発見された蛋白質で砂糖より500倍甘く、加熱してもその甘みを失わないと報告されている）、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）食用ワクチンなど

Ventria Bioscience : 自殖性の高い作物（イネ、オオムギ）を用い、種子で組換え遺伝子を発現させ医薬品類の生産を

行っている²⁹⁾。組換えイネにより生産したヒトラクトフェリン及びヒトリゾチームは既に試薬として商品化しており、これらはその他の用途（機能的食品及び食用医薬）のための開発が進行中である。2006年においては、これらの作物の大規模野外圃場栽培（100エーカー以上）が計画されている¹⁹⁾。その他、マタイレシノール（黒ごま中の抗酸化ポリフェノール）含有米（機能的食品）なども開発されている。

9. カナダ植物工場グループ企業

Agrisoma Biosciences Inc.、Bevo Farms、Linnaeus Plant Sciences Inc.、MEDICAGO INC.、Plantigen、Prairie Plant Systems, Inc.、SemBioSys Genetics の7社が植物工場グループとして紹介されている。このうち2社が食用作物（アルファルファ、ベニバナ）を用いた薬用 GM 植物開発を行っている。特に SemBioSys Genetics 社のベニバナは、米国での野外圃場試験も行われている。同社は、油脂作物であるベニバナ種子のオイルボディの構造タンパク質（オレオシン）と外来タンパク質をオイルボディへ貯蔵させ（oilbody-oleosin technology、Stratosome™）、融合タンパク質から医薬用タンパク質を抽出精製する技術を開発し³⁰⁾、ヒトインスリン、アポリポタンパク質 AI の他、家畜用ワクチン、抗体医薬、試薬なども生産している。また、同技術で開発した高機能的食用油（高DHA含有ベニバナ油、高γ-リノレン酸含有ベニバナ油）は、提携会社の方で、商品化が行われている³¹⁾。

10. EU植物工場グループ企業

デンマーク1社（Cobento Biotech）、フィンランド1社（UniCrop Ltd.）、フランス3社（CropScience、BioScience、LemnaGene、MERISTEM Therapeutics）、ドイツ7社（Fraunhofer IME、Icon Genetics AG、Maltagen Forschung GmbH、

Novoplant GmbH、Planton、SunGene、greenovation Biotech GmbH)、アイスランド1社 (ORF Genetics)、スペイン1社 (Agrenvec)、スイス1社 (Syngenta)、オランダ1社 (Plant Research International) の16社が植物工場グループとして紹介されている。このうち、12社が食用作物 (ナタネ、ワタ、イネ、ウキクサ、トウモロコシ、オオムギ、ジャガイモ、アマ、エンドウ、ベニバナ、トマト、イチゴ) を用いた薬用GM植物開発を行っている。ウキクサは日本では食用とされないが、LemnaGene社 (フランス) のHPは、ウキクサは食用作物であり、生食もされると紹介されている。同社は2005年7月からBiolex Therapeutics社の完全子会社となっており、ウキクサによる食用PMP生産を目指している。

フランス・MERISTEM®THERAPEUTICS：トウモロコシ、タバコで医薬品類を生産している。トウモロコシ由来のMerispase® (胃リパーゼ：嚢胞性繊維症治療薬) は、フェーズII臨床試験が2004年7月に終了し、胃リパーゼ生産トウモロコシは2005年4月27日にフランス農務省より20 haの野外圃場での栽培が認可された。その他、膵リパーゼ (Cter)、ラクトフェリン、血漿多価酵素 (plasma multimeric enzyme)、ヒトアレルギーン、ヒトヘモグロビン、ヒト血清アルブミン、コラーゲン、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を生産している。周年生産が可能のように、フランス、イタリア、米国、チリで組換えタバコ、組換えトウモロコシを圃場栽培している³²⁾。

ドイツ・Maltagen Forschung GmbH：組換えオオムギ種子及び麦芽により、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)、

ヒトリゾチーム (機能性食品、試薬)、ソーマチン (天然甘味料)、バカプレルミン (糖尿病性潰瘍治療薬)、ヒトβ-ディフェンシン-2 (炭疽病治療)、ワクチン (接種用及び食用) などの医薬品類を生産している³³⁾。ハンガリーの野外圃場で栽培試験を行い、医薬品類の生産性を確認している。

11. その他の外国の植物工場グループ企業

アルゼンチン1社・(Instituto de Virologia)、オーストラリア1社 (Farmacule BioIndustries Australia)、イスラエル1社 (Evogene Ltd.)、韓国1社 (NEXGEN Biotechnologies, Inc.) の4社が植物工場グループとして紹介されており、全社とも食用作物 (アルファルファ、バナナ、サトウキビ、ワタ、トマト、マクワウリ、キュウリ) を用いた薬用GM植物開発を行っている。

12. 国内の主な薬用GM植物開発研究所

国内の主な薬用GM植物開発研究所として、(独) 農業生物資源研究所 (茨城) 及び(独) 産業技術総合研究所 (北海道) がある。(独) 農業生物資源研究所の花粉尘緩和米は、マウスを用いた実験で効果が認められているため、2005年に同研究所内隔離圃場での栽培が行われ、収穫したコメを用いてさらに食品としての安全性を調べるため、マウス、ラット、カニクイザルを用いた試験が行われる予定である³⁴⁾。2006年は、ヒトでの経口摂取による食品安全性・有効性の評価のための材料を得るため、花粉尘緩和米の二期作 (4月上旬～及び8月上旬～) が予定されている。一方、(独) 産業技術総合研究所では、GMP (製造管理及び品質管理に関する基準) に対応した植物工場が建設され (早ければ2006年に稼働)、外界から完全に隔離された状態で、薬用GM植物の栽培、抽出、精製が行われ、医

薬品生産系に求められる評価（生育特性、安定性、生産コストなど）が行われる予定である³⁵⁾。

13. 臨床試験段階にある薬用 GM 植物製品^{36, 37)}

薬用 GM 植物に関する総説^{36, 37)}及び開発企業 HP により臨床試験段階にある薬用 GM 植物製品を調べた。フェーズ II が終了しているものが 2 製品 (MERISTEM Therapeutics 社の胃リパーゼ、ラクトフェリン)、フェーズ II 中が 3 製品

(Monsanto 社アビジン及び IgG、Planet Biotechnology 社 IgGs、Cobent Biotech 社 Human intrinsic factor)、フェーズ I / II 中とされているものが 5 製品

(Planet Biotechnology 社 sIgA、Large Scale Biology 社非ホジキンリンパ腫カスタムワクチン、Texas A & M University 毒素原性大腸菌食用ワクチン及び B 型肝炎食用ワクチンならびにノーウオークウイルス食用ワクチン)、フェーズ I 中が 5 製品 (MERISTEM Therapeutics 社ラクトフェリン、Prodigene 社毒素原性大腸菌食用ワクチン、Arizona State University ノーウオークウイルス食用ワクチン、Thomas Jefferson University 狂犬病食用ワクチン及び B 型肝炎食用ワクチン) で、合計 15 製品である。しかし、PMP 2005 グランドホスト企業 (Bayer CropScience, BioScience、Dow AgroSciences LLC、NEXGEN Biotechnologies, Inc.、Syngenta) は、いずれもこの分野の研究の先導的企業であるが、開発中の製品に関する詳細情報を公開していない。また同様に、PMP 2005 ホスト企業 (Agrisoma Biosciences Inc.、Chlorogen、Dow BioPharma、ERA Plantech、Fraunhofer USA、GENEART GmbH、Icon Genetics AG、Large Scale Biology Corporation、MEDICAGO, INC.、MERISTEM Therapeutics、ORF Genetics、Planet Biotechnology, Inc.、SemBioSys Genetics

UniCrop Ltd.) の多くも、開発中の PMP 製品情報の詳細を公開していない。したがって、臨床試験段階にある薬用 GM 植物製品数は、今回把握できた数よりはるかに多いと考えられる。

米・Monsanto 社は、2003 年 10 月に PMP 開発の中止を発表し、2004 年からは薬用 GM 植物による医薬品開発を行っていない。しかし、機能性食品（栄養機能を高めた飼料及び食品）の開発は継続して行っており、高リジントウモロコシ（飼料及び食用、アミノ酸生産菌

Corynebacterium glutamicum の Cordapa 遺伝子導入)、低リノレン酸ダイズなどが作出されている³⁸⁾。高リジントウモロコシは、現在 Renessen 社 (Monsanto 社と Cargill 社の合弁会社) において、商品化の最終段階を迎えている。当該トウモロコシは、飼料として商品化するために必要とされる基準を満たし、USDA から認可が下りたことが 2006 年 2 月 6 日に公表されている³⁹⁾。また、日本においても飼料用及び食品としての安全性評価が行われている⁴⁰⁾。低リノレン酸ダイズは、ラウンドアップレディダイズから従来の育種法により作成されたダイズで、ダイズ油脂中通常 8% 含まれているリノレン酸が 3% 以下まで低下している⁴¹⁾。従って、これはグリホサート耐性遺伝子 (EPSP 合成酵素) を持つ組換えダイズである。当該ダイズは、2004 年 9 月 1 日より米国で販売が開始されており、これから作成されたダイズ油は保存性が向上し、体に有害とされ 2006 年 1 月 1 日より米国での表示が義務づけられたトランス脂肪酸がほとんど含まれないため、食用油製造業者、販売社、消費者の全てに有益な商品であると紹介されている⁴²⁾。同社ではさらに、加工特性や健康機能を高めるために、オレイン酸、リノール酸、飽和脂肪酸の含量を変化させたダイズや、オメガ 3 脂肪酸合成酵素遺伝子を導入したオメガ 3 脂肪酸高含有ダイズも開発が進められている⁴³⁾。

14. 薬用GM植物開発・研究状況

昨年度及び今年度に収集した薬用GM植物開発・研究状況調査内容を、1) 機能性食品、2) 食用ワクチン、3) 食用医薬、4) ワクチン抗原、5) 抗体医薬、6) 治療薬、7) 診断薬・試薬の7つのカテゴリー別に整理し集計した結果、機能性食品44件、食用ワクチン39件、食用医薬17件、ワクチン抗原17件、抗体医薬16件、治療薬58件、診断薬・試薬16件であった。

D. 考察

2005年及び2004年の薬用GM植物の米国野外圃場栽培認可及び作付け状況をAPHIS、USDAのHPから調べ比較すると、認可面積は1.6倍(2005年/2004年)、作付け面積は(2005年/2004年)1.7倍に増加している。モンサント社のように、薬用GM作物開発の中止を表明する企業がある一方で、その簡便性、経済性、生産性を利用し、多くの提携製薬企業とともに医薬品類の開発を盛んに行っている企業がある。上記のモンサント社も、GM植物による機能性食品の開発は継続している。

2004年、2005年の各企業等の米国における薬用GM植物の野外圃場栽培申請面積を申請内容が公表されているものについて調べたところ、そのほとんどが10エーカー以下の申請で、10エーカー以上の栽培を申請したのは、2005年のLarge Scale Biology社のタバコ(申請:10-49エーカー)だけであった。2006年においては、2006年3月9日現在で5社2大学から既に775.55エーカーの栽培申請が提出されており、2004年の申請面積456.24エーカーの1.7倍の面積である。2006年の栽培が認可されたのは2006年3月9日現在Ventria Bioscience社の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)の3作物で、ヒト血清アルブミン生産米は10-49エーカー、ヒトラクトフェリン生産米及びヒトリゾチーム生産米は100エーカー以上の作付けが認可されている。広大な面積に作付けが予定されているVentria Bioscience社のヒトラクトフェリン生産米及びヒトリゾチーム生産米は、どちらもヨーグルトのサプリメント、ミール、飲料、クッキー(グラノーラクッキーなど)などの食品や、酒類の添加物、医療用乾燥食品などへの利用が進められている。

薬用GM植物に関する国際学会

(Conference on Plant-made Pharmaceuticals 2005)で植物工場グループとして紹介されている企業の研究開発内容を調べた結果、米国5社、カナダ2社、EU12社、その他の国4社、計23社が食用作物(アマ、アルファルファ、イチゴ、イネ、ウキクサ、エンドウ、オオムギ、キュウリ、ササゲ、サトウキビ、ジャガイモ、ダイズ、トウモロコシ、トマト、ナタネ、マクワウリ、バナナ、ベニバナ、レタス、ワタ)を用いた薬用GM植物開発を行っており、その中の12社で食用を目的とする薬用GM植物-機能性食品、食用医薬、食用ワクチン-開発研究が確認できた。しかしながら、研究開発中の商品の詳細を明示しない企業の方が多いため、食用作物を用いた薬用GM植物開発企業の多くは、食用を目的とする医薬品類の開発を指向していると思われる。

これまでの調査により、それぞれのカテゴリーに分類した研究・開発数は、機能性食品44件、食用ワクチン39件、食用医薬17件、ワクチン抗原17件、抗体医薬16件、治療薬58件、診断薬・試薬16件であった。キーワードの選択および情報ソースの選択方法により、収集情報の種類及び数が異なる可能性は否めないが、薬用GM植物研究開発の中でも、特に機能性食品、食用ワクチン及び治療薬の開発が

盛んである実態が伺えた。これらの薬用GM植物研究は、着手直後と思われるものから、すでにヒトボランティアでの安全性試験、臨床試験を終えたものなど、その開発段階は様々である。最近、これら薬用GM植物の有効性や、安全性に関する研究報告も増加していることから、今後は、開発研究だけでなく、有効性、安全性に関する情報も収集する必要があると思われる。

E. 結論

薬用GM植物の範囲を、遺伝子組換え(GM)植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用GM植物に関する情報を収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリとして、機能性食品、食用ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬の7種類を設定し、それぞれの一覧表を作成した。その結果、それぞれのカテゴリ別に集計した研究・開発数は、機能性食品44件、食用ワクチン39件、食用医薬17件、ワクチン抗原17件、抗体医薬16件、治療薬58件、診断薬・試薬16件であり、薬用GM植物研究開発の中でも、特に機能性食品、食用ワクチン及び治療薬の開発が盛んである状況が伺えた。本研究結果から、薬用GM植物による医薬品類の生産は、生産コストが安価であること、生産者・利用者双方にとって安全性が高いこと、複雑なタンパク質等の再構築が容易に行えることなどの理由から、最近ますます活発に開発・研究が行われている実態が明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

1. 吉松嘉代 (2006) : 薬用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向、医薬品研究、印刷中

学会発表

1. 吉松嘉代、木内文之、手島玲子、長尾拓 : 薬用GM植物の開発状況・生産実態の調査
日本生薬学会第52回年回 (金沢)
(2005. 9)

解説

1. 吉松嘉代、「遺伝子組み換え植物の現状と未来 (1) 遺伝子組換え食品の開発に用いられた技術」、農林経済 (時事通信社、2005. 7. 25) 第9713号、2-7
2. 吉松嘉代、「遺伝子組み換え植物の現状と未来 (3) 遺伝子組換え食品の安全性評価」農林経済 (時事通信社、2005. 10. 6) 第9730号、2-7
3. 吉松嘉代、「遺伝子組み換え植物の現状と未来 (4) 健康維持に役立つ遺伝子組換え植物」農林経済 (時事通信社、2005. 11. 14) 第9739号、2-7
4. 吉松嘉代、「遺伝子組み換え植物の現状と未来 (7) 植物ワクチン」農林経済 (時事通信社、2006) 印刷中

G. 参考文献・インターネットホームページ

- 1) Subramanian, S. (March 24, 2004) Biotechnology and Society, Part XVIII, Biopharmaceuticals (<http://www.chennaionline.com/science/BiotechCorner/18biotech.asp>)
- 2) 松本安喜、辻 尚利、荒川 武、山川 隆 (2001) 食べるワクチン-遺伝子組換え植物にワクチンを作らせる-、遺伝、55 : 39-45.
- 3) Warzecha, H.; Mason, H. S. (2003) Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. Journal of Plant Physiology, 160: 755-764.

- 4) Reuters reports 15/06/2001 BSE fears may lead to sales of transgenic gelatine
<http://www.foodnavigator.com/news/news-ng.asp?id=40880-bse-fears-may>.
- 5) Ma, J. K.-C. et al. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Nature*, 268: 716-719
- 6) Bakker, H. et al. (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(5): 2899-2904.
- 7) 高木英典・高岩文雄(2003) スギ花粉症に効果のあるペプチド含有米の開発 ブレインテクノニュース, 99: 6-9.
- 8) 城森孝仁ほか(2003) 血糖コントロール作用を持つペプチド含有米の開発 ブレインテクノニュース, 99: 10-13.
- 9) Ebinuma, H. et al. (1997) Principle of MAT vector system. *Plant Biotechnology*, 14: 133-139.
- 10) Guidance for Industry; Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals
<http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.htm>
- 11) Points to consider on quality aspects of medicinal products containing active substances produced by stable transgene expression in higher plants
<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/076402en.pdf>
- 12) GENEWARE®,
<http://www.lsb.com/geneware.html>
- 13) MeGA-PharM™
http://www.bio.com/industryanalysis/industryanalysis_profiles.jhtml?categoryId=c21&action=view&id=c6135
- 14) Chlorogen technology,
<http://www.chlorogen.com/technology.htm>
- 15) Recombinant Protein Secretion Technology (REPOST) & Gene Amplification Technology (GAT)
http://www.phytomedics.com/portfolio/products_molecular.html
- 16) LEX System™,
<http://www.biolex.com/>
- 17) Canadian Food Inspection Service. 2001. Plant molecular farming discussion document,
http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/mf/mf_disde.shtml
- 18) Transgenic Crop: An Introduction and Resources Guide; Bio-Parming
<http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/hotbiopharm.html>
- 19) Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of March 9, 2006
http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html
- 20) UCS Pharma Crop Database
http://www.ucsusa.org/food_and_environment/pharm/index.php?s_keyword=XX
- 21) Society for Moleculture
<http://www.cmp2005.org/Home.aspx?lang=en>
- 22) Conference on Plant-made Pharmaceuticals 2005
<http://archives.cmp2005.org/maintemplate.aspx?lang=en>

- 23) BIOLEX The New Gold Standard for Therapeutic Proteins
<http://www.bioplex.com/>
- 24) Chlogen technology,
<http://www.chlogen.com/technology.htm>
- 25) Therapeutics,
<http://www.lsb.com/thera.html#thera>
- 26) Products,
<http://www.planetbiotechnology.com/products.html>
- 27) ProdiGene,
<http://www.prodigene.com/>
- 28) Horn, M. E. (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*, 22: 711-720.
- 29) Ventria Bioscience,
<http://www.ventria.com>
- 30) oilbody-oleosin technology,
<http://www.sembiosys.com/core.html>
- 31) SemBioSys,
<http://www.sembiosys.com>
- 32) HARVEST YOUR PHARMACEUTICALS
<http://www.meristem-therapeutics.com/GB/intro3.htm>
- 33) Maltagen Forschung GmbH, Molecular Farming: Production of High-Value Proteins in Barley.

<http://www.maltagen.de/PDF/Products.pdf>
- 34) 高岩文雄、高木英典、楊麗群、広瀬咲子、斉藤三郎、杉田耕一、笠原さおり、海老沼宏安 (2006) スギ花粉症緩和米の開発状況、日本農芸化学会 2006 年度 (平成 18 年度) 大会 (京都) 講演要旨集、シ 98 (4SY12a3)
- 35) 加藤勇治 (2005) GMP 対応植物工場建設へ—生物製剤の安全性向上に期待、日経バイオビジネス、2005.09: 22-23
- 36) Arcand F, Arnison P (2004) Development of Novel Protein-Production Systems and Economic Opportunities & Regulatory Challenges for Canada
- 37) Ma, J. K -C., Barros, E., Bock, R., Christou, P., Dale, P. J., Dix, P. J., Fischer, R., Irwin, J., Mahoney, R., Pezzotti, M., Schillberg, S., Sparrow, P., Stoger, E., Twyman, R. M. (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines.
- 38) Monsanto imagine. Science and Technology.
(http://www.monsanto.com/monsanto/layout/sci_tech/default.asp)
- 39) Renessen Receives Final Regulatory Clearance for World's First Crop-Based Biotechnology Quality Trait for Animal Feed Industry
High lysine technology will provide higher level of essential amino acid than conventional feed corn (2006. 2. 6)
(<http://www.monsanto.com/monsanto/layout/investor/news&events/2006/02-06-06b.asp>)
- 40) 食品安全委員会第 124 回会合議事録 (2005. 12. 15)
(<http://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai124/dai124kai-gijiroku.pdf>)
- 41) Cargill To Process Monsanto's VISTIVE™ Low Linolenic Soybeans
New Soybean Variety Will Provide A Trans Fat Solution to the Food Industry (2004. 10. 4)
(<http://www.monsanto.com/monsanto/layout/media/04/10-04-04.asp>)
- 42) モンサント・カンパニーの研究開発
(<http://www.monsanto.co.jp/biotech/research/index.shtml>)

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

遺伝子組換え農作物における導入遺伝子の塩基配列上の安定性を調べるため、輸入ダイズに含まれていたラウンドアップ・レディー・ダイズ（RR ダイズ）72 粒から抽出した核 DNA について、導入遺伝子と内生遺伝子のプロモーター領域からオープン・リーディング・フレーム（ORF）の 5' 領域を PCR によって増幅し、その塩基配列を決定して変異率を調べた。その結果、導入遺伝子と内生遺伝子とにおいて、ほぼ同じ頻度で点突然変異が起こっていること、しかし ORF 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いことがわかった。トウモロコシにおいても同様な調査を行うために MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニングを試みたが、ゲノム内に多数存在するレトロトランスポゾンおよび repetitive sequence にプライマーが結合してしまい、5' 近傍塩基配列は得られなかった。そこで既報の MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列をもとにプライマーを設計し、68 粒の MON810 トウモロコシ DNA から増幅された ORF の 3' 領域から 3' 非翻訳領域の部分の DNA 断片について塩基配列を決定したところ、それらの領域における変異率が RR ダイズに比較して低いことが明らかとなった。

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評価が義務付けられ、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。その安全性評価において、導入遺伝子の塩基配列が検討され、その塩基配列由来のタンパク質において毒性やアレルギー性のないことが審査され、安全性が確認されている。一方、植物において、世代を経ることによって核 DNA の塩基配列に点突然変異が生じることは一般的であり、広く認められている。しかし、この点突然変異の生じる頻度が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。

そこで、安全性評価が済み、5 年から 10 年にわたってその後代が広く栽培されているラウンドアップ・レディー・ダイズ（RR ダイズ）と MON810 トウモロコシを材料として、これらの穀粒の一粒ずつから核 DNA を抽出し、これをテンプレートとして導入遺伝子を増幅して塩基配列を決定し、穀粒間の塩基配列を比較することによって変異率を算出し、後代品種における導入遺伝子の安定性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

＜試料＞

RR ダイズ核 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 ダイズであることが確認された核 DNA の譲渡を受けた。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) で粉碎した。この粉碎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。

<方法>

RR ダイズからの導入遺伝子および内生 β -コングルチニン α (β -*cona*) 遺伝子の 5' 領域の増幅のためのプライマーの設計

これまでの研究において輸入ダイズに含まれていた RR ダイズから、導入遺伝子である 35S::*CTP*::*epsps* 遺伝子と 5' 側の挿入近傍配列を決定しており、その領域から ORF の 5' 側を増幅するプライマー対を作成した。またコントロールとして内生遺伝子である β -*cona* 遺伝子の塩基配列をデータベースから得て、プロモーター領域から ORF の 5' 側を増幅するプライマー対を作成した。

MON810 トウモロコシからの導入遺伝子の 5' 挿入近傍領域のクローニング

MON810 トウモロコシ核 DNA を Bam HI, Eco RI, Hind III, Xba I, もしくは Xho I で切断し、これをセルフ・ライゲーションを行ったものをテンプレートとし、35S プロモーターに対する外向きのプライマー対を用いて inverse PCR 法を行ない、増幅産物をアガロース・ゲル電気泳動で分離し、クローニングして塩基配列の決定を行った。また、Hernandez ら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、fasta 検索によってイネ全ゲノム塩基配列の中で、その塩基配列と相同性を示す塩基配列領域を見だし、その塩基配列をもとに 5' 上流域に対する degenerate プライマーを設計した。このプライマーと 35S プロモーターに対するプライマーを用い、MON810 核 DNA をテンプレートとして PCR を行い、増幅産物をクローニングして塩基配列の決定を行った。

MON810 トウモロコシからの導入遺伝子および内生 starch synthase isoform zSTSII-2 (*SSIIB*) 遺伝子の 3' 領域の増幅のためのプライマーの設計

MON810 トウモロコシの導入遺伝子の 3' 領域については Hernandez らによって報告

された塩基配列情報からプライマーを設計した。また内生のコントロール遺伝子である 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を元に、ORF の 3' 側と 3' 非翻訳領域を増幅するプライマー対を設計した

RR ダイズおよび MON810 トウモロコシ由来の核 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

RR ダイズ各粒由来の核 DNA もしくは MON810 トウモロコシ各粒由来の核 DNA をテンプレートとして、5 μ l の 10 \times Ex Taq 緩衝液 (Mg²⁺入)、250 μ M dNTP mix、2 pmol ずつのプライマーを含む 50 μ l の反応液を 500 μ l の PCR 反応チューブに作った。これに 30 μ l のミネラルオイルを重層し、PCR 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/ μ l の Ex Taq polymerase を 1 μ l を加え、ホット・スタートした。反応チューブのフタを閉じ、95 $^{\circ}$ C 30 秒 \diamond 60 $^{\circ}$ C (RR ダイズ) もしくは 56 $^{\circ}$ C (MON810 トウモロコシ) 45 秒 \diamond 72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 40 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分反応させ、4 $^{\circ}$ C とした。反応液から 10 μ 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、RR ダイズ導入遺伝子および MON810 導入遺伝子と内生遺伝子由来の増幅断片については PCR に用いたプライマーを用いてダイレクト・シーケンスを行った。また、RR ダイズ内生遺伝子 β -*cona* 由来の増幅 DNA 断片は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 ダイズにおける導入遺伝子および内生遺伝子塩基配列に生じた点突然変異の検出とその変異率

RR ダイズ核 DNA に対して、今回設計したプライマー対を用いて導入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、予想される 600 bp のバンドのみが増幅されてくることがわかった。これに対し、内生遺伝子の β -*cona* 遺伝子領域を PCR によって増幅したところ、予想される 610 bp の長さのバンドの他に約 300 bp の長さの DNA 断片が増幅され

てることがわかった。そこで、こちらについてはアガロース・ゲル電気泳動後、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、導入遺伝子および内生遺伝子に対するプライマーによって DNA 断片が増幅されたのは 68 粒および 65 粒からであり、4 粒および 7 粒からは増幅されてこなかった。これらは 1 つの粒から両方の DNA 断片が増幅されてこ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であり、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ためであると考えられた。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 °C としており、プライマーの 3' 端の 5 - 8 bp に当たる部分のダイズ核 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。この結果はダイズ核 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 つの現れであると考えられた。

次にこれら増幅されてきた DNA 断片の塩基配列を決定して比較した。その結果、導入遺伝子については、68 粒由来の核 DNA において、34 カ所に点突然変異が生じており、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た。一方、内生遺伝子については、65 粒由来の核 DNA において、37 カ所に点突然変異が生じており、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。これらの結果から、塩基配列レベルで、導入遺伝子について、68 個体 × 600 bp = 40.8 kbp 当たりに 34 カ所の突然変異、すなわち 1.2 kbp 当たりに 1 カ所の確率で突然変異が導入されているのに対し、内生遺伝子では、65 個体 × 610 bp = 39.65 kbp 当たりに 37 カ所の突然変異、すなわち 1.07 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、導入遺伝子よりも内生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。

これに対して、アミノ酸配列レベルで比較

した時、今回塩基配列を決定した導入遺伝子のオープン・リーディング・フレーム (ORF) のアミノ酸配列は 49 残基であり、68 個体 × 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。これに対し、内生遺伝子の ORF のアミノ酸配列は 124 残基であり、65 個体 × 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置換を引き起こす塩基配列の突然変異率については、導入遺伝子よりも内生遺伝子の方が突然変異率が高く、約 2.6 倍であることが明らかになった。これは、導入遺伝子である *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、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、導入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、このため導入遺伝子の ORF におけるアミノ酸置換を生じる突然変異率が内生遺伝子の ORF 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。

C.2. Inverse PCR 法およびイネ全ゲノム塩基配列情報に基づいた MON810 トウモロコシからの 5' 挿入近傍塩基配列のクローニング

35S プロモーターに対する様々なプライマー対を用いて環状化した MON810 核 DNA をテンプレートとして inverse PCR を行ったところ、非常に数多くの DNA 断片が増幅されてきた。これらのバンドをクローニングしてその塩基配列を決定したところ、そのほとんどがトウモロコシ全ゲノム内のかんりの領域を占めていることが明らかにされているレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列と高い

相同性があることがわかった。レトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列はもともとは RNA ウィルス由来であると考えられており、ここで用いたプライマーの塩基配列である 35S プロモーターはカリフラワー・モザイク・ウィルス由来であり、トウモロコシの内在性のレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列と相同性があるために、プライマーがこれらの塩基配列にアニールしてしまっただけで増幅されてきたために、標的とした導入遺伝子が有する 35S プロモーター領域へのプライマーの結合とそこからの DNA の伸長が阻害されてしまったものと考えられる。

そこで、次に Hernandez ら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用いて、イネ全ゲノム塩基配列に対して fasta 検索を行ったところ、80.7% の塩基配列の相同性がある領域が見いだされた。そこで、そのイネの塩基配列をもとに、挿入位置の上流に相当する領域に対する degenerate プライマーを作成し、これと 35S プロモーターに対するプライマーを用い、MON810 トウモロコシ核 DNA をテンプレートとして PCR を行ったが DNA 断片の増幅は見られず、導入遺伝子の挿入 5' 近傍領域をクローニングすることができなかった。そこで、Hernandez らによって報告された 3' 挿入近傍の塩基配列をもとに、導入遺伝子 ORF の 3' 領域から 3' 非翻訳領域における塩基配列の変異率を解析することにした。

C.3. MON810 トウモロコシの導入遺伝子および内生遺伝子 (SSIIb) の ORF 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* としてデータベースに登録されている塩基配列を元に合成したプライマー対を用いて MON810 ゲノム DNA をテンプレートとして用いて PCR を行ったところ、1 本の DNA 断片が増幅された。しかし、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、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、増幅されてきた DNA 断片を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、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。

これに対し、MON810 トウモロコシの導入遺伝子の 3' 挿入近傍の塩基配列をもとに作成したプライマー対を用いて 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 を行ない、得られた DNA 断片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、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、ORF 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の違いは見られなかった。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る、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取られたものであり、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., 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).

Ogasawara, T., Arakawa, F., Watanabe, T., Akiyama, H., Hino, H., Maitani, T., Goda, Y. and Ozeki, Y. Genomic DNA fragmentation of genetically modified corn during food processing. *Jpn. J. Food Chem.*, **11**: 137-143 (2004).

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[®] 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)

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。

荒川史博、小笠原 健、村上隆之、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(2)」日本食品化学学会第 10 回総会・学術大会、大阪、2004 年 6 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、1. 安全性評価のためのプロファイリング条件の検討」日本食品化学学会第 10 回総会・学術大会、大阪、2004 年 6 月。

小笠原健、荒川史博、佐々木和生、梅津博紀、渡邊敬浩、穂山 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。

荒川史博、小笠原健、伊藤澄夫、渡邊敬浩、菊地博之、穂山 浩、米谷民雄、小関良宏、峯岸恭孝、古井聡、日野明寛：遺伝子組換え食品定量分析における加工影響についての検討、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。

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障害となる、大豆種子からRNAの抽出とそのRNA発現の質的量的ばらつきを検討を行なった。はじめに非組換え体の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結果、同一の大豆品種からも相違が見られ、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。次年度は国産品種を用いて品種間でどの程度データのばらつきがあるか検討するため抽出法を検討した。大豆のRNA抽出にあたっては、開発が進んできた多検体破砕機を使用し、多数の標品を同時に用いた。その結果、多検体破砕機使用によって多くの個体から一度にそれぞれのRNAを抽出することが可能となったが、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。RNA抽出にあたって当初の条件（安全性試験のための再現性、多検体処理が可能、簡便、安価）の目標は満たされたと考えられる。3年目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15年度（初年度）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。その結果、国産発芽大豆でも個体差、また抽出法による差がみられた。また、個体によってストレスが異なり、発現 RNA 組成が変わることが予想された。このために次年度は、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、さらに国内産大豆の RNA の品種間の差を検討するためにその抽出法を探った。平成 17 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>

初年度は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)、次年度は国内産の非組換え大豆種子(品種はムラユタカ:2002年度福島産、およびコクユタカ:2002年度広島産)、最終年度は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>

初年度は大豆を殺菌後、植物組織培養用の Murashige-Skoog 培地に浸して 25°C で発芽処理を行ない、発芽大豆から RNA の抽出では CTAB 法と、フェノール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 1 を用いた発現解析によって検討した。

次年度は、大豆を一粒ずつ(×20 粒)粉碎混合し、キット試薬による RNA 抽出の後、全量を合わせて RNA 精製を行った。破碎には国立衛研穉山氏が安井器械(株)と共同開発した機械 Multi-beads shocker, MB601NIHS を使用した(穉山氏の御好意による)。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。

抽出にあたっては大豆種子の個体差、抽出方法による差、ロット差をそれぞれ消すために、開発が進んできた多検体破碎機を使用し、多数の標品を用いた。少し大きく改良したセルに大豆をひと粒ずつ入れて、Total RNA 抽出試薬 1 ml を加え 1cm 程度の破碎用ビーズ 1 つを入れて 8 の字攪拌した。2500rpm 60 秒 2 回(むらゆたか 2002 年度福島産)、2,500rpm 60 秒 2 回 + 1,900rpm 30 秒 2 回(こくゆたか 2002 年度広島産)の条件で大豆を破碎するとともに Total RNA を抽出した。サンプルは 20 粒を合計 4 セット(全部で 80 粒)使用した。Total RNA 抽出後、抽出液にクロロホルムを加えて親油性化合物を除去し、水層からイソプロパノール沈澱で Total RNA を得た。また、必要に応じてエタノール沈澱によって Total RNA の精製を行った。

最終年度の組換え大豆の RNA 解析実験では大豆を一粒ずつ粉碎し、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。

3 年目に組換え大豆を用いた場合は大豆を一粒ずつ機械で粉砕し、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 社、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。

C. 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 μ g、RNA 抽出用キットで約 70 μ 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発現の差が見られた。

次年度は抽出法の検討を行なった結果、多検体破砕機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの大豆種子ごとの RNA を抽出することが可能となり、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。大豆一粒あたり 400-1000 μ g の RNA が抽出された。

組換え大豆で 3 粒の種子からそれぞれ 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 DNA 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 8-12% 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。EPSP 遺伝子の転写レベルも 3 粒で -0.5-0.6 倍量の発現変動が数値上は見られたが、有意な差とは見なされなかった。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全体的に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状況は見い出されていない。

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が、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。初回の実験は予備的なものであるが、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。

大豆の RNA 抽出にあたって、多検体破砕機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの大豆種子ごとの RNA を抽出すること