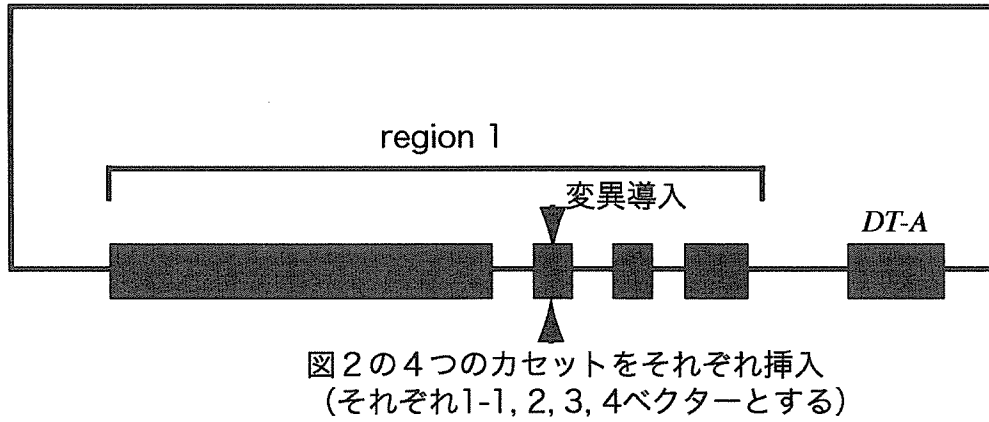


図2 ポジティブ選抜及び追跡用に準備した4つカセットの構成

*P_{CAGI}*はニワトリβアクチンプロモーター、*puro^r*はピューロマイシン耐性遺伝子、*EGFP*はクラゲ由来緑色蛍光タンパク質遺伝子で*IRES*配列を挟んで*puro^r*を連結している。下の2つカセットは、上の2つのカセットの両端を*loxP*で挟み込んだもの。

1 null型ターゲティングベクター



2 エピトープ改変型ターゲティングベクター

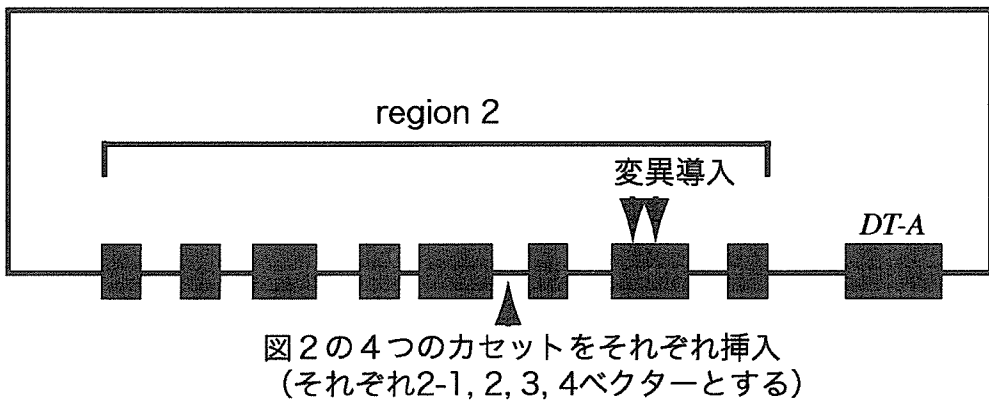


図3 最終的に構築 (予定も含む) したターゲティングベクター

分担研究報告書（平成 18 年度）

薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究

分担研究名

分担研究者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨：薬用遺伝子組換え（GM）植物の範囲を、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、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。米国における薬用 GM 植物野外圃場栽培面積は、2005 年の 82.00 エーカーから 2006 年の 198.36 エーカーへと 2.4 倍に増加し、作付けが行われた作物には、食用作物でもあるトウモロコシ、ベニバナ、イネ、オオムギ、エンドウが含まれていた。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、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。2006 年に公表・出版された論文等をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能性食品 18 件、食用ワクチン 17 件、食用医薬 3 件、ワクチン抗原 6 件、抗体医薬 12 件、治療薬 3 件であり、薬用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品、食用ワクチンの開発が盛んである状況が伺え、食用ワクチン開発研究の多くは、日本近隣の台湾、中国、韓国の 3 カ国の研究であった。本研究結果から、薬用 GM 植物による医薬品類の生産は、特に機能性食品及び食用ワクチンが活発であり、欧米だけでなく、アジアでも盛んとなっていることが伺えた。

協力研究者

吉松嘉代（独立行政法人医薬基盤所薬用植物資源研究センター筑波研究部）

A. 研究目的

最近活発に研究開発が進んでいる高栄養、高機能食品または医薬品類を生産する遺伝子組換え植物（薬用 GM 植物）は、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃場栽培も行われている。このような意図的に特定成分を生産・蓄積させた、あるいは医薬品類を生産する薬用 GM 植物が誤って食用作物に混入し、一般の食品として摂取された場合、生産物の種類によっては健康へ影響を及ぼす恐れがある。従って、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

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。前年度に引き続き、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。

（倫理面への配慮）

本研究は、論文、学会講演要旨集、文献データベース、インターネット検索等の公表された文字データを利用するものであるため、倫理上の問題は無い。

C. 研究結果

1. 2004-2006 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

図 1 に The Animal and Plant Health Inspection Service of the United States Department of

Agriculture (USDA-APHIS) によりウェブサイト上で公開されている Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of March 1, 2007¹⁾を基に調査した、2004-2006年の米国における薬用 GM 植物（産業用及び環境修復用を含む）野外圃場作付け状況を示した。

薬用 GM 植物の圃場栽培は、2004 年においては 276.61 エーカーの栽培が認可され、実際には 45.35 エーカーに作付けされた。2005 年においては、456.24 エーカーの栽培が認可され、実際には 78.45 エーカーに作付けされた。2006 年においては、797.50 エーカーの栽培が認可され、実際には 198.36 エーカーに作付けされた。各年度の作付け面積は、認可面積に比べてはるかに小さく、2004 年は認可面積の 16.4%、2005 年は認可面積の 18.0%、2006 年は認可面積の 24.9%である。わずかながら、年度を追う毎に、認可面積と作付け面積が近づく傾向が認められる。経年の認可面積の増減は、2004 年から 2005 年は 1.65 倍の増加、2005 年から 2006 年は 1.75 倍の増加で、作付け面積の増減は、2004 年から 2005 年は 1.8 倍の増加、2005 年から 2006 年は 2.4 倍の増加であり、特に作付け面積の増加が著しい。

表 1 に 2007 年 3 月 1 日現在の 2007 年における薬用 GM 植物米国野外栽培許可状況¹⁾を示す。2007 年は、Ventria Bioscience、SemBioSys Genetics、Washington State University、Planet Biotechnology、MacIntosh & Associates, Inc. の 4 社 1 大学が、薬用 GM イネ、ベニバナ、オオムギ、タバコ、アカエンドウの野外栽培を申請している。そのうち Ventria Bioscience のヒト血清アルブミン生産イネ、合成ラクトフェリン・リゾチーム生産イネは既に承認されており、それぞれ 10-49 エーカー及び 100 エーカー以上の栽培が計画されている。

表 2 に 2006 年、表 3 に 2005 年における薬用 GM 植物米国野外栽培許可状況を示した。2007 年の野外圃場栽培申請を行っている Ventria Bioscience、SemBioSys Genetics、Washington State University、Planet Biotechnology の 3 社 1 大学は、2006 年、2005 年の両年とも野外圃場栽培試験を行っている。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。

2005 年においては、Ventria Bioscience のヒト血清アルブミン生産イネが 10 エーカー以下の

栽培、同社ヒトラクトフェリン及びヒトリゾチーム生産イネがそれぞれ 35 エーカーの作付けが計画され栽培されたが、他社はほとんどが 10 エーカー以下の計画での栽培であった。

2006 年においては、Ventria Bioscience の薬用 GM イネ 3 種の栽培面積が大幅に拡大し、ヒト血清アルブミン生産イネは 10-49 エーカーの栽培、ヒトラクトフェリン及びヒトリゾチーム生産イネはいずれも 100 エーカー以上の作付けが計画され、栽培された。同社のイネで生産された組換えヒト血清アルブミン、組換えヒトラクトフェリン及び組換えヒトリゾチームはそれぞれ商品名 CellstinTM、LactominTM 及び LysobacTM として、InVitria 社から試薬として販売されている。

2. 2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等

文献情報 (PubMed) で「transgenic plant」と「antibody」、「vaccine」、「nutrition」、「health」、「metabolite」及び「pharmaceutical」等の組み合わせのキーワードで抽出された 2006 年-2007 年の情報（2007 年 1 月末現在）及び 2006 年に開催された日本農芸化学会及び日本植物細胞分子生物学会講演要旨集から、薬用 GM 植物に関する情報を収集した結果を表 4-7 に示した。2006-2007 年の薬用 GM 植物に関する論文等のカテゴリー別の件数は、機能性食品 18 件、食用ワクチン 17 件、食用医薬 3 件、ワクチン抗原 6 件、抗体医薬 12 件、治療薬 3 件であった。

2-1. 機能性食品

機能性食品に関する論文等を表 4 に示した。機能性食品開発には、機能性タンパク質の遺伝子を組込んで生産させる場合（遺伝子産物の利用）と代謝酵素遺伝子を導入し、植物体内で合成・変換された代謝物を利用する場合（代謝物の利用）があるが、今回収集した 18 件のうち、代謝物の利用が 16 件と大多数を占める。

最近の健康ブームから、植物由来の機能性成分への関心が高まっており、様々な成分がサプリメントとして利用されている。表 4 中には、サプリメントとしても需要が高い、コエンザイム Q10、アスタキサンチン、レスベラトロール配糖体、イソフラボン、フラクトオリゴ糖生産も含まれている。

2-2. 食用ワクチン

食用ワクチンに関する論文等を表 5 に示した。

ロタウイルス、ピロリ、SARS、病原性大腸菌、手足口病、麻疹、ペストなどのヒトの感染症のワクチンのほか、餌として投与できる簡便さから、ニワトリ、豚等の家畜用ワクチンの開発も活発である。イネやムギ等の穀物中に含まれる医療用タンパク質は比較的安定で、常温での長期保管が可能であることがこれまでに示されているが⁶¹⁾、表5中の麻疹ウイルスヘマグルチニン生産レタスの研究報告³⁵⁾では、凍結乾燥レタス葉に含まれるワクチン抗原は、室温で最大13ヶ月間安定で、50℃の環境下でも最低1週間安定であることが確認されている。

2-3. 食用医薬・ワクチン抗原・治療薬

食用医薬・ワクチン抗原・治療薬に関する論文等を表6に示した。食用医薬としてまとめた3件は、全て農業生物資源研究所のグループによる医薬品類を生産するイネに関する研究である。この中で最も進展していると思われるのはスギ花粉症緩和イネで、隔離圃場栽培での生物多様性影響評価試験とともに、隔離圃場で栽培した米をマウス、ラット、カンクイザル等の動物に食べさせ、食品としての安全性を試験中であることが紹介されている³⁹⁾。

ワクチン抗原生産では、食用ワクチンと同様に、コレラ、ポリオ、炭疽病等のヒトの感染症用ワクチンのほか、ウサギ、豚用のワクチン抗原が生産されている。食用ワクチンとは異なり、抽出精製後の使用を目的としていることから、生産ホストのほとんどは食用作物ではないタバコである。

治療薬は抽出精製後の使用を目的としていることから、表5にまとめた3件の生産ホストはタバコである。シアノウィリンN及びCD14は、いずれも遺伝子産物を使用したものであるが、ケンタッキー大学のグループによるパチョロール(抗癌剤タキソール半合成前駆体)生産⁴⁷⁾は、他生物の代謝酵素を導入し、本来タバコでは生合成されない二次代謝物(パチョロール)を生産させるのに成功している。

2-4. 抗体医薬

抗体医薬に関する論文等を表7に示した。形質転換、栽培、交配によるタンパク質再構成の容易さから、生産ホストのほとんどはタバコである。生細胞内の小胞体で合成されたタンパク質の多くは、糖鎖修飾を受けるが、ヒトと植物ではその糖鎖付加の様式が異なっている。したがって、植物で生産された抗体医薬を医薬品として使用す

る場合、植物型糖鎖が重篤な副作用を引き起こす可能性があることから、ヒト型糖鎖転移酵素を導入した植物が作製され、抗体医薬生産に用いられるようになってきている。

生産されている抗体は、分子量の小さい人工抗体分子、FV単鎖から、分泌型IgA(sIgA)まで、様々である。抗体分子の基本構造は、通常は2本のL鎖と2本のH鎖からなる(図2)。しかし最近になって、ラクダやラマには、L鎖がなくH鎖のみから構成される抗体の存在が明らかになり、このH鎖抗体の変領域(単一可変領域抗体フラグメント、V_H)は、他の抗体や人工抗体にくらべて低分子のポリペプチドでありながら、本来のH鎖抗体と同様の安定性、抗原結合能を持つことから、抗癌剤などの抗体医薬への応用が期待されている。イラン Tarbiat Modares 大学の研究グループは、ラクダ抗 MUC1 ムチン単一可変領域抗体フラグメントをタバコで生産している。

2-5. 国別集計数

2006-2007年に公表・出版された薬用GM植物に関する論文等の件数を国別に集計した結果を表8に示した。薬用GM植物に関する研究は、世界中の様々な国で行われている。この中で、食用ワクチンに関する研究は、特に日本近隣の台湾、韓国、中国において件数が多い。

D. 考察

2006年-2007年1月末までの薬用GM植物に関する情報を収集し、カテゴリー別に整理し分類した。野外圃場栽培状況については、インターネット上で情報が公開されている米国について調査した。

奈良先端大学の小泉は、「米国といえども圃場栽培は容易ではない。イネ種子でラクトフェリンを大量生産することに成功した企業は、組換えイネの栽培場所の確保に苦労しており、未だ商業栽培に踏み切れない。」と報告している⁶²⁾。

しかしながら、USDA-APHISが公開している情報によると、米国野外圃場栽培面積は、2005年の82.00エーカーから2006年の198.36エーカーへと2.4倍に増加し、2004年から2005年の1.8倍の増加に比べ、増加率がさらに伸びている。また、2006年に米国で最も広い面積での圃場栽培試験を行っている Ventria Bioscience は、イネ種子で生産した組換えヒト血清アルブミン(Cellastin™)、組換えヒトラクトフェリン(Lactomin™)、組換えヒトリゾチーム

(Lysobac™) を既に試薬として商品化しているほか、組換えヒトラクトフェリン (Lactiva™) と組換えヒトリゾチーム (Lysomin™) を、医療用として開発中である。同社のウェブサイトには、二重盲検法で Lactiva™ と Lysomin™ を含む電解液の効果を調べた臨床試験の結果が紹介されている。急性の下痢に苦しむ 140 名の小児患者に対しての試験の結果、Lactiva™ と Lysomin™ を含む電解液を与えられたグループは、通常の電解液を与えられた患者よりも約 1.5 日回復が早く、再発も有意に防げた (Lactiva™ と Lysomin™ を含む電解液では 8%、通常の電解液では 18%) と報告されている⁶³⁾。

急性の下痢は小児の死亡の 17% を占め、世界で毎年 200 万人の小児が下痢のために死亡し、世界で第 2 番目の死亡の原因となっている感染の症状である。Ventria Bioscience の Lactiva™ と Lysomin™ を含む電解液での下痢の治療法が広く認められ、普及するようになれば、さらに組換えイネの栽培が盛んになるものと推察される。

2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等をカテゴリ別に集計した結果、機能性食品 18 件、食用ワクチン 17 件、食用医薬 3 件、ワクチン抗原 6 件、抗体医薬 12 件、治療薬 3 件であり、薬用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品と食用ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。さらに、国別集計数から、食用ワクチンに関する研究は、特にアジア (台湾、韓国、中国) において件数が多いことが判明した。

中国、台湾、韓国は日本と距離が近く、日本の農産物の主な輸入元である。これらの国において、アルファルファ、イネ、ジャガイモ、トマト、レタスの食用作物を用いた薬用 GM 植物開発が行われていることが明らかとなったため、今後、未承認の薬用 GM 植物が誤って食品として輸入されることのないように、さらに情報を収集し、食品の安全性確保を図る必要があるものと思われる。

E. 結論

米国における薬用 GM 植物野外圃場栽培面積は、2005 年の 82.00 エーカーから 2006 年の 198.36 エーカーへと 2.4 倍に増加し、作付けが行われた作物には、食用作物でもあるトウモロコシ、バナナ、イネ、オオムギ、エンドウが含まれていた。2006-2007 年に公表・出版された論文等をそれぞれのカテゴリ別に集計した結果、機能性食品 18 件、食用ワクチン 17 件、食用医薬 3 件、ワクチン抗原 6 件、抗体医薬 12 件、治療薬 3 件であり、

薬用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品、食用ワクチンの開発が盛んである状況が伺え、食用ワクチン開発研究の多くは、日本近隣の台湾、中国、韓国の 3 カ国の研究であった。本研究結果から、薬用 GM 植物による医薬品類の生産は、特に機能性食品及び食用ワクチンが活発であり、欧米だけでなく、アジアでも盛んとなっていることが伺えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

吉松嘉代、木内文之、手島玲子：薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査(2) (ポスター)
日本薬学会第 127 年会 (富山) (2007. 3. 30)

(特許出願)

なし

解説

1. 吉松嘉代：遺伝子組み換え植物の現状と未来 (7) 期待される植物ワクチンの実用化と食用ワクチン、農林経済 (時事通信社、2006. 4. 14) 第 9776 号、2-8.

2. 吉松嘉代：遺伝子組み換え植物の現状と未来 (8) (完) 癌や C 型肝炎など困難な病を克服するために、農林経済 (時事通信社、2006. 8. 28) 第 9804 号・合併号、2-8.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献・インターネットホームページ

- 1) Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of March 1, 2007
(http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html).
- 2) 菅谷俊之、Hyeon-Jin S、江面浩：ミラクリン遺伝子を導入した組換えイチゴの作製、第24回日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集、p.74 (2006)。
- 3) 本山貴康、奥本裕、谷坂隆俊、高岩文雄、内海成：イネ種子におけるダイズβ-conglycinin α' およびβサブユニットの共発現とその効果、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p189 (2006)。
- 4) Wakasa K, Hasegawa H, Nemoto H, Matsuda F, Miyazawa H, Tozawa Y, Morino K, Komatsu A, Yamada T, Terakawa T, Miyagawa H: High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *J Exp Bot*, 57: 3069- 3078 (2006).
- 5) 松田史生、Dubouzet J、宮川亘、若狭暁 OASA1D:TDC3 形質転換イネの代謝変動解析、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p188、(2006)。
- 6) 門脇光一：コエンザイム Q10 強化米の開発、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p. シ50 (2006)。
- 7) Das B, Goswami L, Ray S, Ghosh S, Bhattacharyya S, Das S, Majumder AL: Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica juncea* with a cyanobacterial (*Synechocystis* PCC6803) delta-6 desaturase gene leads to production of gamma-linolenic acid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 216-231 (2006).
- 8) Regina A, Bird A, Topping D, Bowden S, Freeman J, Barsby T, Kosar-Hashemi B, Li Z, Rahman S, Morell M: High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *PNAS*, 103: 3546-3551 (2006).
- 9) Morris WL, Ducreux LJ, Fraser PD, Millam S, Taylor MA: Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Metab Eng*, 8: 253-263 (2006).
- 10) Yu CK, Lam CN, Springob K, Schmidt J, Chu IK, Lo C: Constitutive accumulation of cis-piceid in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a sorghum stilbene synthase gene. *Plant Cell Physiol*, 47: 1017-1021 (2006).
- 11) 高梨功次郎、松田史生、石本政男、若狭暁、宮川亘：トリプトファン高生産形質転換ダイズの代謝プロファイリング、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p181 (2006)。
- 12) 小原一郎、小門善正、山本浩文、佐藤文彦、矢崎一史：酵母 COQ2 遺伝子を用いた高等植物コエンザイム Q の代謝工学、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p. シ49 (2006)。
- 13) Tian L, Dixon RA: Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. *Planta*, 224:496-507 (2006).
- 14) Xie DY, Sharma SB, Wright E, Wang ZY, Dixon RA: Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expressions of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *Plant J*, 45: 895-907 (2006).
- 15) 谷口美香、武石愛佳、永田裕加里、井上栄一、玉掛秀人、安西弘行：ヤーコンおよびキクイモ 1-SST 遺伝子を導入した植物におけるフラクトオリゴ糖生産、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p190 (2006)。
- 16) Huang S, Frizzi A, Florida CA, Kruger DE, Luethy MH: High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. *Plant Mol Biol*, 61: 525-535 (2006).
- 17) van der Rest B, Danoun S, Boudet AM, Rochange SF: Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *J Exp Bot*, 57: 1399-1411 (2006).
- 18) Husken A, Baumert A, Milkowski C, Becker HC, Strack D, Mollers C: Resveratrol glucoside (Piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Theor Appl Genet*, 111: 1553-1562 (2005).
- 19) Ruhmann S, Treutter D, Fritche S, Briviba K, Szankowski I: Piceid (resveratrol glucoside) synthesis in stilbene synthase

- transgenic apple fruit. *J Agric Food Chem*, 54: 4633-4640 (2006).
- 20) Huang LK, Liao SC, Chang CC, Liu HJ: Expression of avian reovirus sigmaC protein in transgenic plants. *J Virol Methods*, 134:217-222 (2006).
- 21) Yang ZQ, Liu QQ, Pan ZM, Yu HX, Jiao XA: Expression of the fusion glycoprotein of newcasstle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 25: 591-598 (2007).
- 22) 松村健：遺伝子組換え植物による物質生産技術開発、日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集、シ 97 (2006) .
- 23) Li JT, Fei L, Mou ZR, Wei J, Tang Y, He HY, Wang L, Wu YZ: Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology*, 356: 171-178 (2006).
- 24) Liang W, Huang Y, Yang X, Zhou Z, Pan A, Qian B, Huang C, Chen J, Zhang D: Oral immunization of mice with plant-derived fimbrial adhesin FaeG induces systemic and mucosal K88ad enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific immune responses. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46: 393-399 (2006).
- 25) Zhang H, Zhang X, Liu M, Zhang J, Li Y, Zheng CC: Expression and characterization of *Helicobacter pylori* heat-shock protein A (HspA) protein in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Biotechnol Appl Biochem*, 43: 33-38 (2006).
- 26) Lee KY, Kim DH, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Yoo HS, Arntzen CJ, Yang MS, Jang YS: Induction of protective immune responses against the challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the oral administration of transgenic tobacco plant expressing ApxIIA toxin from the bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48: 381-389 (2006).
- 27) Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD: A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 7082-7087 (2006).
- 28) Li HY, Ramalingam S, Chye ML: Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231: 1346-1352 (2006).
- 29) Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores T, Fehervari-Bone T, Gomez-Lim MA: Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res*, 15: 455-463 (2006).
- 30) Karaman S, Cunnick J, Wang K: Analysis of immune response in young and aged mice vaccinated with corn-derived antigen against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol Biotechnol*, 32: 31-42 (2006).
- 31) Shchelkunov SN, Salyaev RK, Pozdnyakov SG, Rekoslavskaya NI, Nesterov AE, Ryzhova TS, Sumtsova VM, Pakova NV, Mishutina UO, Kopytina TV, Hammond RW: Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnol Lett*, 28: 959-967 (2006).
- 32) Saldana S, Esquivel Guadarrama F, Olivera Flores Tde J, Arias N, Lopez S, Arias C, Ruiz-Medrano R, Mason H, Mor T, Richter L, Arntzen CJ, Gomez Lim MA: Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol*, 19: 42-53 (2006).
- 33) Chen HF, Chang MH, Chiang BL, Jeng ST: Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine*, 24: 2944-2951 (2006).
- 34) Alvarez ML, Pinyerd HL, Crisantes JD, Rigano MM, Pinkhasov J, Walmsley AM, Mason HS, Cardineau GA: Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine*, 24: 2477-2790 (2006).
- 35) Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL: Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal

- vaccination. *Vaccine*, 24: 3538-3544 (2006).
- 36) Kim TG, Kim MY, Kim BG, Kang TJ, Kim YS, Jang YS, Arntzen CJ, Yang MS: Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Protein Expr Purif*, 51: 22-27 (2007).
- 37) 高岩文雄、楊麗群、多田欣史、吉川正明：経口投与により血圧降下機能を示す高血圧緩和米の開発、第24回日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集、p. 75 (2006)
- 38) 保田浩、林祐二、城森孝仁、高岩文雄：イネ胚乳中での外来遺伝子産物の局在と蓄積量について、第24回日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集、p. 66 (2006)
- 39) 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：スギ花粉症緩和米の開発状況、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集、p. シ98 (2006)
- 40) Gil F, Titarenko E, Terrada E, Arcalis E, Escribano JM: Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. *Plant Biotechnol J*, 4:135-143 (2006).
- 41) Mishra S, Yadav DK, Tuli R: Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *Biotechnol*, 127: 95-108 (2006).
- 42) Marconi G, Albertini E, Barone P, De Marchis F, Lico C, Marusic C, Rutili D, Veronesi F, Porceddu A: In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC Biotechnol*, 6:29 (2006).
- 43) Fujiyama K, Saejung W, Yanagihara I, Nakado J, Misaki R, Honda T, Watanabe Y, Seki T: In Planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system. *J Biosci Bioeng*, 101: 398-402 (2006).
- 44) Kohl T, Hitzeroth II, Stewart D, Varsani A, Govan VA, Christensen ND, Williamson AL, Rybicki EP: Plant-produced cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof-of-concept study. *Clin Vaccine Immunol*, 13: 845-853 (2006).
- 45) Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect Immun*, 73: 8266-8274 (2005).
- 46) Sexton A, Drake PM, Mahmood N, Harman SJ, Shattock RJ, Ma JK: Transgenic plant production of cyanovirin-N, an HIV microbicide. *FASEB J*, 20: 356-358 (2006).
- 47) Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J: Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotechnol*, 24: 1441-1447 (2006).
- 48) Nemchinov LG, Paape MJ, Sohn EJ, Bannerman DD, Zarlenga DS, Hammond RW: Bovine CD14 receptor production in plants reduces severity of intramammary bacterial infection. *FASEB J*, 20: 1345-1351 (2006).
- 49) Rouwendal GJ, Wuhrer M, Florack DE, Koeleman CA, Deelder AM, Bakker H, Stoop GM, van Die I, Helsen JP, Hokke CH, Bosch D: Efficient introduction of a bisecting GlcNAc residue in tobacco N-glycans by expression of the gene encoding human N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology*, 17: 334-344 (2007).
- 50) Rajabi-Memari H, Jalali-Javaran M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh-Moghadam M, Esmaili A: Expression and characterization of a recombinant single-domain monoclonal antibody against MUC1 mucin in tobacco plants. *Hybridoma (Larchmt)*, 25: 209-215 (2006).
- 51) Morgun B, Richter A, Deshmukh SD, Stepanyuk V, Kalai K, Nagy G, Hufnagel L, Lukacs N: Targeting dsRNA-specific single-chain Fv antibody fragments to different cellular locations in *Nicotiana tabacum* L. *Acta*

- Biol Hung, 57: 247-259 (2006).
- 52) Platis D, Labrou NE: Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. *J Chromatogr A*, 1128:114-124 (2006).
- 53) Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JH, Pogrebnyak N, Golovkin M, Steplewski Z, Koprowski H: Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103: 8804-8809 (2006).
- 54) Girard LS, Fabis MJ, Bastin M, Courtois D, Petiard V, Koprowski H: Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 345: 602-607 (2006).
- 55) Bakker H, Rouwendal GJ, Karnoup AS, Florack DE, Stoopen GM, Helsper JP, van Ree R, van Die I, Bosch D: An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103: 7577-7582 (2006).
- 56) Wieland WH, Lammers A, Schots A, Orzaez DV: Plant expression of chicken secretory antibodies derived from combinatorial libraries. *J Biotechnol*, 122: 382-391 (2006).
- 57) Almquist KC, McLean MD, Niu Y, Byrne G, Olea-Popelka FC, Murrant C, Barclay J, Hall JC. Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. *Vaccine*, 24: 2079-2086 (2006).
- 58) Law RD, Russell DA, Thompson LC, Schroeder SC, Middle CM, Tremaine MT, Jury TP, Delannay X, Slater SC: Biochemical limitations to high-level expression of humanized monoclonal antibodies in transgenic maize seed endosperm. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 1434-1444 (2006).
- 59) Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A: Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol*, 140: 3-11 (2006).
- 60) Komarnytsky S, Borisjuk N, Yakoby N, Garvey A, Raskin I: Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiol*, 141: 1185-1193 (2006).
- 61) Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., Fischer, R: Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, 42:583-590 (2000).
- 62) 小泉望: 国内外のモレキュラー・ファーミングについて、第24回日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集、p.15 (2006) .
- 63) Zavaleta N, Figueroa D, Rivera J, Sanchez J, Alfaro S, Lonnerdal B: Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. *J. Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44: 258-264 (2007).

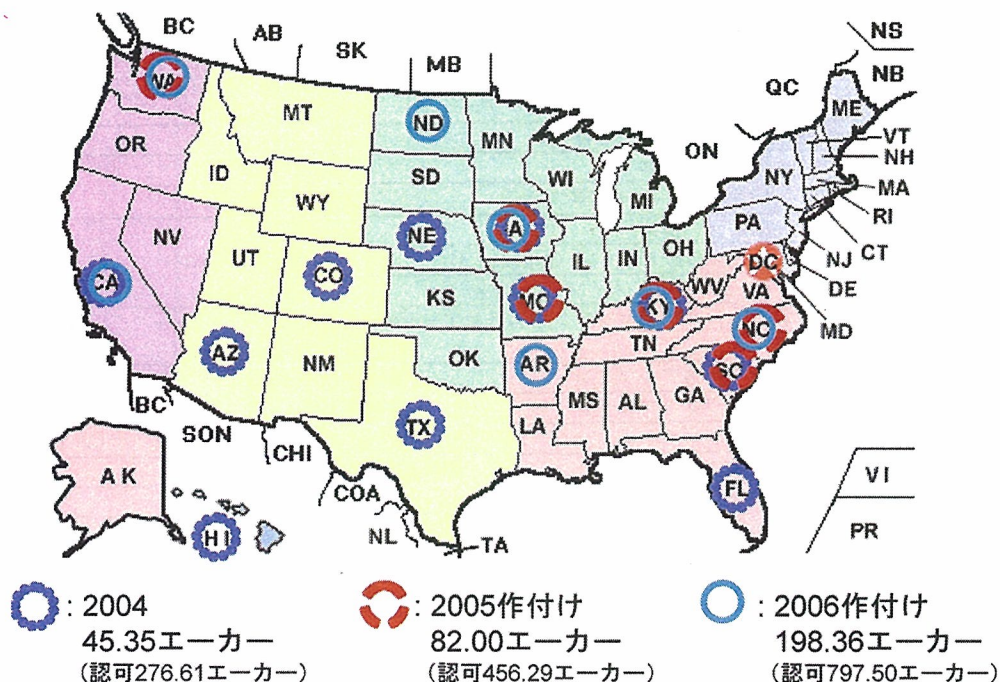


図1. 2004-2006年の米国における薬用GM植物(産業用及び環境修復用を含む)野外圃場作付け状況

表1. 2007年における薬用GM植物米国野外栽培許可状況(2007年3月1日現在)

| 企業等 | 作物 | 生産物 | 州 | 審査状況 |
|------------------------------|--------|-----------------|-----------------------|------|
| Ventria Bioscience | イネ | ヒト血清アルブミン | ノースカロライナ (10-49 acre) | 承認 |
| | | 合成ラクトフェリン、リゾチーム | ノースカロライナ (>100 acre) | 承認 |
| | | ヒトリゾチーム | カンザス | 審査中 |
| | | ヒトラクトフェリン | カンザス | 審査中 |
| | | ヒト血清アルブミン | カンザス | 審査中 |
| SemBioSys Genetics | ベニバナ | オレオシン+コイ成長ホルモン | ワシントン | 審査中 |
| | | 不明1件 | ワシントン | 審査中 |
| Washington State U | オオムギ | 不明1件 | ワシントン | 審査中 |
| Planet Biotechnology | タバコ | 不明2件 | ケンタッキー | 審査中 |
| MacIntosh & Associates, Inc. | アカエンドウ | 不明1件 | ノースダコタ | 審査中 |

表2. 2006年における薬用GM植物米国野外栽培許可状況

| 企業等 | 作物 | 生産物 | 州 | 作付け状況 |
|----------------------|----------|------------------------------|-----------------------|-------|
| Ventria Bioscience | イネ | ヒト血清アルブミン(医療用) | ノースカロライナ (10-49 acre) | 作付け完了 |
| | | ヒトラクトフェリン(食用) | ノースカロライナ (>100 acre) | 作付け完了 |
| | | ヒトリゾチーム(食用) | ノースカロライナ (>100 acre) | 作付け完了 |
| SemBioSys Genetics | ベニバナ | オレオシン+コイ成長ホルモン | ワシントン (10 acre 2カ所) | 作付け完了 |
| Washington State U | オオムギ | ヒトラクトフェリン+リゾチーム | ワシントン (<10 acre) | 作付け完了 |
| Planet Biotechnology | タバコ | 抗虫菌抗体 | カリフォルニア (<10 acre) | 作付け完了 |
| | | 抗風邪ウイルス抗体 | ケンタッキー (<10 acre) | 作付け完了 |
| Novoplant | エンドウ | 社外秘(医療用)1件 | ノースダコタ (<10 acre) | 作付け完了 |
| Chlorogen, Inc | タバコ(葉緑体) | 社外秘1件 | ケンタッキー (<10 acre) | 作付け完了 |
| Iowa State U | トウモロコシ | 大腸菌易熱性腸毒素Bサブユニット(医療用) | アイオワ (<10 acre) | 作付け完了 |
| Edenspace Systems | タバコ | エンドグルカナーゼ(cellose→ethanol合成) | アリゾナ (<10 acre) | 作付け完了 |
| Ventria Bioscience | イネ | 不明3件 | ミズーリー | 申請取下 |
| SemBioSys Genetics | ベニバナ | 不明1件 | ワシントン | 無効 |
| 社外秘 | トウモロコシ | 社外秘1件 | アイオワ | 申請取下 |

表 3. 2005 年における薬用 GM 植物米国野外栽培許可状況

| 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/タバコ | アプロチニン (医療用) | フロリダ | 作付け未完了 |
| Planet Biotechnology | タバコ | 抗虫菌抗体 抗風邪ウイルス抗体 | ケンタッキー | 作付け完了 作付け完了 |
| SemBioSys Genetics | ベニバナ | 社外秘 (酵素) 1 IgG 結合ドメイン (Protein A) 51 IgG 結合ドメイン (Protein A) | ワシントン | 作付け完了 作付け完了 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リアーゼ* | ケンタッキー | 作付け完了 |
| Ventria Bioscience | イネ | ヒト血清アルブミン ヒトラクトフェリン ヒトリゾチーム | ノースカロライナ (<10 acre) ノースカロライナ (35 acre) ノースカロライナ (35 acre) | 作付け完了 作付け完了 作付け完了 |
| Washington State U | オオムギ | 不明 1 件 | 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 | 不明 | ケンタッキー | 申請取下 |
| SemBioSys Genetics | ベニバナ | 不明 3 件 | 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、不明 1 件 | ミズーリー | 申請取下 |

*フェニルアラニンアンモニリアーゼ (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

表 4. 2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等 (機能性食品)

| 種類 | 導入遺伝子 | 作物 | 生産物・特徴・目的等 | 研究・開発国 | 文献等 |
|-------|--|--------------|---|---------------------------------|-----|
| 遺伝子産物 | ミラクリン | イチゴ | ミラクリン (味覚修飾機能タンパク質) 生産; メタボリックシンドローム予防 | 日・筑波大 | 2 |
| 遺伝子産物 | β -コングリシニン α' 及び β サブユニット | イネ | 単独発現系統を交配させ、 α' 及び β サブユニットの共発現系統を作出 | 日・京都大&農業生物資源研 | 3 |
| 代謝物 | アントラニル酸合成酵素 | イネ | 高トリプトファン; 栄養機能向上 | 日・作物研 | 4 |
| 代謝物 | 改変アントラニル酸合成酵素、イネトリプトファン脱炭酸酵素 | イネ | 新規二次代謝物合成能; 形質転換カルスにおいてインドール二次代謝物の生産を確認 | 日・科技構CREST&京都大&東京農大 | 5 |
| 代謝物 | デカプレニル2リン酸合成酵素 | イネ | コエンザイム Q10 強化米; 機能性向上 | 日・農業生物資源研 | 6 |
| 代謝物 | $\Delta 6$ -不飽和化酵素 (藍藻由来) | カラシナ | γ -リノレン酸合成; 栄養機能向上 | 印・ボーズ研&米・クリーブランド医療財団&印・北ベンガル大 | 7 |
| 代謝物 | デンプン枝作り酵素 RNAi | コムギ | 高アミロース (>70%、難消化性デンプン); ラットで大腸機能向上を確認 | 豪・オーストラリア 連邦科学産業研究機構&英・バイジエンマ社 | 8 |
| 代謝物 | β -ケトラーゼ、フィトエン合成酵素 | ジャガイモ | ケトカロテノイド、アスタキサンチン生産; 抗酸化、動脈硬化予防 | 英・スコットランド作物研 | 9 |
| 代謝物 | ソルガムスチルベン合成酵素 | シロイヌナズナ | シスパイシード (レスベラトロール配糖体) 生産 | 中・香港大 | 10 |
| 代謝物 | 改変アントラニル酸合成酵素 | ダイズ | 高トリプトファン生産; 他の代謝物への影響を調べ、トリプトファン以外に変化が無いことを確認 | 日・京都大&科技構CREST&北海道農研セ&東京農大 | 11 |
| 代謝物 | p-ヒドロキシ安息香酸プレニルトランスフェラーゼ | タバコ | 高コエンザイム Q10 生産; 機能性成分 | 日・京都大&東洋大 | 12 |
| 代謝物 | イソフラボン合成酵素+チャルコン異性化酵素 | タバコ | 非マメ科植物でのイソフラボン生産 | 米・サミュエル・ロバーツ・ノーブル基金 | 13 |
| 代謝物 | アントシアニン還元酵素、PAP1 MYB 転写因子 | タルウマゴヤシ、タバコ | フラバン-3-オール合成; 家畜、人の消化性向上 | 米・サミュエル・ロバーツ・ノーブル基金 | 14 |
| 代謝物 | ヤーコン及びキクイモスクロース-スクロース 1-フルクトース転移酵素 (1-SST) | テンサイ、シロイヌナズナ | フラクトオリゴ糖生産; 腸内環境改善、糖尿病予防 | 日・茨城大&道立中央農試 | 15 |
| 代謝物 | ゼイン RNAi | トウモロコシ | 19 及び 22kD α ゼインの減少とともにリジン、トリプトファンを始め、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸の増加; 栄養機能向上 | 米・モンサント社 | 16 |
| 代謝物 | シンナモイルCoA還元酵素 RNAi | トマト | 機能性成分 (フェノール性化合物) 含量増加 | 仏・CNRS-Universite Paul Sabatier | 17 |
| 代謝物 | スチルベン合成酵素、シナピン酸グルコース転移酵素 RNAi | ナタネ | パイシード (レスベラトロール配糖体); 心臓病予防、動脈硬化予防 | 独・ゲオルグアウグスト大 | 18 |
| 代謝物 | スチルベン合成酵素 | リンゴ | パイシード (レスベラトロール配糖体); 心臓病予防、動脈硬化予防 | 独・ハノーヴァー大 | 19 |

表 5. 2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等 (食用ワクチン)

| 導入遺伝子 | 作物 | 生産物及び特徴 | 研究・開発国 | 文献等 |
|----------------------------------|-----------------|--|--|-----|
| トリレオウイルス構造タンパク質 SigmaC | アルファルファ | 培養細胞での生産を確認 | 台・成功大 | 20 |
| ニューキャッスル病Fタンパク質 | イネ | ニューキャッスル病予防：腹腔内投与したマウスで特異抗体産生を確認 | 中・揚州大 | 21 |
| ニワトリロイコチトゾーン原虫シゾンド膜タンパク質 | ジャガイモ | ニワトリロイコチトゾーン原虫経口ワクチン：血清抗体価上昇、感染防御効果を確認 | 日・産総研 (北海道セ) | 22 |
| ロタウイルス VP7 | ジャガイモ | ロタウイルスワクチン：15 世代目のジャガイモでも初代と同様な免疫誘導を摂取マウスで確認 | 中・第 3 軍医大 | 23 |
| 腸管毒素産生性大腸菌フィンブリア附着因子 FaeG | 植物 | 子豚下痢症予防：摂取マウスで血清 IgG、IgG 及び糞中 IgA を確認 | 中・上海交通大 | 24 |
| ピロリ菌熱ショックタンパク質 A | タバコ | マウスへの粘膜免疫で血清抗体産生を確認 | 中・山東大 | 25 |
| ブタ胸膜肺炎菌外毒素 ApxIIA | タバコ | マウスへの経口投与で免疫誘導および感染阻止効果を確認 | 韓・Chonbuk 大 | 26 |
| 腸管出血性大腸菌不活化志賀型毒素 A サブユニット | タバコ | 免疫マウスで粘膜 IgA、中和血清 IgG 産生、感染阻止効果を確認 | 米・Uniformed Services University of the Health Sciences | 27 |
| SARS-Cov スパイクタンパク質 (S1) | タバコ、レタス (核/葉緑体) | 細胞質内での生産を確認 | 中・香港大 | 28 |
| ニューキャッスル病Fタンパク質 | トウモロコシ | ニューキャッスル病予防：摂食させたヒヨコで通常のワクチンと同様の感染阻止効果を確認 | メキシコ・Cinvestav Campus Guanajuato | 29 |
| 大腸菌易熱性腸管毒素 B サブユニット (LT-B) | トウモロコシ | 若いマウスと老年期マウスでの免疫誘導の差を試験 | 米・アイオワ州立大 | 30 |
| HIV ENV, GAG エピトープ+B 型肝炎ウイルス表面抗原 | トマト | 食用ワクチン：摂取マウスの血中と糞中に抗体を確認 | 露・State Research Center of Virology and Biotechnology Vector | 31 |
| ロタウイルス VP2、VP6 | トマト | マウスへの腹腔内投与で血清抗体産生を確認 | メキシコ・Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN | 32 |
| エンテロウイルス 71 (手足口病) VP1 | トマト | 摂取マウスで糞中 IgA、血清 IgG を確認 | 台・台湾大 | 33 |
| ベスト菌 F1-V 抗原 | トマト | 抗原を皮下注射したマウスに対し、経口で追加免疫効果を確認 | 米・アリゾナ州立大 | 34 |
| 麻疹ウイルスヘマグルチニン (MV-H) | レタス | レタスエキスのマウスへの腹腔内投与と皮下注射で中和抗体産生を確認、凍結乾燥レタス中では最大 13 ヶ月間室温で安定、50℃では最低 1 週間安定であることを確認 | 豪・The Macfarlane Burnet Institute for Medical Research and Public Health | 35 |
| 大腸菌易熱性腸管毒素 B サブユニット (LT-B) | レタス | レタス葉中の可溶性タンパク質の 1-2% の生産に成功 | 韓・Chonbuk 大 | 36 |

表 6. 2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等 (食用医薬・ワクチン抗原・治療薬)

| 区分 | 導入遺伝子 | 作物 | 生産物及び特徴 | 研究・開発国 | 文献等 |
|--------|------------------------------------|---------------|---|-------------------------------------|-----|
| 食用医薬 | オボキニン改変高機能ペプチド RPLKPW | イネ | RPLKPW ペプチド：血圧降下作用、自然発症高血圧ラットへの経口投与で血圧降下作用を確認 | 日・農業生物資源研&京都大 | 37 |
| 食用医薬 | グルカゴン様ペプチド 1 | イネ | インスリン分泌促進、糖尿病予防 | 日・農業生物資源研&三和化学 | 38 |
| 食用医薬 | スギ花粉抗原 T 細胞エピトープ | イネ | スギ花粉症緩和米：食品としての安全性を動物モデルで試験中 | 日・農業生物資源研&慈恵医大&日本製紙 | 39 |
| ワクチン抗原 | ウサギ出血性疾患ウイルス VP7 | 植物 | ワクチン：マウスで免疫活性化を確認 | 西・INIA | 40 |
| ワクチン抗原 | コレラトキシン B サブユニット | タバコ | コレラワクチン | 印・インド国立植物研 | 41 |
| ワクチン抗原 | ブタコレラウイルス (CSFV) E2 糖タンパク質 | タバコ (PVX) | ウサギで免疫誘導を確認 | 伊・Universita degli Studi di Perugia | 42 |
| ワクチン抗原 | ポリオウイルス I 型カプシドタンパク質 VP1、VP3 | タバコ (TMV) | マウスへの腹腔内投与で抗体産生を確認 | 日・大阪大 | 43 |
| ワクチン抗原 | ワタオウサギパピローマウイルス L1 核タンパク質 | タバコ、タバコ (TMV) | パピローマウイルスワクチン | 南ア・ケープタウン大 | 44 |
| ワクチン抗原 | 炭疽病防御抗原 (PA) | タバコ (葉緑体) | 最高可溶性タンパク質の 14.2% の生産に成功し、マウスへの皮下注射で感染阻止効果を確認 | 米・中央フロリダ大 | 45 |
| 治療薬 | シアノウィリン N | タバコ | cyanovirin-N (抗ウイルスタンパク質) 生産；エイズ治療薬 | 英・ロンドンセントジョージ大 | 46 |
| 治療薬 | トリファルネシル 2 リン酸合成酵素、テルベン合成酵素 | タバコ | パチョロール (タキソール前駆体) の生産 | 米・ケンタッキー大 | 47 |
| 治療薬 | CD14 (単球やマクロファージで選択的に発現される表面タンパク質) | タバコ (PVX) | 感染症予防：ウシで乳腺炎予防効果を確認 | 米・USDA | 48 |

PVX：ジャガイモウイルス X、TMV：タバコモザイクウイルス

表 7. 2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等 (抗体医薬)

| 導入遺伝子 | 作物 | 生産物及び特徴 | 研究・開発国 | 文献等 |
|--|--------|---|-----------------------|-----|
| ヒト 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) | タバコ | ヒト型糖鎖を有する抗体生産 | オランダ・ワーニンゲン大 | 49 |
| ラクダ抗 MUC1 ムチン単一可変領域抗体断片 | タバコ | 抗癌 | イラン・Tarbiat Modares 大 | 50 |
| 抗 2 本鎖 RNA 抗体 | タバコ | 導入遺伝子の細胞内発現部位を変化させ抗体の安定性・生産性を検討 | ハンガリー・生物学研 | 51 |
| ヒト抗 HIV 単クローン抗体 | タバコ | 効率的なタバコからの抗体抽出法を検討 | ギリシア・アテネ農業大 | 52 |
| 抗ルイス Y 糖鎖抗原単クローン抗体 | タバコ | 抗癌: 低アルカロイドタバコで生産した抗体で乳癌細胞および結腸癌細胞の細胞毒性を確認、結腸癌を移植したヌードマウスで制癌作用を確認 | 米・トーマスジェファーソン大 | 53 |
| ヒト抗狂犬病ウイルス単クローン抗体 | タバコ | タバコ培養細胞で、30µg/g 乾燥重 (0.5mg/L) の生産に成功 | 米・トーマスジェファーソン大 | 54 |
| シロイヌナズナキシロース転移酵素+ヒト β 1-4 ガラクトース転移酵素 I | タバコ | マウス単クローン抗体産生タバコと交配し、植物型糖鎖が著しく減少した (低アレルギー性) 抗体を生産 | オランダ・ワーニンゲン大 | 55 |
| 抗コキシジウムニワトリ sIgA | タバコ | コキシジウム結合性の V 鎖をファージ提示法で選抜し、人工的に IgA を合成、IgA H 鎖、L 鎖、J 鎖、分泌片をタバコで発現させ sIgA を作成 | オランダ・ワーニンゲン大 | 56 |
| 抗ボツリヌス菌 A 型毒素抗体 Fv 単鎖 | タバコ | 摘出マウス筋を用いた試験でタバコで生産した抗体 Fv 単鎖が神経筋接合部においてボツリヌス菌 A 毒素の麻痺作用を中和することを確認 | 加・グエルフ大 | 57 |
| ヒト化単クローン抗体 | トウモロコシ | ヒト化単クローン抗体を種子で生産 | 米・モンサントプロテインテクノロジー社 | 58 |
| 抗コキシジウムニワトリ IgA | トマト | 抗体遺伝子をもつアグロバクテリアを果実に注射し、トマト果実内での IgA 生産に成功 | オランダ・ワーニンゲン大 | 59 |
| IgG、IgG 単鎖、植物由来 calreticulin | 植物 | 治療用抗体: 植物由来 calreticulin により抗体収量が 2 倍に増加 | 米・ラトガース大 | 60 |

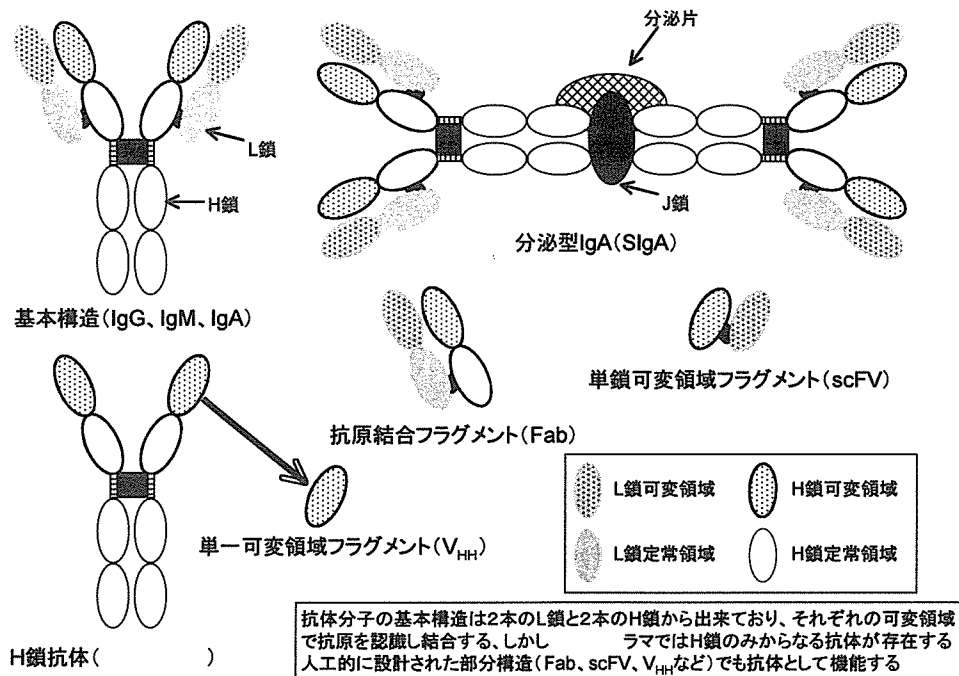


図 2. 抗体分子の構造

表 8. 2006-2007 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等 (国別集計)

| | 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 | 合計 |
|---------|-------|--------|------|--------|------|-----|--------|----|
| 米国 | 3 | 3 | | 1 | 4 | 2 | | 13 |
| カナダ | | | | | 1 | | | 1 |
| メキシコ | | 2 | | | | | | 2 |
| 英国 | 1 | | | | | 1 | | 2 |
| フランス | 1 | | | | | | | 1 |
| ドイツ | 2 | | | | | | | 2 |
| オランダ | | | | | 4 | | | 4 |
| イタリア | | | | 1 | | | | 1 |
| スペイン | | | | 1 | | | | 1 |
| ギリシャ | | | | | 1 | | | 1 |
| ハンガリー | | | | | 1 | | | 1 |
| イラン | | | | | 1 | | | 1 |
| 南アフリカ | | | | 1 | | | | 1 |
| ロシア | | 1 | | | | | | 1 |
| インド | 1 | | | 1 | | | | 2 |
| オーストラリア | 1 | 1 | | | | | | 2 |
| 台湾 | | 2 | | | | | | 2 |
| 韓国 | | 2 | | | | | | 2 |
| 中国 | 1 | 5 | | | | | | 6 |
| 日本 | 8 | 1 | 3 | 1 | | | | 13 |
| 合計 | 18 | 17 | 3 | 6 | 12 | 3 | 0 | 59 |

分担研究報告書（平成 18 年度）

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究
遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究(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

現在実用化されている遺伝子組み換え食品は農作物が主であるが、その他の畜産物も上梓されるのも目前に迫っており、それらについても安全性評価の検討が必要である。本研究では遺伝子組み換え魚としてアマゴを用いて、プロテオーム及びメタボローム解析による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についての検討を行い安全性評価の可能性を探った。アマゴからの RNA 抽出法について検討した後、非組み換え体 1 年齢、2 年齢、組み換え体 1 年齢各 4 固体のアマゴの背肉から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA チップはその他の遺伝子組み換え魚についても汎用的に用いることができるかもあわせて検討するために、魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュのものを用いた。搭載遺伝子数は 42,065、プローブ長は 60 塩基であった。マイクロアレイの結果、すべての遺伝子についてシグナルが得られ、アマゴサンプルにおいて統計学的な解析が十分可能であると考えられた。非遺伝子組み換え体 1 年齢、2 年齢、遺伝子組み換え体 1 年齢において遺伝子発現量の多寡に偏りは無く、遺伝子組み換えによって遺伝子発現に劇的な変化が起こっている可能性は非常に低いことが示唆された

研究協力者

佐々木伸大（東京農工大学大学院・共生科学
技術研究院・生命機能科学部門）

A.研究目的

近年、遺伝子組み換え農作物は栄養改変・付与といった第 2 世代の物が実用化されつつある。これらの第 2 世代の組み換え農作物では代謝プールを変動させるような組み換えを行うため、その影響で宿主の遺伝子発現の変動、それに伴う発現タンパク質の変動、更に意図しなかった宿主の代謝プールの変動が想定される。その為、これらの遺伝子組み換え食品では、遺伝子発現、タンパク質、代謝物について標的を定めずに一斉解析を

行う必要がある。また、現在出回っている農作物のみならず、魚等を含む様々な畜産物についても遺伝子組み換え食品として実用化され、市場に出回るのも時間の問題であり、これらの遺伝子組み換え食品について、ポスト・ゲノム手法の安全性評価への導入条件を模索することが必要となる。そこで、本研究では遺伝子組み換えアマゴを用いて、遺伝子発現の段階でのプロファイリングを解析することを目的として、トランスクリプトーム解析を行った。これらの遺伝子組み換え食品については、アマゴ等のモデル生物ではない生物種においては、トランスクリプトームを行うにあたって、まず、RNA 抽出法を確立し、用いる DNA チップを選定することが肝

要である。そこで本研究では、組み換えアマゴと非組み換えアマゴにおいて遺伝子発現のプロファイリングがどのように異なっているのかを検討するために、RNA 抽出法と魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュの DNA チップを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

B. 研究方法

<試料>

遺伝子組み換えアマゴ 1 年齢と非組み換えアマゴ 1 年齢、2 年齢各々 4 個体の背肉を切り取り、液体窒素で急速冷凍し保存したものを試料として供した。

<方法>

アマゴからの RNA 抽出は Invitrogen 社の TRIzol Reagent と Qiagen 社の RNeasy Plus Mini Kit を組み合わせて行った。アマゴ背肉約 0.5g を乳鉢を用いて液体窒素中でパウダー状になるまで磨砕し、液体窒素が蒸発しきったところで、5ml の TRIzol 溶液を加えてよく混合してから、室温で 5 分間静置した。遠心して上清を新たな試験管に移し 1ml のクロロホルムを加えてよく混合し、3 分間室温に静置した。15,000xg、10 分間遠心した後、上層を新たな試験管に移し、0.5 容のイソプロパノールを加えてよく混合した後、15,000xg で 15 分間遠心して RNA を沈殿させた。沈殿した RNA を 1ml の 70%エタノールで洗浄した後風乾した。沈殿した RNA を RLT buffer に懸濁し、gDNA Eliminator Mini Spin Column にアプライし、遠心してゲノム DNA を除去した。素通り面分に 0.5 容のエタノールを加えてよく混合し、RNeasy column にアプライして RNA をカラム担体に吸着させた。RW1 buffer, RPE buffer でカ

ラムを洗浄した後、50 μ l の RNase free 水で RNA を溶出した。

DNA マイクロアレイはジーンフロンティア株式会社の DNA マイクロアレイ解析サービス“なんでもアレイ”を利用した。DNA チップはゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) とメダカ (*Oryzias latipes*) のものが使用可能であったが、搭載遺伝子数とこれまでの研究の知見の多いゼブラフィッシュを用いることとした。DNA チップは 42,065 遺伝子が搭載しており、遺伝子あたりのプローブペア数は 9 で、プローブ長は 60mer であった。

C. 結果

アマゴ背肉からの RNA 抽出は、最も汎用的な方法である GTC/塩化セシウム密度勾配超遠心法では、油脂分が多く抽出が困難であったが、TRIzol Reagent と RNeasy Plus Kit を組み合わせて用いることで DNA マイクロアレイに供するのに十分な純度の RNA を抽出することができた(図 1)。収量はアマゴ背肉約 0.5g あたり、total RNA 約 60~120 μ g であった。

1 年齢と 2 年齢の非組み換えアマゴ、各 4 個体と、組み換えアマゴ 1 年齢、4 個体、計 12 個体について RNA を抽出し、1 色法によるマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイの結果をノーマライズしたものを非組み換え 1 年齢、2 年齢、組み換えアマゴ 1 年齢の各々の個体について発現量をスクエアー・プロットによって比較した(図 2)。その結果、いずれの検体においても、発現強度が少なめになる傾向は見られたものの、図 2 に示すように相関係数は約 0.92~0.96 程度であり、各個体間のばらつきは少ないことが分かった。そこで各個体間で平均化した遺伝子発現量について遺伝子組み換え体、非組み換え体、年齢における遺伝子の発現量の差を検

討した。

非組み換え体 1 年齢を基準として非組み換え体 2 年齢と、組み換え体 1 年齢についてスキャッター・プロットしたが、いずれの比較においても大きな差異は見出されなかった (図 3A)。また、非組み換え体 2 年齢と組み換え体の発現プロファイルについても同様にスキャッター・プロットによって解析を行ったが、有意な差異は見出されなかった (図 3B)。また、非組み換え体 1 年齢の遺伝子発現量と比較して 1.5 倍以上であった遺伝子の数は、組み換え体では 302、非組み換え体 2 年齢では 271 で両方に共通していたものは 48 であり、全体の 1.5% 程度であった (図 4 左)。また、遺伝子発現量が 0.66 倍以下であったものは組み換え体で 207、非組み換え体 2 年齢で 205、両方に共通のものは 44 であり、全遺伝子に占める割合は約 1.1% であった (図 4 右)。これらの結果からも、特に発現に変化のある遺伝子に偏りは無く、組み換えた遺伝子によって遺伝子の発現が大きく変化していることは確認できなかった。

D. 考察

アマゴ背肉は多量の油脂分を含んでいたため、フェノール、クロロホルムを含む TRIzol 溶液を用いて脱脂した後で、シリカメンブレン担体としたカラムクロマトグラフィーで精製することで比較的簡便に精製度の高い RNA を抽出できることが解った。今後他種の遺伝子組み換え魚からの RNA を抽出する場合もこの方法が応用できるものと考えられる。

DNA マイクロアレイ解析は DNA チップとして魚類では最も研究が進んでおり、搭載遺伝子数も最も多いゼブラフィッシュのものを用いて行ったが、若干シグナルが弱めに

検出されたが、42,065 種すべての遺伝子のプローブにおいてシグナルが観測されており、統計学的な処理を行うに十分な情報量が得られたものと考えられる。このことは他の種の遺伝子組み換え魚においてもゼブラフィッシュの DNA チップを用いたトランスクリプトームの可能性を示唆している。また、トランスクリプトーム解析の結果、非組み換え体 1 年齢、2 年齢、組み換え体 1 年齢の各個体間において遺伝子発現に有意な差異は認められなかった。今回用いた検体は 1 年齢と 2 年齢の 2 種類の魚齢についてのみであったが、他の発達段階や他の部位、組織についての解析の必要性についても示唆された。

本研究において遺伝子組み換え魚の一例としてアマゴを用いてトランスクリプトーム解析を行い、その条件等について十分に検討できたものと考えられた。

E. 研究発表

特になし

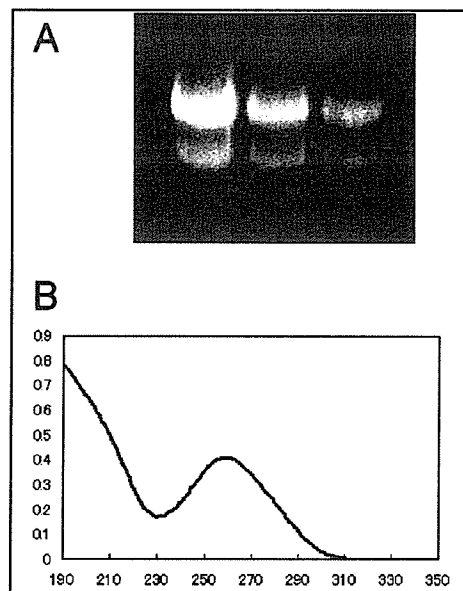


図 1 アマゴから抽出した RNA のホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動図 (A) と UV スペクトル (B)

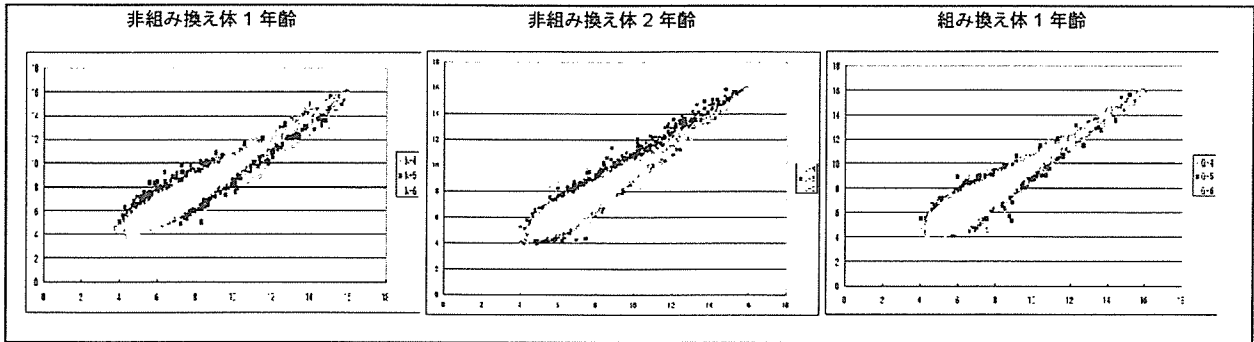


図2 非組み換え体 1 年齢、2 年齢、組み換え体 1 年齢、各個体間におけるスキヤッター・プロット図

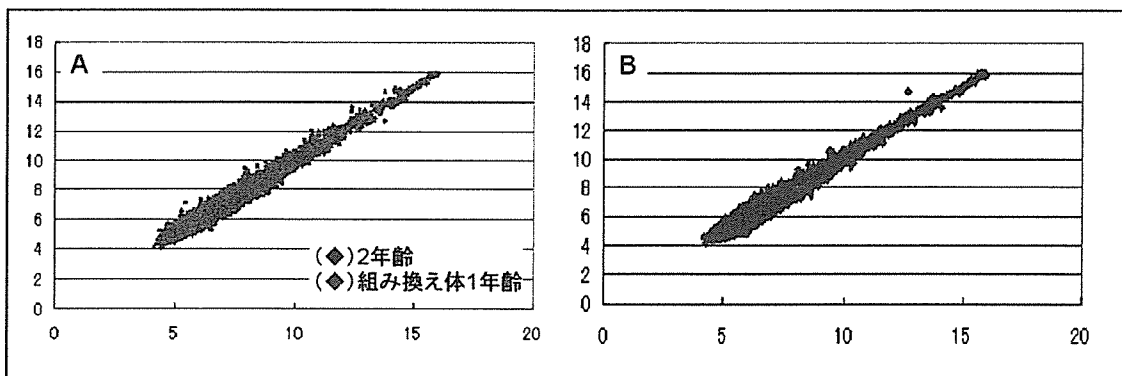


図3 各検体間のスキヤッター・プロット図

A: 非組み換え体 1 年齢と 2 年齢あるいは組み換え体
 B: 非組み換え体 2 年齢と組み換え体

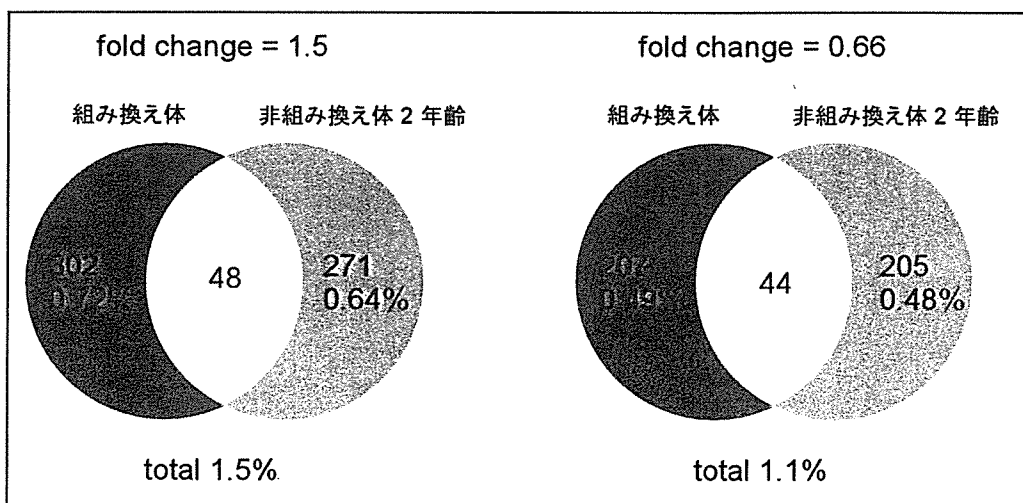


図4 非組み換え体の遺伝子発現量を基準として発現量が 1.5 倍以上、0.66 倍以下であった遺伝子数

分担研究報告書（平成 18 年度）

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究
遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究(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:今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とし、本年度はベニザケの成長ホルモンをコードする遺伝子を導入したアマゴと非遺伝子組換えアマゴを用いて、それぞれの発現タンパク質の違いをプロテオーム解析により比較検討した。

協力研究者

佐々木和生(青森大学薬学部)

梅津博紀(岐阜聖徳学園大学短期大学部)

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められる一方、国際的な基準作りが進められている。バイオテクノロジーを応用した食品の中でも、特に、除草剤耐性、害虫抵抗性等の第一世代の遺伝子組換え作物の開発、作付けが米国を中心に進み、これら遺伝子組換え食品の国際的な流通が急速に広まっている。また、近年では、組換え微生物を利用した食品や組換え魚などの新たな遺伝子組換え食品や、食品の栄養成分を改変した遺伝子組換え食品の開発が進むとともに、とうもろこし等の作物を組換え、医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。わが国においては、平成 13 年 4 月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、最新の科学的知見に基づく審査を行うとともに、遺伝子組換え食品の表示について義務付けし、輸入時にモニタリング検査等を行っている。

このような状況の中、生産者のメリットを考慮した第一世代バイオテクノロジー応用食品に加え、消費者のメリットも考慮したモダンバイオテクノロジー応用食品についても実用化が現実のものとなりつつある現状に対応するため、本研究においては、今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とする。本年度は、ベニザケの成長ホルモンをコードする遺伝子を導入したアマゴの発現タンパク質の変

化をプロテオーム解析によりプロファイリングすることを目的とし、遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴを用いてそれぞれのプロファイルの比較検討を行った。

B. 研究方法

<材料>

農水省水産総合研究センターより供与された遺伝子組換えアマゴと 1 齢と 2 齢の非遺伝子組換えアマゴを材料として用いた。

<方法>

タンパク質抽出

凍結保存したサンプルをマイクロチューブにとり、10mg/100 μ l の割合で抽出バッファー（8M Urea, 4%(W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl, 1 μ l/100 μ l Protease inhibitor mixture (Amersham Pharmacia Biotech)) を加え、氷上ですりつぶした。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

粗抽出物を 2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。得られた沈殿を 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (Amersham Pharmacia Biotech) に溶解し、限外濾過膜 (Ultrafree, Millipore) により低分子性物質を除去した。2-D Quant Kit によりタンパク質量を定量し、30 μ g 相当を電気泳動に供した。

電気泳動

・ 1 次元目電気泳動 (IEF)

サンプルおよび 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution を用いて Immobiline DryStrip 3-10NL 18cm (Amersham Pharmacia Biotech) を膨潤させ、Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて電気泳動した。500V で 1 時間、