

200734033A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害
防止に関する安全性確保のための研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

(H19-食品-004)

主任研究者 穉山 浩

平成20年4月

目次

I. 総括研究報告

非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への
混入危害防止に関する安全性確保のための研究

穂山 浩 1

II. 分担研究報告

1. 非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究

穂山 浩 21

2. 産業用及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物の検知に関する研究

五十君 静信 25

3. 工業原料用遺伝子組換え植物・生物の混入危害に関する研究

小関 良宏 63

4. 非食用遺伝子組み換え魚と動物に関する文献調査

手島 玲子 73

5. 医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物の調査研究

吉松 嘉代 85

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 107

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止に関する
安全性確保のための研究

総括研究報告書

主任研究者	穠山 浩	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	室長
分担研究者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	室長
分担研究者	小関 良宏	東京農業工業大学	工学部	教授
分担研究者	手島 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	部長
分担研究者	吉松 嘉代	独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源 研究センター筑波研究部	育種生理研究室	室長

研究要旨： 非食用の遺伝子組換え（GM）遺伝子の有無を判断するスクリーニング系の開発を目的に、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 法の基礎的検討を行った。増幅された 2 本鎖 DNA 特異的に蛍光を発するという特徴を活かし、GM 作物に汎用されるプロモーター・ターミネーター・その他の遺伝子プライマーを用いることで、1 サンプルから組換え遺伝子を複数かつ同時に検出可能と考えた。微生物に関しては、市販の大腸菌用 GM ベクターと研究用に利用されている乳酸菌用 GM ベクターについてまとめ一覧表を作成した。GM 微生物の定量的検知法に関し検討を行った。工業用原料生産に関しては、GM 植物においてエタノールや生分解性プラスチックなどの工業原料を生産する研究が進められているため、これら工業原料生産を意図して作出された GM 植物の開発の現状について、可食性工業原料と非食性工業原料に分類し、文献データベース、インターネット検索、報告書等を用いて調査した。可食性工業原料は、植物がそもそも合成している食経験のある化合物の蓄積量を増大あるいは改質することによって、より工業原料としての優良品性を高める開発と、収穫した後にこれを加工する際に必要な耐熱性酵素遺伝子などを導入する開発の 2 つの方向性があることが明らかになった。前者は化合物の量・質の改変であることから、栄養改変・付加型の第 2 世代の GM 植物に類似し、また後者は新たな酵素タンパク質の発現を付加するものであることから、除草剤耐性や害虫抵抗性に関わるタンパク質を付与した第 1 世代の GM 植物に類似のものと考えられた。一方、非食性工業原料は新たな酵素タンパク質の付与とともに、食経験のない化合物や消化吸収できない化合物、ヒトの健康を害する可能性のある化合物などを GM 植物に合成させるものであり、食品への混入は認められないと考えられた。動物に関しては、組換え魚、ニワトリと鶏卵、ブタを中心に開発状況を調査した。トランスジェニックニワトリや鶏卵をバイオリクターとして利用して大量の組換えタンパクを生産していることが明らかになった。トランスジェニックブタについては大量にクローンを作成することを可能にする技術が研究されていることが明らかになった。医薬品目的の GM 植物（薬用 GM 植物）に関しては、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 植物及び環境浄化目的の GM 植物（環境浄化用 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、環境浄化の 8 種類を設定し、それぞれの一覧表を作成した。2007 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：15 件、食用ワクチン：6 件、食用医薬：5 件、ワクチン抗原：5 件、抗体医薬：2 件、治療薬：7 件、診断薬・試薬：3 件、環境浄化：11 件であり、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品、環境浄化の開発が盛んである状況が伺えた。また、中国・台湾での研究について挿入遺伝子カセット構造を調べ、一覧表を作成した。さらに、未承認 GM 植物検知のための配列未知の導入遺伝子配列の取得・解析法の開発のため、既知領域の遺伝子情報を利用した未知領域の塩基配列解析法について調査した。

略号：phbA, β -ketothiolase; phbB, acetoacetyl-CoA reductase; phbC, PHB polymerase; phaCac, phaCac polymerase; lvA, threonine deaminase; PhaC1, PhaC1 synthase 35S, CaMV 35S RNA プロモーター; P-Lh, *Lesquerella hydroxylase* プロモーター; Prrn, plastid rRNA プロモーター; psbA, plastid psbA プロモーター; Tnos, NOS ターミネーター; T35, CaMV 35S RNA gene ターミネーター; SE9, *Pisum sativum rbcSE9* ターミネーター; TpsbA, plastid psbA ターミネーター; NPT II, Neomycin phosphotransferase II; HPH, hygromycin phosphotransferase; GUS, β -glucuronidase; EPSPS, enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase; *bar*, Bialaphos resistant gene; GFP, Green Fluorescent Protein; Spe, Spectinomycin resistance gene Glucanase, endo-1,4- β -D-glucanase; APU, amylopullulanase; pin, puroindoline genes; cel-hyb1, hybrid cellulase gene of *celA* (*Neocallimastix patriciarum*) and *Cel6G* (*Piromyces sp.*); COMT, caffeic acid O-methyltransferase; 4CL, 4-coumarate:coenzyme A ligase

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用技術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、国際的な基準作りが進められている。近年では Genetically Modified (GM) 食品の開発が進む一方、とうもろこし等の作物を組換え、医療用の医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。さらには食品添加物を生産するためのGM微生物は

既に応用されており、工業原料産生及び環境浄化目的のGM植物・生物の開発も急速に行われている。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来の非食用バイオテクノロジー応用植物・生物が誤って食品に混入する可能性が示唆されている。わが国においては、平成13年4月からGM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、GM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。またGM生物に関しても、平成16年からGM生物の多様性確保により法律が施行され、GM生物の使用等を規制している。国際的にも、コーデックス委員会バイオテクノロジー応用食品特別部会 (CTFBT) において、GM食品の安全性に係るガイドライン等の作成を行っており、種子植物、微生物のガイドラインの作成が、2003年6月終了した。2004年第27回 Codex総会において、CTFBTの再設置が採択され、わが国が議長国を引き受けることになり、2005年9月に第五回タスクフォース会合が行なわれた。

このような状況の中、本申請研究においては、非食用のバイオテクノロジーを応用した植物・生物について食品への混入に関する安全性確保を実施するため、非食用バイオテクノロジー応用植物・生物に関する開発・実用化の動向の調査研究、非食用バイオテクノロジー応用植物・生物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な試験方法の確立を行うことを目的とする。

B. 研究方法

①非食用バイオテクノロジー応用生物の

食品への混入危害の調査研究 ①-1) 試料：市販されている中国産野菜(エンドウマメ、冷凍ニンジン、冷凍ブロッコリー、冷凍カリフラワー、冷凍アスパラガス) ①-2) DNA 抽出精製：DNeasy Plant Maxi kit 法：JAS 分析試験ハンドブック「GM 食品検査・分析マニュアル 基本操作編、3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A に準じた。①-3) 試薬調製・SYBRGreen リアルタイム PCR: 試薬は SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (タカラ Cat. RR041A) を使用した。反応液は、1×SYBR Premix Ex Taq、1×ROX Reference Dye、0.2 μmol / L 5' 及び 3' プライマー、滅菌水を含む液に、10 ng/ μL に調製した DNA 試料液 2.0 μL (DNA として 20ng) を氷中で加え、全量を 20 μL にした。プライマー対は 35S プロモーター、Actin I プロモーター、NOS ターミネーター、cp4epsps、NPTII など、GM 作物に代表的な遺伝子を用いた。PCR 温度条件は以下の通りとした。温度条件 95℃で 10 秒間加熱し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95℃5 秒、60℃34 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応後、95℃15 秒間、60℃1 分間、さらに 0.2℃/秒で温度を上昇させ 95℃15 秒間を保持し、融解曲線を作成した。

②産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究 非食用バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、②-1) 論文、書籍、web、業者カタログなどを用い、微生物の GM に関わるベクターに関するデータベース作りを開始した。本年度は、市販されている大腸菌用の GM ベクターおよび、研究用

に利用されている乳酸菌組換えベクターについてまとめ一覧表を作成した。②-2) スペインで開催された“国際環境および工業応用微生物会議” (The Second International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007)) に参加し、産業用及び環境浄化目的の GM 微生物に関する情報収集を行った。微生物における対象遺伝子を測定する検知技術の検討では、リボゾーマル RNA を標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を開始した。*Escherichia coli* の 23S rRNA 配列を標的とした RT-PCR 法を試みた。プライマーは、Enlsu3F (TGCCGTA ACTTCGGGAGAAGGCA)、Enlsu3' R (TCAAGGCTCAATGTTTCAGTGTTC) を用いた。(Matsuda K et al. 2007)

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究 生分解性プラスチック、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)・ポリヒドロキシブチレート (PHB) やバイオエタノールなどのキーワードをもとに、文献データベース (Entrez PubMed 等)、インターネット検索 (Google)、研究開発報告書データベース (NEDO 成果報告書データベース等) などを用いて調査し、そこで用いられた導入遺伝子、プロモーターおよびターミネーターについて情報をカテゴリ別に分類した。

④医薬品用遺伝子組み換え生物や再生医療用動物の調査研究 文献データベースやインターネット等を用いて情報収集を行った。

⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究 ⑤-1) 「薬用 GM 植物及び環境浄

化用 GM 植物の調査」 GM 植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲と位置づけ、薬用及び環境浄化用 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、カテゴリ別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。さらに、上記情報のうち、特に食用作物が宿主として使用されているもの及び日本の主な農産物輸入元となっている国の情報を解析し、組換え遺伝子カセット構築に使用されているプロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子配列等についての情報を収集し整理した。⑤-2)「既知領域の遺伝子情報を利用した、未知領域の塩基配列解析法の調査」シロイヌナズナ T-DNA タグラインにおける T-DNA 挿入部位の解析など、ゲノム DNA 上の既知（内在もしくは外来）配列に隣接する未知配列情報の取得に頻用されている inverse PCR 法および adaptor-ligation-PCR 法の 2 種について、その手法の詳細を調査するとともに、薬用植物ケシの T-DNA 挿入体の解析への適応例を吟味し、その有効性を検討した。

C. 研究結果

①非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究 中国産エンドウマメ、冷凍野菜(ニンジン、ブロッコリー、カリフラワー、アスパラガス)など GM が疑われる食品について、ランダムに複数種のプライマーを選出し、リアルタイム PCR を行った。増幅曲線と融解曲

線にて解析を行った結果、複数遺伝子を同時に検出が可能になった。

②産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究 非食用バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、今年度研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクターと研究用に開発された乳酸菌用発現ベクターに関して一覧表を作成して、データベース化した。市販の 520 の大腸菌用ベクターについて、主にカタログ及び web を中心に、用途・機能・特徴、研究・開発メーカー、ベクター名、プロモーター、ターミネーター、マーカーにつき調べ、一覧表を作成した。用いられているプロモーターは、T7、lac、SP6、CMV などの頻繁に用いられている場合と、用途の限定された限られたプロモーターが使われている場合があった。マーカーとしては、ampicillin を用いていることが多く、kanamycin、chloramphenicol も多用されていた。その他 spectinomycin、hygromycin、geneticin 他が用いられていた。

乳酸菌用発現ベクター112について、主に論文、書籍等の文献を基に一覧表を作成した。これらの組換え微生物はそのほとんどがまだ実用化までは至っていない研究段階であり、ワクチン、機能性剤等として開発されていた。ベクターの種類は多いが、プロモーター、ターミネーター、マーカーは用いられている種類がそれほど多くなかった。特にベクターのマーカーとして用いられているのはほぼ erythromycin であり、chloramphenicol が使われる場合もあった。スペインで開

催された“国際環境および工業応用微生物会議”(BioMicroWorld 2007)に参加し、産業用及び環境浄化目的のGM微生物に関する情報収集を行った。組換え技術を用いて製剤化し、実用化に至っている例はなく、検討されているのは、自然分離株に関する機能の検討が多く、一部ではどのような酵素が有効かといった遺伝子レベルでの検討もあった。微生物における対象遺伝子を測定する検知技術の検討では、高感度の検出が可能とされるリボゾーマル RNA を標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を開始した。本年度は、大腸菌を対象として、主に菌体の処理方法の検討を開始した。1 step RT-PCR と 2 step RT-PCR を行ったのち定量 PCR を行い評価したところ、実験毎検出感度が異なり、評価可能な安定した結果はまだ得られていない。

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究 ③-1. 「可食性工業原料」

Wu らは、サトウキビに sucrose の異性体である isomaltulose (palatinose) を合成する遺伝子 (sucrose isomerase) を導入し、アルコール発酵の原料として糖を従来の2倍収穫できるGMサトウキビを作出した(Wu et al. Plant Biotechnol. J. 5: 109-117 (2007))。さらに同氏らは、液胞で isomaltulose が蓄積するように N-terminal pro-peptide (NTPP) を結合した sucrose isomerase 遺伝子を導入することによって、sucrose の蓄積を妨げることなく isomaltulose を液胞に蓄積させ、全体として非GM体に比べ約2倍量の糖の蓄積に成功した。また Hu らは、アンチセンス法により 4-クマル酸 CoA リガーゼ

遺伝子発現を抑制した組換えポプラを作出し、この組み換え体においてリグニン量が45%減少、セルロース含有量が9~15%増加し、葉、根、茎の成長が促進された(Hu et al. Nature Biotechnol. 17: 808-812 (1999))。

デンプン質の作物からバイオエタノールを製造する際、デンプンを糖に分解するために、アミラーゼを加える必要がある。このコストや手間を削減するために、アミラーゼを遺伝子導入してデンプンを分解し、糖に分解させて蓄積させる研究がなされている。タバコにイネの α -アミラーゼ遺伝子を導入すると細胞質で発現がみられ、葉緑体移行シグナルを結合させた α -アミラーゼ遺伝子を導入した場合において葉緑体のストロマでの発現が見られた(Chen et al. Plant Physiol. 135: 1367-1377 (2004))。しかし、 α -アミラーゼ遺伝子を導入したGMイネにおいて葉におけるデンプン蓄積が減少するとともに、完熟種子の乾燥重量も減少してしまった(Asatsuma et al. J. Appl. Glycosci. 53: 187-192 (2006))。また Chiang らは、コメに *Thermoanaerobacter ethanolicus* 由来の耐熱性アミロプラーゼ遺伝子を導入した(Chiang et al. Mol. Breed. 15: 125-143 (2005))。この酵素の最適温度は90℃のため、植物体が成長している間は活性が低く、貯蔵デンプンの蓄積を抑制しない。これを収穫して破砕し、高温にすることによってアミラーゼの添加なしにデンプンを糖化できる。すでに同様な耐熱性アミラーゼ遺伝子を導入したトウモロコシも作出され、実用化が進められている。同様な

微生物由来の耐熱性酵素を遺伝子導入した植物体を作成し、通常の植物の生育温度においては活性が非常に低い状態で植物体の生育には影響を及ぼさず、収穫・粉砕後にその耐熱性酵素の活性至適温度の高温処理を施すことによって、酵素添加することなく加工を行なう方法は、セルロースの分解についても研究されている。セルロースは植物繊維質の主成分であり、天然の植物質の2/3を占め、地上最大のバイオマスであると言われる。Biswasらはトウモロコシにおいて、*Acidothermus cellulolyticus* 由来のセルラーゼ (endo-1, 4- β -D-glucanase catalytic domain(E1-cd)) の上流に apoplast 移行シグナルを結合させた遺伝子を導入したところ、E1-cd タンパク質が発現・合成されて apoplast に蓄積していること、しかしその GM トウモロコシの生長は野生型と大きな違いがなかったことを示した (Biswas et al. Plant Sci. 171: 617-623 (2006))。

③-2. 「非食性工業原料」 現在、GM 植物を用いた非食性工業原料の生産について研究されているのは生分解性プラスチックである。生分解性プラスチック生産 GM 植物は、主に微生物が合成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を産生させるように、微生物由来の遺伝子を導入した GM 植物がほとんどである。PHA は熱可塑性を持ち、再生可能な資源である糖や植物油から発酵法により生産することができ、さらに自然界の様々な微生物により分解されることから持続可能型の完全生分解性プラスチック材料として注目されている。最も代表的な PHA はポリヒド

ロキシブチレート (PHB) である。このポリマーはアセチル-CoA から合成され、 β -ケトチオラーゼ (PhaA) によりアセチル-CoA が二量体化し、アセトアセチル-CoA レダクターゼ (PhaB) による還元によって生成した (R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA が PHA シンターゼ (PhaC) により重合されることで PHB が合成される。これら合成系は *Ralstonia eutropha* などの微生物が有しており、その合成系の遺伝子のクローニングがなされ、これら遺伝子を植物に導入することで PHB の合成が試みられている。その最初の例は、シロイヌナズナに *R. eutropha* 由来の PhaB と PhaC を、CaMV35S プロモーターと結合させたものを導入して発現させたところ、根や葉、子葉、種子において PHB が合成され、これらが葉緑体とミトコンドリア以外の細胞の核や液胞、細胞質内に細粒となって観察された (Poirier et al. Science 256: 520-523 (1992))。しかし、その合成蓄収量は乾燥重量で 0.1% であり、PhaB を過剰発現させた組み換え植物においては、強い成長阻害と種子の生産の減少が見られた。PHB 合成の出発材料となるのはアセチル-CoA であり、その合成量は細胞質より葉緑体内の方が高い。より高い PHB の合成生産量を求め、よりアセチル-CoA 量が高いとされる葉緑体内での合成が試みられた。PhaA、PhaB、PhaC に葉緑体移行ペプチド (CTP) を結合し、CaMV35S プロモーターにより発現させるコンストラクトを作成してシロイヌナズナに遺伝子導入したところ、これらタンパク質の葉緑体における発現が確認され、PHB の乾燥重量に対する合成蓄積量を 14% から 40% に

まで上昇させることに成功した(Nawrath et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12760- 12764 (1994); Bohbert et al. Planta 211: 841-845 (2000))。Nakashitaらは、タバコを用いて PHA オペロン(PhaCBA)を plastidial rRNA operon promoter (prrrn) で発現させるようにして、葉緑体ゲノムへ導入したところ、合成量は少ないが PHB の合成が確認された(Nakashita et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 1688- 1691 (2001))。さらに葉における葉緑体ではなく、種子における白色体に蓄積させるために種子特異的なプロモーターである *Lesquerella fendii* fatty acid hydroxylase プロモーターを用い、CTP を結合した PhaA、PhaB、PhaC を発現させた。その結果、種子の乾燥重量の 8%の PHB 合成蓄積が認められた(Houmiel et al. Planta 209: 547-550 (1999))。

④ 医薬品用遺伝子組み換え生物や再生医療用動物の調査研究 ④-1. 「組換え魚」

非食用の魚は観賞用、バイオリクター、環境モニタリングなどの目的で開発されている。まず、中国での組換え魚の研究状況を調査した。遺伝子導入のための基礎研究および成長ホルモン遺伝子を導入した食用の組換え魚の開発とその魚の分析が盛んになされている。一方で、非食用と考えられる組換え魚の報告は少ない。Zhong J. らは、2002年にコイ β -アクチンプロモーターの制御下においたヒトラクトフェリン遺伝子をソウギョに導入した。この組換えソウギョは、GCH ウイルスへの抵抗性が增強されていた。この組換えソウギョの検知には、コイ β -アクチン

プロモーターとヒトラクトフェリン遺伝子の配列を利用して PCR プライマーを設計することが考えられる。中国以外の国の状況としては、Zeng Z. らが 2005年にメダカへの green fluorescent protein (GFP) 遺伝子導入の研究を報告した。2003年には、Gong Z. らは GFP、yellow fluorescent protein (YFP)、red fluorescent protein (RFP) をゼブラフィッシュに導入した研究を報告している。これらの組換え魚の検知には、導入した蛍光タンパクの遺伝子配列やベクターの配列を利用することが考えられる。組換え観賞魚についてインターネットを用いて調査したところ、Taikong 社では光るメダカや様々な蛍光色のゼブラフィッシュを開発しており、これは Gon Z. らの研究が基になっている。Taikong 社で開発された組換え魚に導入された遺伝子の詳細についてはホームページに記載がなく、不明である。日本国内でもこの会社の光るメダカが販売されたことがあったが、行政当局からの販売自粛要請を受けて販売中止と回収がなされた。韓国では 2005年に組換えメダカ TK1 が販売された。Taikong 社では組換え観賞魚をアメリカで販売する計画中であるが、組換えタンパクを商業的に利用する特許の問題がまだ解決できておらず、アメリカ小売業界がこの組換え観賞魚の販売にはあまり積極的ではないようである(http://mongaby.com/external/glowing_fish.htm)。また、Yorktown Technologies 社が Glofish を開発しており、アメリカではすでに市販されている。Yorktown Technologies 社は他の国に Glofish を輸出する計画を現在は立てていな

いと報告もあった (<http://www.glofish.com/buy.asp>)。日本ではこれらの組換え観賞魚を輸入することを認められておらず、不法な輸入に対して監視や検知の体制を整えることが必要と思われる。次に、有用物質生産のために作成された組換え魚について述べる。Pohajdak B. らがヒトインシュリンを、Hwang G. らがヒト血液凝固因子 VII を組換え魚で発現させた研究を報告している。これらは医療で利用価値が高い組換えタンパクを組換え魚で発現させようと試みた研究である。このような研究報告はまだ少ない。またニワトリリゾチームや抗微生物活性をもつペプチド cecropin を組換え魚で発現させて病原菌に対する耐性を強化した研究がある。このような研究報告も少ない。上記の組換え魚を検知するためには、ベクター配列、プロモーター配列、翻訳領域の配列が利用できる。しかし、同種の魚に由来するプロモーターが使われているときには検知のためにその配列は利用できない。導入遺伝子の翻訳領域の配列については非組換えの魚の中に相同的な遺伝子が存在する場合は、導入遺伝子に固有の配列を選択する必要がある。次に環境モニター用に組換え魚を応用した研究について述べる。Kurauchi K. らは GFP 遺伝子を choriogenin H プロモーターの制御下においてメダカに導入した。環境中のエストロゲン様物質の濃度に応じて GFP の蛍光が測定された。この組換え魚の検知には GFP 遺伝子の配列を利用することが考えられる。

④-2. 「トランスジェニックニワトリと鶏卵」 医療での利用を期待できそうな生

理活性を持つ組換えタンパクが生産されている。例えば、Rapp J. C. らが 2003 年にヒトインターフェロン α -2b を、Kwon M. S. らが 2005 年にヒト顆粒球刺激因子を、Kodama D. らが 2008 年にヒトエリスロポエチンを生産するトランスジェニックニワトリあるいは鶏卵を作成した。鶏卵をバイオリクターにしたときの組換えタンパクの発現量は近年急速に増加しているようである。異なるタンパクの生産量を単純に比較することは適切ではないかもしれないが、Rapp J. C. らが 2003 年にヒトインターフェロン α -2b を発現させたときには鶏卵 1 個当たりの発現量は 120 μ g だったが、2005 年に Kamihira M. らがヒト抗プリオン可変部一本鎖抗体を生産させたときには鶏卵 1 個当たりの発現量は 150 mg になっていた。鶏卵における組換えタンパクの生産の技術に大きな進歩があることがうかがえる。上に述べた Kamihira M. らの研究では、ニワトリ胚への遺伝子導入法を工夫した。レトロウイルスを胚に顕微注入するタイミングを検討して、組換え抗体をニワトリ血清と卵中で 5.6 mg/ml の高濃度で生産させることに成功した。プロモーターの使用について興味を引かれた研究は、鶏卵中の全タンパクの半分以上を占めるオブアルブミンの遺伝子の 15 kb のプロモーターをこの遺伝子の 3' 側の配列とともに用いてヒトモノクローナル抗体を発現させたものがある。結果は組換えタンパクの分子数で考えると、サイトメガロウイルスプロモーターで組換えタンパクを発現させたときの 3-4 倍にまでしか発現量が増強しておらず、期待していたような結

果は得られなかったようである。以上で述べたトランスジェニックニワトリや鶏卵の検知には、導入した遺伝子の翻訳領域、ウイルスベクター、プロモーターの配列を利用することが考えられる。ニワトリの内在性の遺伝子に相同的な配列が存在するときには、導入遺伝子に固有な配列を選択する必要がある。

④-3. 「トランスジェニックブタ」 Revivicor 社のホームページを調査した。ブタの臓器をヒトに移植するときには、ブタの主要な移植抗原である 1,3 α -Gal を除去できれば、あるいはヒトの補体経路の活性化を阻害できれば急性免疫拒絶反応を避けられるかもしれないという発想でトランスジェニックブタの開発が行われている。2002 年には Revivicor 社で 1,3 α -Gal 遺伝子をダブルノックアウトしたブタが作成された。最近の研究報告を調べると、糖鎖の生合成経路を修飾して 1,3 α -Gal の発現量を低下させる目的で β -D-mannoside β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase II (GnT-III) 遺伝子が導入された研究が多数報告されている。また、ヒトの補体経路を抑制する human decay accelerating factor (hDAF) 遺伝子が導入された研究が多く、ヒトの補体経路の活性化を抑制する試みがなされている。これらの研究は Revivicor 社と同様な考えに基づいて行われているようだ。これらのトランスジェニックブタの検知には GnT-III 遺伝子あるいは hDAF 遺伝子、プロモーター配列を利用することが考えられる。なお、遺伝子導入の際には核酸のベクターは使用されないようであり、ベクターの配列を

検知のために利用することはできない。次に、バイオリクターとしてトランスジェニックブタの利用を試みた研究報告について述べる。報告数は少なく、2005 年に Naruse K. らが、2006 年に Kurome M. らがヒトアルブミンと EGFP を生産するトランスジェニックブタの作成を報告した。これらのトランスジェニックブタの検知にはヒトアルブミンまたは EGFP 遺伝子の配列を利用することが考えられる。

④-4. 「クローン家畜」 2006 年に GM ヤギで生産された antithrombin がバイオ医薬品としてヨーロッパで承認された。その他にも表 4 に示すようにクローン家畜によるバイオ医薬品が多く開発中である。これらは近い将来にバイオ医薬品としての承認が申請されると思われる。

⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

⑤-1. 「2005-2008 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況」 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 Jan. 22, 2008 を基に調査した、2005-2007 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場作付け状況において、薬用 GM 植物の圃場栽培は、2005 年においては 456.29 エーカーの栽培が認可され、実際には 82.00 エーカーに作付けされた。2006 年においては、799.00 エーカーの栽培が認

可され、実際には 181.64 エーカーに作付けされた。2007 年においては、ほぼ前年と同じ 811.08 エーカーの栽培が認可され、実際には 176.08 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、2005 年は認可面積の 18.0%、2006 年は認可面積の 22.7%、2007 年は認可面積の 21.7% である。経年の認可面積の増減は、2005 年から 2006 年は 1.75 倍の増加、2006 年から 2007 年は 1.02 倍の増加で、作付け面積の増減は、2005 年から 2006 年は 2.2 倍の増加、2006 年から 2007 年は 0.97 倍の減少であった。2008 年 1 月 22 日現在の 2008 年における薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外栽培許可状況において、2008 年は University of Minnesota、Ventria Bioscience、SemBioSys Genetics、Planet Biotechnology、Purdue Univ. の 3 社 2 大学が、トウモロコシ、イネ、ベニバナ、タバコ、ポプラの野外栽培を申請している。Planet Biotechnology 社のタバコは、2007 年に引き続いての申請であり（2007 年は作付けが行われていない）、生産物が明らかにされているが、他社の生産物の詳細は不明である。2008 年の野外圃場栽培申請を行っている Ventria Bioscience、SemBioSys Genetics、Planet Biotechnology の 3 社は、2007 年、2006 年の両年とも野外圃場栽培申請を行っている。両年に栽培された GM 植物のうち、イネ、オオムギ、トウモロコシ、が食用作物である。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、栽培されたが、2007 年では同社のヒトリゾチーム生産米の栽培計画面積がさらに拡大し、3000 エーカーまでの栽培が承認され作付けされた。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 Cellstin™、Lactomin™ 及び Lysobac™ として、InVitria 社から試薬として販売されている。また、組換えヒトラクトフェリンを、医療用として開発中である。同社のウェブサイトには、急性の下痢に苦しむ小児患者に対する試験の結果、同社の組換えヒトラクトフェリンを含む電解液を与えられたグループは、通常電解液を与えられた患者よりも約 1.5 日回復が早かったと報告されている。

⑤-2. 「2007 年に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等」文献情報 (SciFinder) で「transgenic plant」をキーワードに抽出された 2007 年の情報 (2007 年 12 月末現在) 及び 2007 年に開催された日本植物細胞分子生物学会講演要旨集から、薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を収集した結果を表 4-11 に示した。2007 年の論文等のカテゴリ別の件数は、機能性食品：15 件、食用ワクチン：6 件、食用医薬：5 件、ワクチン抗原：5 件、抗体医薬：2 件、治療薬：7 件、診断薬・試薬：3 件、環境浄化：11 件であった。

⑤-3. 「中国・台湾における薬用及び環境浄化用 GM 植物研究状況と組換え遺伝子カセットの構造」 農産物の貿易で日本と

の関わりが深い中国・台湾における薬用及び環境浄化用GM植物研究状況と組換え遺伝子カセットの構造を表12に示した。GM植物作出のほとんどは *Agrobacterium tumefaciens* を用いた方法がとられており、特に *A. tumefaciens* EHA105 がイネに、*A. tumefaciens* LBA4404 がアルファルファ、シロイヌナズナ、トマトに使用されている。新規機能を付与するための組換え遺伝子及びマーカー遺伝子とも、最も良く使用されているプロモーターは Cauliflower mosaic virus 35S promoter (35S pro) である。しかしイネでは、組換えタンパク質を効率よく種子に蓄積させるため、Rice specific glutelin promoter や maize ubiquitin (Ubi) promoter が用いられ、またトマトでは、トマト果実に組換えペプチドを蓄積させるため、fruit-specific promoter 2A11 が用いられている。ターミネーターは *Agrobacterium* 由来の Nopaline synthase terminator (NOS ter) の使用頻度が高い。

⑤-4. 「既知領域に隣接する未知領域の遺伝子情報の取得方法」 ゲノム DNA 上の既知（内在もしくは外来）配列に隣接する未知配列情報の取得に頻用されている inverse PCR 法及び adaptor-ligation PCR 法の概要を以下に記す。Inverse PCR (IPCR) 法：本法は、試料 DNA を適当な制限酵素で断片化し、自己閉環させた環状 DNA ライブラリーを作成、それを鋳型として、既知配列特異的なプライマーにより、未知領域方向へ PCR 増幅を行い既知配列に隣接する未知配列情報を取得するものである。Adaptor ligation PCR (Al-PCR) 法：本法は、試料 DNA を適当な制限酵素

で断片化し、adaptor を付加した adaptor 付加 DNA ライブラリーを作成し、これを鋳型として、アダプター特異的なプライマー、および既知配列特異的なプライマーで PCR 増幅を行い、既知配列に隣接する未知配列情報を取得するものである。

⑤-5. 「ケシのアグロバクテリウム由来 T-DNA 挿入型形質変異体の T-DNA 挿入部位、およびそのコピー数の解析」 ケシはモルヒネをはじめとするアヘンアルカロイド類を生産する重要な薬用植物のひとつである。ケシのアグロバクテリウム感染による T-DNA 挿入型形質変異体は花卉の形状の異常などの形態変異、ならびにアヘンアルカロイドの成分変異が認められた。これらの形質変異はアグロバクテリウム T-DNA のケシゲノム DNA への挿入に因るものと予想されたため、上述の未知領域の塩基配列取得法により、ケシのアグロバクテリウム由来 T-DNA 挿入型形質変異体の T-DNA 挿入部位近傍のゲノム DNA の塩基配列解析を行い、形質変異ケシに少なくとも 8ヶ所 (8 コピー) の T-DNA 挿入部位が存在することを明らかにした。以下にその概略を記す。In vitro 培養植物体の葉より DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を制限酵素、KpnI, EcoRV, PvuII, HaeIII でそれぞれ消化し、自己閉環ライゲーションさせ自己閉環ゲノム DNA ライブラリーとしてインバース PCR (IPCR) の鋳型に用いた。また、平滑末端を生じる EcoRV, PvuII, HaeIII で消化したものについては、アダプターを付加し、アダプター付加ゲノム DNA ライブラリーとしてアダプターライゲーション

PCR(A1-PCR) に用いた。IPCR は、Agrobacterium rhizogenes strain MAFF 03-01724 plasmid pRil724 の塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AP002 086) よりデザインした、T-DNA の 5' 側末端 (Left Border: LB) および 3' 側末端 (Right Border: RB) に特異的なプライマーを用い、T-DNA に接する配列未知のゲノム DNA 方向へ伸長反応を行い、T-DNA に接するケシゲノム DNA の増幅を行った。なお、PCR は特異性を上げる為 nested PCR により行った。特異的に増幅された PCR 産物はシーケンシングベクターにクローニングし、ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) による塩基配列解析に供した。また、A1-PCR においては、アダプター配列特異的なプライマーおよび上記の LB、RB 特異的プライマーを用い、T-DNA に接する配列未知のゲノム DNA 方向へ PCR を行い隣接ケシゲノム DNA の増幅を行った。なお、PCR(nested PCR) および塩基配列解析はインバース PCR 時と同様の手法で行った。IPCR および A1-PCR 法により、アグロバクテリウム T-DNA の LB と接するゲノム部分を含むクローン 4 種 (LB1-4)、そして T-DNA の RB およびそれに接するゲノム部分を含むクローン 6 種 (RB1-6) を得た。これらの配列情報からゲノム DNA 領域に特異的なプライマーを設計し、野生株ゲノム DNA を鋳型にして各ゲノム断片間で組み合わせを変えて PCR を行ったところ、LB1-RB2 および LB3-RB6 の 2 組で特異的な増幅が認められ、両断片は、同一 T-DNA 挿入部位の両端であることが明らかになった。以上の情報を総合し、本形質転換体 (T0)

には少なくとも 8ヶ所 (8 コピー) の独立した T-DNA 挿入部位が存在するものと結論された。なお、これらのケシゲノム DNA 上の挿入部位であるが、ORF の破壊などは起きておらず、現在のところ、アルカロイド含有量変異との相関は明らかにできていない。以上のように、IPCR または A1-PCR 法は、ケシのようにゲノム情報の少ない植物の試料においても、標的塩基配列の一部の情報が見られれば、それに近接する未知領域の遺伝子情報が得られることが判明した。従って、導入遺伝子の配列が未知の未認可 GM 作物へ導入された遺伝子の解析、および検知法の開発に有力なツールであると考えられる。

D. 考察

① 非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究 広範囲に渡る組換え遺伝子を複数同時に検出し、検出時間も短縮可能になった。さらに多検体同時に適応可能となれば、スクリーニング法として大変有用と考えられる。

② 産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究 微生物の組換えは、大腸菌に対する組換えが最も進んでおり、工業的にも生産に用いられている。本年度は、まず市販で入手可能な大腸菌用のベクターについて調べ、520 のベクターについて一覧表を作成した。一般的にはこれらの市販ベクターのパーツを組み合わせ、実用的なベクターや組換え体を作成しているものと思われる。マーカーとしては、ampicillin、kanamycin、chloramphenicol などが使いやすいことからこれらを利用したベクターが多かった。プロモーターは、lac、T7、SP6 など多種にわ

たって使われていた。これは、大腸菌で機能するものと、シャトルベクターとして他の生物や微生物で機能するものを用いているため、他種類となるものと思われる。ターミネーターについては、記載のないベクターが多かった。それ以外については、生産物を効率よく回収するためにタグを付けるものもあり、このような遺伝子配列を検出用に設定することも可能であると思われた。乳酸菌組換え用のベクターでは、宿主として *Lactobacillus* 属と *Lactococcus* 属用がほとんどで、これらの菌での GM が進んでいる。プロモーターやターミネーターの種類もそれほど多くない。マーカーでは、erythromycin を用いているものがほとんどで、chloramphenicol など使われていた。発現が良好であることから乳酸菌のマーカーとしては、erythromycin が実用的であるが、抗生物質耐性以外をマーカーとする試みも進んでいる。“国際環境および工業応用微生物会議”で発表されている多数の演題の中で、GM 微生物の実用化に関するものは確認できなかったが、自然界から分離された菌株を用いた試みについては、多数報告されていた。この中には、その浄化機能に関わる遺伝子の特定や評価に関する発表もあり、将来的にはこれらの遺伝子を利用する可能性は高いと思われた。

GM 微生物の定量的検知法に関し検討を開始した。リボゾーマル RNA を標的とした定量 real time PCR 法は、ターゲットとする遺伝子のコピー数が多いことから、検出感度を高く設定可能であることから、環境微生物や菌叢解析に用いられ始めて

いる。一方、対象とする遺伝子が RNA であることから、安定したデータが取れる試験法プロトコール作成が必要となる。本年度は、大腸菌を対象として、1 step RT-PCR と 2 step RT-PCR を行ったのち定量 PCR を行い評価したところ、実験毎検出感度が異なり、安定した結果はまだ得られていない。RNA から cDNA を安定的に作成する方法論が確立しないと、安定した評価が難しいと思われた。

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究 ③-1. 「可食性工業原料」植物における可食性工業原料生産のための GM 技術としては、主に 2 つの方向性がある。1 つは原料となる化合物の増量もしくは改質、2 つ目は化合物の量・質自体は変わらず、原料として収穫後の加工段階を容易にするための改変である。前者の一例として Wu らの研究が挙げられ、サトウキビにおいて isomaltulose は少量合成蓄積されているが、サトウキビ内のインベルターゼにより分解されることがないため蓄積が進むと考えられる。また Isomaltulose は虫歯になりにくく消化が遅いため、血糖値を上げにくい甘味料として日本でも用いられている。本国においては、これを還元した化合物を含む食品が特定保健用食品に指定されているが、sucrose と同様に glucose と fructose を含むため、fructose 代謝疾患のある人の甘味料には適していない。また改質することによって原料としての有用性を高める研究として、食品となる植物ではないがポプラにおけるリグニン合成抑制がある。改質のもう 1 つの例がバイオエタノール生産における低デンプン・高糖類蓄

積 GM 植物の作出である。Asatsuma の報告を考察すると、穀粒における糖蓄積そのものを増加させるために植物体が有する α -アミラーゼ遺伝子をそのまま導入してその酵素活性を増加させるだけでは、貯蔵デンプンの蓄積を抑制してしまい、結局バイオマス増加にはつながらないため、かえって効率が悪くなる可能性がある。これら化合物の蓄積量の増大やその改質は、GM 食品における第 2 世代である栄養改変型と考え方において類似したものであり、基本的に「食品」としての可食成分は同じであり、その安全性評価とリスク管理も第 2 世代の GM 食品と同様であると考えられる。しかし、栄養としてではなく、新たな工業原料成分として改変・付加する場合は、「C-2. 非食性工業原料」の項目に該当するものとなり、リスク管理において十分な注意が必要である。上述のように、GM 植物においてバイオエタノール生産を目指してアミラーゼを発現させて貯蔵デンプンを分解して糖として植物体に蓄積させる試みは成功していないが、バイオエタノールの効率的な生産のために、原料となる穀物植物に対し、2 つ目の方向性である収穫後の加工段階を容易にするための GM による改変の研究開発が活発に進められており、その研究開発の中心が微生物由来の耐熱性アミラーゼ遺伝子の導入であり、これが、Chiang らが行ったコメへの *Thermoanaerobacter ethanolicus* 由来耐熱性アミロプラーナーゼ遺伝子導入へと至る。植物の細胞壁にはセルロースのみならず、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンなどが沈着しているため、セルラーゼを発現さ

せただけでは細胞壁を分解させるには不十分ではあるが、今後さらにこれらを分解する耐熱性酵素遺伝子を追加導入することによって、収穫・粉碎後に高温処理するだけで簡単にセルロース分解物を生じるような GM 植物体が開発されてくる可能性がある。特に、このような植物は樹木ではなく、処理に困っている収穫後の農作物植物体の処理とその有効利用につながり、固定された CO₂ の完全利用につながるため、今後さらに食品原料、特に穀物植物において研究が進展すると考えられる。このようなタイプの GM 植物は宿主植物の代謝系に影響を与えることなく、加工に有用なタンパク質の発現を付加するという点において、リスクとしてはそのタンパク質の毒性およびアレルギー性について評価すべきと考えられることから、除草剤耐性や害虫抵抗性などに関わるタンパク質を付与した第 1 世代の GM 植物に類似のものと考えられる。その他、可食性工業原料植物において GM 技術が用いられるであろう方向性の 1 つは、原材料としての植物体の収穫量を増大させることが考えられる。このために植物体の成長を早める、あるいは大きくすることによって、収穫までの時間を早め、単位面積当たりの収穫量を上げる試みがなされている。しかし、これは未だ実験段階であるためここでは調査の対象外とした。また、第 1 世代の GM 農作物と同様に、害虫抵抗性、ウイルス抵抗性および除草剤耐性を付与することによって「減産」を無くすことも利用されるであろう。あるいは第 3 世代の GM 植物である環境抵抗性を付与することによって、耕作不適地

にも作付けできるGM植物を作出する試みもユウカリなどで行われている。しかしながら、現状において、第1世代および第3世代のGM食品である農作物が工業原料に転用される場合であっても、すでにGM食品としての安全性評価がなされたものでなければ利用できない。従って、これらはGM食品のリスク管理内に含まれるものである。

現在、枯渇しつつある石油の代替えとしてのエタノールをトウモロコシなどの穀物を原料として生産するため、その原料としての加工に最も適したGM植物が開発されている。しかし、さらに直接的に植物から工業利用に向けた油を生産させようとする試みが今後なされるものと考えられる。また、ナガミノアマナズナは石油代替油の原料の油種子として利用するために、GMが行われている。これは食用にならない油種子であるため、食品への混入は考えられない。しかし、人類は昔から植物油を食用とともに灯火用燃料として用いてきた。石油が使われるようになった後でも、第二次世界大戦中、カナダでは枯渇した石油の代わりにナタネ油を軍艦の蒸気機関の潤滑油として使用することを目的としてナタネが栽培された。このことから考えて、ナタネなどの食用として用いられている油種子植物の油の質（たとえば、より長鎖にする）とその組成をGMによって改変して工業原料に用いる試みがなされる可能性が考えられる。

③-2.「非食性工業原料」 葉緑体に PHB を大量に生産蓄積するGM体においても成長阻害が見られ、矮化や種子を作らないなどの問題が生じている。従って、実用

化に向けてはこの点の解決が必要とされる。また葉緑体ゲノムにこれら合成遺伝子を葉緑体内で発現するコンストラクトとして作成し、これを核ゲノムではなく葉緑体ゲノムに導入することも行われている。これは葉緑体ゲノムが母性遺伝し花粉には入らないため、環境中での遺伝子拡散がほとんどないという利点がある。今後、さらにこのような導入遺伝子を含んだ花粉が生じないというメリットを生かした葉緑体へのGM技術が進展し、これを利用した工業原料生産GM植物の開発が進められるであろう。以上のことから考えると、これら非食性工業原料用GM植物においては、それら化合物を合成するための新たな酵素タンパク質の付与がなされ、食経験のない化合物、ヒトが消化吸収できず栄養にならない化合物、あるいは化合物によってはヒトにとって毒性のある化合物をGM植物に合成させるものであり、食品への混入は認められないと考えられた。

④医薬品用遺伝子組み換え生物や再生医療用動物の調査研究 ④-1.「組換え魚」近年では鑑賞用の組換え魚が海外で市販されるまでに至った。これらについては、目視によって見分けることができるので、検知の問題はあまり困難になるとは考えられない。今後は組換え魚をバイオリアクターとしてあるいは環境モニタリングに利用するための研究、耐病性付与の研究の動向に着目する必要があるようだ。バイオリアクターとしての組換え魚の報告は少ない。導入した組換え遺伝子は次世代に伝わり、組換えタンパクも次世代でも発現するようである。しかし、組換

えタンパクの十分な発現量が得られたとの報告はなく、バイオリクターとしてはまだ実用レベルには達していないようである。しかし、有用物質を組換え魚で生産することは利点があり、今後の発展が予想される。本研究においても十分に調査をしたい。環境モニター用の組換え魚の報告が一報あった。しかし、その後の報告がなく、この研究が実用されるのかは不明である。組換え魚の検知の観点からプロモーターについて調べると、食用の組換え魚では中国の研究者が頻繁に利用するコイ β -アクチンや Aqua Bounty Technologies 社が発表している OP- AFP が注目に値する。一方で、非食用の組換え魚を作成するときには多様なプロモーターが使われており、検知のプライマーを設計するときには特定のプロモーターに限定して考えることは難しそうである。

④-2. 「トランスジェニックニワトリと鶏卵」 鶏卵で有用物質を生産させることは経済的な観点などからとても魅力があり、精力的に研究が行われてきた。遺伝子導入法やプロモーターの研究などが進んでいる。遺伝子導入の技術としては、ウイルスベクターを利用することが多かった。その背景は、哺乳類の胚に遺伝子を導入するときには前核に顕微注入することが広く行われてきたが、鶏卵では急速に細胞の数が多くなるために顕微注入は技術的に困難なためである。しかし、ウイルスベクターを利用して遺伝子を導入する場合には、そのベクターの安全性が完全に保証されていない、導入遺伝子が組み込まれるゲノム中の位置を指定できないなどの問題があり、現在でも未解

決である。今後、新しい遺伝子導入技術が開発されて、ウイルスベクターに取って代わる可能性が考えられる。プロモーターについては現在までの研究報告において様々なものを使用されている。トランスジェニックニワトリや鶏卵の検知のために特定のプロモーターに限定して考えることは難しそうである。プロモーターやその他の制御因子については組換えタンパクの発現量を上げることを目的に研究が行われており、新規なものが登場してくることが想定される。一方で、ニワトリ ES 細胞の研究も盛んに行われている。マウス ES 細胞で行われているようなジーントラップ法がニワトリ ES 細胞や生殖系幹細胞 (EG 細胞) でも可能になれば、遺伝子導入の技術が大きく進歩しそうである。ニワトリ ES 細胞についてはすでに報告がいくつかあるが、ニワトリ ES 細胞の培養法についてはまだ改良の余地が残っているらしい。最近の状況をインターネットで調査すると、広島大学大学院・生物圏科学研究科・生物機能開発学専攻・分子生命開発学講座・免疫生物学 (松田治男教授) のホームページに、「ニワトリ LIF (白血病阻害因子) を使用してニワトリ ES 細胞と EG 細胞を未分化のまま維持することに成功」、との記載がある。今後、ニワトリにおけるより洗練された遺伝子導入や修飾が可能になりそうである。このように、近年ではトランスジェニックニワトリの作成について様々な工夫が試みられている。鶏卵で組換えタンパクを大量に生産することが可能であり、後世代でも組換えタンパクの発現が持続する段階にまで至っている。現時点で鶏卵

におけるワクチン等の組換えタンパクの生産は技術的にほぼ可能になっているらしい。さらに、トランスジェニックニワトリや鶏卵の作成の研究は今後急速に発展しそうである。鶏卵の飼育や流通の管理、検知の体制を至急整備する必要があると思われる。

④-3. 「トランスジェニックブタ」 明治大学・農学部・生命化学科・発酵工学研究室（長嶋比呂志教授）のホームページや論文を調べた。精子ベクター法や体細胞核移植などの遺伝子導入やクローニングの技術が精力的に研究されている。試験管内で成熟させた卵母細胞に精子ベクター法で遺伝子を導入すると、コストと作業量が軽減できるが、まだ妊娠率が低いことが報告されている。また、精子ベクター法と体細胞核移植を組み合わせるとトランスジェニックブタが作成されている。この方法が確立されれば、大量のトランスジェニックブタを作成することが可能となる。また、最近では iPS 細胞の研究が非常に活発に行われている。その研究成果がトランスジェニックブタの開発にも応用されることが考えられる。このような技術の進歩によって近い将来にトランスジェニックブタの大量生産が可能となり、その検知の問題も重要になると考えられる。

④-4. 「クローン家畜」 開発中のクローン家畜が多くある。これらの大型動物については飼育や運搬などの管理が比較的容易であり、フードチェーンへの混入はあまり起きづらいと考えられる。万が一これらのクローン家畜がフードチェーンに混入したことが疑われて、その検知が

必要になった際には、上述したように組換え遺伝子に固有の配列を組み入れたプライマーを設計して PCR 法を利用することで対応できると考えられる。近年の非食用の組換え動物や魚の研究は非常に活発である。鑑賞用組換え魚が海外で市販されるようになった。鶏卵においては大量に組換えタンパクを生産させることが可能になった。またトランスジェニックブタを大量に作成する方法が検討されている。このような近年の状況下では、これらの非食用の組換え魚や動物を検知する方法を確立することが必要である。

⑤医薬品及び環境浄化目的のGM植物の調査研究 2007年12月末までの薬用及び環境浄化用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。野外部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。米国での薬用及び環境浄化用GM植物の野外部場作付け面積は、2006年から2007年にかけては増加が見られない。今後、この状況が維持されていくかどうかは、これからも注視していく必要があると思われる。世界のGM農作物の栽培面積は、確実に増加している。しかしながら、米国以外の国、特に最近、GM植物開発及び栽培が活発化している中国における野外部場栽培状況については公表されている資料が得られていない。如何に情報を入手していくかが今後の課題である。2007年に公表・出版された薬用及び環境浄化GM植物に関する論文等をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品：15件、食用ワクチン：6件、食用医薬：5件、ワクチン抗原：5件、抗体医薬：2件、治

療薬：7件、診断薬・試薬：3件、環境浄化：11件であり、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品、環境浄化の開発が盛んである状況が伺えた。中国・台湾での研究については、さらに詳細に論文を調べ、組換え植物作出方法及び組換え遺伝子カセット構造を調べた。プロモーターは Cauliflower mosaic virus 35S promoter (35S pro) が、ターミネーターは Nopaline synthase terminator (NOS ter) の使用頻度が多いが、作物により、特異的なプロモーターが用いられている場合や、生産物の蓄積を高めたり、翻訳効率を改善するため、組換え遺伝子に様々な配列が付加されている例もあった。今後、新規のプロモーター、ターミネーターによる発現システムが使用されるケースも増加すると予想され、GM 植物により産生される生産物やその機能の情報だけでなく、検知法開発の手がかりとするための配列情報の取得が益々重要になって行くものと思われる。未知領域の塩基配列解析法として、IPCR 法及び A1-PCR 法をケシ形質転換体に適応した結果、ゲノム情報の少ないケシにおいても T-DNA 近傍部位の配列情報が得られ、得られた情報を基に設計したプライマーを用いたケシ特定ゲノムの増幅が可能であった。従って、これらの方法は未知の未認可 GM 作物へ導入された遺伝子の解析、および検知法の開発に有力なツールであると考えられる。

E. 結論

①非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究 組換え遺伝子が検知された検体について、各内在

性遺伝子(トウモロコシ、ダイズ、コメ等)の有無をさらに確認し、非食品 GM か GM 食品由来を絞っていくことでより信頼性の高い検知が期待される。

②産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究 非食用バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。本年度は情報収集により、市販の大腸菌用 GM ベクターと研究用に利用されている乳酸菌用 GM ベクターについてまとめ一覧表を作成した。環境浄化に微生物を用いる研究が進んでいることから、スペインで開催された“国際環境および工業応用微生物会議”に参加し、この分野の情報収集を行った。GM 微生物の定量的検知法に関し検討を開始した。

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究 工業原料用途に用いられる GM 植物は可食性工業原料と非食性工業原料の生産に分類される。可食性工業原料用 GM 植物は、食経験のある糖など、植物がそもそも合成している化合物の蓄積量を増大させ、あるいは改質させ、より工業原料としての優良品性を高める開発と、収穫した後の加工特性を向上させるための開発、たとえば耐熱性分解酵素遺伝子などを導入する開発の 2 つの方向性があることが明らかになった。前者は化合物の量・質の改変であることから、これまでの GM 植物のカテゴリーとして栄養改変・付加型の第 2 世代の GM 植物に類似のものと考えられる。また後者は新たな酵素タンパク質の発現を付加するものであり、リスクとしてはそのタンパク質の毒性・アレルギー性が考えられ、除草剤