

乳酸菌組換えベクター

番号	区分	導入遺伝子	宿主乳酸菌	機能・特徴	研究・開発国	文献	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考
83					オランダ・TNO	Pouwels et al. (1996) The potential of Lactobacillus as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for						
84					ドイツ・Institut für Lebensmitteltechnologie	Obst et al. (1995) Two genes encoding the beta-galactosidase of Lactobacillus sake. Microbiology, 141:3059-						
85					スロバキア・Comenius University	Grones and Turna. (1995) Transformation of microorganisms with the plasmid vector with the replicon from pAC1 from Acetobacter pasteurianus. Biochem Biophys Res Commun.		pACK5, pACT72				
86					ドイツ・Institut für Lebensmitteltechnologie	Hemme et al. (1994) Expression of Lactobacillus casei ATCC 393 beta-galactosidase encoded by plasmid pLZ15 in Lactococcus lactis. J. Appl. Microbiol. 19:345-8.		pLZ15				
87		chitinase gene from Serratia marcescens	Lactococcus lactis and Lactobacillus plantarum		ノルウェー・Agricultural University of Norway	Brurberg et al. (1994) Expression of a chitinase gene from Serratia marcescens in Lactococcus lactis and Lactobacillus plantarum. Appl. Microbiol.		pMG36e, pGKV259, pIL253	p32, p59			
88		beta-glucuronidase gene (gusA)			オランダ・Netherlands Institute for Dairy Research (NIZO)	Platteau et al. (1994) Use of the Escherichia coli beta-glucuronidase (gusA) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 60:587-93. Erratum in: Appl. Environ. Microbiol.		pNZ272	lacA, usp45, a promoter from bacteriophage phi SK11G			
89		manganese superoxide dismutase	Lactococcus lactis and Lactobacillus gasserii		アメリカ・North Carolina State University	Roy et al. (1993) Cloning and expression of the manganese superoxide dismutase gene of Escherichia coli in Lactococcus lactis and Lactobacillus gasserii. Mol. Gen. Genet.		pMG36e				

乳酸菌組換えベクター

番号	区分	導入遺伝子	宿主乳酸菌	機能・特徴	研究・開発国	文献	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考
90		conjugated bile acid hydrolase	Lactobacillus plantarum 80		ベルギー・University of Ghent	Christiaens et al. (1992) Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from Lactobacillus plantarum by using a direct plate assay. Appl Environ Microbiol. 59:1179-82.		pOBH1				
91		kata	Lactobacillus casei		ドイツ・Universität Hohenheim	Knauf et al. (1992) Cloning, sequence, and phenotypic expression of kata, which encodes the catalase of Lactobacillus sake. Appl Environ Microbiol. 58:1467-71.		pGKV210				
92		lyso-staphin	Lactobacillus casei 102S		西ドイツ・Universität Hohenheim	Gaier et al. (1992) Cloning and expression of the lyso-staphin gene in Bacillus subtilis and Lactobacillus casei. Lett Appl Microbiol. 15:105-8.						
93		beta-galactosidase	L. helveticus SBT2195		日本・雪印乳業	Hashiba et al. (1992) Establishment of a host-vector system in Lactobacillus helveticus with beta-galactosidase activity as a selection marker. Biosci Biotechnol Biochem. 56:105-8.		pBG10				
94		beta-glucanase	Lactobacillus helveticus strain CNRZ450		イギリス・Department of Agriculture for Northern Ireland	Thompson and Collins (1991) Molecular cloning in Lactobacillus helveticus by plasmid pSA3::pVA797 co-integrate formation and conjugal transfer. Appl Microbiol Biotechnol. 15:105-8.		pSA3, pVA797				
95					アメリカ・North Carolina State University	Muriana and Klaenhammer (1991) Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by Lactobacillus spp. J Bacteriol. 173:1779-88.		pTRK160, pTRK162				
96					フィンランド・Genesit Oy	Sibakov et al. (1991) Secretion of TEM beta-lactamase with signal sequences isolated from the chromosome of Lactococcus lactis subsp. lactis. Appl Environ Microbiol. 57:105-8.		pNS2				

乳酸菌組換えベクター

番号	区分	導入遺伝子	宿主乳酸菌	機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考
97		alpha-amy/lase			イギリス・Cranfield Institute of Technology	Jones and Warner (1990) Cloning and expression of alpha-amy/lase from Bacillus amyloliquefaciens in a stable plasmid vector in Lactobacillus plantarum. Lett. Appl. Microbiol.					
98		lipase	Lactobacillus curvatus Lc2-c		西ドイツ・Hohenheim University	Vogel et al. (1990) Expression of the lipase gene from Staphylococcus hyicus in Lactobacillus curvatus Lc2-c. FEMS Microbiol Lett. 57:289-300	pLipSI				
99			Lactobacillus plantarum CCM 1904		フランス・Université Louis-Pasteur	Bringei et al. (1989) Characterization, cloning, curing, and distribution in lactic acid bacteria of pLPI, a plasmid from Lactobacillus plantarum CCM 1904 and its use in shuttle vector construction. Plasmid.	pLPI				
100			Leuconostoc paramesent eroides		オランダ・Netherlands Institute for Dairy Research (NIZO)	David et al. (1989) Plasmid transformation by electroporation of Leuconostoc paramesent eroides and its use in molecular cloning. Appl Environ Microbiol. 55:1483-9.	pNZ12				

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

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。そこで、これら工業原料生産を意図して作出された遺伝子組換え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させたり改質することによって、より工業原料としての優良性を高める開発と、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世代の遺伝子組換え植物に類似し、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世代の遺伝子組換え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遺伝子組換え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。

A. 研究目的

植物遺伝子組換えの研究は1983年にZambryskiらが世界で初めて報告したタバコへの遺伝子組換えの研究にはじまり、その後、様々な植物に有用遺伝子を導入し、新しい植物種を作り出してきた。以来、様々な種類・用途の遺伝子組換え植物が作出されてきており、これらを導入した遺伝子の特性ごとに分けると、主に第1世代から第3世代の3つに分類される。第1世代は、農業生産性に役立つ特性を付与された遺伝子組換え植物であり、例えば害虫抵抗性、ウイルス抵抗性、除草剤耐性などの特性を付与した遺伝子組換え作物であり、すでにこれら特性を有した多くの遺伝子組換え農作物が食品としての安全性評価および生物多様性影響評価がなされて商業生産され、食卓に上っている。第2世代は、栄養改変・栄養付加型遺伝子組換え植物であり、もともとの植物が有していた栄養機能の強化や新たな機能性の付与が行われたものであり、すでに高オレイン酸ダイズや高リシン・トウモロコシが実用化され商業栽培されている。さらに第3世代として、地球環境の温暖化による乾燥地や塩害地の増大に伴う耕作可能地の減少に対し、そのような土地でも生育する環境抵抗性の遺伝子組換え植物の開発が進められている。

一方、これとは別に石油資源の枯渇化によるプラスチック原材料の先行き不安とともに、そ

の廃棄処理のために、遺伝子組換え植物を利用して生分解性プラスチック原料を生産しようとする研究開発が行われている。このような生分解性プラスチックは遺伝子組換え植物が固定したCO<sub>2</sub>から合成され、さらに微生物分解によってCO<sub>2</sub>として発散しても、植物が固定したCO<sub>2</sub>からの発散ということでトータル・バランスから見て大気中のCO<sub>2</sub>量を増加させることがない。さらにCO<sub>2</sub>排出量の低下を目指して、石油燃料の利用ではなく、植物がCO<sub>2</sub>固定して作った糖やデンプンからエタノールを合成し、これを石油代替燃料にする、いわゆるバイオエタノールの生産が進められている。このバイオエタノール生産の効率をさらに増進することを意図した遺伝子組換え植物が作出されている。実際にこれを主目的とした耐熱性アミラーゼを遺伝子導入したトウモロコシの商業栽培が始められようとしている。これらは食品として開発されたものではなく工業原料用として開発されたものであるため、これらが圃場において花粉媒介によって食品としての農作物の中に混入する、あるいは流通の過程において誤って混入する恐れがあり、食品の安全性を確保するためには、これらの混入を阻止しなければならない。

ここでポイントとなるのは、遺伝子組換え植物で生産される「工業原料」が、食品として食されているもの（例えばエタノール、糖、油）

を大量生産させる、あるいは改質させてこれを工業原料に用いる場合か、それとも食品ではない化合物を植物に生産させてこれを工業原料に用いる場合か、すなわち「可食性工業原料」と「非食性工業原料」に分類することである。後者の場合は、これまでヒトが食品として食した経験のないものであるから、これが食品となる遺伝子組換え食品（農作物）に混入する可能性のある場合には、食品への非食品の混入であることから厳しいリスク管理が必要となる。また、前者においても、既存の食品に含まれていた成分であったとしても、既存の食品と比較して原料とする化合物の生産含有量や質が遺伝子組換えの結果として大幅に改変されている可能性が高い。この場合、それら化合物を既存の食品とは異なった量・質で食することになり、既存の食経験のある食品とは異なった食品としての安全性を評価する必要とともに、それに見合ったリスク管理が必要とされる。特に、遺伝子組換えによって代謝系のフローなどを改変した場合、宿主の非組換え遺伝子植物の代謝フローに大きな影響をもたらす可能性があり、これによって、有害生理活性物質の量の増大や質の変化を引き起こす可能性があり、これらがヒトの健康を損なう可能性は否定できない。

そこで、当研究においては、現在、開発されている工業原料用遺伝子組換え植物について、可食性工業原料と非食性工業原料に分けて、それらについて実験植物の段階からの情報を収集・整理すること、特に用いられている導入遺伝子のみならず、プロモーターおよびターミネーターについてもリストアップすることによって、これら工業原料用遺伝子組換え植物が食品の中に混入しているかどうかを検知するためのデータベースとして資することを目的とした。

## B. 研究方法

### <方法>

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調べ、これらをカテゴリー別に分類して表とした。

### （倫理面への配慮）

本研究は、論文や報告書等のインターネット上に公開された文字データを利用するものであるため、倫理上の問題はない。

## C. 研究結果と考察

### C-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遺伝子組換え技術としては、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倍収穫できる遺伝子組換えサトウキビを作出した (Wu et al. Plant Biotechnol. J. 5: 109-117 (2007))。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。さらに Wu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、全体として非遺伝子組換え体に比べ、約2倍量の糖の蓄積に成功した。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。日本においては、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。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% 減少し、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 (Hu et al. Nature Biotechnol. 17: 808 - 812 (1999))、木質系セルロースの有効活用のために有用な手法であると考えられている。

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・高糖類蓄積遺伝子組換え植物の作出である。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  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を導入した場合、細胞質での発現がみられ、葉緑体移行シグナルを結合させた  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え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))。このため、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  $\alpha$ -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、遺伝子組換え食品における第 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 世代の遺伝子組換え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、遺伝子組換え植物において

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ようとす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遺伝子組換え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る。Chiang らは、コメに *Thermoanaerobacter ethanolicus* 由来の耐熱性アミロプル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°C のため、植物体が成長している間は活性は低く、貯蔵デンプンの蓄積を抑制せず、これを収穫して破碎し、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・粉碎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 *Acidothermus cellulolyticus* 由来のセルラーゼ、endo-1,4- $\beta$ -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 タンパク質が発現し合成され apoplast に蓄積していること、しかしその遺伝子組換え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))。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遺伝子組換え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 CO<sub>2</sub> 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遺伝子組換え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ゲン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 世代の遺伝子組換え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遺伝子組換え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が、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 世代の遺伝子組換え農作物と同様に、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 世代の遺伝子組換え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遺伝子組換え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、現状において、第 1 世代および第 3 世代の遺伝子組換え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、すでに遺伝子組換え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ため、遺伝子組換え食品のリスク管理内に含まれるものである。

上述のように、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遺伝子組換え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。表 1. にあるように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、遺伝子組換えが行われている。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）とその組成を遺伝子組換え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。

#### C-2. 非食性工業原料

現在、遺伝子組換え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遺伝子組換え植物は、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遺伝子組換え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、 $\beta$ -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 プロモーターを結合して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、その合成蓄積量は乾燥重量で 0.1% であり、また、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。このため、より高い PHB の合成生産量を求めるため、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% にまで上昇させるのに成功した (Nawrath et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12760-12764 (1994); Bohbert et al. Planta 211: 841-845 (2000))。しかし、葉緑体に PHB を大量に生産蓄積する遺伝子組換え体においても、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おり、実用化に向けては、この点の解決が必要とされている。

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。Nakashita らはタバコを用いて、PHA オペロン (PhaCBA) を plastidial rRNA operon promoter (*prrn*) 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おいて蓄積させるため、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))。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遺伝子組換え技術が進展し、これを利用した工業原料生産遺伝子組換え植物の開発がさらに進められることと考えられる。

以上のことから考えると、これら非食性工業原料用遺伝子組換え植物においては、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、ヒトが消化吸收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遺伝子組換え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。

#### D. 結論

工業原料用途に用いられる遺伝子組換え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。可食性工業原料用遺伝子組換え植物は、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、これまでの遺伝子組換え植物のカテゴリーとして栄養改変・付加型の第 2 世代の遺伝子組換え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 世代の遺伝子組換え植物に類似のものと考えられる。ただし、後者において、加工の際に非遺伝子組換え植物とは大きな違いが生じることから、これらが食品の中に混



入した場合、加工特性が大きく変わる可能性が考えられる。一方、非食性工業原料用遺伝子組換え植物においては、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、消化吸収できない化合物、ヒトの健康を害するような可能性のある化合物などを遺伝子組換え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る。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 2. 学会発表

佐々木和生、梅津博紀、太田大策、名古屋博之、佐々木伸大、小関良宏「遺伝子組換え体の安全性評価へのポストゲノム手法の応用  
1. プロファイリング技術による遺伝子組換え魚の非意図的影響の評価」日本食品化学学会第13回学術大会、東京、2007年6月。

#### G. 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

表 1. 可食性工業原料用遺伝子組換え植物。

生物種(宿主)	組換えた遺伝子(由来)	組換えたコンストラクト				発表者名	参考文献(発表学会名、URL など)	用途
		プロモーター	ターミネーター	マーカー	プラスミド			
イネ ( <i>Oryza sativa</i> )	APU ( <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 由来)	GluB-1	Tnos	HPH	pGpApu, pGppApu	Academia Sinica	Mol. Breed. (2005) 15, 125-143	Biomass conversion
イネ ( <i>Oryza sativa</i> )	APU ( <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 由来)	$\alpha$ Amy3	$\alpha$ Amy3	HPH	pA3Apu	Academia Sinica	Mol. Breed. (2005) 15, 125-143	Biomass conversion
イネ ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Nipponbare)	$\alpha$ Amy1,4 ( <i>Oryza sativa</i> 由来)	35S			pZH2B-35S-Amy1-1	Niigata University	J. Appl. Glycosci. (2006) 53, 187-192	Biomass conversion (アミラーゼを植物体に行わせる)
イネ ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Nipponbare)	pinA and pinB ( <i>Triticum aestivum</i> 由来)	Maize Ubi-1	Tnos	hygromycin B phosphotransferase	pLITAB22, pUbiPinA, pUbiPinB	Konduru Krishnamurthy & Michael J. Giroux	Nature Biotechnology (2001) 19, 162 - 166	Biomass conversion (コメの品質改良、軟らかくする)
ウキクサ ( <i>Lemna minor</i> 8627)	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pCel25IX	North Carolina State University 他	Bioresource Technol. (2007) 98, 2866-2872	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
オオムギ ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise)	cel-hyb1	<i>GluB-1</i>	<i>GluB-1</i> ターミネーター	HPH	GCel-hyb1G	CSIRO Plant Industry	Plant Cell Rep. (2003) 21, 1088-1094	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
オオムギ ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Kymppi)	Glucanase ( <i>Trichoderma reesei</i> 由来)	$\alpha$ Amy	$\alpha$ Amy	bar	pKAH80	Biotechnology and Food Research 他	Plant Mol. Biol. (1999) 41, 777-783	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
サトウキビ <i>Saccharum</i> ssp.	sucrose isomerase ( <i>Pantoea dispersa</i> UQ68J 由来)	Maize Ubi-1	Tnos		pEmuKN	University of Queensland	Plant Biotechnology Journal (2007) 5, 109-117	Biomass conversion (糖を従来の2倍作らせる)
ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	Mac	Tmas	NPT II	pPMT4-5	Pacific Northwest National Laboratory	Molecular Breeding (2000) 6, 277-285	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	RbcS-3C	T7-T5	NPT II	pPMT4-5	Pacific Northwest National Laboratory	Molecular Breeding (2000) 6, 277-285	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	35S	Tnos	GFP	pMZ766-E1cat	University of Colorado 他	Molecular Breeding (2000) 6, 37-46	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	Mac	Tmas	NPT II	pPMT4-5	Pacific Northwest National Laboratory	Molecular Breeding (2000) 6, 277-285	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	RbcS-3C	T7-T5	NPT II	pPMT4-5	Pacific Northwest National Laboratory	Molecular Breeding (2000) 6, 277-285	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	$\alpha$ Amy3 ( <i>Oryza sativa</i> 由来)	35S	Tnos		pBK- $\alpha$ Amy3	Academia Sinica	Plant Physiology (2004), 135, 1367-1377	Biomass conversion (アミラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II		University of Wisconsin-Madison	Molecular Breeding (2001) 8, 147-158	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	RbcS-3C	T7-T5	NPT II	pZD276	Pacific Northwest National Laboratory	Transgenic Res. (2000) 9, 43-54	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	E1	University of Chicago	Plant Mol. Biol. (2003) 51, 493-507	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Petit Havana SR1)	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	Mac	Tmas		Mm	Pacific Northwest National Laboratory	Transgenic Res. (2005) 14, 627-643	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Petit Havana SR1)	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	RbcS-3C	T7/T5		Re-chI	Pacific Northwest National Laboratory	Transgenic Res. (2005) 14, 627-643	Biomass conversion (セルラーゼを植物体に行わせる)
トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> )	Glucanase ( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 由来)	35S	Tnos	bar	pMZ766, pDM302, pBY520	Michigan state Univ	Plant Sci. (2006) 171, 617-623	Biomass conversion
ナガミノアマナズナ ( <i>Camelina sativa</i> )	$\Delta$ 12-Fatty acid hydroxylase ( <i>FAH12</i> )	pPHAS, pCVMV	T35	DsRed	pGDP-FAH12	Montana State University	Plant Cell Report (2008) 27, 273-278	Fatty acid 合成
ポプラ ( <i>Populus tremuloides</i> Michx.)	4CL ( <i>Populus tremuloides</i> 由来)	35S	T35	HPH		Michigan Technological University 他	Nature Biotechnology (1999) 17, 808 - 812	Biomass conversion (高セルロース・低リグニン樹木の開発)
ポプラ ( <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> )	COMT ( <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> 由来)	35S	T35	HPH	p35 <sup>2</sup> SOMT	Institut National de la Recherche Agronomique 他	Plant Physiol. (2000) 123, 1363-1373.	Biomass conversion (高セルロース・低リグニン樹木の開発)

表 2. 非食性工業原料用遺伝子組換え植物

生物種(宿主)	組換えた遺伝子(由来)	組換えたコンストラクト				発表者名	参考文献(発表学会名、URL など)	用途
		プロモーター	ターミネーター	マーカ	プラスミド			
アマ ( <i>Linum usitatissimum</i> )	phbA ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	14-3-3 プロモーター	Tnos	NPT II	pBI121	University of Wrocław	Journal of Biotechnology (2004) 107, 41-54	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
アマ ( <i>Linum usitatissimum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S, 14-3-3 プロモーター	Tnos	HPH	pBI121	University of Wrocław	Plant Biotechnology Journal (2005) 3, 249-258	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
アマ ( <i>Linum usitatissimum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBinARHyg	University of Wrocław	Plant Biotechnology Journal (2005) 3, 249-258	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
イネ ( <i>Oryza sativa</i> )	phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II, HPH	pBI121Hm-b, c	大成建設株式会社	平成14年度 NEDO 工業原料生産技術の研究開発成果報告書	Biodegradable polymer (セルロースとPHBの新規な天然複合系素材の創出)
ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> )	cyanophycin synthetase ( <i>Thermosynochococcus elongatus</i> BP-1 由来)	35S	T35	NPT II	p35ScphA	Agrobiotechnologie, Universität Rostock 他	Plant Biotechnology Journal (2005) 3, 249-258	Biodegradable polymer (polyaspartateの原料cyanophycinを合成)
ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S, Pnos	Tnos, Tocs,pA	HPH	pBinARHygrpABC	Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie	Plant Physiology, April 2002, Vol. 128, pp. 1282-1290	Biodegradable polymer (PHB生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbB, phbC ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBI121	Michigan State University 他	Science (1992) 256, 520-523	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbB, phbC ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II, HPH	pBI121, pBIB-Hyg	Carnegie Institution of Washington 他	International Journal of Biological Macromolecules (1995) 17, 7-12	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBI121	Carnegie Institution of Washington	Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 12760-12764	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBI ABC	Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie 他	Planta (2000) 211: 841-845	Biodegradable polymer (PHB 生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来), ilvA ( <i>Escherichia coli</i> 由来)	35S	E9	EPSPS, NPT II	pMON258 12, pMON256 78	Monsanto Company	Nature Biotechnology (1999) 17, 1011 - 1016	Biodegradable polymer (PHBV生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来), phbC ( <i>Nocardia corallina</i> 由来), ilvA ( <i>Escherichia coli</i> 由来)	35S	E9	EPSPS, NPT II	pMON258 12, pMON257 40	Monsanto Company	Nature Biotechnology 17, 1011 - 1016 (1999)	Biodegradable polymer (PHBV生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来), 変異型 ilvA466 ( <i>Escherichia coli</i> 由来)	35S	E9	EPSPS, NPT II	pMON258 01, pMON256 78	Monsanto Company	Nature Biotechnology 17, 1011 - 1016 (1999)	Biodegradable polymer (PHBV生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来), phbC ( <i>Nocardia corallina</i> 由来), 変異型 ilvA466 ( <i>Escherichia coli</i> 由来)	35S	E9	EPSPS, NPT II	pMON258 01, pMON257 40	Monsanto Company	Nature Biotechnology 17, 1011 - 1016 (1999)	Biodegradable polymer (PHBV生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S, Pnos	Tnos, Tocs,pA	HPH	pBinARHygrpABC	Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie	Plant Physiology, April 2002, Vol. 128, pp. 1282-1290	Biodegradable polymer (PHB生産)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	PhaC1 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来)	35S	OCS		C-PHA	Universite de Lausanne	Plant Physiology (1999), 121, 1359-1366	Biodegradable polymer (Medium-Chain-Length Fatty Acidsの合成)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	PhaC1 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来)	NAPIN	OCS		N-PHA	Universite de Lausanne	Plant Physiology (1999), 121, 1359-1366	Biodegradable polymer (Medium-Chain-Length Fatty Acidsの合成)
シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	FatB3 ( <i>Cuphea lanceolata</i> 由来)	NAPIN	OCS		N-FatB3	Universite de Lausanne	Plant Physiology (1999), 121, 1359-1366	Biodegradable polymer (Medium-Chain-Length Fatty Acidsの合成)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	phbB, phbC ( <i>Aeromonas caviae</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBI121	RIKEN	Biosci. Biotechnol. Biochem. (1999) 63, 870-874	Biodegradable polymer (polyhydroxybutyrate (PHB)の合成)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	cyanophycin synthetase ( <i>Thermosynochococcus elongatus</i> BP-1 由来)	35S	T35	NPT II	p35ScphA	Agrobiotechnologie, Universität Rostock 他	Plant Biotechnology Journal (2005) 3, 249-258	Biodegradable polymer (polyaspartateの原料cyanophycinを合

表 2. 非食性工業原料用遺伝子組換え植物 (続き)

生物種(宿主)	組換えた遺伝子(由来)	組換えたコンストラクト				発表者名	参考文献(発表学会名, URL など)	用途
		プロモーター	ターミネーター	マーカ	プラスミド			
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Aeromonas caviae</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBM205E	RIKEN	RIKEN Rev. (2001), 42, 67-70.	Biodegradable polymer (タバコ細胞質でのPHA 生産)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	phaCac ( <i>Aeromonas caviae</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBM225	RIKEN	RIKEN Rev. (2001), 42, 67-70.	Biodegradable polymer (PHA production exploiting $\beta$ -oxidation in peroxisome)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	psbA	<i>Ralstonia eutropha</i> 由来ターミネーター	aadA	pKCZ	Ludwig-Maximilians-Universit	Plant Cell Rep (2003) 21, 891-899	Biodegradable polymer (PHB生産)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S	Tnos, Tocs.pA	HPH	pBinARHy gprABC	Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie	Plant Physiology (2002) 128, 1282-1290	Biodegradable polymer (PHB生産)
タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	Prrn	TpsbA	aadA	pPT06	RIKEN	Plant Cell Physiol. (2004) 45, 1176-1184	Biodegradable polymer (polyhydroxybutylate (PHB)の合成)
タマリクス ( <i>Tamarix chinensis</i> )	phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S	Nos	NPT II, HPH, GFP		大成建設株式会社	平成14年度 NEDO 工業原料生産技術の研究開発成果報告書	Biodegradable polymer (セルロースとPHBの新規天然複合系素材の創出)
テンサイ( <i>Beta vulgaris</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBI ABC	Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung	Appl Microbiol Biotechnol (2003) 60, 571-576	Biodegradable polymer (PHB 生産)
トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> )	phbB, phbC ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> 由来)	35S	Tnos	NPT II	pBI121	University of Minnesota	Biotechnology Progress (1997) 13, 347-354	Biodegradable polymer (polyhydroxybutylate (PHB)の合成)
ナタネ ( <i>Brassica napus</i> )	phbA, phbB, phbC ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来)	P-Lh	SE9	EPSPS	pMON368 14	Monsanto Company	Planta (1999) 209, 547-550	Biodegradable polymer Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) 合成
ナタネ ( <i>Brassica napus</i> )	phbA, phbB ( <i>Ralstonia eutropha</i> 由来), phbC ( <i>Nocardia corallina</i> 由来), 変異型 iivA466 ( <i>Escherichia coli</i> 由来)	35S	E9	EPSPS, Km	pMON368 24	Monsanto Company	Nature Biotechnology 17, 1011 - 1016 (1999)	Biodegradable polymer (PHBV生産)
ワタ ( <i>Gossypium spp.</i> )	phbB, phbC ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> 由来)	FbL2A (phbB) 35S (phbC)	Tnos	GUS	pBCSK+	Green University	Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 12768-12773	ワタの繊維特異的にPHBを合成させ、繊維の品質を向上させた

略号:

phbA,  $\beta$ -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,  $\beta$ -glucuronidase; EPSPS, enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase; bar, Bialaphos resistant gene; GFP, Green Fluorescent Protein; Spe, Spectinomycin resistance gene glucanase, endo-1,4- $\beta$ -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

非食用遺伝子組み換え魚と動物に関する文献調査

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

研究要旨

バイオテクノロジーを応用して作成された非食用組換え動物や魚が多数報告されている。そこで、これらの組換え動物の混入を防止する目的で検知する方法を確立することは非常に重要である。本年度は組換え魚、ニワトリと鶏卵、ブタを中心にして研究の状況を調査した。組換え魚については海外で組換え観賞魚が市販されるようになった。また、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できるようになった。鶏卵においてワクチン等の組換えタンパクを生産させることは技術的にほぼ可能になっていることが判明した。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。近い将来に大量のトランスジェニックブタが生産可能になると推定された。

このような状況下においては、組換え魚や動物の飼育や流通の管理の方法を検討し、さらに組換え体の検知の体制を至急整える必要があると考えられた。

協力研究者

中島治 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部 主任研究官

A. 研究目的

近年ではバイオテクノロジーを応用して組換え動物や魚などが多数作成されている。これらの組換え動物や魚がフードチェーンに混入してしまうことが懸念される。このような混入に備えて、組換え体を検知する方法を作成することは非常に有益である。本研究は非食用に開発された組換え動物や魚を対象を絞ってその検知法を作成することを目的とする。検知の方法は、組換え遺伝子に固有の配列をプライマーに組み込んでPCR法を適用することを考えている。組換え体からはPCR法によって期待される大きさの増幅DNA断片が得られるが、一方で非組換え体

からはそれが得られないので、組換え体と非組換え体を判別することができる。

今回は組換え魚、トランスジェニックニワトリと鶏卵、クローンブタを中心に研究開発状況を調査した。組換え魚やトランスジェニックニワトリと鶏卵については飼育や流通に厳重な管理を施さないと食品に混入してしまう懸念がある。クローンブタは臓器移植を目的に急速に研究が進んでいる。本年度ではこれらの組換え体の研究開発状況やその検知のために必要な情報収集を行った。

B. 研究方法

情報収集は文献データベースやインターネット等を用いて行った。

C. 研究結果

(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。その研究報告を表1にまとめた。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。中国の研究者からは次の報告があった。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増強されていた。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。以下は中国以外の国の状況である。まず、観賞用の組換え魚の情報について述べる。Zeng Z.らは2005年にメダカにgreen fluorescent protein (GFP)遺伝子を導入した研究を報告した。Gong Z.らは2003年に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た。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調べた。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いる。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を持っている。しかし、組換えタンパ

クを商業的に利用することについての特許の問題がまだ解決できていない。また、アメリカの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](http://mongaby.com/external/glowing_fish.htm))。Yorktown Technologies社がGlofishを開発している。Glofishはアメリカで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 (<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。

(2) トランスジェニックニワトリと鶏卵 トランスジェニックニワトリと鶏卵をバイオリクターとして利用して有用物質を生産させた報告を表 2 にまとめた。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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b を発現させたときには鶏卵 1 個当たりの発現量は 120  $\mu$ 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。最近の研究報告の中から興味を引かれた二例を以下に挙げる。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 (参考文献 1)、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。

(3) トランスジェニックブタ トランスジェニックブタの研究報告を表 3 にまとめた。トランスジェニックブタは臓器移植用、バイオリクターとしての利用が考えられている。まず、臓器移植用の研究状況について述べる。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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -Gal の発現量を低下させる目的で  $\beta$ -D-mannoside  $\beta$ -1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III (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、バイオリア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)クローン家畜 クローン家畜によるバイオ医薬品の開発状況を表4にまとめた(ファルマシア2007年10月号から転載)。2006年に遺伝子組換えヤギで生産された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。

#### D. 考察

(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、バイオリア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(参考文献3)、

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 $\beta$ -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。

(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増え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（参考文献2）、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。（参考文献4）。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。

(3)トランスジェニックブタ 明治大学・農学部・生命化学科・発生工学研究室（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)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。

#### 参考文献

- (1) Ivarie R. Competitive Bioreactor Hens on the Horizon. (2006) TRENDS in Biotechnology 24 (3) 99-101
- (2) Ivarie R. Avian Transgenesis: Progress towards the Promise (2003)

- TRENDS in Biotechnology 21 (1) 14-19
- (3) Hwang G. et.al. Fish as Bioreactors: Transgene Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos. (2004) Mar. Biotechnol. 6 485-92
- (4) 堀内浩幸ら ニワトリにおける抗体エンジニアリングとトランスジェニックテクノロジー (2006) Foods Food Ingredients J. Jpn. 211 (11) 948-954
- 485-492
- (6) Yazawa R. et.al. (2006) Transgenic Zebrafish Expressing Chicken Lysozyme Show Resistance against Bacterial Diseases. Transgenic Res. 15 (3) 385-391
- (7) Sarmasik A. et.al. (2002) Production of Transgenic Medaka with Increased Resistance to Bacterial Pathogens. Mar. Biotechnol. 4 (3) 310-322
- (8) Hew C.L. et.al. (1995) Transgenic Salmon: Tailoring the Genome for Food Production. J. Fish Biol. 1995 47 (Suppl. A) 1-19
- (9) Kurauchi K. et.al. (2005) In Vivo Visual Reporter System for Detection of Estrogen-Like Substance by Transgenic Medaka Environmental Sci. Technol. 39 2762-69

#### 表1の文献

- (1) Zhong J. et.al. (2002) Introduction of the Human Lactoferrin Gene into Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to Increase Resistance against GCH Virus. Aquaculture 214: 93-101
- (2) Zeng Z. et.al. (2005) Faithful Expression of Living Color Reporter Genes in Transgenic Medaka under Two Tissue Specific Promoters. Developmental Dynamics 234: 387-392
- (3) Gong Z. et.al. (2003) Development of Transgenic Fish for Ornamental and Bioreactor by Strong Expression of Fluorescent Proteins in the Skeletal Muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 308 (1) 58-63
- (4) Pohajdak B et.al. (2004) Production of Transgenic Tilapia with Brockmann Bodies Secreting 【desThrB30】 Human Insulin. Transgenic Res. 13 (4) 313-23
- (5) Hwang G. et.al. (2004) Fish as Bioreactors: Transgenic Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos. Mar. Biotechnol. 6 (5)
- 表2の文献
- (10) Kwon MS et.al. (2008) Generation of Transgenic Chickens That Produces Bioactive Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor. Mol. Reprod. Dev.
- (11) Kodama D. et. al. (2008) Production of human erythropoietin by chimeric chickens. Biochem. Biophys. Res. Commun.
- (12) Lee SH et.al. (2007) Development of Transgenic Chickens Expressing Human Parathormone under the Control of a Ubiquitous Promoter by Using a Retrovirus Vector System. Poult Sci. 86 (10) 2221-7

- (13) Koo BC et.al. (2006) Production of Germline Transgenic Chickens Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein Using a MoMLV-Based Retrovirus Vector. FASEB J. 20, 2251-60
- (14) Kamihira M. (2005) High-Level Expression of Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein in Serum and Egg White of Genetically Manipulated Chickens by Using a Retroviral Vector. J. Virol. 79 (17) 10864-74
- (15) Mozdziak PE et.al. (2003) Development of Transgenic Chickens Expressing Bacterial Beta-Galactosidase. Dev. Dyn. 226 (3) 439-45
- (16) Rapp JC et.al. (2003) Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. Transgenic Res. 12 (5) 569-75
- (17) Harvey AJ et.al. (2003) Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. Poult Sci. 82 (6) 927-30
- (18) Zhu L. et.al. (2005) Production of Human Monoclonal Antibody in Eggs of Chimeric Chickens. Nat. Biotechnol. 23 (9) 1159-69
- (20) Murakmai H. (2002) Transgenic Pigs Expressing Human Decay-Accelerating Factor Regulated by Porcine MCP Gene Promoter. Mol. Reprod. Dev. 61 (3) 302-11
- (21) Fujimura T. et.al. (2004) Cloning of the Transgenic Pigs Expressing Human Decay Accelerating Factor and N-Acetylglucosaminyltransferase III. Cloning Stem Cells 6 (3) 294-301
- (22) Takahagi Y. et.al. (2005) Production of Alpha 1,3-Galactosyltransferase Gene Knockout Pigs Expressing Both Human Decay-Accelerating Factor and N-Acetylglucosaminyltransferase III. Mol Reprod Dev. 71 (3) 331-8
- (23) Naruse K. et.al. (2005) Production of a Transgenic Pig Expressing Human Albumin and Enhanced Green Fluorescent Protein. J. Reprod. Dev. 51 (4) 539-546
- (24) Kurome M. et.al. (2006) Production of Transgenic-Clone Pigs by the Combination of ICSI-Mediated Gene Transfer with Somatic Cell Nuclear Transfer. Transgenic Res. 15 229-240

#### 表3の文献

- (19) Miyagawa S. (2001) Remodeling of the Major Pig Xenoantigen by N-Acetylglucosaminyltransferase III in Transgenic Pig. J. Biol. Chem. 276 (42) 39310-19

区分	導入遺伝子	魚の種類	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
中国の研究	ヒトラクトフェリン	ソウギヨ	GCHウイルスへの耐性が強化された。	中国	リニアールにしたプラスミドと精子を混合してエレクトロポレーションした。この精子と卵を人工的に受精させた。	pUC118	コイβ-アクトチンプロモーター		なし		
観賞魚用	GFP	メダカ	蛍光を発する魚を作成した。	シンガポール Univ. Singapore			myl2プロモーター、krt8プロモーター			研究用としても論じられている。	2
	GFP, YFP, RFP	ゼブラフィッシュ	3色の蛍光を発する魚を作成した。蛍光タンパクは筋肉のタンパクの3-17%を占めた。メンデル型の遺伝をした。	シンガポール National Univ. Singapore	リニアールにしたプラスミドを1, 2細胞期の胚に顕微注入した。	pEGFP-1, pEYF-1, pdsRed-1 (Clontech 社)	内在性myl2プロモーター	SV40由来ポリ(A)シグナル	GFP, YFP, RFP	ハイオリアクターとしても論じられている。	3
バイオリアクター用	ヒト化したインシュリン	ティラピア	F1世代の血清とβ細胞でヒトインシュリンを検出した。		受精卵に顕微注入した。	なし	内在性インシュリンプロモーター	内在性インシュリンター	なし		4
	ヒト血液凝固因子VII	ゼブラフィッシュ, アフリカナマズ, ティラピア	医療で利用価値が高いヒトタンパクを魚の胚で生産させた。	イギリス Univ. Southampton	胚に顕微注入した。		サイトメガロウイルスプロモーター、エンハンサー	0.12 kbのSV40ポリ(A)シグナル配列			5
	ニフトリ卵白リゾチーム、GFP	ゼブラフィッシュ	リゾチームmRNAの発現は肝臓と皮膚で確認された。リゾチームタンパクは肝臓で検出された。組換え魚は病原菌に対する耐性が強化された。	日本 海洋大	受精卵に顕微注入した。	プラスミド pEGF-1 (Clontech 社)	日本ヒラメ(カレイ)ケラチン遺伝子プロモーター		GFP		6
耐病性付与	cecropin	メダカ	抗微生物活性をもつペプチドを生産させた。F2世代にも組換え遺伝子が伝わり、組換え魚はバクテリアに対する耐性が強化された。	アメリカ Univ. Connecticut	受精直後の卵にエレクトロポレーションを行った。	プラスミド pRC/CMV (5.5 kb, Invitrogen 社)	サイトメガロウイルスプロモーター		なし		7
低温耐性の試み	antifreezeペプチド (AFP)	大西洋サケ	AFPの前駆体が血清中で検出された。	カナダ Univ. Toronto	リニアールにしたプラスミドを受精卵に顕微注入した。	プラスミド pUC-9	AFP遺伝子プロモーター	AFP遺伝子ターミネーター	なし		8
環境モニタリング用	GFP	メダカ	GFP蛍光強度とエストロゲン濃度 (~40 nM) の間に比例関係があった。エストロゲン様物質を検出する新しい技術である。	日本 京都市大			chorionengin Hプロモーター				9

表 1. 組換え魚の研究報告