

- 明, 増田 税, 田林紀子, 松村 健. 植物ウイルスベクターによる抗ダイオキシン単鎖抗体の発現、第26回日本植物細胞分子生物学会大阪大会・シンポジウム(2008.9.1-2)講演要旨集 p171.
65. Unnisa, Syeda Azeem; Seshabala, P.; Reddy, P. Chandra Sekhar. Synergistic use of transgenic plant to remediate the soil. *Pollution Research* (2008), 27(2), 269-272.
66. Fluhr, Robert; Sagi, Moshe. Control of sulfur dioxide metabolism in transgenic plants expressing sulfite oxidase (SO) and bioremediation, monitoring and anti-poisoning uses. *PCT Int. Appl.* (2008), 88pp. CODEN: PIXXD2 WO 2008093326 A2 20080807 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2008-IL79 20080117. Priority: US 2007-898103 20070130. CAN 149:262760 AN 2008:943768
67. Gaxiola, Roberto A.; Fink, Gerald R.; Alper, Seth L. Vacuolar pyrophosphatase (AVP1)-overexpressing salt-tolerant transgenic plants with increased orthophosphate uptake. *U.S. Pat. Appl. Publ.* (2008), 44pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 119,683. CODEN: USXXCO US 2008104733 A1 20080501 Patent written in English. Application: US 2007-890795 20070807. Priority: US 99-164808 19991110; US 2000-644039 20000822; US 2001-834998 20010413; US 2005-119683 20050502. CAN 148:445178 AN 2008:526722
68. Ma, Chen Feng; Sato, Kazuhiro. Cloning of cDNA for the MATE transporter protein associated with the resistance to aluminum from barley. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2008), 22pp. CODEN: JKXXAF JP 2008220308 A 20080925 Patent written in Japanese. Application: JP 2007-65630 20070314. Priority: CAN 149:348760 AN 2008:1150843
69. Parkash, Om. Construction of metal-resistant transgenic plants transformed with plant arsenate reductase and microbial phytochelatin biosynthetic enzymes. *PCT Int. Appl.* (2008), 60pp. CODEN: PIXXD2 WO 2008103350 A1 20080828 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in

- English. Application: WO 2008-US2181  
20080220. Priority: US 2007-890730  
20070220. CAN 149:300715 AN  
2008:1042734
70. Tamura, Hideo; Mizuno, Takafumi.  
Buckwheat gene for preparation of  
transgenic plant resistant to heavy metal.  
Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2008), 26pp.  
CODEN: JKXXAF JP 2008220368 A  
20080925 Patent written in Japanese.  
Application: JP 2008-33062 20080214.  
Priority: JP 2007-34901 20070215. CAN  
149:351384 AN 2008:1150937
71. Hirai, Hirofumi; Kashima, Yoshiyuki;  
Hayashi, Katsuma; Sugiura, Tatsuki;  
Yamagishi, Kenji; Kawagishi, Hirokazu;  
Nishida, Tomoaki. Efficient expression of  
laccase gene from white-rot fungus  
*Schizophyllum commune* in a transgenic  
tobacco plant. FEMS Microbiology Letters  
(2008), 286(1), 130-135.
72. Chen, Limei; Yu, Yongxiong; Li, Kunzhi;  
Liu, Diqiu; Hu, Qingquan; Zhao, Yue.  
Application of specific recombinant plant  
expression vector Ppzp211-Prbcs-cs  
incorporating citrate synthase. Faming  
Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu  
(2008), 23pp. CODEN: CNXXEV CN  
101265479 A 20080917 Patent written  
in Chinese. Application: CN  
2007-10066419 20071205. Priority: CAN  
149:395614 AN 2008:1136865
73. Hussein HS, Ruiz ON, Terry N, Daniell H.  
Phytoremediation of mercury and  
organomercurials in chloroplast transgenic  
plants: enhanced root uptake, translocation  
to shoots, and volatilization. Environ Sci  
Technol. 2007 Dec 15;41(24):8439-46.
74. Zhang, Yong; Zhao, Lihong; Wang, Yao; Yang,  
Baoyu; Chen, Shiyun. Enhancement of heavy  
metal accumulation by tissue specific  
co-expression of *iaaM* and ACC deaminase  
genes in plants. Chemosphere (2008), 72(4),  
564-571.



図1. 薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け状況 (2005-2008) <sup>1)</sup>

表1. 薬用及び環境浄化用 GM 植物- 米国野外圃場栽培申請・認可状況 2009 年 (Jan. 16, 2009 まで)

企業等	作物	生産物	州	審査状況	作付け状況
Applied Biotechnology Institute	トウモロコシ	不明	カリフォルニア	審査中	完了
Ventria Bioscience	イネ	ラクトフェリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミン	バージン諸島	承認	完了
		ラクトフェリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミン	カンザス	承認	未完了
		不明	カンザス	審査中	完了
SemBioSya Genetics	ベニバナ	不明	ノースカロライナ	審査中	完了
		不明	ワシントン	審査中	完了
Washington State University	オオムギ	不明	ワシントン	承認	未完了
University of Washington	ハコヤナギ属	チトクロームP450 2E1 (ラビット由来)	ワシントン	承認	完了
Purdue Univ.	ポプラ	チトクロームP450 2E1	インディアナ	承認	未完了

表2. 薬用及び環境浄化用 GM 植物- 米国野外圃場栽培申請・認可状況 2008 年

企業等	作物	生産物	州	審査状況	作付け状況
Ventria Bioscience	イネ	ラクトフェリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミン	ノースカロライナ (>100エーカー)	承認	完了
		ラクトフェリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミン、社外秘	ノースカロライナ (<10エーカー)	承認	完了
		ヒトラクトフェリン、ヒトリゾチーム、ヒト血清アルブミン	カンザス (<3, 200エーカー)	承認	完了
SemBioSya Genetics	ベニバナ	不明2件	ノースカロライナ	申請取下	完了
		社外秘	ワシントン (<250エーカー)	承認	完了
		ヒトプロインシュリン	ワシントン (<1エーカー)	承認	未完了
Planet Biotechnology	タバコ	抗虫菌菌抗体	ケンタッキー (<100エーカー)	承認	未完了
Kentucky BioProcessing	タバコ (TMV)	ウシ肺由来アプロチニン	ケンタッキー (2.0エーカー)	承認	未完了
Iowa State University	トウモロコシ	大腸菌熱毒性腸管毒素Bサブユニット(試用)	アイオワ (0.25エーカー)	承認	完了
University of Minnesota	トウモロコシ	不明	ミネソタ	申請取下	完了
Purdue University	ポプラ	チトクロームP450 2E1	インディアナ (1.35エーカー)	承認	未完了
		不明	インディアナ	申請取下	完了
University of Washington	ハコヤナギ属	チトクロームP450 2E1	ワシントン	承認	完了



表 3. 2008-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等  
(機能性食品・嗜好品)

区分	導入遺伝子	作物	生産物・機能及び特徴等	研究・開発国	文献
機能性食品	ミラクリン	トマト	ミラクリン (糖尿病およびメタボリックシンドローム予防) : ミラクリン発現トマトを T6 まで世代促進し、遺伝的に安定して発現することを確認。また、さらに発現量増加が期待できる新規プロモーター、ターミネーターを得、さらなる増産を実施中。植物工場における高収量栽培技術、トマト果実からのミラクリン抽出・精製法の確立も実施。	日・筑波大学&植物物質情報センター&インプラントイノベーションズ	2, 3
機能性食品	ゴマ由来 CYP81Q 遺伝子+PLR 遺伝子 RNAi、	レンギョウ	セサミン: ゴマ由来 CYP81Q 遺伝子および PLR 遺伝子 RNAi 配列を挿入した発現ベクターをシロイヌナズナに導入し、CYP81Q の発現と PLR の発現抑制を確認し、同ベクターをレンギョウ葉に導入し、培養細胞を樹立。この培養細胞におけるセサミン生産を確認。	日・サントリー&大阪大学	4
機能性食品	ニコチンアミン合成酵素 (NAS1)	イネ	種子中のニコチンアミン、鉄、亜鉛含量増加: 種子特異的プロモーター、Nos ターミネーター制御下で、NAS1 遺伝子をイネに導入したところ、種子中の鉄、亜鉛、ニコチンアミン含量が増加した。	中・ Zhejiang University	5
機能性食品	ソルガム Δ カフィリン 2 タンパク質、サトウキビ Δ プロラミン 2 タンパク質、ソルガムリジンケトグルタレートレダクターゼ (LKR) 遺伝子の利用により、穀物または種子中のタンパク質を変化させることが出来、消化性向上、栄養向上、アミノ酸含量増加を行うことが出来る。 protein, and the amino acid sequences so encoded. Methods of using such sequences are also provided.	穀類	ソルガム Δ カフィリン 2 タンパク質、サトウキビ Δ プロラミン 2 タンパク質、ソルガムリジンケトグルタレートレダクターゼ (LKR) 遺伝子の利用により、穀物または種子中のタンパク質を変化させることが出来、消化性向上、栄養向上、アミノ酸含量増加を行うことが出来る。 protein, and the amino acid sequences so encoded. Methods of using such sequences are also provided.	米・Pioneer Hi-Bred International	6
機能性食品	Leuconostoc mesenteroides (乳酸菌の 1 種) アルタナンスクラーゼ	コムギ	多糖アルタナンの合成	独・ Bayer Cropsience	7
機能性食品	ミオイノシトール酸素添加酵素 (MIOX)、グルクロン酸還元酵素 (GlcUAR)、L-グルノノ-1,4-ラクトン酸化酵素 (GLOssa)	シロイヌナズナ、クレソン、ハルザキヤマガラシ	ビタミン C (L-アスコルビン酸) 含量の増加: ビタミン C 合成酵素 (イノシトール経路) を過剰発現させたシロイヌナズナは、野生型植物の 2-3 倍のビタミン C を含有し、様々な環境ストレス (塩、低温、高温、メチルビオロゲン) に対し、耐性を示し、また、トリクロロエチレン、ピレン、多環芳香族炭化水素等の環境汚染物質に対しても耐性を示し、地上部および地下部の生育量も増加した	米・ Arkansas State University	8
機能性食品	シロイヌナズナ液胞カルシウム逆輸送体, Cation exchanger 1 (CAX1)	ニンジン	高カルシウム: 骨粗鬆症予防、マウスおよびヒトに CAX1 ニンジンを摂取させコントロールと比較した結果、いずれにおいても CAX1 の方がカルシウム吸収率が高いことを確認	米・ Texas A&M University	9
機能性食品	Δ 9 伸長酵素 (Eulgena gracilis)、Δ 8 不飽和酵素 (Tetruetretia poniquetensis、Pavlova lutheri)、Δ 5 不飽和酵素 (Mortierella alpina)、Δ 15 不飽和酵素/ω3 不飽和酵素 (fad3) (soybean)	油糧作物	アラキドン酸	米・不明	10
機能性食品	ラッカセイ主要アレルゲンタンパク質 (Ara h1、Ara h2、Ara h3) RNAi	ラッカセイ	アレルゲンタンパク質の除去: 形質転換ラッカセイ種子中の Ara h1、Ara h2、Ara h3 の低下または除去率は、それぞれ、9%、10%、16%であり、3%の種子はこれら 3 種のアレルゲンを含有しなかった。IgE 結合能を調べた結果、Ara h フリー種子は、野生型に	米・ Alabama A&M University	11

			比べて著しく結合能が低下した。		
機能的食品	シロイヌナズナ H+/Ca2+ 輸送体 (sCAX1)	レタス	カルシウム含量増加:細胞分裂サイクル (cdc2a) プロモーターあるいは CaMV35S プロモーター制御下で輸送体遺伝子を導入したレタス葉では、コントロールに比べカルシウム含量が25%増加したが、レタスの生育および収量に変化はなかった。	米・Kansas State University	12
機能的嗜好品	チトクローム p450 遺伝子発現抑制	タバコ	タバコ中の nornicotine およびその発がん性代謝物である N'-nitrosonornicotine (NNN)を低下させ、喫煙および二次喫煙による発ガンリスクの低下	米・North Carolina State University, USA; University of Kentucky Research Foundation	13
機能的食品	トウモロコシデンブ分岐酵素 (sbe2b) アンチセンス	トウモロコシ	高アミロースデンブ:アミロペクチン合成を抑制し、アミロース含量増加のため、花粉管法により、トウモロコシデンブ分岐酵素 (sbe2b) アンチセンスをトウモロコシに導入。GM トウモロコシでは、デンブ分岐酵素の活性が低下し、アミロース含量が顕著に増加。T1 世代でのアミロース含量は、2.2-24.9%に増加し、最大 59.4%に増加。アンチセンスは、分離比 3:1 でほとんどの T2 世代植物に遺伝したが、一部 15:1 の分離比を示すものもあった。	吉林農薬大学・中	14
機能的食品	カロテノイド代謝関連遺伝子 7 種	ナタネ	アスタキサンチン:微生物で既に同定されているカロテノイド代謝関連遺伝子 7 種のそれぞれに種子特異的発現用プロモーター、RubisCo 小サブユニット由来トランジットベプチド配列、ターミネーターを連結した遺伝子カセットを作製し、さらに多重遺伝子連結技術により、これらのカセットを連結した発現プラスミドを構築。これを用いてナタネの形質転換を行い、種子中の総カロテノイド量が非形質転換体に対して 19-30 倍に増加し、アスタキサンチン等のケト基を有するカロテノイドが検出された。	日・キリン&かずさ DNA 研&石川県立大学	15

表 4. 2008-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等 (経口ワクチン及び食用医薬)

区分	導入遺伝子	作物	生産物・機能及び特徴等	研究・開発国	文献
経口ワクチン	コレラ毒素 B 鎖 (CTB)	イネ	グルテリンプロモーター、グロブリンプロモーター、プロラミンプロモーターの 3 種のプロモーターを連結した CTB 遺伝子をイネに導入し、胚乳部分での蓄積量を調査した結果、グルテリンプロモーターを用いたイネで 1.5-2.3mg/g の生産量が確認できた。ヒトでは米約 1g/回でワクチン効果が期待できる	日・日本製紙&農業生物資源研究所 & ロート製薬&東京大学	16, 17
経口ワクチン	インフルエンザウイルスヘマグロチン HA1+CTB	イネ	グルテリンプロモーターを用い、インフルエンザウイルス H1N1 pR8 株抗原 HA と CTB を連結したワクチン抗原 CTB-HA1 をイネに導入。米での発現量 0.1mg/g に成功。	日・日本製紙&農業生物資源研究所 & ロート製薬&東京大学	16, 17
経口ワクチン	Mannheimia haemolytica A1 (牛呼吸器病:パストレラ性肺炎の原因菌) GS60 (54) (外膜リポタンパク質) 抗原	アルファルファ	Mannheimia haemolytica A1 (牛呼吸器病:パストレラ性肺炎の原因菌) 感染予防、少し短くした GS60 抗原 (GS54) を生産。乾燥植物中の抗原は、室温で 1 年以上安定、植物で生産した抗原をウサギへ注射すると免疫反応を示し、経口投与すると血清反応が認められた	加・University of Guelph	18
経口ワクチン	腸毒素産生性大腸菌線毛末端タンパク質	植物	腸毒素産生性大腸菌感染によるブタ胃腸炎の予防	韓	19
経口ワクチン	コレラトキシン B サブユニット-HIV-1 gp41 膜近位融合タンパク質 (CTB-MPR649-684)	タバコ	GM タバコで発現させた融合タンパク質は、5 量体に構成され、GM1 ガングリオシド結合型であり、高マンノース型の N 型糖鎖が結合していた。このタンパク質は、免疫原性と GM1 ガングリオシド結合能を示し、マウス投与で粘膜および液性免疫を誘導した。	米・Arizona State University	20
経口ワクチン	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	抗下痢剤、免疫賦活剤、5 年間の野外圃場試験で明らかになった環境影響評価結果と低レベルのこのコーンの暴露が引き起	米・Iowa State University	21

			コオリスクアセメントについて、ヒト健康影響と生態系の面から報告		
経口ワクチン	腸管出血性大腸菌 Escherichia coli O157:H7 インチミン (intimin 付着因子)	トマト	2種のプラスミドを用いて、トマトにインチミン遺伝子(カルボキシル基末端 261 アミノ酸残基: int261)を導入。1つは、小胞体移行のためのシグナルペプチドを結合したもの、もう1つはシグナルペプチドを結合していないもの。タバコでは、シグナルペプチドを含むコンストラクトで導入すると、発現量は上昇するものの、int261に糖鎖が付加され、免疫原性が変化した。しかし、トマトではシグナルペプチドの付加によりint261の発現量は10倍に増加するが、糖鎖は付加されなかった。得られたint261生産トマト果実を凍結乾燥し、ELISAで最も含量が高かった(1g トマト果実当たり1mgのint261)ものは、マウスを用いた動物実験に使用予定である。	米・Arizona State University	22
経口ワクチン	マラリアメロゾイト表面タンパク質抗原 (MSP-1, MSP-2, MSP-3)	トマト	5種のトマト品種の中から、最も再分化効率の高い2種を選んで形質転換法を最適化し、様々なライフサイクルのマラリア原虫の抗原遺伝子をトマトに導入し、トマト果実での抗原発現を調べた	米・Claflin University	23
経口ワクチン	腸管出血性大腸菌毒素 B サブユニット (Stx2eB)	レタス	小胞体蓄積型 Stx2eB 発現プラスミドを有するアグロバクテリウムをレタス子葉に感染させ、Stx2eB を生産するレタスを得た。多数のクローン個体を作出し、植物工場内のパネルへ定植した。	日・奈良県農業総合センター	24
経口ワクチン	腸管出血性大腸菌毒素 B サブユニット (Stx2eB)	レタス、タバコ培養細胞	ワクチン抗原生産量向上のため、翻訳エンハンサーの利用、Stx2eB のタンデム連結、シグナルペプチド連結、HA タグおよび小胞体残留シグナル (HDEL) の連結、Stx2eB 間への Pro 残基を含むスパーサー (PG12) の挿入等を検討した結果、Stx2eB 間のスパーサーの長さやアミノ酸配列が、2×2Stx2eB の蓄積レベル向上の重要なファクターであることが明らかとなった。	日・出光興産	25
経口ワクチン	B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) + ヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1) ポリエピトープ	タバコ、シロイヌナズナ	ヒト化マウスへ粗エキスを経口投与した結果、抹消リンパ節および脾臓において、抗 HIV 活性特異的な CD8+ T 細胞の誘導を確認	仏・Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)、伊・Università degli Studi di Milano	26
経口ワクチン	トリインフルエンザウイルス (AIV H5N1) ヘマグルチニン	ミヤコグサ	トリインフルエンザワクチン	中・Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing	27
経口ワクチン	高病原性トリインフルエンザウイルス (HPAI) ヘマグルチニン (HA) および核タンパク質 (NP)	ジャガイモ	HA, NP 抗原を抗原活性を維持したまま発現する GM ジャガイモを作出。葉での発現量は、HA 1-2 μg/g, NP 5-6 μg/g	日・北里大学&産総研	28
経口ワクチン	コレラトキシン B サブユニット (CTB)+小胞体保留シグナル (SEKDEL)	ニンジン	アグロバクテリウム形質転換でニンジン根にコレラトキシン B サブユニットを発現。不定胚誘導により、6ヶ月の培養で、14の GM ニンジン植物体を得。植物中の sCTB タンパク質は、低重合体あるいは5量体として存在し、GM1 ガングリオシドに対し、強い結合性を有していた。sCTB の発現レベルは、ニンジン根の可溶性タンパク質の48%であった。	韓・全北大学校	29



食用医薬	ヒトアディポネクチン	イチゴ	ヒトアディポネクチン: CaMV35S プロモーター制御による形質転換により、イチゴ果実において 200ng/g 以上の生産量を示すイチゴが得られた。	日・北海三共&産総研&北海道大学 & 藤田保健衛生大学	30
食用医薬	ウシ $\alpha$ ラクトアルブミン	イチゴ	ウシ $\alpha$ ラクトアルブミン: CaMV35S プロモーターおよびストロバリーベインバンディングウイルス (SVBV) より新たに探索した花托高発現プロモーター (SV10) 制御によるイチゴ形質転換を行い、SV10 系統で果実中の生産量 200ng/g 以上の系統が得られた。	日・北海三共&産総研&北海道大学 & 藤田保健衛生大学	30
食用医薬	ヒトチオレドキシシン 1 (hTRX1)	レタス (葉緑体)	ヒトチオレドキシシン 1 (ストレス・炎症・アレルギー抑制): 葉緑体形質転換ベクターを用い、コドン非改変型およびコドン改変型 hTRX1 をレタス葉緑体ゲノムに導入し、コドン非改変型の導入においても可溶性タンパク質の約 3% を占める hTRX1 生産を確認。	日・奈良先端大学 & 近畿大学 & 京都大学 & 大阪府立大学 & 三洋電機 & レドックスバイオサイエンス & 植物ハイテック研究所	31

表 5. 2008-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等 (ワクチン抗原及び抗体医薬)

区分	導入遺伝子	作物	生産物・機能及び特徴等	研究・開発国	文献
ワクチン抗原	鶏ニューカッスル病ウイルス抗原エピトープ+ロイシンジッパー構造	タバコ (ウイルスベクター)	鶏ニューカッスル病ウイルスワクチン: ウイルスベクターをタバコに混合接種し、抗原分子と免疫増強成分が発現し、ロイシンジッパー (補体との結合のため) により会合していることを確認	日・ホクレン & 北海道大学 & 産総研	32
ワクチン抗原	高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV16) E7 タンパク質 (HPV 16E7)	イネ	子宮頸癌予防ワクチン: イネ種子中で HPV 16E7 を発現させるため、2 種のコンストラクトで導入した。1 つはイネ貯蔵タンパク質のグルテリン 1 (Glt1) の小胞体シグナルペプチドに E7 を連結させたもの、もう 1 つはプロテインボディに E7 を移行させるため、イネレクチンの C 末端プロペプチド (CTPP) を利用したものである。いずれもプロモーターはイネグルテリン 1 プロモーターを用い、発現カセットはタンパク質精製のための 6x-His tag と FXa プロテアーゼ認識部位を含んでいる。イネ種子で生産した E7 タンパク質のウエスタン解析の結果、CTPP シグナルを E7 のカルボキシル基末端に付けるとイネ種子のプロテインボディに E7 タンパク質が移行するが、プロテアーゼで切断されにくくなることが判明した。	米・Arkansas State University	33
ワクチン抗原	ベスト菌 F1-V 抗原-ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 gp41 膜近位タンパク質 (MPR649-684)	植物	ベストワクチン: F1-V-MPR649-684 融合タンパク質をウイルスを用いた一過的発現システムで植物に生産させた。	米・Arizona State University	34
ワクチン抗原	抗エボラウイルスグライコプロテイン 1 (GP1) 単クローン抗体-GP1 融合タンパク質	タバコ	免疫複合体 (抗原-抗体複合物) は、体液性免疫、細胞性免疫の両方を活性化することが出来る。免疫複合体のワクチン効果を調べるため、タバコで抗エボラウイルス GP1 単クローン抗体-GP1 融合タンパク質をさせた。	米・Arizona State University	35
ワクチン抗原	B 型肝炎表面抗原 (HBsAg)	タバコ (ウイルスベクター)	マウスへの投与で抗体産生を確認	米・Arizona State University	36
ワクチン抗原	ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 gp41 膜近位タンパク質 (MPR649-684)	タバコ (ウイルスベクター)	エイズサブユニットワクチン: MPR649-684 単独では免疫原性はないため、B 型肝炎ウイルス外核タンパク質と gp41 を融合させ、ウイルス発現ベクターをタバコ葉に感染させたところ、全可溶性タンパク質の 2% の融合タンパク質生産が確認された。MPR-HBc 融合タンパク質はウイルス様粒子を形成し、その粗精製物をマウスの鼻腔内に投与したところ、MPR に対する強い体液性免疫が誘導された。	米・Arizona State University	37
ワクチン抗原	ヒト免疫不全ウイルス HIV-1	タバコ (TMV)	エイズサブユニットワクチン: Gag/gp41 キメラタンパク質を TMV を用いた一過的発現システムでタバコ葉に生産	米・Arizona State	38

	外被タンパク質 gp41-Gag (ウイルス外被構成タンパク質)		させたと、径約 100nm のウイルス様粒子 (VLPs) が形成された。この Gag を基にした VLPs の結果は、他の HIV-1 エンベロープを VLPs として発現させることが可能なことを示している。	University	
ワクチン抗原	ジフテリア菌、百日咳菌および破傷風菌外毒素エビトープ (DPT)	タバコ (葉緑体)	ジフテリア菌、百日咳菌および破傷風菌外毒素エビトープ；三種混合ワクチン；DPT エビトープをタバコ葉緑体に導入したところ、4 系統で発現を確認した。ELISA の結果、DPT タンパク質は抗 DPT 毒素抗体により認識された。ウエスタン解析の結果、葉緑体形質転換でのタバコ葉での DPT エビトープの生産量は、以前にトマト核形質転換で得られた生産量の 100 倍高く、新世代の DPT サブユニットワクチン生産が期待できる。	米・University of Illinois	39
ワクチン抗原	腸毒素産生性大腸菌 (ETEC) 耐熱性毒素 (ST) -大腸菌易熱性腸管毒素 B サブユニット (LT-B)	タバコ (葉緑体)	腸毒素産生性大腸菌 (ETEC) ワクチン；葉緑体 16S リボソーム RNA 遺伝子プロモーターと T7 ファージの遺伝子 10 の 5' 非翻訳領域に連結した LTB-ST 融合タンパク質遺伝子をタバコ葉緑体形質転換により導入したところ、全可溶性タンパク質の 2.36% の生産量であった。	米・University of Illinois	40
ワクチン抗原	トリインフルエンザヘマグルチニン (HA)	タバコ培養細胞 NT-1	HA1 polypeptides；マウスへ投与し感染阻止効果を調べた結果、粗エキスクワクチンは、精製ワクチンよりも抗体価が高く、感染阻止効果および他の種類のウイルス阻止効果も高かった	米・Dow Agrosciences LLC	41
抗体医薬	抗ヒト CD20 ヒト・マウスキメラモノクローナル抗体、 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素 (FucT) RNAi、 $\beta$ 1,3-キシロース転移酵素 (XylT) RNAi	ウキクサ (Lemna)	フコース、キシロース付加のないリツキシマブ (rituximab)；Lemna で生産したリツキシマブは、ほ乳動物細胞で生産したリツキシマブと同様の CD20 結合能とより高い抗体由来の細胞毒性および B 細胞減少作用を血液全体に対し示した。より高い活性と、少ない副作用が期待できる。	米・Biolex Therapeutics	42
抗体医薬	IgG 抗体	タバコ	IgG 抗体をアポプラスト、細胞膜あるいは小胞体に蓄積する GM タバコを用い、種々の葉からの抗体抽出法を検討した結果、蓄積部位の違いにより、最適な抽出条件が異なることが判明し、抽出バッファーへの界面活性剤の添加は抽出効率を改善したが、蓄積部位の違いによりその効果は異なっていた	英・University College London	43
抗体医薬	単クローン抗体 (mAb)、 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素 (FucT) RNAi、 $\beta$ 1,2-キシロース転移酵素 (XylT) RNAi	タバコ	ヒト型糖鎖の単クローン抗体；個別に RNAi を導入した組換え植物ではわずかながらフコースあるいはキシロースが付加された単クローン抗体が得られたが、両方を発現させた植物では、フコースおよびキシロースが付加しない単クローン抗体が得られ、何世代も安定であった。	ベルギー・Bayer BioScience	44
抗体医薬	血液型タイピング IgGC5-1	タバコ (Nicotiana benthamiana；ササゲモザイクウイルス)	血液型タイピング IgGC5-1；IgG 遺伝子を RNA-2 全長または RNA-2 遺伝子を短くした断片に挿入したササゲウイルスベクターを複製し、アグロバクテリウムを介し、RNA-1 存在下でタバコ葉にウイルス感染を行い、IgG を生産させた。どちらのベクターでも IgG 生産が認められたが、RNA-2 を短くして遺伝子導入を行ったウイルスの方が、生産量が高かった。また、抗体重鎖の C 末端に小胞体維持シグナルを付加すると生産量が増加した。	英・John Innes Centre & 加・Medicago Inc	45
抗体医薬	抗 HIV-1 単クローン抗体 2G12、RNAi による糖鎖修飾変化	タバコ (Nicotiana benthamiana)	種々の N 型糖鎖を有する抗 HIV-1 単クローン抗体；野生型タバコおよび RNAi により糖鎖修飾を変化させたタバコで単クローン抗体を生産させ、抗体原性およびアレルギー性を調査。植物型糖鎖修飾 (野生型植物で生産) を受けた単クローン抗体をウサギに免疫すると、様々な糖タンパク質に反応する IgG 抗体が産生され、また、アレルギー患者血清の IgE に強い反応性を示した。一方、植物型糖鎖修飾を受けない植物で生産した IgG は、アレルギー患者血清由来の IgE と結合しなかった。	オーストリア・University of Natural Resources and Applied Life Sciences & 独・アーヘン工科大学	46
抗体医薬	抗 HIV モノクローナル抗体	トウモロコシ	HIV 感染予防、トウモロコシ由来の抗体と CHO 由来の抗体のウイルス中和活性を調べた結果、トウモロコシ由来の抗体の方が約 3 倍活性が高かった	西・Universitat de Lleida	47



抗体医薬	抗 HIV-1 単クローン抗体 2G13+KDEL+蛍光マーカータンパク質 (DsRed)	トウモロコシ	抗 HIV-1 単クローン抗体 2G13: 単クローンと蛍光マーカータンパク質 (DsRed) とともにトウモロコシ胚乳で生産。生産された抗体の重鎖は、ゴルジ特異的な糖鎖修飾 (フコース、キシロース) を欠いており、ほとんどの糖鎖が除かれていた。これは胚乳内在のグリカナゼによるものと思われる。生産された単クローン抗体は、CHO で生産されたものと同等かそれ以上の HIV 中和活性が認められた。	独・アーヘン工科大学 & オーストリア・University of Natural Resources and Applied Life Sciences	48
抗体医薬	抗ルイス Y 抗原抗体、フコース転移酵素ノックアウト	ヒメツリガネゴケ	抗ルイス Y 抗原抗体: コケは半数体でクローン増殖が可能で短期間で大量に増産でき、相同組換えによる遺伝子ノックアウトが可能。遺伝子導入も容易で全ゲノム解読終了。抗ルイス Y 抗原抗体活性の上昇、副作用軽減。	独・Greenovation	49

表 6. 2008-2009 年 1 月公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等 (治療薬及び診断薬・試薬)

区分	導入遺伝子	作物	生産物・機能及び特徴等	研究・開発国	文献
治療薬	アポリポプロテイン A-I	イネ	アポリポプロテイン A-I dimer or multimer (apo A-I, HDL の主要な構成成分、HDL の代謝に関与) : コレステロール代謝異常の改善、種子特異的プロモーターの利用により、種子中に apo A-I を蓄積、この種子から作製したライスミルク中の apo A-I は 4℃ で 63 日間安定であることを確認	伊・Plantechno S.r.L.	50
治療薬	ヒト I 型コラーゲン α1(C1a1) 鎖	オオムギ	ドラッグデリバリー担体	フィンランド・VTT Technical Research Centre of Finland	51
治療薬	組織プラスミノーゲン活性化物質	植物	血栓溶解薬	韓	52
治療薬	バラオキシナーゼ 1 (PON-1)	植物 (ウイルスベクターも含む)	バラオキシナーゼ 1 (PON-1) : 有機リン系神経毒、化学兵器中毒の治療薬: PON-1 を植物で生産するため、アグロバクテリウムによる形質転換、植物ウイルス感染による一過的タンパク質発現システムを比較した。	米・Arizona State University	53
治療薬	クロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成酵素 (cvHAS)、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (Ugd)、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT)	タバコ	ヒアルロン酸: cvHAS, Ugd および GFAT を連結した三重遺伝子を導入した形質転換タバコでは、ヒアルロン酸生産量が著しく向上した。	日・東洋紡	54
治療薬	ヒトアセチルコリンエステラーゼ (AChE)	タバコ	ヒトアセチルコリンエステラーゼ (AChE) : 有機リン系神経毒、化学兵器中毒の治療薬: 発現カセットおよび精製法を最適化してタバコで生産させた AChE は、ほ乳動物由来の AChE と同様の酵素活性を示し、さらに、甚だしくひどい有機リン系神経毒中毒の臨床症状を完全に緩和することが出来、長時間有効であった。	米・Arizona State University	55
治療薬	GDP-D-マンノース-4,6-脱水酵素 (GMD)	タバコ (ウイルスベクター)	植物型糖鎖付加の抑制: キュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターを用いたウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) 法により GMD 遺伝子ノックダウンを試みた。GMD 遺伝子の一部を CMV ベクターに導入して GMD 遺伝子抑制用のウイルスベクターを構築し、タバコへ接種し糖鎖へのフコース修飾の抑制を試みた結果、フコース修飾が削除された糖鎖の増加およびフコース修飾糖鎖の減少が観察された。	日・産総研	56
治療薬	ヒトブチルコリンエステラーゼ (BChE)	タバコ (TMV も含む)	ヒトブチルコリンエステラーゼ (BChE) : 有機リン系神経毒、化学兵器中毒の治療薬: タバコで BChE を生産するため、アグロバクテリウムによる形質転換、2 種の組換え植物ウイルス (TMV: MagnICON およびインゲン黄萎ウイルス: EPEPE) 感染による一過的タンパク質発現システムを比較した。	米・Arizona State University	57

治療薬	マウスインターロイキン12(mIL-12)	タバコ(毛状根培養)	タバコ毛状根培養による mIL-12 生産スケールアップのため、フラスコでの振とう培養、ミストリアクター、エアリフトリアクターでの培養を検討した結果、フラスコでの振とう培養が最も新鮮重量、mIL-12 生産量が高く、毛状根中の含量 76.2 μg/g 新鮮重、培地中の濃度 167.6 μg/L であった。	米・Arkansas State University	58
治療薬	アプロチニン	タバコ(葉緑体)	アプロチニン;セリンプロテアーゼ阻害薬、心臓血管外科等での手術における血液、体液等の漏出防止	仏・Bayer BioScience	59
治療薬	ヒトカルシトニン	タバコ培養細胞 BY-2	ヒトカルシトニン:変形性関節症において軟骨保護作用を示し、骨痛に対し鎮痛作用を持つ:植物用発現ベクター pCMBIA にクローン化したカルシトニン遺伝子を組み込み、細菌の選択マーカーはカナマイシン耐性、植物での選択はハイグロマイシンとし、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス C58C1 を形質転換し、植物の形質転換に用いた。	ヨルダン・University of Jordan	60
治療薬	ヒトグルコセレブリンダーゼ、α-ガラクトシダーゼ	ニンジン(細胞培養)	high-mannose lysosomal enzymes: リソソーム蓄積症治療薬、ニンジン培養細胞で生産された酵素が、Man/GlcNAc レセプターを介し、標的マクロファージに取り込まれ、機能していることを確認、マウスへの投与では、最高濃度においても副作用は認められなかった	イスラエル・Protalix Ltd.	61
治療薬	アグロバクテリウム・リゾジエネス T-DNA, GUS, NPTII	ラッカセイ	レスベラトロールの効率的生産のため、A. r. 15834 を感染させ、ラッカセイ毛状根を誘導した。	韓・Seoul National University	62
診断薬・試薬	プレプロキモシン	植物(種子)	プレプロキモシン:キモシン商業生産のための植物種子での発現方法について記載。この手法では、少なくとも全種子タンパク質の 0.5% をキモシンが占める。また、種子からのキモシン単離の改良法、プレプロキモシンキメラ遺伝子を搭載した植物用形質転換ベクターについても記載。	加・Sembiosys Genetics Inc.	63
診断薬・試薬	抗ダイオキシン単鎖抗体(scFv)	タバコ(ウイルスベクターも含む)	大量生産を検討するため、形質転換タバコとキュウリモザイクウイルス(CMV)ベクターによる発現の比較を行った結果、CMV ベクター 接種上葉の発現量が、最も発現量が高い形質転換タバコの約 7 倍であることが判明した。さらにこのとき、ポティウイルスを重複感染させることにより、さらに生産量を増加させることが判明した。	日・産総研	64

表 7. 2008-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等(環境浄化)

区分	導入遺伝子	作物	生産物・機能及び特徴等	研究・開発国	文献
環境浄化	不明	カラシナ	鉢植え植物を用いた試験で、組換えにより重金属を蓄積するようになった植物は、重金属耐性を持ち、土壌中のクロムを茎葉部に蓄積した。	印・Jawaharlal Nehru Technological University	65
環境浄化	亜硫酸酸化酵素	植物	亜硫酸塩生成化合物の除去、殺菌剤としての利用または二酸化硫黄生成物質のモニタリング	イスラエル・Yeda Research and Development Co. Ltd.	66
環境浄化	液胞ピロホスファターゼ	植物	耐塩性、土壌中リン取り込み量増加	米	67
環境浄化	多剤排出型輸送体(MATE: Multidrug And Toxin Extrusion)タンパク質(オオムギ由来)	植物	オオムギ由来 MATE 導入により、アルミニウム誘導性のクエン酸輸送が活性化。	日・岡山大学	68
環境浄化	ヒ酸還元酵素(ACR2、植物由来)、フィトケラチン合成酵素	植物	ヒ酸還元酵素(ACR2、植物由来)導入により、重金属耐性あるいは重金属を蓄積しない GM 植物の作出について記載。また、ヒ酸還元酵素(ACR2、植物由来)一植物発現調節配列一微生物由来フィトケラチン合成酵素による GM 植物の作出についても記載。	米・マサチューセッツ大学	69
環境浄化	多剤耐性関連タンパク質(MRP)(FeMPR3、ゾバ由来)	シロイヌナズナ	FeMPR3 導入植物は、選択的に鉛を蓄積したが、カドミウムや酸化クロムは蓄積しなかった。この植物は土壌中の重金属除去に有効である。	日・中部電力&三重大学	70
環境浄化	白色腐朽菌由来ラッカーゼ	タバコ	scL の cDNA の CpG-ジヌクレオチドを 12% に低下させた scK12 遺伝子をタバコに導入したところ、scL	日・静岡大	71

			導入植物および野生型植物に比べて高いラッカーゼ活性が認められ、トリクロロフェノールを除去することが出来た		
環境浄化	クエン酸合成酵素 (タバコ由来)	タバコ	クエン酸合成酵素産物のクエン酸は、細胞内、根から土壤中に放出されて土壤中のアルミニウムイオンとキレートを生成し、高レベルのアルミニウムの毒性を軽減する。光誘導性プロモーター (ルビスコシモールサブユニット) による酵素タンパク質の発現は、非組換え植物の1-1.5倍で、GM植物はより多くの有機酸を放出し、根の生育も良く、100-300 μMのアルミニウムストレス下でも耐性を示した。	中・昆明理工大学	72
環境浄化	細菌由来無機水銀還元酵素 (merA and merB)	タバコ (葉緑体)	水銀除去、組換え体は、非組換え体に比べ100倍の水銀耐性を示し、無機水銀、有機水銀どちらに対しても耐性を示した	米・University of California	73
環境浄化	アグロバクテリウムトリプトファンモノオキシゲナーゼ (iaaM)、1-アミノシクロロパンデアミナーゼ (ACC)	ベチュニア、タバコ	重金属耐性：木部特異的高グリシンタンパク質プロモーター制御下で iaaM 遺伝子を単独導入あるいは CaMV35S プロモーター制御下の ACC 遺伝子共に導入した植物を作出した。両方の遺伝子を発現させたベチュニアは 7.5mg/l の CoCl <sub>2</sub> 存在下でも発根した。形質転換タバコ T1 植物は、Cu <sup>2+</sup> および Co <sup>2+</sup> を含む砂で生育し、部位特異的プロモーターで両方の遺伝子を発現させたタバコの方が生育が早く、バイオマスも増大し、より多くの重金属を蓄積した。また、この植物は、無機環境汚染物質だけでなく、有機環境汚染物質存在下でも生育が可能であった。	中・The Chinese Academy of Sciences	74

表 8. 2008-2009 年 1 月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等 (国別集計)

国名	機能的食品・嗜好品	経口ワクチン	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	合計
米国	7	4		9	1	4		3	28
カナダ		1					1		2
英国					2				2
フランス		1				1			2
ドイツ	1				2				3
オーストリア					1				
ベルギー					1				1
イタリア						1			1
スペイン					1				1
フィンランド						1			1
ヨルダン						1			1
イスラエル						1		1	2
インド								1	1
韓国		2				2			4
中国	2	1						2	5
日本	3	5	3	1		2	1	3	18
合計	13	14	3	10	8	13	2	10	73



平成 20 年度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）

「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書（平成 20 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）

研究分担者 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換え食品は農作物が主であるが、最近では組換え畜産物についての研究もなされており、これらが実用化されるのも目前に迫っているため、それらについての安全性評価方法の検討が必要である。中でも遺伝子組換えニワトリは鶏卵のアレルギー低減や、鶏卵を用いたワクチンの産生のための遺伝子組換えについて研究がなされており、近い将来それら遺伝子組換え動物が数多く作出され広く用いられると目される。そこで、本研究では遺伝子組換え動物のモデルとして、緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した遺伝子組換えニワトリを材料として、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。ニワトリ個体より通常の方法により各組織を切り分け凍結したサンプルから RNA 抽出を行ったところ RNA の分解が認められた。このことから屠殺後、流通に回った可食部からはトランスクリプトーム解析に用いることができる品質の RNA が得られないことが明らかになった。しかし、材料採取の際に時間をおかず直ちに急速冷凍したサンプルを用いることで、マイクロアレイに供する純度の RNA が抽出できることが分かった。遺伝子組換えニワトリと非組換えニワトリの筋肉・胃・肝臓とを用いた遺伝子発現解析の結果、遺伝子組換え体と非組換え体において各組織間の発現プロファイルに顕著な差は認められず、遺伝子組換えによって遺伝子発現が大きく異なる可能性は低いことが示された。

### 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・生命機能科学専門）

### A. 研究目的

近年、遺伝子組換え農作物は植物のみならず、畜産物についても実用化に向けて研究がなされている。特に鶏卵は高濃度で組換えタンパク質を蓄積できることから、インシュリンやワクチンなどの医薬品を遺伝子組換えニワトリで生産する試みがなされている。また、鶏卵は我々の食生活において特に身近なものであるが、オプアルブミンやオボムコイドなどのアレルゲンを大量に含んでいることが問題となっている。そこで、これらのアレルゲンタンパク質を生産させない、あるいは低減させるための遺伝子組換えニワトリの作出がなされ始めている。そのため組換えニワトリの卵が実用化された場合、その流通量は莫大なものとな

ると目されるため、遺伝子組換えニワトリについての安全性評価を検討することは重要である。そこで、本研究では遺伝子組換え動物のモデルとして、緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した遺伝子組換えニワトリを材料として、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。

### B. 研究方法

#### <試料>

GFP 遺伝子組換え・非組換えニワトリの筋肉・胃・肝臓・表皮は国立大学法人広島大学大学院生物圏科学研究科助教堀内浩幸博士に分与いただいたものを使用した。各組織は孵化直前あるいは直後のものから採取し液体窒素にて急速冷

凍し使用するまでは $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

#### <方法>

凍結したニワトリ各組織約 0.2~0.5 g (生重量) を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中でパウダー状になるまで磨砕し、50 ml 遠沈管に移してから $-80^{\circ}\text{C}$ で液体窒素を完全に気化させた。そこに 5 ml のセパゾールスーパー (ナカライテスク社) を加えてよく混合してから室温で 5 分間静置した。さらに 1.6 ml のクロロホルムを加えてよく混合し、室温で 3 分間静置した後に、 $7,500 \times g$  で 15 分間遠心して上層を新たな遠沈管に移した。そこに等容の 2-プロパノールを加えて混合し室温で 10 分間静置してから  $20,000 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い RNA を沈殿させた。沈殿を 70% 冷エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた RNA を RNeasy カラム (キアゲン社) を用いて精製した。沈殿させた RNA を 400  $\mu\text{l}$  の RLT バッファーに懸濁したのち、200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  の RNase free 水で RNA を溶出した。

ニワトリ各組織の遺伝子発現解析はクラボウ社の "GeneChip" Expression Array 受託解析サービス" を利用し、Chicken Genome Array (約 33,000 の Gallus gallus 転写産物、約 700 の Avian pneumovirus 転写産物がスポットされたもの) を用いた。

### C. 研究結果

まず、ニワトリ各組織においてマイクロアレイ解析に供することができる純度の RNA が抽出できるかを検討した。その結果、組換えニワトリ、非組換えニワトリの筋肉・胃・表皮・肝臓から抽出した RNA は分解が認められ、マイクロアレイ解析に供することができないことが判明した。そこで、新鮮な材料を可能な限り速やかに液体窒素で凍結したものを新たにサンプルと

して広島大学の堀内博士に分与していただき、RNA 抽出を行った。その結果、セパゾールと RNeasy カラムを用いることでマイクロアレイ解析に十分な純度で精製することができた (図 1)。その後 cRNA を合成しアレイ解析に供したが、その過程で表皮由来の RNA からは十分な合成量が得られなかったため、その他の筋肉・胃・肝臓から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。RNA の収量は、湿重量 0.2~0.5g 程度の試料から 5~25  $\mu\text{g}$  程度であり、一般的なマイクロアレイ解析には十分な量であった。

ニワトリ由来の転写産物約 33000 がスポットされたマイクロアレイを用いた解析では、まず、非組換えニワトリ、遺伝子組換えニワトリ各々で各組織ごとの発現量の比較を行った。筋肉-肝臓、筋肉-胃、肝臓-胃、それぞれの遺伝子の発現量をそれぞれ縦軸・横軸にとったスクエアープロットによって解析したところ、各組織間では各遺伝子の発現量に相関が無いことが分かった (図 2)。また、その結果は遺伝子非組換え体、組換え体のいずれのサンプルにおいても同様の傾向が見られた。

筋肉・胃・肝臓における組換えニワトリ、非組換えニワトリでの遺伝子発現のプロファイルをスクエアープロットによって解析した (図 3)。その結果、筋肉・胃・肝臓それぞれにおいて、発現量が低い遺伝子については分散する傾向が見られたが、発現量が中盤以上のものについては、有意な差は認められず、遺伝子組換えによる遺伝子発現の有意な変化は認められなかった。

### D. 考察

ニワトリ各組織からの RNA 抽出の収量は 0.1 mg あたりで数  $\mu\text{g}$  であり収率は比較的低かったが、これは RNeasy カラムにアプライできる量が限られているためであり、実際の組織内の RNA 量はさらに数倍存在していると見積もられる。マイクロアレイ解析等の高感度分析以外の実験に供す

る場合にはカラムを複数本使用する等の工夫をすることで材料を増やすことなく高収量を得られると考えられる。

一般に肝臓については RNA 分解酵素活性が強く注意が必要とされているが、今回の実験では胃や表皮、また、筋肉についても同様であり、ニワトリ各組織からの RNA を分解されること無く抽出するためには新鮮な組織を解体後速やかに急速冷凍することが肝要であると思われた。そのため、ニワトリのトランスクリプトーム解析を行うには、屠殺後の時間の過ぎた市販の鶏肉や臓器を材料として供することは RNA の十分な品質を確保できず困難であると考えられた。また、表皮については cRNA 合成の段階で十分な合成量が獲得できなかったため、マイクロアレイ解析に供することができなかったが、これは抽出された RNA が若干の分解を受けていたためであると思われた。ニワトリ表皮は細かい毛に覆われており、サンプルを十分に破碎することが困難で、その後の試薬の浸透が他の組織に比べて十分ではなかったことが原因と考えられた。

マイクロアレイ解析によってニワトリ各組織間の遺伝子発現量の差異を検討したところ、筋肉、胃、肝臓それぞれの遺伝子発現には明らかな相関は認められなかった (図 2)。また、遺伝子発現の変化は各組織間で、組換え、非組換えにおいて非常に似通ったデータとなり (図 2、上段と下段)、これらの発現量の違いは個体差よりも、組織間の差が検出されているものと考えられた。

遺伝子組換え・非組換えニワトリにおける遺伝子発現解析においては、各組織間で発現量が有意に異なる遺伝子はほとんど無かったが、今後、今回確立された方法をもとに検体数を増やして統計学的処理を行って検討するとともに、今回導入した GFP 以外の遺伝子が導入された検体についても評価していく必要があるものと考えられる。

E. 研究発表  
なし



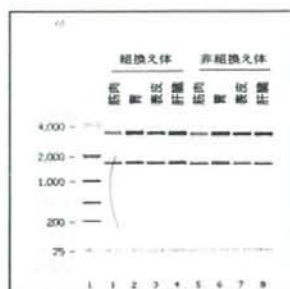


図 1 ニワトリ各組織から抽出した RNA のチップ電気泳動図。いずれの組織から抽出した RNA おいても 28S、18S リボソーム RNA のバンドが検出され、RNA の分解がほとんど無いことが示された。

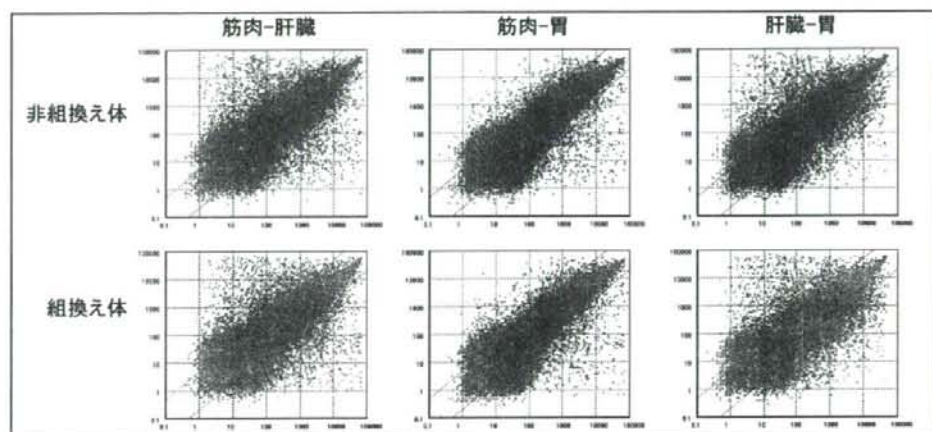


図 2 遺伝子組換え・非組換えニワトリにおける各々の各組織間での遺伝子発現の変化を示すスキャタープロット図。

各組織間での遺伝子の発現量が異なっていること、またその変化は遺伝子組換え体、非組換え体ともに同様の遺伝子発現変化が生じていると考えられる。

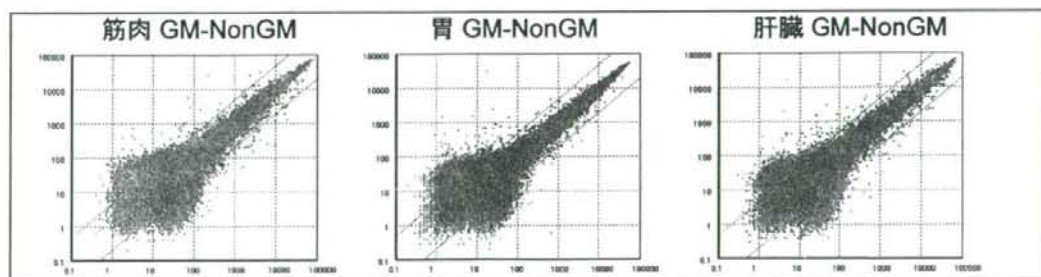


図 3 遺伝子組換え・非組換えニワトリにおける組織間の遺伝子発現の変化を示すスキャタープロット図。

遺伝子組換え体・非組換え体とで遺伝子発現量が中盤以上のものについては変化がほとんどないと考えられる。

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）

研究分担者 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、本年度は遺伝子組換え動物のモデルとして、発光クラゲ蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリを用いて、非遺伝子組換え体と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。その結果、発現タンパク質の個体差が非常に大きく、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の発現タンパク質の特異的な変化は検出できなかった。

協力研究者

佐々木和生（東洋大学生命科学部）

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に、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、発光クラゲ蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリ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ために、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体それぞれのプロファイルを比較検討した。

B. 研究方法

<材料>

広島大学大学院生物圏科学研究科堀内浩幸助教より供与された、発光クラゲ蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリから抽出された胃、肝臓、表皮、筋肉を材料として用いた。

<方法>

タンパク質抽出

粉砕した種子に抽出バッファー（8M Urea, 4%(W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl, 1% Protease



inhibitor mixture (GE Healthcare Biosciences)) を加え、10,000rpm で10分間遠心分離して上清を得た。得られた上清は再度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 (GE Healthcare Biosciences) を用いて精製した。精製後得られた沈殿を 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare Biosciences) に溶解し、限外濾過膜 (Microcon YM-10, 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、30mg 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 (GE Healthcare Biosciences) を用いて Immobiline DryStrip 3-10NL 18cm (GE Healthcare Biosciences) を膨潤させ、Ettan IPGphor II (GE Healthcare Biosciences) を用いて電気泳動した。500V で1時間、1000V で1時間通電した後、8000V で5時間30分泳動した。

##### ・2次元目電気泳動 (SDS-PAGE)

IEF 終了後の Immobiline DryStrip は、SDS を含むバッファーで平衡化し、ExcelGel SDS XL Gradient 12-14 (GE Healthcare Biosciences) 上で、Multiphor II (GE Healthcare Biosciences) を用いて泳動した。1000V 20mA で35分間通電した後、1000V 40mA で2時間40分間泳動した。

#### タンパク質の検出

PhastGel Silver Staining Kit (GE Healthcare Biosciences) を用いて銀染色によりタンパク質を検出した。染色後、ゲルを室温で乾燥させ、スキャナを用いてコンピュータに画像を取り込んだ。得られた画像は Image Master Platinum (GE Healthcare Biosciences) により画像解析を行った。

### C. 研究結果

#### 遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリのプロテオーム解析

遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリそれぞれ3個体より抽出された器官または組織より調製されたタンパク質抽出物について、1次元目の電気泳動 (IEF) を同時に行い、2次元目の電気泳動 (SDS-PAGE) をそれぞれ個別に行い、可能な限り同じ条件で染色し、画像の取り込みを行った。

ニワトリより抽出された、胃、肝臓、表皮、筋肉のサンプルの中で、再現性よくタンパク質の2次元電気泳動パターンが得られたのは、筋肉のサンプルだけであった。胃、肝臓および表皮のサンプルは、同じ条件でタンパク質を抽出しても得られる電気泳動パターンの再現性は低く、プロファイルの比較はできなかった。

再現性よく電気泳動パターンが得られた、筋肉のサンプルについて、遺伝子組換えニワトリ3個体のサンプルと非遺伝子組換えニワトリ3個体のサンプルをそれぞれ1つのグループとし、2つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

遺伝子組換えニワトリのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ (図1)、1059個のスポットが遺伝子組換えニワトリのグループのいずれかの個体で検出され、388個は遺伝子組換えニワトリのグループ内の複数の個体で共通に検出された。非遺伝子組換えニワトリのグループと遺伝子組換えニワトリのグループで共通に検出されたスポットは、47.5%に相当する503個であった。残りの52.5% (556個) は、非遺伝子組換えニワトリのグループのみで検出された。また、非遺伝子組換えニワトリのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ (図2)、1215個のスポットが非遺伝子組換えニワトリのグループのいずれかの個体で検出され、364個は非遺伝子組換えニワトリのグループ内の複数の個体で共通に検出された。非遺伝子組換えニワトリのグループと遺伝子組換えニワトリのグループで共通



に検出されたスポットは、44.4%に相当する 539 個であった。残りの 55.6% (676 個) は非遺伝子組換えニワトリのグループのみで検出された。

#### D. 考察

##### 遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリのプロテオーム解析

今回の研究に用いた、ニワトリより抽出された、胃、肝臓、表皮、筋肉のサンプルにおいて、筋肉では再現性のある泳動パターンが得られたが、胃、肝臓および表皮については、泳動パターンの再現性は低い結果となった。これは、器官または組織に含まれるタンパク質分解酵素によるタンパク質の分解や器官または組織からのタンパク質の抽出効率に影響した結果であると考えられる。今後、これらの器官または組織については、タンパク質の抽出法の改良を行う必要がある。

筋肉のサンプルについて、遺伝子組換えニワトリまたは非遺伝子組換えニワトリのグループ内で、いずれかの個体間で共通に検出されたスポットは、40%程度であり、同じグループ内においても、検出されるタンパク質について、大きな個体差があると考えられる。個体差を小さくするには、個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要がある。一方、遺伝子組換えニワトリのグループと非遺伝子組換えグループ間では、共通に検出されるスポットは 45%程度であり、若干ではあるが、グループ内で共通に検出されるスポットの割合を上回る結果を得た。これは、比較に用いた個体数が、グループ内では 3 個体であるが、グループ間では 6 個体のデータを解析に用いるために、個体差が僅かに圧縮されたことによると考えられる。よって、遺伝子組換えニワトリと非遺伝子組換えニワトリのプロファイルと比較するには、個体数を増やして検討することが必要である。また、今回の結果より、遺伝子を組換えることにより、個体差によって生じる以上の変化は起こっていないことが示唆される。

#### E. 結論

遺伝子組換えニワトリについて、プロテオームによるプロファイルの比較検討を行ったが、個体数を増やして、より詳細に解析する必要があるものの、個体差によって生じる以上の変化を検出することはできなかった。

#### 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

なし

#### 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

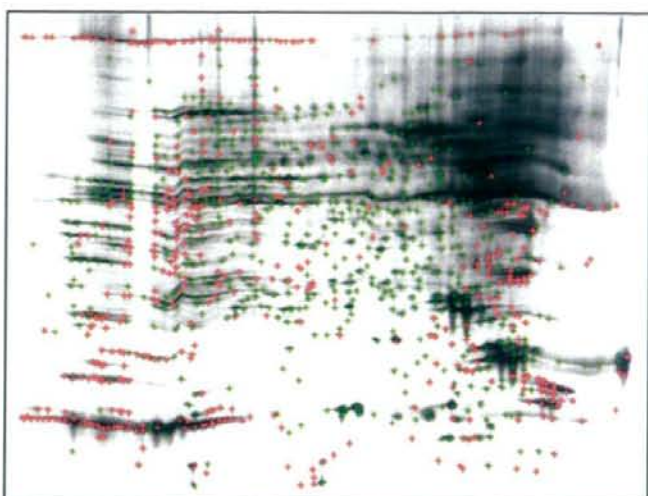


図1 筋肉からの抽出物について、遺伝子組換えニワトリをリファレンスとした解析

緑は、非遺伝子組換えニワトリと共通しているスポット。

赤は、遺伝子組換えニワトリのみで検出されたスポット。

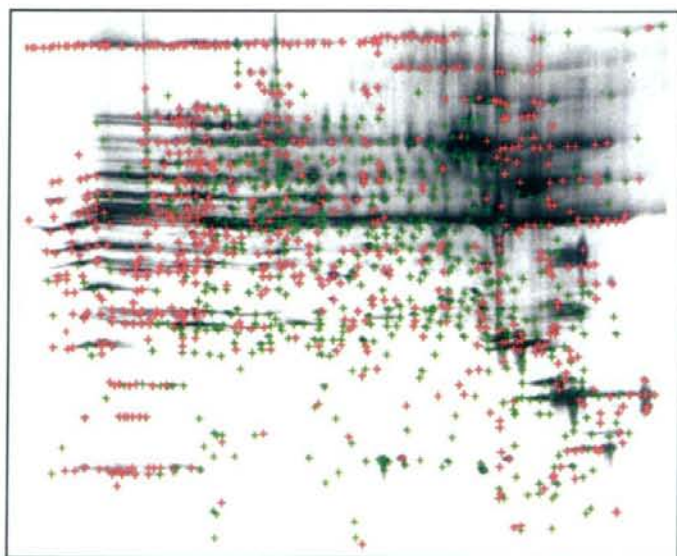


図2 筋肉からの抽出物について、非遺伝子組換えニワトリをリファレンスとした解析

緑は、遺伝子組換えニワトリと共通しているスポット。

赤は、非遺伝子組換えニワトリのみで検出されたスポット。

平成 20 年度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）

「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書（平成 20 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（3）

研究分担者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

### 研究要旨

遺伝子組換えによってニワトリ肉の栄養素の増減、あるいは有害成分蓄積などを判別するための基礎データ取得を目指して、遺伝子組換えと非組換えニワトリ肉の組織中の非タンパク性成分（代謝成分）の総和（メタボローム）をメタボロミクスによって比較・検討した。本研究では、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置（FT-ICR/MS）による高分解能マスペクトル測定、および LC-Linear-Trap-TOF/MS の 2 種類の質量分析（2 種の溶媒、正・負それぞれのイオンモード）によって鶏肉部位別のメタボローム解析を行った。FT-ICR/MS 法では、試料抽出物に含まれる成分を未精製のまま一斉分析することが出来るため、食品の安全性評価のためのメタボローム情報を迅速に取得することが可能である。また、FT-ICR/MS による迅速なメタボローム評価は、LC-Linear-Trap-TOF/MS によって再確認するスキームを採用した。

平成 20 年度は、FT-ICR/MS を用いた鶏肉成分比較のためのメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法による FT-ICR/MS 分析、マスペクトルデータ（質量数と各ピーク強度）の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。分析には、遺伝子組換えニワトリ肉（GM）と非組換えニワトリ肉（nonGM）を供試し、両サンプルのメタボロームを FT-ICR/MS における ESI 陰イオンモードおよび陽イオンモードで比較した。GM と nonGM の筋肉組織中の低分子成分組成を主成分分析によって解析したところ、陰イオンモードおよび陽イオンモードともに顕著に異なるメタボロームクラスターは形成されなかった。一方、表皮組織抽出液の分析では、明らかなメタボロームの相違が見られ、その差は脂質組成の差に由来することがわかった。

今回の分析条件下で、GM と nonGM の間には、代謝成分に明確な差異が認められることが明らかになった。供試試料の由来、操作された遺伝子に関する情報は無いので、代謝成分の変化が遺伝子操作とどのような関連性を持つかは不明である。以上、FT-ICR/MS 分析、LC-Linear-Trap-TOF/MS 分析、とメタボローム解析によって、GM ニワトリ肉の低分子成分組成の迅速な比較が可能であった。今後、個体間の差や加齢などの情報を加味した実験計画も必要と思われる。

### 協力研究者

太田大策（大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科）

### A. 研究目的

遺伝子組換え技術によって様々な生物に有用形質を導入することが可能である。遺伝子組換

え技術を使用した生物機能改変技術は、食料品への応用に留まらず、工業原料の生産や地球温暖化対策のための重要基盤技術として、今や必須の役割を担っていると言える。このような背景において、遺伝子組み換え技術を使用して作出・生産された食品の安全性に関する科学的実証データの集積は、社会的に重要な課題の一つであり、遺伝子組み換え作物の実質的同等性の