

200837019A

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20年度 総括・分担研究報告書

(H19-食品-004)

研究代表者 穉山 浩

平成21年4月

# 目次

I. 総括研究報告書		
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		
穉山 浩	.....	1
II. 分担研究報告書		
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防止に関する 安全性確保のための研究		
穉山 浩	.....	2 3
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	.....	3 3
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	.....	5 3
4. 医薬品用遺伝子組換え生物や再生医療用動物の調査研究		
手島 玲子	.....	5 9
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	.....	8 7
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....	1 2 9

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

研究代表者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
研究分担者	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
研究分担者	小関 良宏	東京農業工業大学 工学部 教授
研究分担者	手島 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長
研究分担者	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:

①組換え遺伝子の有無を判断する高処理スクリーニング系の開発を目的に、マルチプレックス PCR を用いた組換え作物検査法を考案し、最適化を行った。これは特に DNA 増幅後の融解(一次微分)曲線のピーク解析を中心とした方法で、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固有の融解ピークの有無によって、一つの作物サンプルから目的遺伝子の存在を複数かつ同時に判断するものである。本研究では極めて高い温度分解能を持つ装置を用いたため、僅かな Tm 値のズレも検出でき、従来よりもさらにかい 2 本鎖 DNA 変性過程の情報を得ることに成功した。また、今回 PCR の蛍光色素には Eva green を用いたが、これは細胞不浸透性なので SYBR green と比べて毒性が低く、かつ PCR 阻害性の低いことから、DNA の変性状況をより正確にモニタリングすることが可能となった。また昨年度集計した非食用 GM 体の開発状況のデータベースを確立した。

②食品添加物を生産するための遺伝子組換え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遺伝子組換え微生物の開発も進みつつある。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微生物が誤って食品に混入してくる可能性が示唆されている。そこで、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。情報収集により、昨年度のデータに追加して市販の大腸菌用遺伝子組換えベクターと研究用に利用されている乳酸菌用遺伝子組換えベクターについてまとめ一覧表をほぼ網羅するよう完成した。乳酸菌組換え研究が進んでいることから、オランダで開催された“国際乳酸菌シンポジウム LAB9”に参加し、乳酸菌組換え体研究の成果を発表するとともに、この分野の情報収集を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法に関し牛乳中に混入した大腸菌モデル組換え体を用いて検討を行った。

③近年、遺伝子組換え植物に工業原料を生産させるための研究が進められている。これら工業原料やその中間産物等はヒトの健康を害する可能性のある化合物であり、食品の原料となる植物に混入する可能性を完全に否定することはできない。また、多種多様な遺伝子組換え生物が実用化されつつあるなか、多くの組換え遺伝子を網羅的にモニタリングするシステムの構築が必要であると考えられる。検出する技術が必要とされている。そこで、本研究では DNA マイクロアレイを用いた網

羅的な混入組換え遺伝子の検知法を開発するために、トウモロコシゲノム DNA を用いて内在遺伝子の検出感度の検討を行った。内在遺伝子として *Adh* 遺伝子、*SSIIb* 遺伝子からプローブを設計し、DNA マイクロアレイ上に固定化し、それらのプローブのアンチセンス鎖を Cy3 標識したターゲット DNA を調整して実際にハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイ上のシグナルを検出した。その結果、DNA マイクロアレイの検出感度は  $1.0 \times 10^7$  コピー/アレイであることが分かり、実際に使用するには化学発光法や抗原-抗体反応等を用いた検出感度の増強が必要であると考えられた。

④バイオテクノロジーを応用して作成された組換え動物や魚が多数報告されており、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。そこで、これらの組換え体を検知する方法を確立することは非常に有意義である。本研究では非食用に開発される組換え体を検知する方法を確立することを目的としており、本年度は組換えウシであるプリオンノックアウト牛の開発の調査を行うとともに、プリオンノックアウトウシに導入されている抗生物質耐性マーカーの検出法につき検討を行った。また、本年度は、米国 FDA が、遺伝子組換え(GE)動物の規制に関するガイドラインを作成し、2009年1月に公表したので、このガイドラインにつき日本語への仮訳を行うとともに、作成の経緯、概要についてまとめを行った。今後、組換え動物の開発が進むことが予想されるので、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思われる。

⑤医薬品目的の遺伝子組換え植物(薬用 GM 植物)の範囲を、GM 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用 GM 植物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、環境浄化の 8 種類を設定し、それぞれの一覧表を作成した。2006-2009年1月末に公表・出版された論文等 179 件をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能的食品・嗜好品:44 件、経口ワクチン:35 件、食用医薬:9 件、ワクチン抗原:20 件、抗体医薬:23 件、治療薬:22 件、診断薬・試薬:5 件、環境浄化:21 件であり、また、また、国別の件数では、米国:51 件、日本:45 件に次ぎ、中国:21 件であった。さらに作物別に集計した結果、タバコ 60 件についてイネ 18 件、トマト 12 件であった。調査の結果、食用作物の中で最も薬用 GM 植物としての使用頻度が高いイネについて、自家プロモーター発現系 GM 植物検知法を検討した。モデル植物として自家プロモーター制御下でマーカー遺伝子である  $\beta$  - glucuronidase (GUS) を発現する DSH1::GUS イネのゲノム DNA を材料に、制限酵素処理、自己閉環ゲノム DNA ライブラリーの作成、プロモーター領域から周辺配列方向へ PCR を行うインバース PCR(IPCR)を行い GM 植物の検知を試みた結果、本法が自家プロモーター発現系 GM 植物検知法として有用であることを実証した。また、GUS 遺伝子を有する非食用 GM 植物の検知法として、組織化学的染色法が簡便な検知法として実用可能であることを示した。さらに、GM 植物において多用される「組換えマーカー」遺伝子の検知に、PCR 法が有用であることを示した。

略号 : phbA,  $\beta$  - ketothiolase; phbB, polymerase; phaCAc, phaCAc polymerase;  
acetoacetyl - CoA reductase; phbC, PHB 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; Prn, 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, puroidoline 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GM (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われた。

#### 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) 試料 主に厚生労働省において擬陽性と判断されたもち米試料、陰性もち米検体(市販製品)と、その他のGM作物。
- 2) DNA抽出精製 もち米については、ニッポンジーン社製 GM quicker 2 改変法を用いた。その他のGM作物はキアゲン社製 DNeasy mini kit を用いた。
- 3) 試薬調製・定性 PCR・Eva Green マルチプレックスリアルタイム PCR マルチプレックスPCRの予備試験として行った通常の定性PCRの試薬は、AmpliTaq Gold (Applied Biosystem)を使用した。反応液は、1×PCR緩衝液、0.16 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.6  $\mu$ mol /L 5'及び3'プライマー並びに0.8 units Taq DNAポリメラーゼを含む液に、10 ng/ $\mu$ Lに調製したDNA試料液 5.0  $\mu$ L (DNAとして50ng)を氷中で加え、

全量を 25  $\mu\text{L}$  にした。装置は ABI9700 を用いた。マルチプレックス PCR の試薬は、QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN Cat. No.206143) と、Eva Green™ (WAKO 販売元 code. 550-80471) を使用した。反応液は、1  $\times$  Multiplex PCR Mix、0.5  $\times$  Q solution、1  $\times$  EvaGreen™、各 0.2  $\mu\text{mol/L}$  プライマー対、滅菌水を含む液に、10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  に調製した DNA 試料液 2.0  $\mu\text{L}$  (DNA として 20  $\text{ng}$ ) と、ColE1 プラスミド 2  $\mu\text{L}$  を各々氷中で加え、全量を 20  $\mu\text{L}$  にした。ColE1 プラスミドは、 $5 \times 10^{-1} \text{ng}/\mu\text{L}$  から  $5 \times 10^{-8} \text{ng}/\mu\text{L}$  の間で最適な濃度を検討した。プライマー対は 35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3plex を中心に、4plex として上記に hph、NPTII を加えて用いた。PCR 温度条件は以下を基本としてサイクル数、読み取り温度について各々条件検討を行った。95°C で 15 分間加温し、95°C 30 秒間、60°C 90 秒間、72°C 90 秒間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応後、72°C 10 分間、95°C 30 秒間加温した後、72°C から 99°C まで温度を上昇させ読み取り温度 0.3°C で融解曲線を作成した。サイクル数は 35、40、45、50 で比較し、読み取り温度は 1°C、0.5°C、0.3°C で検討した。

データベースの確立 昨年各分担研究者によって集計された情報を精査し、データベース用のソフトにデータを入力し作成した。

## 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、(1)論文、書籍、インターネット、業者カタログなどを用い、微生物の遺伝子組換えに関わるベクターに関するデータベース作りを継続した。本年度は、昨年度に引き続き市販されている

大腸菌用の遺伝子組換えベクターおよび、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、現状で入手可能なベクターをほぼ網羅的にデータベース化した。(2)オランダで開催された“国際乳酸菌シンポジウム(LAB9)” (The 9<sup>th</sup> Symposium on Lactic Acid Bacteria (LAB9)) に参加し、乳酸菌組換え体研究の成果を発表するとともに、乳酸菌を応用した遺伝子組換え微生物に関する情報収集を行った。(3)遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、大腸菌モデル組換え体を用いて、ミルク中に混入させた場合の定量的検知法について検討した。組換え体に 1 コピーのみ存在する遺伝子 (*dxs*: chromosomal D - 1 - deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene) と、複数コピー存在するプラスミド上のグラム陽性細菌のマーカーとしてしばしば用いられるエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*: plasmid erythromycin resistance gene) を標的として検知法を検討した。また、等量のモデル大腸菌を、①濃縮操作なし②PBS へ懸濁後に濃縮③牛乳へ懸濁後に濃縮、の 3 通りで PCR テンプレートを調製し、リアルタイム PCR で解析した。

## ③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究

トウモロコシは近くの八百屋で北海道産のものを購入し、可食部分を液体窒素にて急速冷凍し、-80°C で保存した。保存してあったトウモロコシを液体窒素内で乳鉢・乳棒を用いて磨碎し、*N,N,N* - cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) 法を用いてゲノム DNA を抽出した。DNA マイクロアレイは基板上に 5' 端をアミノ基修飾された合成オリゴ DNA をスポットターによってスポットし固定化した。スポット

は、アレイの向きを決定するためのマーカースポットと、ネガティブコントロールとしてDNAを含まないスポット溶液のスポットと、各プローブDNAを10箇所ずつになるように配置した。プローブ配列としては、トウモロコシ内在性の遺伝子として *alcohol dehydrogenase (ADH)* 遺伝子 (5'-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-3')、*starch syntase IIb (SSIIB)* 遺伝子 (5'-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-3')、また、組換え遺伝子のプロモーターとして使用される頻度が高いカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター配列から設計した (5'-CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT-3')。検出感度を検討するために、アレイ上にスポットした *ADH* と *SSIIB* 遺伝子のプローブ配列のアンチセンス鎖で、5'端が蛍光色素の一種である Cy3 で標識されたオリゴ DNA を合成した。ランダムプライマーによる標識反応の鋳型として、*ADH* と *SSIIB* のプローブ配列を挟み込むように約 120 bp が増幅されるように設計したプライマーを用いて、トウモロコシゲノム DNA を鋳型とした PCR によって増幅されたものを用意した。それぞれの DNA 断片のコピー数は分光光度計を用いて DNA 量を定量した値から算出した。ランダムプライマーによるターゲット DNA の標識は random primer labeling Kit ver 2 (Takara Bioinc) か BeaBEST Labeling kit を用いて、5'端が Cy3 によって標識された random nonamer か、Cy3 標識された dCTP を取り込ませることによって行った。DNA マイクロアレイ解析のハイブリダイゼーションは 470  $\mu$ l のハイブリダイゼーションバッファー (8 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.8 mM EDTA, 0.1% SDS, 4 $\times$ SSC) に

Cy3 で標識したターゲット DNA を各コピー数になるように加えたものを用いて 65 $^{\circ}$ C、4 時間で行った。その後アレイを、37 $^{\circ}$ C の 3 $\times$ SSC、0.1% SDS 中での洗浄を 1 分間、2 回行った後に、室温の 0.2 $\times$  SSC 中で 1 分間リンスした後に読取装置にセットしてシグナルを検出した。

#### 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

1) プリオンノックアウト (PRNP<sup>-/-</sup>) 牛の文献調査 インターネット検索した 2 個の論文につき内容の調査を行った。

2) プリオンタンパクを作らないウシについての検知法の研究 (a) 材料 5 品のアメリカ産牛肉を東京周辺の小売店で購入した。4 品は加工されておらず、1 品は加熱されていた。1 品の国産牛肉も同様に購入した。(b) 牛肉 DNA の抽出 牛肉サンプル 2 g から Genomic-tip 20/G (Qiagen) を使用して DNA を抽出した。得られた DNA はアガロースゲル電気泳動と GeneQuant<sup>pro</sup> 分光光度計 (Amersham Biosciences) を用いて分析した。DNA の定量は 260 nm の紫外吸収に基づいて計算した。(c) リアルタイム PCR における測定 ABI PRISM 7900HT を使用して 96 穴プレート中で 1 サンプルについて 3 ウェルを使って測定した。ネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子の測定は別個に行った。指数関数的な増幅の確認が困難になるので Ct 値が 38 以上のときは偽陽性と判断した。(d) 牛肉から抽出した DNA を無添加でのリアルタイム PCR の検量線の作成 PCR 反応液は 25  $\mu$ l として、以下の物を加えた: 12.5  $\mu$ l ユニバーサル PCR マスターミックス (Applied Biosystems)、0.75  $\mu$ l ずつ 2 種プライマー (各 10  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ l TaqMan MGB プローブ

(10 μM)、7つの濃度のテンプレート DNA (20, 200, 2.0 k, 20 k, 200 k, 2.0 M, 20 M)。テンプレート DNA を加えないネガティブコントロール反応も行った。ネオマイシン耐性遺伝子の検出のためには、pcDNA3.1(-) (Invitrogen)を *EcoRI* で制限消化したものをテンプレートDNAとして用いた。センス、アンチセンスプライマーの配列は、NeoF: CGA CCA CCA AGC GAA ACA T, NeoR :CTC TTC GTC CAG ATC ATC CTG AT。プローブの構造は、NeoPro: 6 - carboxy-fluorescein (FAM) - CAT CGA GCG AGC ACG TA - minor groove binder (MGB)。ピューロマイシン耐性遺伝子の検出のためには、pIRESpuro3 Vector(Clontech)を *EcoRI* で制限消化したものをテンプレート DNA として用いた。センス、アンチセンスプライマーの配列は、PuroF:TCA CCG AGC TGC AAG AAC TCT, PuroR:CCC ACA CCT TGC CGA TGT。プローブの構造は、PuroPro: FAM- CCT CAC GCG CGT CG- MGB。PCR の反応条件は、最初の段階の 50°C、2 分と 95°C、10 分に続いて、95°C、10 秒と 60°C、1 分を 40 サイクル行った。データ解析はリアルタイム PCR システムの解析ソフトウェア 2.1 を使った。(e)牛肉から抽出した DNA を添加したときのリアルタイム PCR の検量線の作成 上記の反応液に、最終濃度 10 ng/μl の国産牛肉から抽出した DNA、5' 端を VIC で標識した内在性 18S rRNA プライマー、プローブ (No.4319413E、Applied Biosystems) をさらに加えた。上記と同様に反応を行って、デュプレックスとして測定をした。(f)アメリカ産牛肉の実態調査 「牛肉から抽出した DNA を添加したときのリアルタイム PCR の検量線の作成」の項の国産牛肉

から抽出した DNA に代わってアメリカ産牛肉から抽出した DNA を加えた。プラスミドは加えなかった。「牛肉から抽出した DNA を添加したときのリアルタイム PCR の検量線の作成」の方法で作成した検量線を利用して、アメリカ産牛肉から抽出した DNA 中のネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を定量的に検出した。

3) 米国 FDA の遺伝子組換え(GE)動物の規制に関するガイドラインの調査 2009 年 1 月に公表した、FDA ガイドラインの日本語への仮訳を行うとともに、作成の経緯、概要についてまとめを行うことを目的とした。

#### ⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査 遺伝子組換え植物のうち、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、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。また、得られた情報を国別及び作物別に集計した。

2) 自家プロモーター発現系 GMO 及び主要組換えマーカーの検出法開発 自家プロモーター発現系 GMO モデル植物 DSH1::GUS イネ

遺伝子導入宿主植物の自家プロモーターによりマーカー遺伝子を発現するイネのモデル植物として、イネのスフィンゴ脂質合成の鍵酵素である dihydrosphingosine C4 Hydroxylase 1 のプロモーター制御下でマー

カー遺伝子である $\beta$ -glucuronidase (GUS)を  
発現する DSH1::GUS イネを使用した。

#### DSH1::GUS イネの栽培

DSH1::GUS イネ(GUS 系)及び共に譲渡を  
受けた非組換えイネ(日本晴、WT 系)の栽  
培は薬用植物資源研究センター 筑波研究  
部 薬用植物資源研究棟内グロースチャン  
バーにおいて行った。播種後約一ヶ月の実  
生苗を径 15 cm x 深さ 12.5 cm の下記の培  
養土を入れたポリポットに移植し、ばんじゅう  
A(内寸 38 x 64 x 14.5 cm)1 つあたりに 7-8  
鉢を入れ、ポット全体が浸るまで灌水した。  
培養土は、JA 粒状くみあい合成培土 3 号  
(サンアグロ全農)(N 0.4 g, P 0.8 g, K 0.6 g  
/kg)にくみあいゼオライト入粒状培土鹿沼 A  
号(鹿沼産業株式会社)(N 0.6 g, P 1.5 g, K  
0.6 g /kg)を補充したものを使用した。短日  
条件に変更した播種 61 日後に、くみあい尿  
素入り窒素加里化成 2 号 NK2 (16-0-16)を  
鉢ごとに 3 g 追肥を行った。グロースチャン  
バー内の相対湿度は全期間を通じ 60 %とし、  
照明・温度条件は、播種後 60 日目までは、  
14 時間明(温度 28°C)/10 時間暗(温度  
23°C)、61 日目から 10 時間明(温度 28°C)  
/14 時間暗(温度 23°C)の短日条件に変更  
した。

#### イネゲノム DNA の調製

イネからのゲノム DNA の調製は、新鮮葉か  
らは DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)、また、  
コメからの調製には GM Quicker 2 (Nippon  
Gene)を用いた。新鮮葉は切片調製後、2 ml  
容のスクリュウキャップチューブに入れ、ステ  
ンレスボール(4.8 mm 径)2 個と共に、キット  
添付の Buffer AP1 500  $\mu$ l と共に破砕機  
MS-100(TOMY)で 60 秒間 x 2 回(4,500 rpm)  
破砕したのち、キットのプロトコルに従いゲノ

ム DNA を調製した。コメ(玄米または精米済  
み)の場合は乳鉢乳棒を用い粉砕したのち、  
遺伝子組換え米(LLRICE601)の検知法(GM  
Quicker 2 を用いたゲノム DNA 抽出法の変  
法)に従い調製した。

#### インバース PCR(IPCR)用ゲノムライブラリー の調製

DSH1::GUS イネの文献記載の情報をもとに  
DSH1 プロモーターの 5'領域および 3'領域  
それぞれの近傍領域について、電気泳動レ  
ベルでの判別に適した増幅産物が得られる  
制限酵素サイトを検索し、その結果、5'領域  
については、*EcoRV*と *DraI*(いずれも平滑末  
端)の二重消化、また 3'領域については  
*MspI* が適当なサイズの増幅産物を与える自  
己閉環ゲノム DNA ライブラリーが作製でき  
るものと考えられた。そこで、それぞれの制限  
酵素でゲノム DNA を完全消化したのち、  
self-ligation により環状ゲノム DNA ライブラ  
リーを作製した。

#### IPCR 法による自家プロモーター系 GMO 検 知法の検証

DSH1 プロモーターの 5'領域および 3'領域  
それぞれに特異的な「外向き」プライマーを  
各 2 セット設計し、IPCR に用いた。PCR 機器  
は Perkin Elmer 社 GeneAmp 2400 を使用し  
た。反応系の組成および PCR 条件は下記で  
ある。ddH<sub>2</sub>O 77  $\mu$ l, ExTaq buffer (10 x) 10  $\mu$ l,  
dNTP 8  $\mu$ l, primer sense & antisense (100  
 $\mu$ M) 1  $\mu$ l each, genome DNA library 2.5  $\mu$ l,  
ExTaq (Takara Bio) 0.5  $\mu$ l (reaction volume:  
100  $\mu$ l), 94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C  
30 sec. - 72°C 1 min.) x 30 - 72°C 10 min.  
-4°C infinite

#### 蛍光法による GUS 米の検知法の検討

非組換え体は WT2、WT14 株を、

DSH1::GUS イネは GUS1、GUS13 株を使用した。新鮮葉約 100 mg をメスで細かく裁断し、2 ml 容のスクリューキャップ付きチューブに入れ、破碎バッファーを[新鮮重量(mg) x 4/3]μl 加えた。これに 4.8 mm 径ステンレスボール 2 個を入れ、MS-100(TOMY)で 2,000 rpm 60 秒間破碎した。いったん氷上で 1 分間静置したのちふたたび MS-100 で 2,000 rpm 30 秒間破碎した。これに 20 μl の基質溶液と 130 μl の破碎バッファーを加え 37℃で 1 時間ゆっくりと回転攪拌したのち、5,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 50 μl を新しい 0.5 ml エッペンドルフチューブに移した。これに 150 μl の反応停止バッファーを加え UV 305 nm 下蛍光を観察した。破碎バッファー: 50 mM SPB (pH 7.0), 0.1% Triton X-100, 10 mM β-ME, 1 mM EDTA, 4 - methyl - umbelliferyl - β - D - glucuronide (4MUG) 基質溶液: 10 mM 4MUG (破碎バッファーに溶解) 反応停止バッファー: 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

組織化学的染色法による GUS 米の検知法の検討

GUS 遺伝子を有する未承認遺伝子組換えパパイア(55-1)の GUS 試験法に従った 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - glucuronide (X-Gluc)を基質とする組織化学的染色法を検討した。非組換え体は WT2 株を、DSH1::GUS イネは GUS1 株を使用した。コメ(脱穀前) 12 粒をメスで殻を剥き、玄米と粃殻に分離した。新鮮葉は先端の 1 cm 程度を 5 切片に切断した。これらの試料を 15 mL コニカルチューブ入れ、X-Gluc 基質溶液を加えた(玄米 500 μl, 粃殻 1 ml)。減圧チャンバー内で 15 分間減圧処理したのち、37 °C インキュベーターで約 14 時間保温した。その後、実体顕微鏡下青色色素の有無を観

察した。X-Gluc 基質溶液: 1 mM X-Gluc in 0.2 M SPB (pH 7.0)

PCR 法による遺伝子組換えマーカーの検知  
前述の DSH1::GUS イネをモデル GM 植物に設定し、組換えマーカー遺伝子のうち、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hptII)、NOS ターミネーターのそれぞれについて特異的なプライマーを用い、モデル GM 試料より調製したゲノム DNA を鋳型に、各遺伝子の PCR 法による組換え体の検知を試みた。また、モニタリング例としてアリゾナ州ツーソンのスーパーマーケットで購入した米国市場流通米 4 種(試料コード A、B、C、D)を被試験試料とした。試料 D のみがカリフォルニア州のメーカーの製品で、他の 3 種はテキサス州のメーカーの製品であった。なお、PCR 反応の陽性対照としては内在性の SPS 遺伝子を使用した。

## 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

#### スクリーニング系の開発

マルチプレックス PCR の予備実験として、ABI9700 リアルタイム PCR 機器で増幅した各遺伝子 PCR 産物の融解曲線ピークを Rotor-gene 6000 を用いて確認したところ、35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1、hph、NPTII 各々のピークはすべて分離されていた。よって、このうちの 35S プロモーターと NOS ターミネータープライマー対、マルチプレックス PCR 用試薬を用いて 2plex PCR を実施し、Rotor-gene 6000 で融解ピークの分離がみられるかを確認したところ、2 つの遺伝子の融解ピーク分離に成功した。この 2plex PCR において、読み取り温度を

1.0°C、0.5°C、0.3°Cで比較したところ、0.3°Cで最も明確なピークの分離が可能と判断した。この条件を用いて、さらに ColE1 プラスミド、ColE1 プライマーを加えた 3plex PCR を検討した。ColE1 プラスミドの添加量は、予備試験として  $5 \times 10^{-1}$  ng/  $\mu$ L (DNA 量として 1 ng)、 $5 \times 10^{-3}$  ng/  $\mu$ L (DNA 量として  $1 \times 10^{-2}$  ng)、 $5 \times 10^{-5}$  ng/  $\mu$ L (DNA 量として  $1 \times 10^{-4}$  ng) の 3 点で比較したところ、 $5 \times 10^{-5}$  ng/  $\mu$ L が妥当と判断した。これを用いて 35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3plex PCR を行い、各々の融解ピークの分離に成功した。この 3plex PCR において、PCR のサイクル数を 35、40、45、50 で比較したところ、50 サイクルが最適だと判断した。また、これら条件において、ColE1 添加量のさらなる検討を行った結果、 $5 \times 10^{-5}$  ng/  $\mu$ L (DNA 量として  $1 \times 10^{-4}$  ng) が最適であり、 $5 \times 10^{-9}$  ng/  $\mu$ L (DNA 量として  $1 \times 10^{-8}$  ng) では ColE1 の融解ピークが検出されないことを確認した。以上の条件に hph、または NPTII を加えて 4plex PCR を検討した。チャート上の 35S プロモーターと ColE1 の融解ピークの間ピークがくるように hph と NPTII のプライマーを設計し、4plex PCR を実施したが、これまで 3plex PCR で使用していたプライマー対と干渉してしまい、成功には至らなかった。

#### データベースの確立

各分担研究者によって集計したデータをもとに、GM 動物、GM 微生物、工業原料 GM、薬用 GM の表の統一を行った。4データとも表記の統一および項目の統一を行い、「番号」、「区分」、「生物種」、「研究・開発国・機関」、「開発段階」、「遺伝子組換え法」、「導入遺伝子」、「生産物」、「生産物の種類」、「機能・薬理・特徴・用途」、「ベクター、プロ

モーター」、「ターミネーター」、「マーカー」、「備考」、「参考資料1」、「参考資料2」、「参考資料3」、「参考資料4」、「参考資料5」、「参考資料6」、「分類」の23項目を設けた。

#### 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、作年度研究用・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。本年は継続してこれらの分野のベクターに関してほぼ網羅的となるようデータベース化を行った。

新たに市販の 324 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245 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

ば erythromycin であり、chloramphenicol が使われる場合もあった。

オランダで開催された“国際乳酸菌シンポジウム(LAB9)” (The 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria (LAB9))に参加し、乳酸菌組換え体研究の成果を発表するとともに、乳酸菌の遺伝子組換えに関する情報収集を行った。

遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、DNAを標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を行った。本年度は、大腸菌モデル組換え体を対象として、ミルクに混入した場合の定量 PCR を行い具体的な検知法に付き検討した。プラスミドの分子数として100個程度あれば本法により検出が可能であることが示された。

等量の大腸菌からPCRテンプレート溶液(キレックスビーズ処理)を調製し、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子 dxs をターゲットとするプライマーと、プラスミド上にある遺伝子 ery をターゲットとするプライマーを用いて定量 PCR を行なった。その結果、ery プライマーを使用した場合の方が Ct 値は8程度高かった。

等量の大腸菌を、①濃縮操作なし②PBSへ懸濁後に濃縮③牛乳へ懸濁後に濃縮、の3通りでPCRテンプレートを調製し、リアルタイムPCRで解析した。その結果、PBSへ懸濁した場合には濃縮操作をしなかった場合と同等の検出効率であった

### ③工業原料用GM植物・生物の混入危害に関する研究

#### 1. Cy3 標識アンチセンスターゲット DNA を用いた検出感度の検討

DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知における検出感度を検討するために、

アレイに固定化したプローブ DNA のアンチセンス鎖を Cy3 標識したものを合成し、ターゲット DNA としてハイブリダイゼーションを行った。ターゲット DNA のコピー数が  $1.0 \times 10^{12} \sim 1.0 \times 10^6$  となるように希釈したものをハイブリダイゼーションバッファーに添加し、それぞれのアレイをハイブリダイゼーション、洗浄を行ってシグナルを検出した。その結果、ターゲット DNA の濃度が  $1.0 \times 10^7$  以上では十分なシグナルが得られたのに対し、 $1.0 \times 10^6$  以下ではシグナルを検出することはできなかった。このことから、今回用いたマイクロアレイの検出系ではターゲット DNA 1 分子につき 1 分子の Cy3 で標識されている場合の検出感度は  $1.0 \times 10^7$  コピー/アレイであることが分かった。

#### 2. ターゲット DNA 標識法の検討

DNA マイクロアレイでは DNA の標識方法によって感度が大きく異なる。標識方法としては PCR 法によって標識した dNTP を取り込ませる方法が最も感度が高いと考えられるが、PCR 法では各 DNA 断片の増幅効率が異なるために、ゲノム情報の欠落が生じることが知られている。そこで本研究においてはなるべく増幅せずに DNA を標識するためにランダムプライマーを用いた方法で標識を行った。ランダムプライマーを用いて標識する場合には、予めランダムプライマーを標識しておく方法と、標識された dCTP 等の基質を取り込ませて標識する方法があるが前者は、1 ターゲット DNA あたり 1 分子の標識化合物となり標識効率は比較的低いと考えられた。後者は 1 ターゲット DNA あたり複数分子の標識化合物を取り込めるため、標識効率は比較的高くなると考えられた。しかしながら後者の方法では用いる DNA ポリメラーゼの

種類や、反応に用いる標識された dCTP の濃度によって、DNA 合成効率が減少することが知られている。そこで、Cy3 標識ランダムプライマーと、Cy3 標識 dCTP と 3 種の DNA ポリメラーゼ (Klenow fragment、BcaBEST DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ) を用いて標識反応を行い、DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行った。その結果、DNA ポリメラーゼの種類は標識プライマー、標識 dCTP いずれを用いた場合においても Klenow fragment を用いた場合が最も検出感度が高いことが分かった。

次に、検出にはどの程度のコピー数が必要かについて検討するために、鋳型となる DNA のコピー数を  $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{10}$  となるように反応液に加えて標識を行ったものをそれぞれ DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、*ADH* 遺伝子、*SSI1b* 遺伝子ともに  $1.0 \times 10^9$  コピー/アレイでは十分に検出でき、*ADH* 遺伝子については  $1.0 \times 10^8$  コピー/アレイ程度まで検出できることが明らかとなった。先の標識されたアンチセンスを用いた結果では、 $1.0 \times 10^7$  コピー/アレイまで検出されていたことから、標識反応によって約 1桁感度が低下していることが示された。また、標識するには標識された dCTP を用いるよりも標識されたランダムプライマーを用いる方が効率よく検出できることが示された。*ADH* 遺伝子と *SSI1b* 遺伝子とでは検出感度に差が見られたが、各々のマイクロアレイにおいては各遺伝子に対応するスポットでのみシグナルが検出され、高い特異性で組換え遺伝子を検出できるものと考えられた。

また、ハイブリダイゼーションの時間について検討するために、1 時間、2 時間、4 時間、16 時間ハイブリダイゼーションを行った物に

ついて検出感度を検討した。その結果、4 時間ハイブリダイゼーションしたものでは 16 時間ハイブリダイゼーションしたものとほとんど検出感度が変わらないことから 4 時間のハイブリダイゼーションで十分な結果が得られるものと考察された。

#### 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

(1)プリオンノックアウト (PRNP<sup>-/-</sup>) 牛の文献調査

(a)論文1について ウシの線維芽細胞を使ってジーンターゲティングを行った。遺伝子が正しく組換えられた細胞から核を抜き出して、体細胞核移植を行い胎児まで発生させた。この胎児から線維芽細胞を得て次のジーンターゲティングを行った。対象にした遺伝子は、転写されない遺伝子として immunoglobulin- $\mu$  遺伝子、転写される遺伝子としてプリオンタンパク遺伝子を選んだ。immunoglobulin- $\mu$  遺伝子の 2 つの対立遺伝子にネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を導入した。その後で Cre-loxP 系を利用してこれらの遺伝子を除去した。続いてプリオンタンパク遺伝子にネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を導入してプリオンタンパク遺伝子を破壊した。immunoglobulin- $\mu$  遺伝子とプリオンタンパク遺伝子の 2 つの遺伝子を連続してダブルノックアウトした。つまり合計で 4 回遺伝子をノックアウトさせることができた。転写されない遺伝子のノックアウトは難しいのだが、可能であった。また、Cre-loxP 系をウシ体細胞中で利用できることを確認した。この論文では、マウス ES 細胞を使うときと同様なジーンターゲティングがウシ体細胞を使用して可能であることが述べられている。

(b)論文2について 論文1と同じ方法でプリオンタンパク遺伝子をダブルノックアウトした。得られたウシは正常に生育した。このウシはミルク、ゼラチン、コラーゲン、血清、血漿などのバイオテクノロジーで広く使用されるウシ由来の製品をプリオンの混入を受けずに生産できる可能性がある。新規遺伝子の導入などこのウシのゲノムにさらなる修飾を施せば、医療目的の組換えヒトタンパク、医療目的の臓器や組織をプリオンタンパクの混入を受けずに生産できる可能性が論じられている。

(2)プリオンタンパクを作らないウシについての検知法の研究

(a)牛肉からの DNA 抽出 加工されていない牛肉からは 63-117  $\mu\text{g}$  の DNA が抽出された。アガロースゲル電気泳動の分析結果から、抽出された DNA の多くの部分は 6.6 kb 以上の大きさだった。加熱された牛肉からは 16  $\mu\text{g}$  の DNA が抽出されて、多くは 0.2-1.4 kb だった。この結果より加熱された牛肉から抽出された DNA は分解を受けていると考えられる。

(b)検量線の作成 まず、ネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子の配列中から新規に設計したプライマーとプローブを使用してリアルタイム PCR の増幅曲線と検量線が描けて、それぞれの遺伝子を定量的に検出することが可能であることを確認した。次に、国産牛肉から抽出した DNA、10 ng/ $\mu\text{l}$  にネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドをスパイクしてリアルタイム PCR の測定を行った。ネオマイシン耐性遺伝子の検量線は、*EcoRI* で制限消化した pcDNA3.1(-)の希釈系列をテンプレート DNA として用いて計算した：

$y = -4.830x + 48.42$  ( Threshold 0.20 ,  $R^2 = 0.979$ )。ピューロマイシン耐性遺伝子の検量線は *EcoRI* で制限消化した pIRESpuro3 Vector の希釈系列をテンプレート DNA として用いて計算した： $y = -5.366x + 54.25$  (Threshold 0.16,  $R^2 = 0.973$ )。

検出限界は上の式に Ct 値 38 をあてはめて計算した。ネオマイシン耐性遺伝子の検出限界は 144 コピー、ピューロマイシン耐性遺伝子の検出限界は 1070 コピーになった。また、VIC で標識した内在性 18S rRNA プローブによって増幅曲線が描けることを確認して牛肉から抽出した DNA の質を評価した。

(c)アメリカ産牛肉の実態調査 上記の方法が牛肉の実態調査に適用できるかを検討するためにアメリカ産牛肉、5 サンプルを測定した。ときどき、微量のネオマイシン耐性遺伝子が検出された。しかし、その検出は再現性が乏しかった。存在する遺伝子量が検出限界に近いとと考えられる。ピューロマイシン耐性遺伝子は検出されなかった。内在性 18S rRNA の反応では5つのサンプルから同等の増幅曲線が得られ、Threshold を 0.20 に設定すると Ct 値はほぼ一定になり 16.8-18.9 になった。

(3)米国 FDA の遺伝子組換え(GE)動物の規制に関するガイドラインの調査

(a)FDAの GE動物の規制に関するガイドライン作成にいたる経緯 (i)2008年9月にガイダンス案 (<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/guide187.pdf>)を公表し60日間の意見募集を実行。(ii)2009年1月にコメントの要約とFDAの対応は、動物用医薬品センター(CVM)のサイトに掲載した(<http://www.fda.gov/cvm/GEanimals.htm>)。CVMは、初期段階とより完成した段階の両方でGE動物

の作出者と協働予定で、今のところ、GE 動物申請許可の決定について事前に公開で科学諮問委員会を開催する予定である。(iii) 同様に2009年1月にGE動物の規制に関する最終ガイダンス(Guidance for Industry #187 - Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs)。(http://www.fda.gov/cvm/Guidance/fguide187.pdf)を公表した(別添資料1日本語仮訳)。

(b)最終ガイダンスの概要 (i)「遺伝性rDNA構築物を有する遺伝子組換え動物の規制」と題する本ガイダンスは、連邦食品・医薬品・化粧品法(FFDCA)の動物用医薬の規定によるGM動物の規制に関する業界向け最終ガイダンスであり、FDAの規制権限を明確にし、GE動物作出者に対し、法の定める義務と責任について勧告するものである。(ii)遺伝子組換え(GE)とは、一般的に組換えDNA(rDNA)技術を用い生物に新しい特性や形質を導入することである。新たな特質の獲得を目的にDNA片を組み合わせ、そのDNAを生物に導入することをrDNA技術と呼ぶ。組み合わせられたDNA片は、rDNA構築物と呼ばれる。GE動物は新たな特性や形質の付与を意図したrDNA構築物を含む。(iii)本ガイダンスはGE動物由来製品の安全性と有効性を確認するための申請の効率的な評価を助けるものである。(iv)FFDCAでは、「ヒトあるいは他の動物の身体構造や生体機能に影響を与えることを意図する(食品以外の)物品」を医薬品と規定している。GE動物のrDNA構築物は、動物の構造や機能に影響を与えることを意図しており、当該動物が食用に意図された、あるいは、ある種の物質を産生するのに用いられるかに係らず、動

物用医薬品の定義に合致する。GE動物開発者は、構築物及び/もしくは挿入された構築物により発現した新規生成物がGE動物の健康に対する安全性と食用動物であれば食品としての安全性を証明しなければならない。本ガイダンスは、国家環境対策法に基づく環境評価の要件を満たすとの事業者の責任も明記している。

#### ⑤医薬品及び環境浄化目的のGM植物の調査研究

1. 2005-2008年の米国における薬用GM植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況<sup>1)</sup>

U.S. Department of Agriculture (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)の情報公開サイト「Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS」で、2005年から2008年まで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申請・認可状況を調べた(2009年1月16日現在)。

2006年は認可面積589.00エーカーに対し、181.64エーカーに作付けが行われ、2007年は認可面積811.08エーカーに対し、176.08エーカーに作付けが行われた。2008年の認可面積は2650.50エーカーと、2007年の約3.3倍であるが、作付けが行われた面積は未だ公開されていない。

2006年から2009年までの薬用及び環境浄化用GM植物米国野外圃場作付け申請・認可状況より、2009年は既に6社から10件の申請が行われ、作物は、トウモロコシ、イネ、ペニバナ、オオムギ、ポプラである。2008年は、8社から13件の栽培が申請され、そのう

ち5件が作付けされ、作物はイネ、ベニバナ、トウモロコシ、ポプラである。ベントリア社のラクトフェリン生産イネ、リゾチーム生産イネ及びヒト血清アルブミン生産イネは、ノースカロライナ州及びカンザス州で栽培され、ノースカロライナ州では100エーカー以上、カンザス州では3200エーカーまでの栽培が計画され作付けされた。なお、ベントリア社はHPで、ラクトフェリンの増産を公表している(2008年10月1日付け)。

ベントリア社のGMイネは2006年以降100エーカー以上の栽培の申請が行われるようになっており、2007年からは3000エーカー以上の申請と栽培申請面積が急速に拡大している。

## 2. 2006-2009年1月に公表・出版された薬用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2006-2009年1月の情報(2009年1月末現在)、World Congress on In Vitro Biology, Tucson, Jun.14-18, 2008 Abstract、2006-2008年に国内で開催された日本植物細胞分子生物学会講演要旨集、日本農芸化学会及び第26回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集(主催:バイオテクノロジー開発技術研究組合)から、薬用GM植物に関する情報を収集した。収集した情報179件をそれぞれのカテゴリ別に集計した結果、機能性食品・嗜好品:44件、経口ワクチン:35件、食用医薬:9件、ワクチン抗原:20件、抗体医薬:23件、治療薬:22件、診断薬・試薬:5件、環境浄化:21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・嗜好品および経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。

また、国別の件数を集計した結果、米国:51件、日本:45件に次ぎ、中国:21件、ドイツ:9件、韓国:7件であった。米国、日本及び中国は、幅広いカテゴリーでの開発研究が進んでおり、ドイツは機能性食品・嗜好品と抗体医薬、韓国は経口ワクチン、治療薬と機能性食品・嗜好品の開発研究が行われていた。さらに作物別に集計した結果、タバコ60件に次いでイネ18件、トマト12件が多かった。

## 3. 自家プロモーター発現系GMの検知法開発

前記の文献調査により、穀類、特にイネを中心とした利用の拡大が明らかになった。組換えイネは、繁用プロモーターだけでなく、特にイネ種子(米)の利用を目的とする場合、自家プロモーターによる標的遺伝子の発現系が用いられる場合が多い。そこで、自家プロモーター制御下の標的遺伝子を有するGM植物の検知法として、塩基配列既知領域の周辺未知領域の遺伝子情報解析に用いられるインバースPCR(IPCR)法の適用の可否について、自家プロモーター発現系のモデルGM植物を設定し、検知技術の開発及び検証を行った。

3-1. IPCR法による自家プロモーター発現系GM検知法の戦略 イネにおけるグルテリンプロモーターやアクチンプロモーターのような自家プロモーター発現系のGMは、ホストと同じプロモーターで発現を行うため、在来又は繁用のプロモーターに対するPCRによるスクリーニング法では、同じサイズの増幅産物を与えるため、判別が不可能であった。しかしGMと非GMでは、プロモーターは同じでも、その周辺配列は異なるため、試料のゲノムDNAを制限酵素消化した

のち自己閉環ライブラリーを作成し、プロモーター領域から周辺配列方向へ PCR を行うインパース PCR(IPCR)法により、GMO 特異的な増幅産物が得られる。この原理を利用したのが、IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO の検知法である。

具体的には、解析対象植物から抽出したゲノム DNA を適当な制限酵素で消化し、self-ligation により自己閉環ゲノム DNA ライブラリーとする。これを鋳型として、プロモーター等の「組換えマーカー」領域に特異的なプライマーで「外向き」に PCR を行い、既知配列の周辺部の配列情報を取得するもので、非組換え体と組換え体の PCR 増幅産物を電気泳動で解析した場合、理論的には組換え体の方が非組換え体と比較して、1 本以上多くのバンドが観察される。

3-2.モデル GM イネ植物 モデル GM イネは DSH1 遺伝子の機能解析の過程で、発現部位解析のため東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章研究室において作製されたものであり、DSH1 プロモーター制御下で GUS を発現する植物である。形質転換用ベクター pCAMBIA1301 をバックボーンとするコンストラクトがイネ日本晴にアグロバクテリウム法により導入されている。組換えイネは同研究室より実生苗として譲渡を受けた。なお、DSH1 遺伝子の発現部位は stigma(柱頭)、vascular bundle(維管束)、apical meristem(茎頂分裂組織)と報告されている。

#### DSH1::GUS イネの栽培

短日条件変更後 12 日後に出穂、開花が認められ、播種後 102 日目に株ごとに根元から約 10 cm で刈り取り、穂を自然乾燥した後、種籾として収穫した。DSH1::GUS イネおよび

非組換え体は、グロースチャンパーにおいて良好に稔実し、コメが収穫された。なお、両者の間で顕著な形態の差異は認められなかった。

3-3.PCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法の検証 DSH1::GUS イネは文献<sup>179)</sup>記載の情報から図 3 に示すような遺伝子構造を有すると推定されたので、これをもとに DSH1 プロモーターの 5'領域および 3'領域それぞれの近傍領域について、電気泳動レベルでの判別に適した増幅産物が得られる制限酵素サイトを探索し、その結果、5'領域については、*EcoRV*と *DraI*(いずれも平滑末端)の二重消化、また 3'領域については *MspI*が適当なサイズの増幅産物を与える自己閉環ゲノム DNA ライブラリーが作製できるものと考えられた。そこで、それぞれの制限酵素でゲノム DNA を完全消化したのち、self-ligation により環状ゲノム DNA ライブラリーを作製した。

DSH1 プロモーターの 5'領域および 3'領域それぞれに特異的な「外向き」プライマーを各 2 セット設計し、IPCR を実施した。その結果、両領域において非組換え体と組換え体に共通な増幅産物のバンドに加え、DSH1::GUS イネに特異的な増幅産物のバンドが検出された。これは IPCR 法が自家プロモーター発現系 GM 植物の検知に有効であることを示すものである。

ところで、DSH1::GUS イネにおいては、IPCR の増幅産物は文献記載のコンストラクトの情報から想定していたものとは異なる増幅産物のサイズを与えた。この理由を解明するため、増幅産物を T-vector にクローニングし、塩基配列を解析したところ、自己閉環ライブラリー調製時の self-ligation の際に

他の制限酵素消化断片とのランダムな ligation が起きていることが判明した。これは、IPCR 法による組換え体検出時のノイズ(余分な増幅産物)となるもので、今後、非特異的な他の消化断片とのライゲーションを低減させる反応条件の検討等が必要である。

3-4.GUS 米の検知法の検討 GM 植物作出の際に高頻度で使用されていることが調査研究により明らかになった主要な組換え体選抜マーカーのうち、 $\beta$  - glucuronidase (GUS)について、酵素活性を検知指標とした蛍光法及び組織化学的染色法の組換え体検知への適用の可否を、DSH1::GUS イネを材料に検討した。

#### GUS 米検知法(蛍光法)

4MUG を基質とした蛍光法では、新鮮葉より調製した粗酵素液を用いたアッセイで、DSH1::GUS イネにおいて非組換え体には見られない強い蛍光が観察された。しかしながら、玄米またはその籾殻を用いた非破壊的なアッセイでは、蛍光強度の差は認められなかった。

#### GUS 米検知法(組織化学的染色法)

X-Gluc を基質とした組織化学的染色法では、DSH1::GUS イネの玄米の胚芽部に 12 粒中 11 粒において青色呈色が認められた。一方、DSH1::GUS イネの籾殻や、非組換え体の玄米、籾殻においては青色を呈した部位は認められなかった。葉の切片については、DSH1::GUS イネにおいて葉の切断面からわずかに青色色素の浸潤が認められた。

3-5.PCR 法による遺伝子組換えマーカーの検知の試み 本研究の調査結果から、GM 植物で使用される頻度が高い遺伝子は「組換えマーカー」として、それらを標的とした PCR 法による組換え体のスクリーニングに使

用できる可能性が示された。そこで、前述の DSH1::GUS イネをモデル GM 植物に設定し、組換えマーカー遺伝子のうち、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hptII)、NOSターミネーターのそれぞれについて特異的なプライマーを用い、モデル GM 試料より調製したゲノム DNA を鋳型に、各遺伝子の PCR 法による組換え体の検知が可能か検討した。また、モニタリング例として、アリゾナ州ツーソンのスーパーマーケットで購入した米国市場流通米 4 種(試料コード A、B、C、D)を被試験試料とした。試料 D のみがカリフォルニア州のマーカーの製品で、他の 3 種はテキサス州のマーカーの製品であった。なお、PCR 反応の陽性対照としては内在性の SPS 遺伝子を使用した。

CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、NOS ターミネーターのそれぞれについて米国市場流通米より調製したゲノム DNA を鋳型に各遺伝子の検知を試みた。その結果、陰性対照(非 GM)の日本晴、陽性対照の DSH1::GUS イネは良い対照となることが確認されたが、モデル試料として使用した米国市場流通米 4 種からはいずれの遺伝子も検出されなかった。

#### 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

極めて高い温度分解能を持つ装置を用いることで、マルチプレックス PCR の融解曲線ピーク分離を実現し、35S プロモーター、NOS ターミネーターの増幅と同定を同時に行うことが可能になった。それと同時に今回 PCR 実行の陽性コントロールとして ColE1 を置くことで、各 PCR の妥当性を評価しつつ、正

確な PCR のモニタリングが可能となった。今後さらに特異的なプライマーを検討し、多検体・多遺伝子を同時にスクリーニングする上で大変有用になると考える。

## 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。昨年度は、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。本年度は引き続き、さらに 324 についてデータベース化した。これにより、研究用の個別にしか入手出来ないベクターを除き、現在一般的に入手することの可能な主な大腸菌用ベクターはほぼ網羅的にデータベース化できたと思われる。大腸菌の遺伝子組換えで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。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る。

乳酸菌組換え用のベクターについても、昨年度データベース化できなかったものについて 245 を追加し整理した。宿主として *Lactobacillus* 属と *Lactococcus* 属用がほとんどで、これらの菌での遺伝子組換えが進ん

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多く、chloramphenicol なども使われていた。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。

“国際乳酸菌シンポジウム(LAB9)”で発表されている多数の演題の中で、遺伝子組換え微生物のに関するものはワクチン開発関連で報告が見られた。乳酸菌組換えに関しては、将来的には経口ワクチンの抗原運搬体として遺伝子組換えを利用する可能性が高いと思われた。

遺伝子組換え微生物の定量的検知法に関し検討を進めた。本年度は、モデル組換え体として大腸菌を対象として、DNA を標的として定量 PCR を行い評価した。この検出系では、プラスミドの分子数として 100 個程度あれば定量的な検出が可能である。プラスミドを添加した牛乳サンプルを直接 PCR 反応液に加えた場合(16 倍希釈)、検出は可能であったが、PCR 産物の増幅曲線は異常であった。なんとか定量測定は可能であるが検出感度は低下してしまうことから、ミルクのような検体については遺伝子の抽出法が重要であると思われる。

等量のモデル大腸菌から PCR テンプレート溶液を調製し、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子をターゲットとした場合と、プラスミド上にある遺伝子をターゲットとした場合を比較すると、プラスミド上のマーカー遺伝子 *ery* をターゲットとした場合の方が Ct 値は 8 程度高かった。この差は、大腸菌内でのプラスミドのコピー数を反映しており、そのコピー

数が $10^2$ オーダーであることが推察された。等量のモデル大腸菌を、①濃縮操作なし②PBSへ懸濁後に濃縮③牛乳へ懸濁後に濃縮、の3通りでPCRテンプレートを調製し、リアルタイムPCRで解析した結果、PBSへ懸濁した場合には濃縮操作をしなかった場合と同等の検出効率であったため、濃縮作業による大腸菌の損失は少ないと考えられた。一方、牛乳からの濃縮では、検出効率が著しく低下していたことから、この作業によって大部分の大腸菌が失われたことが示唆された。

#### 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

ここでは、3つの研究項目のうち、(2)プリオンタンパクを作らないウシについての検知法の研究についての考察を記す。本研究ではPRNP<sup>+</sup>ウシを検知するためにリアルタイムPCRを用いた。本分析法の原理はPRNP<sup>+</sup>ウシのゲノムに導入されたネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を定量的に検出することに基づく。TaqMan chemistryなどの蛍光色素を利用したリアルタイムPCRはすでにGMダイズ、GMトウモロコシ、他のGM品種の農産物の検知や定量、さらには食品中の豚肉、牛肉、鶏肉、ヒツジの肉、馬肉の検出に使われており、広く受け入れられている。

本研究においてはPRNP<sup>+</sup>ウシの肉を入手することはできず、コンストラクト特異的な配列の情報が得られなかった。そこで、ネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドをスタンダードとして利用した。検知したい配列を含むプラスミドをスタンダードとして利用する方法はGMOの分析で今までに採用されてきており、本研究においても妥

当であると考えられる。リアルタイムPCRのプライマーとプローブは2つの耐性遺伝子の配列の内部から新規に設計した。

その新規に設計したプライマーとプローブを用いてリアルタイムPCRの測定が可能であることを確認した。次に、牛肉から抽出したDNAにスパイクしたネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドをリアルタイムPCRによって定量的に検知できることを確認した。日本市場の牛肉中のPRNP<sup>+</sup>ウシ由来産物の検知にこの測定法が適用できるかを調べた。この方法を用いて日本国内で販売されているアメリカ産牛肉、5サンプルを調べた。この調査において、ときどき微量のネオマイシン耐性遺伝子が検出された。国産牛肉を調べたときも同様な結果であった。この結果は、牛肉サンプル中に存在していた細菌にときどき共存するトランスポゾン、Tn5やTn601が混入していたと推定される。ネオマイシン耐性遺伝子はこれらのトランスポゾンに起源があり、本分析法ではPRNP<sup>+</sup>ウシのゲノムに挿入されたものと区別できない。また、牛肉サンプル中に混入している細菌を分析前に完璧に除去することは現実的に非常に難しい。したがって、本分析法の実態調査においてPRNP<sup>+</sup>ウシ検知の陽性の基準は、ネオマイシンとピューロマイシン耐性遺伝子をサンプルが同等のコピー数で含むこととするのが適切である。この基準で判断すると、今回実態調査で調べたアメリカ産牛肉5品はいずれもPRNP<sup>+</sup>ウシに由来しないと考えられる。

加熱した牛肉から抽出したDNAは分解を受けていた。しかし、リアルタイムPCRにおける内在性18S rRNA反応の増幅曲線は未加工の牛肉由来のDNAを使用したときと同等で