

あり、加熱した牛肉についてもこの方法で分析できると考えられる。しかし、加熱した牛肉では検出感度が低下することが考えられる。複雑な加工を受けたサンプルを調べるためには今回の方法をさらに改良する必要があると思われる。

ところで、ウシゲノムのサイズはおおよそ 3×10^9 bp である。C 値を用いてウシゲノムの DNA 量を求めるとおおよそ 3 pg である。本研究の実態調査ではアメリカ産牛肉から抽出した DNA を 250 ng 使った。これはおおよそウシゲノムの 8×10^4 コピーに相当する。結果の項に記したリアルタイム PCR の検出限界を考慮すると、PRNP⁺ウシ由来の材料を調べていて混入率が 100% ならば、標的遺伝子を十分に検出できると考えられる。また、ひき肉を調査するときには PRNP⁺ウシと通常のウシに由来する肉が混合されることが考えられる。現在の日本における GM 作物の表示の規制の閾値が 5 % であるが、もし、ひき肉についても将来に同様な規制が作成されたとすれば、本研究の方法で閾値 5 % 以上のひき肉を検知することができるであろう。混入率の低いサンプルを調べるには今回作成した方法をさらに改良する必要がある。

ネオマイシン、ビユーロマイシンの耐性遺伝子は培養細胞に遺伝子修飾を施すときに選抜マーカーとして広く使われてきた。したがって本分析法で陽性のサンプルが見出されても、PRNP⁺ウシ由来産物であるとは特定できない。しかし、本分析法で陽性サンプルが見出されるならば、何らかの遺伝子改変ウシに由来することが強く疑われるので、さらに詳細な分析をする必要性が示される。総括すると、本研究では、PRNP⁺を含めた遺伝子改変ウシ由来サンプルを迅速にスク

リーニングする方法を作成した。原理はウシゲノムに導入されたネオマイシン、ビユーロマイシン耐性遺伝子をリアルタイム PCR によって定量的に検出することに基づく。今回の実態調査で調べたアメリカ産牛肉はすべて陰性だった。今回作成した方法にさらに検討を加えて日本市場の牛肉を調査する態勢を整えたい。

⑤ 医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

2006 年から 2009 年 1 月末までの薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を収集し、カテゴリー別に整理し分類した。野外圃場栽培状況については、インターネット上で情報が公開されている米国について調査した。

米国における薬用 GM 植物野外圃場栽培の経年の認可面積の増減は、2005 年から 2006 年は 1.75 倍の増加、2006 年から 2007 年は 1.02 倍の増加で、作付け面積の増減は、2005 年から 2006 年は 2.2 倍の増加、2006 年から 2007 年は 0.97 倍の減少である。昨年までは増加の一途を辿っていた野外圃場栽培申請・作付け面積が、2006-2007 年ではほとんど変化がない。しかし、2007 年から 2008 年の認可面積の変化は 3.27 倍の増加で 2006 年から 2007 年の 1.02 倍に比べて増加が著しい。2008 年の作付け面積は未だ公表されていないが、この認可面積の増加が、作付け面積の増加に反映されているかどうかは、引き続き注視する必要があると思われる。

2006-2009 年 1 月末に収集した情報 179 件をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、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。

国内学会は学会講演要旨等の情報が得られやすく、2008 年は米国学会での調査も行ったため、日本、米国に関しては比較的多数の情報が収集できた。しかしながら、その他の外国の情報は、インターネット及び SciFinder による文献検索に限られてしまうため、最新情報を得るのは困難である。それにも関わらず、中国及び韓国の件数が多かったことは、実際にはそれらの国でより多くの研究が活発に行われていることを示唆している。

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。イネ及びトマトは国内での栽培も盛んであるが、国外から輸入もされている。中国及び韓国は日本と距離が近く、日本の農産物の主な輸入元である。今後、未承認の薬用及び環境浄化用 GM 植物が誤って食品として輸入されないように、さらに情報を収集する必要があると思われる。

調査の結果、実験植物で繁用されるタバコについて、イネが薬用 GM 植物ホストとしての利用頻度が高く、自家プロモーター発現系での挿入遺伝導入も行われていることが明らかになったため、DSH1::GUS イネをモ

デル植物として、IPCR 法が自家プロモーター発現系 GMO の検知に適用可能であるか否かを検討し、有用であることを実証した。しかしながら、IPCR の増幅産物は予想した数よりも多く出現した。これらの予想しない増幅産物は、ゲノム DNA の自己閉環ライブラリー作成時に複数の制限酵素消化断片が非特異的にライゲーションするために生成することが判明したので、より高精度の検知のためには、自己閉環ライブラリー作成時のライゲーション条件等の検討が必要と考えられる。レポーター遺伝子の GUS 遺伝子は、他の植物同様、組換えイネの作出に繁用されている。そこで、未承認パパイア検知法を応用した組織化学的染色法を DSH1::GUS イネに適用した。その結果、胚芽における GUS 活性の検知に成功し、本法が GUS 遺伝子を持つ遺伝子組換え米の検出法として有用であることを示した。本法は、実際には GUS 遺伝子の発現部位のターゲット化により組換え体ごとに GUS による青色呈色部位が異なると予想されるが、胚芽もしくは胚乳において GUS を発現する組換えイネならば簡便な検知法として実用可能と考えられる。

さらに、DSH1::GUS イネを陽性対照、米国市場流通米をモニタリング被検試料として「組換えマーカ」遺伝子の PCR 法による検知を試みた。今回入手した米国市場流通米からはいずれの遺伝子も検知されなかったが、非食用 GM 植物においてはマーカ遺伝子の残留の可能性が高いと危惧されるため、本法の開発は意義のあるものと考えられる。

E 結論

① 非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究

データベースとスクリーニング法を参考に、GM 体に用いられる共通組換え遺伝子が検知された検体について、各内在性遺伝子(トウモロコシ、ダイズ、コメ、ジャガイモ等)や詳細解析から、非 GM 体を絞っていくことが可能であると思われる。

② 産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究

非食用バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。昨年度に引き続き情報収集をすすめ、市販の大腸菌用遺伝子組換えベクターと主に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、データベース化をほぼ終了した。乳酸菌研究で遺伝子組換えに関する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、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具体的な検討を進めた。

③ 工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究

トウモロコシゲノムのサイズは約 3.0 Gbp と見積もられている。その場合トウモロコシゲノムに 1 コピー存在する遺伝子は、1 μg のゲノム DNA には約 6.0×10^4 コピー存在することになる。そのため、例えば 5 % 程度の混入率を検知するためには 6.0×10^4 コピーのものを検出する必要があると考えられた。

今回のモデル実験では検出感度の限界は 1.0×10^7 コピー/アレイであったことから、3 桁検出感度が足りていないことが明らかとなったが、30 μg のトウモロコシゲノムを用いた場合には 1 コピーの遺伝子のコピー数は 1.8×10^7 コピーとなることから標識するゲノム DNA 量を増加させることで混入率 1 割程度

の組換え遺伝子を検知可能であると考えられる。

今後、検出感度を上げるために抗原-抗体反応を利用した蛍光増強法や、蛍光標識ではなく、アルカリンフォスファターゼを用いた化学発光系を利用することで、混入率 1% 以下の組換え遺伝子も検出することが可能であると期待される。

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

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。2008 年 6 月に Codex の組換え動物に関するガイドラインが採択され、2009 年 1 月に米国 FDA の遺伝子組換え(GE)動物の規制に関するガイドラインが作成されたのに伴い、今後、ますます食用、非食用を問わず組換え動物の開発はすすんでくるものと思われる。このような近年の状況下、組換え動物の開発状況についての情報収集を行うとともに、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確立してゆくことがますます必要になると思われる。

⑤ 医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

薬用遺伝子組換え(GM)植物の範囲を、GM 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用及び環境浄化用 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分類した。米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場栽培の認可面

積は、2006 年 589.00 エーカー、2007 年 811.08 エーカー、2008 年 2650.5 エーカーと最近急速に拡大している。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。

上記の調査研究結果に基づき、検知対象 GMO として設定した医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物を主とする非食用 GMO、とくに、自家プロモーター発現系 GM 植物については、その検知法として IPCR 法が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。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

1. Nakajima O., Akiyama H., Teshima R.: Real-Time PCR detection methods for genetically engineered cattle in meat sample. (in preparation)

2. Kim T.W., Igimi S., Kajikawa A., Kim H.Y.: Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. J. Appl. Microbiol., 104(6): 1636-1643, 2008
3. Kajikawa A., Igimi S.: Reduction of TNF- α inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* caused by the expression of *Salmonella* OmpC. Appl. Environ. Microbiol., 2009: Epub ahead of print

学会発表

1. 山田千尋、穂山浩、中村文美、中島治、張替直輝、古井聡、橋田和美、川上浩、手島玲子: 未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング検知法について 日本食品化学学会、第 15 回総会、2009.5
2. 五十君静信: 遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発 日本微生物資源学会、第 15 回大会、2008.7、千葉
3. Kajikawa A., Igimi S.: Expression of *Salmonella* OmpC in recombinant *Lactobacillus casei* induced an attenuated pro-inflammatory response of RAW264.7 cell. 9th Symposium on Lactic acid bacteria. 2008.8.31-9.4. Egmond aan Zee (The Netherlands)
4. 五十君静信: 遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン 第 11 回日本臨床腸内微生物学会、2008.9、東京

H 知的財産権の出願・登録

なし

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

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

研究要旨

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 T_m 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。

協力研究者

中村文美（国立医薬品食品衛生研究所）
山田千尋、川上浩（共立女子大学大学院）

A. 研究目的

現在、非食品用途の遺伝子組換え（GM）農作物の多様化が進んでおり、スクリーニングの段階において複数遺伝子の存在を広範囲、かつ同時に確認する方法が必要とされている。また、数検体同時にスクリーニングを行うことで、GM 検知の高速かつ高処理化が期待される。そこで本研究では広範囲の GM 農作物を同時に検知可能な分析法の開発を検討した。また昨年度得られた非食用 GM 体の開発状況をデータベース化することを検討した。

B. 研究方法

- 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、 $1\times$ PCR 緩衝液、 0.16 mmol/L dNTP、 1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、 $0.6\mu\text{mol/L}$ $5'$ 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、 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ に調製した DNA 試料液 $5.0\mu\text{L}$ (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 GreenTM (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、 $1\times$ EvaGreenTM、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 20ng) 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℃で15分間加温し、95℃30秒間、60℃90秒間、72℃90秒間を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応後、72℃10分間、95℃30秒間加温した後、72℃から99℃まで温度を上昇させ読み取り温度0.3℃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℃、0.5℃、0.3℃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。

C. 研究結果

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、ColEI、hph、NPTII各々のピークはすべて分離されていた(図1)。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(図2-1)。この2plex PCRにおいて、読み取り温度を1℃、0.5℃、0.3℃で比較したところ、0.3℃で最も明確なピークの分離が可能と判断した(図2-2)。この条件を用いて、さらにColEIプラスミド、ColEIプライマーを加えた3plex PCRを検討した。ColEIプラスミドの添加量は、予備試験として $5 \times 10^{-1} \text{ng}/\mu\text{L}$ (DNA量として1ng)、 $5 \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{L}$ (DNA量として $1 \times 10^{-2} \text{ng}$)、 $5 \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{L}$ (DNA量として $1 \times 10^{-4} \text{ng}$)の3点で比較したところ、 $5 \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{L}$ が妥当と判断した(図3)。これを用いて35Sプロモーター、NOSターミネーター、ColEIの3plex PCRを行い、各々の融解ピークの分離に成功した(図3)。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(図

4-1)。また、これら条件において、ColEI添加量のさらなる検討を行った結果、 $5 \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{L}$ (DNA量として $1 \times 10^{-4} \text{ng}$)が最適であり、 $5 \times 10^{-9} \text{ng}/\mu\text{L}$ (DNA量として $1 \times 10^{-8} \text{ng}$)ではColEIの融解ピークが検出されないことを確認した(図4-2)。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ColEIの融解ピークの間に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。

D. 考察

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ColEI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。

E. 結論

データベースとスクリーニング法を参考に、GM体に用いられる共通組換え遺伝子が検知された検体について、各内在性遺伝子(トウモロコシ、ダイズ、コメ、ジャガイモ等)や詳細解析から、非GM体を絞っていくことが可能であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング
検知法について、山田千尋、槐山浩、中村文
美、中島治、張替直輝、古井聡、橘田和美、
川上浩、手島玲子 日本食品化学学会・第
15回総会（2009.5）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1. 1plex PCR 増幅産物の融解(一次微分)曲線

サンプル : GM もち米

読み取り温度 0.3℃

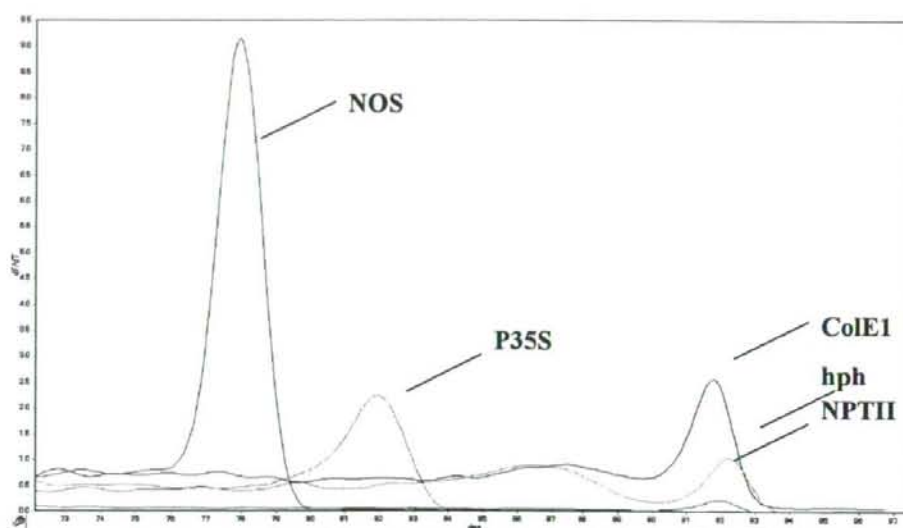


図 2-1. P35S プロモーター、NOS ターミネーターの 2plex PCR 融解曲線

サンプル：GM もち米

読み取り温度 0.3℃

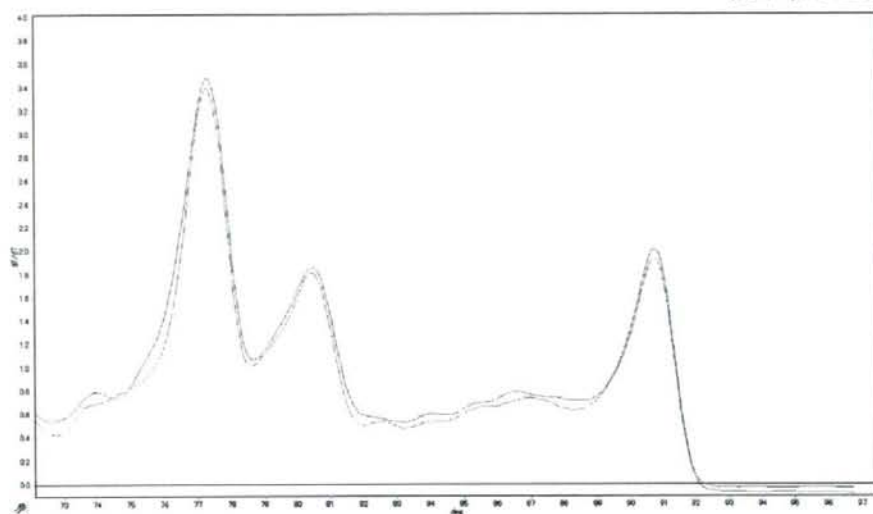
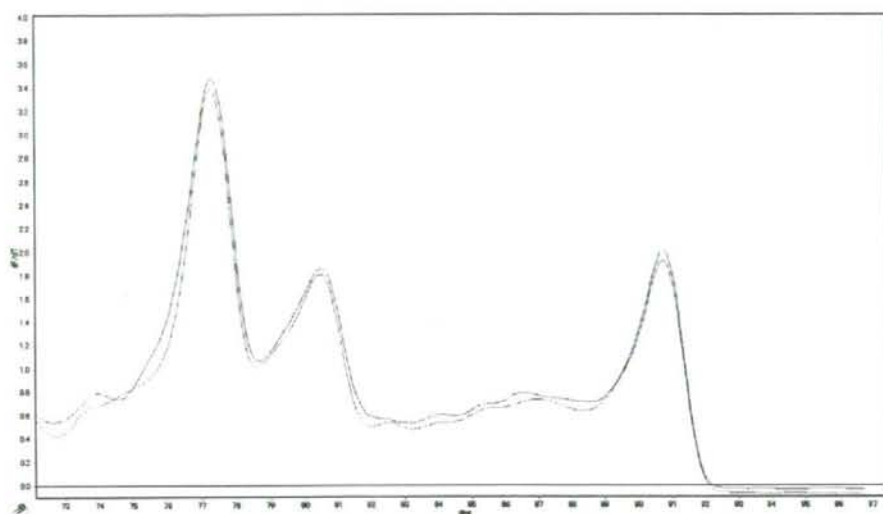


図 2-2. P35S プロモーター、NOS ターミネーターの 2plex PCR 融解曲線
読み取り温度比較

サンプル：GM もち米

読み取り温度 0.5℃



サンプル：GM もち米

読み取り温度 1℃

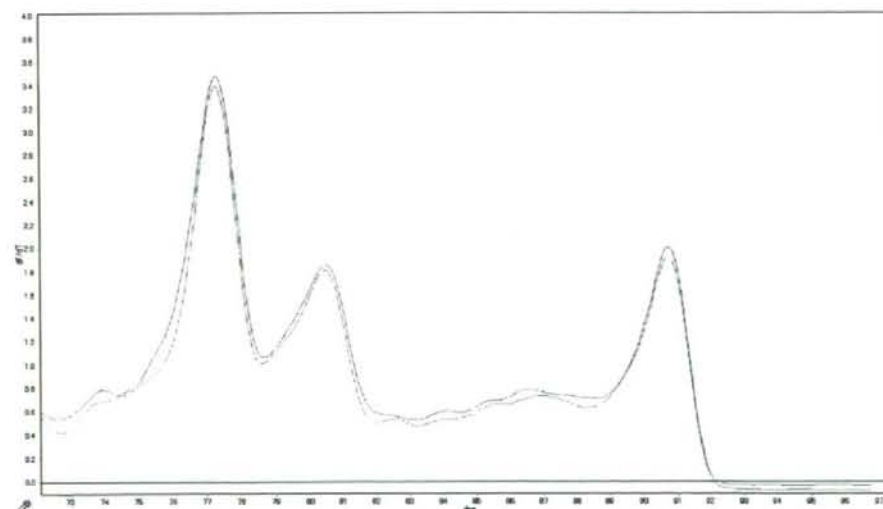
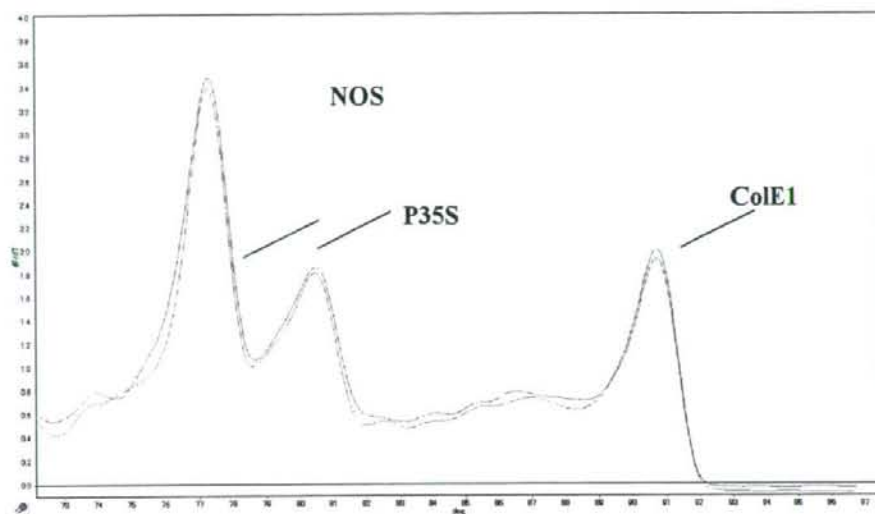


図 3. P35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3plex PCR 融解曲線

サンプル：GM もち米

読み取り温度 0.3℃



サンプル：nonGM もち米 (赤字)

NTC (青字)

読み取り温度 0.3℃

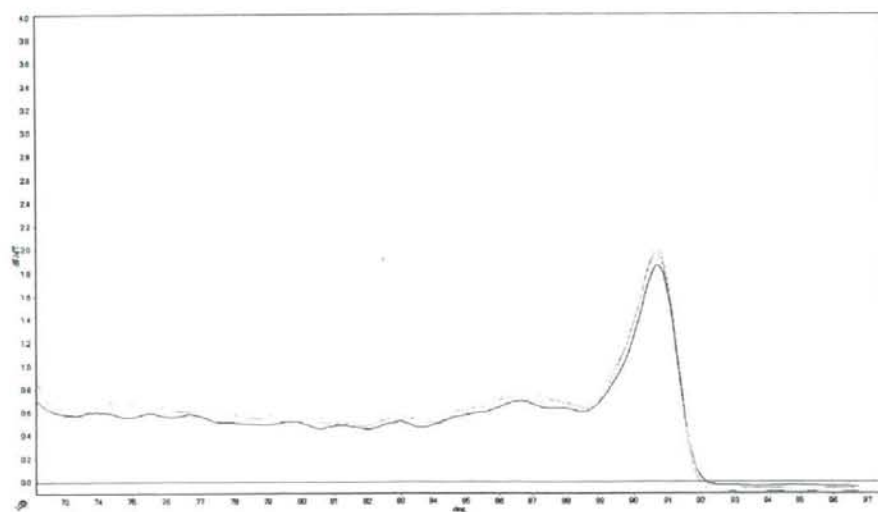
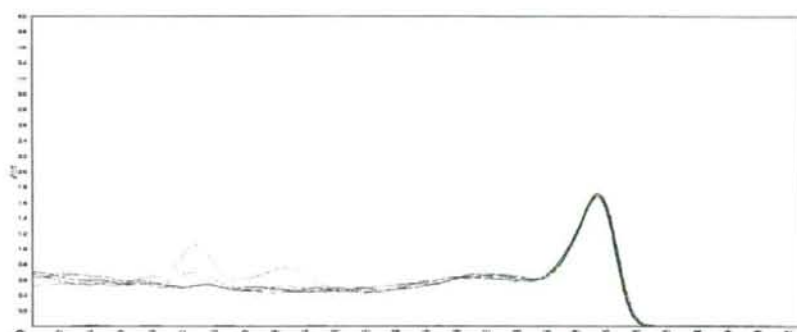


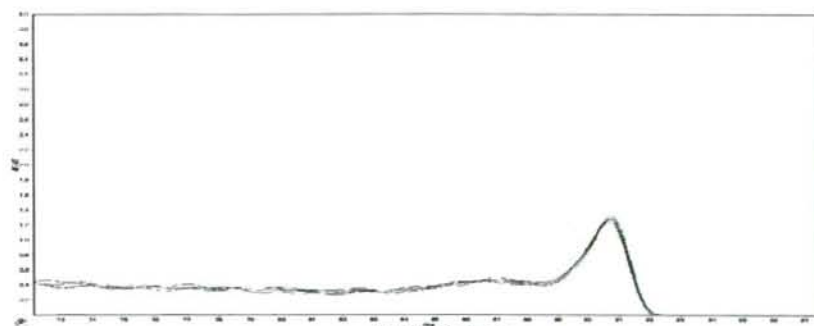
図 4-1. P35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3plex PCR 融解曲線

PCR サイクル数比較

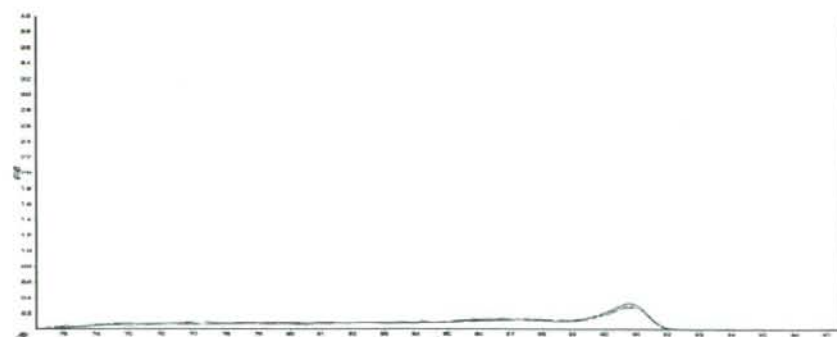
すべて GM もち米サンプル、読み取り温度 0.3℃



45 サイクル



40 サイクル

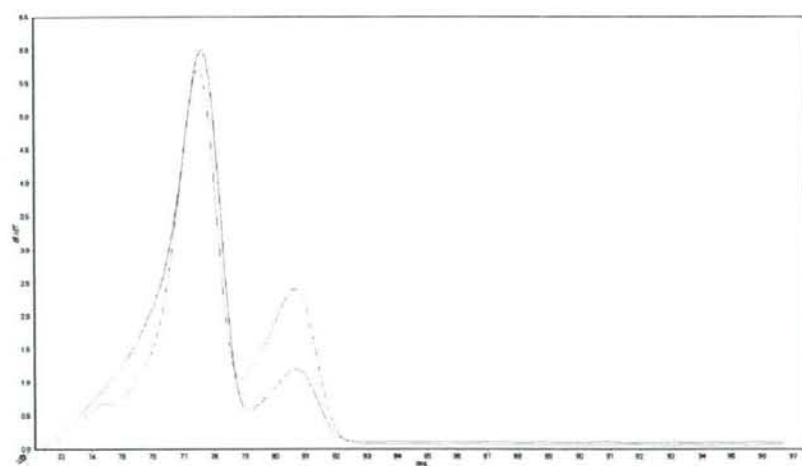
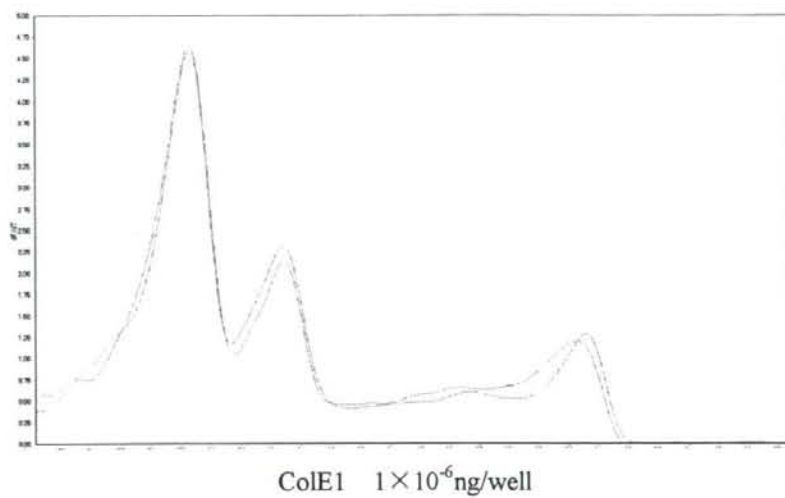


30 サイクル

図 4-2. P35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3plex PCR 融解曲線

ColE1 添加量比較

すべて GM もち米サンプル、読み取り温度 0.3℃



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

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

研究要旨

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。

協力研究者

食品衛生管理部 梶川 揚申

食品衛生管理部 梶田 和彌

食品衛生管理部 吉田 朋高

の動向の調査研究を行う。このような情報を基に、非食用バイオテクノロジー応用微生物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用と思われる検知技術の検討を行う。

A. 研究目的

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実用化されており、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

B. 研究方法

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 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。

C. 研究結果

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。(添付資料1:市販大腸菌用ベクターリスト H20 年度追加分参照)

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ぼ erythromycin であり、chloramphenicol が使われる場合もあった。(添付資料2:乳酸菌用発現ベクターリスト H20 年度追加分参照)

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 (図 1)。

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 (図 2)。

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 (図 3)

D. 考察

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る。

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 (図 1)。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 10^3 オーダーであることが推察された (図 2)。

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。

E. 結論

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。昨年度に引き続き情報収集をすすめ、市販の大腸菌用遺伝子組換えベク

ターと主に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、データベース化をほぼ終了した。乳酸菌研究で遺伝子組換えに関する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、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出法に関し具体的な検討を進めた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

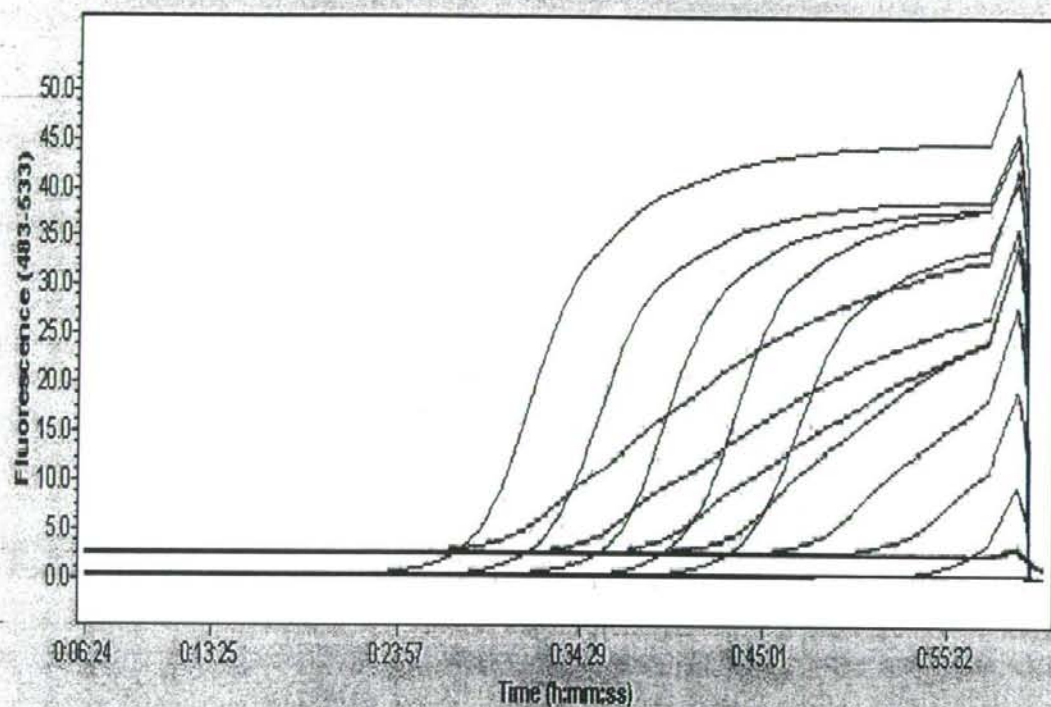
1. Kim TW, Igimi S, Kajikawa A, Kim HY. Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. J Appl Microbiol. 104(6):1636-1643. 2008.
2. Kajikawa A., and Igimi S. Reduction of TNF- α inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* caused by the expression of *Salmonella* OmpC. Appl. Environ. Microbiol. 2009 Epub ahead of print

学会発表

1. 五十君 静信. 遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発. 日本微生物資源学会第 15 回大会. 2008.7. 千葉
2. Kajikawa A., and Igimi S. Expression of *Salmonella* OmpC in recombinant *Lactobacillus casei* induced an

attenuated pro-inflammatory response of RAW264.7 cell. 9th Symposium on Lactic acid bacteria. 2008.8.31-9.4. Egmond aan Zee (The Netherlands)	H. 知的所有権の取得状況
3.五十君静信。遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン。第 11 回日本臨床腸内微生物学会。2008.9。東京	1. 特許所得 なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし

Fluorescence History



TE	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg	100 ag	10 ag	0
Milk	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg	100 ag	10 ag	0

図1. ミルクおよびTEバッファー中のモデル大腸菌組換え体の定量PCR検出

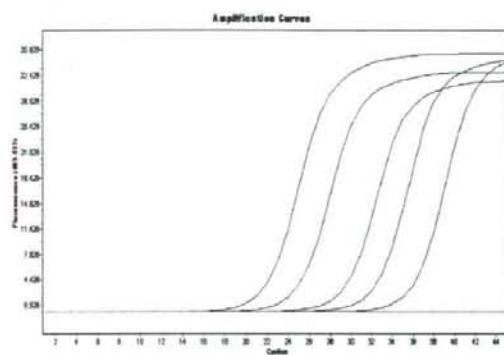
pLPt401Emp: 1 fg = 120 molecules

LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)

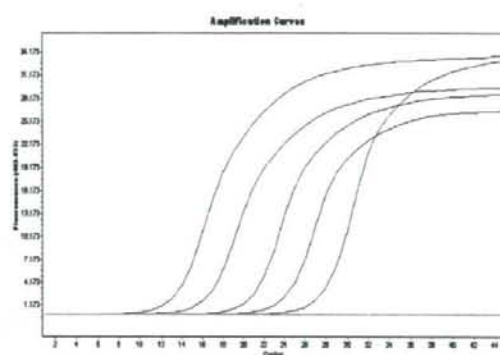
1 ul of DNA in TE (or Milk) was included in 16 ul of PCR reaction mixture

Primer: IGM651 & IGM652

a) Quantitative Real Time-PCR



Primer dxs



Primer ery

b) Quantitative Real Time-PCRのCt値の比較

cfu in tube	primer dxs	primer ery
1×10^4	21.67	13.08
1×10^3	24.69	16.17
1×10^2	29.16	20.57
1×10^1	32.22	23.82
1×10^0	35.83	27.48
blank	ND	ND

単位: Ct (threshold cycle)

図2. ゲノム上とプラスミド上の遺伝子に対するモデル組換え体の定量PCR検出

Bacterial strain: *E. coli* JM109 / pLPEmpty

dxs: chromosomal D-1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene (single copy)

ery: plasmid erythromycin resistance gene (high copy)