

200939004A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

(H19—食品—004)

研究代表者 穂山 浩

平成 22 年 3 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 ..... 1  
穂山 浩

## 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の調査研究(総括) ..... 19  
穂山 浩
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 ..... 27  
五十君 静信
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 ..... 51  
小関 良宏
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 ..... 57  
手島 玲子
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 ..... 65  
吉松 嘉代

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 99

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	東京農工大学大学院 共生科学技術研究院 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 を用いた遺伝子組換え作物 (GM) 検査法を確立した。この方法は GM 作物に汎用される 35S プロモーター、NOS ターミネーターと PCR 妥当性のための ColE1 プラスミドのプライマーを設計し、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 2 つ DNA 配列の存在を同時に判断するものである。本研究で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。本法を、GM 大豆、GM トウモロコシ、GM ジャガイモ、GM 大豆が混入しているお菓子、Bt 米が混入しているもち米について応用したところ、全て、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。また各分担研究者から集計した非食用 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、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、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枯草菌用遺伝子組換えベクターと酵母用遺伝子組換えベクターについてまとめ一覧表を作成した。国際的な遺伝子組換え研究の最先端の情報収集として、フランスパスツール研究所を訪問、更にイタリアで開催されたシンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”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の検討では、豚肉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、エタノールや生分解性プラスチック等の原料となる化合物を組換え植物に生産させる試みがなされている。これらの工業原料はヒトが食した場合、健康を害するような化合物が多く含まれている。これらの遺伝子組換え植物が将来流通し、食品の原料となる作物に混入した場合には健康被害が出る恐れがある。そこで、本研究では今後多種多様に増加するであろう組換え遺伝子を網羅的にモニタリングするシステムを構築するために、DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検出の可能性を探った。前年度までに検討した条件を用いて、トウモロコシゲノムをモデル系として用いて、内在性の *Adh*、*SSI1b* 遺伝子をプローブとして、ゲノム DNA を PCR 増幅なしで蛍光標識した DNA をターゲット分子としてハイブリダイゼーションを行った。その結果、2 mg のトウモロコシゲノム DNA を鋳型として標識した場合には内在性遺伝子のプローブにおいて蛍光が観察された。このことから、DNA マイクロアレイを用いて、検出する DNA 配列を PCR 等の増幅を行うことなく組換え遺伝子を検知することが可能であること

を示唆した。

④近年、非食用バイオテクノロジー応用魚や動物が多数報告されている。これらの非食用バイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料の食品への混入防止を考える必要がある。今年度は平成19年度の報告書以後に発表された非食用バイオテクノロジー応用ニワトリ、ブタ、魚の開発状況について文献調査を行った。非食用バイオテクノロジー応用ニワトリについては組換えタンパクを鶏卵において大量に生産させることが技術的に可能になっている。そのためこれらの組換えニワトリや鶏卵の検知法の作成が望まれる。非食用バイオテクノロジー応用ブタについては人への臓器移植を行うための基礎研究が十分に進んでおらず、組換えブタが大量に飼育される状況には至っていないようである。非食用バイオテクノロジー応用魚については魚に直接遺伝子を導入した報告はなかった。

⑤遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物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」の範囲と定め、また、環境中 (土壌、地下水など) の汚染物質 (重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など) に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能性食品・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、一覧表を作成した。2009年に公表・出版された論文等73件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：26件、経口ワクチン：11件、食用医薬：6件、ワクチン抗原：5件、抗体医薬：5件、治療薬：12件、診断薬・試薬：3件、環境浄化：5件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、2009年の国別の件数は、日本：29件、米国：15件に次ぎ、中国：10件、韓国7件であった。調査研究の結果から、近年とくに穀類を中心として利用が拡大しているホスト植物の自家プロモーターによる目的物質発現システムの検知法の開発を行った。本年度は、イネの actin 1 (OsAct1) 遺伝子のプロモーターで緑色蛍光タンパク質 (sGFP) を発現する組換えイネ、R-5-sGFP rice をモデル GM 植物として、IPCR 法による自家プロモーター発現系 GM 植物の検知法の実証実験を進め、さらに、本検知法の実用化に向け、コメ1粒を供試試料とした検知法を開発した。

略号：GFP: green fluorescent protein, Cvh: chicken vasa homologue, eGFP: enhanced green fluorescent protein, SV40: simian vacuolating virus 40, CMV: cytomegalovirus, TNF: tumor necrosis factor, IgG: immunoglobulin G, WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulation element, RCASBP: replication-competent avian sarcoma-leukosis virus, with a splice acceptor, bryan RSV Pol, LTR: long terminal repeat, FSH: follicle-stimulating hormone, DsRed: red fluorescent protein, shRNA: small hairpin RNA, GFAP: glial fibrillary acidic protein, MoMLV: Moloney murine leukemia virus, pgk: phosphoglycerate kinase, neo: neomycin-resistant gene

#### A. 研究目的

①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く、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。

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、本来はヒトが直接摂取することを想定していない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、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進める。

③これまでに多くの遺伝子組換え植物が開発され市場に出回ってきた。これまでに認可され、市場に出回っている遺伝子組換え植物は食品やその原料となるものであったが、最近ではエタノールや生分解性プラスチック等の原料となるような化学物質を植物に生産させる研究がなされている。それらの植物は可食性のものが使われることも多く、これらの遺伝子組換え植物が認可され、市場に出回った場合、食品の原材料等に混入する可能性を排除できない。これらの工業原料をヒトが食した場合、健康被害が出る恐れがあるため、非食用の遺伝子組換え植物の流通を監視し、食品等への混入を阻止するためのシステムの構築を検討することが必要である。しかし、年々増加の一途をたどる遺伝子組換え植物を委細もらさず検出するのは非常に困難になるものと予想される。

DNA マイクロアレイは数cm 四方のガラス基板上に数万～数十万種類の DNA プローブを固定することで、一度に数十万種類の遺伝子を検出することが可能なDNA検出方法であるため、この技術が組換え遺伝子検知法に応用することで今後、増大すると思われる意図しない非食用の遺伝子組換え植物の混入を検出することが可能となると期待される。昨年度までにトウモロコシを用いて、内在性の遺伝子である *Adh*、*SSIIb* のプローブを作成してDNAチップに固定化し、これらのプローブのアンチセンス DNA を蛍光標識したものをを用いて検出感度についての検討を行った。その結果、ターゲット DNA が反応系に  $1.0 \times 10^7$  コピー存在する場合に検出可能であることが分かった。トウモロコシゲノムのサイズはおおよそ  $3.0 \times 10^9$  塩基対と見積もられているため、 $1 \mu\text{g}$  のゲノム DNA 中にはゲノム当たり 1 コピー存在している遺伝子は  $6.0 \times 10^6$  コピー存在していると考えられる。そこで、本年度は実際のトウモロコシゲノム DNA を標識した場合にゲノム内に 1 コピー存在する遺伝子をマイクロアレイ上

で検出することが可能かどうかを検討することを目的とした。

④バイオテクノロジー応用魚や動物の開発は活発に行われている。本来は非食用として開発されたバイオテクノロジー応用魚や動物が誤って食品に混入する可能性が考えられる。そこで、非食用バイオテクノロジー応用魚と動物の中から報告の多い魚、ニワトリ、ブタを選んでそれらの開発と実用化への動向を調査する。今年度は平成19年度の報告書以後に発表された最近の情報を収集する。

⑤遺伝子組換え生物(genetically modified organism、GMO)は、植物分野においては、高栄養、高機能または経口ワクチン等の医薬品類を生産する目的(薬用GM植物)や、土壌浄化等の環境浄化目的(環境浄化GM植物)に利用され始めている。これらの新GMOは、従来の除草剤耐性の食用植物などのGM植物とは異なり、基本的に非食用であることから、フードチェーンへの混入は健康被害等の重大な問題を引き起こす可能性が高い。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。そこで本研究においては、薬用GM植物及び環境浄化用GM植物の開発状況・生産実態に関する情報を収集して整理し、食品の安全性評価基準作成の一助とする。また、これらの非食用GMOの市場への混入を検知するシステムの構築が求められている。そこで本研究においては、近年とくに穀類を中心として利用が拡大しているホスト植物の自家プロモーターによる目的物質発現システムの検知法の開発を行う。自家プロモーター発現系のGMOは、ホスト植物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は利用できない。しかしGMOと非GMOでは、自家プロモーターであって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を行うインバースPCR(IPCR)法により、GMO特異的な増幅産物が得られる。本技術はこの増幅産物の差異によりGMO検出を行う。また本法は、検知により取得された遺伝子の周辺部位の配列解析が可能であり、未知GMOの遺伝子レベルでの特性の解析に応用可能であり、未承認GMOの個体識別、流通管理にも有用と考えられる。

## B. 研究方法

### ①非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究

1) 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)、GM大豆(RRS)、GMトウモロコシ(NK603)、GMジャガイモを用いた。

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 μmol /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/μL に調製したDNA試料液5.0 μL (DNAとして50 ng) を氷中で加え、全量を25 μL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× Multiplex PCR Mix、0.5×Q solution、1× EvaGreen™、各0.2 μmol /L プライマー対、滅菌水を含む液に、10 ng/μL に調製したDNA試料液2.0 μL (DNAとして20 ng) と、ColE1プラスミド2 μL を各々氷中で加え、全量を20 μLにした。ColE1プラスミドは、 $5 \times 10^{-1}$  ng/μL から  $5 \times 10^{-8}$  ng/μL 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°C30秒間、60°C90秒間、72°C90秒間を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応後、72°C10分間、95°C30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。

また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 (FileMaker) 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

1) 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、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、枯草菌用と酵母用の遺伝子組換えベクターについてまとめ、現状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) 海外の研究動向に関する情報収集として、フランスのパスツール研究所を訪問し、主に遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報交換を行った。さらにイタリアで開催されたシンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”に参加し、新たに開発される微生物の安全性評価に関する動向と遺伝子組換え研究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、豚肉中に混入させた場合の定量的検知法について検討した。宿主としては、*E. coli* JM109株を用い、プラスミドは乳酸菌とのシャトルベクターであるpLPEmptyを用いた。組換え体に1コピーのみ存在することを確認した遺伝子 (*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) を標的としてリアルタイムPCR法による検知法を検討した。

4) 市販の豚肉から、アンピシリン耐性大腸菌を分離した。大腸菌や、大腸菌と他の菌のシャトルベクターには、遺伝子組換え用ベクターのマーカーとしてアンピシリン耐性がしばしば用いられている。そこで、この分離株の耐性について、PCRにて耐性遺伝子を確認し評価してみた。

### 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 DNA は *N,N,N*-cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) 法によって抽出した。抽出したゲノム DNA を平均鎖長が 3,000 塩基対となるように超音波処理を行いターゲット DNA の調整に用いた。DNA マイクロアレイは 20 年度と同様の方法で作成したものを用いた (①-図 1)。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 (SSIb)* 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')。

ターゲット DNA の調整は超音波処理したゲノム DNA を鋳型としてランダムプライマーラベリングキット (Takara Bio Inc.) と Cy3 標識 dCTP を用いて行った。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) に標識したターゲット DNA を加えて 65 $^{\circ}$ C、4 時間で行った。アレイの洗浄は、標準の方法としては 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 分間リンスしてから読取装置にセットしてシグナルを検出した。洗浄温度の検討ではアレイの 1 回目と 2 回目の洗浄を 37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C、47 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C で行った後、リンスして検出を行った。洗浄バッファーの検討では SSC バッファー (1 $\times$ SSC バッファー: 150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム) 濃度を 3 $\times$ 、2 $\times$ 、1 $\times$ 、0.5 $\times$  となるように調整し、37 $^{\circ}$ C で洗浄を 2 回行った後、リンスして検出を行った。

### 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

論文、インターネット、業者カタログなどを使って非食用バイオテクノロジー応用魚、

ニワトリ、ブタの開発についての情報収集を行った。それらの検知のために有益と考えられる項目の一覧表を作成した。

### 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 (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を薬用 GM 植物の範囲と位置づけた。また、近年、牛、豚、鶏等の家畜は、人畜共通の感染症の報告があることから、これらの家畜の健康に影響を与える植物も、薬用 GM 植物の範囲とした。また、環境中 (土壌、地下水など) の汚染物質 (重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など) に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を収集した。前年度に引き続き、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<sup>1-74)</sup> は、カテゴリ別に整理し、分類した。

#### 2) 自家プロモーター発現系 GMO 検知技術の開発

**植物材料** インバース PCR (IPCR) 法 (⑤-図 2) 等による自家プロモーター発現系 GMO 検知技術開発実験材料は、イネ由来アセト乳酸合成酵素 (ALS) プロモーターでドライブされた 2 点変異型イネ由来 ALS 遺伝子、そしてイネ由来の Actin1 遺伝子 (OsAct1) のプロモーターでドライブされた改変型緑色蛍光タンパク質 (sGFP) の 2 種の自家プロモーターによる外来遺伝子発現ユニットを有する R-5-sGFP rice (⑤-図 3、4) の T<sub>0</sub> 植物より得られた完熟種子 (T<sub>1</sub> 種子、種籾) を、イネのモデル植物として使用した。なお、sGFP 遺伝子は静岡県立大学植物機能開発研究室 丹羽康夫博士より譲渡を受けた。

**R-5-sGFP rice の栽培** R-5-sGFP rice 及び非組換えイネ (日本晴、WT) 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で行った。シャーレ中、RO 水で十分に湿らせたろ紙上

に種籾を置き、暗所、30°Cで発芽させた。6日後、発芽種子はアラシシステムに充てんした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)に植え付け、ばんじゅうA(内寸38 x 64 x 14.5 cm)に設置し、土が水に浸るまで灌水した。播種31日後、成長した苗をJA粒状くみあい合成培土3号を入れたポリポット(径15 cm x 深さ12.5 cm)に移植し、ばんじゅうA1台あたり10鉢を入れ、ポット全体が浸るまで灌水した。播種56日後に、短日条件に変更し、くみあい尿素入り窒素加里化成2号NK2(16-0-16)を4 g/10鉢追肥を行った。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55日目までは、14時間明(温度28°C)/10時間暗(温度23°C)、56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。短日条件変更後17日後(日本晴)または19日後(R-5-sGFP)に出穂、開花が認められ、播種後115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。

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(種籾)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容アシスト社製自立チューブに入れ、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 µL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)の場合は乳鉢乳棒を用い粉碎したのち、遺伝子組換え米(LLRICE601)の検知法<sup>79)</sup>(GM Quicker 2を用いたゲノムDNA抽出法の変法)に従い調製した。

コメ1粒からのゲノムDNA調製では、コメ1粒を2 mL容アシスト社製自立チューブに入れ、ステンレスボール(径4.8 mm)2個、キット添付のGE1バッファーを250 µL加え、MS-100(TOMY)により60秒間 x 3回(3,000 rpm)処理し、バッファー中粉碎した。この粉碎液を、キット添付のプロトコルに従い処理し、ゲノムDNAを得た。

インバースPCR(IPCR)用ゲノムライブラリーの調製 R-5-sGFP rice 作製に使用されたベクターの構造情報(⑤-図3)から推定されるR-5-sGFP riceの遺伝子構造(⑤-図4)をもとにOsAct1プロモーター/コード領域の近傍領域について、アガロースゲル電気泳動(AGE)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、自己閉環ゲノムDNAライブラリーが作製にはDraIまたはHaeIIIを選択した。各制限酵素でゲノム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 OsAct1プロモーター特異的な「外向き」プライマーを各制限酵素消化ライブラリーについて設計し、IPCRに用いた(⑤-図5)。PCR機器はPerkin Elmer社GeneAmp 2400を使用した。新鮮葉ゲノムDNAをテンプレートとして、ExTaqをポリメラーゼとして使用した場合の反応系の組成およびPCR条件は下記のとおりである。

[組成] ddH<sub>2</sub>O 77 µL, ExTaq buffer (10 x) 10 µL, dNTP mix 8 µL, primer sense & antisense (100 µM) 1 µL each, genome DNA library 2.5 µL, ExTaq (Takara Bio) 0.5 µL (reaction volume: 100 µL)

[PCR条件] 94°C 5 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C ∞

また、新鮮葉ゲノムDNAをテンプレートとして、GoTaq Green Master Mixをポリメラーゼとして使用した場合の反応系の組成およびPCR条件は下記のとおりである。

[組成] GoTaq Green Master Mix (2 x) 3 µL, primer sense & antisense (10 µM) 1 µL each, genome DNA library 1 µL (reaction volume: 6 µL)

[PCR条件] 94°C 5 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 (or 35) → 72°C 10 min. → 4°C ∞

コメ1粒からの検知、処理時間の短縮及びプロトコルの簡略化 GM quicker2を使用し、キットのプロトコルに準拠しコメ1粒からゲノムDNAを抽出・精製し、制限酵素処理以降の処理に供した。処理時間の短縮及びプロ



トコルの簡略化のため、制限酵素処理の小スケール化 (10  $\mu$ L 反応液)、フェノールクロロホルム抽出で行っていた各酵素失活処理の加熱処理への変更、さらに PCR 酵素の ExTaq (Takara Bio) からマスターミックス形態の GoTaq Green Master Mix (Promega) への変更、100  $\mu$ L の PCR 反応スケールの 6  $\mu$ L へのスケールダウンを行った。

コメ 1 粒より抽出・精製したゲノム DNA (10  $\mu$ L スケール) を 37  $^{\circ}$ C、1 時間制限酵素消化し、70 $^{\circ}$ C、15 分加熱処理し制限酵素を失活させた。この反応液のうち 3  $\mu$ L を DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Bio) を用いた自己閉環ライゲーション反応 (6  $\mu$ L スケール) に使用し、16 $^{\circ}$ C、1 時間反応後、70 $^{\circ}$ C、15 分加熱処理し失活させた。この反応液の 3  $\mu$ L を Go Taq Green Master Mix (Promega) を用いた IPCR 反応に使用した。

#### Real-time PCR 法による GMO 検知法の検討

OsAct1 プロモーターを使用した自家プロモーター発現系 GM 植物では、⑤-図 6 のように、宿主由来の OsAct1 遺伝子座 1 コピーに加え、人為的に導入された遺伝子コンストラクトが 1 コピー以上存在すると考えられる。このとき、イネは 2 倍体であり、導入遺伝子がホモで導入されているとすると、プロモーター領域と、プロモーター/OsAct1 コード領域境界領域の存在比は、プロモーター/OsAct1 コード領域境界領域を 1 とすると、プロモーター領域は 2 以上となる。そこで、これらの遺伝子領域の存在比を定量 real-time PCR 法により求めることとした。

イネ非組換え体 (日本晴)、R-5-sGFP rice 個体#1 (GMO)、R-5-sGFP rice 個体#3 (外来遺伝子コンストラクトなし) の各植物葉より調製したゲノム DNA の等量を鋳型とし、下記の OsAct1 プロモーター領域、またはプロモーター/OsAct1 コード領域境界領域特異的なプライマーと SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTMI (Takara Bio) を使用し、アプライドバイオシステムズ 7000 リアルタイム PCR システム (ABI) でリアルタイム PCR を行った後、Delta Rn 対 PCR cycle 数の増幅曲線をプロットした。得られた増幅曲線について、 $\Delta\Delta$ Ct 法を適用し、各遺伝子領域の存在比率を求めた。OsAct1 プロモーター特異的プライマ

ー:product size: 65 bp

[1] OsAct1-pro-S1 (23 mer) 5' - GA ATC CCT CAG CAT TGT TCA TCG -3'

[2] OsAct1-pro-A1 (20 mer) 5' - C ACG AGG CTG CAT TTG TCA C -3'

OsAct1 プロモーター/コード領域境界領域特異的プライマー:product size: 77 bp

[3] OsAct1-pro-S2 (20 mer) 5' - GT GAC AAA TGC AGC CTC GTG -3'

[4] OsAct1-code-A1 (19 mer) 5' - A GAC GAG GGG CTG GAT ATC -3'

## 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

GM 作物に汎用されるターゲット配列として 35S プロモーター (P35S)、NOS ターミネーター (NOSter) を選択した。PCR の妥当性を評価するための内部標準プラスミドに ColE1 を用いた。ターゲット DNA 配列及び ColE1 プラスミド配列を検知するプライマー対を設計した。増幅したところ、各プライマー対の PCR 産物は 1 つで、副産物が産生されていないことが判明した (①-図 1)。

GM トウモロコシ (NK603) にてピークの分離度を確認後、鋳型濃度や PCR 条件などの最適化を行った。予備実験において各プライマーとも特有の Tm 値を示し、ピークの分離により各増幅産物の同定を確認することが可能となった。P35S、NOSter 検出用プライマーを用いて 2-plex PCR を行ったところ、融解曲線のピークが分離した。続いて ColE1 検出用プライマーを加えた 3-plex PCR においても、各々融解曲線分ピークが分離した (①-図 2)。3-plex PCR の条件検討を行い、読み取り温度、鋳型濃度、サイクル数、ColE1 添加量について最適条件を決定した。これらの条件の下、NK603 のトウモロコシ試料により、検出限界を検討したところ、0.1% (W/W) まで検出可能であった。(①-図 3)

また試料として GM 大豆、GM ジャガイモ、Bt rice 混入もち米を用いて 3-plex PCR を行った結果、再現性の高い良好な結果が得られた (①-図 4)。

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

1) 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、昨年まで2年間に研究用・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。本年は枯草菌と酵母のベクターに関してほぼ網羅的にデータベース化を行った。

枯草菌用および枯草菌-大腸菌シャトルベクターは82について、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、多種であり研究者によりそれぞれの開発したプラスミドを利用しているようである。マーカーとしては、ampicillin, tetracycline, kanamycin, chloramphenicol, erythromycinなどが用いられていた。(添付資料1: 枯草菌用ベクターリスト参照)

酵母用および酵母-大腸菌シャトルベクターベクターは127について、主に論文、書籍等の文献やカタログを基に同様な一覧表を作成した。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。ベクターのマーカーとして用いられているのは、ampicillin, kanamycinが多く用いられていた。酵母でのマーカーとしてはHIS, TRP, URA, LEUなどが使われている。(添付資料2: 酵母用発現ベクターリスト参照)

2) 海外の情報収集として、フランスのパスツール研究所を訪問し、主に細菌を用いた遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行った。ワクチン開発は現在そのほとんどがウイルスワクチンであり、遺伝子組換え技術で行われている。細菌に関しては、

以前から弱毒病原菌を用いた経口粘膜ワクチンの開発が行われているようである。このようなワクチン開発とは別に、基礎研究として、生体と微生物の相互作用の研究にいろいろな遺伝子組換え細菌が開発されていた。たとえば蛍光遺伝子を組み込んだ細菌などが代表的な組換え細菌である。弱毒病原体を抗原運搬体とするワクチンは一時盛んに研究されたが、生菌の投与でないと免疫効果が低い。一方、実用化にあたっては、安全性の面で生存した菌を用いる事にはまだ十分なコンセンサスが得られていない。

イタリアではシンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”に参加し、新たに開発された食品の安全性評価に関する情報収集、乳酸菌の遺伝子組換えに関する情報交換を行った。遺伝子組換えを用いた育種については、基礎研究として進められているものの、生きた組換え微生物の安全性に関する議論は進んでおらず、この考え方を早急に何とかするべきだとの意見が出されていた。

3) 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、豚肉に混入した場合の定量PCRを行い具体的な検知法を検討した。

*E. coli* JM109 / pLPEmpty をエリスロマイシンを含むLBブロスで増菌後、10倍階段希釈したものを検体として、リアルタイムPCRで分析した結果を②-図1に示す。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。

②-図1 a)はクロモゾーム上の *dxs* 遺伝子を、b)はプラスミド上の *ery* 遺伝子を標的とした結果である。表1は、菌数とCt値の一覧である。組換え大腸菌数として200個程度あれば本法により検出が可能である。プラスミド上の遺伝子を標的とする20個程度で検出が可能であることが示された。

モデル組換え大腸菌を豚肉に接種して同

様な検討を行った結果を②-図2に示す。接種直後の解析(T=0h)と、EC培地で24時間増菌後の成績(T=24h)を示す。豚肉中では、増菌をしないと *dxs* 遺伝子を標的とした場合、 $4 \times 10^4$  cfu では検出できないが、プラスミド上の *ery* 遺伝子を標的すると  $4 \times 10^4$  cfu で検出可能である。一方、EC培地で24時間増菌した後検知すると、いずれも推定接種菌数4 cfu で検知可能であった(②-表2)。

培養法により、増菌前と24時間増菌後について、各3検体ずつコロニー形成を確認したところ、②-表3の様な結果を得た。

4) モデル組換え大腸菌を接種していない豚肉検体からアンピシリン耐性菌株が分離されたため、遺伝子組換えプラスミドのマーカーとして用いられるアンピシリン耐性遺伝子の塩基配列を基に、プライマーを作成し評価を行った。16S rDNA配列から分離株は *E. coli* と同定された。組換えベクターに用いられているアンピシリン耐性マーカー用のPCRで増幅された(②-図3)。この分離菌株の内、#6の菌株では、プラスミド上にアンピシリン耐性遺伝子が存在していることが示された(②-図4)。

### ③工業原料用GM植物・生物の混入危害に関する研究

C-1: DNA マイクロアレイ検出感度に与える長鎖ゲノムDNAの影響の検討

ゲノムDNAを標識する場合、モデル系とは異なり、様々な長さのDNAが反応溶液中に存在することになるため、マイクロアレイ上に固定された1本鎖DNAであるプローブとターゲットとなるDNAとが相補鎖を形成するのを妨げる可能性があるため、ターゲットDNAとしてプローブのアンチセンス鎖を蛍光標識したものと、標識していないゲノムDNAを混合してハイブリダイゼーションを行い、検出される蛍光強度を比較した。用いたゲノムDNAは超音波処理によって平均鎖長が約3,000塩基対になるように調整したものを、用いた。ターゲットDNAはハイブリダイゼーション溶液中に  $1.0 \times 10^9$  コピーとなるように調整し、ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後、マイクロアレイ上の蛍光を検出した。その結果、ハイブリダイゼーション溶

液中にゲノムDNAが混入した場合のマイクロアレイ上の蛍光強度は、*Adh* 遺伝子、*SSI1b* 遺伝子いずれにおいても混入していない場合と比較してほとんど変化していないことが示された(③-図2)。

C-2: DNA マイクロアレイによるゲノムDNAを用いた内生遺伝子の検出

トウモロコシゲノムDNAを超音波処理によって平均鎖長が3,000塩基対となったものを2mgを鋳型としてランダムプライム法によって蛍光標識を行った。標識したターゲットDNAをマイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行って、洗浄後、読取装置にセットして蛍光強度を観測した。その結果、*Adh* 遺伝子、*SSI1b* 遺伝子いずれにおいても十分な蛍光が観察された。しかし、トウモロコシゲノム上に存在していないP35SのDNA配列をプローブとしたスポットにおいても若干の蛍光が観察されることが分かった(③-図3矢印)。

C-3: DNA マイクロアレイ検出におけるマイクロアレイ洗浄条件の検討

トウモロコシゲノムDNAを用いて直接ハイブリダイゼーションに用いた場合、ネガティブコントロールであったP35Sのスポットにおいても蛍光が観察されたため、ハイブリダイゼーション後のDNAチップの洗浄条件を検討することで、非特異的に結合したターゲットDNAを除去することを試みた。DNAマイクロアレイの洗浄は洗浄温度と、洗浄液中に含まれる塩濃度を調整することによって条件を変化させることが一般的である。そこで、まず洗浄温度について検討したところ、通常の洗浄温度である37°Cで洗浄したときに比べて、47°Cや、52°Cで洗浄した場合はP35Sのスポットにおいて蛍光の減少が認められた(③-図4)。次に、洗浄温度を37°Cに固定し、洗浄液中の塩濃度を減少させた場合の蛍光強度について検討した。その結果、NaCl濃度が450mM(3×SSC)の場合には検出されていたP35Sのスポットでの蛍光が、75mM(0.5×SSC)の場合では検出されていないことがわかった(③-図5)。

### 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

(1)非食用バイオテクノロジー応用魚について

魚に直接遺伝子を導入した報告はなかったが、注目する報告として次の論文があった。Li S., and Tsai H. (2009) Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 316-325

この論文では、藻類用にコドンを最適化したウシラクトフェリンと DsRed の融合遺伝子を微細藻類に導入した。プロモーターにはヒートショックプロテイン 70A プロモーターと *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit 2' プロモーターを組み合わせたものを使った。この組換え微細藻類をメダカに摂取させると消化管においてバクテリアに対する抵抗性が増強されていることが示された。抗生物質を使わずに魚をバクテリアから守る新しい方法である。この手法が今後どのように発展するのかを監視したい。

(2)非食用バイオテクノロジー応用ニワトリについて

平成 19 年度の報告書以後に 10 報の論文が報告された。これらを④-表 1 にまとめた。導入された遺伝子としては GFP やヒトエリスロポエチンなどが多かった。GFP は研究用の遺伝子組換えニワトリを作成するときに頻繁に使われていた。GFP はマーカーとしてもとても頻繁に使われていた。ヒトエリスロポエチンは有用物質の例として使われていた。プロモーターにはニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターが使われることが多かった。ターミネーターには SV40 ポリ A や WPRE が使われることが多かった。遺伝子導入法ではレトロウイルスを利用することが多かった。精子に遺伝子を導入する方法も報告されている。また、注目する遺伝子導入法としてニワトリ ES 細胞の利用が試みられている。(④-参考出典 1)

(3)非食用バイオテクノロジー応用ブタについて

平成 19 年度の報告書以後に 5 報の論文が

出版された。これらを④-表 2 にまとめた。ブタの臓器を臓器移植に利用する目的で、ブタ内在性レトロウイルスの発現を抑えるための研究が登場した。また、糖尿病やアルツハイマー病の病態モデルを作成した報告があった。導入された遺伝子とプロモーターは多様である。マーカーには GFP、ターミネーターには SV40 ポリ A が使われることが多かった。ブタの臓器を人に移植する研究はまだ十分には進んでおらず(④-参考出典 2)、臓器移植の目的で非食用バイオテクノロジー応用ブタが大量に飼育される段階には至っていないようである。

#### ⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

1. 2007-2010 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況

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

([http://www.aphis.usda.gov/brs/ph\\_permits.html](http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html)) で、2007 年から 2010 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・認可状況を調べた(⑤-図 1、2010 年 1 月 6 日現在)。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。2009 年は認可面積 702 エーカーに対し、96.90 エーカーに作付けが行われた。従って、2009 年の作付け面積は、2007 年の 55% に減少している。

2010 年の薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べたところ、既に 8 社から 13 件の申請が行われ、作物は、アマナズナ、タバコ、イネ、ベニバナ、トウモロコシ、オオムギ、ハコヤナギ属植物であり、Metabolix 社の生分解性プラスチックを生産するタバコ、Kentucky

BioProcessing社のウシ肺アプロチニンを生産するタバコ(ただし組換えTMVを用いた一過的遺伝子発現)、SemBioSys社のウシキモシンを生産するベニバナ、Applied Biotechnology InstituteのB型肝炎ワクチン成分を生産するトウモロコシ、Washington State Universityのヒト摂取用高付加価値タンパク質を生産するオオムギ、University of Washingtonの環境浄化用のハコヤナギ属植物は既に作付けが完了している(⑤-表1)。Ventria Bioscience社の組換えイネは作付けされていないが、承認は2種について既に得られており、まもなく作付けが行われるものと思われる。

2009年は、4社からの9件の栽培申請のうち、Ventria Bioscience社の組換えイネのみが作付けされた(⑤-表2)。2009年の申請のうち、審査が長期にかかったものは、2010年の作付けデータとして再申請・訂正されたため、2009年の作付け品目が減少したものと思われる。2008年は、8社からの14件の申請のうち、Ventria Bioscience社の組換えイネ、SemBioSys社の組換えベニバナ、Iowa State Universityの組換えトウモロコシ、University of Washingtonの組換えハコヤナギ属植物の作付けが行われた(⑤-表3)。2007年は、10社からの15件の申請のうち、9件の作付けが行われた(⑤-表4)。

## 2. 2009年月に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する論文等

文献情報(SciFinder)で「transgenic plant」をキーワードに抽出された2009年の情報、2009年に国内で開催された日本農芸化学会2009年度大会(福岡)講演要旨集、第27回日本植物細胞分子生物学会(藤沢)大会・シンポジウム講演要旨集及び第27回バイオテクノロジーシンポジウム(植物利用物質生産/糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索/AD総合診断体系実用化)予稿集(主催:バイオテクノロジー開発技術研究組合)から、薬用及び環境浄化用GM植物に関する情報を収集したところ、73件の情報が得られた。それらをカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品:126件、経口ワクチン:11件、食用医薬:6件、ワクチン抗原:5件、抗体医薬:5件、治療薬:12件、

診断薬・試薬:3件、環境浄化:5件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた(⑤-表5)。

### 2-1. 機能性食品

機能性食品・嗜好品に関する論文等<sup>2-27)</sup>を⑤-表6に示した。26件のうち、遺伝子導入による機能性タンパク質の生産例は、高含硫アミノ酸貯蔵蛋白質を蓄積するダイズ<sup>17)</sup>、味覚修飾蛋白質ミラクリンを生産するトマト<sup>22)</sup>及び同蛋白質を生産するレタス<sup>26)</sup>の3件である。その他は代謝酵素遺伝子(または代謝酵素抑制遺伝子)導入による新規機能性成分の生産あるいは既存機能性成分の含量改変(増加または低下)である。その中で最も件数が多いのが、ビタミンE生産に関するもの<sup>7, 9-13, 20)</sup>7件、次いで脂肪酸組成や改変に関するもの<sup>6, 8, 15, 19)</sup>及びアスタキサンチンやカロテノイド生産に関するもの<sup>16, 21, 23, 24)</sup>がそれぞれ4件であった。その他、デンプンの改変に関するもの<sup>2, 3)</sup>、ゴマリグナン生産に関するもの及びフラボノイド生産に関するもの<sup>18, 25)</sup>がそれぞれ2件ずつで、窒素含量の増加1件<sup>4)</sup>、リン酸の改変1件<sup>5)</sup>であった。

### 2-2. 経口ワクチン

経口ワクチンに関する論文等<sup>28-38)</sup>を⑤-表7に示した。11件のうち、日本及び米国での開発例が最も多くそれぞれ4件、次いで韓国2件、スウェーデン1件であった。使用された作物はジャガイモが最も多く4件、次いでイネ3件、ニンジン2件、レタス1件であり、植物種不明が1件であった。11件のうち、3件にコレラトキシンBサブユニット遺伝子の導入が認められた。コレラトキシンBサブユニットは、それ単独でも経口ワクチンとしての開発が行われている<sup>28, 29, 37)</sup>が、この蛋白質は、腸管上皮細胞に発現するGM1ガングリオシドに結合し、細胞内に抗原を送り込む働きがあることから、インフルエンザ抗原とともに発現させる研究が行われている<sup>29)</sup>。

### 2-3. 食用医薬

食用医薬に関する論文等を⑤-表8に示した<sup>39-44)</sup>。食用医薬に関しては、国内研究の6件で、うち3件はイネを用いた研究例であ

った<sup>40-42)</sup>。その他の作物は、イチゴ、ダイズ及びレタスがそれぞれ1件ずつであった。2009年に報告された花粉症緩和米<sup>41)</sup>では、花粉症に対する免疫寛容の効果的誘導のため、T-細胞エピトープをコレラトキシンBサブユニットとの融合蛋白質として発現させており、マウスでの実験で効率の良い免疫寛容誘導が確認されている。

#### 2-4. ワクチン抗原

ワクチン抗原に関する論文等を⑤-表9に示した<sup>45-49)</sup>。ワクチン抗原は、抽出・精製後の利用を目的とするため、タバコを宿主植物として用いる研究例が多く、5件中3件がタバコを用いた例であった<sup>47-49)</sup>。また、タバコでは、通常の核形質転換以外の葉緑体形質転換<sup>48)</sup>やタバコ植物そのものを形質転換するのではなく、組換えウイルスベクターを用いた一過的外来遺伝子発現系が用いられている<sup>47, 49)</sup>。

#### 2-5. 抗体医薬

抗体医薬に関する論文等を⑤-表10に示した<sup>50-54)</sup>。抗体医薬も、抽出・精製後の利用を目的とするため、食用作物以外を宿主植物として用いる研究例が多く、5件中2件はタバコ<sup>50, 54)</sup>、1件はウキクサ<sup>51)</sup>を用いた研究例であった。宿主植物由来の不純物の存在は、抗体医薬の有効性・安全性に大きく関わってくると考えられている。抗体医薬に関する論文等5件のうち、3件は宿主植物からの抗体分子の精製に関するものであった<sup>51-53)</sup>。

#### 2-6. 治療薬

治療薬に関する論文等を⑤-表11に示した<sup>55-65)</sup>。ワクチン抗原、抗体医薬と同様に、治療薬も抽出・精製後の利用を目的とするため、非食用作物を宿主植物として用いる研究例が多く、治療薬12件のうち5件でタバコが用いられ<sup>61-65)</sup>、3件でゼニゴケ<sup>58-60)</sup>が用いられている。前項と同様、ウイルスベクター<sup>61)</sup>も利用されている。

#### 2-7. 診断薬・試薬

診断薬・試薬に関する論文等を⑤-表12に示した<sup>67-69)</sup>。2009年は組換え植物で生産された $\alpha$ -アミラーゼ、プロテアーゼ阻害蛋白質、ウシアプロチニンの3件がこのカテゴリーに属すると思われる。

#### 2-8. 環境浄化

環境浄化に関する論文等を⑤-表13に示した<sup>70-74)</sup>。環境浄化用のGM植物は、土壤中の有害物質を蓄積あるいは分解するように遺伝子改変されるため、その食用作物への混入は健康被害を引き起こすと考えられ深刻である。5件の研究例のうち、3件はイネが使用されていた<sup>70, 71, 72)</sup>。今後も食用作物を用いた環境浄化用のGM植物開発については注視する必要があると思われる。

#### 2-9. 国別集計数

2009年に公表・出版された薬用GM植物に関する論文等の件数を国別に集計した結果を⑤-表14に示した。国別では日本の件数が最も多く29件であり、次いで米国15件、中国10件、韓国7件であった。

#### 3. 自家プロモーター発現系GMOの検知法開発

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GMOは、宿主が元来有する遺伝子のプロモーターで発現を行うため、プロモーター配列に対するPCRによる在来の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GMOと非GMO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を行うインバース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を適切な制限酵素で消化し、self-ligationにより自己閉環ゲノムDNAライブラリーを作成する。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、非GMOとGMOのPCR増幅産物を電気泳動で解析すると、理論的にはGMOの方が非GMOと比較して、1本以上多くのバンドが観察される。⑤-図2には昨年度実証実験に用いた、イネのスフィンゴ脂質生合成の鍵酵素である dihydrosphingosine C4 hydroxylase 1

(DSH1) 遺伝子のプロモーターで、マーカー遺伝子の  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子を発現する DSH1::GUS rice76)における GMO 検知の概念図を示した。

イネの actin 1 (OsAct1) 遺伝子のプロモーターで緑色蛍光タンパク質 (sGFP) を発現する組換えイネ、R-5-sGFP rice を自家プロモーター発現系 GMO モデル植物として、IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO の検知法の実証実験を進めた。遺伝子導入宿主植物の自家プロモーターにより外来遺伝子を発現するイネのモデル植物として、R-5-sGFP rice を使用した (⑤-図 3、4)。本 GM イネは、イネの分岐鎖アミノ酸 (イソロイシン、バリン) 生合成経路の鍵酵素であるアセト乳酸合成酵素 (ALS) を標的とした ALS 阻害剤 (ビスピリバックナトリウム塩) とその阻害剤耐性の点変異型 ALS 遺伝子の組合せにより形質転換植物を選抜する技術を用い作出されたものであり、導入された遺伝子コンストラクト中に、イネ由来 ALS プロモーターでドライブされた 2 点変異型イネ由来 ALS 遺伝子、そしてイネ由来の Actin1 遺伝子 (OsAct1) のプロモーターでドライブされたマーカー遺伝子、改変型緑色蛍光タンパク質 (sGFP) の 2 種の自家プロモーターによる外来遺伝子発現ユニットを有している。

R-5-sGFP rice の栽培 R-5-sGFP rice および日本晴 (非組換え体) は、グロースチャンパーにおいて良好に生育、稔実し、コメ ( $T_2$  種子) が収穫された。なお、両系統間または系統内において、顕著な形態の差異を示す個体は認められなかった (⑤-図 7)。

R-5-sGFP rice  $T_1$  世代における外来遺伝子の確認 生育中の R-5-sGFP rice および日本晴

(非組換え体) の新鮮葉より調製したゲノム DNA を鋳型に、sGFP 遺伝子特異的プライマーを用い PCR による増幅を行い、外来遺伝子コンストラクトの存在を確認したところ、R-5-sGFP rice の個体#3 以外の  $T_1$  個体は、いずれも sGFP 遺伝子を有する組換え体であることが確認された (⑤-図 8)。個体#3 は遺伝的にヘテロな  $T_0$  世代から  $T_1$  世代に進む際に、野生型ホモになったものと考えられる。

IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法の検証 日本晴 (非組換え体) の

OsAct1 遺伝子のゲノム DNA 配列情報から、プロモーター/コード領域境界部について適切な制限酵素と、制限酵素消化-自己閉環ライブラリーに対する特異的プライマーセットの組合せを設計した。その結果、制限酵素 *DraI* もしくは *HaeIII* で消化し、自己閉環ライブラリーを作成した場合、GMO と非 GMO の IPCR 産物のサイズが適度に異なり、電気泳動等による GMO・非 GMO の判別が可能と考えられた。そこで、両制限酵素でゲノム DNA を消化し作製した環状ゲノム DNA ライブラリーを鋳型に IPCR を行ったところ、両酵素いずれを用いた場合も、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、R-5-sGFP rice に特異的な増幅産物のバンドが検出された (⑤-図 9)。これにより、昨年度のモデル、DSH1::GUS rice と同様、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が示された。

検討した 2 種の制限酵素については、両者を比較した場合、制限酵素 *HaeIII* で処理した場合の方が、非特異的な PCR 増幅産物が少なかったため、以降の実用化に向けた検討では、*HaeIII* 消化のライブラリーを使用することとした。

実用化に向けたゲノム DNA 抽出法、PCR 条件等の検討 前述の IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法の検証は、新鮮葉より抽出した比較的高品質のゲノム DNA を用いて行ったものであるが、GMO 検知法としての実用化に向けて、1. コメ (玄米) から抽出したゲノム DNA を用いた検知、2. コメ 1 粒からの検知、3. 制限酵素処理、セルフライゲーション、IPCR の時間短縮、処理の簡素化の 3 点について改良を加えた。

コメ (玄米) を検体とした GMO 検知 コメ (玄米) を検体とし、市販のコメからのゲノム DNA 抽出・精製キットである GM quicker2 (ニッポンジーン) を用い、乳鉢乳棒を用い粉碎したコメ粉末 0.5 g よりゲノム DNA を抽出・精製し、制限酵素 *HaeIII* 消化、セルフライゲーションののち、IPCR に供したところ、新鮮葉を検体とした場合と同様に、WT、R-5-sGFP 共通バンドに加え、R-5-sGFP では特異的なバンドが出現し (⑤-図 10)、GM イネの特異的な検知が可能であることが示さ

れた。

コメ 1 粒からの検知、処理時間の短縮及びプロトコルの簡略化 GM quicker2 を使用し、キットのプロトコルに準拠しコメ 1 粒から抽出・精製したゲノム DNA を用い、制限酵素消化およびセルフライゲーションの反応スケールの小スケール化、反応時間の短縮、酵素のプレミックスタイプへの変更と、プロトコルの簡略化を行ったところ、PCR 産物の電気泳動において、WT、R-5-sGFP 共通バンドに加え、R-5-sGFP 特異的なバンドが出現し (⑤-図 11)、GM イネの特異的な検知に成功した。

当初の 30 サイクルの PCR サイクルでは、とくに非 GMO、GMO に共通して現れるバンドが明瞭ではなかったが、35 サイクルに増加することにより、共通バンド、GMO 特異的なバンドの両者が明瞭に観察されるように改善された。簡略化プロトコルのゲノム DNA 抽出から、PCR、電気泳動の終了まで、検知に要した時間は 6 時間強であった。

なお、コメ 1 粒は本来個々で遺伝的性質は異なるが、今回の供試した T<sub>2</sub> 種子サンプルは親株と同じ IPCR 増幅パターンを示した。

#### Real-time PCR 法による GMO 検知法の検討

イネ非組換え体 (日本晴)、R-5-sGFP rice 株#1 (GMO)、R-5-sGFP rice 株#3 (外来遺伝子コンストラクトなし) の各植物葉より調製したゲノム DNA の等量を鋳型とし、OsAct1 プロモーター領域、またはプロモーター/OsAct1 コード境界領域特異的なプライマーセットを用い、リアルタイム PCR を行った結果、Delta Rn 対 PCR cycle 数の増幅曲線は⑤-図 12 のようになり、R-5-sGFP rice 個体#1 のみ増幅曲線が左にずれ、OsAct1 プロモーターの存在量が他の遺伝子領域よりも多いことが示された。

また、 $\Delta\Delta Ct$  法を適用し、各遺伝子領域の存在比率を求めると、⑤-表 15 のようになり、非組換え体および導入遺伝子コンストラクトの存在しない R-5-sGFP rice 個体#3 では OsAct1 プロモーター領域の存在比は等しいが、R-5-sGFP rice 個体#1 では存在比は 6 と計算され、本形質転換体では導入遺伝子コンストラクトが複数コピー挿入されていることが示唆された。

## 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

1) 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、工業的にも実用化され生産に用いられている。作年度までに、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、844 のベクターについて一覧表を作成した。これにより、研究用の個別に開発した特殊なベクターを除き、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、多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た。

乳酸菌組換え用のベクターについても、昨年度 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。

枯草菌と酵母のベクターに関してほぼ網羅的なデータベース化を行った。枯草菌用および枯草菌-大腸菌シャトルベクターは 82 について、一覧表を作成した。用いられているプロモーターは、多種であり研究者によりそれぞれの開発したプラスミドを利用しているようである。枯草菌はグラム陽性菌としては最も遺伝子組換え研究が進んでいる菌であり、研究者の数も多いため、プラスミドの種類も多数報告されているものと思われる。マーカーとしては、ampicillin、tetracycline、kanamycin、chloramphenicol、erythromycin などが用いられていたが、大腸菌とのシャトルベクターが多いため、大腸菌用のマーカーと重複するものが多い。

酵母用および酵母-大腸菌シャトルベクターベクターは 127 について、一覧表を作成した。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。マーカーとして用いられているのは、ampicillin、kanamycin が多く、これらは大腸菌とのシャトルベクターとして主に大腸菌側で機能するものと思われる。酵母でのマーカーとしては HIS, TRP, URA, LEU などが使われている。

2) 海外の遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行ったが、ウイルスワクチン研究は盛んであるが、細菌を用いた遺伝子組換えワクチンの実用化は見えていないように思えた。既に開発されている主なワクチンは弱毒化された経口粘膜生ワクチンなどで、マウスの段階では高い効果が確認されている。しかし生きた組換え細菌を解放系に出すには安全性の面で議論が続いており、この点が実用化を妨げているようである。イタリアで開催されたシンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”に参加し、新たに開発される微生物の安

全性評価に関する研究動向と遺伝子組換え研究に関する情報収集を行った。このシンポジウムでも新たに開発された組換えなどを利用した乳酸菌の安全性については、国際的な安全性に関するコンセンサスが必要であると議論されていた。生きたままの遺伝子組換えの安全性をどのように考えるかは、今後の最も重要な課題と思われた。

3) 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用い、定量 PCR を行い評価した。豚肉に接種し、添加回収実験を行った。昨年度検討した牛乳サンプルを直接 PCR 反応液に加えた場合、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。豚肉の場合は、牛乳に比べ増殖曲線の乱れはそれほど大きくなかった。直接検出では、 $10^4$  cfu 以上の菌数を必要としたが、24 時間の選択培地による増菌を行えば、接種予想菌数 1 桁での検出が可能であることが示された。1 つの遺伝子組換え細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合と、プラスミドなど上の複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、当然複数コピー存在する場合の検出感度が高かった。直接分析する場合では、特にその差が顕著であるが、増菌した場合はほとんど差が無かった。

4) 近年、市販の豚肉や鶏肉からは、しばしばアンピシリン耐性株が分離され問題となっている。これらは Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) と呼ばれその急激な増加が問題となっている。今回の実験でも市販豚肉からアンピシリン耐性株が得られたことから、遺伝子組換えベクターに用いられているアンピシリン耐性遺伝子との比較を試みた。分離された耐性菌の内、1 株はアンピシリン耐性がプラスミド上にコードされており、組換え用マーカーとして用いられている遺伝子配列を基に作成したプライマーセットで増幅が見られた。このプラスミドが遺伝子組換え由来であるかの判定は容易ではなく、それ以外の遺伝子の保持状況を明らかにしながら、今後も検討して行く必要があると思われる。

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関

## する研究

今後増え続けるであろう非食用の遺伝子組換え植物の混入をモニタリングするためには、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析方法が非常に有効であると期待される。DNA マイクロアレイ法においてターゲット DNA を標識する方法はいくつかあるが、もっとも利用頻度が高いものは PCR を用いた方法である。しかし、標識に PCR を用いる場合には増幅すべき配列をプライマーとして増幅するため、一つの遺伝子を検出するためには一組のプライマーセットが必要となることから、網羅的に遺伝子を検知することは困難である。また、PCR による遺伝子断片の増幅効率はその DNA 塩基配列によって異なるため、定量的な解析を行う場合には増幅効率の分かっている遺伝子についてのみが適応可能となる。そこで、本研究では PCR によるバイアスのかからない方法であるランダムプライマーを用いてターゲット DNA を標識してマイクロアレイ解析に供することで網羅的に組換え遺伝子を検知できる系の構築を目指した。前年度までに DNA マイクロアレイでの検出感度について検討したが、実際に植物から抽出したゲノム DNA を標識した場合、ゲノム内のコピー数が 1 である遺伝子を検出可能かどうかについては検討していなかった。今年度は最も大きなサイズのゲノムを持ち、組換え作物が市場に出回っているトウモロコシから抽出したゲノムを用いて、内在性の遺伝子を検出できるかについて検討した。その結果、1 mg 程度のゲノム DNA を標識した場合、1 コピーの遺伝子を特異的に検出することが可能であることが示された。トウモロコシゲノムは最も大きく、大豆やイネではその数分の 1 程度のゲノムサイズである。そのため、市場に出回る確率の高い、大豆やイネについても DNA マイクロアレイ解析は十分適応可能であると目される。今後は混入率 1% 程度の組換え遺伝子が検出するために、標識方法や蛍光増強などについて検討する必要があると思われる。

### 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

近年の報告としては、非食用バイオテクノロジー応用ニワトリの開発の報告が多いこ

とが判明した。鶏卵を使って組換えタンパクを生産させることは技術的に高い水準に達している。非食用バイオテクノロジー応用ニワトリや鶏卵の食品への混入危害は近い将来に起こりうる状況になりつつある。

### ⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

2009年に公表・出版された論文等73件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：26件、経口ワクチン：11件、食用医薬：6件、ワクチン抗原：5件、抗体医薬：5件、治療薬：12件、診断薬・試薬：3件、環境浄化：5件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。機能性食品、経口ワクチン及び食用医薬は、ホスト植物として食用作物が多く使用されることから、今後も注視する必要があると思われる。また、抗体医薬、治療薬、試薬・診断薬及び環境浄化でも、トマト、ジャガイモ、ニンジン、イネ等の食用作物が使用されていた。これらの作物は、さまざまな用途で使用されているため、今後も注視要すると思われる。

2009年の国別の件数は、日本：29件、米国：15件に次ぎ、中国：10件、韓国7件であった。国内の開発状況は学会講演要旨等の情報が得られやすく、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。

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。

自家プロモーター発現系GMO検知法開発については、昨年度、検知法の実証実験を行ったDSH1::GUS riceと同様に、R-5-sGFP riceをモデルGMOとして設計した実験系においても、IPCR法は自家プロモーター発現系GMOの検知に有用であることが実証された。また、本手法のGMO検知への実用化に向け検討を行ったところ、簡略化プロトコルにおいてもGMOの検知に成功した。本簡略化プロトコルを

用いた場合、ゲノムDNA抽出から、電気泳動の終了まで、検知に要した時間は6時間強であり、迅速なGMO検知法の実用化に耐えうるものと考えられる。

また、real-time PCR法による検知法について検討し、GMO植物個別試料由来のゲノムDNAを試料とする検知に成功した。本手法は組換え植物体単体のGM、非GMの判別には使用できるが、混合物や、加工された試料では標的遺伝子の希釈による存在比の低下が起り、検知は困難になると考えられる。

## E. 結論

①確立した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。引き続き情報収集をすすめ、市販の枯草菌用および酵母用遺伝子組換えベクターについて、データベース化を行った(添付資料1及び2参照)。遺伝子組換えに関する研究が進んでいる分野として、ワクチン開発についてはフランスのパスツール研究所を訪問し情報交換を行った。イタリアで開催された国際シンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”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食品を用いて具体的な検討を進めた。

③本研究ではこれからも増え続けるであろう非食用の遺伝子組換え植物の食品への混入をモニタリングする方法としてDNAマイクロアレイ解析を導入することを検討した。その結果、ある程度多量のDNAを標識することで網羅的に組換え遺伝子をDNAマイクロアレイで遺伝子を増幅することなく検出する系の構築の可能性を示唆した。

④非食用バイオテクノロジー応用魚と動物について開発、実用化の動向に関する調査研究を行った。本年度は非食用バイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタについて平成19年度の報告書以後に発表された論文などをまとめた。非食用バイオテクノロジー応用魚

については魚に直接遺伝子を導入した報告はなかった。

非食用バイオテクノロジー応用ニワトリは盛んに研究が行われており、10報の報告があった。非食用バイオテクノロジー応用ニワトリについては今後の開発、実用化の動向を注意深く調査して検知法の作成を検討する必要がある。

非食用バイオテクノロジー応用ブタが新たに作成された報告は5報であった。臓器移植の目的でブタを利用する研究は活発に行われているが、その実現にはまだ時間がかかりそうである。非食用バイオテクノロジー応用ブタが大量に飼育される段階にはまだ至っていないようである。

⑤遺伝子組換え(GM)植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物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」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を環境浄化目的の植物に関する情報とともに収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能性食品・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、一覧表を作成した。2009年に公表・出版された論文等73件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：26件、経口ワクチン：11件、食用医薬：6件、ワクチン抗原：5件、抗体医薬：5件、治療薬：12件、診断薬・試薬：3件、環境浄化：5件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、2009年の国別の件数は、日本：29件、米国：15件に次ぎ、中国：10件、韓国7件であった。

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。

## F. 健康危険情報

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

- (1) Akiyama H, Nakamura F, Yamada C, Nakamura K, Nakajima O, Kawakami H, Harikai N, Furui S, Kitta K, Teshima R. A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting-curve analysis. *Biol Pharm Bull.* 2009 32, 1824-1829.
- (2) 穉山浩、佐々木伸大、大木果林、中村文美、坂田こずえ、中村公亮、大森清美、中島安基江、古井聡、橘田和美、小関良宏、手島玲子：PCR法を用いた米加工品の安全性未審査遺伝子組換え米の検知法。日本食品化学学会誌 2009, 16, 147-151.
- (3) 穉山浩：遺伝子組換え食品の検知法。ぶんせき 2009, 3, 140-143
- (4) Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., and Igimi S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clinical and Vaccine Immunology.* 17(1):43-48. (2010)
- (5) Kajikawa A., Ichikawa E., and Igimi S.: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 20(2):375-382 (2010)
- (6) Kajikawa A. and Igimi S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19):3409-3415 (2010)
- (7) 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開発の試み。日本臨床腸内微生物学会誌 11:34-40 (2009)
- (8) Nakajima O., Akiyama H. and Teshima R.: Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Contamination of Beef by Material from Genetically Engineered Cattle. *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32 (8) 1313-16

## 2. 学会発表

- (1) 山田千尋、穉山浩、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：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) 伊東篤志、田口朋之、和氣仁志、穉山浩、手島玲子、佐々木伸大、小関良宏：DNA マイクロアレイを用いた遺伝子組換え食品検知法の開発。日本食品化学学会総会・第15回学術集会 (2009. 5)
- (3) 中島治、穉山浩、手島玲子：リアルタイムPCRを用いた遺伝子組換えウシに由来する肉の検知法について。第98回日本食品衛生学会学術講演会 (2009. 10)
- (4) 河野徳昭、今村智弘、島田浩章、穉山浩、川原信夫、吉松嘉代：自家プロモーター発現系遺伝子組換え植物の検知技術開発。第27回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (2009. 7. 31, 藤沢)

## [参考出典]

- (1) 松田治男教授、堀内浩幸助教、広島大学大学院・生物圏科学研究科・分子生命開発学講座、  
<http://www.hiroshima-u.ac.jp/immunobi/>
- (2) Sprangers B., Waer M. and Billiau A. D. (2008) Xenotransplantation: Where are we in 2008? *Kidney International* 74, 14-21