

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)

研究代表者 穉山 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 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。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。

研究協力者

中村文美、中村公亮
(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)、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 50ng) 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 20ng) 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、 $5 \times 10^{-1} \text{ng}/\mu\text{L}$ 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。

C. 研究結果

スクリーニング系の開発

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 (図 1)。

GM トウモロコシ (NK603) にてピークの分離を確認後、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 T_m 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-plexPCR 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 (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。(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 (図 4)。

D. 考察

蛍光色素として用いた Eva green[®] は細胞不浸透性なので SYBR green[®] と比べて毒性が低く、かつ PCR 阻害性の低いことなどが特徴とされている。本研究で確立された方法は、未承認 GM 作物のスクリーニング法として迅速性、安全性、信頼性に優れた手段であると考えられる。

E. 結論

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、非食用 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

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.* 32, 1824-1829. (2009)

- (2) 穂山 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. 日本食品化学会誌 2009, 16, 147-151.
- (3) 穂山 浩：遺伝子組換え食品の検知法. ぶんせき 2009, 3, 140-143.

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、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)

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

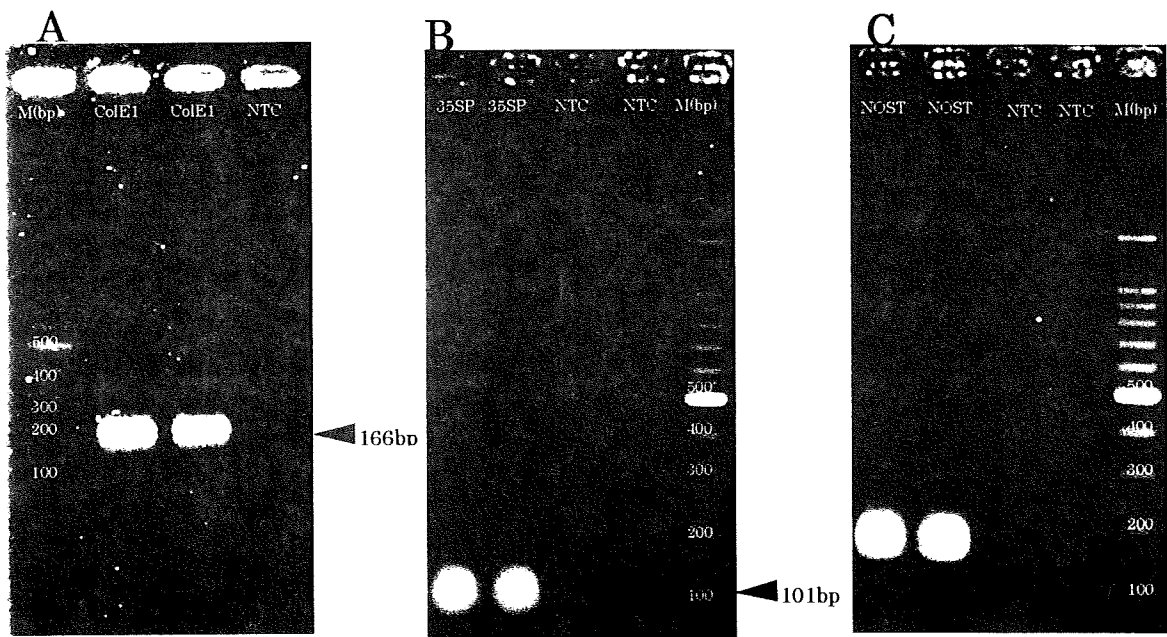


図1 PCR増幅産物の電気泳動解析
ColE1 (A), 35SP (B) and NOST(C).

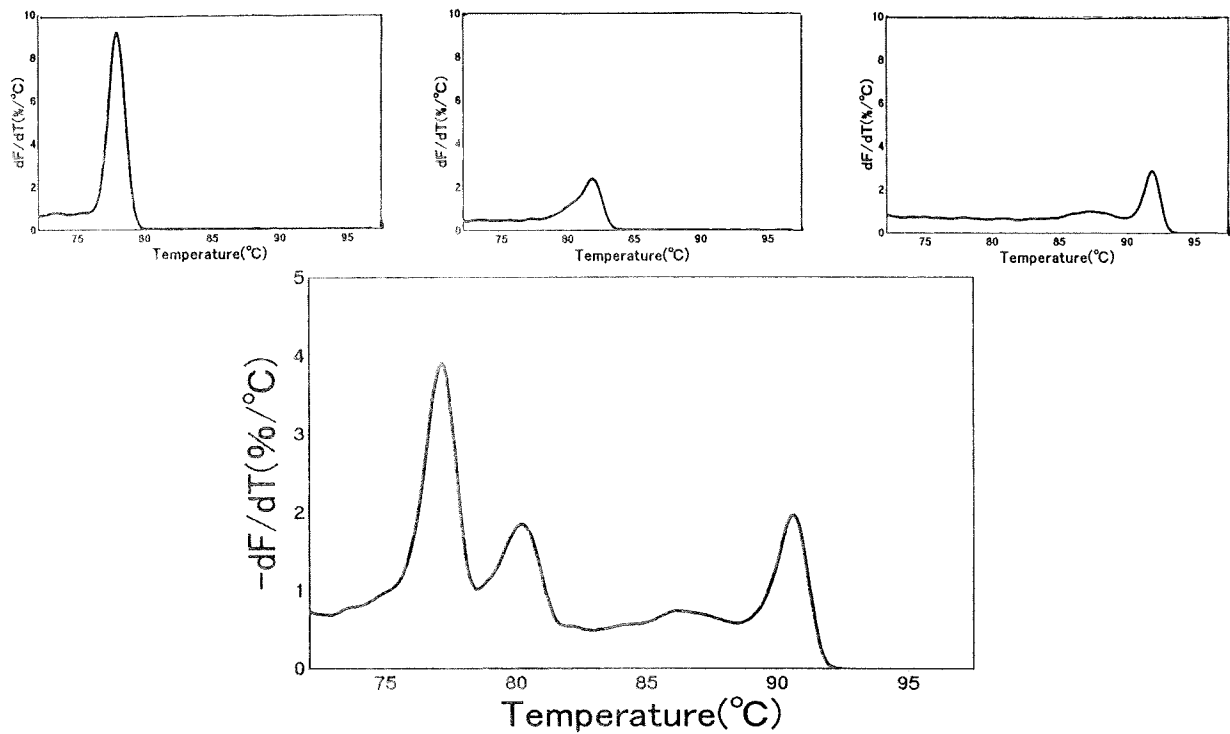


図2 NOST (A), P35S (B), ColE1(C) と 3-plex PCR assay (D)の融解曲線解析

NK603 maize genomic DNA was amplified as template by thermal conditions (initial denaturation at 95°C for 15 m, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 90 s and extension at 72°C for 90 s, and terminal elongation at 72°C for 10 m. Melting curves were analyzed by Rotor gene™ 6000 using EvaGreen® as intercalating dyes, and the corresponding T_m was assigned for each product by arrow.

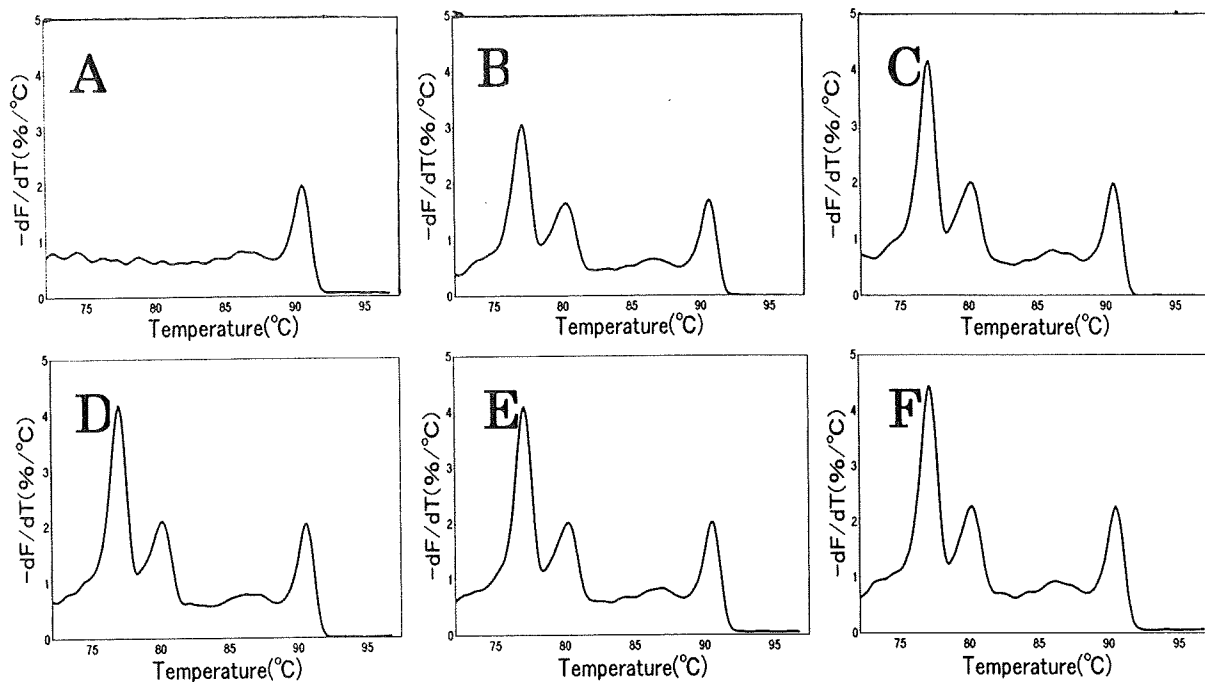


図 3 3-plex realtime PCR の感度の検討.

The melting curves were tested for detection of different amounts of NK603 maize samples: A) 0% (w/w, non-GM), B) 0.1% (w/w), C) 0.5% (w/w), D) 1% (w/w), E) 2% (w/w) and F) 5% (w/w).

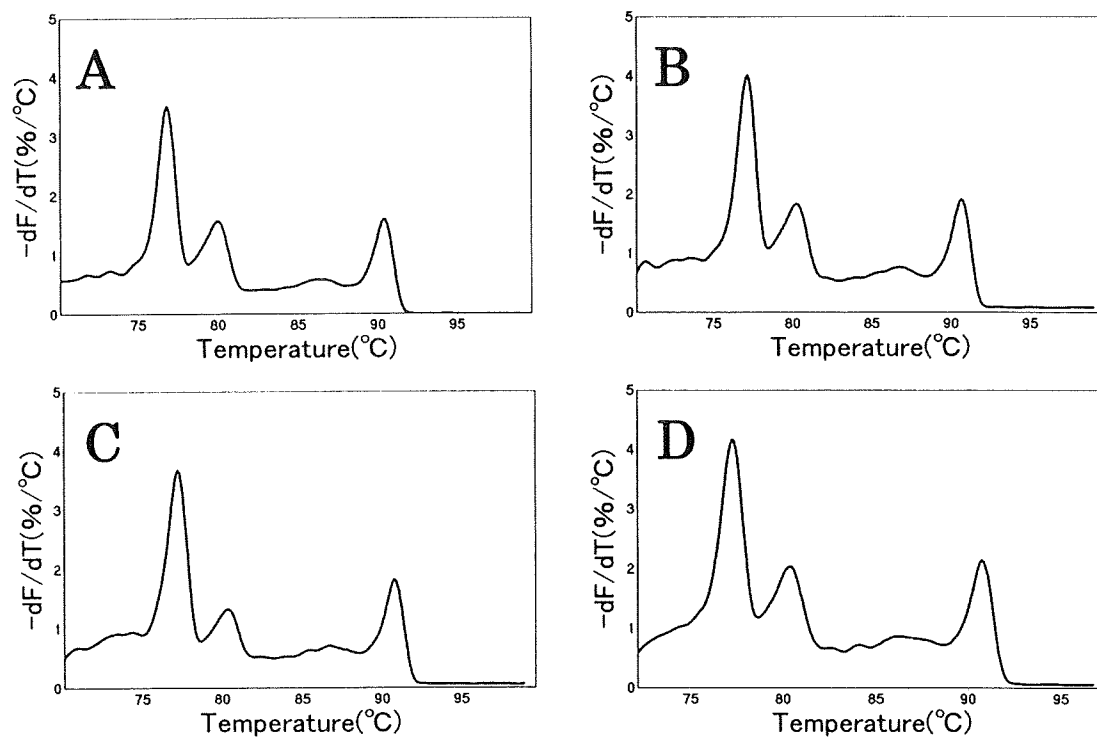


図 4 他の GM 食品混入試料への応用

Melting curves represent 3-plex PCR using total genomic DNA samples from: A) GM soybean (Roundup Ready soybean), B) GM potato (NewLeaf), C) rice contaminated with unauthorized GM rice and D) biscuit contaminated with GM soybean of unknown amount.

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。

協力研究者

梶川 揚申、榊田 和彌、加藤 光徳
(食品衛生管理部)

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。

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、

B. 研究方法

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ス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ジン遺伝子 (*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ス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。

C. 研究結果

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、マーカースにつき調べ、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。マーカースとしては、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、マーカース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スとして用いられているのは、ampicillin, kanamycin が多く用いられていた。酵母でのマーカースとしては 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、フランスのパスト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。

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、 4×10^4 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 4×10^4 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(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、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(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(図 4)。

D. 考察

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て、実用的なベクターや組換え体を作出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る。

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。

本年度は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 β -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。

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。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。

F. 健康危機情報

なし

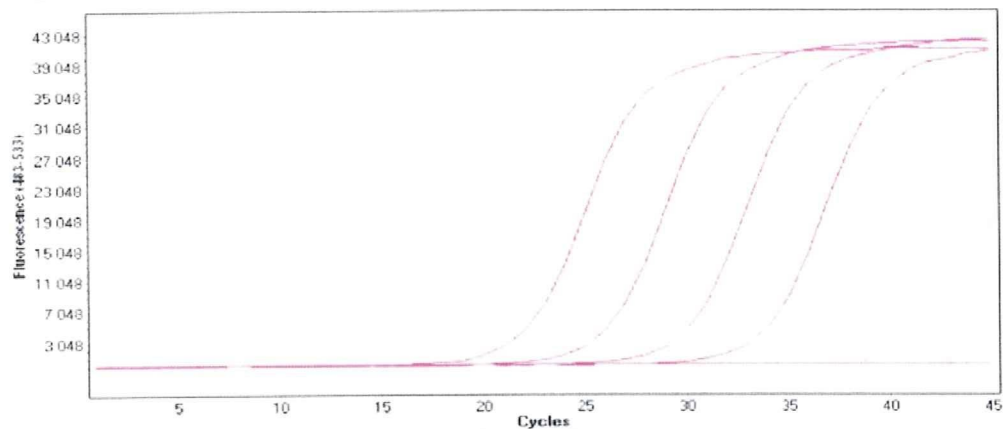
G. 研究発表

論文発表

1. 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)
 2. 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)
 3. 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)
 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開発の試み. *日本臨床腸内微生物学会会誌* 11: 34-40 (2009)
- 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. モデル組換え大腸菌の LB 培地でのリアルタイム PCR による検知

a) *dxs* 遺伝子を標的として分析



b) *ery* 遺伝子を標的として分析

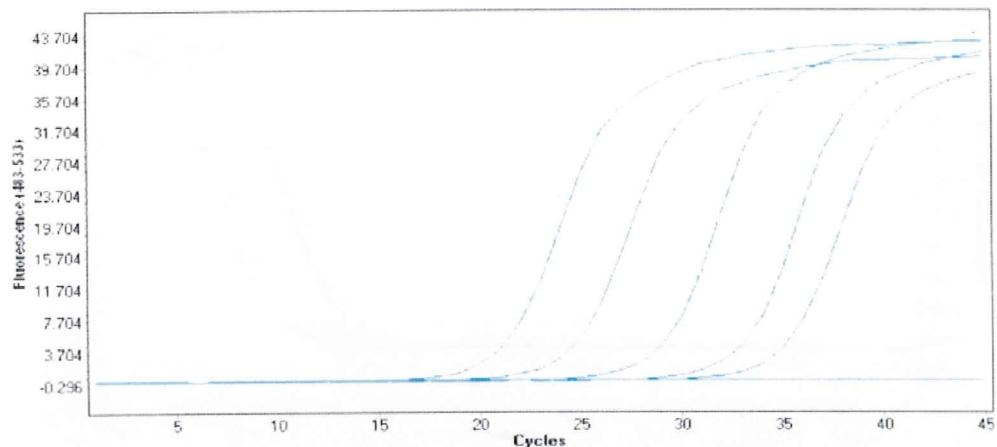
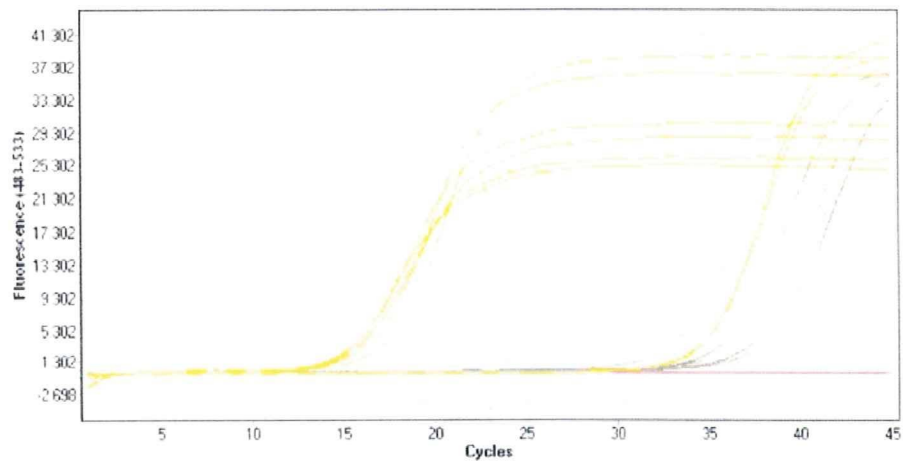


表 1. 接種したモデル組換え大腸菌の菌数と Threshold cycle (Ct) 値

Cfu in tube	Primer <i>dxs</i>	Primer <i>ery</i>
2×10^5	21.76	20.77
2×10^4	25.75	24.22
2×10^3	29.75	28.72
2×10^2	33.60	32.63
2×10^1	ND	34.73
Blank	ND	ND

図 2. モデル組換え大腸菌を豚肉に接種した場合のリアルタイム PCR による検知

a) *dxs* 遺伝子を標的として分析



b) *ery* 遺伝子を標的として分析

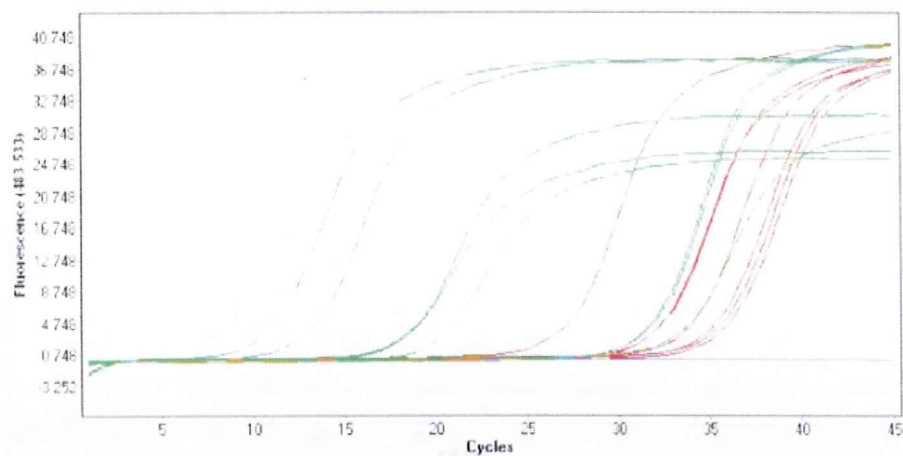


表 2. 豚肉に接種したモデル組換え大腸菌の菌数と Threshold cycle (Ct) 値

cfu/g	primer <i>dxs</i>		primer <i>ery</i>	
	T=0	T=24	T=0	T=24
4×10^4	33.29	15.31	26.82	18.04
4×10^3	36.03	15.14	31.79	19.50
4×10^2	38.25	14.71	35.58	17.71
4×10^1	38.37	16.49	33.62	10.62
4×10^0	37.59	17.30	34.89	12.86
4×10^{-1}	37.72	34.78	31.94	31.34
Blank	35.89	34.83	31.05	31.55

表 3. 豚肉に接種したモデル組換え大腸菌の菌数とそれぞれの濃度での検知数(n=3)

inocula of bacteria(cfu / g) Time	4×10^4	4×10^3	4×10^2	4×10^1	4×10^0	4×10^{-1}	Blank
T=0 h	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
T=24 h	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3

T=0 は、接種直後直接分析した結果を示す（陽性検体数／検査検体数）

T=24h は、EC 増菌培地で 24 時間増菌後分析した結果を示す

図 3. 豚肉から分離したアンピシリン耐性株に対するアンピシリン耐性遺伝子と 16SrDNA 遺伝子の PCR による評価

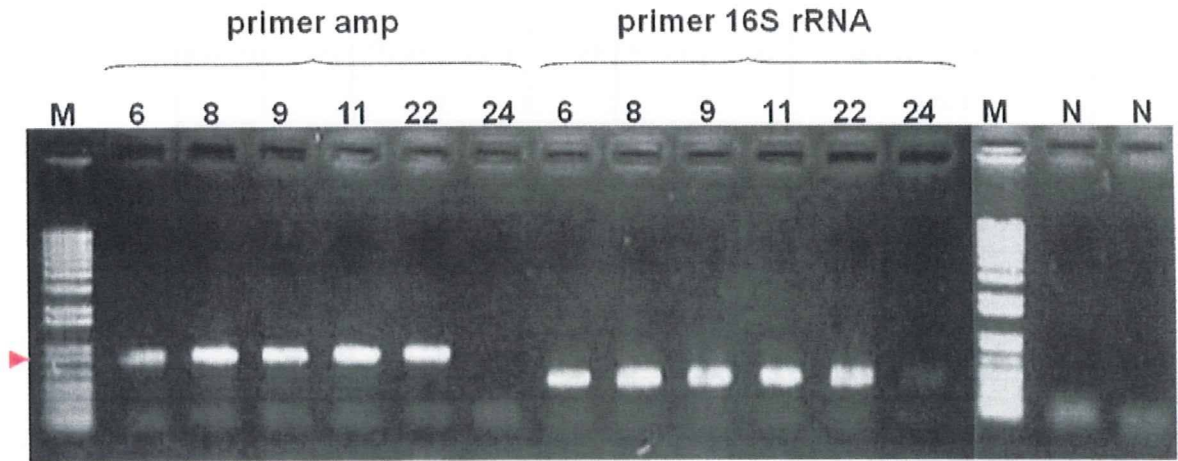
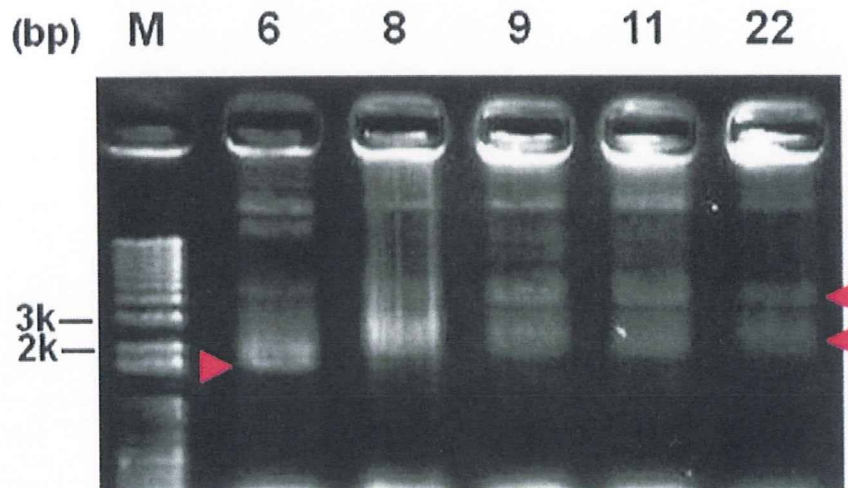


図 4. 豚肉から分離された自然汚染株の保持するプラスミドの検出



豚肉から分離された自然汚染株 6, 8, 9, 11, 22 は、すべて *E. coli* と同定された。一晚培養した菌株から抽出されたプラスミドを示す。検体 6 のプラスミド上にはアンピシリン耐性遺伝子がコードされているようである。

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発	文献	遺伝子組換え法	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	N末端	タグ	その他	備考
1		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pWH1520	xyA			-Ampicillin -Tetracycline				
2		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pMM1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline				pMM1522-signal sequence
3		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pMM1525	xyA			-Ampicillin -Tetracycline			His	
4		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pHIS1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline			His	
5		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pHIS1525	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP		His	pHIS1522-signal sequence
6		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pSTREP1525	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP		His	pHIS1522-signal sequence
7		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pSTREPHIS1525	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP		His	
8		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pC-HIS1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline			His	
9		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pC-STREP1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline		STREP		
10		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pN-HIS-TEV1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	His			
11		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pN-STREP-TEV1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP			
12		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pN-STREP-Xa1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP			
13		-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pSTOP1522	xyA			-Ampicillin -Tetracycline			His	
14	levansucrase (Lactobacillus reuter)	-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pRBBm15	xyA			-Ampicillin -Tetracycline			His	
15	levansucrase (Lactobacillus reuter)	-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pRBBm13	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP			
16	levansucrase (Lactobacillus reuter)	-E. coli -Bacillus megaterium	Bacillus megaterium	Mo Bi Tec			pRBBm16	xyA			-Ampicillin -Tetracycline	STREP		His	
17		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pHT01	groE			-Ampicillin				
18		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pHT43	groE			Chloramphenicol -Ampicillin				
19		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pHT08	groE			Chloramphenicol -Ampicillin	His			
20		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pHT09	groE			Chloramphenicol -Ampicillin	STREP			
21		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pHT10	groE			Chloramphenicol -Ampicillin		cMyc		
22		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pBacTag-FLAG	spac		Tryptophan operon	-Ampicillin -Erythromycin		FLAG		
23		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pBacTag-cMyc	spac		Terminator Tryptophan operon	-Ampicillin -Erythromycin		cMyc		
24		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pBacTag-HA	spac		Terminator Tryptophan operon	-Ampicillin -Erythromycin		HA		
25		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pBacTag-GFP+	spac		Terminator Tryptophan operon	-Ampicillin -Erythromycin		GFP+		
26		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pBacTag-CFP	spac		Terminator Tryptophan operon	-Ampicillin -Erythromycin		CFP		
27		-E. coli -Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Mo Bi Tec			pBacTag-YFP	spac		Terminator Tryptophan operon	-Ampicillin -Erythromycin		YFP		

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発	文献	遺伝子組換え法	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	N末端	C末端	その他	備考
28	ワクチン	white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP28	Bacillus subtilis	・B. subtilisはVP28を分泌・膜口分泌し、その中にWSSVに対する防御効果を示す	中・京江大学	Fu LL et al. (2008) Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in Procambarus clarkii using Bacillus subtilis as delivery vehicles. Lett Appl Microbiol. 47(5):591-6	electroporation	pGS-H1	sigma43 promoter from B. subtilis 168	Kanamycin					
29		a-amylase gene	Bacillus subtilis QB1130	培養液中にa-amylaseを産生	中・中山大	藤本 文彦ら (1994) 地衣状菌類PUS168の培養及発酵特性を基にした菌株選別の家畜飼料効果		pUSA166	sigma43 promoter from B. subtilis 168	Kanamycin					
30		thioredoxin from Alicyclobacillus acidocaldarius (AtTrx)	Bacillus subtilis DB428	B. subtilisはAtTrxを培養液中に活性を有するAlicyclobacillus acidocaldariusを還元活性を有する	伊・国立遺伝学研究所	Yama D, et. Al. (2003) High level expression of Alicyclobacillus thiorodxin in Pichia pastoris and Bacillus subtilis. Protein Expr Purif. 30:179-184.	electroporation	pYS08	a-amylase promoter (from Bacillus subtilis NA64)	Erythromycin				B. subtilis subtilisin E signal peptideにより分泌	
31		single chain variable fragment (scFv)	Bacillus brevis HPD-31	B. brevisはscFvを分泌	日・日本大学	Shiroza T et al. (2001) Construction of a chimeric shuttle plasmid via a heterodimer system: secretion of an scFv protein from Bacillus brevis cells capable of inhibiting hemagglutination. Biosci Biotechnol Biochem. 65(2):389-95.	electroporation	pYS18	a-amylase promoter (from Bacillus subtilis NA64)	Erythromycin					
32		single chain variable fragment (scFv)	Bacillus brevis HPD-31	B. brevisは生細胞活性を有するscFvを分泌	日・日本大学	Shiroza T et al. (2003) Production of a single-chain variable fraction capable of inhibiting the Streptococcus mutans glucosyltransferase in Bacillus brevis cells using a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. Biochim Biophys Acta	electroporation	pSP12	gIC promoter	Neomycin		6xHis		相同置換により染色体上へ導入される	
33		Glutamin合修制御タンパク GIC(GIC)	Bacillus subtilis SMY	B. subtilisはGICを表現	米・ガフン大学	Pirossi S et. Al. (2007) Molecular mechanism of the regulation of Bacillus subtilis gIAB expression by GIC. PLoS One 2(10):2007	electroporation	pSP16	gIC promoter	Neomycin		6xHis		相同置換により染色体上へ導入される	
34		Glutamin合修制御タンパク GIC(GIC)	Bacillus subtilis SMY	B. subtilisはGICを表現	米・ガフン大学	Pirossi S et. Al. (2007) Molecular mechanism of the regulation of Bacillus subtilis gIAB expression by GIC. PLoS One 2(10):2007	electroporation	pMB26	lip promoter	-Ampicillin -Kanamycin					
35		Bacillus pumilus B26由来 lipaseB26 (Lip)	Bacillus subtilis DB 104	B. subtilisはlipase B26を分泌	韓・Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	Kim HK et. Al. (2002) Expression and characterization of Ca(2+)-independent lipase from Bacillus pumilus B26. Biochim Biophys Acta. 1511:193027-35	electroporation	pSR427	temperature inducible promoter P2	Chloramphenicol Spectinomycin					
36		bgxB	Bacillus subtilis 1A1747	B. galactosidase	韓・Northwest A&E University	Chang et al. (2007) Characterization of two temperature-inducible promoters isolated from B. subtilis. Biochem Biophys Res Commun. 358(4):148-53.	electroporation								

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発	文献	遺伝子複製方法	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	薬剤	備考
37		bgxB	Bacillus subtilis 1A747	B-galactosidase	中 Northwest A&F University	Li W et al. (2007) Characterization of two temperature-inducible promoters newly isolated from <i>B. subtilis</i> Res. Biochem Biophys Res Commun 358(4):1148-51	electroporation pS17427	temperature inducible promoter P7			Chloramphenicol Spectinomycin		
38		cystatin S and SA	Bacillus subtilis Marburg 168	B. subtilisは培養液中に cystatin SあるいはSAを産生	独 Biological science laboratories of Kao corporation	Kim L et al. (1998) A xylose-inducible <i>Bacillus subtilis</i> integration vector and its application. Gene. 181(1-2):1-6.	PHSP-US	alkaline endoglucanase promoter (from <i>Bacillus sp.</i> KSM-5237)			Ampicillin Tetracycline		
39		grpE dnaK dnaJ bgaB	Bacillus subtilis 1012	B. subtilisはいずれのタンパク質も発現	独 University of Bayreuth	Serrano-Heras G et al. (2005) A new plasmid vector for regulated gene expression in <i>Bacillus subtilis</i> . Plasmid. 54(3):278-82.	pX	xyIA (from <i>B. megaterium</i>)			Chloramphenicol		染色体上の hscA anyE部位に plasmidは組み込まれる
40		gfp (jellyfish Aequorea victoria)	Bacillus subtilis YB886	B. subtilisは温度依存的に GFPを発現し、蛍光を発する	西 Universidad Autónoma	Hart B et al. (2007) Integration site within the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome and compatible expression cassettes. J Bacteriol. 185(9):2698-9.	pPR54	λ -phage promoter (temperature inducible)		rrnB (from <i>E. coli</i>)	Bleomycin		染色体上の hscA 部位に plasmid は組み込まれる
41		bgxB	Bacillus subtilis 1HA01	B-galactosidase	独 University of Bayreuth	Hart B et al. (2007) Integration site within the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome and compatible expression cassettes. J Bacteriol. 185(9):2698-9.	pAX01	xyIA promoter		10 (lambda phage)	Erythromycin		染色体上の hscA 部位に plasmid は組み込まれる
42		bgxB bgaB bgaA aminotransferase	Bacillus subtilis 1HA01	B-galactosidase B. subtilisは下で、 B. subtilisは導入したタンパク質を菌株内に産生	独 University of Bayreuth	Hart B et al. (2007) Integration site within the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome and compatible expression cassettes. J Bacteriol. 185(9):2698-9.	pAX01	hsc promoter		10 (lambda phage)	Erythromycin		染色体上の hscA 部位に plasmid は組み込まれる
43		bgxB	Bacillus subtilis 1A747	B-galactosidase	中 Northwest A&F University	Zhang AL et al. (2007) Assay and characterization of a strong promoter element from <i>B. subtilis</i> . Biochem Biophys Res Commun. 354(1):90-5.	pS18423	xyIE			Chloramphenicol Spectinomycin		
44		bgxB	Bacillus subtilis 1A747	B-galactosidase	中 Northwest A&F University	Zhang AL et al. (2007) Assay and characterization of a strong promoter element from <i>B. subtilis</i> . Biochem Biophys Res Commun. 354(1):90-5.	pYG123	xyIE			Chloramphenicol		
45		pga (Bacillus megaterium penicillin G acylase)	Bacillus subtilis WB600	B. subtilisは培養液中に活性を有する penicillin G acylaseを産生	中 Chimise academy of sciences	Yang S et al. (2001) Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 21:90-9.	pEES102	PA3			Neomycin		
46		bgxB or hscG	Bacillus subtilis 1012	B-galactosidase Heat shock protein	独 University of Bayreuth	Nguyen HD et al. (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for <i>Bacillus subtilis</i> exhibiting full structural stability.	pHCM002	hscA (weak constitutive promoter)		trpA	Ampicillin Chloramphenicol		