

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	分類	備考
47		bgxB or hcz	Bacillus subtilis 1012 Bacillus subtilis ISS8	-B-galactosidase	加・ University of Bayreuth	Nguyen HD et al. (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for Bacillus subtilis exhibiting full structural stability.	PHOMC03	bgxB (B. subtilis glucose starvation inducible promoter)	tpA	-Ampicillin Chloramphenicol	N末端	その他
48		bgxB or htpG	Bacillus subtilis 1012	-B-galactosidase -Heat shock protein	加・ University of Bayreuth	Nguyen HD et al. (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for Bacillus subtilis exhibiting full structural stability.	PHOMC04	xylA (xylose inducible promoter)	tpA	-Ampicillin Chloramphenicol		
49		bgxB or htpG	Bacillus subtilis 1012	-B-galactosidase -Heat shock protein	加・ University of Bayreuth	Nguyen HD et al. (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for Bacillus subtilis exhibiting full structural stability.	PHOMC05	gpcS (pTc inducible promoter)	tpA	-Ampicillin Chloramphenicol		
50		Glutamyl endopeptidase gene (gsEL from Bacillus licheniformis) B-6839	Bacillus subtilis AJ73	B. subtilisは培養液中にGsELを産生	加・Institute of Genetics and Industrial Microorganism	Shevlev AB et al. (2000) Expression of bacillar and glutamyl endopeptidase genes in Bacillus subtilis by a new mobilizable single-Microorganism replicon vector pLF-sms	plF9	-cryIAa (endotoxin gene from B. thuringiensis ssp kurstaki) -Kanamycin		Chloramphenicol		
51		-Glutamyl endopeptidase gene (gsEL from Bacillus licheniformis) B-6839 -Glutamyl endopeptidase gene (gsEL from Bacillus intermedius)	Bacillus subtilis AJ73	-B. subtilisは培養液中にGsELを産生 -B. subtilisは培養液中にGsELを産生	加・Institute of Genetics and Industrial Microorganism	Shevlev AB et al. (2000) Expression of bacillar and glutamyl endopeptidase genes in Bacillus subtilis by a new mobilizable single-Microorganism replicon vector pLF-sms	plF14	Kanamycin		Chloramphenicol		
52		Bacillus thuringiensis subsp. Morrison PG-14由来 cry11Aa	Bacillus brevis	B. brevisはCry11Aaを表現し、Aedes aegypti Culex pipiens に対し殺虫活性をもつ	加・Seoul national university	Roh JY et al. (2010) Expression of Bacillus thuringiensis mosquitoicidal toxin in an antimicrobial Bacillus brevis strain.	pPro11A	cry1Ac		Erythromycin		
53		*psA (xylosylase from Bacillus subtilis 168) *btl (luciferase from Bacillus subtilis 168)	Bacillus subtilis 1A304	B. subtilisは培養液中に発光活性をもつ、*psAを産生し、*btlはglucuronaseを産生	加・University of Hong Kong	Wu SC et al. (2002) Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in Bacillus subtilis.	pSGL	φ105 (bacterial induction)	φ-syfyase (from B. licheniformis)	Chloramphenicol Ampicillin		vectorは宿主の染色体上に組み込まれる
54		*bira (Bacillus subtilis biotin biosynthetic enzyme) *prsA (Bacillus subtilis extracytoplasmic molecular chaperone) *sak (staphylokinase)	Bacillus subtilis WB600	B. subtilisはそれぞれBira、PrsAを菌体内に、SAKを培養液中に産生する	加・University of calgary	Wu SC et al. (1999) Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in Bacillus subtilis.	PUB18P4BJRA PUB18P4JPRSA PUB18P4JSAKT	P43 (B. subtilis constitutive promoter)	PUB18P4JSA KTのみTT2 (from E. coli mnb operon)	Kanamycin		
55		*bira (Bacillus subtilis biotin biosynthetic enzyme) *prsA (Bacillus subtilis extracytoplasmic molecular chaperone) sak (staphylokinase)	Bacillus subtilis WB600	B. subtilisはそれぞれBira、PrsAを菌体内に、SAKを培養液中に産生する	加・University of calgary	Wu SC et al. (1999) Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in Bacillus subtilis.	pE18P43BJRA pE18P43PRSA pE18P43SAK	P43 (B. subtilis constitutive promoter)	P43 (B. subtilis constitutive promoter)	-Erythromycin -Lincomycin		
56			Bacillus subtilis WB600	B. subtilisはSAKを培養液中に産生する	加・University of calgary	Wu SC et al. (1999) Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in Bacillus subtilis.	pUB18P43	P43 (B. subtilis constitutive promoter)		Kanamycin		

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	ターミナー	マーカー	タグ	備考
57		cry/C (<i>Cp</i> -endotoxin from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> 7-29)	- <i>Bacillus thuringiensis</i> 407-OA - <i>Bacillus thuringiensis</i> Kto	Cry/Cはいずれの宿主でも発現するが、 <i>B. thuringiensis</i> litensisへの感染率は407-OA株が高い	Sanchis V et al. (1998) Construction of recombinant <i>Bacillus thuringiensis</i> strains by using the <i>sp</i> operator non-dependent expression system of <i>cryIIIA</i> and site specific recombination vector J Biotechnol. 48:81-96 Kai K et al. (1997) Over-expression and post-translational modification of thermophilic <i>Bacillus</i> cytochrome <i>c</i> -551 in <i>Bacillus subtilis</i> . J Ferment Bioeng. 84:190-194.	electroporation	pHTBS-F3-IC	<i>cryIIIA</i>	-Erythromycin -Ampicillin -Tetracycline				
58		cccA (<i>Bacillus stearothermophilus</i> PS3 cytochrome <i>c</i> -551)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	<i>B. subtilis</i> は培養液中に活性を維持し、NADH oxidase活性をもつ	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Institute of Technology	electroporation	pHYG551		<i>B. stearothermophilus</i> neutral protease gene		-Tetracycline -Ampicillin		
59		celE (from <i>Clostridium thermocellum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> は培養液中に活性を維持し、celE gene carboxymethylcellulaseを産生する	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Mito university	electroporation	pUB102		celE promoter		-Kanamycin -Neomycin		
60		celE (from <i>Clostridium thermocellum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> は培養液中に活性を維持し、celE gene carboxymethylcellulaseを産生する	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Mito university	electroporation	pHEB102		celE promoter		-Erythromycin Chloramphenicol		
61		aprBI (serine protease from <i>Bacillus intermedius</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> AJ73	<i>B. subtilis</i> は培養液中に活性を維持し、serine proteaseを産生する	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Kazan university	protoplast method	pCS9		aprBI	aprBI	Erythromycin		
62		bTub1 (β -tubulin from <i>Plasmodium falciparum</i>)	<i>Bacillus brevis</i> 47-50	<i>B. brevis</i> は培養液中に活性を維持し、tubulinを産生する	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Biozentrum	Tris-polyethylen method	pGB202		MWP (<i>B. brevis</i> midle wall protein promoter)		Erythromycin		
63		ami (Amidase from <i>Rhodococcus erythropolis</i>)	<i>Bacillus subtilis</i>	全ての細菌体系がAmidaseを産生するが、amiEプロモーターを用いたものが産生量、活性共に高い	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Biozentrum	Biochimie. 77:256-261 Cloning of amidase gene from <i>Rhodococcus erythropolis</i> and expression by distinct promoters in <i>Bacillus subtilis</i> . Yue Y et al. (2009)	pG103		-sacB -amyE -p43 -degQ -aprE		Chloramphenicol		
64		kajP (kajilobiose phosphorylase(KP) from <i>Rhodococcus erythropolis</i>) trpP (tryptophanase) from <i>Thermomonasbrockii</i> ATCC35047	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> はKPあるいはTPを産生するが、kajPを用いたものが産生量、活性共に高い	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Biozentrum	prctoplast method Thermomonasbrockii subtilis and selaginose synthesis utilizing two phosphorylases. Phan TT et al. (2006)	-pUBAKPK -pUBAFTTP		BamP (s-amyE gene from <i>Bacillus amyloquelificans</i>)		Kanamycin		
65		-bgaB (<i>B</i> -galactosidase) -hspG (heat shock protein) -pbpE (penicillin binding protein Pbp4)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	<i>B. subtilis</i> はIPTGの添加により、菌体内に各タンパク質を産生	日 本 工 業 振 興 院 研 究 所 Bayreuth university	ATCC35047 in <i>Bacillus subtilis</i> and selaginose synthesis utilizing two phosphorylases. Phan TT et al. (2006)	pNDH33		<i>grcE</i>		-Ampicillin Chloramphenicol		

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特長	研究・開発	文献	遺伝子挿入法	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	備考
66		*ampC (α-amylase) *celA and celB (from <i>Chaetium thermocellum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	B. subtilisはIPTGの添加により培養液中に各タンパク質を産生	Phan TT et al. (2006) University of bayreuth	PNDH7	groE		-Ampicillin Chloramphenicol					
67		ampC B-lactamase from Enterobacter cloacae P89)	<i>Bacillus subtilis</i> 1A304	B. subtilisは培養液中に活性を有するAmpCを産生	中-The hong kong polytechnic university	psc1112/E	φ 105 (thermal induction)		-Erythromycin Chloramphenicol					vectorは宿主の染色体上に組み込まれる
68		ampC B-lactamase from Enterobacter cloacae P89)	<i>Bacillus subtilis</i> 1A304	B. subtilisは培養液中に活性を有するAmpCを産生	中-The hong kong polytechnic university	psc1113/M	φ 105 (thermal induction)		-Erythromycin Chloramphenicol	(His)6				vectorは宿主の染色体上に組み込まれる
69		*pyruvate dehydrogenase a and b subunit (from <i>Pisum sativum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> W600	vectorにStaphylococcal protein AのIcG結合ドメインを導入することにより培養液中への各pyruvate dehydrogenaseのサブユニットの産生が向上	University of missour	pWB705-E1A(E1B)	spore method	P43 (B. subtilis constitutive promoter)	Kanamycin					
70		lacZ (β-galactosidase)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	B. subtilisは低温で培養することによりβ-galactosidaseを菌体内に産生	University of bayreuth	pAL10	des (cold-inducible <i>Bacillus subtilis</i> desaturase promoter)		-Ampicillin Chloramphenicol					vectorは宿主の染色体上に組み込まれる
71		lacZ (β-galactosidase)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	B. subtilisは低温で培養することによりβ-galactosidaseを培養液中に産生	University of bayreuth	pAL12	des (cold-inducible <i>Bacillus subtilis</i> desaturase promoter)		-Ampicillin Chloramphenicol					vectorは宿主の染色体上に組み込まれる
72		Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	<i>Bacillus subtilis</i> DB104	B. subtilisはBDNFを培養液中に産生し、後根神経節細胞の生育を促進した	日-Hitachi	pVLXBDNF	constitutive vegetative phase promoter from B. subtilis		Kanamycin					B. subtilis subtilisin signal peptidaseにより目的タンパク質は分泌される
73		ker (keratinase from <i>Bacillus licheniformis</i> MKU)	<i>Bacillus megaterium</i> MS941	B. subtilisはケラチナーゼを培養液中に産生し、後根神経節細胞の分裂を促進した	印-Madurai kamarai university	pWAK3	amyL (from B. MT00610 a-amyliase promoter)		-Ampicillin -Kanamycin					keratinase gene signal peptidaseにより目的タンパク質は分泌される
74		subC (Serine alkaline protease:SAP from <i>Bacillus licheniformis</i>)	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM1989	B. subtilisはSAPを産生し、SAPを過剰に産生している菌体は、葉緑体、TGA回路、アミノ酸合成経路のフラグメントが	士-Middle east technical university	electroporation pHV1431	subC		Chloramphenicol					

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	株系	その他	備考
75		*cryIAC *cry11A	Bacillus thuringiensis subsp. Morrisoni PG-14	ProAcN-11Aを導入し、B. thuringiensis cryIACと Cry11Aが融合したタンパク質を産生し、Plutella xylostella C.Olex. plimensに對し毒性を示した。	韓・Seoul national university	Roh JY et al. (2004) Expression and characterization of a recombinant CryIAC crystal protein fused with Cry11A in <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki cry-B. <i>J. Asia Pac. Entomol.</i> 7:119-125.	electroporation	pProAcN-11Aは cryIAC	cryIAC	pProAcN-11Aは cryIAC terminator	Erythromycin			
76		Mycoplasma gallisepticum agglutinin (MGGA)	Bacillus thuringiensis BMB171	B. thuringiensisは菌体表面にpMGGAを産生した。また、組換え菌体表面に産口受容した結果、宿主免疫を誘導した。	中・Huazhong agricultural university	Liu M et al. (2008) Displaying the protein of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> agglutinin on the cell surface of <i>Bacillus thuringiensis</i> with the S-layer protein. <i>Protein Expression and Purification</i> 65:103-108.	electroporation	pSPMGGA1.2P			Ampicillin Erythromycin			CTC S-layer proteinは目撃された菌体表面に融合し、宿主免疫を誘導した。
77		-CYP -YFP	Bacillus subtilis	B. subtilisは青蛍光タンパク質を産生した。	英・University of Oxford	Forbes et al. (2001) Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Gene</i> 284:289-297.		*SG1190:CFP *SG1181:YFP	xyI		Ampicillin Chloramphenicol			
78		-P-hom (from <i>Corynebacterium glutamicum</i> chromosome) -P-leuA (from <i>Corynebacterium glutamicum</i> chromosome) -P-per (from <i>Corynebacterium glutamicum</i> plasmid pGA1) -P-ees1+ees2 (from <i>Corynebacterium glutamicum</i> plasmid pGA1) -P-45 (from <i>Corynebacterium glutamicum</i> chromosome) -P-104 (from <i>Corynebacterium glutamicum</i> chromosome) gfp (jellyfish <i>Aequorea victoria</i>)	Bacillus subtilis 1-E7	P-per, P-45, P-ees1+ees2 はB. subtilisでプロモーター活性を示した。	韓・Academ Patek M et al. (2003) Function of <i>Corynebacterium glutamicum</i> promoters in <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptomyces lividans</i> , and <i>Bacillus subtilis</i> . <i>J. Bacteriol.</i> 104:325-334			pRB394	-hom -leuA -per -ees1+ees2 -45 -104		Kanamycin			
79		Bacillus megaterium MSS41	B. megateriumはsucroseaseを産的にGFPを産生した。	英・Technical Braunschweig	Bierdondtch, R et al. (2007) A sucrose-inducible promoter system for the intro- and extracellular protein production in <i>Bacillus megaterium</i> . <i>Dunn AK et al. (1997) A vector for promoter trapping in <i>Bacillus cereus</i>. <i>Gene</i> 226:297-305.</i>	protoplast method	PRBEm53	sacB (sucrose inducible promoter from <i>Bacillus megaterium</i>)			Ampicillin Tetracycline			
80		gfp (jellyfish <i>Aequorea victoria</i>)	Bacillus cereus UW85	プロモーター活性を持つ配列がベクターに導入された場合、GFPが産生した。	米・University of Wisconsin-China	Dunn AK et al. (1997) A vector for promoter trapping in <i>Bacillus cereus</i> . <i>Gene</i> 226:297-305.	electroporation	pAD123			Ampicillin Chloramphenicol			プロモーター用ベクター
81		pac (Alcaligenes faecalis OICC ASI/87 penicillin G acylase-PGA)	Bacillus subtilis WB600	B. subtilisはPGAを培養液中に産生し、8-nitro-3-phenylacetamidobenzoic acidの加水分解により活性を阻害した。	中・East china university of technology	Zhang M et al. (2006) Production of <i>Alcaligenes faecalis</i> penicillin G acylase in <i>Bacillus subtilis</i> WB600(pMAS) fed with partially hydrolyzed starch. <i>Enzym. Microb. Tech.</i> 40:395-400.			pMAS		Kanamycin			SecB signal peptideにより目的タンパク質は分泌される。
82		vib (vegetative insecticidal protein)	Bacillus thuringiensis 407	B. thuringiensisは菌体内にVIPを産生した。	英・Interactions Institute for vegetable insecticidal protein into mother cell engineering	Rezaei et al. (2003) Interactions for genetic engineering of <i>Bacillus thuringiensis</i> and <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 310:158-162.	electroporation	pHT101-BH-2-SD-YFP-crySI-L	BH and BH1 (Cooperation dependent promoters)	cry	Erythromycin			

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	宿主株	タグ	その他	備考
1		-E.coli	GeneCoposia				pReceiver-YAD	pADH	ADH	Ampicillin	GAL/JAD			
2		-Yeast	GeneCoposia				pReceiver-YBD	pADH	ADH	Gentamycin	GAL4DE			
3		-E.coli	GeneCoposia				pReceiver-Y01	GAL1		Ampicillin		His		
4		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pBT3-N	CYC1	CYC1	Kanamycin				
5		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pBT3-C	CYC1	CYC1	Kanamycin				
6		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pBT3-SUC	CYC1	CYC1	Kanamycin				
7		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pBT3-SYE	CYC1	CYC1	Kanamycin				
8		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pPR3-N	CYC1	CYC1	Ampicillin	HA			
9		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pPR3-C	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA			
10		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pPR3-SUC	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA			
11		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pPR3-SYE	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA			
12		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pCov-Alg5	CYC1	CYC1	Kanamycin				
13		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pAt-Alg5	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA			
14		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pDL2-Alg5	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA			
15		-E.coli	one-Hybrid				pGNG2		ADH1	Ampicillin				
16		-E.coli	one-Hybrid				pJG4-5	GAL1	ADH	Ampicillin				
17		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pGNG1	GAL1,10	ADH	Ampicillin				
18		-E.coli	Mo Bi Tec	Y2H			pEG202	ADH1	ADH	Ampicillin				
19		-E.coli	酵母発現				pORF-GLONE	GUP1		Ampicillin	-HA -His			
20		-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現				pRICHOLI(1-3)	-T7 Alcohol dehydrogase -Alcohol dehydrogase nase	Alcohol Terminato	Zocoin	His			
21		-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現				pRICHOLI-C	-T7 Alcohol dehydrogase -CUP-1	Alcohol Terminato	Zocoin	His			
22		-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現				pRICHOLI-HA	-T7 Alcohol dehydrogase nase	Alcohol Terminato	Zocoin	HA			
23		-E.coli	Mo Bi Tec	ツーンハイブリッド用			pLexA-dir	ADH1	ADH	Kanamycin(E.coli) TRP1(Yeast)				
24		-E.coli	Mo Bi Tec	ツーンハイブリッド用			pDir-LexA	ADH1	ADH	Kanamycin(E.coli) TRP1(Yeast)				
25		-E.coli	Mo Bi Tec	ツーンハイブリッド用			pGAD-HA	-T7	ADH1	LEU2(Yeast) Ampicillin(E.coli)	HA			
26		-E.coli	酵母発現				p427-TEF	TEF1	CYC1	G418(Yeast) Ampicillin(E.coli)				
27		-E.coli	酵母発現				p417-CYC	CYC1	CYC	G418(Yeast) Ampicillin(E.coli)				酵母内でHigh copy
28		-Saccharomyces	TAKARA	染色体組み込み型			pAUR101			Aureobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)				酵母内でLow copy
29		-E.coli	TAKARA	プラスミド体系で自律複製可能			pAUR112			Aureobasidin A Ampicillin(E.coli)				
30		-E.coli	TAKARA	タンパク質発現用			pAUR123	ADH1	ADH1	Aureobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)				
31		-E.coli	TAKARA	マーカー除去型			pAUR135	GAL10		Aureobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)				

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	菌株種	その他	備考
32		-E.coli -Saccharomyces pombe	TAKARA	Schizos. pombe用発現ベクター	TAKARA		pAUR224	CMV		Aurobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)			
33		-E.coli -Aspergillus nidulans	TAKARA	プラスミド状態で自体複製可能	TAKARA		pAUR316			Aurobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)			
34		-E.coli -Aspergillus属	TAKARA	染色体様組成のみ型	TAKARA		pPTR1			Pyribiamine(Aspergillus) Ampicillin(E.coli)			
35		-E.coli -Aspergillus属系状菌	TAKARA	自複製型	TAKARA		pPTR1			Pyribiamine(Aspergillus) Ampicillin(E.coli)			
36		-E.coli -Pichia methanolica		タンパク質発現用	Invitrogen		pMETA pMETB pMETC pMET α A pMET α B pMET α C	AUG1 ADE2 ADE2 ADE2 ADE2 ADE2	AUG1 ADE2 ADE2 ADE2 ADE2 ADE2	Ampicillin	His V5 epitope		酵母内で自律的に複製しない
37		-E.coli -Pichia methanolica		タンパク質発現用	Invitrogen		pMET α B/HSA	AUG1 ADE2	AUG1 ADE2	Ampicillin	His V5 epitope		N-末端にSSS配列(α-factor)
38		-E.coli -Pichia methanolica		タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ A pPICZ B pPICZ C	AOX1 TEF1 CYG1	AOX1 TEF1 CYG1	Zeoicin	C-myc His		N-末端にSSS配列(α-factor) N-末端にSSS配列(α-factor) 成発酵母にシベツ子配列(HSA)
39		-E.coli -Pichia pastoris		タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ α A pPICZ α B pPICZ α C	AOX1 TEF1 EM7	AOX1 TEF1 CYG1	Zeoicin	C-myc His		N-末端にSSS配列(α-factor)
40		-E.coli -Pichia pastoris		タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ-E	TEF1 EM7	AOX1 CYG1	Zeoicin	C-myc His		N-末端にSSS配列(α-factor)
41		-E.coli -Pichia		タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ α-E	AOX1 TEF1 EM7	AOX1 CYG1	Zeoicin	C-myc His		N-末端にSSS配列(α-factor)
42		-E.coli -Pichia		タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ α-E	AOX1 TEF1 EM7	AOX1 CYG1	Zeoicin	C-myc His		N-末端にSSS配列(α-factor)
43		-E.coli -Saccharomyces cerevisiae		タンパク質発現用	Invitrogen		pYES-DEST12	GALI T7	GALI T7	Chloramphenicol Ampicillin URA3(Yeast) ccdB	His V5 epitope		N-末端にSSS配列(α-factor)
44		-E.coli -Pichia pastoris		マルチコピ- <i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pPIC3.5K	AOX1	AOX1	Kanamycin Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
45		-E.coli -Pichia pastoris		マルチコピ- <i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pPIC5K	AOX1	AOX1	Kanamycin Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
46		-E.coli -Pichia pastoris		マルチコピ- <i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pAO815	AOX1	AOX1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		ColEI ori pBR322 ori
47		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pPIC3	AOX1	AOX1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
48		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pPIC3.5	AOX1	AOX1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
49		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pPIC5	AOX1	AOX1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
50		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pHL-D2	AOX1	AOX1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
51		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pHL-S1	AOX1	AOX1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
52		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> PinK発現用	Invitrogen		pPink-HC	AOX1 ADE2	CYG1	Ampicillin	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
53		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> PinK発現用	Invitrogen		pPink α-HC	AOX1 ADE2	CYG1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
54		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> PinK発現用	Invitrogen		pPink-LC	AOX1 ADE2	CYG1	Ampicillin HIS4(Yeast)	His		N-末端にSSS配列(α-factor)
55		-E.coli -Pichia pastoris		タンパク質発現用(メチルアミン)	Invitrogen		pFLD	TEF1 T7	AOX1 CYG1	Ampicillin Zeoicin	His V5 epitope		N-末端にSSS配列(α-factor)
56		-E.coli -Pichia pastoris		タンパク質発現用(メチルアミン)	Invitrogen		pFLD α	TEF1 T7	AOX1 CYG1	Ampicillin Zeoicin	His V5 epitope		N-末端にSSS配列(α-factor)
57		-E.coli -Pichia pastoris		タンパク質発現用(メチルアミン)	Invitrogen		pFLD/GAT	TEF1 T7	AOX1 CYG1	Ampicillin Chloramphenicol Zeoicin	His V5 epitope		N-末端にSSS配列(α-factor)
58		-E.coli -Pichia		<i>Pichia</i> 発現用	Invitrogen		pGAPZ A pGAPZ B pGAPZ C	GAP TEF1 EM7	AOX1 CYG1	Zeoicin	myc epitope His		

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発型	文献	プロモーター	ターゲット	マーカー	N-末端	タグ	その他	備考
59			-EcoII -PclIIa	Pichia 発現用	Invitrogen		pGAPZ α A pGAPZ α B pGAPZ α C	GAP TEFI EM7	Zeoцин		myc epitope His		N-末端にSS配列(α-factor)
60			-EcoII -PclIIa -Pichia pastoris	Pichia pastoris 発現用	Invitrogen		pPIC6 A pPIC6 B pPIC6 C	AOX1 TEFI EM7	Blastidin		c-myc epitope His		
61			-EcoII -PclIIa -Pichia pastoris	Pichia pastoris 発現用	Invitrogen		pPIC6/lacZ	AOX1 TEFI EM7	Blastidin		c-myc epitope His		
62		N-末端にlacZ遺伝子	-EcoII -PclIIa -Pichia pastoris	Pichia pastoris 発現用	Invitrogen		pPIC6 α A pPIC6 α B pPIC6 α C	AOX1 TEFI EM7	Blastidin		c-myc epitope His		N-末端にSS配列(α-factor)
63			-EcoII -PclIIa -Pichia pastoris	Pichia pastoris 発現用	Invitrogen		pPIC6 α /HSA	AOX1 TEFI EM7	Blastidin	HSA	c-myc epitope His		N-末端にSS配列(α-factor)
64			-EcoII -Yeast	クローニング/タンパク質発現用	Invitrogen		pTEF1/Bsd	TEFI EM7	Ampicillin Blastidin				
65			-EcoII -Yeast	クローニング/タンパク質発現用	Invitrogen		pTEF1/Zeo	EM7 CYC1	Ampicillin Zeoцин				
66			-EcoII -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYC2/CT	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でlow copy
67		BamHI-HindIII	-EcoII -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYC2/CT/lacZ	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でlow copy
68			-EcoII -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/CT	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
69		BamHI-HindIII	-EcoII -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/CT/lacZ	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
70			-EcoII -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES3/CT	GALI TRPI	Ampicillin TRP1(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
71		BamHI-HindIII	-EcoII -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES3/CT/lacZ	GALI TRPI	Ampicillin TRP1(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
72			-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES6/CT	GALI TEFI EM7	Ampicillin Blastidin		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
73		BamHI-HindIII	-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES6/CT/lacZ	GALI TEFI EM7	Ampicillin Blastidin		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
74			-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYCG/CT	GALI TEFI EM7	Ampicillin Blastidin		V5 epitope His		酵母内でlow copy
75		BamHI-HindIII	-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYCG/CT/lacZ	GALI TEFI EM7	Ampicillin Blastidin		V5 epitope His		酵母内でlow copy
76			-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
77		N-末端にlacZ遺伝子	-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2.1/V5-His /lacZ	GALI T7 URA3	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
78			-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2.1/V5-His -TOPO	GALI T7 URA3	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His		酵母内でhigh copy
79		N-末端にEnterokinase	-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/NT A pYES2/NT B pYES2/NT C	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)	His Xpress Epitope	V5 epitope His		酵母内でhigh copy
80		N-末端にEnterokinase KpnI-HindIII	-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/NT/lacZ	GALI T7	Ampicillin URA3(Yeast)	His Xpress Epitope	V5 epitope His		酵母内でhigh copy
81			-EcoII -Yeast	大腸菌/クローニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/rp-Jun bla	GALI T7 TRPI	Ampicillin TRP1(Yeast)		V5 epitope Nuclear localization signal B42 activation domain Jun leucine		酵母内でhigh copy

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	宿主種	タグ	その他	備考
82			-E.coli -S.cerevisiae -E.coli -Yeast	大腸菌クローニング ツーンハイブリット用	CloneTech		pGADT7 AD	ADHI T7	ADHI	Ampicillin LEU2	NA			
83			-E.coli -Yeast	ラムダベクターを用いた改良!	Stratagene		pAD-GAL4-2.1 phage	ADHI	ADHI	Ampicillin LEU2	GAL4-AD			
84		cl-vec1aa (132-236)	-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pBD-WT	ADHI	ADHI	Chloramphenicol TRP1 (Yeast)	GAL4-BD			
85		cl-E233(kaa 132-236)	-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pBD-MUT	ADHI	ADHI	Chloramphenicol TRP1 (Yeast)	GAL4-BD			
86			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pLamin C	ADHI	ADHI	Ampicillin	GAL4-BD			
87			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pBD-GAL4 Cam	ADHI T7	ADHI	Chloramphenicol TRP1 (Yeast)	GAL4-BD			
88		cl-vec1aa (132-236)	-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pAD-WT	ADHI	ADHI	Ampicillin LEU2	GAL4-BD			
89		cl-E233(kaa 132-236)	-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pAD-MUT	ADHI	ADHI	Ampicillin LEU2	GAL4-BD			
90			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pESC-HIS	GALI/GAL CYC1	ADHI	HIS3	FLAG	c-myc		
91			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pESC-LEU	GALI/GAL CYC1	ADHI	Ampicillin LEU2	FLAG	c-myc		
92			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pESC-TRP	GALI/GAL CYC1	ADHI	Ampicillin TRP1	FLAG	c-myc		
93			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Stratagene		pESC-URA	GALI/GAL CYC1	ADHI	Ampicillin URA3	FLAG	c-myc		
94		evoglow-Y1遺伝子	-S.cerevisiae -Calbicans -E.coli	蛍光タンパク質発現用	evostal		pGlow-Aac ^W -Yt	Act1	act1	Ampicillin LEU2 URA3			低発現に誘発型	
95		evoglow-Y1遺伝子	-S.cerevisiae -Calbicans -E.coli -Yeast	蛍光タンパク質発現用	evostal		pGlow-Gal ^W -Yt	Gali	gali	Ampicillin URA3(Yeast)			グルコース非存在下で誘発型	
96			-E.coli -Yeast	Cu誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.		pYEX-AT-1 pYEX-AT-2 pYEX-AT-3	CUP1	CUP1	Ampicillin LEU2-d URA3	GST			
97			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	CLONTECH Lab.		pYEX-S1	PGK	PGK	Ampicillin LEU2-d URA3			分装シグナル	
98			-E.coli -Yeast	Cu誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.		pYEX-BX	CUP1	CUP1	Ampicillin LEU2-d URA3				
99		銅誘導酵母E9マウス K-Ras proteinエピソード 発現遺伝子	-E.coli -Yeast	Cu誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.		pYEX-BX	CUP1	CUP1	Ampicillin LEU2-d URA3				
100		Human A20遺伝子	-E.coli -Saccharomyces cerevisiae(trp1- cervisiae)	ツーンハイブリット用システム 細胞死の阻害剤 Inger Lindemannの初期にエト A20cDNAを発現	ベルギー	Yingnian Lu et al.(2004) Mutation-Selective Tumor Remission with Ras- Targeted, Whole Yeast-Based Immunotherapy Cancer Research 64, 5084-5088. DKR De Vack et al.(1996) A20, an inhibitor of cell death, self-associates by its finger domain FEBS Letters 394, 61-64 Zhuangping Jiang et al.(2008) Efficient display of active lipase LipB52 with a Pichia pastoris cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on Saccharomyces cerevisiae cell surface. BMC Biotechnology/8:4 Zhengbing Jiang et al.(2008) Efficient display of active lipase LipB52 with a Pichia pastoris cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on Saccharomyces cerevisiae cell surface. BMC Biotechnology/8:4 Shawn Chen et al.(2007) An Improved System for the Generation and Analysis of Mutant Proteins Containing Unnatural Amino Acids in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Molecular Biology/471,112-122 Meredith M. Stachurski, David D. Beach, D. (1987) The product of the <i>trp1</i> gene expressed under control of the mating type locus induces meiosis and sporulation in fission yeast EMBO J. 1987 March; 6(3): 729-738. Hoffman, C. S. and Winston, F. (1991). Glucose repression of transcription of the schizosaccharomyces pombe <i>trp1</i> gene occurs by a cAMP signaling pathway.								
101		Ipac遺伝子	-E.coli -Pichia pastoris		中国		pASZ20	ADHI	ADHI CYC1	Ampicillin Cytosine TRP1	HA epitope			N末端にSS型列(α -factor)
102		Ipac遺伝子	-E.coli -Pichia pastoris		中国		pLH-047	AOX1	AOX1	Ampicillin Kanamycin				N末端にSS型列(α -factor)
103		ヒトのスーパーオキシダスLL3- p(SOD)遺伝子 (酵母内発現に関するコ ンの至適化)	-E.coli -Saccharomyces cerevisiae		中国		pCHSOD	TDH3	TDH3	Ampicillin LEU2-d				
104			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用			pART1	ADH	ADH	Ampicillin LEU				
105			-Yeast	タンパク質発現用			pOHY21	FBP	FBP	URA3				

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	マーカー	菌株	その他	備考	
121	B型肝炎表面抗原遺伝子の発	-E.coli cerevisiae	-E.coli cerevisiae	タンパク質発現	大阪大学 生命情報研究科	ATSUSHI MIYAHARA et al. (1983) Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast.	pAT77 pAMB2	APase	Ampicillin LEU2				
122	B型肝炎表面抗原遺伝子(HBsAg)	-E.coli cerevisiae	-E.coli cerevisiae	タンパク質発現	USA	Ronald A.Hizeman et al.(1983) Expression of Hepatitis B virus surface antigen in Yeast. Acids Research Vol.11 #9,p.2745-2763	pYEHbs	PGK	Ampicillin LEU2				
123	B型肝炎表面抗原遺伝子(HBsAg)	-E.coli cerevisiae	-E.coli cerevisiae	タンパク質発現	USA	Ronald A.Hizeman et al.(1983) Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. Nucleic Acids Research Vol.11 #9 p2745-2763	pYEHbs	PGK	Ampicillin TRP				
124	scaffold protein(cohesin and Z domain of protein A)遺伝子3'half of α-agglutininの発現	-E.coli cerevisiae	-E.coli cerevisiae	タンパク質発現	JPN	Junji Ito et al. (2009) Regulation of the Display Ratio of Enzymes on the Saccharomyces cerevisiae Cell Surface by the Immunoglobulin G and Cellulosomal Enzyme Binding Domains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,June .p.4149-4154	pWIZZOhi2	UPR-1CL	Ampicillin TRP1			ss配列 3'-half of α-agglutininアンカー	
125	Z domain+Fc domain of hlgG or cohesin+dockrinの分泌 タンパク質発現	-E.coli cerevisiae	-E.coli cerevisiae	タンパク質発現	JPN	Junji Ito et al. (2009) Regulation of the Display Ratio of Enzymes on the Saccharomyces cerevisiae Cell Surface by the Immunoglobulin G and Cellulosomal Enzyme Binding Domains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,June .p.4149-4154	pUEZ pUEZD pUEZF pUEBID	GAPDH	Ampicillin URA3			ss配列	
126	Z domain+Fc domain of hlgG cohesin+dockrinの分泌 タンパク質発現	-E.coli cerevisiae	-E.coli cerevisiae	タンパク質発現	JPN	Junji Ito et al. (2009) Regulation of the Display Ratio of Enzymes on the Saccharomyces cerevisiae Cell Surface by the Immunoglobulin G and Cellulosomal Enzyme Binding Domains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,June .p.4149-4154	pUEZFED pUEZFID	GAPDH+2	Ampicillin URA3			ss配列	
127	β-Carotene合成酵素遺伝子に関する遺伝	-Saccharomyces cerevisiae	-Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現	Fungal Genomics, Laboratory of Microbiology, Wageningen University Wageningen University	Reine Verwaal et al.(2007) High-Level Production of Beta-Carotene in Saccharomyces cerevisiae by Successive Transformation with Carotenogenic Genes from <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> . APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,July.p.4342-4350	pYEpao195- entYB/crE pYEpao195- entE/crd/crE pYEpao195- entG/crd/crE pYEpao195- entH/crd/crE pYEpao211- entYB/crd/crE pYEpao211- entY/crd pYEpao211- entYB/crd/RTS1	TDH3	URA3				

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

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

研究要旨

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*、*SSIIb* 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。

研究協力者

佐々木 伸大（東京農工大学大学院
共生科学技術研究院 助教）

A. 研究目的

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ろ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、1 度に数十万種類の遺伝子を検知することが可能な 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知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 1.0×10^7 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 3.0×10^9 塩基対と見積

もられているため、1 μg 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 6.0×10^5 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。

B. 研究方法

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を用いた (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ィルス由来の 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 μl 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 $^{\circ}\text{C}$ 、4 時間で行った。アレイの洗浄は、標準の方法としては 37 $^{\circ}\text{C}$ 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一回目と 2 回目の洗浄を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 、47 $^{\circ}\text{C}$ 、52 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ で洗浄を 2 回行った後、リンスして検出を行った。

C. 研究結果

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 1.0×10^9 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、*SSIb* 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 (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 2 mg 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 (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 (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 450 mM (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、75 mM (0.5×SSC) の場合では検出されていないことがわかった (図 5)。

D. 考察

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 コピーの遺伝子の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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 伊東 篤志、田口 朋之、和気 仁志、梶山 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 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

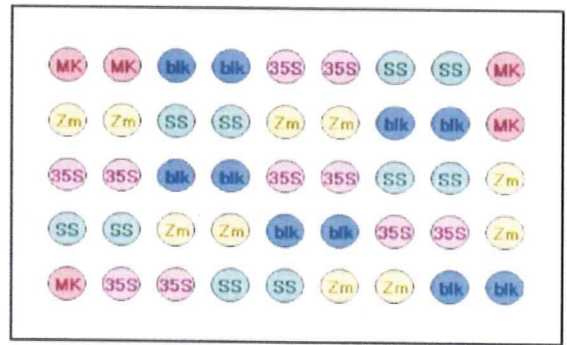


図 1 DNA チップ上に固定したプローブの配置
MK: 蛍光マーカー、blk: ブランクスポット、35S: カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、Zm: トウモロコシ *Adh* 遺伝子、SS: トウモロコシ *SSI/b* 遺伝子

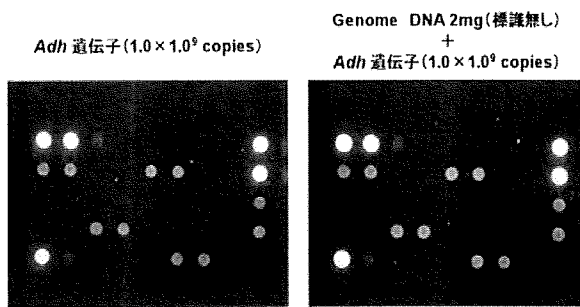


図 2 ゲノム DNA がハイブリダイゼーションに与える影響の検討

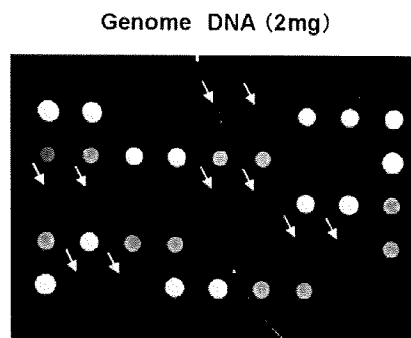


図 3 トウモロコシゲノム DNA を用いた DNA マイクロアレイ解析

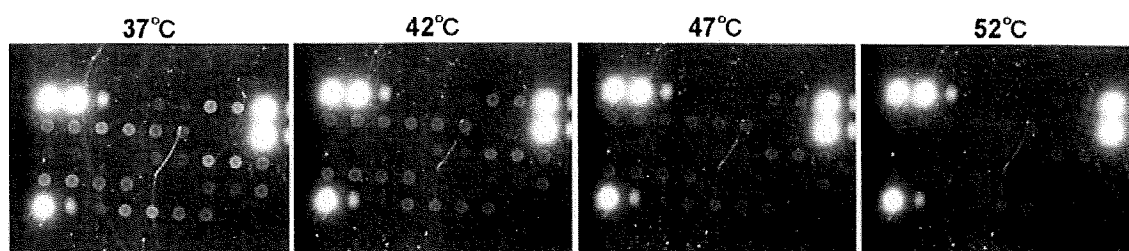


図4 マイクロアレイ洗浄温度の検討

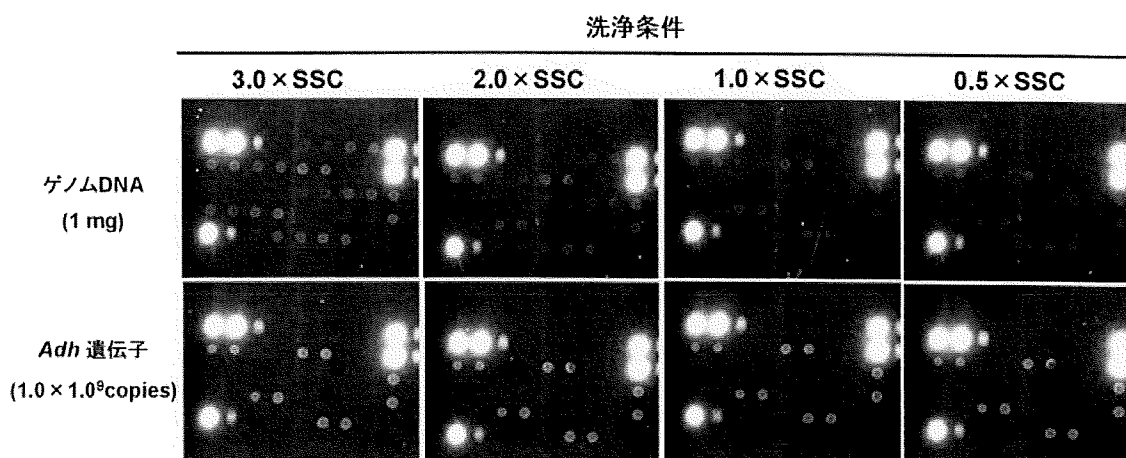


図 5 マイクロアレイ洗浄バッファの検討

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

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

研究要旨

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。

協力研究者

中島 治（代謝生化学部 主任研究官）

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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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

C. 研究結果と考察

(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增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β-アクト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^{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^{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。

D. 結論

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。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。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。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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

中島治、穂山浩、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年10月

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

参考論文

(表 1) 平成 19 年度報告書作成以後に報告された非食用バイオテクノロジー応用ニトリに関する論文

- (1) Minematsu, T., Harumi, T. and Naito, M. (2008) Germ cell-specific expression of GFP gene induced by chicken vasa homologue (Cvh) promoter in early chicken embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (10) 1515-22
- (2) Li, B., Sun, G., Sun, H., Xu, Q., Gao, B., Zhou, G., Zhao, W., Wu, X., Bao, W., Yu, F., Wang, K. and Chen, G. (2008) Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo and ex vivo transfection. *Sci. China Ser. C. Life Sci.* 51 (8) 734-42
- (3) Kyogoku, K., Yoshida, K., Watanabe, H., Yamashita, T., Kawabe, Y., Motono, M., Nishijima, K., Kamihira M. and Iijima S. (2008) Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *J.*

Biosci. Bioeng. 105 (5) 454-9

- (4) Kawabe, Y., Naka, T., Komatsu, H., Nishijima, K., Iijima, S. and Kamihira M. (2008) Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation. *J. Biosci. Bioeng.* 106 (6) 598-601
- (5) Kamihira, M., Kawabe, Y., Shindo, T., Ono, K., Esaka, K., Yamashita, T., Nishijima, K. and Iijima, S. (2009) Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J. Biotechnol.* 141 (1-2) 18-25
- (6) Smith, C.A., Roeszler, K.N. and Sinclair, A.H. (2009) Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation.* 77 (5) 473-82
- (7) Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., Shore, L.S., Katz, A., Stram, Y. and Shemesh, M. (2009) Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 80 (5) 1046-52
- (8) Penno, C.A., Kawabe, Y., Ito, A. and Kamihira M. (2010) Production of recombinant human erythropoietin/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Res.* 19 (2) 187-95

- (9) Lu, Y., Lin, C. and Wang, X. (2009) PiggyBac transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic Acids Res.* 37 (21) e141
- (10) Koo, B.C., Kwon, M.S., Lee, H., Kim, M., Kim, D., Roh, J.Y., Park, Y.Y., Cui, X.S., Kim, N.H., Byun, S.J. and Kim, T. (2009) Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res.* 印刷中
- (表2) 平成19年度報告書作成以後に報告された非食用バイオテクノロジー応用ブタに関する論文
- (11) Dieckhoff, B., Petersen, B., Kuess, W.A., Kurth, R., Niemann, H. and Denner, J. (2008) Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* 15 (1) 36-45
- (12) Kurome, M., Ishikawa, T., Tomii, R., Ueno, S., Shimada, A., Yazawa, H. and Nagashima, H. (2008) Production of transgenic and non-transgenic clones in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 54 (3) 156-63
- (13) Matsunari, H., Onodera, M., Tada, N., Mochizuki, H., Karasawa, S., Haruyama, E., Nakayama, N., Saito, H., Ueno, S., Kurome, M., Miyawaki, A. and Nagashima, H. (2008) Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, Kusabira-Orange. *Cloning Stem Cells.* 10 (3) 313-23
- (14) Kragh, P.M., Nielsen, A.L., Li, J., Du, Y., Lin, L., Schmidt, M., Boegh, I.B., Holm, I.E., Jakobsen, J.E., Johansen, M.G., Purup, S., Bolund, L., Vajta, G. and Joergensen, A.L. (2009) Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res.* 18 (4) 545-58
- (15) Umeyama, K., Watanabe, M., Saito, H., Kurome, M., Tohi, S., Matsunari, H., Miki, K. and Nagashima, H. (2009) Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res.* 18 (5) 697-706

略語

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