

hairpin RNA , GFAP: glial fibrillary
acidic protein, MoMLV: Moloney
murine leukemia virus, pgk:
phosphoglycerate kinase, neo:
neomycin-resistant gene

導入遺伝子	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
ヒト化したGFP	生殖細胞において特異的に蛍光を発した	日本 Transgenic Animal Research Center 他	リボソーム-DNA複合体を胚の血管へ注入した	プロモーターを含まないヒト化した組換えGFPレポーターベクター、pHRGFP (Stratagene)	Cy3プロモーター		ヒト化したGFP	ニワトリ生殖細胞の研究に有用である	1
eGFP	F1, F2世代の肝臓、心臓、腎臓、筋肉において蛍光が観察された	中国 College of Animal Science and Technology 他	プラスミドとカチオン性ポリマーの複合体を精巣へ注入した。精子を集めて人工授精した	pEGFP-N1 (Clontech)	GMVプロモーター	SV40ポリA	eGFP	GMニワトリを作成する新しい方法である	2
ヒトTNF受容体2の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc領域の融合遺伝子	生理活性のある組換えタンパクが血清と卵黄で発現した	日本 Kaneka Corporation	ウイルスを胚の心臓へ顕微注入した	レトロウイルスベクター-pMSCVneo plasmid、Q vector system (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE (Q vector system用)	GFP	炎症の治療に応用が期待される	3
β-ガラクトシダーゼ	生殖腺への遺伝子導入効率を高くできる遺伝子注入のタイミングを調べた	日本 九州大 他	レトロウイルスを胚の心臓へ顕微注入した	レトロウイルスベクター-pMSCV	ニワトリβ-アクチンプロモーター		β-ガラクトシダーゼ		4
プリオン抗体のHL鎖	抗原結合活性を持つモノクローナル抗体を生産させた	日本 九州大 他	レトロウイルスを胚の心臓へ注入した	レトロウイルスベクター-pMSCV (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター		GFP		5
eGFP	胚の体細胞においてeGFPが発現した	オーストラリア Murdoch Childrens Research Institute 他	レトロウイルスを胚盤胞へ注入した	トリレトロウイルスベクター RCASBP	ウイルスLTR RCASBPプロモーター		eGFP		6
eGFP、ヒトFSH	eGFPは白血球において、ヒトFSHは血清において発現していた	イスラエル Koret School of Veterinary Medicine 他	プラスミドと制限酵素を精子へリポフェクションしてから人工授精した	pEGFP-N3 vector (eGFP用、Clontech)、pTarget expression vector (ヒトFSH用、Promega)	GMVプロモーター	SV40ポリA (eGFP用)、SV40 Late ポリA (ヒトFSH用)		高い効率でGMニワトリを作成する方法である	7
ヒトエリスロポエチンとヒトIgGのFc領域の融合遺伝子	活性のある組換えタンパクを卵黄から回収した	日本 九州大	レトロウイルスを胚へ顕微注入した	pMSCVneo (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE	GFP	Fcを付加させたので組換えタンパクが卵黄へ輸送された	8
GFP, DsRed, agrin sh RNA	GFP, DsRed, agrin shRNAを脊髄で発現させた	米国 Northwestern Univ.	PiggyBacトランスポゾンとトランスポゼース遺伝子を胚の脊髄へエレクトロポレーションした	PiggyBacトランスポゾン	CAGプロモーター (GFP, DsRed用)、GFAPプロモーター (GFP用)、ヒトH1プロモーター (agrin sh RNA用)			神経の発生の研究に利用できる	9
ヒトエリスロポエチンとヒトIgGのFc領域の融合遺伝子	組換えタンパクは生理活性があり、G1世代においても発現した	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine	レトロウイルスを胚盤胞の下へ注入した	MoMLVを基にしたレトロウイルスベクター	テトラサイクリンによって誘導がかかるプロモーター			制御されずに恒常的に組換え遺伝子が発現されることを防ぐ工夫をした	10

表1 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリを作成した研究報告

区分	導入遺伝子	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
臓器移植用	ブタ内在性レトロウイルスに保存されている配列に対するshRNA	ブタ内在性レトロウイルスの発現が抑制された	ドイツ Robert Koch Institute 他	レンチウイルスを線維芽細胞に導入して体細胞核移植を行った	レンチウイルスベクター pLVTHM-pol2	H1ポリメラーゼIIIH1-RNA遺伝子プロモーター		GFP	ブタ内在性レトロウイルスはヒト細胞に感染するものがある	11
	GFP-neo融合遺伝子	ミニブタで体細胞核移植を行って仔を作った	日本 明治大 他	細胞をトランスフェクションしてから体細胞核移植を行った	pQBI-pgk (Qbiogene)	pgkプロモーター	BGHポリA, SV40ポリA	GFP	ミニブタはブタよりも情報が少ない	12
	ヒト化したKusabira-Orange (赤い蛍光タンパク)	蛍光タンパクマーカーを導入した細胞は移植した細胞や組織を追跡するために有用である	日本 明治大	レトロウイルスで胎児線維芽細胞へ遺伝子導入してから体細胞核移植を行った	レトロウイルスベクター DΔNsap					13
病態モデル	スエーデンでシユ変異を持つヒトアミロイド前駆体タンパク遺伝子の神経細胞変異型	導入遺伝子の発現は脳においてmRNA、タンパクレベルで確認された	デンマーク Aarhus Univ.	ミニブタの繊維芽細胞にプラスミドをトランスフェクトした		PDGFβプロモーター			アミロイドβペプチドが脳に蓄積するには1-2年かかると予想される	14
	変異型ヒト肝細胞核因子1α遺伝子	糖尿病の症状を示すブタを作成した	日本 BIOS Research Laboratory Inc.	卵細胞質内精子注入法と体細胞核移植を行った	pBluescript SK(-) (Stratagene)	ブタインシュリンプロモーター	SV40ポリA			15

表2 非食用バイオテクノロジー応用ブタを作成した研究報告

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

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

研究要旨

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。

協力研究者

河野徳昭（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）

A. 研究目的

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) 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¹⁻⁷⁴⁾ は、カテゴリー別に整理し、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 (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 (OsActI) 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 (図 3、4) の T₀ 植物より得られた完熟種子 (T₁ 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砕したのち、遺伝子組換え米 (LLRICE601) の検知法⁷⁵⁾ (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、バッファー中粉砕した。この粉砕液を、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 (図 3) から推定される R-5-sGFP rice の遺伝

子構造 (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 *Dra*I または *Hae*III 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 (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。

ddH₂O 77 μ l, ExTaq buffer (10 x) 10 μ l, dNTP mix 8 μ l, primer sense & antisense (100 μ M) 1 μ l each, genome DNA library 2.5 μ l, ExTaq (Takara Bio) 0.5 μ l (reaction volume: 100 μ l)

94°C 5 min. \rightarrow (94°C 30 sec. \rightarrow 58°C 30 sec. \rightarrow 72°C 1 min.) x 30 \rightarrow 72°C 10 min. \rightarrow 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。

GoTaq Green Master Mix (2 x) 3 μ l, primer sense & antisense (10 μ M) 1 μ l each, genome DNA library 1 μ l (reaction volume: 6 μ l)

94°C 5 min. \rightarrow (94°C 30 sec. \rightarrow 58°C 30 sec. \rightarrow 72°C 1 min.) x 30 (or 35) \rightarrow 72°C 10 min. \rightarrow 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 μ 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 μ l の PCR 反応スケールの 6 μ 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 μ l スケール) を 37 °C、1 時間制限酵素消化し、70°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 μ 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 μ l スケール) に使用し、16°C、1 時間反応後、70°C、15 分加熱処理し失活させた。この反応液の 3 μ l を GoTaq 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、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® Premix Ex Taq™II (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. 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.htm)¹⁾ 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(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(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(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(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(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（表5）。

2-1. 機能性食品

機能性食品・嗜好品に関する論文等²⁻²⁷⁾を表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¹⁷⁾、味覚修飾蛋白質ミラクリンを生産するトマト²²⁾及び同蛋白質を生産するレタス²⁶⁾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^{7, 9-13, 20)}7件、次いで脂肪酸組成や改変に関するもの^{6, 8, 15, 19)}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^{16, 21, 23, 24)}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^{2, 3)}、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^{18, 25)}がそれぞれ2件ずつで、窒素含量の増加1件⁴⁾、リン酸の改変1件⁵⁾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²⁸⁻³⁸⁾を表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^{28, 29, 37)}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²⁹⁾。

2-3. 食用医薬

食用医薬に関する論文等を表8に示した³⁹⁻⁴⁴⁾。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⁴⁰⁻⁴²⁾。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⁴¹⁾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表9に示した⁴⁵⁻⁴⁹⁾。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⁴⁷⁻⁴⁹⁾。また、タバコでは、通常のコルヒチン誘起以外の葉緑体形質転換⁴⁵⁾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^{47, 49)}。

2-5. 抗体医薬

抗体医薬に関する論文等を表10に示した⁵⁰⁻⁵⁴⁾。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^{50, 54)}、1件はウキクサ⁵¹⁾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⁵¹⁻⁵³⁾。

2-6. 治療薬

治療薬に関する論文等を表 11 に示した⁵⁵⁻⁶⁵⁾。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⁶¹⁻⁶⁵⁾、3 件でゼニゴケ⁵⁸⁻⁶⁰⁾が用いられている。前項と同様、ウイルスベクター⁶¹⁾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表 12 に示した⁶⁷⁻⁶⁹⁾。2009 年は組換え植物で生産された α -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た。

2-8. 環境浄化

環境浄化に関する論文等を表 13 に示した⁷⁰⁻⁷⁴⁾。環境浄化用の GM 植物は、土壌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^{70, 71, 72)}。今後も食用作物を用いた環境浄化用の GM 植物開発に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、ホスト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。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 β -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。

本年度は新たに、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 (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) 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 (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 (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 (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、乳鉢乳棒を用い粉砕したコメ粉末 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 (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 (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_2 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、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

2009 年に公表・出版された論文等 73 件をカテゴリ別に集計した結果、機能的食品・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、特に機能的食品・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。機能的食品、経口ワクチン及び食用医薬は、宿主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

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として、機能的食品・嗜好品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化の 8 種類を設定し、一覧表を作成した。2009 年に公表・出版された論文等 73 件をカテゴリ別に集計した結果、機能的食品・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、特に機能的食品・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

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 河野徳昭, 今村智弘, 島田浩章, 穂山浩, 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献・インターネットホームページ

1. Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Protein for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of Jan. 6, 2010, http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html
2. Cheng, Beiyou; Zhang, Jian; Jiang, Haiyang; Xia, Mian; Zhu, Suwen; Wang, Jieming. Method for increasing amylose content in *Oryza sativa* seeds via RNA interference of starch synthesis enzyme gene RBE3. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 12pp. CODEN: CNXXEV CN 101519660 A 20090902 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10029257 20090403. Priority: CAN 151:374849 AN 2009:1086688 Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101519660 A 20090902 CN 2009-10029257 20090403 Priority Application CN 2009-10029257 20090403
3. 阿部克、関川晶子、小澤由美、藤田直子、三ツ井敏明、大坪研一、伊藤紀美子、岸根雅宏、「高アミロース米の研究」、日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 講演要旨集 p. 314(3P1186B), 2009. 3. 29.
4. Dhugga, Kanwarpal S.; Appenzeller, Laura M.; Gupta, Rajeev; Abbaraju, Hari Kishan Rao. Vegetative storage protein-type lipooxygenase 6 of maize for increasing the nitrogen storage capacity of a transgenic plant. U.S. Pat. Appl. Publ. (2009), 64pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 611,911. CODEN: USXXCO US 2009094712 A1 20090409 Patent written in English. Application: US 2008-258478 20081027. Priority: US 2005-751871 20051220; US 2006-611911 20061218. CAN 150:415132 AN 2009:421106
5. Yu, Su-May; Hong, Ya-Fang. Transgenic plants expressing a bacterial phytase gene from a tuber-specific promoter for use in animal feed. U.S. Pat. Appl. Publ. (2009), 23pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 989719. Abandoned. CODEN: USXXCO US 2009092703 A1 20090409 Patent written in English. Application: US 2008-55502 20080326. Priority: US 2002-97896 20020313; US 2004-989719 20041115. CAN 150:397320 AN 2009:425861
6. Zuo, Jianru; Mou, Jinye; Wang, Xingchun; Teng, Chong; Tan, Helin. Plant (un)saturated fatty acid and oil metabolism-associated transcription factor, its coding gene and application in preparation of transgenic plants. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 19pp. CODEN: CNXXEV CN 101597329 A 20091209 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10114531 20080606. Priority: AN 2009:1552227 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101597329 A 20091209 CN 2008-10114531 20080606 Priority Application CN 2008-10114531 20080606
7. Tang, Kexuan; Ren, Weiwei; Tang, Yueli. Nucleotide sequence encoding peptide with HPT protein activity of *Lactuca sativa*. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 16pp. CODEN: CNXXEV CN 101586110 A 20091125 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10203447 20081127. Priority: AN 2009:1477796 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101586110 A 20091125 CN 2008-10203447 20081127 Priority Application CN 2008-10203447 20081127
8. Hartnell, Gary F.; Ursin, Virginia M.; Lucas, Don. Methods of feeding pigs and products comprising beneficial fatty acids. PCT Int. Appl. (2009), 44pp. CODEN: PIXXD2 WO

2009097403 A1 20090806 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2009-US32396 20090129. Priority: US 2008-62785 20080129. CAN 151:219464 AN 2009:950988 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date WO 2009097403 A1 20090806 WO 2009-US32396 20090129 W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW RW: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG, BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW, AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM US 20090196950 A1 20090806 US 2009-362102 20090129 Priority Application US 2008-62785P P 20080129

9. Chen, Xiwen; Zhang, Ming; Chen, Defu.

Sequences of Arabidopsis seed-specific promoter FAE1 suitable for vitamin E metabolism engineering. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 10pp. CODEN: CNXXEV CN 101429509 A 20090513 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10152751 20081031. Priority: CAN 151:2171 AN 2009:592768

10. Meyer, Knut. Altering α - and β -tocotrienol content using multiple transgenes in transgenic plants. PCT Int. Appl. (2009), 149pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009046006 A1 20090409 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2008-US78269 20080930. Priority: US 2007-977495 20071004. CAN 150:415134 AN 2009:425818

11. Tang, Yueli; Tang, Kexuan; Ren, Weiwei. Cloning of phyto kinase gene of Lactuca sativa. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 12pp. CODEN: CNXXEV CN 101514345 A 20090826 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10046352 20090219. Priority: CAN 151:329947 AN 2009:1054910 Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101514345 A 20090826 CN 2009-10046352 20090219 Priority Application CN 2009-10046352

- 20090219
12. Tang, Yueli; Tang, Kexuan; Ren, Weiwei; Wang, Yueyue. Protein and cDNA sequences of *Lactuca sativa* γ -tocopherol methyltransferase and its uses in increasing vitamin E in transgenic plants. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* (2009), 12pp. CODEN: CNXXEV CN 101514346 A 20090826 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10046353 20090219. Priority: CAN 151:374874 AN 2009:1054802 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101514346 A 20090826 CN 2009-10046353 20090219 Priority Application CN 2009-10046353 20090219
13. Tang, Kexuan; Ren, Weiwei; Tang, Yueli. Nucleotide sequence coding peptide with *lactuca sativa* hppd protein activity. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* (2009), 16pp. CODEN: CNXXEV CN 101586108 A 20091125 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10203446 20081127. Priority: AN 2009:1480048 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101586108 A 20091125 CN 2008-10203446 20081127 Priority Application CN 2008-10203446 20081127
14. 岡澤敦司, 堀遂人, 橋爪祥輝, 畑直樹, 馬場健史, 福崎英一郎, 小埜栄一郎, 佐竹炎, 小林昭雄, 「植物工場でのフロフラン型リグナン生産に資するシロイヌナズナ形質転換体のリグナンプロファイリング」, 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(2009.7.30-31)講演要旨集 p. 129. (2Ca-15)
15. Seo, Mi Jeong; Ko, Yeong Sam; Jung, Jeong Han; Kim, Mi Jeong. Expressing *Perilla frutescens* microsomal linoleic acid desaturase in *Arabidopsis* for regulation of fatty acid composition in seeds. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* (2009), 22pp. CODEN: KRXXA7 KR 2009028284 A 20090318 Patent written in Korean. Application: KR 2007-93768 20070914. Priority: CAN 150:415127 AN 2009:347989
16. 原田尚志, 藤澤雅樹, 寺本真紀, 櫻井望, 鈴木秀幸, 大山莞爾, 柴田大輔, 三沢典彦, 「シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いたアスタキサンチン合成関連鍵遺伝子と代謝物の解析」, 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(2009.7.30-31)講演要旨集 p. 155 (2Ea-10)
17. Zhai, Hong; Bai, Xi; Zhu, Yanming; Chen, Xiuhua. Protokaryotic expression of SCMRP gene and preparation of polyclonal antibody. *Dongbei Nongye Daxue Xuebao* (2009), 40(7), 60-65.
18. 山田哲也, 松田史生, 斎藤和季, 新井麻衣子, 渡辺啓史, 原田久也, 喜多村啓介, 「アグロバクテリアを介したダイズ形質転換系の確立とその利用」, 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(2009.7.30-31)講演要旨集 p. 151 (2Ea-06)
19. Wang, Qi; Dubois, Patrice. Regulatory elements identified from the soybean 7s-alpha (beta-conglycinin) gene for expressing transgenes in plants. *U.S. Pat. Appl. Publ.* (2009), 26pp. CODEN: USXXCO US 2009064378 A1 20090305 Patent written in English. Application: US 2008-197137 20080822. Priority: US 2007-969515 20070831. CAN 150:276394 AN 2009:270645
20. 吉村佐保子, 田部記章, 藪田行哲, 田茂井政宏, 重岡成, 「葉緑体形質転換技術による α -トコフェロール高含有植物の作出」, 日本農芸化学会2009年度大会(福岡)講演要旨集 p. 314(3P1188B), 2009.3.29.
21. Shaista Naqvia, Changfu Zhu, Gemma Farre, Koreen Ramessar, Ludovic Bassie, Jürgen Breitenbach, Dario Perez Conesa, Gaspar Ros,

- Gerhard Sandmann, Teresa Capell, and Paul Christou. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. PNAS, 106:7762-7767 (2009)
22. 黒田浩文, 市川尚斉, 西崎修代, 菊崎綾子, 高根健一, 棚瀬京子, 平井正良, 加藤一幾, Kim You-Wang, Narendra Duhita, 矢野めぐむ, 溝口剛, 福田直也, 宮崎均, 吉田滋樹, 江面浩, 角田英男, 池上雄二, 「組換えトマトを利用したミラクリン製造」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009.11.5, 0-11, p.35-38.
23. 三沢典彦, 藤澤雅樹, 原田尚志, 瀧田英司, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 大山莞屋爾, 「有用カロテノイド生産のための油量作物の代謝工学」, 日本農芸化学会2009年度大会(福岡)講演要旨集 p. 315(3P1195A), 2009.3.29.
24. 藤澤雅樹, 原田尚志, 三沢典彦, 瀧田英司, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 「カロテノイド生産制御技術の開発」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009.11.5, 1-9, p.55-56.
25. 矢崎一史, 「有用成分を高効率・高生産する組換え植物作出技術の研究開発(その1)プレニルトランスフェラーゼ遺伝子を利用した植物代謝工学技術の開発」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009.11.5, 2-11, p.93-94.
26. Shohael Abdullah, Kim You-Wang, 矢野めぐむ, 平井正良, 江面浩, 「ユビキチンプロモーターカセットを利用した組換えレタスでのミラクリン安定発現技術」, 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(2009.7.30-31), 1Ea-06, 講演要旨集 p. 105
27. 佐竹炎, 森本絹代, 金賢仲, 小埜栄一郎, 岡澤敦司, 畑直樹, 小林昭雄, 「組換えレンギョウ等による高機能成分生産及び閉鎖系での栽培システム構築の開発」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009.11.5, 2-8, p.85-86.
28. 笠原さおり, 南藤和也, 和才昌史, 高岩文雄, 野地智法, 幸義和, 清野宏, 福澤徳穂, 松村健, 島田照久, 「コレラワクチン物質を蓄積した米の開発」, 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(2009.7.30-31), 1Ea-11, 講演要旨集 p. 110
29. 黒河志保, 目島未央, 石川いづみ, 高橋裕子, 中西潮, 徳原大介, 幡井裕乙, 中鉢亜弥, 幸義和, 清野宏, 「イネ種子での医療用タンパク質の生産技術開発(その3)閉鎖型植物工場用組換えイネ作成技術の開発」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009.11.5, 2-2, p.67-68.
30. Huang, Ning; Zhang, Deshui; Nandi, Somen; Petersen, Lyle Robert. Recombinant production of Borrelia OspA proteins in plant cells, particularly in monocot seeds, for use in Lyme disease control. PCT Int. Appl. (2009), 53pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009126816 A1 20091015 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK,

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2009-US40083 20090409. Priority: US 2008-71032 20080409. CAN 151:423598 AN 2009:1258862 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date WO 2009126816 A1 20091015 WO 2009-US40083 20090409 W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW RW: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG, BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW, AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM Priority Application US 2008-71032 P 20080409

31. Thanavala, Yasmin; Arntzen, Charles Joel; Mason, Hugh S. Oral immunology using plant product containing hepatitis surface antigen. U.S. (2009), 6pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 418,177. CODEN: USXXAM US 7527810 B1 20090505 Patent written in English. Application: US 99-420695 19991019. Priority: US 99-418177 19991013. CAN 150:492898 AN 2009:549921

32. Thanavala, Yasmin. Oral immunology using plant product containing a non-enteric pathogen antigen. U.S. (2009), 6pp.,

Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 420,695. CODEN: USXXAM US 7585522 B2 20090908 Patent written in English. Application: US 99-464414 19991216. Priority: US 99-418177 19991013; US 99-420695 19991019. CAN 151:311530 AN 2009:1101710 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date US 7585522 B2 20090908 US 1999-464414 19991216 US 20020004076 A1 20020110 US 7527810 B1 20090505 US 1999-420695 19991019 EP 1093822 A2 20010425 EP 2000-121918 20001007 EP 1093822 A3 20030102 R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE, MC, PT, IE, SI, LT, LV, FI, RO SG 102598 A1 20040326 SG 2000-5888 20001009 CA 2320518 A1 20010413 CA 2000-2320518 20001012 BR 2000004828 A 20010522 BR 2000-4828 20001013 JP 2001163803 A 20010619 JP 2000-313051 20001013 CN 1302652 A 20010711 CN 2000-134411 20001013 TW 237566 B 20050811 TW 2000-89121457 20001013 Priority Application US 1999-418177 B2 19991013 US 1999-420695 A2 19991019 US 1999-464414 A 19991216

33. Thanavala, Yasmin; Arntzen, Charles Joel; Mason, Hugh S. Oral immunology using plant product containing a non-enteric pathogen antigen. U.S. (2009), 6pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 420,695. CODEN: USXXAM US 7572466 B1 20090811 Patent written in English. Application: US 99-464416 19991216. Priority: US 99-418177 19991013; US 99-420695 19991019. CAN 151:243378 AN 2009:965940 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date US 7572466 B1 20090811 US 1999-464416 19991216 US 7527810 B1 20090505 US 1999-420695 19991019 EP 1093821 A2 20010425 EP 2000-121917 20001007 EP 1093821 A3 20030102 R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI,

- LU, NL, SE, MC, PT, IE, SI, LT, LV, FI, RO SG
108815 A1 20050228 SG 2000-5774 20001009 CA
2320741 A1 20010413 CA 2000-2320741 20001012
BR 2000004825 A 20010522 BR 2000-4825 20001013
JP 2001163804 A 20010619 JP 2000-313053
20001013 CN 1302662 A 20010711 CN 2000-137146
20001013 MX 2000010072 A 20040811 MX
2000-10072 20001013 Priority Application US
1999-418177 B2 19991013 US 1999-420695 A2
19991019 US 1999-464416 A 19991216
34. 三好幸宏, 諏佐健太郎, 姫野尚美, 五反田亨, 伊藤亮, 田坂恭嗣, 「組換えジャガイモを利用した家畜用経口ワクチン素材の開発」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009. 11. 5, 2-5, p. 75-76.
35. Yang, Joo-Sung; Yang, Eun Hee. A method for producing a recombinant protein in transgenic plants, particularly, an avian influenza virus oral vaccine and diagnostic antigens. PCT Int. Appl. (2009), 64pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009008573 A1 20090115 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2007-KR4802 20071001. Priority: KR 6937-3 20070710. CAN 150:137588 AN 2009:52333
36. Lindh, Ingrid; Wallin, Anita; Kalbina, Irina; Saevenstrand, Helena; Engstroem, Peter; Andersson, Soeren; Strid, Aake. Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. *Protein Expression & Purification* (2009), 66(1), 46-51.
37. Kim, Young-Sook; Kim, Mi-Young; Kim, Tae-Geum; Yang, Moon-Sik. Expression and Assembly of Cholera Toxin B Subunit (CTB) in Transgenic Carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Biotechnology* (2009), 41(1), 8-14.
38. Yoshida, Kazuya; Sawada, Kazutoshi; Matsui, Takeshi; Makino, Sou-Ichi; Kawamoto, Keiko; Yoshida, Mayumi; Yoshida, Nobuo; Yoshida, Kyoko. Plant vaccine containing Stx2e toxin for swine edema disease. PCT Int. Appl. (2009), 59pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009004842 A1 20090108 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in Japanese. Application: WO 2008-JP55550 20080325. Priority: JP 2007-174919 20070703. CAN 150:71099 AN 2009:24898
39. 青木隆, 加賀谷羽衣子, 田林紀子, 古田和義, Marcelo S. Andrade, 宮代裕子, 油井晶子, 半澤

- 卓, 松村健, 安野理恵, 杉本千尋, 谷口孝喜, 「高機能物質生産イチゴによる技術開発」, 第27回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009. 11. 5, 2-4, p. 71-72.
40. 臼田華奈子, 和田泰明, 石丸泰寛, 小林高範, 高橋美智子, 中西啓仁, 長戸康郎, 森敏, 西澤直子, 「植物由来の血圧降下物質ニコチアナミン高蓄積米の創製」, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 講演要旨集 p. 315 (3P1191A), 2009. 3. 29.
41. 高木英典, 廣井隆親, 楊麗軍, 高岩文雄, 「コレラ毒素 B 鎖と T 細胞エピトープとの融合タンパク質を発現させたイネ種子を用いた効率の良い経口免疫寛容の誘導」, 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 (2009. 7. 30-31), 1Ea-10, 講演要旨集 p. 109
42. 重光隆成, 尾崎真治, 斎藤雄飛, 森田重人, 佐藤茂, 黒田昌治, 増村威宏, 「ヒト成長ホルモンを種子胚乳で発現させた形質転換イネの解析」, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 講演要旨集 p. 315 (3P1192B), 2009. 3. 29.
43. 寺川輝彦, 長谷川久和, 西澤けいと, 浮気由里子, 石本政男, 内海成, 「アルツハイマー病エピトープを蓄積する遺伝子組換えダイズの開発」, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 講演要旨集 p. 314 (3P1189A), 2009. 3. 29.
44. 蘆田弘樹, 田茂井政宏, 福田弘和, Lim Soon, 稲井康二, 渡辺理江, 加藤徹, 茨木裕, 牛山敬一, 重岡成, 淀井敦司, 横田明穂, 「医・農・工融合によるヒトチオレドキシン 1 産生レタスの生産技術の開発」, 第 27 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009. 11. 5, 2-10, p. 91-92.
45. Escribano, Jose M.; Perez-Filgueira, Daniel M. Strategies for improving vaccine antigens expression in transgenic plants: fusion to carrier sequences. *Methods in Molecular Biology* (Totowa, NJ, United States) (2009), 483 (Recombinant Proteins from Plants), 275-287.
46. Yusibov, Vidadi. Vaccine compositions comprising transgenic plant-produced influenza viral antigens for prophylaxis and therapy of influenza virus infection. *PCT Int. Appl.* (2009), 176pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009026397 A2 20090226 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2008-US73776 20080820. Priority: US 2007-956763 20070820; US 2007-973270 20070918; US 2008-21169 20080115; US 2008-57753 20080530. CAN 150:281318 AN 2009:233499
47. 池口正二郎, 一町田紀子, 後藤一法, 石原岳明, 田村咲子, 上田一郎, 増田税, 中原健二, 杉本千尋, 梶野喜一, 中村一郎, 松村健, 福澤徳穂, 松尾幸毅, 安野理恵, 「ウイルスベクターを用いた高発現システムの開発」, 第 27 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 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, 2009. 11. 5, 2-3, p. 69-70.
48. Sim, Joon-Soo; Park, Hyo-Kyung; Kim, Dong-Sub; Lee, Seung-Bum; Kim, Yong-Hwan; Hahn, Bum-Soo. Expression and characterization of

- synthetic heat-labile enterotoxin B subunit and hemagglutinin-neuraminidase-neutralizing epitope fusion protein in *Escherichia coli* and tobacco chloroplasts. *Plant Molecular Biology Reporter* (2009), 27(3), 388-399.
49. Huang, Zhong; Chen, Qiang; Hjelm, Brooke; Arntzen, Charles; Mason, Hugh. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology and Bioengineering* (2009), 103(4), 706-714.
50. Di Carli, Mariasole; Villani, Maria Elena; Renzone, Giovanni; Nardi, Luca; Pasquo, Alessandra; Franconi, Rosella; Scaloni, Andrea; Benvenuto, Eugenio; Desiderio, Angiola. Leaf proteome analysis of transgenic plants expressing antiviral antibodies. *Journal of Proteome Research* (2009), 8(2), 838-848.
51. Woodard, Susan L.; Wilken, Lisa R.; Barros, Georgia O. F.; White, Steven G.; Nikolov, Zivko L. Evaluation of monoclonal antibody and phenolic extraction from transgenic *Lemna* for purification process development. *Biotechnology and Bioengineering* (2009), 104(3), 562-571.
52. Padilla, Sigifredo; Valdes, Rodolfo; Gomez, Leonardo; Geada, Deborah; Ferro, Williams; Mendoza, Otto; Garcia, Cristina; Mila, Lorely; Pasin, Leonardo; Issac, Yordan; Gavilan, David; Gonzalez, Tatiana; Sosa, Raudel; Leyva, Alberto; Sanchez, Julio; LaO, Mailin; Calvo, Yodelis; Sanchez, Rafael; Fernandez, Eutimio; Brito, Jose. Assessment of a Plantibody HB-01 Purification Strategy at Different Scales. *Chromatographia* (2009), 70(11/12), 1673-1678.
53. Jamal, Arshad; Ahn, Mi-Hyun; Song, Mira; Oh, Eun-Yi; Hong, Juyeon; Choo, Young-Kug; Ko, Kinarm; Han, Yeon Soo; Oh, Seung Han; Van Der Linden, Joke; Leusen, Jeanette H. W.; Ko, Kisung. Biological Validation of Plant-derived Anti-human Colorectal Cancer Monoclonal Antibody C017-1A. *Hybridoma* (2009), 28(1), 7-12.
54. Drake, Pascal M. W.; Barbi, Tommaso; Sexton, Amy; McGowan, Edward; Stadlmann, Johannes; Navarre, Catherine; Paul, Matthew J.; Ma, Julian K.-C. Development of rhizosecretion as a production system for recombinant proteins from hydroponic cultivated tobacco. *FASEB Journal* (2009), 23(10), 3581-3589.
55. Xiang, Fengning; Wang, Junfeng. Cloning of geraniol 10-hydroxylase gene from *S. wurtia muscotii*. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 32pp. CODEN: CNXXEV CN 101509005 A 20090819 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10129803 20090321. Priority: CN 2009-10014743 20090302. CAN 151:329942 AN 2009:1022875 Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101509005 A 20090819 CN 2009-10129803 20090321 Priority Application CN 2009-10014743 A 20090302
56. Von Schaewen, Antje; Kaulfuerst-Soboll, Heidi. Method for producing hypoallergenic glycoproteins in mutated or genetically modified plants or plant cells. *PCT Int. Appl.* (2009), 34pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009135603 A1 20091112 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR.