

200939004B

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害

防止に関する安全性確保のための研究

平成 19～21 年度 総合研究報告書

(H19-食品-004)

研究代表者 穂山 浩

平成 22 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止に関する 1
安全性確保のための研究
 穂山 浩

II. 分担研究報告書

1. 非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究(総括) 35
 穂山 浩
2. 産業用及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物の検知に関する研究 43
 五十君 静信
3. 工業原料用遺伝子組換え植物・生物の混入危害に関する研究109
 小関 良宏
4. 医薬品用遺伝子組換え生物や再生医療用動物の調査研究119
 手島 玲子
5. 医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物の調査研究133
 吉松 嘉代

III. 研究成果の刊行に関する一覧表203

IV. 研究成果の刊行物205

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

「非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害
防止に関する安全性確保のための研究」

平成 19-21 年度 総括・分担研究報告書
(H19-食品一般-004)

研究代表者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
研究分担者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
研究分担者	小関 良宏	東京農工大学大学院 共生科学技術研究院 教授
研究分担者	手島 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長
研究分担者	吉松 嘉代	独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 筑波研究部 育種生理研究室 室長

研究要旨：

組換え遺伝子の有無を判断する高処理スクリーニング系の開発を目的に、マルチプレックス PCR を用いた遺伝子組換え (GM) 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。

食品添加物を生産するための遺伝子組換え (GM) 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 GM 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、食用としての評価をされていない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、大腸菌用、乳酸菌用、枯草菌用および酵母用の遺伝子組換えベクターについてそれぞれの特徴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、海外で開催された国際シンポジウムへの参加や現地調査により、この分野の情報収集を行った。GM 微生物の定量的検知法の検討では、リアルタイム PCR による方法を検討し、食品中に混入した大腸菌モデル組換え体を用いて検討を進めた。

遺伝子組換え (GM) 植物においてエタノールや生分解性プラスチックなどの工業原料を生産する研究が進められている。そこで、これら工業原料生産を意図して作出された GM 植物の開発の現状について、文献データベース、インターネット検索、報告書等を用いて調査した。非食性工業原料は新たな酵素タンパク質の付与とともに、食経験のない化合物や消化吸収できない化合物、ヒトの健康を害する可能性のある化合物などを GM 植物に合成させるものであり、食品への混入は認められないと考えられた。そこで、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。その反面、DNA マイクロアレイの検出感度は 1.0×10^7 コピー/アレイであることが分かり、混入率 1% 程度の GM 植物を検知するには化学発光法や抗原-抗体反応等を用いた検出感度の増強が必要であると考えられた。

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が食品に混入することを防止する目的でそれらの検知法を作成することは重要である。本研究では、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、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、最近魚に直接遺伝子導入した報告がなかった。また、米国で開発されたプリオンノックアウト牛について、食品中にその肉が混入してしまったケースを想定して検知法を作成した。さらに、米国 FDA が 2009 年 1 月に公表した、遺伝子組換え動物の規制に関するガイダンスにつき、日本語への仮訳を行うとともに、作成の緯、概要についてまとめを行った。

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。2007-2009 年までに得られた情報 202 件を、カテゴリー別、国別及び作物別に集計した結果、カテゴリー別では、機能性食品・嗜好品：54 件、治療薬：33 件、経口ワクチン：31 件、環境浄化：26 件、ワクチン抗原：20 件、抗体医薬：17 件、食用医薬：14 件、診断薬・試薬：7 件の順に多く、国別では日本 67 件、米国 54 件に次いで中国が 26 件、韓国が 12 件で多く、作物はタバコ 49 件に次いでイネ 25 件、レタス：12 件、トマト 11 件が多かった。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宿主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。設定した 2 種のモデル GM 植物について 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。

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用技術の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められ、国際的な基準作りが進められている。近年では遺伝子組換え食品の開発が進む一方、とうもろこし等の作物を組換え、医療用の医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。さらには食品添加物を生産するための遺伝子組換え微生物は既に応用されており、工業原料産生及び環境浄化目的の遺伝子組換

え植物・生物の開発も急速に行われている。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来の非食用バイオテクノロジー応用植物・生物が誤って食品に混入する可能性が示唆されている。わが国においては、平成13年4月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、最新の科学的知見に基づく審査を行うとともに、輸入時にモニタリング検査等を行っている。また遺伝子組換え生物に関しても、平成16年から遺伝子組換え生物の多様性確保によ

り法律が施行され、遺伝子組換え生物の使用等を規制している。

このような状況の中、本研究においては、非食用のバイオテクノロジーを応用した植物・生物について食品への混入に関する安全性確保を実施するため、非食用バイオテクノロジー応用植物・生物に関する開発・実用化の動向の調査研究、非食用バイオテクノロジー応用植物・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な検知技術の確立を行うことを目的とする。

B. 研究方法

①非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究

1) スクリーニング系の開発

1-1) 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。

1-2) 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。

1-3) 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/mL に調製した DNA 試料液 5.0 μL (DNA として 50 ng) を氷中で加え、全量を 25 μL にした。装置は ABI9700 を用いた。マルチプレックス PCR の試薬は、QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN Cat. No. 206143) と、Eva Green™ (WAKO 販売元 code. 550-80471) を使用した。反応液は、1×Multiplex PCR Mix, 0.5×Q solution, 1×EvaGreen™, 各 0.2 μmol/L プライマー対、滅菌水を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 2.0 μL (DNA として 20 ng) と、ColE1 プラスミド 2 μL を各々氷中で加え、全量を 20

μL にした。ColE1 プラスミドは、 5×10^{-1} ng/μL から 5×10^{-8} ng/μL の間で最適な濃度を検討した。プライマー対は 35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3 plex を中心に、4 plex 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。

2) データベースの確立

各分担研究者によって集計された情報を精査し、データベース用のソフトにデータを入力し作成した。

②産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究

1) バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、論文、書籍、インターネット、業者カタログなどを用い、微生物の遺伝子組換えに関わるベクターに関するデータベース作りを行った。平成 19~20 年度は、大腸菌の市販ベクターと乳酸菌用のベクターについて一覧表を作成した。平成 21 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た。これらの菌については市販で入手可能なベクターと研究用として用いられている主なベクターについて、ほぼ網羅的にデータベース化した。

2) 海外の研究動向や行政的な取り組みに関する情報収集や情報交換として、国際シンポジウムへの参加や現地調査を行った。

平成 19 年度は、スペインで開催された“国際環境および工業応用微生物会議” (The Second International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007) に参加し、

産業用及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物に関する情報収集を行った。

平成 20 年度は、オランダで開催された“国際乳酸菌シンポジウム (LAB9)” (The 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria)に参加し、乳酸菌組換え研究の成果を発表するとともに、乳酸菌を応用した遺伝子組換え微生物に関する情報収集を行った。

平成 21 年度は、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。加えて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や情報交換を行った。

3) 遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、定量 real time PCR 法について、対象とする遺伝子や手技など実験系の検討、食品からの検知に関する検討を行った。

平成 19 年度は、微生物における対象遺伝子を測定する検知技術の検討として、リボゾーマル RNA を標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を開始した。Escherichia coli の 23S rRNA 配列を標的とした RT-PCR 法を試みた。プライマーは、En-1su3F (TGCCGTAACCTCGG GAGAAGGCA), En-1su3' R (TCAAGGCTCAATGTTTCAG TGTC)を用いた。(Matsuda K et al. 2007)

平成 20 年度は、大腸菌モデル組換え体を用いて、ミルク中に混入させた場合の定量的検知法について検討した。モデル組換え体に 1 コピーのみ存在する遺伝子として (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に存在するグラム陽性細菌でしばしば用いられるエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (ery: plasmid erythromycin resistance gene) を標的として検知法を検討した。また、モデル大腸菌を、①濃縮操作なし②PBS へ懸濁

後に濃縮③牛乳へ懸濁後に濃縮、の 3 通りで PCR テンプレートを調製し、解析した。

平成 21 年度は、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。標的や条件は平成 20 年度に検討したのを用い定量 real time PCR 法による検知法を検討した。4) 市販の豚肉から、アンピシリン耐性大腸菌を分離した。大腸菌や、大腸菌と他の菌のシャトルベクターには、遺伝子組換え用ベクターのマーカーとしてアンピシリン耐性がしばしば用いられている。そこで、この分離株の耐性について、PCR にて耐性遺伝子を確認し評価を試みた。

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究

1) データベースを用いた非食性遺伝子組換え食物研究動向調査

生分解性プラスチック、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)・ポリヒドロキシブチレート (PHB) やバイオエタノールなどのキーワードをもとに、文献データベース (Entrez PubMed 等)、インターネット検索 (Google)、研究開発報告書データベース (NEDO 成果報告書データベース等) などを用いて調査し、そこで用いられた導入遺伝子、プロモーターおよびターミネーターについて情報を調べ、これらをカテゴリー別に分類して表とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、論文や報告書等のインターネット上に公開された文字データを利用するものであるため、倫理上の問題はない。

2) DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知

トウモロコシは近くの八百屋で北海道産のものを購入し、可食部分を液体窒素にて急速冷

凍し、 -80°C で保存した。保存してあったトウモロコシを液体窒素内で乳鉢・乳棒を用いて磨砕し、N,N,N-cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) 法を用いてゲノム DNA を抽出した。

DNA マイクロアレイは基板上に 5' 端をアミノ基修飾された合成オリゴ DNA をスポットャーによってスポットし固定化した。スポットは、アレイの向きを決定するためのマーカースポットと、ネガティブコントロールとして DNA を含まないスポット溶液のスポットと、各プローブ DNA を 10 箇所ずつになるように配置した(③-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 (SSIIb) 遺伝子 (5'-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-3')、また、組換え遺伝子のプロモーターとして使用される頻度が高いカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター配列から設計した (5'-CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT-3')。

検出感度を検討するために、アレイ上にスポットした ADH と SSIIb 遺伝子のプローブ配列のアンチセンス鎖で、5' 端が蛍光色素の一種である Cy3 で標識されたオリゴ DNA を合成した。

ランダムプライマーによる標識反応の鋳型として、ADH と SSIIb のプローブ配列を挟み込むように約 120 bp が増幅されるように設計したプライマーを用いて、トウモロコシゲノム DNA を鋳型とした PCR によって増幅されたものを用意した。それぞれの DNA 断片のコピー数は分光光度計を用いて DNA 量を定量した値から算出した。

ランダムプライマーによるターゲット DNA の標識は random primer labeling Kit ver2 (Takara Bioinc) か BcaBEST Labeling kit を用いて、5' 端が Cy3 によって標識された random nonamer か、Cy3 標識された dCTP を

取り込ませることによって行った。

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 Cy3 で標識したターゲット DNA を各コピー数になるように加えたものを用いて 65°C 、4 時間で行った。その後アレイを、 37°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 分間リンスした後に読取装置にセットしてシグナルを検出した。ターゲット DNA の調整に用いたトウモロコシゲノム DNA は抽出したゲノム 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ったものを用いた。

DNA マイクロアレイは 20 年度と同様の方法で作成したものを用いた (③-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 (SSIIb) 遺伝子 (5'-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-3')、また、組換え遺伝子のプロモーターとして使用される頻度が高いカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター配列から設計した (5'-CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT-3')。

ターゲット DNA の調整は超音波処理したゲノム DNA を鋳型としてランダムプライマーラベリングキット (Takara Bio Inc.) と Cy3 標識 dCTP を用いて行った。

DNA マイクロアレイ解析のハイブリダイゼーションは 470 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°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°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°C、42°C、47°C、52°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×SSC バッファー：
150 mM NaCl、15 mM クエン酸ナトリウム) 濃
度を 3×、2×、1×、0.5×となるように調整し、
37°Cで洗浄を 2 回行った後、リンスして検出
を行った。

④医薬品用遺伝子組換え生物や再生医療用動 物の調査研究

1) 文献調査について

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

2) プリオンノックアウトウシに由来する肉の 検知法について

ウシ肉からの DNA 抽出に Genomic-tip 20/G
(Qiagen)を使用した。コンストラクト特異的な
配列の情報が得られなかったので、プリオンタ
ンパク遺伝子座に挿入されたネオマイシン、ピ
ューロマイシン耐性遺伝子の各配列から
real-time PCR のプライマーと FAM 標識された
MGB プローブを各々設計した。ネオマイシン、
ピューロマイシン耐性遺伝子の検量線作成の
ためのスタンダードには EcoRI で制限酵素消化
した pcDNA3.1(-) (Invitrogen)、pIRESpuro3
Vector (Clontech)について 20-20 x10⁶ コピー
間の 10 倍希釈系列を使用した。国産の牛肉か
ら抽出した DNA 溶液(10 ng/μL)に上記のコン
トロールプラスミドをスパイクして、各抗生物
質耐性遺伝子用のプライマー、プローブと内在
性 18S rRNA 用のプライマー及び VIC 標識した
MGB プローブを加えて duplex real-time PCR の
測定を行った。次に、東京で購入したアメリカ
産牛肉から抽出した DNA 溶液 (10 ng/μL) に
ついて上記 duplex real-time PCR を行い、ネ
オマイシンとピューロマイシン耐性遺伝子を

測定した。ウシ DNA からネオマイシンとピュー
ロマイシン耐性遺伝子の両方が同時に検出さ
れたときに陽性と判断した。

3) 米国 FDA の遺伝子組換え(GE)動物の規制に関 するガイダンスの調査

FDA ホームページから 2009 年 1 月に公表され
た組換え動物の規制にガイダンスを入手し、日
本語への仮訳を行い、概要についてまとめを行
った。

⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研 究

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査

遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康に
影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植
物の範囲と位置づけた。また、近年、牛、豚、
鶏等の家畜は、人畜共通の感染症の報告がある
ことから、これらの家畜の健康に影響を与える
植物も、薬用 GM 植物の範囲とした。また、環
境中 (土壌、地下水など) の汚染物質 (重金属、
残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など) に
耐性を示すあるいは吸収する能力が付与され
た植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定め、
その開発及び生産に関する情報を収集した。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
¹⁻²⁰²⁾。得られた情報は、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

19 年度は、自家プロモーター発現系 GMO 検知
法として、ゲノム DNA 挿入外来遺伝子の周辺領
域の配列情報解析に用いられる IPCR 法、アダ
プターライゲーション PCR (A1-PCR) 法の適用の
可否の検討を開始し、ケシの T-DNA 挿入型形質
変異体を材料として両 PCR 法による T-DNA 挿入
部位解析を行い、得られた塩基配列情報をもと

に、本手法が GMO 検知に適用可能か否か評価を行った。

20 年度は、東京理科大島田教授より譲渡を受けたイネのスフィンゴ脂質生合成経路の鍵酵素である DSH1 遺伝子のプロモーターで β -glucuronidase(GUS) を発現する DSH1::GUS rice203) をモデルとして、IPCR 法による GMO 検知の実証実験を行った。

21 年度は、IPCR 法による GMO 検知法の実用化に向け、新たにイネのアクチン遺伝子 (OsAct1) のプロモーターで sGFP を発現する R-5-sGFP rice をモデルとした実証実験を行った。また、real-time PCR 法による GMO 検知についても検討した。以下、詳細を記す。

既知領域に隣接する未知領域の遺伝子情報の取得方法

ゲノム DNA 既知領域周辺部の遺伝子情報の取得方法について、調査、検討した。

シロイヌナズナ T-DNA タグラインにおける T-DNA 挿入部位の解析など、ゲノム DNA 上の既知 (内在もしくは外来) 配列に隣接する未知配列情報の取得に頻用されているのは下記の IPCR 法及び A1-PCR 法の 2 種の手法である。

IPCR 法

本法は、試料 DNA を適当な制限酵素で断片化し、自己閉環させた環状 DNA ライブラリーを作成、それを鋳型として、既知配列特異的なプライマーにより、未知領域方向へ PCR 増幅を行い既知配列に隣接する未知配列情報を取得するものである。

A1-PCR 法

本法は、試料 DNA を適当な制限酵素で断片化し、adaptor を付加した adaptor 付加 DNA ライブラリーを作成し、これを鋳型として、アダプター特異的なプライマー、及び既知配列特異的なプライマーで PCR 増幅を行い、既知配列に隣接する未知配列情報を取得するものである。

既知領域に隣接する未知領域の遺伝子情報

の取得

我々は、上述の未知領域の塩基配列取得法を、ケシのアグロバクテリウム由来 T-DNA 挿入型形質変異体の T-DNA 挿入部位、及びそのコピー数の解析に利用し、解析対象とした形質変異ケシに少なくとも 8 ヶ所 (8 コピー) の T-DNA 挿入部位が存在することを明らかにしている。以下にその概略を記す。

ケシのアグロバクテリウム T-DNA 挿入型形質変異体における変異原因遺伝子の探索

ケシはモルヒネをはじめとするアヘンアルカロイド類を生産する重要な薬用植物のひとつである。ケシのアグロバクテリウム感染による T-DNA 挿入形質変異体は花卉の形状の異常などの形態変異、ならびにアヘンアルカロイドの成分変異が認められた。これらの形質変異はアグロバクテリウム T-DNA のケシゲノム DNA への挿入に因るものと予想されたため、アヘンアルカロイド生合成経路に関わる遺伝子 (群) の解明を目的とし、その挿入部位近傍のゲノム DNA の塩基配列解析を行った。

T-DNA 挿入部位ならびにコピー数の解析

野生株と比較してモルヒネ含有量が低下し、テバイン含有量が増加した、ケシ (*Papaver somniferum L.*) の *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 株の感染による T-DNA 挿入型形質変異体を材料とした。

In vitro 培養植物体の葉より DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を制限酵素、*KpnI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HaeIII* でそれぞれ消化し、自己閉環ライゲーションさせ自己閉環ゲノム DNA ライブラリーとしてインバース PCR (IPCR) の鋳型に用いた。また、平滑末端を生じる *EcoRV*, *PvuII*, *HaeIII* で消化したものについては、アダプターを付加し、アダプター付加ゲノム DNA ライブラリーとしてアダプターライゲーション PCR (A1-PCR) に用いた。

IPCR は、*Agrobacterium rhizogenes* strain

MAFF03-01724 plasmid pRi1724 の塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AP002086) よりデザインした、T-DNA の 5' 側末端 (Left Border: LB) 及び 3' 側末端 (Right Border: RB) に特異的なプライマーを用い、T-DNA に接する配列未知のゲノム DNA 方向へ伸長反応を行い、T-DNA に接するゲノム DNA の増幅を行った。なお、PCR は特異性を上げる為 nested PCR により行った。特異的に増幅された PCR 産物はシーケンシングベクターにクローニングし、ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) による塩基配列解析に供した。また、A1-PCR においては、アダプター配列特異的なプライマー及び上記の LB、RB 特異的なプライマーを用い、T-DNA に接する配列未知のゲノム DNA 方向へ PCR を行い隣接ゲノム DNA の増幅を行った。なお、PCR (nested PCR) 及び塩基配列解析はインバース PCR 時と同様の手法で行った。以上を概念図としてまとめたのが⑤-図 2 である。

IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法の検討

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。⑤-図 3 に DSH1::GUS rice における GMO 検知の概念図を示した。

モデル植物 DSH1::GUS rice を使用した自家プロモーター発現系 GMO 検知の実証実験

自家プロモーター発現系 GMO モデル植物 DSH1::GUS rice

遺伝子導入宿主植物の自家プロモーターによりマーカー遺伝子を発現するイネのモデル植物として、イネのスフィンゴ脂質生合成の鍵酵素である dihydrosphingosine C4 Hydroxylase 1 のプロモーター制御下でマーカー遺伝子である β -glucuronidase (GUS) を発現する DSH1::GUS rice (203) を使用した。この組換えイネは DSH1 遺伝子の機能解析の過程で、発現部位解析のため東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章研究室において作製されたものであり、DSH1 プロモーター制御下で GUS を発現する植物形質転換用ベクター pCAMBIA1301 をバックボーンとするコンストラクト (⑤-図 3) がイネ日本晴にアグロバクテリウム法により導入されている。組換えイネは同研究室より実生苗として譲渡を受けた。なお、DSH1 遺伝子の発現部位は stigma (柱頭)、vascular bundle (維管束)、apical meristem (茎頂分裂組織) と報告されている。

DSH1::GUS rice の栽培

DSH1::GUS rice 及び共に譲渡を受けた非組換えイネ (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において行った。播種後約一ヶ月の実生苗を径 15 cm x 深さ 12.5 cm

の下記の培養土を入れたポリポットに移植し、ばんじゅう A (内寸 38 x 64 x 14.5cm) 1 つあたりに 7-8 鉢を入れ、ポット全体が浸るまで灌水した。

培養土は、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) にくみあいゼオライト入粒状培土鹿沼 A 号 (鹿沼産業株式会社) (N 0.6 g, P 1.5 g, K 0.6 g/kg) を補充したものを使用した。短日条件に変更した播種 61 日後に、くみあい尿素入り窒素加里化成 2 号 NK2 (16-0-16) を鉢ごとに 3 g 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 60 日目までは、14 時間明 (温度 28°C) / 10 時間暗 (温度 23°C)、61 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 12 日後に出穂、開花が認められ、播種後 102 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 μ l 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²⁰⁴⁾

(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 μ l 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。

IPCR 用ゲノムライブラリーの調製

DSH1::GUS rice は文献²⁰³⁾記載の情報から⑤-図 4 に示すような遺伝子構造を有すると推定されたので、これをもとに DSH1 プロモーターの 5' 領域及び 3' 領域それぞれの近傍領域について、電気泳動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、その結果、5' 領域については、EcoRV と DraI (いずれも平滑末端) の二重消化、また 3' 領域については MspI が適当なサイズの増幅産物を与える自己閉環ゲノム DNA ライブラリーが作製できるものと考えられた。そこで、それぞれの制限酵素でゲノム 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

DSH1 プロモーターの 5' 領域及び 3' 領域それぞれに特異的な「外向き」プライマーを各 2 セット設計し (⑤-図 5)、IPCR に用いた。PCR 機器は Perkin Elmer 社 GeneAmp 2400 を使用した。反応系の組成及び PCR 条件は下記のとおり。
ddH₂O 77 μ l, ExTaq buffer (10 x) 10 μ l, dNTP 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. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C infinite

GUS 米の検知法の検討

DSH1::GUS rice の新鮮葉及び収穫されたコメを用い、GUS 米の検知法について検討を行った。ひとつは 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (4MUG) を基質とする蛍光法であり、新鮮葉は破砕バッファー中で破砕し、遠心分離した上清を粗酵素液として GUS 活性のア

ッセイに使用した。コメについては、籾殻と玄米に分離したのち GUS アッセイに供した。もうひとつは、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) を基質とする組織化学的染色法であり、GUS 遺伝子を有する未承認遺伝子組換えパパイヤ(55-1)の GUS 試験法^{205、206)}に従い、新鮮葉切片、コメ(籾殻、玄米)について行った。

蛍光法

非組換え体は WT2、WT14 株を、DSH1::GUS rice は GUS1、GUS13 株を使用した。新鮮葉約 100 mg をメスで細かく裁断し、2 ml 容のスクリーキャップ付きチューブに入れ、破碎バッファーを(新鮮重量(mg) x 4/3) ml 加えた。これに 4.8 mm 径ステンレスボール 2 個を入れ、MS-100(TOMY) で 2,000 rpm 60 秒破碎した。いったん氷上で 1 分静置したのちふたたび MS-100 で 2,000 rpm 30 秒破碎した。これに 20 μ l の基質溶液と 130 μ l の破碎バッファーを加え 37°C で 1 時間ゆっくりと攪拌したのち、5,000 rpm で 5 分遠心分離し、上清 50 μ l を新しい 0.5 ml エッペンドルフチューブに移した。これに 150 μ l の反応停止バッファーを加え UV 305 nm 下蛍光を観察した。

破碎バッファー: 50 mM SPB (pH 7.0), 0.1% Triton X-100, 10 mM β -ME, 1 mM EDTA

4MUG 基質溶液: 10 mM 4MUG (破碎バッファーに溶解) 反応停止バッファー: 0.2 M Na₂CO₃

組織化学的染色法

非組換え体は WT2 株を、DSH1::GUS rice は GUS1 株を使用した。コメ(脱穀前) 12 粒をメスで殻を剥き、玄米と籾殻に分離した。新鮮葉は先端の 1 cm 程度を 5 切片に切断した。これらの試料を 15 mL コニカルチューブ入れ、X-Gluc 基質溶液を加えた(玄米 500 μ l, 籾殻 1 ml)。減圧チャンバー内で 15 分間減圧処理したのち、37 °C インキュベーターで約 14 時間保温した。その後、実体顕微鏡下青色色素の有無を観察した。

X-Gluc 基質溶液: 1 mM X-Gluc in 0.2 M SPB (pH 7.0)

PCR 法による遺伝子組換えマーカの検知の試み

本研究の調査結果から、GM 植物で使用される頻度が高い遺伝子は「組換えマーカ」として、それらを標的とした PCR 法による組換え体のスクリーニングに使用できる可能性が示された。そこで、前述の DSH1::GUS rice をモデル GM 植物に設定し、組換えマーカ遺伝子のうち、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hptII)、NOS ターミネーターのそれぞれについて特異的なプライマーを用い、モデル GM 試料より調製したゲノム DNA を鋳型に、各遺伝子の PCR 法による組換え体の検知が可能か検討した。今回は、アリゾナ州ツーソンのスーパーマーケットで購入した米国市場流通米 4 種(試料コード A、B、C、D) をモデル試料とした。試料 D のみがカリフォルニア州のメーカーの製品で、他の 3 種はテキサス州のメーカーの製品であった。なお、PCR 反応の陽性対照としては内在性の SPS 遺伝子を使用した。

モデル植物 R-5-sGFP rice を使用した自家プロモーター発現系 GMO 検知の実証実験

自家プロモーター発現系 GMO モデル植物 R-5-sGFP rice

DSH1::GUS rice と同様に、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。本 GM イネは、イネの分岐鎖アミノ酸(イソロイシン、バリン) 生合成経路の鍵酵素であるアセト乳酸合成酵素(ALS) を標的とした ALS 阻害剤(ビスピリバックナトリウム塩) とその阻害剤耐性の点変異型 ALS 遺伝子の組合せにより形質転換植物を選抜する技術を用い作出されたものであり、導入された遺伝子コンストラクト中に、イネ由来 ALS プロモーターでドライブされた 2 点

変異型イネ由来 ALS 遺伝子、そしてイネ由来の Actin1 遺伝子 (OsAct1) のプロモーターでドライブされたマーカー遺伝子、改変型緑色蛍光タンパク質 (sGFP) の 2 種の自家プロモーターによる外来遺伝子発現ユニットを有している。

今回、R-5-sGFP rice の T₀ 植物より得られた完熟種子 (T₁ 種子、種籾) を実験に使用した。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) 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において行った。

シャーレ中、R0 水で十分に湿らせたろ紙上に種籾を置き、暗所、30°C で発芽させた。6 日後、発芽種子はアラシシステムに充てんした JA 粒状くみあい合成培土 3 号 (サンアグロ全農) (N 0.4 g, P 0.8 g, K 0.6 g /kg) に植え付け、ばんじゅう A (内寸 38 x 64 x 14.5cm) 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。

IPCR 用ゲノムライブラリーの調製

R-5-sGFP rice はベクターの構造情報 (⑤-図 6) から⑤-図 7 に示すような遺伝子構造を有すると推定されたので、これをもとに 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た。その結果、DraI または HaeIII で消化することにより、AGE での識別に適したサイズの IPCR 増幅産物を与える自己閉環ゲノム DNA ライブラリーが作製できることが明らかになった。そこで、各制限酵素でゲノム DNA を完全消化したのち、self-ligation により環状ゲノム DNA ライブラリーを作製した。

IPCR 法による自家プロモーター系 GMO 検知法の検証

OsAct1 プロモーター特異的な「外向き」プライマーを各制限酵素消化ライブラリーについて設計し、IPCR に用いた (⑤-図 8)。PCR 機器は Perkin Elmer 社 GeneAmp 2400 を使用した。ExTaq をポリメラーゼとして使用した場合の反応系の組成及び PCR 条件は下記のとおりである。

ddH₂O 77 µl, ExTaq buffer (10 x) 10 µl, dNTP mix 8 µl, primer sense & antisense (100 µM) 1 µl each, genome DNA library 2.5 µl, ExTaq (Takara Bio) 0.5 µl (reaction volume: 100 µl) 94°C 5 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C ∞.

また、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及び PCR 条件は下記のとおりである。

GoTaq Green Master Mix (2 x) 3 µl, primer sense & antisense (10 µM) 1 µl each, genome DNA library 1 µl (reaction volume: 6 µl) 94°C 5 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 (or 35) → 72°C 10 min. → 4°C ∞.

実用化に向けたゲノム DNA 抽出法、PCR 条件等

の検討

上記の条件等の検討は、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

まず、コメ（玄米）を検体とした GMO 検知の可否について検討した。市販の、コメからのゲノム DNA 抽出・精製キットである GM quicker2（ニッポンジーン）を用い、乳鉢乳棒を用い粉碎したコメ粉末 0.5 g よりゲノム DNA を抽出・精製し、制限酵素処理、セルフライゲーションののち、IPCR に供した。

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

つぎに、同じく 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。ここで、反応スケールの小スケール化に加え、これまでフェノールクロロホルム抽出によって行っていた各酵素の失活処理を加熱処理に変更し、さらに PCR 酵素を ExTaq (Takara Bio) からマスターミックス形態の GoTaq Green Master Mix (Promega) に変更し、PCR の反応スケールを 100 μ l から 6 μ l にスケールダウンした。コメ 1 粒より抽出・精製したゲノム DNA を 10 μ l スケールで 37 $^{\circ}$ C、1 時間制限酵素消化し、70 $^{\circ}$ C、15 分加熱処理し制限酵素を失活させた。この反応液のうち 3 μ l を DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Bio) を用いた 6 μ l スケールの自己閉環ライゲーション反応に使用し、16 $^{\circ}$ C、1 時間反応後、70 $^{\circ}$ C、15 分加熱処理し失活させた。この反応液の 3 μ l を Go Taq Green Master Mix (Promega) を用いた IPCR 反応に使用した。本 PCR 酵素液は反応後、電気泳動用色素等を添加することなく電気泳動が可

能であるため、PCR 反応後の全量を電気泳動に供し、増幅産物を解析した。

Real-time PCR 法による GMO 検知法の検討

自家プロモーター発現系 GM 植物を非 GM 植物と識別する方法として、real-time PCR 法の適用を検討した。OsAct1 プロモーターを使用した自家プロモーター発現系 GM 植物では、⑤-図 9 のように、ホスト由来の 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を用い、SYBR[®] Premix Ex TaqTMII (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 を行い、Delta Rn 対 PCR cycle 数の増幅曲線をプロットした。得られた増幅曲線について、 $\Delta\Delta$ Ct 法を適用し、各遺伝子領域の存在比率を求めた。

OsAct1 プロモーター特異的プライマー: product size: 65 bp

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

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

OsAct1 プロモーター/コード領域境界領域特

異的プライマー:product size: 77 bp

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

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

C. 研究結果

①非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究

1)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 (①-図 1)。

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

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

2)データベースの確立

各分担研究者によって集計したデータをもとに、GM 動物、GM 微生物、工業原料 GM、薬用 GM の表の統一を行った。4 データとも表記の統一および項目の統一を行い、「番号」、「区分」、「生物種」、「研究・開発国・機関」、「開発段階」、「遺伝子組換え法」、「導入遺伝子」、「生産物」、「生産物の種類」、「機能・薬理・特徴・用途」、「ベクター、プロモーター」、「ターミネーター」、「マーカー」、「備考」、「参考資料 1」、「参考資料 2」、「参考資料 3」、「参考資料 4」、「参考資料 5」、「参考資料 6」、「分類」の 23 項目を設けた。

②産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究

1) バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、3 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、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌用ベクター、酵母用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。これらの 4 つの菌群に関してほぼ網羅的なデータベース化を行った。

ベクターは、用途・機能・特徴、研究・開発メーカー、ベクター名、プロモーター、ターミネーター、マーカーにつき調べた。

大腸菌用ベクターは、844 の大腸菌用ベクターについて、カタログ及び web を中心に市販ベクターを調査し一覧表を作成した。プロモーターは、T7、lac、SP6、CMV などが頻繁に用いられていた。ときに用途の限定された特殊なプロモーターが使われている場合があった。マーカーとしては、ampicillin を用いていることが多く、kanamycin、chloramphenicol も多用されていた。その他 spectinomycin、hygromycin、geneticin 他が用いられていた。リストには、大腸菌と他の菌のシャトルベクターについてもまとめた。遺伝子組換え操作の確立している

大腸菌で遺伝子操作をした後、エレクトロポレーション法などで当該微生物の形質転換を行うために開発されているので、プラスミド上に複数の ori やマーカーを持つのが特徴である。

乳酸菌用ベクターは、357 をリスト化した。市販のベクターはほとんどないため、主に論文、書籍等の文献を基に一覧表を作成した。これらの組換え微生物はそのほとんどがまだ実用化までは至っていない研究段階であり、ワクチン、機能性剤等として開発中である。ベクターの種類は多いが、プロモーター、ターミネーター、マーカーの種類はそれほど多くなかった。特にマーカーは選択肢が少なく、erythromycin が一般的で、chloramphenicol が使われる場合もあった。

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、調べた。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が開発したプラスミドを利用しているようである。マーカーとしては、ampicillin, tetracycline, kanamycin, chloramphenicol, erythromycin などが用いられていた。

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。ベクターのマーカーとしては、ampicillin, kanamycin が広く用いられていた。酵母でのマーカーとしては HIS, TRP, URA, LEU などが使われている。

2) 海外の情報収集として、3年間に3回海外出張を行い、国際シンポジウムでの情報発信及び情報交換、情報収集と、現地調査としてパストゥール研究所を訪問し専門家と直接の情報交換などを行った。

平成 19 年度は、スペインで開催された“国際環境および工業応用微生物会議” (BioMicroWorld 2007) に参加し、産業用及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物に関する情

報収集を行った。環境浄化のために微生物を利用しようという試みは複数報告されていたが、自然分離株に関する機能の検討が多く、原油汚染、塩害、重金属汚染除去に関しての研究が報告されていた。一部の報告ではどのような酵素が有効かといった遺伝子レベルでの検討もあった。一方、組換え技術を用いて製剤化し、実用化に至っている例はまだなかった。

平成 20 年度は、オランダで開催された“国際乳酸菌シンポジウム (LAB9)” (The 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria (LAB9)) に参加し、乳酸菌組換え研究の成果を発表するとともに、乳酸菌の遺伝子組換えに関する情報交換を行った。遺伝子組換え技術を用いた育種としては、経口粘膜ワクチンの抗原運搬体として乳酸菌を用いる研究やプロバイオティクスとしてヒトの健康に有用な乳酸菌の育種に組換え技術を応用するなどの研究が進められていた。

平成 21 年度は、フランスのパストゥ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、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。これ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る。たとえば蛍光遺伝子を組み込んだ細菌などが代表的な例である。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、生体への投与は生菌でないと効果が低くなってしまふ。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が進んでおらず、この考え方を国際的に統一す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 法による検知法の検討を行った。

平成 19 年度は、高感度の検出が可能とされるリボゾーマル RNA を標的とした定量 real time PCR 法による検知法の検討を開始した。大腸菌を対象として、主に菌体の処理方法の検討を行った。1 step RT-PCR と 2 step RT-PCR を行ったのち定量 PCR を行い評価したところ、実験毎検出感度が異なり、評価可能な安定した試験法となるよう検討を行った。

平成 20 年度は、DNA を標的とした定量 real time PCR 法による検知法の検討を行った。大腸菌モデル組換え体を対象として、ミルクに混入した場合の定量 PCR を行い具体的な検知法を検討した。プラスミドの分子数として 100 個程度あれば本法により検知が可能であることが示された。

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 dxs 遺伝子をターゲットとするプライマーと、プラスミド上にある ery 遺伝子をターゲットとするプライマーを用いて定量 PCR を行なった。その結果、ery 遺伝子用プライマーを使用した場合の方が Ct 値は 8 程度高かった。大腸菌を、①濃縮操作なし②PBS へ懸濁後に濃縮③牛乳へ懸濁後に濃縮、の 3 通りで PCR テンプレートを調製し、リアルタイム PCR で解析した。その結果、PBS へ懸濁した場合には濃縮操作をしなかった場合と同等の検出効率であった。

平成 21 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。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。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コピー数が多いことから、菌数では 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、接種直後 (T=0h) と、EC 培地で 24 時間増菌後 (T=24h) を調べた。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。

4) デル組換え大腸菌を接種していない市販の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用の PCR で増幅された。この分離菌株の内、#6 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。

③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究

1) データベースを用いた非食性遺伝子組換え食物研究動向調査

1-1. 可食性工業原料

植物における可食性工業原料生産のための

遺伝子組換え技術としては、主に2つの方向性がある。1つは原料となる化合物の増量もしくは改質、2つ目は化合物の量・質自体は変わらず、原料として収穫後の加工段階を容易にするための改変である。前者の一例として、Wuらはサトウキビに sucrose の異性体である isomaltulose (palatinose) を合成する遺伝子 (sucrose isomerase) を導入しアルコール発酵の原料として、糖を従来の2倍収穫できる遺伝子組換えサトウキビを作出した (Wu et al. *Plant Biotechnol. J.* 5: 109-117 (2007))。

サトウキビにおいて isomaltulose は少量合成蓄積されているが、しかしサトウキビ内のインベルターゼにより分解されることがないため、蓄積が進むと考えられる。さらに Wuらは液胞で isomaltulose が蓄積するように、N-terminal pro-peptide (NTPP) を結合した sucrose isomerase 遺伝子することによって、sucrose の蓄積を妨げることなく isomaltulose を液胞に蓄積させ、全体として非遺伝子組換え体に比べ、2倍量の糖の蓄積に成功した。Isomaltulose は虫歯になりにくく、消化が遅いため血糖値を上げにくい甘味料として日本でも用いられている。日本においては、これを還元した化合物を含む食品が特定保健用食品に指定されているが、sucrose と同様に glucose と fructose を含むため、fructose 代謝疾患のある人の甘味料には適していない。

また改質することによって原料としての有用性を高める研究として、食品となる植物ではないがポプラにおけるリグニン合成抑制がある。Huらは、アンチセンス法により4-クマル酸 CoA リガーゼ遺伝子発現を抑制した組換えポプラを作出し、この組み換え体においてリグニン量が45%減少し、セルロース含有量が9~15%増加し、葉、根、茎の成長が促進され (Hu et al. *Nature Biotechnol.* 17: 808-812 (1999))、木質系セルロースの有効活用のために有用な手法であると考えられている。

改質のもう1つの例がバイオエタノール生産における低デンプン・高糖類蓄積遺伝子組換え植物の作出である。デンプン質の作物からバイオエタノールを製造する際、デンプンを糖に分解するために、アミラーゼを加える必要がある。このコストや手間を削減するために、アミラーゼを遺伝子導入してデンプンを分解し、糖に分解させて蓄積させる研究がなされている。タバコにイネの α -アミラーゼ遺伝子を導入した場合、細胞質での発現がみられ、葉緑体移行シグナルを結合させた α -アミラーゼ遺伝子を導入した場合において葉緑体のストロマでの発現が見られた (Chen et al. *Plant Physiol.* 135: 1367-1377 (2004))。しかし、 α -アミラーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換えイネにおいて葉におけるデンプン蓄積が減少するとともに、完熟種子の乾燥重量も減少してしまった (Asatsuma et al. *J. Appl. Glycosci.* 53: 187-192 (2006))。このため、穀粒における糖蓄積そのものを増加させるために植物体が有する α -アミラーゼ遺伝子をそのまま導入してその酵素活性を増加させるだけでは、貯蔵デンプンの蓄積を抑制してしまい、結局バイオマス増加にはつながらないため、かえって効率が悪くなる可能性がある。

これら化合物の蓄積量の増大やその改質は、遺伝子組換え食品における第2世代である栄養改変型と考え方において類似したものであり、基本的に「食品」としての可食成分に変化がなく、その安全性評価とリスク管理も第2世代の遺伝子組換え食品と同様であると考えられる。しかし、栄養としてではなく、新たな工業原料成分として改変・付加する場合は、「C-2. 非食性工業原料」の項目に該当するものとなり、リスク管理において十分な注意が必要である。

上述のように、遺伝子組換え植物においてバイオエタノール生産を目指してアミラーゼを発現させて貯蔵デンプンを分解して糖として

植物体に蓄積させようとする試みは成功していないが、バイオエタノールの効率的な生産のために、原料となる穀物植物に対し、2つ目の方向性である収穫後の加工段階を容易にするための遺伝子組換えによる改変の研究開発が活発に進められており、その研究開発の中心が微生物由来の耐熱性アミラーゼ遺伝子の導入である。Chiangらは、コメに *Thermoanaerobacter ethanolicus* 由来の耐熱性アミロプラーゼ遺伝子を導入した (Chiang et al. *Mol. Breed.* 15: 125-143 (2005))。この酵素の最適温度は 90℃ のため、植物体が成長している間は活性化せず、貯蔵デンプンの蓄積を抑制せず、これを収穫して破碎し、高温にすることによってアミラーゼの添加なしにデンプンを糖化できる。すでに同様な耐熱性アミラーゼ遺伝子を導入したトウモロコシも作出され、実用化が進められている。

同様な微生物由来の耐熱性酵素を遺伝子導入した植物体を作成し、通常の植物の生育温度においては活性が非常に低い状態で植物体の生育には影響を及ぼさず、収穫・粉碎後にその耐熱性酵素の活性至適温度の高温処理を施すことによって、酵素添加することなく加工を行なう方法は、セルロースの分解についても研究されている。セルロースは植物繊維質の主成分であり、天然の植物質の 2/3 を占め、地上最大のバイオマスであると言われる。Biswasらはトウモロコシに *Acidothermus cellulolyticus* 由来のセルラーゼ、endo-1,4- β -D-glucanase catalytic domain (E1-cd) の上流に apoplast 移行シグナルを結合させた遺伝子を導入したところ、E1-cd タンパク質が発現の合成され apoplast に蓄積していること、しかしその遺伝子組換えトウモロコシの生長は野生型と大きな違いはなかったことを示した (Biswas et al. *Plant Sci.* 171: 617-623 (2006))。植物の細胞壁にはセルロースのみならず、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンなどが沈着してい

るため、セルラーゼを発現させただけでは細胞壁を分解させるには不十分ではあるが、今後、さらにこれらを分解する耐熱性酵素遺伝子を追加導入することによって、収穫・粉碎後に高温処理するだけで簡単にセルロース分解物を生じるような遺伝子組換え植物体が開発されてくる可能性がある。特に、このような植物は樹木ではなく、処理に困っている収穫後の農作物植物体の処理とその有効利用につながり、固定された CO₂ の完全利用につながるため、今後、さらに食品原料、特に穀物植物において研究が進展すると考えられる。

このようなタイプの遺伝子組換え植物は宿主植物の代謝系に影響を与えることなく、加工に有用なタンパク質の発現を付加するという点において、リスクとしてはそのタンパク質の毒性およびアレルギー性について評価すべきと考えられることから、除草剤耐性や害虫抵抗性などに関わるタンパク質を付与した第 1 世代の遺伝子組換え植物に類似のものと考えられる。

その他、可食性工業原料植物において遺伝子組換え技術が用いられるであろう方向性の 1 つは原材料としての植物体の収穫量を増大させることが考えられる。このために、植物体の成長を早める、あるいは大きくすることによって、収穫までの時間を早め、単位面積当たりの収穫量を上げる試みがなされているが、未だ実験段階であるため、ここでは調査の対象外とした。また、第 1 世代の遺伝子組換え農作物と同様に、害虫抵抗性、ウイルス抵抗性および除草剤耐性を付与することによって「減産」を無くすことも利用されるであろう。あるいは第 3 世代の遺伝子組換え植物である環境抵抗性を付与することによって、耕作不適地にも作付けできる遺伝子組換え植物を作成する試みもユーカリなどで行われている。しかし、現状において、第 1 世代および第 3 世代の遺伝子組換え食品である農作物が工業原料に転用される

場合であっても、すでに遺伝子組換え食品としての安全性評価がなされたものでなければ利用できないため、遺伝子組換え食品のリスク管理内に含まれるものである。

上述のように、現在、枯渇しつつある石油の代替えとしてのエタノールをトウモロコシなどの穀物を原料として生産するため、その原料としての加工に最も適した遺伝子組換え植物が開発されている。しかし、さらに直接的に植物から工業利用に向けた油を生産させようとする試みが今後なされるものと考えられる。③-表 1. にあるようにナガミノアマナズナは石油代替油の原料の油種子として利用するために、遺伝子組換えが行われている。これは食用にならない油種子であるため、食品への混入は考えられない。しかし、人類は昔から植物油を食用とともに灯火用燃料として用いてきた。石油が使われるようになった後でも、第二次世界大戦中、カナダでは枯渇した石油の代わりにナタネ油を軍艦の蒸気機関の潤滑油として使用することを目的としてナタネが栽培された。このことから考えて、ナタネなどの食用として用いられている油種子植物の油の質（たとえば、より長鎖にする）とその組成を遺伝子組換えによって改変して工業原料に用いる試みがなされる可能性が考えられる。

1-2. 非食性工業原料

現在、遺伝子組換え植物を用いた非食性工業原料の生産について研究されているのは生分解性プラスチックである。生分解性プラスチック生産遺伝子組換え植物は、主に微生物が合成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を産生させるように、微生物由来の遺伝子を導入した組換えた植物がほとんどである。PHA は熱可塑性を持ち、再生可能な資源である糖や植物油から発酵法により生産することができ、さらに自然界の様々な微生物により分解されることから持続可能型の完全分解性プラスチック材料として注目されている。最も代表的な PHA はポ

リヒドロキシブチレート (PHB) である。このポリマーはアセチル-CoA から合成され、 β -ケトチオラーゼ (PhaA) によりアセチル-CoA が二量体化し、アセトアセチル-CoA レダクターゼ (PhaB) による還元によって生成した (R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA が PHA シンターゼ (PhaC) により重合されることで PHB が合成される。

これら合成系は *Ralstonia eutropha* などの微生物が有しており、その合成系の遺伝子のクローニングがなされ、これら遺伝子を植物に導入することで PHB の合成が試みられている。その最初の例は、シロイヌナズナに *R. eutropha* 由来の PhaB と PhaC を CaMV35S プロモーターを結合して導入して発現させたところ、根や葉、子葉、種子において PHB が合成され、これらが葉緑体とミトコンドリア以外の細胞の核や液胞、細胞質内に細粒となって観察された (Poirier et al. *Science* 256: 520-523 (1992))。しかし、その合成蓄収量は乾燥重量で 0.1% であり、また、PhaB を過剰発現させた組み換え植物においては、強い成長阻害と種子の生産の減少が見られた。

PHB 合成の出発材料となるのはアセチル-CoA であり、その合成量は細胞質より葉緑体内の方が高い。このため、より高い PHB の合成生産量を求めるため、よりアセチル-CoA 量が高いとされる葉緑体内での合成が試みられた。PhaA、PhaB、PhaC に葉緑体移行ペプチド (CTP) を結合し、CaMV35S プロモーターにより発現させるコンストラクトを作成してシロイヌナズナに遺伝子導入したところ、これらタンパク質の葉緑体における発現が確認され、PHB の乾燥重量に対する合成蓄積量を 14% から 40% にまで上昇させるのに成功した (Nawrath et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12760-12764 (1994); Bohbert et al. *Planta* 211: 841-845 (2000))。しかし、葉緑体に PHB を大量に生産蓄積する遺伝子組換え体においても、成長阻害