

が見られ、矮化や種子を作らないなどの問題が生じており、実用化に向けては、この点の解決が必要とされている。

また葉緑体ゲノムにこれら合成遺伝子を葉緑体内で発現するコンストラクトとして作成し、これを核ゲノムではなく、葉緑体ゲノムに導入することも行われている。これは葉緑体ゲノムが母性遺伝し、花粉には入らないため、環境中での遺伝子拡散がほとんどないという利点がある。Nakashitaらはタバコを用いて、PHAオペロン (PhaCBA) を plastidial rRNA operon promoter (prrn) で発現させるようにして、葉緑体ゲノムへ導入したところ、合成量は少ないが PHB の合成が確認された (Nakashita et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1688-1691 (2001))。さらに葉における葉緑体ではなく、種子における白色体において蓄積させるため、種子特異的なプロモーターである *Lesquerella fendii* fatty acid hydroxylase プロモーターを用い、CTP を結合した PhaA、PhaB、PhaC を発現させた。その結果、種子の乾燥重量の 8% の PHB 合成蓄積が認められた (Houmiel et al. *Planta* 209: 547-550 (1999))。今後、さらにこのような花粉飛散防止のメリットを生かした葉緑体への遺伝子組換え技術が進展し、これを利用した工業原料生産遺伝子組換え植物の開発がさらに進められることと考えられる。

以上のことから考えると、これら非食性工業原料用遺伝子組換え植物においては、それら化合物を合成するための新たな酵素タンパク質の付与がなされ、食経験のない化合物、ヒトが消化吸収できず栄養にならない化合物、あるいは化合物によってはヒトにとって毒性のある化合物を遺伝子組換え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。

2) DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知

2-1. Cy3 標識アンチセンスターゲット DNA を用いた検出感度の検討

DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知における検出感度を検討するために、アレイに固定化したプローブ DNA のアンチセンス鎖を Cy3 標識したものを合成し、ターゲット DNA としてハイブリダイゼーションを行った。ターゲット DNA のコピー数が  $1.0 \times 10^{12} \sim 1.0 \times 10^6$  となるように希釈したものをハイブリダイゼーションバッファーに添加し、それぞれのアレイをハイブリダイゼーション、洗浄を行ってシグナルを検出した。その結果、ターゲット DNA の濃度が  $1.0 \times 10^7$  以上では十分なシグナルが得られたのに対し、 $1.0 \times 10^6$  以下ではシグナルを検出することはできなかった。このことから、今回用いたマイクロアレイの検出系ではターゲット DNA 1 分子につき 1 分子の Cy3 で標識されている場合の検出感度は  $1.0 \times 10^7$  コピー/アレイであることが分かった。

2-2. ターゲット DNA 標識法の検討

DNA マイクロアレイでは DNA の標識方法によって感度が大きく異なる。標識方法としては PCR 法によって標識した dNTP を取り込ませる方法が最も感度が高いと考えられるが、PCR 法では各 DNA 断片の増幅効率が異なるために、ゲノム情報の欠落が生じることが知られている。そこで本研究においてはなるべく増幅せずに DNA を標識するためにランダムプライマーを用いた方法で標識を行った。ランダムプライマーを用いて標識する場合には、予めランダムプライマーを標識しておく方法と、標識された dCTP 等の基質を取り込ませて標識する方法があるが、前者は 1 ターゲット DNA あたり 1 分子の標識化合物となり標識効率は比較的低いと考えられた。後者は 1 ターゲット DNA あたり複数分子の標識化合物を取り込めるため、標識効率は比較的高くなると考えられた。しかしながら後者の方法では用いる DNA ポリメラーゼの種類や、反応に用いる標識された dCTP の

濃度によって、DNA 合成効率が減少することが知られている。そこで、Cy3 標識ランダムプライマーと、Cy3 標識 dCTP と 3 種の DNA ポリメラーゼ (Klenow fragment、BcaBEST DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ) を用いて標識反応を行い、DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行った。その結果、DNA ポリメラーゼの種類は標識プライマー、標識 dCTP いずれを用いた場合においても Klenow fragment を用いた場合が最も検出感度が高いことが分かった。

次に、検出にはどの程度のコピー数が必要かについて検討するために、鋳型となる DNA のコピー数を  $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{10}$  となるように反応液に加えて標識を行ったものをそれぞれ DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、ADH 遺伝子、SSIb 遺伝子ともに  $1.0 \times 10^9$  コピー/アレイでは十分に検出でき、ADH 遺伝子については  $1.0 \times 10^8$  コピー/アレイ程度まで検出できることが明らかとなった。先の標識されたアンチセンスを用いた結果では、 $1.0 \times 10^7$  コピー/アレイまで検出されていたことから、標識反応によって約 1 桁感度が低下していることが示された。また、標識するには標識された dCTP を用いるよりも標識されたランダムプライマーを用いる方が効率よく検出できることが示された (③-図 4)。ADH 遺伝子と SSIb 遺伝子とでは検出感度に差が見られたが、各々のマイクロアレイにおいては各遺伝子に対応するスポットでのみシグナルが検出され、高い特異性で組換え遺伝子を検出できるものと考えられた。

また、ハイブリダイゼーションの時間について検討するために、1 時間、2 時間、4 時間、16 時間ハイブリダイゼーションを行った物について検出感度を検討した。その結果、4 時間ハイブリダイゼーションしたものでは 16 時間ハイブリダイゼーションしたものとほとんど検出感度が変わらないことから 4 時間のハイ

ブリダイゼーションで十分な結果が得られるものと考察された。

### 2-3. 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  $1.0 \times 10^9$  コピーとなるように調整し、ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後、マイクロアレイ上の蛍光を検出した。その結果、ハイブリダイゼーション溶液中にゲノム DNA が混入した場合のマイクロアレイ上の蛍光強度は、Adh 遺伝子、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。

### 2-4. 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、SSIb 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。

## 2-5. 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。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) の場合には検出されていないことがわかった。

これらの結果から、1 mg 程度のゲノム DNA を PCR による増幅なしで標識した場合でも、1 コピーの遺伝子をマイクロアレイ上で特異的に検知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知するために、標識方法や蛍光増強などについて検討する必要があると思われる。

## ④医薬品用遺伝子組換え生物や再生医療用動物の調査研究

### (1) 文献調査について

#### 1) 非食用バイオテクノロジー応用魚の文献調査

収集した情報を表 1 にまとめた。

2006 年までに観賞魚の開発、バイオリアクターとしての試み、環境モニターへの利用の試みの報告があった。2007 年以降は魚に直接遺伝子導入した非食用バイオテクノロジー応用魚の報告はなかった。この分野は、最近はあまり研究が行われていないようである。

#### 2) 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリの文献調査

収集した情報を表 2 にまとめた。この分野は盛んに研究が行われている。導入された遺伝子はモデルタンパクとして検出の容易な GFP の遺伝子あるいは生理活性を持つ様々なタンパクの遺伝子が使われていた。GFP はマーカーとしてもとても頻繁に使われていた。プロモーターにはニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターが使われることが多かった。ターミネーターには SV40 ポリ A や WPRE が使われることが多かった。遺伝子導入法ではレトロウイルスが利用されることが多かった。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 2)。

鶏卵を使って組換えタンパクを大量に生産させることは技術的に可能になっている。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。

#### 3) 非食用バイオテクノロジー応用ブタの文献調査

収集した情報を表 3 にまとめた。この分野では臓器移植にブタの臓器を利用するための研究が多かった。2005 年までには、 $\alpha$  1,3-galactosyltransferase 遺伝子をノックアウトする、またはヒト decay accelerating factor 遺伝子を導入する報告が多かった。これらは移植抗原を減少させる、またはヒトの補体系の活性化を防いで超急性拒絶を抑制する試みである。最近ではブタ内在性レトロウイルスの発現

を抑制する試みが報告されている。使われた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 3)、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。

臓器移植以外の目的ではバイオリクターとしての利用や病態モデルの作成が報告されていた。

(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

新規に設計したプライマーとプローブおよび先述のプラスミドをスタンダードとして利用して、ネオマイシン、ピューロマイシン耐性遺伝子を real-time PCR で定量することができた。国産牛肉から抽出した DNA に上記のプラスミドをスパイクして real-time PCR の測定を行ったところ、上記の耐性遺伝子の定量的検出が可能だった。

未加工の牛肉から抽出した DNA は主に 6.6 kb 以上の長さのものを含んでいた。加熱加工処理した牛肉から抽出した DNA は主に 0.2-1.4 kb のものを含んでいた。

加熱加工処理した牛肉から抽出した DNA は real-time PCR による内在性 18S rRNA 遺伝子の測定が可能なので本測定法が適用可能と考えた。ピューロマイシン耐性遺伝子はアメリカ産牛肉から検出されなかったが、ネオマイシン耐性遺伝子は微量に検出されるサンプルがあった。環境中にネオマイシン耐性を持つ細菌が存在することが知られており(参考出典 4)、今回の微量に検出されたネオマイシン耐性遺伝子は混入された細菌由来と示唆された。ネオマイシンとピューロマイシン耐性遺伝子が同時に検出されるアメリカ産牛肉は存在せず、試験した全サンプルは陰性であると判断された。高度に加工処理されたサンプルから抽出した DNA は

分解が進んでいると考えられ、加工によって感度が影響されることが示唆された。

(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

日本語への仮訳の全文は、平成 20 年度の分担報告書に記したが、ガイダンスの概要は以下のようにまとめられる。

- 1) 「遺伝性 rDNA 構築物を有する遺伝子組換え動物の規制」と題する本ガイダンスは、連邦食品・医薬品・化粧品法(FFDCA)の動物用医薬品の規定による GM 動物の規制に関する業界向け最終ガイダンスであり、FDA の規制権限を明確にし、GE 動物作出者に対し、法の定める義務と責任について勧告するものである。
- 2) 遺伝子組換え(GE)とは、一般的に組換え DNA (rDNA) 技術を用い生物に新しい特性や形質を導入することである。新たな特質の獲得を目的に DNA 片を継ぎ合わせ、その DNA を生物に導入することを rDNA 技術と呼ぶ。継ぎ合わされた DNA 片は、rDNA 構築物と呼ばれる。GE 動物は新たな特性や形質の付与を意図した rDNA 構築物を含む。
- 3) 本ガイダンスは GE 動物由来製品の安全性と有効性を確認するための申請の効率的な評価を助けるものである。
- 4) FFDCA では、「ヒトあるいは他の動物の身体構造や生体機能に影響を与えることを意図する(食品以外の)物品」を医薬品と規定している。GE 動物の rDNA 構築物は、動物の構造や機能に影響を与えることを意図しており、当該動物が食用に意図された、あるいは、ある種の物質を産生するのに用いられるかに係らず、動物用医薬品の定義に合致する。GE 動物開発者は、構築物及び/もしくは挿入された構築物により発現した新規生成物が GE 動物の健康に対する安全性と食用動物であれば食品としての安全性を証明しなければならない。

本ガイダンスは、国家環境対策法に基づく環境

評価の要件を満たすとの事業者の責任も明記している。

### ⑤医薬品及び環境浄化目的のGM植物の調査研究

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

U. S. Department of Agriculture (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)の情報公開サイト Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS ([http://www.aphis.usda.gov/brs/ph\\_permits.html](http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html))で、2007年から2010年までの薬用及び環境浄化用GM植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べた(⑤-図1、2010年1月6日現在)。2007年は認可面積811.08エーカーに対し、176.08エーカーに作付けが行われた。2008年の認可面積は2650.50エーカーと、2007年の約3.3倍であるが、作付けが行われた面積は未だ公開されていない。2009年は認可面積702エーカーに対し、96.90エーカーに作付けが行われた。従って、2009年の作付け面積は、2007年の55%に減少している。

2010年の薬用及び環境浄化用GM植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べたところ、既に8社から13件の申請が行われ、作物は、アマナズナ、タバコ、イネ、ベニバナ、トウモロコシ、オオムギ、ハコヤナギ属植物であり、Metabolix社の生分解性プラスチックを生産するタバコ、Kentucky BioProcessing社のウシ肺アプロチニンを生産するタバコ(ただし組換えTMVを用いた一過的遺伝子発現)、SemBioSys社のウシキモシンを生産するベニバナ、Applied Biotechnology InstituteのB型肝炎ワクチン成分を生産するトウモロコシ、Washington State Universityのヒト摂取用高付加価値タ

ンパク質を生産するオオムギ、University of Washingtonの環境浄化用のハコヤナギ属植物は既に作付けが完了している(⑤-表1)。Ventria Bioscience社の組換えイネは作付けされていないが、承認は2種について既に得られており、まもなく作付けが行われるものと思われる。

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

#### 2. 2007-2009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2007-2009年の情報、2007-2009年に国内で開催された日本農芸化学会講演要旨集、日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム講演要旨集及び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)に加え、World Congress on In Vitro Biology, Tucson, Jun. 14-18, 2008 Abstractより、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、202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: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、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた（⑤-表5）。

#### 2-1. 機能性食品

機能性食品等に関する論文等<sup>2-56)</sup>を⑤-表6に示した。54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、カフィリン2タンパク質等を生産する穀類<sup>9)</sup>、10KDゼインを生産するサツマイモ<sup>13)</sup>、高含硫アミノ酸貯蔵蛋白質を蓄積するダイズ<sup>31)</sup>、味覚修飾蛋白質ミラクリンを生産するトマト<sup>40、41、43、44)</sup>及び同蛋白質を生産するレタス<sup>54)</sup>の7件である。また、アレルギー蛋白質遺伝子のRNAiを利用した、低アレルギー化の1例として、低アレルギー化ラッカセイがある<sup>52)</sup>。その他のほとんどは代謝酵素遺伝子（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変化（増加または低下）である。その中で最も件数が多いのが、脂肪酸組成や変化に関するもの9件<sup>8、16、18、19、24、28、34、50、51)</sup>で、次いでビタミンE生産に関するもの8件<sup>17、20、21、23、25、26、33、37)</sup>、次いで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5件<sup>29、39、45、46、47)</sup>であった。

#### 2-2. 経口ワクチン

経口ワクチンに関する論文等<sup>57-87)</sup>を⑤-表7に示した。31件のうち、6件<sup>58-61、74、80)</sup>にコレラトキシンBサブユニットの使用がみられた。コレラトキシンBサブユニットは、それ単独でも経口ワクチンとしての開発が行われている<sup>58-60、80)</sup>が、この蛋白質は、腸管上皮細胞に発現するGM1ガングリオシドに結合し、細胞内に抗原を送り込む働きがあることから、他のワクチン抗原とともに発現させる研究も行われている<sup>58、59、61、74)</sup>。

使用された作物はイネが最も多く6件<sup>58-63)</sup>、次いでジャガイモ5件<sup>64-68)</sup>、レタス5件<sup>83-87)</sup>、トマト4件<sup>77-79、81)</sup>であった。

#### 2-3. 食用医薬

食用医薬に関する論文等を⑤-表8に示した<sup>88-99)</sup>。食用医薬に関しては、1例が中国<sup>96)</sup>でその他は国内研究の13件<sup>88-94、97-99)</sup>で、うち6件はイネを用いた研究例であった<sup>91-94)</sup>。その他の作物は、イチゴ4件<sup>88-90)</sup>、レタス2件<sup>98、99)</sup>、ダイズ1件<sup>97)</sup>であった。2009年に報告された花粉症緩和米<sup>92)</sup>では、花粉症に対する免疫寛容の効果的誘導のため、T-細胞エピトープをコレラトキシンBサブユニットとの融合蛋白質として発現させており、マウスでの実験で効率の良い免疫寛容誘導が確認されている。

#### 2-4. ワクチン抗原

ワクチン抗原に関する論文等を⑤-表9に示した<sup>100-119)</sup>。ワクチン抗原は、抽出・精製後の利用を目的とするため、タバコを宿主植物として用いる研究例が多く、20件中14件がタバコを用いた例であった<sup>106-119)</sup>。また、タバコでは、通常の核形質転換以外の葉緑体形質転換<sup>116-118)</sup>やタバコ植物そのものを形質転換するのではなく、組換えウイルスベクターを用いた一過的外来遺伝子発現系が用いられている<sup>111-115)</sup>。

#### 2-5. 抗体医薬

抗体医薬に関する論文等を⑤-表10に示した<sup>120-136)</sup>。抗体医薬も、抽出・精製後の利用を目的とするため、食用作物以外を宿主植物として用いる研究例が多く、17件中8件はタバコ<sup>126-132、135)</sup>、3件はウキクサ<sup>120-122)</sup>、1件はヒメツリガネゴケ<sup>136)</sup>を用いた研究例であった。

#### 2-6. 治療薬

治療薬に関する論文等を⑤-表11に示した<sup>137-169)</sup>。ワクチン抗原、抗体医薬と同様に、治療薬も抽出・精製後の利用を目的とするため、非食用作物を宿主植物として用いる研究例が多く、治療薬33件のうち15件でタバコが用いられ<sup>152-166)</sup>、3件でゼニゴケ<sup>149-151)</sup>が用いられている。前項と同様、ウイルスベクター<sup>147、152、158、160)</sup>も利用されている。

#### 2-7. 診断薬・試薬

診断薬・試薬に関する論文等を⑤-表 12 に示した<sup>170-178)</sup>。2007-2009 年は、7 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⑤-表 13 に示した<sup>176-201)</sup>。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。26 件の研究例のうち、3 件はイネが使用されていた<sup>176-178)</sup>。今後も食用作物を用いた環境浄化用の GM 植物開発については注視する必要があると思われる。

#### 2-9. 国別集計数

2007-2009 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等の件数を国別に集計した結果を⑤-表 14 に示した。国別では日本の件数が最も多く 67 件であり、次いで米国 54 件、中国 26 件、韓国 12 件であった。

#### 2-10. 作物別集計数

2007-2009 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作物別に集計した結果を⑤-表 15 に示した。食用作物ではイネが最も多く 25 件、次いでレタス 12 件、トマト 5 件であった。

### 3. 自家プロモーター発現系 GMO の検知法開発 IPCR 法及び A1-PCR 法によるケシの T-DNA 挿入変異体の解析

IPCR 法及び AL-PCR 法により、アグロバクテリウム T-DNA の LB と接するゲノム部分を含むクローン 4 種 (LB1-4)、そして T-DNA の RB 及びそれに接するゲノム部分を含むクローン 6 種 (RB1-6) を得た。これらの配列情報からゲノム DNA 領域に特異的なプライマーを設計し、野生株ゲノム DNA を鋳型にして各ゲノム断片間で組み合わせを変えて PCR を行ったところ、LB1-RB2 及び LB3-RB6 の 2 組で特異的な増幅が認められ、両断片は、同一 T-DNA 挿入部位の両端であることが明らかになった。以上の情報を

総合し、本形質変異体 ( $T_0$ ) には 8 ヶ所 (8 コピー) 以上の独立した T-DNA 挿入部位が存在するものと結論された。

### DSH1::GUS rice をモデルとした GMO 検知法の検討

#### DSH1::GUS rice の栽培

DSH1::GUS rice 及び非組換え体は、グロースチャンパーにおいて良好に稔実し、コメが収穫された。なお、両者の間で顕著な形態の差異は認められなかった (⑤-図 10)。

#### IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法の検証

DSH1 プロモーターの 5' 領域及び 3' 領域についてそれぞれ制限酵素と特異的プライマーセットの組合せを設計し、作製した環状ゲノム DNA ライブラリーを鋳型に IPCR を実施した。その結果、両領域において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、DSH1::GUS rice に特異的な増幅産物のバンドが検出された (⑤-図 11、12)。これは 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を示すものである。

#### GUS 米検知法(蛍光法)

4MUG を基質とした蛍光法では、新鮮葉より調製した粗酵素液を用いたアッセイで、DSH1::GUS イネにおいて非組換え体には見られない強い蛍光が観察された (⑤-図 13)。しかしながら、玄米またはその籾殻を用いた非破壊的なアッセイでは、蛍光強度の差は認められなかった。

#### GUS 米検知法(組織化学的染色法)

X-Gluc を基質とした組織化学的染色法では、DSH1::GUS イネの玄米の胚芽部に 12 粒中 11 粒において青色呈色が認められた (⑤-図 14)。一方、DSH1::GUS rice の籾殻や、非組換え体の玄米、籾殻においては青色を呈した部位は認められなかった。葉の切片については、DSH1::GUS rice において葉の切断面からわずかに青色色素の浸潤が認められた。

### PCR 法による遺伝子組換えマーカーの検知の試み

組換え植物の組換えマーカーとして多用される遺伝子のうち、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、NOS ターミネーター (⑤-図 15) のそれぞれについて米国市場流通米より調製したゲノム DNA を鋳型に各遺伝子の検知を試みた。その結果、陰性対照 (非 GM) の日本晴、陽性対照の DSH1::GUS rice は良い対照となることが確認されが、モデル試料として使用した米国市場流通米 4 種からはいずれの遺伝子も検出されなかった (⑤-図 16)。R-5-sGFP rice をモデルとした GMO 検知法の検討

#### R-5-sGFP rice の栽培

R-5-sGFP rice 及び日本晴 (非組換え体) は、グロースチャンパーにおいて良好に生育、稔実し、コメ ( $T_2$  種子) が収穫された。なお、両系統間または系統内において、顕著な形態の差異を示す個体は認められなかった (⑤-図 17)。

#### 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 及び日本晴 (非組換え体) の新鮮葉より調製したゲノム DNA を鋳型に、sGFP 遺伝子特異的プライマーを用い PCR による増幅を行い、外来遺伝子コンストラクトの存在を確認したところ、R-5-sGFP rice の個体 #3 以外の  $T_1$  個体は、いずれも sGFP 遺伝子を有する組換え体であることが確認された (⑤-図 18)。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 0sAct1 遺伝子のゲノム DNA 配列情報から、プロモーター/コード領域境界部について適切な制限酵素と、制限酵素消化-自己閉環ライブラリーに対する特異的プライマーセットの組合せを設計した。その

結果、制限酵素 DraI もしくは HaeIII で消化し、自己閉環ライブラリーを作成した場合、GMO と非 GMO の IPCR 産物のサイズが適度に異なり、電気泳動等による GMO・非 GMO の判別が可能と考えられた。そこで、両制限酵素でゲノム DNA を消化し作製した環状ゲノム DNA ライブラリーを鋳型に IPCR を行ったところ、両酵素いずれを用いた場合も、非組換え体と組換え体に共通な増幅産物のバンドに加え、R-5-sGFP rice に特異的な増幅産物のバンドが検出された (⑤-図 19)。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

##### コメ (玄米) を検体とした GMO 検知

コメ (玄米) を検体とし、市販のコメからのゲノム DNA 抽出・精製キットである GM quicker2 (ニッポンジーン) を用い、乳鉢乳棒を用い粉碎したコメ粉末 0.5 g よりゲノム DNA を抽出・精製し、制限酵素 HaeIII 消化、セルフライゲーションののち、IPCR に供したところ、新鮮葉を検体とした場合と同様に、WT、R-5-sGFP 共通バンドに加え、R-5-sGFP では特異的なバンドが出現し (⑤-図 20)、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、制限酵素消化及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 rice 共通バンドに加え、R-5-sGFP 特異的なバンドが出現し（⑤-図 21）、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<sub>2</sub> 種子サンプルは親株と同じ IPCR 増幅パターンを示した。

#### Real-time PCR 法による GMO 検知法の検討

イネ非組換え体（日本晴）、R-5-sGFP rice 株 #1 (GMO)、R-5-sGFP rice 株 #3（外来遺伝子コンストラクトなし）の各植物葉より調製したゲノム DNA の等量を鋳型とし、下記の OsAct1 プロモーター領域、またはプロモーター/OsAct1 コード境界領域特異的なプライマーセットを用い、リアルタイム PCR を行った結果、Delta Rn 対 PCR cycle 数の増幅曲線は⑤-図 22 のようになり、R-5-sGFP rice 個体 #1 のみ増幅曲線が左にずれ、OsAct1 プロモーターの存在量が他の遺伝子領域よりも多いことが示された。

また、 $\Delta\Delta Ct$  法を適用し、各遺伝子領域の存在比率を求めると、⑤-表 16 のようになり、非組換え体及び導入遺伝子コンストラクトの存在しない R-5-sGFP rice 個体 #3 では OsAct1 プロモーター領域の存在比は等しいが、R-5-sGFP rice 個体 #1 では存在比は 6 と計算され、本形質転換体では導入遺伝子コンストラクトが複数コピー挿入されていることが示唆された。

#### D. 考察

##### ①非食用バイオテクノロジー応用生物の食品へ

##### の混入危害の調査研究

極めて高い温度分解能を持つ装置を用いることで、マルチプレックス PCR の融解曲線ピーク分離を実現し、35S プロモーター、NOS ターミネーターの増幅と同定を同時に行うことが可能になった。それと同時に今回 PCR 実行の陽性コントロールとして Co1E1 を置くことで、各 PCR の妥当性を評価しつつ、正確な PCR のモニタリングが可能となった。今後さらに特異的なプライマーを検討し、多検体・多遺伝子を同時にスクリーニングする上で大変有用になると考える。

##### ②産業用及び環境浄化目的の GM 微生物の検知に関する研究

1) 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、研究用や商業的に入手可能なベクターのデータベース作りとして、3 年間に大腸菌用市販、乳酸菌用、枯草菌用、酵母用の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うことができたと思う。

微生物の組換えは、大腸菌に対する組換え技術が最も進んでおり、工業的にも実用化され生産にも用いられている。まず市販で入手可能な大腸菌用のベクターについて調べ、他の菌とのシャトルベクターも加え、844 のベクターについて一覧表を作成した。これにより、現在市販で入手することの可能な主な大腸菌用ベクターはほぼ網羅的にデータベース化できたと思われる。大腸菌の遺伝子組換えでは多くの場合、市販ベクターのパーツを組み合わせて、実用的なベクターや組換え体を作出しているものと思われる。マーカーとしては、ampicillin、kanamycin、chloramphenicol などが使いやすいことからこれらを利用したベクターが多かった。プロモーターは、lac、T7、SP6 など多種にわたって使われていた。これは、大腸菌で機能

するものと、シャトルベクターとして他の生物や微生物で機能するものを用いているため、多種類となるものと思われる。それ以外については、生産物を効率よく回収するためにタグを付けるものもあり、このような遺伝子配列を検知用に設定することも可能であると思われた。

乳酸菌組換え用のベクターは、357 について整理した。宿主として *Lactobacillus* 属と *Lactococcus* 属用がほとんどで、これらの菌での遺伝子組換えが進んでいる。プロモーターやターミネーターの種類もそれほど多くない。マーカーでは、erythromycin を用いているものが多く、chloramphenicol など使われていた。発現が良好であることから乳酸菌のマーカーとしては、erythromycin が頻繁に用いられていた。組換え体の実用化を睨んで抗生物質耐性以外をマーカーとする試みも進んでいる。

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

酵母用および酵母-大腸菌シャトルベクターベクターは 127 について、一覧表を作成した。ベクターの種類は多いが、プロモーター、ターミネーター、マーカーは用いられている種類がそれほど多くなかった。マーカーとして用いられているのは、ampicillin, kanamycin が多く、これらは大腸菌とのシャトルベクターとして主に大腸菌側で機能するものと思われる。酵母でのマーカーとしては HIS, TRP, URA, LEU な

どが使われている。

2) 海外の情報収集としては、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、現地調査として研究所を訪問し専門家と直接の情報交換などを行い、現在の遺伝子組換え微生物を取り巻く国際情勢を確認することができた。

平成 19 年度は、“国際環境および工業応用微生物会議”で発表されている多数の演題の中で、遺伝子組換え微生物の実用化に関するものは確認できなかったが、自然界から分離された菌株を用いて、土壌や海水の改善を行うなどの試みについては、多数報告されていた。この中には、その浄化機能に関わる遺伝子の特定や評価に関する発表もあり、将来これらの遺伝子を組換え技術に応用する可能性は高いと思われた。

平成 20 年度は、“国際乳酸菌シンポジウム (LAB9)”に参加した。発表されている多数の演題の中で、遺伝子組換え微生物に関するものは経口粘膜ワクチン開発関連と腸管内の定着性を高めるプロバイオティクスの開発、サイトカインを産生させる機能製剤開発などの報告が見られた。乳酸菌組換えに関しては、将来的には経口ワクチンの抗原運搬体として遺伝子組換えを利用する可能性が高いと思われた。

平成 21 年度は、海外の遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行ったが、ウイルスワクチン研究は盛んであるが、細菌を用いた遺伝子組換えワクチンの実用化は見えていないように思えた。既に開発されている主なワクチンは弱毒化された経口粘膜生ワクチンなどで、マウスの段階では高い効果が確認されている。しかし生きた組換え細菌を解放系に出すには安全性の面で議論が続いており、この点が実用化を妨げているようである。イタリアで開催されたシンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”に参加し、新たに開発される微生物の安全性評価に関する研究動向と遺伝子組換え研究に関する

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

3) 遺伝子組換え微生物の検知法に関しては、モデル組換え体を用いて、定量的な高感度検出法、具体的な遺伝子を標的とした検出法について検討し、これらの方法を食品へ応用し検討を行うことができた。

平成 19 年度は、リボゾーマル RNA を標的とした高感度定量 real time PCR 法を検討した。この方法はターゲットとする遺伝子のコピー数が多いことから、検出感度を高く設定可能であることから、環境微生物や菌叢解析に用いられ始めている。一方、対象とする遺伝子が RNA であることから、安定したデータが取れる試験法プロトコールを作成することが重要である。大腸菌を対象として、1 step RT-PCR と 2 step RT-PCR を行ったのち定量 real time PCR を行い評価したところ、実験毎検出感度が異なり、安定した結果が得られなかった。千差万別な種類の食品を対象とする検出法としては、RNA から cDNA を安定的に作成する方法論が確立しないと、安定した評価が難しいと思われた。

平成 20 年度は、モデル組換え体として大腸菌を対象として、DNA を標的として定量 real time PCR を行い評価した。この検出系では、プラスミドの分子数として 100 個程度あれば定量的な検出が可能である。プラスミドを添加した牛乳サンプルを直接 PCR 反応液に加えた場合（16 倍希釈）、検出は可能であったが、PCR 産物の増幅曲線は正常とは言えなかった。定量測定は可能であるが検出感度は低下してしまうことから、ミルクのような検体については遺伝子の抽出法が必要であると思われる。

モデル大腸菌から PCR テンプレート溶液を調

製し、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子をターゲットとした場合と、プラスミド上にある遺伝子をターゲットとした場合を比較すると、プラスミド上のマーカーである ery 遺伝子をターゲットとした場合の方が Ct 値は 8 程度高かった。この差は、大腸菌内でのプラスミドのコピー数を反映しており、そのコピー数が  $10^2$  オーダーであることが推測された。

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 通りでテンプレートを調製し、リアルタイム PCR で解析した結果、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ため、濃縮作業による大腸菌の損失は少ないと考えられた。一方、牛乳からの濃縮では、検出効率が著しく低下していたことから、この作業によって大部分の大腸菌が失われたことが示唆された。

平成 21 年度は、遺伝子組換え微生物の定量的検出法に関し検討を進めた。モデル組換え体として大腸菌を用い、定量 PCR で評価した。豚肉に接種し、添加回収実験を行った。平成 20 年度の牛乳サンプルを直接 PCR 反応液に加えた時には、検出は可能であったが、PCR 産物の増幅曲線は異常であった。豚肉の場合は、牛乳に比べ増殖曲線の乱れは大きくなかった。直接検出では、 $10^4$  cfu 以上の菌数を必要としたが、24 時間の増菌培地による処理を行えば、接種予想菌数 1 桁での検出が可能であることが示された。1 つの遺伝子組換え細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合と、プラスミド上のような複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、当然複数コピー存在する場合の検出感度が高かった。直接分析する場合は、特にその差が顕著であるが、増菌した場合はほとんど差が無かった。

4) 近年、市販の豚肉や鶏肉からは、しばしばアンピシリン耐性株が分離され問題となっている。これらは Extended Spectrum  $\beta$ -

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

### ③工業原料用 GM 植物・生物の混入危害に関する研究

工業原料用途に用いられる遺伝子組換え植物は可食性工業原料と非食性工業原料の生産に分類される。可食性工業原料用遺伝子組換え植物は、食経験のある糖など、植物がそもそも合成している化合物の蓄積量を増大させ、あるいは改質させ、より工業原料としての優良品性を高める開発と、収穫した後の加工特性を向上させるための開発、たとえば耐熱性分解酵素に対する遺伝子などを導入する開発の 2 つの方向性があることが明らかになった。前者は化合物の量・質の改変であることから、これまでの遺伝子組換え植物のカテゴリーとして栄養改変・付加型の第 2 世代の遺伝子組換え植物に類似のものと考えられる。また後者は新たな酵素タンパク質の発現を付加するものであり、リスクとしてはそのタンパク質の毒性・アレルギー性が考えられ、除草剤耐性や害虫抵抗性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。ただし、加工の際に非遺伝子組換え植物とは大きな違いが生じることから、これらが食品の中に混入した場合、加工特性が大きく変わる可能性が考えられる。一方、非食性工業原料用遺伝子組換

え植物においては、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、消化吸収できない化合物、ヒトの健康を害するような可能性のある化合物などを遺伝子組換え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る。

### ④医薬品用遺伝子組換え生物や再生医療用動物の調査研究

非食用バイオテクノロジー応用魚については 2007 年以降に魚に直接遺伝子を導入して新しい組換え体を作成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いる。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については今後の開発と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については臓器移植の目的でブタの臓器を利用するための研究が多かった。しかし、その実現にはまだ時間がかかりそうであり、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。

プリオンノックアウトウシに由来する肉の検知法を real-time PCR を使って作成した。今回行った市場調査ではアメリカ産牛肉はすべて陰性だった。今後も同様な調査を続けたい。

FDA の組換え動物の規制に関するガイダンスの調査を行ったが、本ガイダンスは、食用、非食用にかかわらず、組換え動物の規制に関するガイダンスであった。このガイダンスを基に、アメリカで、組換え動物の申請がされてくることが予想され、また、今後、各国、独自の組換え動物に関するガイドライン（またはガイダンス）の作成が行われてくるものと思われる。今後も世界の動向の継続的な調査が必要と思われる。

## ⑤医薬品及び環境浄化目的の GM 植物の調査研究

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、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品・嗜好品、治療薬、経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、国別では日本 67 件、米国 54 件について中国 26 件、韓国 12 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、また、米国学会での調査も行ったため、日本、米国に関しては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、中国や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。

作物は非食用作物であるタバコ 49 件について食用作物であるイネ 25 件、レタス：12 件、トマト 11 件が多かった。

中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、遺伝子を検出するための配列情報も含め、さらに情報を収集する必要があると思われる。また、未承認植物検知法開発の対象植物の優先順位は、本調査結果より、特に、イネ、レタス及びトマトであると思われる。

IPCR 法または AI-PCR 法は、ゲノム情報の少ない植物の試料においても、標的塩基配列の一部の情報が得られれば、それに近接する未知領域の遺伝子情報が得られるため、導入遺伝子の配列が未知の未認可遺伝子組換え作物へ導入

された遺伝子の解析、及び検知法の開発に有力なツールであると考えられる。

DSH1::GUS rice 及び、R-5-sGFP rice をモデル GMO として設計した実験系においては、IPCR 法が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 検知の実用に耐えうるものと考えられる。

DSH1::GUS rice をモデルとした、未承認パパイアの検知法を応用した組織化学的染色法による検知実験では、主として胚芽における GUS 活性の検知に成功し、本法が遺伝子組換え米の検出法として有用であることを示した。本法は、実際には GUS 遺伝子の発現部位のターゲット化により組換え体ごとに GUS による青色呈色部位が異なると予想されるが、胚芽もしくは胚乳において GUS を発現する組換えイネならば簡便な検知法として実用可能と考えられる。

さらに、DSH1::GUS rice を陽性対照、米国市場流通米をモデル試料として「組換えマーカ―」遺伝子の PCR 法による検知を試みた。今回、市場流通米からはいずれの遺伝子も検知されなかったが、非食用 GM 植物においてはマーカ―遺伝子の残留の可能性が高いと危惧されるため、本法の開発は意義のあ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 を試料として検知に成功した。本手法は組換え体植物単体の GM、非 GM の判別には使用できるが、混合物や、加工された試料では標的遺伝子の希釈による存在比の低下が起り、検知は困難になると考えられる。

## E. 結論

### ①確立したデータベースとスクリーニング法

を参考に、GM 体に用いられる共通組換え遺伝子が検知された検体について、各内在性遺伝子（トウモロコシ、ダイズ、コメ、ジャガイモ等）や詳細解析から、非 GM 体を絞っていくことが可能であると思われる。

②非食用バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。情報収集をすすめ、844 の大腸菌用市販、357 の乳酸菌用、82 の枯草菌用および 127 の酵母用遺伝子組換えベクターについて、データベース化を行った（添付資料参照）。環境浄化に微生物を用いる研究が進んでいることから、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”に参加し、この分野の情報収集を行った。乳酸菌研究で遺伝子組換えに関する研究が進んでいることから、オランダで開催された“国際乳酸菌シンポジウム (LAB9)”に参加し、この分野の情報収集を行った。遺伝子組換えに関する研究が進んでいる分野として、ワクチン開発についてはフランスのパスツール研究所を訪問し情報交換を行うと共に、イタリアで開催された国際シンポジウム“プロバイオティクス・プレバイオティクス&ニューフーズ”に参加し、この分野の情報収集を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法に関し食品を用いて具体的な検討を進めた。

③本研究ではこれからも増え続けるであろう非食用の遺伝子組換え植物の食品への混入をモニタリングする方法として DNA マイクロアレイ解析を導入することを検討した。その結果、ある程度多量の DNA を標識することで網羅的に組換え遺伝子を DNA マイクロアレイで遺伝子を増幅することなく検出する系の構築の可能性を示唆した。トウモロコシゲノムのサイズは約 3.0 Gbp と見積もられている。その場合トウモロコシゲノムに 1 コピー存在する遺伝子は、1  $\mu\text{g}$  のゲノム DNA には約  $6.0 \times 10^4$  コピー存在することになる。そのため、例えば 5% 程度の混入率を検知するためには  $6.0 \times 10^4$  コ

ピーのものを検出する必要があると考えられた。

今回のモデル実験では検出感度の限界は  $1.0 \times 10^7$  コピー/アレイであったことから、3 桁検出感度が足りていないことが明らかとなったが、30  $\mu\text{g}$  のトウモロコシゲノムを用いた場合には 1 コピーの遺伝子のコピー数は  $1.8 \times 10^7$  コピーとなることから標識するゲノム DNA 量を増加させることで混入率 1 割程度の組換え遺伝子を検知可能であると考えられる。

今後、検出感度を上げるために抗原-抗体反応を利用した蛍光増強法や、蛍光標識ではなく、アルカリンフォスファターゼを用いた化学発光系を利用することで、混入率 1 %以下の組換え遺伝子も検出することが可能であると期待される。

④非食用バイオテクノロジー応用魚と動物の中から魚、ニワトリ、ブタについて開発と実用化の動向に関する調査研究を行った。

⑤遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」の範囲と定め、また、環境中（土壌、地下水など）の汚染物質（重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など）に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能的食品・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。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、機能的食品・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。

また、GUS 遺伝子を有する非食用 GM 植物の検知法として、組織化学的染色法が簡便な検知法として実用可能であることを示した。さらに、GM 植物において多用される「組換えマーカー」遺伝子の検知に、PCR 法が有用であることを示した。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akiyama H., Sasaki N., Sakata K., Ohmori K., Toyota A., Kikuchi Y., Watanabe T., Furui S., Kitta K., Maitani T.: Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5942-5947. (2007)
- 2) Akiyama H., Nakamura F., Yamada C., Nakamura K., Nakajima O., Kawakami H., Harikai N., Furui S., Kitta K., Teshima R.: A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting-curve analysis. *Biol Pharm Bull.* 32, 1824-1829. (2009)
- 3) 穂山浩、佐々木伸大、大木果林、中村文美、坂田こずえ、中村公亮、大森清美、中島安基江、古井聡、橘田和美、小関良宏、手島玲子: PCR 法を用いた米加工品の安全性未審査遺伝子組換え米の検知法, *日本食品化学会誌* 16, 147-151. (2009)
- 4) 穂山浩: 遺伝子組換え食品の検知法 *ぶんせき* 3, 140-143. (2009)
- 5) Kim T.W., Igimi S., Kajikawa A., Kim H.Y.: Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. *J. Appl. Microbiol.* 104(6):1636-1643. (2008)
- 6) Kajikawa A., Igimi S.: Reduction of TNF- $\alpha$  inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* caused by the expression of *Salmonella* OmpC. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(9):2727-2734. (2009)
- 7) Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., Igimi S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(1):43-48. (2010)
- 8) Kajikawa A., Ichikawa E., Igimi S.: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(2):375-382. (2010)
- 9) Kajikawa A., Igimi S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19): 3409-3415. (2010)

- 10) 五十君静信：遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン開発の試み 日本臨床腸内微生物学会誌 11:34-40. (2009)
- 11) Nakajima O., Akiyama H., Teshima R.: Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Contamination of Beef by Material from Genetically Engineered Cattle. Biol. Pharm. Bull. 32 (8) 1313-16. (2009)
- 6) 五十君静信：遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発，日本微生物資源学会第15回大会（2008.7，千葉）
- 7) Kajikawa A., Igimi S.: Expression of Salmonella OmpC in recombinant Lactobacillus casei induced an attenuated pro-inflammatory response of RAW264.7 cell. 9th Symposium on Lactic acid bacteria. (2008.8, Egmond aan Zee (The Netherlands))

学会発表

- 1) 穂山浩，佐々木伸大，坂田こずえ，渡邊敬浩，大森清美，豊田安基江，菊池裕，古井聡，橘田和美，小関良宏，米谷民雄：加工食品における中国産の安全性未審査遺伝子組換え米の同定と検出法，第13回日本食品化学学会学術大会(2007.6)
- 2) Akiyama H.: Detection of unauthorized GM rice and individual detection of GM maize varieties in non-identity preserved maize samples, The 2007 International Symposium of Kyung Hee University (2007.10)
- 3) 山田千尋，穂山浩，中村文美，中島治，張替直輝，古井聡，橘田和美，川上浩，手島玲子：未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング検知法について，日本食品化学学会・第15回総会(2009.5)
- 4) 伊東篤志，田口朋之，和気仁志，穂山浩，手島玲子，佐々木伸大，小関良宏：DNA マイクロアレイを用いた遺伝子組換え食品検知法の開発，日本食品化学学会総会・第15回学術集会 (2009.5)
- 5) Kajikawa A., Igimi S.: Construction and evaluation of recombinant lactobacilli expressing Salmonella antigens for development of vaccines. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2007). (2007.11, Seville (Spain))
- 8) 五十君静信：遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン，第11回日本臨床腸内微生物学会 (2008.9)
- 9) 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 (2009.10)
- 10) 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. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害

防止に関する安全性確保のための研究」

総合研究報告書（平成19-21年度：分担）

## 非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害の調査研究（総括）

研究代表者 亀山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

### 研究要旨

組換え遺伝子の有無を判断する高処理スクリーニング系の開発を目的に、マルチプレックス PCR を用いた組換え作物検査法を確立した。この方法は GM 作物に汎用される 35S プロモーター、NOS ターミナーターと 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。

### 研究協力者：

中村文美、坂田こずえ、中村公亮

（国立医薬品食品衛生研究所）

山田千尋、川上 浩

（共立女子大学大学院）

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

2) DNA 抽出精製 もち米については、ニッポンジーン社製 GM quicker 2 改変法を用いた。その他の GM 作物はキアゲン社製 DNeasy mini kit を用いた。

3) 試薬調製・定性 PCR・Eva Green マルチプレックスリアルタイム PCR マルチプレックス PCR の予備試験として行った通常の定性 PCR の試薬は、AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) を使用した。反応液は、1×PCR 緩衝液、0.16 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.6 μmol /L 5' 及び 3' プライマー並びに 0.8 units Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 5.0 μL (DNA として 50ng) を氷中で加え、全量を 25 μL にした。装置は ABI9700 を用いた。マルチプレックス PCR の試薬は、QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN Cat. No. 206143) と、Eva Green™ (WAKO 販売元 code. 550-80471 ) を使用した。反応液は、1×Multiplex PCR Mix、0.5×Q solution、1×EvaGreen™、各 0.2 μmol /L プライマー対、

### A. 研究目的

現在、非食品用途の遺伝子組換え (GM) 農作物の多様化が進んでおり、スクリーニングの段階において複数遺伝子の存在を広範囲、かつ同時に確認する方法が必要とされている。また、数検体同時にスクリーニングを行うことで、GM 検知の高速かつ高処理化が期待される。そこで本研究では広範囲の GM 農作物を同時に検知可能な分析法の開発を検討した。また各分担研究者の調査研究で獲られた非食用 GM 体の開発状況データをデータベース化することを検討した。

### B. 研究方法

1) 試料 主に厚生労働省において擬陽性と判断されたもち米試料、陰性もち米検体（市販製

滅菌水を含む液に、10 ng/ $\mu$ L に調製した DNA 試料液 2.0  $\mu$ L (DNA として 20 ng) と、ColE1 プラスミド 2 $\mu$ L を各々水中に加え、全量を 20  $\mu$ L にした。ColE1 プラスミドは、 $5 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L から  $5 \times 10^{-8}$  ng/ $\mu$ L の間で最適な濃度を検討した。プライマー対は 35S プロモーター、NOS ターミネーター、ColE1 の 3plex を中心に、4plex として上記に hph、NPTII を加えて用いた。PCR 温度条件は以下を基本としてサイクル数、読み取り温度について各々条件検討を行った。95°C で 15 分間加温し、95°C 30 秒間、60°C 90 秒間、72°C 90 秒間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応後、72°C 10 分間、95°C 30 秒間加温した後、72°C から 99°C まで温度を上昇させ読み取り温度 0.3°C で融解曲線を作成した。サイクル数は 35、40、45、50 で比較し、読み取り温度は 1°C、0.5°C、0.3°C で検討した。

#### 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。

### C. 研究結果

#### スクリーニング系の開発

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

GM トウモロコシ (NK603) にてピークの分離度を確認後、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  $T_m$  値を示し、ピークの分離により各増幅産物の同定を確認することが可能となった。P35S、NOSter 検出用プライマーを用いて 2-plex PCR を行ったところ、融解曲線のピーク

が分離した。続いて ColE1 検出用プライマーを加えた 3-plex PCR においても、各々融解曲線分ピークが分離した (図 2)。3-plex PCR の条件検討を行い、読み取り温度、鋳型濃度、サイクル数、ColE1 添加量について最適条件を決定した。これらの条件の下、NK603 のトウモロコシ試料により、検出限界を検討したところ、0.1% (W/W) まで検出可能であった。(図 3)

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

#### 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。

### D. 考察

極めて高い温度分解能を持つ装置を用いることで、マルチプレックス PCR の融解曲線ピーク分離を実現し、35S プロモーター、NOS ターミネーターの増幅と同定を同時に行うことが可能になった。それと同時に今回 PCR 実行の陽性コントロールとして ColE1 を置くことで、各 PCR の妥当性を評価しつつ、正確な PCR のモニタリングが可能となった。今後さらに特異的なプライマーを検討し、多検体・多遺伝子を同時にスクリーニングする上で大変有用になると考える。

### E. 結論

確立したデータベースとスクリーニング法

を参考に、GM体に用いられる共通組換え遺伝子が検知された検体について、各内在性遺伝子（トウモロコシ、ダイズ、コメ、ジャガイモ等）や詳細解析から、非GM体を絞っていくことが可能であると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akiyama H, Sasaki N, Sakata K, Ohmori K, Toyota A, Kikuchi Y, Watanabe T, Furui S, Kitta K, Maitani T Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products *J. Agric. Food Chem.* 55, 5942-5947 (2007).
- 2) Akiyama H, Nakamura F, Yamada C, Nakamura K, Nakajima O, Kawakami H, Harikai N, Furui S, Kitta K, Teshima R. A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting-curve analysis. *Biol Pharm Bull.* 2009 32, 1824-1829.
- 3) 穂山浩, 佐々木伸大, 大木果林, 中村文美, 坂田こずえ, 中村公亮, 大森清美, 中島安基江, 古井聡, 橘田和美, 小関良宏, 手島玲子: PCR法を用いた米加工品の安全性未審査遺伝子組換え米の検知法, 日本食品化学会誌 2009, 16, 147-151.

##### 2. 学会発表

- 1) 穂山浩, 佐々木伸大, 坂田こずえ, 渡邊敬浩, 大森清美, 豊田安基江, 菊池裕, 古井聡, 橘田和美, 小関良宏, 米谷民雄: 加工食品における中国産の安全性未審査遺伝子組換え米の同定と検出法 第13回日本食品化学学会学術大会 (2007. 6)
- 2) Hiroshi Akiyama, Detection of unauthorized GM rice and individual detection of GM maize

varieties in non-identity preserved maize samples, The 2007 International Symposium of Kyung Hee University (2007. 10)

- 3) 山田千尋, 穂山浩, 中村文美, 中島治, 張替直輝, 古井聡, 橘田和美, 川上浩, 手島玲子: 未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング検知法について 日本食品化学学会・第15回総会 (2009. 5)

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許所得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

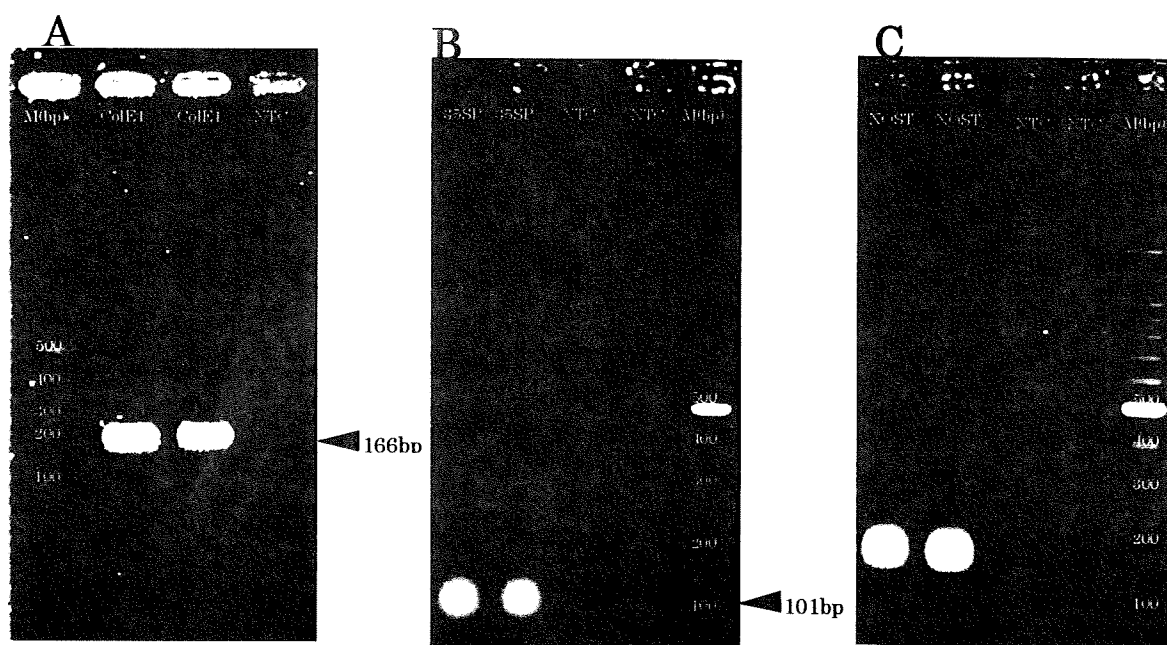


図1 PCR増幅産物の電気泳動解析  
CoIE1 (A), 35SP (B) and NOST(C)