

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発	文献	遺伝子組換え法	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	タグ	備考
					国								
66		ampC (β-lactamase) -cexA and cexB (from <i>Clostridium thermocellum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	<i>B. subtilis</i> はPTGの発加により、培養液中に各タンパク質を産生	中・The hong kong polytechnic university	Phan TT et al. (2006) expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 46(2):189-95	groE	pNDH37	φ105 (thermal induction)	-Ampicillin Chloramphenicol	vectorは宿主の染色体上に組み込まれる		
67		ampC β-lactamase from <i>Enterobacter cloacae</i> P99	<i>Bacillus subtilis</i> 1A304	<i>B. subtilis</i> は培養液中に活性を有するAmpCを産生	中・The hong kong polytechnic university	Tsang MW et al. (2007) Overexpression of the recombinant Enterobacter cloacae P99 AmpC β-lactamase and its mutants based on a φ105 prophage system in <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 55:75-		pSG1112/E	φ105 (thermal induction)	・Erythromycin Chloramphenicol	vectorは宿主の染色体上に組み込まれる		
68		ampC β-lactamase from <i>Enterobacter cloacae</i> P99	<i>Bacillus subtilis</i> 1A304	<i>B. subtilis</i> は懸体内にN末端に6xHis Tagを付与し、活性を有するAmpCを産生	中・The hong kong polytechnic university	Tsang MW et al. (2007) Overexpression of the recombinant Enterobacter cloacae P99 AmpC β-lactamase and its mutants based on a φ105 prophage system in <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 55:75-		pSG1113/M	φ105 (thermal induction)	・Erythromycin (His)6 Chloramphenicol	vectorは宿主の染色体上に組み込まれる		
69		γ-pyruvate dehydrogenase a and b subunit (from <i>Pisum sativum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> W600	vectorにStaphylococcal protein AのHisタグを付与し、懸体内に導入することにより培養液中への各pyruvate dehydrogenaseのサブユニットの産生が向上	中・University of Missouri	Staphylococcal protein A as a fusion partner directs secretion of the E1a and E1b subunits of Pea mitochondrial pyruvate dehydrogenase by <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 18:242-		pHB705-E1a(E1B)	P43 (B. subtilis constitutive promoter)	Kanamycin			
70		lacZ (β-galactosidase)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	<i>B. subtilis</i> は低温で培養することによりβ-galactosidaseを懸体内に産生	独・bayreuth	Thuy Le AT et al. (2007) Expression of A novel cold-inducible expression system for <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 53:264-269		pAL10	des (cold-inducible <i>Bacillus subtilis</i> deatubase promoter)	・Ampicillin Chloramphenicol	vectorは宿主の染色体上に組み込まれる		
71		lacZ (β-galactosidase)	<i>Bacillus subtilis</i> 1012	<i>B. subtilis</i> は低温で培養することによりβ-galactosidaseを培養液中に産生	独・bayreuth	Thuy Le AT et al. (2007) Expression of A novel cold-inducible expression system for <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expr Purif. 53:264-269		pAL12	des (cold-inducible <i>Bacillus subtilis</i> deatubase promoter)	・Ampicillin Chloramphenicol	vectorは宿主の染色体上に組み込まれる		
72		Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	<i>Bacillus subtilis</i> DB104	<i>B. subtilis</i> はBDNFを培養液中に産生し、後発神経細胞の生育を促進した	日・Hitachi	Park K et al. (1996) Expression of brain-derived neurotrophic factor by <i>Bacillus subtilis</i> . J Ferment Bioeng. 82:585-586		pVLXBONF	constitutive vegetative phase promoter from <i>B. subtilis</i>	Kanamycin	<i>B. subtilis</i> subtilisin signal peptideにより目的タンパク質は分泌される		
73		ker (keratinase from <i>Bacillus licheniformis</i> MKU3)	<i>Bacillus megaterium</i> MS941	<i>B. subtilis</i> はケラチナーゼを培養液中に産生し、keratin azureの分解を指標に活性を確認	印・Madurai kamarei university	Radha S et al. (2008) Sustained expression of keratinase gene under PsyA and PamyL promoters in the recombinant <i>Bacillus megaterium</i> MS941. Bioresour Technol. 109:1431		pWAK3	amyL (from <i>B. amyloliquefaciens</i> MTC0610 a-amyfase promoter)	・Ampicillin Kanamycin	keratinase gene signal peptideにより目的タンパク質は分泌される		
74		subC (Serine alkaline protease/SAP from <i>Bacillus licheniformis</i>)	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM1969	<i>B. subtilis</i> はSAPを産生し、SAPを基質に合成している糊剤は、乾燥剤、ベントーシリ、ン酸結核、TCA回路、アミノ酸合成経路のブロックが上	中・Middle east technical university	Caik P et al. (2003) Overexpression of a serine alkaline protease gene in <i>Bacillus licheniformis</i> and its impact on the metabolic reaction network. Enzyme Microb Technol. 32:706-720/		pHV1431	subC	Chloramphenicol			

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発	文献	遺伝子複製法	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	N末端	C末端	タグ	その他	備考
75		-cry1Ac -cry11A	Bacillus thuringiensis subsp. Morrisoni PG-14	ProAcN-11Aを導入したB. thuringiensis/cry1AcとCry11Aが融合したタンパク質を発現し、Plutella xylostella/Culex pipiensに對し毒性を示した	韓・Seoul national university	Roh JY et al. (2004) Expression and characterization of a recombinant Cry1Ac crystal protein fused with Cry11A in Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki cry-B J Asia Pac Entomol. 7:119-125	electroporation	-pProAcN-11A -pPro11A	cry1Ac	pProAcN-11Aは cry1AcTerminator	Erythromycin					
76		Mycoplasma gallisepticum agglutinin (pMGA)	Bacillus thuringiensis BMB171	B. thuringiensisは菌体表面にpMGAを発現した。また、組換え体を菌に接種した結果、液性免疫を誘導した。	中・Huazhong agricultural university	Liu M et al. (2008) Displaying the protein of Mycoplasma gallisepticum agglutinin on the cell surface of Bacillus thuringiensis with the S-layer protein. Feucht et al. (2001) Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in Bacillus subtilis. Gene 264:289-297.	electroporation	pCSPMGA1.2P			-Ampicillin -Erythromycin					CTC S-layer proteinにより目的タンパク質は菌体表面に固定化される
77		-CFP -YFP	Bacillus subtilis	B. subtilisは各蛍光タンパク質を発現	英・University of oxford	Feucht et al. (2001) Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in Bacillus subtilis. Gene 264:289-297.		-pSG1190:CFP -pSG1191:YFP	xyl		-Ampicillin Chloramphenicol					
78		-P-hom (from Corynebacterium glutamicum chromosome) -P-leuA (from Corynebacterium glutamicum chromosome) -P-per (from Corynebacterium glutamicum plasmid pGA1) -P-aes1+aes2 (from Corynebacterium glutamicum plasmid pGA1) -P-45 (from Corynebacterium glutamicum chromosome) -P-104 (from Corynebacterium glutamicum chromosome) φ(GA1) φB (lelyfish Aequorea victoria)	Bacillus subtilis 1-E7	P-per, P-45, P-aes1+aes1 (φB, subtilis)でプロモーター活性を示した	韓・Academy of science	Patek M et al. (2003) Function of Corynebacterium glutamicum promoters in Escherichia coli. Streptomyces lividans, and Bacillus subtilis. J Bacteriol. 104:325-334		pRB394	-hom -leuA -per -aes1+aes2 -45 -104		Kanamycin					
79			Bacillus megaterium MS941	B. megateriumはsucrose依存的にGFPを発現	独・Technical university braunschweig	Beledendiek R et al. (2007) A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in Bacillus megaterium. Dunn AK et al. (1997) A vector for promoter trapping in Bacillus cereus. Gene. 226:297-305.	protoplast method	pRB6m59	sacB (sucrose inducible promoter from Bacillus megaterium)		-Ampicillin -Tetracycline					プロモーター-ラップ用ベクター
80		φB (lelyfish Aequorea victoria)	Bacillus cereus UW85	プロモーター活性を持つ配列がベクターに導入された場合、GFPが発現	米・University of wisconsin-china	Zhang M et al. (2006) Production of Alcaligenes faecalis penicillin G acylase in Bacillus subtilis WB600(pMA5) fed with partially hydrolyzed starch. Enzym Microb Tech. 39:555-560.	electroporation	pAD123			-Ampicillin Chloramphenicol					SecB signal peptideにより目的タンパク質は分泌される
81		pac (Alcaligenes faecalis C100 ASI:767 penicillin G acylase:PGA)	Bacillus subtilis WB600	B. subtilisはPGAを培養液中に産生し、6-nitro-3-phenylacetamido)benzoic acidの加水分解により活性を確認	中・East china university of science and technology			pMA5	HpaII		Kanamycin					
82		vip (vegetative insecticidal protein)	Bacillus thuringiensis 4D7	B. thuringiensisは菌体内にVIPを産生	印・International centre for genetic engineering and biotechnology	Anora M et al. (2003) Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of Bacillus thuringiensis. Biochem Biophys Res Commun. 310:159-162	electroporation	pHT3101-Bt1-2-SD-VIP-crySt-L	Bt and BtII (sporulation dependent promoters)	cry	Erythromycin					

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	培养基	タグ	備考
1		-E.coli	GeneCopoeia				pReceiver-YAD	pADH	ADH	Ampicillin	GAL4AD		
2		-Yeast	GeneCopoeia				pReceiver-YBD	pADH	ADH	Gentamycin	GAL4DB		
3		-E.coli	GeneCopoeia				pReceiver-Y01	GAL1		Ampicillin		His	
4		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pBT3-N	CYC1	CYC1	Kanamycin			
5		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pBT3-C	CYC1	CYC1	Kanamycin			
6		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pBT3-SUC	CYC1	CYC1	Kanamycin			
7		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pBT3-STE	CYC1	CYC1	Kanamycin			
8		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pPR3-N	CYC1	CYC1	Ampicillin	HA		
9		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pPR3-C	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA		
10		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pPR3-SUC	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA		
11		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pPR3-STE	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA		
12		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pCCW-AI65	CYC1	CYC1	Kanamycin			
13		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pAI-AI65	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA		
14		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pDL2-AI65	ADH1	CYC1	Ampicillin	HA		
15		-E.coli	Me Bi Tec	one-Hybrid			pNG2		ADH1	Ampicillin			
16		-E.coli	Me Bi Tec	one-Hybrid			pJG4-5	GAL1	ADH	Ampicillin			
17		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pNG1	GAL1,10	ADH	Ampicillin			
18		-E.coli	Me Bi Tec	YZH			pEG202	ADH1	ADH	Ampicillin			
19		-E.coli	酵母発現				pORF-CLONE	CUP1		Ampicillin	*HA *His		
20		-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現				pPICHOL(K1-3)	*T7 Alcohol dehydroge nase *Alcohol dehydroge nase	Terminato r	Zeooin	His		
21		-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現				pPICHOU-C	*T7 Alcohol dehydroge nase -CUP-1	Terminato r	Zeooin	His		
22		-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現				pPICHOLI-HA	*T7 Alcohol dehydroge nase Terminato r	Terminato r	Zeooin	HA		
23		-E.coli -Yeast	ツマハイブリッド用				pLexA-dir	ADH1	ADH	Kanamycin(E.coli) TRP1(Yeast)			
24		-E.coli -Yeast	ツマハイブリッド用				pDir-LexA	ADH1	ADH	Kanamycin(E.coli) TRP1(Yeast)			
25		-E.coli	ツマハイブリッド用				pGAD-HA	*T7	ADH	LEU2(Yeast) Ampicillin(E.coli)	HA		
26		-Yeast	酵母発現				p427-TEF	TEF1	CYC1	G418(Yeast) Ampicillin(E.coli)			酵母内でHigh copy
27		-E.coli	酵母発現				p417-CYC	CYC1	CYC	G418(Yeast) Ampicillin(E.coli)			酵母内でLow copy
28		-Saccharomyces	染色体組み込み型				pAUR101			Aurocobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)			
29		-E.coli	TAKARA				pAUR112			Aurocobasidin A UR2(Yeast)			
30		-Saccharomyces cerevisiae	プラスミド形態で自己複製可能				pAUR123	ADH1	ADH1	Ampicillin(E.coli)			
31		-E.coli -Saccharomyces	タンパク質発現用				pAUR135	GAL10		Ampicillin(E.coli) Aurocobasidin A(Yeast)			

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	菌株	タグ	その他	備考
32			-Schizosaccharomyces pombe	Schizo. pombe用発現ベクター	TAKARA		pAUR24	CMV		Aureobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)				
33			-E.coli	プラズミド状態で自律複製可能	TAKARA		pAUR316			Aureobasidin A(Yeast) Ampicillin(E.coli)				
34			-Aspergillus nidulans	染色体組込み型	TAKARA		pPTR1			Pyrihaminc(Aspergillus) Ampicillin(E.coli)				
35		lacZ	-Aspergillus属	自律複製型	TAKARA		pPTR1			Pyrihaminc(Aspergillus) Ampicillin(E.coli)				酵母内で自律的に複製しない
36			-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pMETA	AUG1	AUG1	Ampicillin		His		
			-Pichia methanolic				pMETB	ADE2	ADE2			V5 epitope		
			-Pichia methanolic				pMETC							
37			-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pMET α A	AUG1	AUG1	Ampicillin		His		N末端にSSS配列(α-factor)
			-Pichia methanolic				pMET α B	ADE2	ADE2			V5 epitope		N末端にSSS配列(α-factor)
			-Pichia methanolic				pMET α C							N末端にSSS配列(α-factor) 成熟ヒト血漿7αミンベプド配列(HSA)
38			-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pMET α B/HSA	AUG1	AUG1	Ampicillin		His		
			-Pichia methanolic					ADE2	ADE2			V5 epitope		
39			-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ A	AOX1	AOX1			C-myc		
			-Pichia pastoris				pPICZ B	TEF1	CYC1	Zeoцин		His		
			-Pichia pastoris				pPICZ C	EM7	CYC1					
40			-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ α A	AOX1	AOX1			C-myc		
			-Pichia pastoris				pPICZ α B	TEF1	CYC1	Zeoцин		His		
			-Pichia pastoris				pPICZ α C	EM7	CYC1					
41		loXP	-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ-E	AOX1	AOX1	Zeoцин		C-myc		
			-Pichia					TEF1	CYC1					
42		loXP	-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pPICZ α-E	AOX1	AOX1	Zeoцин		His		
			-Pichia					TEF1	CYC1					
43			-E.coli	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES-DEST52	GAL1	CYC1	Chloramphenicol Ampicillin		His		
			-Saccharomyces cerevisiae					T7		URA3(Yeast) csg		V5 epitope		
44			-E.coli	マルチコピ—Pichia発現用	Invitrogen		pPIC3.5K	AOX1	AOX1	Kanamycin Ampicillin				
			-Pichia pastoris							HIS4(Yeast)				
45			-E.coli	マルチコピ—Pichia発現用	Invitrogen		pPIC3K	AOX1	AOX1	Kanamycin Ampicillin				
			-Pichia pastoris							HIS4(Yeast)				
46			-E.coli	マルチコピ—Pichia発現用	Invitrogen		pAO815	AOX1	AOX1	Kanamycin Ampicillin				
			-Pichia pastoris							HIS4(Yeast)				
47			-E.coli	マルチコピ—Pichia発現用	Invitrogen		pPIC3	AOX1	AOX1	Ampicillin				
			-Pichia							HIS4(Yeast)				
48			-E.coli	Pichia発現用	Invitrogen		pPIC3.3	AOX1	AOX1	Ampicillin				
			-Pichia							HIS4(Yeast)				
49			-E.coli	Pichia発現用	Invitrogen		pPIC9	AOX1	AOX1	Ampicillin				
			-Pichia							HIS4(Yeast)				
50			-E.coli	Pichia発現用	Invitrogen		pPHL-D2	AOX1	AOX1	Ampicillin				
			-Pichia							HIS4(Yeast)				
51			-E.coli	Pichia発現用	Invitrogen		pPHL-S1	AOX1	AOX1	Ampicillin				
			-Pichia							HIS4(Yeast)				
52			-E.coli	PichiaPink発現用	Invitrogen		pPink-HC	AOX1	CYC1	Ampicillin				
			-Pichia					ADE2		TRP1(Yeast)				
53			-E.coli	PichiaPink発現用	Invitrogen		pPink α-HC	AOX1	CYC1	Ampicillin				
			-Pichia					ADE2		TRP1(Yeast)				
54			-E.coli	PichiaPink発現用	Invitrogen		pPink-LC	AOX1	CYC1	Ampicillin				
			-Pichia					ADE2		TRP1(Yeast)				
55			-E.coli	タンパク質発現用(α-リアルミン)	Invitrogen		pFLD	FLD1	AOX1	Ampicillin		His		
			-Pichia pastoris					TEF1	CYC1	Zeoцин		V5 epitope		
			-Pichia pastoris					bla						
56			-E.coli	タンパク質発現用(α-リアルミン)	Invitrogen		pFLD α	FLD1	AOX1	Ampicillin		His		
			-Pichia pastoris					TEF1	CYC1	Zeoцин		V5 epitope		
			-Pichia pastoris					bla						
57			-E.coli	タンパク質発現用(α-リアルミン)	Invitrogen		pFLD/GAT	FLD1	AOX1	Ampicillin		His		
			-Pichia pastoris					TEF1	CYC1	Chloramphenicol Zeoцин		V5 epitope		
			-Pichia pastoris					bla						
58			-E.coli	Pichia発現用	Invitrogen		pGAPZ A	GAP	AOX1	Ampicillin		His		
			-Pichia					TEF1	CYC1	Zeoцин		V5 epitope		
							pGAPZ B	TEF1	CYC1			mvc epitope		
							pGAPZ C	EM7	CYC1			His		

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	宿主種	タグC基類	その他	備考
59			-E.coli -Pichia	Pichia発現用	Invitrogen		pGAPZα A pGAPZα B pGAPZα C	GAP TEF1 EM7	AOX1 CYC1	Zeoicin		myc-epitope His	N末端にSS型別(α-factor)	
60			-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現用	Invitrogen		pPIC6 A pPIC6 B pPIC6 C	TEF1 EM7	AOX1 CYC1	Blasticidin		c-myc epitope His		
61			-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現用	Invitrogen		pPIC6/lacZ	TEF1 EM7	AOX1 CYC1	Blasticidin		c-myc epitope His		
62			-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現用	Invitrogen		pPIC6α A pPIC6α B pPIC6α C	TEF1 EM7	AOX1 CYC1	Blasticidin		c-myc epitope His	N末端にSS型別(α-factor)	
63			-E.coli -Pichia pastoris	Pichia pastoris発現用	Invitrogen		pPIC6α/HSA	TEF1 EM7	AOX1 CYC1	Blasticidin	HSA	c-myc epitope His	N末端にSS型別(α-factor)	
64			-E.coli -Yeast	クロマトニング&タンパク質発現用	Invitrogen		pTEF1/Bsd	TEF1 EM7	CYC1	Ampicillin Blasticidin				
65			-E.coli -Yeast	クロマトニング&タンパク質発現用	Invitrogen		pTEF1/Zeo	TEF1 EM7	CYC1	Ampicillin Zeoicin				
66			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYC2/OT	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でlow copy	
67			BamHI-NdeI siteにlacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYC2/OT/lacZ	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でlow copy	
68			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/OT	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
69			BamHI-NdeI siteにlacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES2/OT/lacZ	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
70			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES3/OT	T7 TRP1	CYC1	Ampicillin TRP1(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
71			BamHI-NdeI siteにlacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	タンパク質発現用	Invitrogen		pYES3/OT/lacZ	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin TRP1(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
72			-E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES6/OT	GAL1 T7 EM7	CYC1 URA3	Ampicillin Blasticidin		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
73			BamHI-NdeI siteにlacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYES6/OT/lacZ	GAL1 T7 EM7	CYC1 URA3	Ampicillin Blasticidin		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
74			-E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pY06/OT	GAL1 T7 TEF1 EM7	CYC1 URA3	Ampicillin Blasticidin		V5 epitope His	酵母内でlow copy	
75			BamHI-NdeI siteにlacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pY06/OT/lacZ	GAL1 T7 TEF1 EM7	CYC1 URA3	Ampicillin Blasticidin		V5 epitope His	酵母内でlow copy	
76			-E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング Sa. cerevisiae発現用	Invitrogen		pYES2	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
77			N末端にlacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング Sa. cerevisiae発現用	Invitrogen		pYES2.1/V5-His /lacZ	GAL1 T7 URA3	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
78			-E.coli -Yeast	大腸菌TA4クロマトニング Sa. cerevisiae発現用	Invitrogen		pYES2.1/V5-His -TOPO	GAL1 T7 URA3	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)		V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
79			-E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング Sa. cerevisiae発現用	Invitrogen		pYES2/NT A pYES2/NT B pYES2/NT C	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)	His Xpress Epitope	V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
80			N末端にEnterokinase KpnI-NdeI部位間lacZ遺伝子 -E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング Sa. cerevisiae発現用	Invitrogen		pYES2/NT/lacZ	GAL1 T7	CYC1	Ampicillin URA3(Yeast)	His Xpress Epitope	V5 epitope His	酵母内でhigh copy	
81			-E.coli -Yeast	大腸菌クロマトニング 酵母内タンパク質発現用	Invitrogen		pYESTr-Jun	GAL1 T7 bia TRP1	CYC1	Ampicillin TRP1(Yeast)		V5 epitope Nuclear localization signal B42 domain activation Jun leucine	酵母内でhigh copy	

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特長	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカ	表現型	その他	備考
82			*E.coli *S.cerevisiae	大腸菌クロニング ゾーハイブリッド用	CloneTech		pGADT7 AD	ADH1	ADH1	Ampicillin LEU2	HA		
83			*E.coli *Yeast	ラムダ・ベクターを用いた改良!	Stratagene		pAD-GAL4-2.1 phagemid	ADH1	ADH1	Ampicillin LEU2	GAL4-AD		
84		cl-wt(aa 132-236)	*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pBD-WT	ADH1	ADH1	Chloramphenicol TRP1(Yeast)	GAL4-BD		
85		cl-E23K(aa 132-236)	*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pBD-MUT	ADH1	ADH1	Chloramphenicol TRP1(Yeast)	GAL4-BD		
86			*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pLamin C	ADH1	ADH1	Ampicillin	GAL4-BD		
87			*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pBD-GAL4 Cam	ADH1	ADH1	Chloramphenicol TRP1(Yeast)	GAL4-BD		
88		cl-wt(aa 132-236)	*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pAD-WT	ADH1	ADH1	Ampicillin LEU2	GAL4-BD		
89		cl-E23K(aa 132-236)	*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pAD-MUT	ADH1	ADH1	Ampicillin LEU2	GAL4-BD		
90			*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pESC-HIS	GALI/GAL	ADH1	Ampicillin	FLAG	c-myc	
91			*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pESC-LEU	GALI/GAL	ADH1	Ampicillin	FLAG	c-myc	
92			*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pESC-TRP	GALI/GAL	ADH1	Ampicillin	FLAG	c-myc	
93			*E.coli *Yeast	クロニング タンパク質発現用	Stratagene		pESC-URA	GALI/GAL	ADH1	Ampicillin URA3	FLAG	c-myc	
94		evoglow-Y1遺伝子	*E.coli *S.cerevisiae	蛍光タンパク質発現用	evocalat		pGlow-Ac ^{Y1} -Yt	Act1	act1	Ampicillin LEU2 URA3			恒常的に発現
95		evoglow-Y1遺伝子	*E.coli *S.cerevisiae	蛍光タンパク質発現用	evocalat		pGlow-Gul ^{Y1} -Yt	Gul1	eye1	Ampicillin URA3(Yeast)			グルコース非存在下で誘導発現
96			*E.coli *Yeast	Cu ²⁺ 誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.		pYEX 4T-1 pYEX 4T-2 pYEX 4T-3	CUP1		Ampicillin URA3	GST		
97			*E.coli *Yeast	Cu ²⁺ 誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.		pYEX-S1	PGK	PGK	Ampicillin LEU2-d URA3			分選シグナル
98			*E.coli *Yeast	Cu ²⁺ 誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.		pYEX-BX	CUP1		Ampicillin LEU2-d URA3			
99		肺腺癌由来EGFRマウス K-Ras proteinエトロープ 変異遺伝子	*E.coli *Yeast	Cu ²⁺ 誘導タンパク質発現ベクター	CLONTECH Lab.	Yingnan Lu et al.(2004) Mutation-Selective Tumor Remission with Ras-Targeted, Whole Yeast-Based Immunotherapy Cancer Research 64, 5084-5088.	pYEX-BX	CUP1		Ampicillin LEU2-d URA3			
100		Human A20遺伝子	*E.coli *Saccharomyces cerevisiae <trp 1-<="" td=""> <td>ゾーハイブリッド用システム 細胞死の抑制とzinc finger domain機能解析のためにヒト A20-DNAを発現</td> <td>ベルギー</td> <td>Dijk Ds Valck et al.(1996) A20, an inhibitor of cell death, self-associates by its zinc finger domain. FEBS Letters. 384, 61-64</td> <td>pASZAZ0</td> <td>ADH1</td> <td>ADH1</td> <td>Ampicillin Cycloheximide TRP1</td> <td>HA epitope</td> <td></td> <td>N-末端側にSS配列(α-factor)</td> </trp>	ゾーハイブリッド用システム 細胞死の抑制とzinc finger domain機能解析のためにヒト A20-DNAを発現	ベルギー	Dijk Ds Valck et al.(1996) A20, an inhibitor of cell death, self-associates by its zinc finger domain. FEBS Letters. 384, 61-64	pASZAZ0	ADH1	ADH1	Ampicillin Cycloheximide TRP1	HA epitope		N-末端側にSS配列(α-factor)
101		lipaseC遺伝子	*E.coli *Pichia pastoris	Cu ²⁺ 誘導タンパク質発現ベクター	中国	Zhengbing Jiang et al.(2008) Efficient display of active lipase LipB52 with a Pichia pastoris cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on Saccharomyces cerevisiae cell surface. BMC Biotechnology 8:4	pLHJ047	AOX1	AOX1	Ampicillin Kanamycin			
102		lipaseC遺伝子	*E.coli *Pichia pastoris	Cu ²⁺ 誘導タンパク質発現ベクター	中国	Zhengbing Jiang et al.(2008) Efficient display of active lipase LipB52 with a Pichia pastoris cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on Saccharomyces cerevisiae cell surface. BMC Biotechnology 8:4	pLHJ048	AOX1	AOX1	Ampicillin Kanamycin			
103		ヒトのメト-ヘキソキシル K1ASOD遺伝子 (酵母内発現に関するコド ンの至適化)	*E.coli *Saccharomyces cerevisiae	ゾーハイブリッド用システム 細胞死の抑制とzinc finger domain機能解析のためにヒト A20-DNAを発現	中国	Shawn Chen et al.(2007) An Improved System for the Generation and Analysis of Mutant Proteins Containing Unnatural Amino Acids in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Molecular Biology 371,112-122. McLeod, M., Stein, M., and Beach, D. (1987) The product of the meb ⁺ gene expressed under control of the mating type locus induces meiosis and sporulation in fission yeast. EMBO J. 1987 March; 6(3): 729-736. Hoffman, C. S. and Winston, F. (1981). Glucose repression of transcription of the schizosaccharomyces pombe fbp1 gene occurs by a camp signaling pathway.	pCIRS0D	TDH3	TDH3	Ampicillin LEU2-d			
104			*E.coli *Yeast	タンパク質発現用			pART1	ADH	ADH	Ampicillin LEU			
105			*Yeast	タンパク質発現用			pCHY21	FBP	FBP	URA3			

番号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特効	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	タグ	備考
106			-Schizosaccharomyces po	タンパク質発現用	研究・開発国	Russell, P. R. and Hall, B. D. (1983). The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . Mol. Biol. Chem. 258, 143-149.	pEVP11	ADH		Ampicillin LEU2		
107			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Nashid, K. (1990). nmt1 of fission yeast: a highly transcribed gene completely repressed by thiamine. J. Biol. Chem. 265 10857-10864.	pPEP1 pPEP3	nmt1 amp lac		Ampicillin LEU2 URA4+		
108			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Forsburg, S.L., and Sherman, D.A. (1987). Gene promoters tagging vectors for fission yeast. Gene 19 191-195.	pSLF172 pSLF272 pSLF372	nmt1 amp lac		Ampicillin URA4+	HA	
109			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Forsburg, S.L., and Sherman, D.A. (1987). Gene promoters tagging vectors for fission yeast. Gene 19 191-195.	pSLF173 pSLF273 pSLF373	nmt1 amp lac		Ampicillin URA4+		
110			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Forsburg, S.L., and Sherman, D.A. (1987). Gene promoters tagging vectors for fission yeast. Gene 19 191-195.	pDS472	nmt	nmt	Ampicillin URA4	GST	
111			-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Forsburg, S.L., and Sherman, D.A. (1987). Gene promoters tagging vectors for fission yeast. Gene 19 191-195.	pDS473	nmt	nmt	Ampicillin URA4	GST	
112			-E.coli -Yeast	contains adh-thymidine kinase, allowing counterselection with FUDR		Shakumar S, Porter-Goff M, Patel PK, Benoit K, Rhind N. In vivo labeling of fission yeast DNA with thymidine and thymidine analogs. Methods. 2004 33:213.	pFS118	adh1		Ampicillin URA4 thymidine kinase		
113		革動型ヌクレオシドトランスポート (HENT1)	-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Hedson, J.A., Bailis, J.M. and Forsburg, S. L. (2003). Efficient labeling of fission yeast S. pombe by thymidine and BUdR. Nucleic Acids Res. 31:134	p-JAH29	adh1		Ampicillin leu1+		
114		Herpes simplex virus 由来の thymidine kinase gene (HSV-TK)	-E.coli -Yeast	タンパク質発現用		Hedson, J.A., Bailis, J.M. and Forsburg, S. L. (2003). Efficient labeling of fission yeast S. pombe by thymidine and BUdR. Nucleic Acids Res. 31:134	p-JAH31	adh1		Ampicillin his7+		
115		プロパギン(oxophenylalanine)	-E.coli -Saccharomyces	クロロニンゲタンパク質発現用		Shawn Chen et al. (2007) An Improved System for the Generation and Analysis of Mutant Proteins Containing Unnatural Amino Acids 1-FPK1-3SUP4+RN ₁ -PGK1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Journal of Molecular Biology, 371,112-122.	pAS404	ADH1 T7 T7 GAL1 T3 ampR	ADH1	Ampicillin TRP1 or URA3	HA	http://www.addgene.org/0 2/vec1.2?cmd=search&id=60 1&filter=CAS1&format=0&f=0
116			-E.coli -Saccharomyces	タンパク質発現用		Sung Jae Shin, Jong Lye Bae et al. (2003) Expression of apA of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . J.Vet.Sci. 4(3)225-228	pAG303GAL-ccdB			Ampicillin TRP1 Chloramphenicol HIS3		
117			-E.coli -Saccharomyces	タンパク質発現用		Sung Jae Shin, Jong Lye Bae et al. (2005) Induction of antigen-specific immune responses by oral vaccination with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ApxIIA. FEMS Immunology and Medical Microbiology 43, 155-164						
118		ブタの主要な病原菌 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> の毒素 (Apx) 遺伝子を導入	-E.coli -S. cerevisiae	タンパク質発現用		H.FUJITA et al. (1987) Studies in the development of Japanese encephalitis vaccine: expression of virus envelope glycoprotein VP(E) gene in yeast. Bulletin of the World Health Organization 65(3):303-308 Thomas P. Hopp et al. (1988) A SHORT POLYPEPTIDE MARKER SEQUENCE USEFUL FOR RECOMBINANT PROTEIN IDENTIFICATION AND PURIFICATION. BIO/TECHNOLOGY VOL.6 OCTOBER 1204-1210	YEpGAD-apxIIA YEpGAD-apxIIA	GPD	GAL7	Ampicillin URA3		
119		日本脳炎ワクチン研究: 外産菌タンパク質(V3(E)遺伝子)発現	-E.coli -Saccharomyces -S. cerevisiae	タンパク質発現用			pJM105	PHO5	TRP1	Ampicillin LEU2		
120		marker peptideと IL-2 cDNA融合遺伝子の発現	-E.coli -Saccharomyces -S. cerevisiae	タンパク質発現用			pXY	α-factor		Ampicillin TRP		α-factor leader-配列

新号	区分	導入遺伝子	宿主	生産物・機能・特徴	研究・開発国	文献	ベクター名	プロモーター	ターミネーター	マーカー	菌株	タグ	その他	研究者
121	B型肝炎抗原抗体遺伝子の発	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	大阪大学 生体機能研究科	ATSUSHI MIYANOHARA et al. (1983) Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. Ronald A.Hitzeman et al.(1983) Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. Nucleic Acids Research.Vol.11.#9.P.2745-2763 Ronald A.Hitzeman et al.(1983) Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. Nucleic Acids Research.Vol.11.#9.P.2745-2763 Junji Ito et al. (2009) Regulation of the Display Ratio of Enzymes on the Saccharomyces cerevisiae Cell Surface by the Immunoglobulin G and Cellulosomal Enzyme Binding Domains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,June .p.4149-4154 Junji Ito et al. (2009) Regulation of the Display Ratio of Enzymes on the Saccharomyces cerevisiae Cell Surface by the Immunoglobulin G and Cellulosomal Enzyme Binding Domains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,June .p.4149-4154	pAT77 pAMB2	APase		Ampicillin LEU2				
122	B型肝炎抗原抗体遺伝子(HBsAg)	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	USA		pYEHbs	PGK	TRP1	Ampicillin LEU2				
123	B型肝炎抗原抗体遺伝子(HBsAg)	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	USA		pYEHbsd	PGK	TRP1	Ampicillin TRP				
124	scaffold protein/cohesin and Z domain of protein A融合のhalf of α-agglutininの発現	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	JPN		wIZZCoH12	UPR-1CL	α-agglutinin	Ampicillin TRP1			3'-half of α-agglutininアンカー	ss配列
125	Z domain+Fc domain of hlgG or cohesin-dockerinの分泌	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	JPN		pUEZ pUEZD pUEZF pUEBD	GAPDH	GAPDH	Ampicillin URA3				ss配列
126	Z domain+Fc domain of hlgGと cohesin-dockerinの分泌	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	-E.coli Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	JPN		pUEZFEZD pUEZFBID	GAPDH*2	GAPDH*2	Ampicillin URA3				ss配列
127	γ-Carotene合成経路に関する遺伝子	Saccharomyces cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae	タンパク質発現用	Fungal Genomics, Laboratory of Microbiology, Wageningen University	Reic Verwaal et al.(2007) High-Level Production of Beta-Carotene in Saccharomyces cerevisiae by Successive Transformation with Carotenogenic Genes from Xanthophyllomyces dendrorhous. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,July.p.4632-4636	pYehac195- crYB/crE pYehac195- crYB/crE pYehac195- crYB/crYB crYB/crYB/BTS1 pYehac211- crYB/crYB/crE pYehac211- crYB/crYB pYehac211- crYB/crYB/BTS1	TDH3	CYC1	URA3				

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）

工業原料用遺伝子組換え植物・生物の混入危害に関する研究

研究分担者 小関 良宏 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 教授

研究要旨

遺伝子組換え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遺伝子組換え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。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*、*SSIb* 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% 程度の組換え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。

研究協力者：

佐々木 伸大（東京農工大学大学院共生科学
技術研究院 助教）

A. 研究目的

植物遺伝子組換えの研究は 1983 年に Zambryski らが世界で初めて報告したタバコへの遺伝子組換えの研究にはじまり、その後、様々な植物に有用遺伝子を導入し、新しい植物種を作り出してきた。以来、様々な種類・用途の遺伝子組換え植物が作出されてきており、これらを導入した遺伝子の特性ごとに分けると、主に第 1 世代から第 3 世代の 3 つに分類される。第 1 世代は、農業生産性に役立つ特性を付与された遺伝子組換え植物であり、例えば害虫抵抗性、ウイルス抵抗性、除草剤耐性などの特性を付与した遺伝子組換え作物であり、すでにこれら特性を有した多

く遺伝子組換え農作物が食品としての安全性評価および生物多様性影響評価がなされて商業生産され、食卓に上っている。第 2 世代は、栄養改変・栄養付加型遺伝子組換え植物であり、もとの植物が有していた栄養機能の強化や新たな機能性の付与が行われたものであり、すでに高オレイン酸ダイズや高リシン・トウモロコシが実用化され商業栽培されている。さらに第 3 世代として、地球環境の温暖化による乾燥地や塩害地の増大に伴う耕作可能地の減少に対し、そのような土地でも生育する環境抵抗性の遺伝子組換え植物の開発が進められている。

一方、これとは別に石油資源の枯渇化によるプラスチック原材料の先行き不安とともに、その廃棄処理のために、遺伝子組換え植物を利用して生分解性プラスチック原料を生産しようとする研究開発が行われている。このような生分解性プラ

スチックは遺伝子組換え植物が固定した CO₂ から合成され、さらに微生物分解によって CO₂ として発散しても、植物が固定した CO₂ からの発散ということでトータル・バランスから見て大気中の CO₂ 量を増加させることがない。さらに CO₂ 排出量の低下を目指して、石油燃料の利用ではなく、植物が CO₂ 固定して作った糖やデンプンからエタノールを合成し、これを石油代替燃料にする、いわゆるバイオエタノールの生産が進められている。このバイオエタノール生産の効率をさらに増進することを意図した遺伝子組換え植物が作出されている。実際にこれを主目的とした耐熱性アミラーゼを遺伝子導入したトウモロコシの商業栽培が始められようとしている。これらは食品として開発されたものではなく工業原料用として開発されたものであるため、これらが圃場において花粉媒介によって食品としての農作物の中に混入する、あるいは流通の過程において誤って混入する恐れがあり、食品の安全性を確保するためには、これらの混入を阻止しなければならない。

ここでポイントとなるのは、遺伝子組換え植物で生産される「工業原料」が、食品として食されているもの（例えばエタノール、糖、油）を大量生産させる、あるいは改質させてこれを工業原料に用いる場合か、それとも食品ではない化合物を植物に生産させてこれを工業原料に用いる場合か、すなわち「可食性工業原料」と「非食性工業原料」に分類することである。後者の場合は、これまでヒトが食品として食した経験のないものであるから、これが食品となる遺伝子組換え食品（農作物）に混入する可能性のある場合には、食品への非食品の混入であることから厳しいリスク管理が必要となる。また、前者においても、既存の食品に含まれていた成分であったとしても、既存の食品と比較して原料とする化合物の生産含有量や質が遺伝子組換えの結果として大幅に改変されている可能性が高い。この場合、それら化合物を既存の食品とは異なった量・質で食することになり、既存の食経験のある食品とは異なった食品としての安全性を評価する必要とともに、それに見合ったリスク管理が必要とされる。特に、遺伝子組換えによって代謝系のフローなどを改変した場合、宿主の非組換え遺伝子植物の代謝フローに大きな影響をもたらす可能性があり、これによって、有害生理活性物質の量の増大や質の変

化を引き起こす可能性があり、これらがヒトの健康を損なう可能性は否定できない。

そこで、当研究においては、現在、開発されている工業原料用遺伝子組換え植物について、可食性工業原料と非食性工業原料に分けて、それらについて実験植物の段階からの情報を収集・整理すること、特に用いられている導入遺伝子のみならず、プロモーターおよびターミネーターについてもリストアップすることによって、これら工業原料用遺伝子組換え植物が食品の中に混入しているかどうかを検知するためのデータベースとして資することと、今後増加すると予想される非食用の遺伝子組換え植物の食品への混入を網羅的にモニタリングする系を構築するために、DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知の可能性を探ることを目的とした。

現在食品に含まれる組換え遺伝子の検知は、既報の組換え遺伝子の DNA 塩基配列情報をもとに作成したプライマーを用いたリアルタイム PCR 法によってなされている。しかし、近年の遺伝子組換え植物は上述したとおり、食用のみならず非食用のものが数多く開発されており、組換えられる遺伝子の種類も多岐にわたっている。PCR 法による組換え遺伝子検知法は非検出感度が高いという利点はあるが、既知の DNA 塩基配列情報をもとにプライマーを設計する必要があるため、混入する疑いのある組換え遺伝子についてある程度の予想がつくものでなければ適用できないという欠点がある。昨今の遺伝子組換え植物の種類の増大をかんがみると、近い将来数多くの組換え遺伝子を一度に検知できる方法確立しておく必要があるものと考えられる。

DNA マイクロアレイは数 cm 四方のガラス基板上に数万～数十万種類の DNA プローブを固定化しておき、蛍光標識したターゲット DNA をプローブと相補鎖を形成させることで、どのようなターゲット DNA 中にどのような遺伝子が存在しているかを検知することができる方法である。理論的には一枚の DNA マイクロアレイ上で数十万種類の遺伝子を検知できるため、認可された遺伝子組換え植物のみならず、遺伝子組換え微生物について、また、情報が公開されていない組換え遺伝子についても、データベース上の情報などから予想される遺伝子については検知が可能となる。そのため、DNA マイクロアレイ技術が組換え遺伝子検知法に応用することが可能

となれば、今後、増大すると思われる意図しない非食用の遺伝子組換え植物の混入を検知することが可能となると期待される。

これまでに多くの遺伝子組換え植物が開発され市場に出回ってきた。これまでに認可され、市場に出回っている遺伝子組換え植物は食品やその原料となるものであったが、最近ではエタノールや生分解性プラスチック等の原料となるような化学物質を植物に生産させる研究がなされている。それらの植物は可食性のものが使われることも多く、これらの遺伝子組換え植物が認可され、市場に出回った場合、食品の原材料等に混入する可能性を排除できない。これらの工業原料をヒトが食した場合、健康被害が出る恐れがあるため、非食用の遺伝子組換え植物の流通を監視し、食品等への混入を阻止するためのシステムの構築を検討することが必要である。しかし、年々増加の一途をたどる遺伝子組換え植物を委細もろざす検出するのは非常に困難になるものと予想される。

DNA マイクロアレイは数 cm 四方のガラス基板上に数万～数十万種類の DNA プローブを固定することで、1 度に数十万種類の遺伝子を検知することが可能な DNA 検出方法であるため、この技術が組換え遺伝子検出法に応用することで今後、増大すると思われる意図しない非食用の遺伝子組換え植物の混入を検知することが可能となると期待される。

20 年度ではトウモロコシを用いて、内在性の遺伝子である *Adh*, *SSIb* のプローブを作成して DNA チップに固定化し、これらのプローブのアンチセンス DNA を蛍光標識したものをを用いて検出感度についての検討を行った。その結果、ターゲット DNA が反応系に 1.0×10^7 コピー存在する場合に検出可能であることが分かった。トウモロコシゲノムのサイズはおおよそ 3.0×10^9 塩基対と見積もられているため、 $1 \mu\text{g}$ のゲノム DNA 中にはゲノム当たり 1 コピー存在している遺伝子は 6.0×10^5 コピー存在していると考えられる。そこで、21 年度ではは実際のトウモロコシゲノム DNA を標識した場合にゲノム内に 1 コピー存在する遺伝子をマイクロアレイ上で検出することが可能かどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

B-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ため、倫理上の問題はない。

B-2) DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検出

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 (図 1)。プローブ配列としては、トウモロコシ内在性の遺伝子として alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (5'-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-3')、starch syntase IIb (SSIb) 遺伝子 (5'-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-3')、また、組換え遺伝子のプロモーターとして使用される頻度が高いカリフラワーモザイクウイルス由来の 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 SSIb 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 SSI**I**b 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 μ l 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 $^{\circ}$ C、4 時間で行った。その後アレイを、37 $^{\circ}$ 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のを用いた (図 1)。プローブ配列としては、トウモロコシ内在性の遺伝子として alcohol dehydrogenase (Adh) 遺伝子 (5'-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-3')、starch syntase IIb (SSI**I**b) 遺伝子 (5'-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAATGC A-3')、また、組換え遺伝子のプロモーターとして使用される頻度が高いカリフラワーモザイクウィルス由来の 35S プロモーター配列から設計した (5'-CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT-3')。

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

DNA マイクロアレイ解析のハイブリダイゼーションは 470 μ l のハイブリダイゼーションバッファー (8 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.8 mM EDTA, 0.1% SDS, 4 \times SSC) に標識したターゲット DNA を加えて 65 $^{\circ}$ C、4 時間で行った。アレイの洗浄

は、標準の方法としては 37 $^{\circ}$ C の 3 \times SSC, 0.1% SDS 中での洗浄を 1 分間、2 回行った後に、室温の 0.2 \times SSC 中で 1 分間リンスしてから読取装置にセットしてシグナルを検出した。洗浄温度の検討ではアレイの一回目と 2 回目の洗浄を 37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C、47 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C で行った後、リンスして検出を行った。洗浄バッファーの検討では SSC バッファー (1 \times SSC バッファー: 150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム) 濃度を 3 \times 、2 \times 、1 \times 、0.5 \times となるように調整し、37 $^{\circ}$ C で洗浄を 2 回行った後、リンスして検出を行った。

C. 研究結果および考察

C-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

C-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ル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出する試みもユウ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。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。

C-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 (prn) 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、さらには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。

C-2) DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝

子検知

C-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 1.0×10^7 以上では十分なシグナルが得られたのに対し、 1.0×10^6 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 1.0×10^7 コピー/アレイであることが分かった。

C-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、SSIIb 遺伝子ともに 1.0×10^9 コピー/アレイでは十分に検出でき、ADH 遺伝子については 1.0×10^8 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、 1.0×10^7 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(図4)。ADH 遺伝子と SSIIb 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同程度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えられた。

C-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 1.0×10^9 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、SSIIb 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。

C-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、SSIIb 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。

C-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 ($3 \times \text{SSC}$) の場合には検出されていた P35S のスポットで

の蛍光が、75 mM (0.5×SSC) の場合では検出されていないことがわかった。

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。

D. 結論

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。

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 μg のゲノム DNA には約 6.0×10^4 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 6.0×10^4 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 1.0×10^7 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 μg 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 1.8×10^7 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出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。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 伊東 篤志、田口 朋之、和気 仁志、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 年 5 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金（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）

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

研究分担者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部部長

研究要旨

近年、非食用バイオテクノロジー応用魚や動物が多数報告されている。これらの非食用バイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料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ウシについて、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。

また、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、作成の経緯、概要についてまとめを行った。

協力研究者：

中島 治（代謝生化学部 主任研究官）

化への動向を調査する。

(2) プリオンノックアウトウシに由来する肉の検知について

A. 研究目的

(1) 文献調査について

バイオテクノロジー応用魚や動物の開発は活発に行われている。本来は非食用として開発されたバイオテクノロジー応用魚や動物が誤って食品に混入する可能性が考えられる。そこで、非食用バイオテクノロジー応用魚と動物の中から報告の多い魚、ニワトリ、ブタを選んでそれらの開発と実用

2007 年に Richt らがプリオンタンパク遺伝子をノックアウトした GM 牛（プリオンノックアウトウシ）を開発し報告した。その報告において、プリオンタンパクの混入の危険性を回避してコラーゲンや血清などのバイオテクノロジーで使用される製品をプリオンノックアウトウシを利用して生産する可能性が論じられている^{参考出典 1}。本研究においては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する。

(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

2008年にCODEX委員会で組換え動物の安全性評価ガイドラインが作成されて以来、国別のガイドラインとしては、世界で最も早く作成され、2009年1月に公表された、組換え動物の規制に関するFDAガイダンスの日本語への仮訳を行うとともに、作成の経緯、概要についてまとめを行うことを目的とした。

B. 研究方法

(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

牛肉からの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ため、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 $20-20 \times 10^6$ 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/ μ L)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/ μ L)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。

C. 研究結果と考察

(1) 文献調査について

(a)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。

(b)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 β -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。

(c) 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、 α 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ア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。