

(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 of 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。

(i) 「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。

(ii) 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。

(iii) 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。

(iv) 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。

D. 結論

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。

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。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

論文発表

- 1) Nakajima, O., Akiyama, H. and Teshima, R. (2009) Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Contamination of Beef by Material from Genetically Engineered Cattle. Biol. Pharm. Bull. 32 (8) 1313-16

学会発表

- 1) 中島治、穂山浩、手島玲子 リアルタイム PCR を用いた遺伝子組換えウシに由来する肉の検知法について 第98回日本食品衛生学会学術講演会 2009年10月

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

参考出典

- (1) Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M. and Kuroiwa, Y. (2007) Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol.*, 25, 132-38
- (2) 広島大学大学院生物圏科学研究科・分子生命開発学講座・松田治男教授、堀内浩幸助教
<http://www.hiroshima-u.ac.jp/immunobi/>
- (3) Sprangers, B., Waer, M. and Billiau, A.D. (2008) Xenotransplantation: Where are we in 2008? *Kidney International* 74, 14-21
- (4) Leff, L.G., Dana, J.R., McArthur, J.V. and Shimkets, L.J. (1993) Detection of Tn5-like sequences in kanamycin-resistant stream bacteria and environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (2) 417-21

参考論文

(表 1) 非食用バイオテクノロジー応用魚に関する論文

- 1) Zhong, J., Wang, Y. and Zhu, Z. (2002) Introduction of the Human Lactoferrin Gene into Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to Increase Resistance against GCH Virus. *Aquaculture* 214: 93-101
- 2) Zeng, Z., Liu, X., Seebah, S. and Gong, Z. (2005) Faithful Expression

of Living Color Reporter Genes in Transgenic Medaka under Two Tissue Specific Promoters.

Developmental Dynamics 234: 387-392

- 3) Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M. and Yan, T. (2003) Development of Transgenic Fish for Ornamental and Bioreactor by Strong Expression of Fluorescent Proteins in the Skeletal Muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (1) 58-63
- 4) Pohajdak, B., Mansour, M., Hrytsenko, Colon, J.M., Dymond, L.C. and J.R. Wright J. (2004) Production of Transgenic Tilapia with Brockmann Bodies Secreting [desThrB30] Human Insulin. *Transgenic Res.* 13 (4) 313-23
- 5) Hwang, G., Müller, F., Rahman, M.A., Williams, D.W., Murdock, P.J., Pasi, K.J., Goldspink, G., Farahmand, H. and Maclean N. (2004) Fish as Bioreactors: Transgenic Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos. *Mar. Biotechnol.* 6 (5) 485-492
- 6) Yazawa, R., Hirono, I. and Aoki, T. (2006) Transgenic Zebrafish Expressing Chicken Lysozyme Show Resistance against Bacterial Diseases. *Transgenic Res.* 15 (3) 385-391
- 7) Sarmasik, A., Warr, G. and Chen.

- T.T. (2002) Production of Transgenic Medaka with Increased Resistance to Bacterial Pathogens. *Mar. Biotechnol.* 4 (3) 310-322
- 8) Li, S., and Tsai, H. (2009) Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 316-325
- 9) Hew, C.L., Fletcher, G.L. and Davies, P.L. (1995) Transgenic Salmon: Tailoring the Genome for Food Production. *J. Fish Biol.* 1995 47 (Suppl. A) 1-19
- 10) Kurauchi, K., Nakaguchi, Y., Tsutsumi, M., Hori, H., Kurihara, R., Hashimoto, S., Ohnuma, R., Yamamoto, Y., Matsuoka, S., Kawai, S., Hirata, T. and Kinoshita, M. (2005) In Vivo Visual Reporter System for Detection of Estrogen-Like Substance by Transgenic Medaka Environmental Sci. Technol. 39, 2762-69.
- (表 2) 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリに関する論文
- 11) Kwon, M.S., Koo, B.C., Choi, B.R., Park, Y.Y., Lee, Y.M., Suh, H.S., Park, Y.S., Lee, H.T., Kim, J.H., Roh, J.Y., Kim, N.H. and Kim, T. (2008) Generation of Transgenic Chickens That Produces Bioactive Human Granulocyte - Colony Stimulating Factor. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (7) 1120-6
- 12) Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motono, M., Watanabe, H., Yamashita, T., Nishijima, K., Kamihira, M. and Iijima, S. (2008) Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (4) 834-9
- 13) Lee, S.H., Gupta, M.K., Han, D.W., Han, S.Y., Uhm, S.J., Kim, T. and Lee, H.T. (2007) Development of Transgenic Chickens Expressing Human Parathormone under the Control of a Ubiquitous Promoter by Using a Retrovirus Vector System. *Poult Sci.* 86 (10) 2221-7
- 14) Koo, B.C., Kwon, M.S., Choi, B.R., Kim, J.H., Cho, S.K., Sohn, S.H., Cho, E.J., Lee, H.T., Chang, W., Jeon, I., Park, J.K., Park, J.B. and Kim, T. (2006) Production of Germline Transgenic Chickens Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein Using a MoMLV-Based Retrovirus Vector. *FASEB J.* 20, 2251-60
- 15) Kamihira, M., Ono, K., Esaka, K., Nishijima, K., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K. and Iijima, S. (2005) High-Level Expression of Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein in Serum and Egg White of Genetically Manipulated Chickens by Using a Retroviral Vector. *J. Virol.* 79 (17) 10864-74
- 16) Mozdziak, P.E., Borwornpinyo, S.,

- McCoy, D.W. and Petite, J.N. (2003) Development of Transgenic Chickens Expressing Bacterial Beta - Galactosidase. *Dev. Dyn.* 226 (3) 439-45
- 17) Rapp, J.C., Harvey, A.J., Speksnijder, G.L., Hu, W. and Ivarie, R. (2003) Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res.* 12 (5) 569-75
- 18) Harvey, A.J. and Ivarie, R. (2003) Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poult Sci.* 82 (6) 927-30
- 19) Zhu, L. et.al. (2005) Production of Human Monoclonal Antibody in Eggs of Chimeric Chickens. *Nat. Biotechnol.* 23 (9) 1159-69
- 20) Minematsu, T., Harumi, T. and Naito, M. (2008) Germ cell-specific expression of GFP gene induced by chicken vasa homologue (Cvh) promoter in early chicken embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (10) 1515-22
- 21) Li, B., Sun, G., Sun, H., Xu, Q., Gao, B., Zhou, G., Zhao, W., Wu, X., Bao, W., Yu, F., Wang, K. and Chen, G. (2008) Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo and ex vivo transfection. *Sci. China C. Ser. Life Sci.* 51 (8) 734-42
- 22) Kyogoku, K., Yoshida, K., Watanabe, H., Yamashita, T., Kawabe, Y., otono, M., Nishijima, K., Kamihira M. and Iijima S. (2008) Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *J. Biosci. Bioeng.* 105 (5) 454-9
- 23) Kawabe, Y., Naka, T., Komatsu, H., Nishijima, K., Iijima, S. and Kamihira M. (2008) Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation. *J. Biosci. Bioeng.* 106 (6) 598-601
- 24) Kamihira, M., Kawabe, Y., Shindo, T., Ono, K., Esaka, K., Yamashita, T., Nishijima, K. and Iijima, S. (2009) Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J. Biotechnol.* 141 (1-2) 18-25
- 25) Smith, C.A., Roeszler, K.N. and Sinclair, A.H. (2009) Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation.* 77 (5) 473-82
- 26) Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., Shore, L.S., Katz, A., Stram, Y. and Shemesh, M. (2009) Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 80 (5) 1046-52

- 27) Penno, C.A., Kawabe, Y., Ito, A. and Kamihira M. (2010) Production of recombinant human erythropoietin /Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Res.* 19 (2) 187-95
- 28) Lu, Y., Lin, C. and Wang, X. (2009) PiggyBac transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic Acids Res.* 37 (21) e141
- 29) Koo, B.C., Kwon, M.S., Lee, H., Kim, M., Kim, D., Roh, J.Y., Park, Y.Y., Cui, X.S., Kim, N.H., Byun, S.J. and Kim, T. (2009) Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res.* 印刷中
- (表 3) 非食用バイオテクノロジー応用ブタに関する論文
- 30) Miyagawa, S. et. al. (2001) Remodeling of the Major Pig Xenoantigen by N-Acetylglucosaminyltransferase III in Transgenic Pig. *J. Biol. Chem.* 276 (42) 39310-19
- 31) Murakmai, H. et. al. (2002) Transgenic Pigs Expressing Human Decay-Accelerating Factor Regulated by Porcine MCP Gene Promoter. *Mol. Reprod. Dev.* 61 (3) 302-11
- 32) Takahagi, Y., Fujimura, T., Miyagawa, S., Nagashima, H., Shigehisa, T., Shirakura, R. and Murakami, H. (2005) Production of Alpha 1,3-Galactosyltransferase Gene Knockout Pigs Expressing Both Human Decay-Accelerating Factor and N-Acetylglucosaminyltransferase III. *Mol Reprod Dev.* 71 (3) 331-8
- 33) Dieckhoff, B., Petersen, B., Kuess, W.A., Kurth, R., Niemann, H. and Denner, J. (2008) Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* 15 (1) 36-45
- 34) Kurome, M., Ishikawa, T., Tomii, R., Ueno, S., Shimada, A., Yazawa, H. and Nagashima, H. (2008) Production of transgenic and non-transgenic clones in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 54 (3) 156-63
- 35) Matsunari, H., Onodera, M., Tada, N., Mochizuki, H., Karasawa, S., Haruyama, E., Nakayama, N., Saito, H., Ueno, S., Kurome, M., Miyawaki, A. and Nagashima, H. (2008) Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, Kusabira-Orange. *Cloning Stem Cells.* 10 (3) 313-23
- 36) Naruse, K., Ishikawa, H., Kawano, H.O., Ueda, H., Kurome, M., Miyazaki, K., Endo, M., Sawasaki, T., Nagashima, H. and Makuuchi, M. (2005) Production of a Transgenic Pig Expressing Human Albumin and Enhanced Green Fluorescent Protein. *J. Reprod. Dev.* 51 (4) 539-546
- 37) Kurome, M., Ueda, H., Tomii, R.,

- Naruse, K. and Nagashima, H. (2006) Production of Transgenic-Clone Pigs by the Combination of ICSI-Mediated Gene Transfer with Somatic Cell Nuclear Transfer. *Transgenic Res.* 15 229-240
- 38) Kragh, P.M., Nielsen, A.L., Li, J., Du, Y., Lin, L., Schmidt, M., Boegh, I.B., Holm, I.E., Jakobsen, J.E., Johansen, M.G., Purup, S., Bolund, L., Vajta, G. and Joergensen, A.L. (2009) Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res.* 18 (4) 545-58
- 39) Umeyama, K., Watanabe, M., Saito, H., Kurome, M., Tohi, S., Matsunari, H., Miki, K. and Nagashima, H. (2009) Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res.* 18 (5) 697-706
- homologue, eGFP: enhanced green fluorescent protein, SV40: simian vacuolating virus 40, CMV: cytomegalovirus, TNF: tumor necrosis factor, IgG: immunoglobulin G, WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulation element, RCASBP: replication-competent avian sarcoma-leukosis virus, with a splice acceptor, bryan RSV Pol, LTR: long terminal repeat, FSH: follicle-stimulating hormone, DsRed: red fluorescent protein, shRNA: small hairpin RNA, GFAP: glial fibrillary acidic protein, GnTIII: β -d-mannoside β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III, α -Gal: Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, hDAF: human decay-accelerating factor, IRES: internal ribosomal entry site, hyg: hygromycin B, pgk: phosphoglycerate kinase, neo: neomycin-resistant gene

略語

MoMLV: Moloney murine leukemia virus, RSV: Rous sarcoma virus, GFP: green fluorescent protein, Cvh: chicken vasa

区分	導入遺伝子	魚の種類	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
中国の研究	ヒトラクトフェリン	ソウギョ	GCHウイルスへの耐性が強化された	中国	リニアールにしたプラスミドを精子へ電ポレーションして、この精子を人工的に受精させた	pUC118	コイβ-アクチンプロモーター		なし		1
観賞魚用	GFP	メダカ	蛍光を発する魚を作成した	シンガポール Univ. Singapore			Danio rerio myosin light polypeptide 2 skeletal muscle mylz2プロモーター、krt8プロモーター			研究用としても論じられている	2
	GFP, YFP, RFP	ゼブラフィッシュ	3色の蛍光を発する魚を作成した。蛍光タンパクは筋肉のタンパクの3-17%を占めた。	シンガポール National Univ. Singapore	リニアールにしたプラスミドを1, 2細胞期の胚へ顕微注射した	pEGFP-1, pEYF-1, pdsRed-1 (Clontech社)	内在性mylz2プロモーター	SV40ポリA	GFP, YFP, RFP	バイオリアクターとしても論じられている	3
バイオリアクター用	ヒト化したインシュリン	ティラピア	F1世代の血清とβ細胞でヒトインシュリンを検出した	カナダ Univ. Dalhousie	受精卵へ顕微注射した	なし	内在性インシュリンプロモーター	内在性インシュリンターミネーター	なし		4
	ヒト血液凝固因子VII	ゼブラフィッシュ、アフリカナマズ	ヒト血液凝固因子VIIを魚の胚で生産させた	イギリス Univ. Southampton	胚へ顕微注射した		CMVプロモーター	SV40ポリA		医療で利用価値が高いヒトタンパクを生産させた	5
	ニフトリ卵白リゾチーム、GFP	ゼブラフィッシュ	リゾチームタンパクは肝臓で検出された。組換え魚は病原菌に対する耐性が強化された。	日本 海洋大	受精卵へ顕微注射した	プラスミド pEGF-1 (Clontech社)	日本ヒラメ(カレイ)ケラチン遺伝子プロモーター		GFP		6
耐病性付与	cecropin	メダカ	抗微生物活性をもつペプチドを生産させた。組換え魚はバクテリアに対する耐性が強化された。	アメリカ Univ. Connecticut	受精直後の卵に電ポレーションした	プラスミド pRC/CMV (5.5 kb, Invitrogen社)	CMVプロモーター		なし		7
	コドン最適化したウシラクトフェリンとDsRedの融合遺伝子	(微細藻類 <i>N. oculata</i>)	組換え藻類を魚に摂取させてバクテリアに対する抵抗性を増強させた	台湾 National Taiwan University	<i>N. oculata</i> のプロトプラストに電ポレーションした		ヒートショックプロテイン70Aプロモーターと ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit 2プロモーターを組み合わせたもの		DsRed	魚に直接遺伝子導入しない	8
低温耐性の試み	凍結防止タンパク	大西洋サメ	凍結防止タンパクの前駆体が血清中で検出された。	カナダ Univ. Toronto	リニアールにしたプラスミドを受精卵へ顕微注射した	プラスミド pUC-9	凍結防止タンパク遺伝子プロモーター	凍結防止タンパク遺伝子ターミネーター	なし		9
環境モニタリング用	GFP	メダカ	GFP蛍光強度とエストロゲン濃度(〜40 nM)の間に比例関係があった	日本 京都大			chorionogenin Hプロモーター			エストロゲン様物質を検出する新しい技術である	10

表1. 組換え魚の研究報告

導入遺伝子	組換えタンパクの発現状況等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
ヒト顆粒球刺激因子	大腸菌で発現させたときよりも強い生理活性を持つ組換えタンパクが得られた	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine	胚盤葉の下へレトロウイルスを注入した	複製欠失のMoMLVを基にしたベクター					11
ヒトエリスロポエチン	卵白に高濃度で組換えタンパクが蓄積した	日本 名古屋大	胚の心臓へウイルスを顕微注入した	レトロウイルスベクター	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE			12
ヒト副甲状腺ホルモン	G(1)世代は孵化しなかった	韓国 Konkuk Univ.	胚盤葉の段階で胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のMoMLVを基にしたベクター	RSVプロモーター			骨粗鬆症の治療に有用なタンパクを産生した	13
eGFP	組換えタンパク1 mg当たり0.1 mgのeGFPが発現した	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine 他	stageXの胚下腔へレトロウイルスを注入した	複製欠失のMoMLVを基にしたベクター	RSVプロモーター	WPRE	eGFP		14
抗プリオン抗体の可変部一本鎖抗体とヒトIgFc領域の融合遺伝子	血清と卵で5.6 mg/mlの組換え抗体が発現した	日本 名古屋大 他	胚の体または心臓へウイルスを顕微注入した	VSV-G-偽型汎細胞性複製欠失のレトロウイルスベクター	ニワトリβ-アクチンプロモーター			レトロウイルスを胚へ顕微注入するタイミングを検討して組換えタンパクを大量に生産させた	15
核移行シグナルを連結させたlacZ	G(2)世代の細胞核でβ-ガラクトシダーゼが発現した	アメリカ North Carolina State Univ.	胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のレトロウイルスSNTZ vector	SV40 early promoter		lacZ		16
ヒトインターフェロンα-2b	卵白に分泌される組換えタンパクは生理活性があった	アメリカ AviGenics, Inc.	胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のレトロウイルスベクター	CMVプロモーター			生理活性のある糖タンパクが生産できた	17
β-ラクタマーゼ	卵白と血清中でβ-ラクタマーゼが発現した	アメリカ AviGenics, Inc.	胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のレトロウイルスベクター	CMVプロモーター				18
ヒトモノクローナル抗体	卵で3 mgの組換え抗体が生産された	アメリカ Origen Therapeutics	ニワトリES細胞にトランスフェクトしてから胚に注入した		オファルブミン遺伝子プロモーター	オファルブミン構造遺伝子の3'側の配列		ニワトリES細胞が使われた	19
ヒト化したGFP	生殖細胞において特異的に蛍光を発した。	日本 Transgenic Animal Research Center 他	リボソーム-DNA複合体を胚の血管へ注入した	プロモーターを含まないヒト化した組換えGFPレポーターベクター、pHrGFP (Stratagene)	Cvhプロモーター		ヒト化したGFP	ニワトリ生殖細胞の研究に有用である	20
eGFP	F1、F2世代の肝臓、心臓、腎臓、筋肉において蛍光が観察された	中国 College of Animal Science and Technology 他	プラスミドとカチオン性ポリマーの複合体を精巣へ注入した。精子を集めて人工授精した	pEGFP-N1 (Clontech)	CMVプロモーター	SV40ポリA	eGFP	GMニワトリを作成する新しい方法である	21
ヒトTNF受容体2の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc領域の融合遺伝子	生理活性のある組換えタンパクが血清と卵黄で発現した	日本 Kaneka Corporation	ウイルスを胚の心臓へ顕微注入した	レトロウイルスベクター-pMSCVneo plasmid、Q vector system (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE (Q vector system 用)	GFP	炎症の治療に応用が期待される	22
β-ガラクトシダーゼ	生殖腺への遺伝子導入効率を高くできる遺伝子注入のタイミングを調べた	日本 九州大 他	レトロウイルスを胚の心臓へ顕微注入した	レトロウイルスベクター-pMSCV	ニワトリβ-アクチンプロモーター		β-ガラクトシダーゼ		23
プリオン抗体のH.L鎖	抗原結合活性を持つモノクローナル抗体を生産させた	日本 九州大 他	レトロウイルスを胚の心臓へ注入した	レトロウイルスベクター-pMSCV (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター		GFP		24
eGFP	胚の体細胞においてeGFPが発現した	オーストラリア Murdoch Childrens Research Institute 他	レトロウイルスを胚盤胞へ注入した	トリレトロウイルスベクター RCASBP	ウイルスLTR RCASBPプロモーター		eGFP		25
eGFP、ヒトFSH	eGFPは白血球において、ヒトFSHは血清において発現していた	イスラエル Koret School of Veterinary Medicine 他	精子へプラスミドと制限酵素をリポフェクションしてから人工授精した	pEGFP-N3 vector (eGFP用、Clontech)、pTarget expression vector (ヒトFSH用、Promega)	CMVプロモーター	SV40ポリA (eGFP用)、SV40 Late ポリA (ヒトFSH用)		高い効率でGMニワトリを作成する方法である	26
ヒトエリスロポエチンとヒトIgGのFc領域の融合遺伝子	活性のある組換えタンパクを卵黄から回収した	日本 九州大	レトロウイルスを胚へ顕微注入した	pMSCVneo (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE	GFP	Fcを付加させたので組換えタンパクが卵黄へ輸送された	27
GFP、DsRed、agrin sh RNA	GFP、DsRed、agrin sh RNAを脊髄で発現させた	米国 Northwestern Univ.	PiggyBactランスポゾンとトランスポゼース遺伝子を胚の脊髄へエレクトロポレーションした	PiggyBactランスポゾン	CAGプロモーター (GFP、DsRed用)、GFAPプロモーター (GFP用)、ヒトH1プロモーター (agrin sh RNA用)			神経の発生の研究に利用できる	28
ヒトエリスロポエチンとヒトIgGのFc領域の融合遺伝子	組換えタンパクは生理活性があり、G1世代においても発現した	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine	レトロウイルスを胚盤葉の下へ注入した	MoMLVを基にしたレトロウイルスベクター	テトラサイクリンによって誘導がかかるプロモーター			制御されずに恒常的に組換え遺伝子が発現されることを防ぐ工夫をした	29

表2 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリを作成した研究報告

区分	導入遺伝子	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
臓器移植用	GnT-III	α -Galの発現が減少した。ヒトの自然抗体への反応性、補体が関与する細胞溶解、細胞性の細胞毒性が低下した	日本 大阪大 他	前核に顕微注射した	なし	β -アクチンプロモーター、CMVプロモーター		なし	糖尿病患者への胚移植の応用が論じられている	30
	hDAF	内皮細胞がヒト血清による細胞溶解に耐性になった。	日本 The Animal Engineering Research Institute			ブタ膜補因子タンパク遺伝子プロモーター				31
	IRES-hyg-ポリA 遺伝子断片	元のトランスジェニックブタと同等のhDAF、GnT-IIIの発現レベルを示し、 α Galエпитオプの発現は野生型細胞の半分以下だった	日本 The Animal Engineering Research Institute	トランスジェニックブタ胎児の様々な細胞へエレクトロポレーションしてから体細胞核移植を行った	なし	なし	なし	hygromycin B	hDAFとGnT-III遺伝子を導入したトランスジェニックブタの細胞において α 1,3GT遺伝子座をノックアウトした	32
	ブタ内在性レトロウイルスに保存されている配列に対するshRNA	ブタ内在性レトロウイルスの発現が抑制された	ドイツ Robert Koch Institute 他	レンチウイルスで線維芽細胞に遺伝子導入してから体細胞核移植を行った	レンチウイルスベクター pLVTHM-pol2	H1ポリメラーゼ IIIH1-RNA遺伝子プロモーター		GFP	ブタ内在性レトロウイルスはヒト細胞に感染するものがある	33
	GFP-neo融合遺伝子	ミニブタで体細胞核移植を行って仔を作った	日本 明治大	細胞をトランスフェクションしてから体細胞核移植を行った	pGB1-pgk (Qbiogene)	pgkプロモーター	BGHポリA, SV40ポリA	GFP	ミニブタはブタよりも情報が少ない	34
	ヒト化した Kusabira-Orange (赤い蛍光タンパク)	蛍光タンパクマーカーを導入した細胞は移植した細胞や組織を追跡するために有用である	日本 明治大	レトロウイルスで胎児線維芽細胞へ遺伝子導入してから体細胞核移植を行った	レトロウイルスベクター D Δ Nsap					35
バイオリアクター用	ヒトアルブミン-eGFP融合遺伝子	肝臓においてヒトアルブミンが発現した	日本 東京大 他	試験管内で成熟させた卵母細胞へ精子ベクター法で遺伝子を導入した	なし	ニワトリ β -アクチンプロモーター		ウサギ β -グロブリンポリAシグナル	eGFP	36
	ヒトアルブミン-eGFP融合遺伝子	眼球、口粘膜、皮下組織においてeGFPが発現した	日本 明治大	卵細胞質内精子注入法と体細胞核移植を行った	なし	ニワトリ β -アクチンプロモーター		ウサギ β -グロブリンポリAシグナル	eGFP	37
病態モデル	スウェーデン変異を持つヒトアミロイド前駆体タンパク遺伝子の神経細胞変異型	導入遺伝子の発現は脳においてmRNA、タンパクレベルで確認された	デンマーク Aarhus Univ.	ミニブタの線維芽細胞にプラスミドをトランスフェクトした		PDGF β プロモーター			アミロイド β ペプチドが脳に蓄積するには1-2年かかると予想される	38
	変異型ヒト肝細胞核因子1 α 遺伝子	糖尿病の症状を示すブタを作成した	日本 BIOS Research Laboratory Inc.	卵細胞質内精子注入法と体細胞核移植を行った	pBluescript SK(-) (Stratagene)	ブタインシュリンプロモーター		SV40ポリA		39

表3 非食用バイオテクノロジー応用ブタを作成した研究報告

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）

医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物の調査研究

研究分担者 吉松 嘉代 独立行政法人医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター筑波研究部

研究要旨 遺伝子組換え（GM）植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」の範囲と定め、また、環境中（土壌、地下水など）の汚染物質（重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など）に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能的食品・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。調査研究の結果から、近年とくに穀類を中心として利用が拡大しているホスト植物の自家プロモーターによる目的物質発現システムの検知法の開発を行った。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 粒を供試料とした検知法を開発した。

協力研究者：

河野 徳昭（独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部）

A. 研究目的

遺伝子組換え生物（genetically modified organism, GMO）は、植物分野においては、高栄養、高機能または経口ワクチン等の医薬品類を生産する目的（薬用 GM 植物）や、土壌浄化等の環境浄化目的（環境浄化 GM 植物）に利用され始めている。これらの新 GMO は、従来の除草剤耐性の食用植物などの GM 植物とは異なり、基本的に非食用であることから、フードチェーンへの混入は健康被害等の重大な問題を引き起こす可能性が高い。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。そこで本研究においては、薬用 GM 植物及び環境浄化用 GM 植物の開発状況・生産実態に関する情報を収集して整

理し、食品の安全性評価基準作成の一助とする。

また、これらの非食用 GMO の市場への混入を検知するシステムの構築が求められている。そこで本研究においては、近年とくに穀類を中心として利用が拡大しているホスト植物の自家プロモーターによる目的物質発現システムの検知法の開発を行う。

自家プロモーター発現系の GMO は、ホスト植物と同じプロモーターで発現を行うため、在来又は繁用のプロモーターに対する PCR によるスクリーニング法は利用できない。しかし GMO と非 GMO では、自家プロモーターであってもその周辺配列は異なるため、試料のゲノム DNA を制限酵素消化したのち自己閉環ライブラリーを作成し、プロモーター領域から周辺配列方向へ PCR を行うインバース PCR (IPCR) 法により、GMO 特異的な増幅産物が得られる。本技術はこの増幅産物の差異により GMO 検出を行う。また本法は、検知により取得された遺伝子の周辺部位の配列解析が可能であり、未知 GMO の遺伝子レベルでの特

性の解析に応用可能であり、未承認 GMO の個体識別、流通管理にも有用と考えられる。

B. 研究方法

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査

遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲と位置づけた。また、近年、牛、豚、鶏等の家畜は、人畜共通の感染症の報告があることから、これらの家畜の健康に影響を与える植物も、薬用 GM 植物の範囲とした。また、環境中 (土壌、地下水など) の汚染物質 (重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など) に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を収集した。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 挿入型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、*Kpn*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Hae*III 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 *Eco*RV, *Pvu*II, *Hae*III 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 に接するケシゲノム 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 を行い隣接ケシゲノム 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。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 rice²⁰³⁾ 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 (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パーにおいて行った。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。

グロースチャンパ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℃）／10 時間暗（温度 23℃）、61 日目から 10 時間明（温度 28℃）／14 時間暗（温度 23℃）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 µl と共に破砕機 MS-100 (TOMY)で 60 秒間 x 2 回(4,500 rpm)破砕したのち、キットのプロトコルに従いゲノム DNA を調製した。コメ(玄米)の場合は乳鉢乳棒を用い粉砕したのち、遺伝子組換え米(LLRICE601)の検知法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 µl 加え、MS-100 (TOMY)により 60 秒間 x 3 回(3,000 rpm)処理し、バッファー中粉砕した。

この粉砕液を、キット添付のプロトコルに従い処理し、ゲノム DNA を得た。

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(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 µl, ExTaq buffer (10 x) 10 µl, dNTP 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℃ 5 min. → (94℃ 30 sec. → 58℃ 30 sec. → 72℃ 1 min.) x 30 → 72℃ 10 min. → 4℃ 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、玄米と粃殻に分離した。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, 粃殻 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(OsActI) のプロモーターでドライブされたマーカ遺伝子、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、RO 水で十分に湿らせたろ紙上に種籾を置き、暗所、30°C で発芽させた。6 日後、発芽種子はアラシ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。

グロースチャンパ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 (図 6) から図 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 (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、乳鉢乳棒を用い粉砕したコメ粉末 0.5 g よりゲノム DNA を抽出・精製し、制限酵素処理、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、図9のように、宿主由来の OsAct1 遺伝子座 1 コピーに加え、人為的に導入された遺伝子コンストラクトが 1 コピー以上存在すると考えられる。このとき、イネは 2 倍体であり、導入遺伝子がホモで導入されているとすると、プロモーター領域と、プロモーター/OsAct1 コード領域境界領域の存在比は、プロモーター/OsAct1 コード領域境界領域を 1 とすると、プロモーター領域は 2 以上となる。そこで、これらの遺伝子領域の存在比を定量 real-time PCR 法により求めることとした。

イネ非組換え体 (日本晴)、R-5-sGFP rice 個体 #1 (GMO)、R-5-sGFP rice 個体 #3 (外来遺伝子コンストラクトなし) の各植物葉より調製したゲノム DNA の等量を鋳型とし、下記の OsAct1 プロモーター領域、またはプロモーター/OsAct1 コード領域境界領域特異的なプライマーを用い、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. 2007-2010 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況

U.S. Department of Agriculture (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) の情報公開サイト Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS

(http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.htm)¹⁾ で、2007 年から 2010 年までの薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べた (図 1、2010 年 1 月 6 日現在)。2007 年は認可面積 811.08 エーカーに対し、176.08 エーカーに作付けが行われた。2008 年の認可面積は 2650.50 エーカーと、2007 年の約 3.3 倍であるが、作付けが行われた面積は未だ公開されていない。2009 年は認可面積 702 エーカーに対し、96.90 エーカーに作付けが行われた。従って、2009 年の作付け面積は、2007 年の 55% に減少している。

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

バナ、Applied Biotechnology Institute の B 型肝炎ワクチン成分を生産するトウモロコシ、Washington State University のヒト摂取用高付加価値タンパク質を生産するオオムギ、University of Washington の環境浄化用のハコヤナギ属植物は既に作付けが完了している（表 1）。Ventria Bioscience 社の組換えイネは作付けされていないが、承認は 2 種について既に得られており、まもなく作付けが行われるものと思われる。

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

2. 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（表 5）。

2-1. 機能性食品

機能性食品等に関する論文等²⁻⁵⁶⁾を表 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、カフェイン 2 タンパク質等を生産する穀類⁹⁾、10 KD ゼインを生産するサツマイモ¹³⁾、高含硫アミノ酸貯蔵蛋白質を蓄積するダイズ³¹⁾、味覚修飾蛋白質ミラクリンを生産するトマト^{40, 41, 43, 44)}及び同蛋白質を生産するレタス⁵⁴⁾の 7 件である。また、アレルゲン蛋白質遺伝子の RNAi を利用した、低アレルゲン化の 1 例として、低アレルゲン化ラッカセイがある⁵²⁾。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改変（増加または低下）である。その中で最も件数が多いのが、脂肪酸組成や改変に関するもの 9 件^{8, 16, 18, 19, 24, 28, 34, 50, 51)}で、次いでビタミン E 生産に関するもの 8 件^{17, 20, 21, 23, 25, 26, 33, 37)}、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^{29, 39, 45, 46, 47)}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⁵⁷⁻⁸⁷⁾を表 7 に示した。31 件のうち、6 件^{58-61, 74, 80)}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^{58-60, 80)}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^{58, 59, 61, 74)}。

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

2-3. 食用医薬

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

2-4. ワクチン抗原

ワクチン抗原に関する論文等を表 9 に示した¹⁰⁰⁻¹¹⁹⁾。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¹⁰⁶⁻¹¹⁹⁾。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¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾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¹¹¹⁻¹¹⁵⁾。

2-5. 抗体医薬

抗体医薬に関する論文等を表 10 に示した¹²⁰⁻¹³⁶⁾。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^{126-132、135)}、3 件はウキクサ¹²⁰⁻¹²²⁾、1 件はヒメツリガネゴケ¹³⁶⁾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表 11 に示した¹³⁷⁻¹⁶⁹⁾。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¹⁵²⁻¹⁶⁶⁾、3 件でゼニゴ

ケ¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾が用いられている。前項と同様、ウイルスベクター^{147、152、158、160)}も利用されている。

2-7. 診断薬・試薬

診断薬・試薬に関する論文等を表 12 に示した¹⁷⁰⁻¹⁷⁸⁾。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表 13 に示した¹⁷⁶⁻²⁰¹⁾。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¹⁷⁶⁻¹⁷⁸⁾。今後も食用作物を用いた環境浄化用の GM 植物開発には注視する必要があると思われる。

2-9. 国別集計数

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(T₀)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 (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 (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 (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 (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 (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 (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 (T₂ 種子) が収穫された。なお、両系統間または系統内において、顕著な形態の差異を示す個体は認められなかった (図 17)。

R-5-sGFP rice T1 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 T₁ 個体は、いずれも sGFP 遺伝子を有する組換え体であることが確認された (図 18)。個体#3 は遺伝的にヘテロな T₀ 世代から T₁ 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