

14. 大西洋サケ (*Salmo salar*) においてゲンゲ (*Macrozoarces americanus*) 不凍タンパク質 OP5a 遺伝子プロモーターにより生じる不凍タンパク質・成長ホルモン導入遺伝子の組織特異的発現 ; R. S. Hobbs, G. L. Fletcher, *Transgenic Res.* 17, 33-45 (2008)

養殖向けに遺伝的に改良された大西洋サケの品種を生み出すことを目的としたこれまでの研究により、ゲンゲの OP5a 不凍タンパク質 (AFP) 遺伝子に部分的に由来する遺伝子構築体を使用し、2 種類の遺伝子組換え大西洋サケの系統が作製された。その株のうち一つはプロモーターの 5' 領域が除去された OP5a AFP 遺伝子を使用して生成され (t-OP5a-AFP と称する)、別の株には t-OP5a-AFP 構築体のプロモーターとほとんど同一の切断された OP5a プロモーターにより作動するマスノスケの成長ホルモン cDNA で構成される成長ホルモン (GH) 導入遺伝子 (E0-1 $\alpha$ ) が含まれる。これらの導入遺伝子のプロモーター領域は類似しているため、組織特異的な発現パターンについて評価することが可能である。ノーザンブロット法および RT-PCR 法を用いて mRNA の発現について評価を行った。その結果、ほぼ全ての体組織において AFP および成長ホルモン導入遺伝子が発現したことが示され、OP5a AFP 遺伝子のプロモーター領域には組織特異的要素が欠けていることが示唆されている。ノーザン解析により、t-OP5a-AFP 遺伝子の発現は E0-1 $\alpha$  成長ホルモン導入遺伝子と比べてより顕著であることが明らかになった。成長ホルモン遺伝子導入体には脾臓組織にのみ、目に見える交雑帯が見られた。一方、AFP 遺伝子導入体の場合、血球を除く全ての組織に明確な交雑帯が見られ、心臓、肝臓、脳の組織に最も高水準の mRNA 発現が見られた。このような高水準の発現が見られたのは、t-OP5a-AFP 導入遺伝子にイントロンが存在するためと思われる。成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケは非導入大西洋サケと比較して成長が大幅に速いため、この株における成長ホルモン導入遺伝子発現の程度は低いものの、望ましい急成長の表現型を生成するには明らかに十分であった。一方、AFP 遺伝子導入大西洋サケの凍結耐性を少しでも改善するには、AFP 発現の程度は不十分であった。

15. 大西洋サケの成長ホルモン導入遺伝子のプロモーター解析 ; T. M. Butler, G. L. Fletcher, *Theriogenology* 72, 62-71 (2009)

成長ホルモン (GH) 遺伝子導入大西洋サケの株を生成するためにゲンゲ (*Macrozoarces*

*americanus*) の op5a 不凍タンパク質遺伝子プロモーターが使用され、成長速度は大幅に高まった。この大西洋サケの株におけるゲノム組み込み成長ホルモン導入遺伝子 (E0-1 $\alpha$ ) について研究した結果、2115bp プロモーターのうち最初の 1579bp が削除され、成長ホルモンのコード化領域の下流側に転写されたことが示され、切断されたプロモーターが成長ホルモン導入遺伝子を発現させる能力および転写された 5' プロモーター領域の潜在的影響について問題を投げかけている。本研究では、11 のプロモーター構築体をルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合し、それぞれ 21°C および 37°C で培養したサケおよびヒトの細胞株に移入した後、その転写能力について調査した。構築体の発現は 266bp 未満の細胞株を除く全ての細胞株と同様であり、大西洋サケの細胞における発現はヒトの細胞における発現を大幅に上回っていた。研究結果から、プロモーター内に複数部位における遺伝子発現の調節を可能にする正および負の調節領域があることが示された。プロモーターから最初の 1579bp を除去すると、完全な長さのプロモーターが示すルシフェラーゼ発現が 70% 失われ、一方ルシフェラーゼレポーター遺伝子の下流の削除された 5' プロモーター配列を連結させてもその損失の約 10% が回復するにすぎなかった。この結果は、E0-1 $\alpha$  導入遺伝子の *in vivo* 発現は、転写された 5' プロモーター領域と連結する弱い切断されたプロモーター内の構成要素により生じることを示唆している。

AquaBounty Technologies 社ホームページから

AquAdvantage® Fish

アクア・バウンティは、従来の魚よりも早く成長するように遺伝子組換えしたサーモン、トラウト、ティラピアを開発している。遺伝子組換え大西洋サケは従来のサーモンよりも 2 倍の速度で市場サイズに成長させることができる。この進歩によって養殖業者に (成長サイクルを短縮することで) 納得のいく経済的な利益をもたらすとともに、内陸での作業の採算性が向上するため、海上の養殖場に対する必要性が減じる。遺伝子組換え大西洋サケはまた繁殖不能であり、サーモン養殖場から脱出する魚を取り扱う上で最近の主要な懸念となっている、養殖魚間または天然の魚との異種交配の危険が取り除かれる。上記の成長図が示すように、遺伝子組換え大西洋サケは成長が早く、標準的サーモンよりも早く成熟した大きさに達するが、より大きく育つことはない。成熟した遺伝子組換え大西洋サケは対応する従来のサーモン

と見分けがつかない。

#### Our Technology

アクア・バウンティは生命科学を戦略とし、現在流通している製品に多様なバイオテクノロジーを用いて、主要な養殖魚の健康と生産性を改善する可能性を持っている。それらの技術とは：

- ・ 遺伝子およびタンパク質同定と解析。
- ・ 遺伝子発現の調節
- ・ 受容体の同定と遮断技術、および
- ・ 遺伝子組換え

当社はまずサーモン、トラウト、エビを重点とした最も一般的な養殖魚における深刻な生産性の制約に対処した製品を開発している。アクアドヴァンテージ®フィッシュ事業は、魚の単一の特定分子を組換えて初期段階でのより早い成長をもたらす技術に基盤を置く。これによって生産サイクルが短縮され、生産効率が増すのである。遺伝子組換え大西洋サケの場合は、これらの利点により代替生産システムを使用することが可能となり、それによって従来の大西洋サケでは経済的でなかった環境や魚の健康に関する大幅な利点が生まれている。他の研究者たちは遺伝子組換えまたは遺伝子操作をした大西洋サケを生産してきた。他の調査員によって生産された他の遺伝子組換え大西洋サケについての研究や報告書は、用いる遺伝子構成、導入の部位、あるいは制御様式が異なるため、遺伝子組換え大西洋サケには適用できない。

特に重要なことは、遺伝子組換え大西洋サケは明確に定義づけされた唯一無比の製品であるということである。徹底的に研究されてきており、またその特性も明確に確立されている。その性質や利点は、大西洋サケのゲノムの特定の安定した部位に導入された特定の遺伝子構成が安定して発現されるところに由来している。

#### よくある質問 (FAQ)

##### 遺伝子組換え大西洋サケについての質問

Q. 遺伝子組換え大西洋サケは他のサーモンよりも相当大きく育つとのことですが、交配について優位性があり、食べ物や空間について天然のサーモンを負かすことができるのですか？

A. いいえ。遺伝子組換え大西洋サケは初期の成長段階で他のサーモンよりも早く成長しますが、大西洋サケよりも大きくなるわけではありません。雄のサーモンは大きさによって交配の優位性を獲得することはありません。事実、「早熟な幼魚」（長さはたった約 15.2cm）は海に出る前の各新世代の約 5 分の 1 で父親となります。養魚場か

ら脱出したサーモンについての研究では、それらは天然の魚よりも大きいのが常ですが、天然のサーモンの 16% の頻度でしか交配に成功しないことがわかっています。養殖サーモンは他の飼育されている家畜やペットに餌を与えるのと同様の小粒のドライフードで育てられています。もし逃げ出せば、新しい餌を探すのに通常は慣れていません。ブリティッシュ・コロンビアやアラスカで捕獲される、脱出した養殖魚の 85% 以上は腹に何も食物がない状態であり、かれら自身が捕食される危険にさらされているでしょう。

Q. パデュー大学の研究者たちが、野生サーモン群は相対的に数の少ない遺伝子組換え大西洋サケによって絶滅に追いやられると報告して懸念を提起しました。これらのサーモンが天然の魚との交配に成功した場合、その新しい遺伝子は野生の遺伝子プールに「脱出」し、天然のサーモン群を改変してしまうのではないのでしょうか？

A. パデュー大学の科学者で「トロイの遺伝子仮説」を提唱したミュアーとハワードは遺伝子組換え大西洋サケを勉強していません。かれらは日本のメダカの行動に基づいた数学モデルを設計したのです。メダカは小さな淡水魚、56 日間で成熟し、死ぬまで毎日繁殖します。サーモンは 3 年、5 年、または 10 年もかけて成熟し、ほとんどは生涯で 1 度だけ子を産みます。さらにアクア・バウンティはすべての雌の遺伝子組換え大西洋サケの不妊魚のみを市場に出すように規定しています。不妊の魚は生殖不能ですから野生のサーモンに遺伝子が移行することはあり得ません。さらなる予防措置として遺伝子組換え大西洋サケは、商業的なトラウト養殖に使用されるのと同様の物理的に密閉した施設で飼育されています。このように遺伝子組換え大西洋サケは生物学的にも物理的にも幾重にも拘束された状態で飼育されており、野生種の遺伝子的多様性にネガティブな影響を与えるあらゆる潜在的危険を緩和しています。

Q. 遺伝子組換え大西洋サケは本当に不妊だと確信できますか？

A. はい。不妊魚を生産する私たちのプロセスの有効性を確認する固有のテストがあります。市場に出す魚の出荷分毎にこれらのテストを施行し、製品が規格に合っていることを確かめています。

Q. 遺伝子組換え大西洋サケは不凍化タンパク質や過剰な量の成長ホルモンを産出しますか？

A. いいえ。遺伝子組換え大西洋サケは不凍化タンパク質を産出しません。促進剤として不凍化タ

ンパク遺伝子から分子の「スイッチ」が用いられているだけです。遺伝子組換え大西洋サケは野生種の大西洋サケとまったく同じ成長ホルモンを産出し、野生種サーモンと比較してこのタンパクのレベルが増加することはありません。

#### 遺伝子組換え魚の連邦規定に関する質問

Q. 人間の食用に飼育されている遺伝子組換え魚などの海の生物に関する規定を治める連邦法はあるのでしょうか？

A. はい。遺伝子組換え大西洋サケは食品医薬品化粧品法のもとに動物用医薬品センターによって管轄されています。遡ること 1986 年、米食品医薬品局 (FDA) は、遺伝子操作や発現タンパク質は動物用医薬品製剤の治療に類似して受容する動物の「構造と機能」に影響を与えるという根拠で、遺伝子操作された動物と魚を管轄下に置くこと明示しました。FDA の管轄権は連邦裁判所によって支持されてきました。

Q. 1986 年の合衆国「調和的枠組」は、バイオテクノロジーを規制から除外しようとするレーガン政権の政治的戦略ではなかったのですか？

A. いいえそうではありません。「調和的枠組」(51 連邦規定 23303) は従来の規制権限の範囲内で先進的バイオテクノロジーによって生産された製品を除外するのではなく包含する、確固とした法令上の権限の対象範囲を明示しました。個々の製品が開発された過程ではなく、個々の製品自体がリスクと利益の根源であり、規制措置の焦点であることを認識して、「調和的枠組」は FDA、環境保護庁、農務省の既存の権限を明確にし、食品医薬品化粧品法 (FDA)、連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法および有害物質規制法 (EPA)、植物害虫防疫、植物検疫、ウィルス血清毒素法 (USDA) によって定められた権限のもとに、バイオテクノロジーで生産された植物と動物を規制することになりました。「調和的枠組」の製品重視を支える科学的根拠は 1989 年、2000 年、2002 年に全米科学アカデミーが行った 3 回の個別調査によって裏付けられました。「調和的枠組」を支える規制上の根拠は 1999 年から 2000 年にかけてクリントン政権によって調査、評価、承認されました。

Q. FDA は遺伝子組換え魚の環境への影響を評価しますか？ または FDA は遺伝子操作の過程で用いられる分子特性、薬学上の効果、または何らかの化学薬品の影響を評価することを制限していますか？ また環境リスク評価は生態系への潜在的な影響にまで及んでいますか？

A. FDA における環境リスク評価は、国家環境政策法 (NEPA) および環境問題諮問委員会 (CEQ)

(40 CFR Parts 1500 から 1508) および FDA (21 CFR Part 25) によって採択された NEPA を施行する規定によって統制されています。当機関に課せられた NEPA および CEQ の義務は、環境リスク評価の対象範囲を含めて、連邦政府全体にわたるあらゆる機関に要請されている義務と完全に同一です。新医薬品適用への対応も必要な環境リスク評価の対象範囲にある当機関の位置は 1998 年の指針に詳述されています: 「FDA は環境への害は、環境中の生命体への害毒だけでなく、害毒以外の環境への影響、例えば生態系のダイナミクスへの持続的な影響も含むと見なす。」

Q. FDA は遺伝子組換え魚の環境リスクを評価できるバイオロジー、エコロジー、環境科学の水産分野の専門家を有していますか？

A. FDA スタッフはバイオロジー、環境科学、リスク評価の分野で教育を積み、多数の環境影響評価を実施してきた専門家を有しています。各評価は、当局が承認した医薬品および食品添加物はそれらの生産、使用、廃棄の後で最終的に水界生態系に溜まるという明確な仮定に基づいてなされています。NEPA および CEQ は連邦各機関に、機関の活動が環境に与える影響評価において、他の影響のある諸機関と連携するように要請しています。

Q. 科学に立脚したリスク評価はバイオテクノロジーの環境への影響評価に適切ですか？

A. 科学に立脚したリスク評価は潜在的なハザードを同定し、起こり得るそれらのハザードの蓋然性を数値化し、有意の安全閾値について不確実性を明らかにします。閾値は通常、リスクが起こり得るレベルの 1000 倍に設定されています。この手法は完全に予防措置に適うものです。クリントン政権の前商務省次官であったデヴィッド・アーロンによれば、この科学に立脚したプロセスは「米国で開発・使用されているバイテクによる食物は『自然界の』対応物の安全性リスク以上のリスクを示すことはなく、いかなる疾患もバイテクによる食物に由来するものはなかったことを我々に示してきた。」同様に、環境への脅威—オオカバマダラの影響から先進ハイブリッドのスーパーウィードへの使用が増えている殺虫剤にいたるまで—も、適切な研究によってすべて反証されるか、あるいは適切な農業実践や規制基準によって避けられてきました。1992 年の「環境と開発に関するリオ宣言」で採択された「予防原則」では、「取り返しがつかないほど深刻な損害の脅

威が」「完全な科学的確実性」を欠く場合には、「環境劣化を防ぐために費用対効果のある手段」のみを要請しています。米国の危機管理実践はこのテストの基準を満たしています。

同社ホームページ Press Releases から

25 November 2009

Aqua Bounty Technologies, Inc. ( “Aqua Bounty” or “the Company” )

Operations Update

今年9月の中間決算では、当社は、AquAdvantage<sup>®</sup>サーモン (AAS) に対する FDA のアプリケーションのすべての残りの研究の提出を完了したこと、FDA に今年の年末までに、その内部のレビューを完了することを期待していることを報告した。かなり進展はあるが、このプロセスは来年に延長する可能性が高い。経営陣は承認が遅れているのは製品の高い新規性によるもので、規制の困難さが出現したものではないことを理解している。当社は、このプロセスは、今後数ヶ月以内に完了し、それから商業化を完了することができると確信している。FDA の承認がおり次第、野外試験を行う最初の商業規模の生産者に AAS の卵サンプルを提供するという計画が進行中である。これは 2010 年の産卵シーズンからの大規模な卵の生産によって 2011 年第 1 四半期につながっていくだろう。これとは別に、商業的市場化テストのための AAS を生産するプロジェクトが 2010 年の 3 月から 5 月の間に AAS が市場サイズに達する時に販売に向けて最初の AAS が飼育され準備する計画において進行中である。

平成 21 年度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）

第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と

リスクコミュニケーションに関する研究

分担研究報告書（平成 21 年度）

#### （iv）遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究

研究分担者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

##### 研究要旨

平成 21 年度は、より高度な遺伝子組換え動物の検知技術を構築するために、食品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変ニワトリを対象として、モデル遺伝子組換えベクターの構築とモデル胚性幹細胞（ES 細胞）の樹立研究を行った。モデル遺伝子組換えベクターは、Cre-loxP のシステムを用いて、緑色蛍光タンパク質遺伝子（*GFP*）とピューロマイシン耐性遺伝子（*Puro<sup>r</sup>*）を loxP 配列で挟み込んだベクターを構築した。これらの遺伝子は、ES 細胞の選抜の際に機能するが、Cre リコンビナーゼを作用させることで、ゲノムから排除され loxP の配列がゲノムに残ることとなる。構築したベクターは、遺伝子レベルで Cre リコンビナーゼの作用により *GFP* と *Puro<sup>r</sup>* が切出されることを確認した。またノックインで ES 細胞へ挿入したこれらの遺伝子が、ゲノムレベルで Cre リコンビナーゼの作用により切出されることもわかった。以上のように、平成 21 年度に計画したモデル遺伝子組換えベクターの構築とモデル ES 細胞の樹立をすべて終了した。

##### 研究協力者

堀内浩幸（国立大学法人広島大学・大学院生物圏  
科学研究科 助教）

手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

##### A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方遺伝子組換え動物では、水域における魚類において流通の許可待ちの段階まできており、その対策が急がれている。陸域の遺伝子組換え動物は、現在、研究段階であるものが多いが、技術的な開発は既に完成の域に達しており、今後 10 年以内には、遺伝子組換え動物の産物が食品として流通す

ることが予想される。既に医薬品では、EU において遺伝子組換えヤギにより作製されたトロンビン（血液凝固因子）が認可を受けている。また近年の各種動物の多能性幹細胞研究の進展から単純なトランスジェニック動物の作出だけでなく、より高度な遺伝子組換え（ノックインやノックアウト）動物の作出も可能になりつつある。例えばニワトリでは、鶏卵成分を一部改変したようなニワトリが誕生しつつある。単純なトランスジェニック動物であれば、導入された外来遺伝子を標的に遺伝子組換え動物の産物か否かを簡便に検出可能である。しかし、多能性幹細胞を用いた高度な遺伝子組換え動物では、組み込まれた外来遺伝子を排除できるシステムの導入が可能であり、食品などへの応用を考えた場合、このシステムが利用されることが予想される。このシステムの一つ

が Cre-loxP のシステムであり、排除したいマーカー遺伝子などを *loxP* の配列で挟み込んでおき、後に不要となったマーカー遺伝子は、Cre リコンビナーゼの作用により切り出しできるシステムである。この場合、遺伝子組換え動物か否かを検知するには、その標的外来遺伝子は、60 bp 程度の残存する *loxP* 配列かもしくは、ゲノムに組み込まれている Cre リコンビナーゼの配列となる。ただし、Cre リコンビナーゼはゲノムに組み込まれなくても細胞に作用させることが可能であり、確実に遺伝子組換え動物か否かを検知するには、残存する *loxP* 配列を検知する必要がある。

そこで本研究では、高度な遺伝子組換え動物の検知技術を構築することを目的に、Cre-loxP のシステムによるモデル遺伝子組換えベクターの構築とモデル ES 細胞の樹立を行った。

## B. 研究方法と結果

### 1) モデル遺伝子組換えベクターの構築

モデル遺伝子組換えベクターの構成図を図 1 に示した。基本ベクターには、pCAG-IRES-EGFP を用い、このベクターから CAG プロモーター配列、EGFP 配列、IRES 配列、*Puro<sup>r</sup>* の配列を取り出し、その 5' 末端と 3' 末端にニワトリのオボムコイド遺伝子配列もしくは  $\delta 1$  クリスタリン配列を付加したものを準備した (pEIP)。さらにニワトリのゲノム配列と CAG および *Puro<sup>r</sup>* の間に *loxP* 配列を付加し、Cre リコンビナーゼの作用により、CAG から *Puro<sup>r</sup>* までの配列が除去できるベクターを構築した (pFloxEIP) (図 1)。

### 2) モデル遺伝子組換えベクターの機能試験

構築した pFloxEIP ベクターから、Cre リコンビナーゼの作用により標的配列が除去できることを

確認するために、大腸菌より調整した pFloxEIP ベクターに直接 Cre リコンビナーゼを作用させた。対象には *loxP* 配列を付加していない pEIP と Cre リコンビナーゼに添付の *loxP* control DNA を用いた。500 ng の各ベクターに 5 U の Cre リコンビナーゼを添加し、37°C で 1 時間反応させ、アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色により標的配列の切り出しの有無を確認したところ、図 2 に示したように、わずかであるが pFloxEIP と *loxP* control DNA で目的に長さの断片を確認することができた。その後、文献や他の同様のプロトコルの調査から、本手技においてアガロース電気泳動による断片の確認は非常に困難であることが判明し、他の検出系による確認が必要であることがわかった。

そこで次に、PCR を用いた簡便な検出系の構築を行った。これは切出される配列中にある CAG の配列が極端な GC リッチな配列であることを利用した手法である。図 3 にその手法の概要を示した。ニワトリのゲノム上の配列に F プライマーと R1 プライマーを設定し、pFloxEIP を鋳型に PCR を行う。通常の PCR であれば F プライマーと R1 プライマー間の配列が増幅されるのが一般的であるが、この間にある CAG 配列のために PCR での増幅がおきない。しかし pFloxEIP に Cre リコンビナーゼを作用させ、CAG 配列を含む領域が除去されていれば、F プライマーと R1 プライマー間の配列が増幅されるという手法である。図 2 で使用した Cre リコンビナーゼを作用させた pFloxEIP と作用させていない pFloxEIP を鋳型に、この PCR を行ったところ、予想通り Cre リコンビナーゼを作用させた鋳型では、目的の長さの増幅断片が検出されたが、作用させていない鋳型では、全く増幅断片の検出は認められず、構築したベクターがモデル遺伝子

組換えベクターとして機能することがわかった（図4）。

### 3) モデル ES 細胞の樹立

構築した pFloxEIP ベクターは、相同遺伝子組換えにより ES 細胞へ導入した。直鎖化した pFloxEIP をエレクトロポレーション法により ES 細胞へ導入し、ピューロマイシンを添加して ES 細胞の選抜を行った。選抜した ES 細胞は、EGFP の蛍光をもとに選抜の可否を判断し、また PCR を用いて相同遺伝子組換え細胞の有無をチェックした（結果は示していない）。相同遺伝子組換え細胞が確認された細胞集団は、限界希釈法による細胞クローニングを実施した。得られた細胞クローンは、最終的に PCR とサザンブロット法により相同遺伝子組換えの可否をチェックし（結果は示していない）、pFloxEIP が 1 コピー挿入されたモデル ES 細胞を樹立した（図5）。

### 4) モデル ES 細胞ゲノムを用いた標的遺伝子の除去

3) で樹立したモデル ES 細胞からゲノムを抽出し、Cre リコンビナーゼの作用により標的遺伝子の除去が可能かどうかを試験した。方法は、2) の図3と同様に、ES 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型に F プライマーと R1 プライマーによる PCR で行い、PCR の増幅が確認できれば標的遺伝子が除去されたものと判断した。また陽性対象として F プライマー近傍のニワトリゲノム領域に R2 プライマーを設計した。その結果、図6に示したように Cre リコンビナーゼを作用させて 15, 30, 60 分後に PCR を行った場合、その反応時間の長さに依存して、PCR の増幅が強くなることを確認された。この結果は、ES 細胞のゲノムに挿入された pFloxEIP も

また、Cre リコンビナーゼにより標的遺伝子の除去が可能であることを示している。

### 4) モデル ES 細胞からの標的遺伝子の除去

培養中のモデル ES 細胞から、Cre リコンビナーゼの作用により標的遺伝子の除去が可能かどうかを試験した。モデル ES 細胞に、ドラッグデリバリーシステムにより、Cre リコンビナーゼを細胞内に導入し、EGFP を含む標的遺伝子が除去され、最終的に EGFP の発現が消失するかどうかを確認した。対照には、pEIP を導入した ES 細胞を用い、Nacalai Tesque のシステムにより、10, 50, 100 U の Cre リコンビナーゼを導入した。導入後、ES 細胞の継代後に EGFP の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、図7に示したように 50 U の Cre リコンビナーゼを作用させた ES 細胞において若干の蛍光の減退が認められたが、3 継代以降も観察が続けたが明瞭な蛍光の減退は観察されなかった。また 100 U を作用させたものでは、対照も含めて 1 継代目に細胞が死滅してしまった。本実験からは、モデル ES 細胞からの標的遺伝子の除去は確認できなかった。

### （倫理面への配慮）

本研究で実施している組換え DNA 実験は、我が国が定める「生物の多様性確保に関する法律」を順守し、協力研究者が研究を実施する広島大学において規定されている「広島大学組換え DNA 実験安全管理規則」に従い適正に研究計画を立案し、機関承認を得ている。また実験動物の使用に関しては、同じく同機関が定める「広島大学動物実験実施規則」に従い研究計画書（承認番号 C09-1）を提出するとともに、本実施規則に従い適切に実験動物を使用している。

### C. 考察

動植物における遺伝子組換え技術は、年々高度化が進み、単純に遺伝子を強制発現させるだけではなく、いわゆる遺伝子改変マウスと同様にノックインやノックアウトが可能になりつつある。この技術では、生物のゲノムの一塩基から変異導入が可能であり、そのため遺伝子改変を検知する技術も高度化させる必要がある。現在のところ動物において、この技術が適応可能なのは、多能性幹細胞が樹立されている動物種に限られているが、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の樹立方法が構築されたことから、今後益々適応可能な動物種が増加することが予想される。いずれにしろ、多能性幹細胞を標的に遺伝子改変を行うには、培養細胞の選抜が必要であり、そのためには薬剤耐性遺伝子を多能性幹細胞に導入しなければならないため、この薬剤耐性遺伝子を標的に検出系が構築できる。しかし遺伝子改変動物やその生産物を食品へ利用するには薬剤耐性遺伝子などの外来遺伝子は不要であり、またその除去が必要であり、Cre-loxPのシステムが適応されるものと考えられる。この場合、薬剤耐性遺伝子はゲノム中から排除されるため、ゲノムに挿入されたCreリコンビナーゼ遺伝子か、排除後に残るloxP配列が標的となる。さらに選抜後に一過的発現によりCreリコンビナーゼを作用させる方法では、ゲノム中にCreリコンビナーゼ遺伝子は挿入されないため、loxP配列のみが標的となることも予想される。本研究では、このloxP配列のみを標的とした遺伝子組換え動物もしくはその産物の検知系を構築することを目的に、平成21年度にはニワトリES細胞を用いてモデル系の作出を行った。

標的遺伝子には、CAGプロモーター制御下でEGFPとPuro<sup>r</sup>が発現するカセットをloxP配列で挟み込んだものを準備した。作製したモデル遺伝子組換えベクターは、ベクター単独およびES細胞のゲノムに挿入された後もCreリコンビナーゼにより標的遺伝子が切出されることがわかり、想定したモデルベクターとして機能することが確認できた（図4、6）。一方、モデルES細胞を培養したまま、Creリコンビナーゼをドラッグデリバリーシステムで導入し、標的遺伝子の除去を試みたが、EGFPの発現をもとにした観察ではその除去を明瞭に確認することができなかった。これはドラッグデリバリーシステムでは、効率良くCreリコンビナーゼが細胞内に導入できていないのか、もしくは切出された標的遺伝子が環状となり、細胞内で安定して遺伝子の発現を続けていることなどが予想された。今後はCreリコンビナーゼを一過的に強制発現できるようなベクターを用いて再試験することや検出方法をEGFPの発現ではなく、図3と同様のゲノムPCRで行うなどの手法の改善が必要であろう。

今後は、loxP配列がゲノム中に1コピーだけ残されたES細胞を樹立し、その検出系の構築、さらにこのES細胞からキメラ胚やキメラニワトリを作出し、loxPの検出系の精度や簡便化などを計らなければならないと考えている。

### D. 結論

平成21年度は、高度な遺伝子組換え技術により作製された遺伝子組換え動物から、外来遺伝子として残存するloxP配列を検出することを目的として、そのモデル遺伝子組換えベクターとモデルES細胞の樹立を行い、年度内に計画したほぼすべての内容を実施期間中に終了させた。今後は



考察で述べたいいくつかの問題点を解決するとともに、実際に短い断片として残存する *loxP* 配列を感度良くかつ簡便に検出する手法を構築していきたいと考えている。

3. その他  
なし

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 堀内浩幸, 江崎僚, アレルギーフリーの卵開発は可能か, 養鶏の友 575: 29-31 (2010).
- 2) 堀内浩幸, アレルギーフリーのたまご開発が可能か, 鶏の研究 (臨時増刊) 5: 5-7 (2010).
- 3) Fukushima, Y., Sato, M., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H. Construction of an insertion vector for gene targeting of chicken lens-specific gene. *J. Poult. Sci.*, 47 (2) (2010) (in press).
- 4) 堀内浩幸, 有澤謙二郎, ニワトリの万能細胞 “ES 細胞” とその遺伝子組換え, 化学と生物 48 (4): 237- 242 (2010).

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

- 1) 鳥類を標的とする遺伝子置換ベクター、およびその利用 (特許 4273230, 国内)

### 2. 実用新案登録

なし

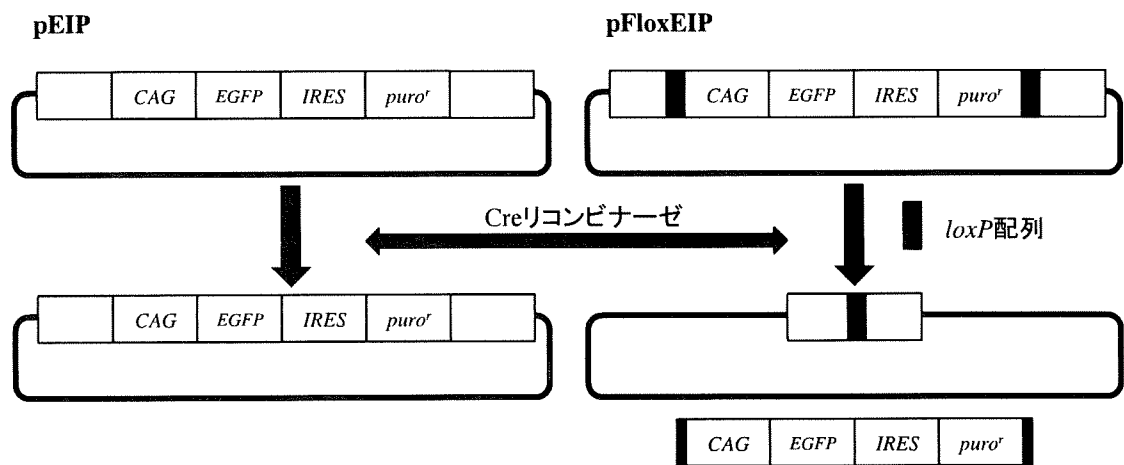


図1 構築したモデルベクターとCreリコンビナーゼの作用

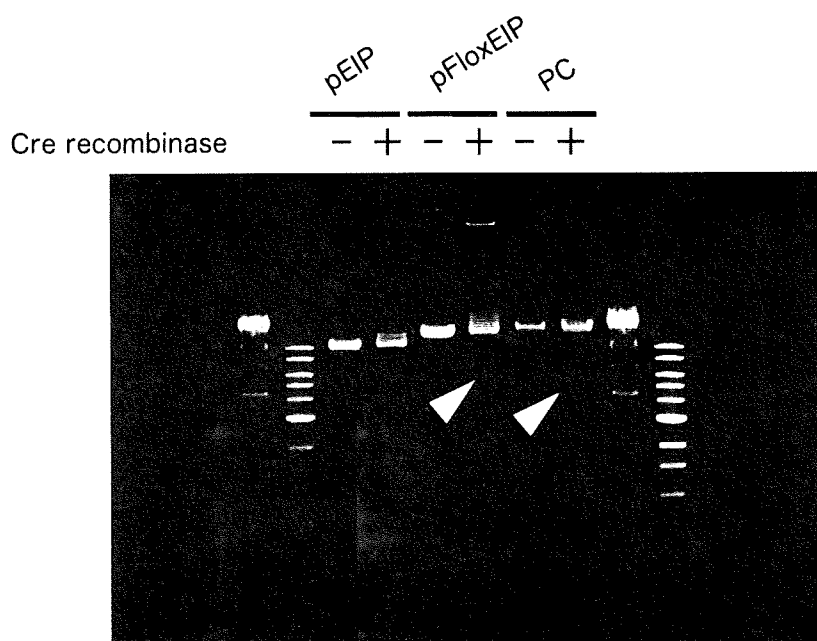


図2 モデルベクターからのCreリコンビナーゼによる標的遺伝子の除去

PC: loxP control DNA  
 矢頭: 切出されたバンドの位置

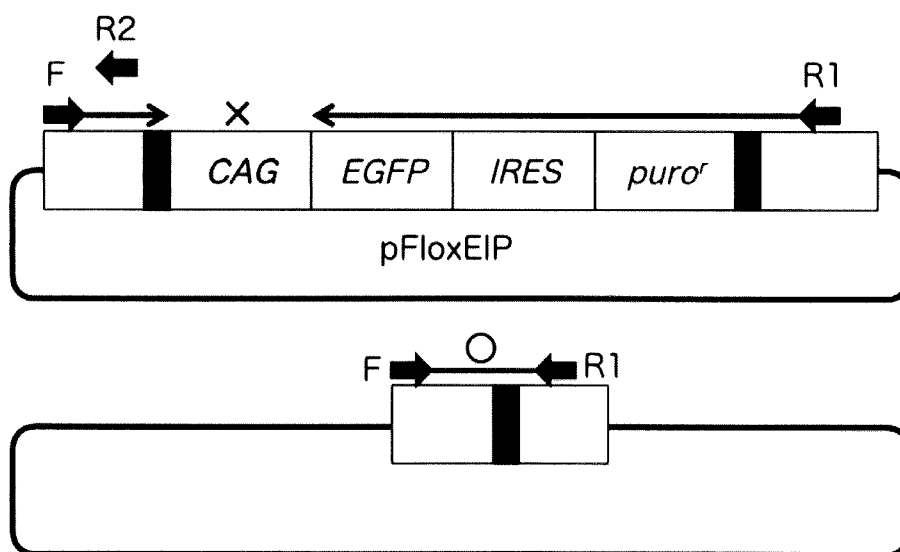


図3 pFloxEIPから標的遺伝子が除去されたことを確認する方法

pFloxEIPのままFとR1プライマー間でのPCRの増幅が、CAGの配列により阻害され、増幅がかからない(上)。これに対してCreリコンビナーゼにより標的遺伝子が除去されていれば、プライマー間でPCRの増幅断片を得ることができる(下)。

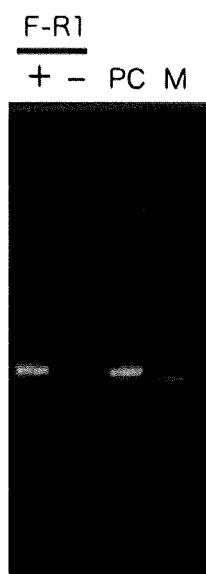


図4 pFloxEIPから標的遺伝子が除去されたことの確認

図3の手法に従ってPCRを行った。Creリコンビナーゼを作用させた方(+)では、目的の増幅断片が認められ、作用させていない方(-)では認められていない。PCは、もともと標的遺伝子を含まないゲノムDNAを鋳型にしたもの。Mは1 kbpラダーマーカー。

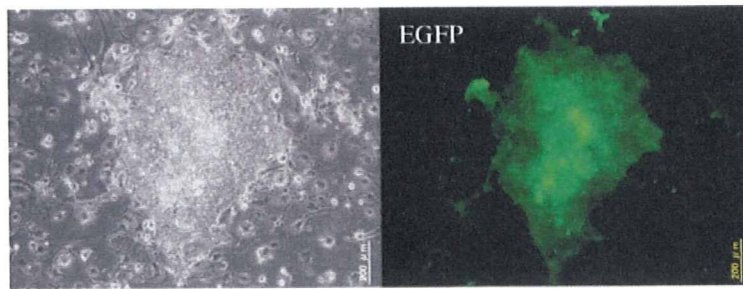


図5 樹立したモデルES細胞

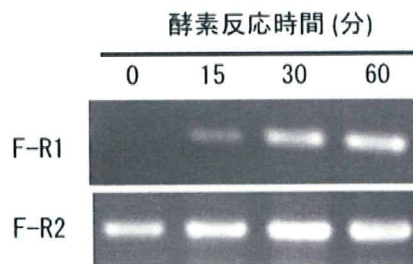


図6 モデルES細胞ゲノムを用いた標的遺伝子の除去

モデルES細胞からゲノムDNAを抽出し、Creリコンビナーゼを0-60分間反応させたDNAを鋳型に図3と同様のPCRを行った。反応時間依存的にF-R1プライマー対での増幅断片が増加し、標的遺伝子が除去されていることがわかる。



図7 モデルES細胞からの標的遺伝子の除去

モデルES細胞ドラッグデリバリーシステムでCreリコンビナーゼを作用させ、継代毎にEGFPの発現を観察した。標的遺伝子の削除による完全なEGFPの発現の消失は認められなかった。

平成 21 年度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）

第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と

リスクコミュニケーションに関する研究

分担研究報告書（平成 21 年度）

## （v）薬用GM植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究

研究分担者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

### 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、その開発及び生産に関する情報を環境浄化目的の植物に関する情報とともに収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能性食品・嗜好品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化の 8 種類を設定し、一覧表を作成した。2009 年に公表・出版された論文等 73 件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：26 件、経口ワクチン：11 件、食用医薬：6 件、ワクチン抗原：5 件、抗体医薬：5 件、治療薬：12 件、診断薬・試薬：3 件、環境浄化：5 件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、2009 年の国別の件数は、日本：29 件、米国：15 件に次ぎ、中国：10 件、韓国 7 件であった。

### 研究協力者

吉松嘉代（独立行政法人医薬基盤所薬用植物資源  
研究センター筑波研究部）

に関する情報を収集整理し、開発企業等の現状を調査するとともに、カテゴリー別の分類を行い、食品の安全性評価基準作成の一助とする。

### A. 研究目的

最近活発に研究開発が進んでいる高栄養、高機能食品または医薬品類を生産する遺伝子組換え植物（薬用 GM 植物）は、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃場栽培も行われている。このような意図的に特定成分を生産・蓄積させた、あるいは医薬品類を生産する薬用 GM 植物が誤って食用作物に混入し、一般の食品として摂取された場合、生産物の種類によっては健康へ影響を及ぼす恐れがある。従って、以上のような意図的に成分を変化させた作物や医薬品類を生産する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。本研究では、薬用 GM 植物の開発・生産・商品化

### B. 研究方法

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。前年度に引き続き、薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を文献データベース（Entrez PubMed、Chemical Abstracts）、インターネット検索（Google）、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、分類した。

(倫理面への配慮)

本研究は、論文、学会講演要旨集、文献データベース、インターネット検索等の公表された文字データを利用するものであるため、倫理上の問題はない。

## 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<sup>1)</sup>

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(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社の組換えベニバナ、Iowa State Universityの組換えトウモロコシ、University of Washingtonの組換えハコヤナギ属植物の作付けが行われた(表3)。2007年は、10社からの15件の申請のうち、9件の作付けが行われた(表4)。

2. 2009年月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等

文献情報(SciFinder)で「transgenic plant」をキーワードに抽出された2009年の情報、2009年に国内で開催された日本農芸化学会2009年度大会(福岡)講演要旨集、第27回日本植物細胞分子生物学会(藤沢)大会・シンポジウム講演要旨集及び第27回バイオテクノロジーシンポジウム(植物利用物質生産/糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索/AD総合診断体系実用化)予稿集(主催:バイオテクノロジー開発技術研究組合)から、薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を収集したところ、73件の情報が得られた。それらをカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品:126件、経口ワクチン:11件、食用医薬:6件、ワクチン抗原:5件、抗体医薬:5

件、治療薬：12件、診断薬・試薬：3件、環境浄化：5件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた（表5）。

### 2-1. 機能性食品

機能性食品・嗜好品に関する論文等<sup>2-27)</sup>を表6に示した。26件のうち、遺伝子導入による機能性タンパク質の生産例は、高含硫アミノ酸貯蔵蛋白質を蓄積するダイズ<sup>17)</sup>、味覚修飾蛋白質ミラクリンを生産するトマト<sup>22)</sup>及び同蛋白質を生産するレタス<sup>26)</sup>の3件である。その他は代謝酵素遺伝子（または代謝酵素抑制遺伝子）導入による新規機能性成分の生産あるいは既存機能性成分の含量改変（増加または低下）である。その中で最も件数が多いのが、ビタミンE生産に関するもの<sup>7, 9, 10, 11, 12, 13, 20)</sup>7件、次いで脂肪酸組成や改変に関するもの<sup>6, 8, 15, 19)</sup>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<sup>16, 21, 23, 24)</sup>がそれぞれ4件であった。その他、デンプンの改変に関するもの<sup>2, 3)</sup>、ゴマリグナン生産に関するもの及びフラボノイド生産に関するもの<sup>18, 25)</sup>がそれぞれ2件ずつで、窒素含量の増加1件<sup>4)</sup>、リン酸の改変1件<sup>5)</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>28-38)</sup>を表7に示した。

11件のうち、日本及び米国での開発例が最も多くそれぞれ4件、次いで韓国2件、スウェーデン1件であった。使用された作物はジャガイモが最も多く4件、次いでイネ3件、ニンジン2件、レタス1件であり、植物種不明が1件であった。11件のうち、3件にコレラトキシンBサブユニット遺伝子の導入が認められた。コレラトキシンBサブユニットは、それ単独でも経口ワクチンとしての開発が行われている<sup>28, 29, 37)</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、インフルエンザ抗原とともに発現させる研究が行われている<sup>29)</sup>。

### 2-3. 食用医薬

食用医薬に関する論文等を表8に示した<sup>39-44)</sup>。食用医薬に関しては、国内研究の6件で、うち3件はイネを用いた研究例であった<sup>40, 41, 42)</sup>。その他の作物は、イチゴ、ダイズ及びレタスがそれぞれ1件ずつであった。2009年に報告された花粉症緩和米<sup>41)</sup>では、花粉症に対する免疫寛容の效果的誘導のため、T-細胞エピトープをコレラトキシンBサブユニットとの融合蛋白質として発現させており、マウスでの実験で効率の良い免疫寛容誘導が確認されている。

### 2-4. ワクチン抗原

ワクチン抗原に関する論文等を表9に示した<sup>45-49)</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、5件中3件がタバコを用いた例であった<sup>47, 48, 49)</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>48)</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>47, 49)</sup>。

### 2-5. 抗体医薬

抗体医薬に関する論文等を表10に示した<sup>50-54)</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、5件中2件はタバコ<sup>50, 54)</sup>、1件はウキクサ<sup>51)</sup>を用いた研究例であった。宿主植物由来の不純物の存在は、抗体医薬の有効性・安全性に大きく関わってくると考えられている。抗体医薬に関する論文等5件のうち、3件は宿主植物からの抗体分子の精製に関するものであった<sup>51, 52, 53)</sup>。

## 2-6. 治療薬

治療薬に関する論文等を表 11 に示した<sup>55-65)</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 12 件のうち 5 件でタバコが用いられ<sup>61, 62, 63, 63, 64, 65)</sup>、3 件でゼニゴケ<sup>58, 59, 60)</sup>が用いられている。前項と同様、ウイルスベクター<sup>61)</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表 12 に示した<sup>67-69)</sup>。2009 年は組換え植物で生産された $\alpha$ -アミラーゼ、プロテアーゼ阻害蛋白質、ウシアプロチニンの 3 件がこのカテゴリーに属すると思われた。

## 2-8. 環境浄化

環境浄化に関する論文等を表 13 に示した<sup>70-74)</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。5 件の研究例のうち、3 件はイネが使用されていた<sup>70, 71, 72)</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

2009 年に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等の件数を国別に集計した結果を表 14 に示した。国別では日本の件数が最も多く 29 件であり、次いで米国 15 件、中国 10 件、韓国 7 件であった。

## D. 考察

2009 年に公表・出版された論文等 73 件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：26 件、経口ワクチン：11 件、食用医薬：6 件、ワクチン抗原：5 件、抗体医薬：5 件、治療薬：12

件、診断薬・試薬：3 件、環境浄化：5 件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。機能性食品、経口ワクチン及び食用医薬は、宿主植物として食用作物が多く使用されることから、今後も注視する必要があると思われる。また、抗体医薬、治療薬、試薬・診断薬及び環境浄化でも、トマト、ジャガイモ、ニンジン、イネ等の食用作物が使用されていた。これらの作物は、さまざまな用途で使用されているため、今後も注視要すると思われる。

2009 年の国別の件数は、日本：29 件、米国：15 件に次ぎ、中国：10 件、韓国 7 件であった。国内の開発状況は学会講演要旨等の情報が得られやすく、比較的多数の情報が収集できた。しかしながら、その他の外国の情報は、インターネット及び SciFinder による文献検索に限られてしまうため、最新情報を得るのは困難である。それにも関わらず、中国及び韓国の件数が多かったことは、実際にはより多くの研究が活発に行われていることを示唆している。

## E. 結論

遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を環境浄化目的の植物に関する情報とともに収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能性食品・嗜好品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化の 8 種類を設定し、一覧表を作成した。2009 年に公表・出版された論文等 73 件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：26 件、経口ワクチン：11 件、食用医薬：6 件、ワクチン抗原：5 件、抗体医薬：5 件、治療薬：12 件、診断薬・試薬：3 件、環境浄化：5 件であり、特に機能性食品・嗜好品、治療薬及び経口ワクチン



の開発が盛んである状況が伺えた。また、2009年の国別の件数は、日本：29件、米国：15件に次ぎ、中国：10件、韓国7件であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

(特許出願)

なし

#### 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

#### I. 参考文献・インターネットホームページ

1. Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Protein for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of Jan. 6, 2010, [http://www.aphis.usda.gov/brs/ph\\_permits.html](http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html)

2. Cheng, Beijiu; Zhang, Jian; Jiang, Haiyang; Xia, Mian; Zhu, Suwen; Wang, Jieming. Method for increasing amylose content in *Oryza sativa* seeds via RNA interference of starch synthesis enzyme gene RBE3. *Faming*

Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 12pp. CODEN: CNXXEV CN 101519660 A 20090902 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10029257 20090403. Priority: CAN 151:374849 AN 2009:1086688 Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101519660 A 20090902 CN 2009-10029257 20090403 Priority Application CN 2009-10029257 20090403

3. 阿部克、関川晶子、小澤由美、藤田直子、三ツ井敏明、大坪研一、伊藤紀美子、岸根雅宏、「高アミロース米の研究」、日本農芸化学会2009年度大会(福岡)講演要旨集 p. 314(3P1186B), 2009. 3. 29.

4. Dhugga, Kanwarpal S.; Appenzeller, Laura M.; Gupta, Rajeev; Abbaraju, Hari Kishan Rao. Vegetative storage protein-type lipooxygenase 6 of maize for increasing the nitrogen storage capacity of a transgenic plant. U.S. Pat. Appl. Publ. (2009), 64pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 611,911. CODEN: USXXCO US 2009094712 A1 20090409 Patent written in English. Application: US 2008-258478 20081027. Priority: US 2005-751871 20051220; US 2006-611911 20061218. CAN 150:415132 AN 2009:421106

5. Yu, Su-May; Hong, Ya-Fang. Transgenic plants expressing a bacterial phytase gene from a tuber-specific promoter for use in animal feed. U.S. Pat. Appl. Publ. (2009), 23pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 989719. Abandoned. CODEN: USXXCO US 2009092703 A1 20090409 Patent written in English. Application: US 2008-55502 20080326. Priority: US 2002-97896 20020313; US 2004-989719 20041115. CAN 150:397320 AN 2009:425861

6. Zuo, Jianru; Mou, Jinye; Wang, Xingchun;

- Teng, Chong; Tan, Helin. Plant (un)saturated fatty acid and oil metabolism-associated transcription factor, its coding gene and application in preparation of transgenic plants. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 19pp. CODEN: CNXXEV CN 101597329 A 20091209 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10114531 20080606. Priority: AN 2009:1552227 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101597329 A 20091209 CN 2008-10114531 20080606 Priority Application CN 2008-10114531 20080606
7. Tang, Kexuan; Ren, Weiwei; Tang, Yueli. Nucleotide sequence encoding peptide with HPT protein activity of *Lactuca sativa*. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 16pp. CODEN: CNXXEV CN 101586110 A 20091125 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10203447 20081127. Priority: AN 2009:1477796 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101586110 A 20091125 CN 2008-10203447 20081127 Priority Application CN 2008-10203447 20081127
8. Hartnell, Gary F.; Ursin, Virginia M.; Lucas, Don. Methods of feeding pigs and products comprising beneficial fatty acids. PCT Int. Appl. (2009), 44pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009097403 A1 20090806 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW RW: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG, BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW, AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM US 20090196950 A1 20090806 US 2009-362102 20090129 Priority Application US 2008-62785P P 20080129
9. Chen, Xiwen; Zhang, Ming; Chen, Defu. Sequences of *Arabidopsis* seed-specific promoter FAE1 suitable for vitamin E metabolism engineering. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 10pp. CODEN: CNXXEV CN 101429509 A 20090513 Patent written in Chinese. Application: CN
- OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2009-US32396 20090129. Priority: US 2008-62785 20080129. CAN 151:219464 AN 2009:950988 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date WO 2009097403 A1 20090806 WO 2009-US32396 20090129 W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW RW: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG, BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW, AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM US 20090196950 A1 20090806 US 2009-362102 20090129 Priority Application US 2008-62785P P 20080129

- 2008-10152751 20081031. Priority: CAN 151:2171 AN 2009:592768
10. Meyer, Knut. Altering  $\alpha$  - and  $\beta$  -tocotrienol content using multiple transgenes in transgenic plants. PCT Int. Appl. (2009), 149pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009046006 A1 20090409 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2008-US78269 20080930. Priority: US 2007-977495 20071004. CAN 150:415134 AN 2009:425818
11. Tang, Yueli; Tang, Kexuan; Ren, Weiwei. Cloning of phytol kinase gene of *Lactuca sativa*. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 12pp. CODEN: CNXXEV CN 101514345 A 20090826 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10046352 20090219. Priority: CAN 151:329947 AN 2009:1054910 Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101514345 A 20090826 CN 2009-10046352 20090219 Priority Application CN 2009-10046352 20090219
12. Tang, Yueli; Tang, Kexuan; Ren, Weiwei; Wang, Yueyue. Protein and cDNA sequences of *Lactuca sativa*  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase and its uses in increasing vitamin E in transgenic plants. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 12pp. CODEN: CNXXEV CN 101514346 A 20090826 Patent written in Chinese. Application: CN 2009-10046353 20090219. Priority: CAN 151:374874 AN 2009:1054802 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101514346 A 20090826 CN 2009-10046353 20090219 Priority Application CN 2009-10046353 20090219
13. Tang, Kexuan; Ren, Weiwei; Tang, Yueli. Nucleotide sequence coding peptide with *lactuca sativa* hppd protein activity. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2009), 16pp. CODEN: CNXXEV CN 101586108 A 20091125 Patent written in Chinese. Application: CN 2008-10203446 20081127. Priority: AN 2009:1480048 Patent Family Information Patent No. Kind Date Application No. Date CN 101586108 A 20091125 CN 2008-10203446 20081127 Priority Application CN 2008-10203446 20081127
14. 岡澤敦司, 堀遂人, 橋爪祥輝, 畑直樹, 馬場健史, 福崎英一郎, 小埜栄一郎, 佐竹炎, 小林昭雄, 「植物工場でのフロフラン型リグナン生産に資するシロイヌナズナ形質転換体のリグナンプロファイリング, 第27回日本植物細胞分子生物学会(藤沢)大会シンポジウム (2009.7.30-31) 講演要旨集 p. 129 (2Ca-15)
15. Seo, Mi Jeong; Ko, Yeong Sam; Jung, Jeong Han; Kim, Mi Jeong. Expressing *Perilla frutescens* microsomal linoleic acid desaturase in *Arabidopsis* for regulation of fatty acid composition in seeds. Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2009), 22pp. CODEN: KRXXA7 KR 2009028284 A 20090318

- Patent written in Korean. Application: KR 2007-93768 20070914. Priority: CAN 150:415127 AN 2009:347989
16. 原田尚志、藤澤雅樹、寺本真紀、櫻井望、鈴木秀幸、大山莞爾、柴田大輔、三沢典彦、「シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いたアスタキサンチン合成関連鍵遺伝子と代謝物の解析」、第 27 回日本植物細胞分子生物学会（藤沢）大会シンポジウム（2009. 7. 30-31）講演要旨集 p. 155 (2Ea-10)
  17. Zhai, Hong; Bai, Xi; Zhu, Yanming; Chen, Xiuhua. Protokaryotic expression of SCMRP gene and preparation of polyclonal antibody. Dongbei Nongye Daxue Xuebao (2009), 40(7), 60-65.
  18. 山田哲也、松田史生、斎藤和季、新井麻衣子、渡辺啓史、原田久也、喜多村啓介、「アグロバクテリウムを介したダイズ形質転換系の確立とその利用」、第 27 回日本植物細胞分子生物学会（藤沢）大会シンポジウム（2009. 7. 30-31）講演要旨集 p. 151 (2Ea-06)
  19. Wang, Qi; Dubois, Patrice. Regulatory elements identified from the soybean 7s-alpha (beta-conglycinin) gene for expressing transgenes in plants. U. S. Pat. Appl. Publ. (2009), 26pp. CODEN: USXXCO US 2009064378 A1 20090305 Patent written in English. Application: US 2008-197137 20080822. Priority: US 2007-969515 20070831. CAN 150:276394 AN 2009:270645
  20. 吉村佐保子、田部記章、藪田行哲、田茂井政宏、重岡成、「葉緑体形質転換技術による $\alpha$ -トコフェロール高含有植物の作出」、日本農芸化学会 2009 年度大会（福岡）講演要旨集 p. 314(3P1188B), 2009. 3. 29.
  21. Shaista Naqvia, Changfu Zhu, Gemma Farre, Koreen Ramessar, Ludovic Bassie, Jürgen Breitenbach, Dario Perez Conesa, Gaspar Ros, Gerhard Sandmann, Teresa Capell, and Paul Christou. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. PNAS, 106:7762-7767 (2009)
  22. 黒田浩文、市川尚斉、西崎修代、菊崎綾子、高根健一、棚瀬京子、平井正良、加藤一幾、Kim You-Wang, Narendra Duhita, 矢野めぐむ、溝口剛、福田直也、宮崎均、吉田滋樹、江面浩、角田英男、池上雄二、「組換えトマトを利用したミラクリン製造」、第 27 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD 総合診断体系実用化, 2009. 11. 5, 0-11, p. 35-38.
  23. 三沢典彦、藤澤雅樹、原田尚志、瀧田英司、櫻井望、鈴木秀幸、柴田大輔、大山莞爾、「有用カロテノイド生産のための油量作物の代謝工学」、日本農芸化学会 2009 年度大会（福岡）講演要旨集 p. 315(3P1195A), 2009. 3. 29.
  24. 藤澤雅樹、原田尚志、三沢典彦、瀧田英司、櫻井望、鈴木秀幸、柴田大輔、「カロテノイド生産制御技術の開発」、第 27 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD 総合診断体系実用化, 2009. 11. 5, 1-9, p. 55-56.
  25. 矢崎一史、「有用成分を高効率・高生産する組換え植物作出技術の研究開発（その 1）プレニルトランスフェラーゼ遺伝子を利用した植物代謝工学技術の開発」、第 27 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD 総合診断体系実用化, 2009. 11. 5, 2-11, p. 93-94.
  26. Shohael Abdullah, Kim You-Wang, 矢野めぐむ、平井正良、江面浩、「ユビキチンプロモー