

201033029A

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

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の
食品への混入危害防止のための検知法開発に関する研究

平成22年度総括・分担研究報告書

(H22 - 食品 - 一般 - 001)

研究代表者 穉山 浩

平成23年5月

目 次

I. 総括研究報告書

非食用バイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止のための検知法 開発に関する研究 穂山 浩	1
--	-------	---

II. 分担研究報告書

1. 非食用バイオテクノロジー応用生物の検知方開発に関する研究 穂山 浩	1 8
2. 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のための 検知法開発に関する研究 五十君 静信	2 5
3. 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のための 検知法開発に関する研究 小関 良宏	4 1
4. 医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究 吉松 嘉代	4 5
5. 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 中島 治	5 8

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	7 9
---------------------	-------	-----

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

平成 23 年度 総括研究報告書

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止
のための検知法開発に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
研究分担者 小関 良宏 東京農工大学大学院共生化学研究院 教授
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 室長
研究分担者 中島治 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 主任研究官

研究要旨：①非食用の GM トマトが誤ってトマト加工品に混入される可能性があり、非食用 GM トマトの混入を監視するための検査法が必要になる。そこで市販のトマト加工品を対象に、GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (CaMVP35S) を用いて調査を行った。トマト 55 検体中 2 検体より、CaMVP35S が検出された。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 検出用プライマープローブを設計し、その偽陽性 2 検体を分析したところ、CaMV が検出された。従って、CaMV の混入であると判断された。非食用バイオテクノロジーの開発状況のデータベース検索の Web 公開用ソフトを確立した。②モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法の検討では、豚肉中に混入した乳酸菌モデル組換え体を用いて具体的な探知法について検討を行った。③年々増加する多様な組換え遺伝子を検知するために、DNA チップを用いた網羅的組換え遺伝子検知法を確立するための条件検討を行った。遺伝子組換え作物によく使用される DNA 塩基配列をプローブとして固定した DNA チップを作成し、トウモロコシから抽出したゲノム DNA を蛍光色素で標識して、DNA チップでプローブ DNA とハイブリダイゼーションを行い、それらの蛍光を検出したところ、数十マイクログラムのゲノム DNA を標識することで内生の遺伝子について検出することが可能となる方法を確立した。トウモロコシ 1 粒から数十マイクログラムのゲノム DNA が抽出可能であったことから、トウモロコシ 1 粒から組換え遺伝子を網羅的に検知できる可能性が示唆された。④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。国別の件数は、日本：118 件、米国：85 件に次ぎ、中国：45 件であり、中国の研究が盛んであることが伺えた。作物別の集計では、食用作物のうち、イネ：43 件が最も多く、次いでトマト：26 件であった。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の結果から、近年各国で盛んに研究開発が進められていることが明らかになった医療用ワクチン生産等を目的とした非食用遺伝子組換え植物の検知法開発を目的とし、検知操作において陽性対照となるモデル組換え植物の入手、または作出を行った。⑤非食用バイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタの文献調査を行ってそれらの開発状況を調べた。特に魚については多数の論文が発表されていた。ニワトリについては複数の研究室で多能性幹細胞を利用した新しい遺伝子導入が試みられている。ブタについては臓器移植、遺伝子導入法の改良、その他の目的で多くの論文が報告されている。近年開発されるバイオテクノロジー応用魚や動物では Cre / LoxP システムを利用して抗生物質耐性遺伝子を除去することが多いようである。本研究では、LoxP 配列のみを手掛かりとしてバイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料を検知するための方法を作成することを試みた。

研究協力者 女子大学大学院) 江川智哉、榊田和彌、(国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部)、
中村公亮、手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部) 山田千尋、川上浩 (共立 佐々木伸大 (東京農工大学大学院共生科学技

術研究院) 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

近年ではモダンバイオテクノロジー応用技術食品の開発が進む一方、とうもろこし等の作物を組換え、医療用の医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。さらには食品添加物を生産するための遺伝子組換え微生物は既に応用されており、工業原料産生及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物・生物の開発も急速に行われている。このようなモダンバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来の非食用モダンバイオテクノロジー応用植物・生物が誤って食品に混入する可能性が示唆されている。わが国においては、平成13年4月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、安全性審査を行うとともに、輸入時にモニタリング検査等を行っている。また遺伝子組換え生物に関しても、平成16年から遺伝子組換え生物の多様性確保により法律が施行され、遺伝子組換え生物の使用等を規制している。

このような状況の中、本申請研究においては、非食用モダンバイオテクノロジーを応用した植物・生物について食品への混入に関する安全性確保を実施するため、それらの動向の調査研究を進め、非食用モダンバイオテクノロジー応用植物・生物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な検知法の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

1) 試料 トマト含有加工食品(ケチャップ、ソース、チリソース、ピューレー、ジュース、ペースト、缶詰)は、東京都内のスーパーで購入したものをを用いた。また、生トマトも同様に国産品を東京都内のスーパーで購入したものをを用いた。

2) DNA抽出精製 イオン交換樹脂タイプのDNA抽出キット(QIAGEN Genomic-tip)を用い付属のプロトコルを改変して抽出精製を行った。

3) 試薬調製・リアルタイムPCR リアルタイムPCR用反応液は25 μ L/wellとして調製した。組成は以下のとおりである。Universal

Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L)各0.9 μ M、対象プローブ溶液(10 μ mol/L)1 μ Mを混合し、水で全量22.5 μ Lに調製後、10 ng/ μ L DNA試料液2.5 μ L(25 ng)を添加した。装置はABI PRISMTM 7900HTを用いた。

リアルタイムPCR温度条件は以下の通りである、50°Cで2分間の条件で保持し、95°C10分間加温した後、94°C30秒間、60°C90秒間を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。

データベース検索サイト開発のソフトとしては、FileMaker ServerIIソフトを用いた。

②非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究

②-1 バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、論文、書籍、インターネット、業者カタログなどの文献調査に加え、学会やシンポジウム等へ参加しその分野の研究者と情報交換を用い、微生物の遺伝子組換えに関わる情報収集と、ベクターに関するデータベース作りを続けた。本年度は、国内の食品添加物用途や医療用として認可されている微生物組換え体について整理し、一覧表を作成した。

②-2 海外の研究動向に関する情報収集として、スロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebioticsに参加し、研究成果を発表すると共に、乳酸菌などの遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。

②-3 遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、乳酸菌モデル組換え体を用いて、豚肉中に混入させた場合の定量的検知法について検討した。宿主としては、ゲノムDNAにエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子(ery)を組込んだ *Lactobacillus casei* IGM232株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子(ermC)をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393株の2株を用いた。

標的とした遺伝子は、各組換え体に1コピーのみ存在することを確認した(*ldhD*: D-lactate dehydrogenase)と、グラム陽性細菌のマーカーとしてしばしば用いられるエリ

スロマイシン耐性遺伝子で、同じエリスロマイシン耐性遺伝子でも *L. casei* IGM232 株はゲノム上に組み込まれているため *ery* を 1 コピー持つ。一方、*L. casei* IGM393 株はプラスミド上に *ermC* が組み込まれており、乳酸菌あたり複数コピーが存在する。これらの遺伝子を標的としてリアルタイム PCR 法による定量的な検知法を検討した。

③工業原料用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

トウモロコシからのゲノム DNA は昨年度と同様に *N,N,N*-cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) によって単離した。またトウモロコシ 1 粒ずつからのゲノム DNA の単離は DNeasy Plant mini kit (キアゲン社) を用いて行った。方法はキットのマニュアルに従った。DNA チップ上のプローブ配列は昨年度と同様にトウモロコシ内在性遺伝子として ADH, SSIIb を、組換え遺伝子の 1 例としてカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列を用いた。これらのプローブの DNA 塩基配列は昨年度と同じものを用いた。プローブの標識反応はランダムプライム法にて行った。通常法では 4 μ M random nonamer, 2~2000 μ g の熱変性を行った鋳型 DNA, 20 μ M dNTP, 0.08 U Klenow fragment, 1 \times Klenow reaction buffer を含むように 25 μ l の液量となるように調整した後に 37°C で 30 分間反応させた。65°C、10 分間で酵素を失活させた後にハイブリダイゼーションに用いた。改変法では、2~2000 μ g の熱変性を行った鋳型 DNA, random nonamer, dNTP, Klenow fragment, 1 \times Klenow reaction buffer を含むように 250 μ l の液量となるように調整した後に 37°C で 30 分間反応させた。ターゲット DNA の標識は Cy3 標識 dUTP, Cy3 標識 random nonamer, Biotin 標識 dUTP を用いて行った。ハイブリダイゼーションは 42 μ l の 3 \times SSC, 0.3% SDS 水溶液中で 4~16 時間、65°C で行った。アレイの洗浄は、標準の方法としては 37°C の 3 \times SSC, 0.1% SDS 中での洗浄を 1 分間、2 回行った後に、室温の 0.2 \times SSC 中で 1 分間リンスした。検出方法は Cy3 標識のものは、アレイ洗浄後そのまま、読取装置にセットしてシグナルを検

出した。Biotin 標識のものは、アレイ洗浄後に Cy3 標識 avidin あるいは、Oyster550 標識抗 biotin 抗体を用いて染色を行い、洗浄後に蛍光検出を行った。

④医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査

遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲と位置づけた。また、近年、牛、豚、鶏等の家畜は、人畜共通の感染症の報告があることから、これらの家畜の健康に影響を与える植物も、薬用 GM 植物の範囲とした。また、環境中 (土壌、地下水など) の汚染物質 (重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など) に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定めた。2006 年~2010 年に公表され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、Scifinder[®])、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、得られた情報は、カテゴリー別に整理し、分類した。各年度の調査媒体は以下である。

2006 年 (薬用 GM 植物のみ)

- PubMed (キーワード: transgenic plant)
- 日本農芸化学会 2006 年度大会 (京都) 講演要旨集
- 第 24 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (つくば) 講演要旨集

2007 年

- SciFinder[®] (キーワード: transgenic plant)
- 第 25 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (千葉) 講演要旨集

2008 年

- SciFinder[®] (キーワード: transgenic plant)
- 第 26 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (大阪) 講演要旨集
- 第 26 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
- World Congress on In Vitro Biology, Tucson (Jun. 14-18) 2008 Abstract

2009 年

- SciFinder[®] (キーワード: transgenic plant)

・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大会・シンポジウム (藤沢) 講演要旨集

・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 2010 年

・SciFinder® (キーワード: transgenic plant)

・第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (仙台) 講演要旨集

・第 28 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、AD 総合診断体系実用化) 予稿集

・12th International Association for Plant Biotechnology Congress, St. Louis, Missouri, 2010. 6. 6-11, Abstract

2) 非食用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

植物試料等

新規にトマト *Solanum lycopersicum* を実験に使用するにあたり、市販品種 (D 社、品種 T、ミニトマト) を用い予備実験を行った。購入した苗は養液栽培 (ハイポネックス 1000 倍液) で育成した。トマト品種 MoneyMaker (非組換え体) 株 (MMWT) 'TOMJPF00002' は National BioResource Project (NBRP) より有償で分譲を受けた。ミラクリタンパク質 (Mir) 生産トマト (MMMir) は系統 '5B' cv. MoneyMaker を筑波大学 大学院生命環境科学研究科 遺伝子実験センター 江面浩教授より分譲を受けた。MMWT 及び MMMir はジフィーセブントタネまき土ポット (サカタのタネ) に播種後、発芽したものについて 5 号鉢 (赤玉土: 堆肥: クレハ培養土 = 3:1:1) に移植し閉鎖温室 (温度 25°C、相対湿度 50%、14 時間明-補光照明使用、10 時間暗) で栽培した。開花後に振動により自家受粉させ、果実は落果まで放置し、種子を収穫した。

遺伝子等

コレラトキシン B サブユニット (ctxB) 遺伝子は国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第一室 五十君静信室長より pET100/D-TOPO ベクターに導入された状態で提供を受けた。pET100B-ctxB vector より、制限酵素サイト (5'-end: *Bsp*HI, 3'-end: *Sac*I) 及び KDEL 配列を付加したプライマーで PCR 増幅した。

2.3 k グルテリン B-1 プロモーター (GluB1)、シグナルペプチド、GluB1 ターミネーターは農業生物資源研究所 遺伝子組換え作物開発センター 高岩文雄センター長よりアンピシリン耐性ベクターに導入された状態で提供を受けた。

ベクター等

ビスピリバック Na 塩で組換え体の選抜を行う、イネ組換えベクター pSTARA R-5 ベクターはインプラントイノベーションズ社 (神奈川県横浜市) より購入した。

ミラクリトマト (MMMir) の無菌培養系立ち上げ

野生型株 (MMWT, cv. MoneyMaker) の種子とともに、常法に従い滅菌処理を行い、MS2G 培地 (Murashige and Skoog 培地、2% sucrose, 0.25% Gelrite) に無菌的に播種した。現在、MSG (0.3) 培地 (Murashige and Skoog 培地、3% sucrose, 0.3% Gelrite) で継代培養を行っている。

遺伝子検知法の検討

無菌培養物または、温室栽培の植物体より採取した新鮮葉各約 100 mg より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用し、ゲノム DNA を調製した。果実からは室温下、乳鉢、乳棒を用いホモジナイズしたもの約 120 mg を試料とし、同様に DNeasy Plant Mini Kit を使用しゲノム DNA を調製した。各試料より調製したゲノム DNA を鋳型として、PCR 増幅した。

PCR の条件及びプライマー配列は下記の通り。

・ *ubi3* の検出

Primer set: Slubi3-1437S + Slubi3-1763A
Slubi3-1644S + Slubi3-1763A

[1] Slubi3-1437S (21 mer) :
5'-TTGAGTCTCCGACACCATCG-3'

[2] Slubi3-1644S (21 mer) :
5'-CCAAGCCAAAGAAGATCAAGC-3'

[3] Slubi3-1763A (20 mer) :
5'-ACTCAGCATTAGGGCACTCC-3'

・ CaMV35Spro-Mir の検出

Primer set: for *ubi3*: Slubi3-1437S +
Slubi3-1763A

for CaMV35SP-mir: AIST35Ss +
RdMir-616A

[1] AIST-35Ss (23 mer) : 5'-GAA GTT CAT TTC ATT
TGG AGA GG -3'

[2] Rdmir-616A (21 mer) : 5'-TGA GAG CCA AAC GCC
TTC TTC-3'

PCR 条件

PCR 反応液：GoTaq Green Master Mix (Promega) 3 μ L、sense-primer (10 μ M) 1 μ L、antisense primer (10 μ M) 1 μ L、genome DNA 1 μ L。温度条件：94 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 30 sec \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 30 sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min) x 30 cycle \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C ∞ 。PCR 機器：GeneAmp 2400 (PE)。反応終了後 6 \cdot L 全量をアガロース電気泳動解析に供した。

イネ形質転換用コンストラクトの作製

目標としたコンストラクトは、文献 4 に記載の *ctxB* 発現コンストラクトである。イネの胚乳に高濃度に標的タンパク質を蓄積させるためのプロモーター *GluB1* プロモーター制御下で、ER 居留シグナル KDEL を付加した *ctxB* タンパク質を発現するコンストラクト *GluB1pro-CtxB-KDEL-GluB1ter* をイネへ導入するための形質転換用ベクターの構造をしめした。構築の要点を下記にまとめた。

・R-5 ベクターの *OsAct1* 発現カセット (Gateway) を *HindIII-EcoRI* で切り出し、

GluB1::ctxB-KDEL と置換。

・KDEL (ER retention signal) を C 末端に付加 (PCR でエンジニアリング)。

・KDEL をコードする塩基はイネで利用頻度の高いコドンを選択した。

・*GluB1* signal 配列末端 (*NcoI* サイト) と読み枠が合うように 5' 末端の

制限酵素サイトを設計 (PCR でエンジニアリング、*BspHI* サイトを付加)。

(5' 末端が *NcoI* だと *ctxB* の開始コドン周辺のアミノ酸が変わってしまうため)

NcoI: C[^]CATGG (compatible)

BspHI: T[^]CATGA

・*BspHI* サイトは大腸菌でメチル化され、以後切断できなくなるので、PCR 産物を制限酵素処理し、*NcoI* サイトと結合した。

・形質転換用ベクター (R-5) に組込む前に KDEL 付加等の塩基配列を確認した。

このコンストラクト構築により、*ctxB* のコドンがイネに最適化されていない点は異なるが、本コンストラクトを導入することにより、文献記載のものと同様の遺伝子構造を有するコンストラクトを有するイネ組換え体が作出できる。

コンストラクト構築に使用したプライマー配列は下記のとおり。

[1] 5' 末端 *BspHI* サイト付加プライマー

ctxB-BspHI-S

5'-cccttcctcatgacacctcaaatattact-3' (30 mer)

下線部：*BspHI* サイト

[2] 3' 末端 KDEL 付加・3' 末端 *SacI* サイト付加プライマー

ctxB-KDEL-SacI-A

5'-atcgttgagctcacagctcgtccttatttggcactactaat tgcggc-3' (46 mer)

下線部：KDEL をコードする配列

CtxB 全長増幅時の PCR 条件は下記のとおり。

Primer set: *ctxB-BspHI-S* + *ctxB-KDEL-SacI-A*

PCR 反応液：KOD-plus (TOYOBO) 1 μ L、ddH₂O 35 μ L、10 x KOD-plus buffer 5 μ L、dNTP 5 μ L、MgSO₄ 2 μ L、Sense-primer (100 μ M) 0.5 μ L、antisense primer (100 μ M) 0.5 μ L、template DNA (plasmid DNA) 1 μ L。温度条件：94 $^{\circ}$ C 2 min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 15 sec \rightarrow 62 $^{\circ}$ C 30 sec \rightarrow 68 $^{\circ}$ C 90 sec) x 35 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C ∞ 。PCR 機器：GeneAmp 2400 (PE)。

イネ形質転換及び育成

イネの形質転換はインプラントイノベーションズ社に委託した。無菌培養物として受領した組換え体イネ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下記の条件で馴化栽培した。

発芽種子はアラシシステム (BMS) 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。植物体の乾燥及び倒伏を防ぐため、アラチューブを設置した。グロースチャンバー内の相対湿度は 60%、照明・温度条件は、14 時間明 (温度 28 $^{\circ}$ C) / 10 時間暗 (温度 23 $^{\circ}$ C) に設定した。

対照とする、非組換えイネ (日本晴) は 2009 年収穫の種籾 (WT2) を 10 粒、シャーレ中、RO 水で十分に湿らせたろ紙上に置き、暗所、30 $^{\circ}$ C で発芽させた。3 日後、全発芽種子を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 号に植え付け、上記組換え体と同条件で栽培を開始した。

⑤経口ワクチン用遺伝子組換え動物の検知法開発に関する研究

⑤ -1 文献調査

論文、インターネット、新聞を使って非食用バイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタ、その他の生物の開発状況についての情報収集を行った。これらの情報の中から検知のために有用と考えられる項目の一覧表を作った。今回の調査では平成21年度以前に行っていた調査で収集していた情報に新しい情報を追加した。

⑤-2 LoxP 配列の検知

LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞を広島大学・堀内浩幸先生からご供与いただいた。LoxP 配列のみを手掛かりとしてバイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料を検知するためのモデル実験として、この細胞を材料に研究を行う。この細胞から抽出したゲノミック DNA を使用してアダプターラーゲーション法によって LoxP 配列の検出を目指す。今年度は LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞からゲノミック DNA を抽出した。Molecular Cloning 2nd edition 9.16-19 ページに記載された方法を用いた。この方法の概略は RNase 処理、プロテアーゼ K 処理、フェノール抽出、エタノール沈殿を組み合わせたものである。

C. 研究結果

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (CaMVP35S) を検出するプライマー・プローブを用いたトマト加工品中の GM トマト混入の調査を行った。

CaMVP35S検出用プライマー・プローブ

35S-F : 5' - GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5' - AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C -3'

35S-P : 5' -FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3'

市販のトマト加工品 55 検体を対象に実態調査を行ったところ、2 検体が擬陽性と判断された (Table1)。再度 DNA 抽出を行い再現性の確認を行ったところ、2 検体において再現性が確認された。以降、この 2 検体 (juice cocktail3, 4) に対して検討を行った。

CaMVP35S 擬陽性検体に対しカリフラワーモザイクウイルスターミネーター (CaMVT) 部位を標的とした PCR の結果、増幅が確認された。そこで、カリフラワーモザイクウイルス

(CaMV) 感染混入の可能性が考えられるため、CaMV 検出用のプライマー・プローブの設計を行った。

CaMV検出用プライマー・プローブ

CaMV p-t F : 5' - GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AGG AA -3'

CaMV p-t R : 5' - GGA ACT ACT CAC ACA TTA TTA TGG AGA AA -3'

CaMV p-t P : 5' -FAM-TTC ATT TCA TTT GGA GAG GAC ACG CTG A-TAMRA-3'

このリアルタイム PCR の結果、増幅が確認された (Fig. 2)。また、CaMVP35S および CaMV 検出のリアルタイム PCR の Ct 値の比較の結果、juice cocktail 3 は 34.01±1.47、35.06±1.19 で差は 0.75、juice cocktail 4 は 32.36±1.17、33.87±1.11 で差は 1.07 で、ほぼ同量のコピー数含まれていることが示唆された。

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

②非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究

②-1 バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、昨年までの 3 年間に研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクター、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌と酵母のベクターに関して一覧表を作成して、ほぼ網羅的にデータベース化を行ったが、その後追加された情報について情報収集を続けた。

国内の食品添加物用途に用いられる組換え微生物情報としては、国内の承認済遺伝子組換え添加物リスト、食品安全委員会で現在審査中ないしは、審査を終了した組換え添加

物リストを作成した。医療用途としては、食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中の遺伝子組換えワクチンリスト、ヒトの医療用として日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品リストを作成した。

②-2 海外の情報収集として、スロバキアで開催された国際シンポジウム (International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics) に参加し、乳酸菌を用いた遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行った。ワクチン開発は現在そのほとんどがウイルスワクチンであり、遺伝子組換え技術で行われている。一方、細菌を用いた組換えワクチンとしては、抗原運搬体とするワクチン (経口粘膜ワクチン) 開発が注目されていることから、乳酸菌研究者が集まる国際シンポジウムに参加し、乳酸菌を用いた組換え乳酸菌ワクチンに関する情報収集を行った。

この国際シンポジウムでは、プロバイオティクス乳酸菌の安全性に関する議論も行われていた。プロバイオティクス乳酸菌の遺伝子組換えを用いた育種については、基礎研究として進められているものの、生きた組換え微生物の安全性に関する議論は進んでおらず、実用化にあたってはこの考え方を早急に何とかするべきだとの意見が出されていた。

国内の学会としては、腸内細菌学会、日本乳酸菌学会に参加し、情報収集を行った。日本細菌学会では、乳酸菌を抗原運搬体とする遺伝子組換え経口粘膜ワクチンの研究動向について口頭発表を行った。

②-3 遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、DNA を標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を行った。本年度は、乳酸菌モデル組換え体を対象として、豚肉にモデル組換え乳酸菌を混入し、定量 PCR を行い具体的な検知法を検討した。

L. casei IGM232 株および *L. casei* IGM393 株を、エリスロマイシンを含む MRS ブロスで増菌後、10 倍階段希釈したものを検体として、リアルタイム PCR で分析した。等量の乳酸菌から PCR テンプレート溶液を Matsuki ら (2004) の方法に従い調製し、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子 *ldhD* および *ery* をターゲットとするプライマーと、プラスミド上にある遺伝子 *ermC* をターゲッ

トとするプライマーを用いて定量 PCR を行った。参考文献: Matsuki T et al., Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. Appl Environ Microbiol. 70(1): 167-173 (2004)

モデル組換え乳酸菌を豚肉に接種して同様な検討を行った。接種直後の解析において、豚肉中では、クロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子および *ery* 遺伝子を標的とした場合、 6×10^3 cfu では検出できないが、プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的すると 6×10^3 cfu 以上で検出可能であった。

③工業原料用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

C-1. プライマー標識法と内部標識法を用いた DNA マイクロアレイ検出感度の検討

これまで、ターゲット DNA の蛍光標識は、Cy3 で標識されたランダムプライマーを用いていたが、DNA マイクロアレイでの検出感度を向上させるために、Cy3 標識された dUTP をターゲット DNA 内に取り込ませる内部標識法によって標識を行った。その結果、プローブ配列と同じ配列を鋳型として標識した場合、プライマー標識法、内部標識法、それらを併用した場合ともに 1×10^7 で検出が可能であった。50 μ g のゲノム DNA を鋳型として標識した場合には、プライマー標識法では SSIIb、ADH 遺伝子ともに検出されなかったのに対し、内部標識法あるいは併用法において ADH 遺伝子の検出が可能であった。特に併用法においては、10 μ g のゲノム DNA を鋳型として用いた場合でも ADH 遺伝子の検出が可能であった。これらのことから、プライマー標識法よりも、内部標識法を用いた場合に効率よく蛍光を検出することが可能であることが示された。

C-2. ビオチン標識法と、Cy3-avidin または蛍光標識 DNA デンドリマーを用いた蛍光増強法の検討

更に蛍光検出感度を向上させるために、ビオチン標識された dUTP をターゲット DNA に取り込ませて、DNA チップ上でハイブリダイゼーションを行わせた後に、蛍光標識のアビジンあるいは、抗ビオチン DNA デンドリマーをビオチンと結合させる方法について検討を行った。その結果、Cy3

標識アビジンを用いた系では、250 μ g のゲノム DNA を標識した場合、ADH、SSIIb 遺伝子ともに明確な蛍光が検出され、ADH 遺伝子については2~10 μ g のゲノム DNA 量でも検出が可能であった。一方、蛍光標識 DNA デンドリマーを用いた系では、50 μ g のゲノム DNA を標識した場合、ADH 遺伝子は検出可能であったが、対象としてプローブ DNA を含まないスポット溶液を添着した blank スポットにおいても蛍光が検出され、バックグラウンドノイズの上昇が確認された。これらの結果から、ビオチン標識と、Cy3 標識アビジンの系を用いることで、数十マイクログラム程度のゲノム DNA を鋳型として組換え遺伝子の検出が可能であることが示唆された。

C-3. 標識反応条件検討による検出感度の向上

続いて、Cy3 dUTP を用いた内部標識法の反応条件を検討することで検出感度が向上できるかについて実験を行った。これまでの方法では、DNA 数十~数千マイクログラムの鋳型に対して、一般的には数マイクログラム程度の DNA を標識する場合に用いる一般的な手順に従って反応を行っていたが、反応に関わる基質や酵素が鋳型 DNA に対して少なすぎる可能性があったため、反応容量を10倍に、基質や酵素量の濃度を5倍として標識反応を行った。その結果、鋳型ゲノム DNA として50 μ g を用いた場合に、ADH、SSIIb 遺伝子ともに蛍光が観察された。また、鋳型ゲノム DNA として10 μ g を用いた場合には ADH 遺伝子を検出することが可能であった。

C-4. 遺伝子組換えトウモロコシ1粒を用いた DNA マイクロアレイ検出

C-3 で数十マイクログラムのゲノム DNA を内部標識法で標識することで ADH 遺伝子の検出が可能であることが分かったため、トウモロコシ1粒から抽出したゲノム DNA を用いて内生遺伝子を検出可能であるかについて検討を行った。また、遺伝子組換えトウモロコシの一つである MON88017 1粒から抽出したゲノム DNA を用いてその組換え遺伝子を検出できるかについても検討を行った。トウモロコシ1粒からシリカメンブレンミニカラムを用いて抽出したところ、10~80 μ g 程度の収量であった。20 μ g の抽出したゲノム DNA を C-3 で確立した方法で標識を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、非組換

え体から抽出したゲノム DNA を用いた場合、ADH 遺伝子のスポットにおいて蛍光が検出された。また、MON88017 由来のゲノム DNA を用いた場合には SSIIb、ADH のスポットにおいて蛍光が検出された。また、HPT 遺伝子や35S プロモーター等に全てのスポットにおいても蛍光が検出されたことから、検出の選択性については低いものと考えられた。

④医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査

1. 2006-2010年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況

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

(http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html) で、2006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。認可面積は2008年までは年々増加し、特に2008年は対2007年327%の2650.50エーカーの認可面積であったが、その後は減少し、2010年は2007年の認可面積に近い773.00エーカーであった。実際に作付けが行われた面積は認可面積よりも小さく、最も作付け面積が大きかったのは、2008年の459.28エーカーであり、2010年は64.13エーカーに減少した。

2006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状況をまとめた。2006年は9社(大学を含む)、2007年と2008年は5社、2009年と2010年は6社が圃場栽培を行っている。食用作物としては、トウモロコシ、エンドウ、ベニバナ、イネ、オオムギの作付けが行われ、導入遺伝子産物または生産物は、環境浄化用酵素(水銀イオン還元酵素、有機水銀分解酵素、チトクロームP450)、工業用酵素(エンドグルカナナーゼ:バイオエタノール生産、レンニン:チーズ生産)、医療用酵素(リゾチーム)、

免疫抗原（大腸菌易熱性腸管毒素Bサブユニット、B型肝炎ウイルス外殻タンパク質表面抗原）、抗体（抗虫菌、抗カゼウイルス）、ホルモン（コイ成長ホルモン、）、医療用タンパク質（ラクトフェリン、ヒト血清アルブミン、ウシ肺アプロチニン、レクチン様タンパク質、ブタ由来セリンプロテアーゼインヒビター不活性型前駆体）、生分解性プラスチック（ポリβヒドロキシブチレート）、機能性タンパク質（ブラゼイン：甘味タンパク質）であった。

2006年の野外圃場作付けを行った Chlorogen, Inc. は2007年9月に事業を停止し、Novoplantはホームページへのアクセスが不可となっている。2009年及び2010年に野外圃場でのGMトウモロコシ作付けを行った Applied Biotechnology Instituteは、同社ホームページのPublicationリスト

(<http://www.appliedbiotech.org/publications-2.html>) には、2002年11月に医薬品類を生産するトウモロコシが後作の非組換え大豆に混入する事件を起こし、倒産した Prodigene社の論文 (Tackett CO, M Pasetti, R Edelman, JD Clements, JA Howard, S Streatfield. 2004. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. Vaccine 22: 4385-4389) が含まれている。

2. 2006-2010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

2006年～2010年に公表・出版された論文等 352件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品：105件、経口ワクチン：51件、食用医薬：34件、ワクチン抗原：32件、抗体医薬：32件、治療薬：59件、診断薬・試薬：12件、環境浄化：31件であり、食用作物を用いた研究では、特に、機能性食品及び経口ワクチンの開発が盛んであることが伺えた。また、国別の件数は、日本：118件、米国：85件に次ぎ、中国：45件であり、中国の研究が盛んであることが伺えた。作物別の集計では食用作物のうち、イネ：43件が最も多

く、次いでトマト：26件であった。

2) 非食用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

トマト果実からのゲノム DNA 調製

トマト果実から DNeasy Plant Mini Kit を使用し、ゲノム DNA を調製した。果実から調製したゲノム DNA は新鮮葉より調製したものと比較し、品質、収量ともに低かった。本ゲノム DNA を鋳型とし、ハウスキーピング遺伝子 *ubi3* の PCR 増幅を試みた。その結果、トマト果実由来のゲノム DNA を鋳型とした PCR で、*ubi3* が増幅されることを確認し、PCR 増幅には支障ないことが示された。

ミラクリントマト (Mir トマト)

Mir トマトについては、組換え体種子の譲渡を受け、モデル組換え体として栽培を行い、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物としての維持を開始した。なお、得られた果実は MMMir 1個、MMWT 2個であった。

組換えトマトモデル植物を使用した遺伝子検知実験

MMMir トマト及び野生型株 MMWT の無菌培養物各新鮮葉より調製したゲノム DNA を鋳型として、Mir タンパク質をコードする遺伝子領域の PCR 増幅による検知を試みた。その結果、カリフラワーモザイク CaMV35S プロモーターから Mir コード遺伝子間に対応する PCR 増幅産物が得られ、Mir タンパク質をコードするコンストラクトの検知が可能なが示された。

CtxB イネの作製

CtxB イネについては、イネグルテリン B-1 プロモーターで *ctxB* タンパク質を発現するための組換え体作製用遺伝子コンストラクトを含むイネ遺伝子導入用ベクターを構築した。本コンストラクトを導入した組換え体イネはインプラントイノベーションズ社において作製が完了し、20本の無菌培養物として受領した。

本組換え体は現在グロースチャンパーで 65株に分け馴化中であり、定植ののち、自殖を

行い後代の種子（コメ）を取得し、コメを用いた遺伝子レベルならびに免疫学的手法による ctxB タンパク質の検知実験に供する予定である。

⑤経口ワクチン用遺伝子組換え動物の検知法開発に関する研究

⑤-1 非食用バイオテクノロジー応用魚についてゼブラフィッシュを用いて遺伝子の機能を調べた研究が近年に多数報告されていた。ゼブラフィッシュが研究のためのモデル魚として頻繁に利用されるようである。導入される遺伝子、プロモーター、ターミネーターでは特定の配列が使用される傾向はなく、多様である。ゼブラフィッシュは通常は食用にしない。また、研究用に開発した GM 魚は実験室で飼育されるにとどまり、野外で飼育、放流することはないと予想される。したがって、今回の調査で調べた GM ゼブラフィッシュについては食品への混入危害の懸念は少ないと思われる。

⑤-2 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリについて

本年度の調査では論文 5 報の情報を集めた。該当する論文数は少なかった。遺伝子導入のためのベクターとしてはレンチウイルスが 4 報で使われていた。導入される遺伝子の中に woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE) が 2 報に含まれていた。これらの情報は非食用バイオテクノロジー応用ニワトリの検知法の作成を考えるときに有用である。

⑤-3 非食用バイオテクノロジー応用ブタについて

今回の調査で論文 29 報に記載されている情報を収集した。導入される遺伝子は多様であるが、GFP と eGFP で 8 報を占めた。プロモーターでは CMV プロモーターまたは CMV immediate early プロモーターが 8 報で使われた。マーカーではネオマイシン耐性が 10 報で利用されていた。これらの情報は非食用バイオテクノロジー応用ブタの検知法の作成を考えるときに有用である。

⑤-4 その他の非食用バイオテクノロジー応用生物について

2011 年 1 月 28 日、読売新聞に遺伝子組換え蚊の記事が掲載された。イギリス企業オクシ

テック社が開発したオスの遺伝子組換え蚊 6000 匹をデング熱対策としてマレーシアの森林に放ったことが報じられた。今後もこのような計画が立てられる可能性がある。このような遺伝子組換え蚊が食料に混入する懸念がある。今後の動向を注目する必要がある。

⑤-5 LoxP 配列を検知する方法の作成

LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞、 $1\sim 2 \times 10^6$ 個から約 30 μg のゲノミック DNA が抽出された。0.8 %アガロースゲル電気泳動で分析すると、得られたゲノミック DNA は大部分が 23 kb 以上の大きさだった。今後は得られたゲノミック DNA を使ってアダプターライゲーション法の条件検討を行う予定である。

D. 考察

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

今回の実態調査で検出された CaMVP35S 擬陽性検体は、CaMVP35S と CaMV 検出用プライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR の Ct 値を比較し、ほぼ同量のコピー数含まれていることが確認されたため、CaMV 混入であることが示唆された。CaMVP35S と CaMV 検出用のプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR の Ct 値を比較することにより、GM 擬陽性検体か CaMV 混入によるものかを判別することが可能となった。

②非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究

②-1 バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、昨年までの 3 年間に研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクター、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌と酵母のベクターに関して一覧表を作成して、ほぼ網羅的にデータベース化を行ったが、その後追加された情報について文献調査や web 等を用いて情報収集を続けた。これらはそのほとんどが研究用に用いられているため、食品への混入のリスクはそれほど高くない。遺伝子組換え微生物として実際に使用段階であるものとしては、食品添加物の生産に用いられる遺伝子組換え細菌や、ワクチンなどの医療用途に用いられる組換え微生物がある。本年度は、国

内の食品添加物用途や医療用として既に使用が認可されている微生物組換え体について整理した。

国内で既に評価を終了し、官報で公表されている添加物 14 を一覧表とした。これらについては、企業保護の立場から、細かい情報までは公開されていないため、その概略を一覧とした。現在食品安全委員会で、遺伝子組換え添加物として審議中ないしは、審議が終了したもの 7 件について一覧表とした。

医療用途としては、食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中の遺伝子組換えワクチン 1 件、また、ヒトの医療用として日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品リストを作成した。国立感染症研究所の生物製剤部がまとめた医薬品リストから、遺伝子組換えと明記されている医薬品のみを選別しリスト化を行った。酵素 11 件、血液凝固線溶系因子 5 件、血清タンパク質 1 件、ホルモン 22 件、ワクチン 4 件、インターフェロン類 7 件、エリスロポエチン類 4 件、サイトカイン類 6 件、抗体 16 件、融合タンパク質 2 件の合計 78 件があった。

②-2 海外の遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行ったが、ウイルスワクチン研究は盛んであるが、細菌を用いた遺伝子組換えワクチンの実用化は見えていないように思えた。この中で、乳酸菌を組換え体を抗原運搬体とする経口粘膜ワクチンは注目されており、研究論文数も多い。海外の情報収集として、スロバキアで開催された **International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics** に参加し、乳酸菌を用いた遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行った。

このシンポジウムでもプロバイオティクス乳酸菌の安全性に関する議論が行われ、生きた乳酸菌の安全性をどのような観点で行うか考えるべきだとされた。また新たに開発される組換えなどを利用した乳酸菌の安全性については、国際的な安全性に関するコンセンサスが必要であると議論されていた。生きたままの遺伝子組換えの安全性をどのように考えるかは、最も重要な課題であると思われた。

国内の学会としては、腸内細菌学会、日本

乳酸菌学会に参加し、情報収集を行った。日本乳酸菌学会では、乳酸菌を抗原運搬体とする遺伝子組換え経口粘膜ワクチンの研究動向について口頭発表を行った。この分野の研究は世界的にも注目されており、遺伝子組換え微生物の安全性の問題が解決されれば実用化が進むものと思われる。

②-3 遺伝子組換え微生物の定量的検知法に関し検討を進めた。本年度は、モデル組換え体として乳酸菌を用い、定量 PCR を行い評価した。今回、定量 PCR のブランクにいくつか非特異増幅が認められた。この非特異反応については原因を調べているが未だ結論に至っていない。非特異反応の影響を受けない範囲を検討したところ、スタンダード遺伝子の定量において、Ct 値=31.3 で正確な定量が可能であるため、これ以外の領域を定量可能範囲とした。

1 つの遺伝子組換え細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合と、プラスミドなどの複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、やはり複数コピー存在する場合の検出感度が高かった。

また、豚肉に接種後直接分析した結果より、組換え乳酸菌においても、昨年度検討した組換え大腸菌と同様、本方法で遺伝子組換え微生物を定量的に検知することが可能であることが示された。

豚肉に接種後、MRS 培地で 24 時間増菌した場合、豚肉に存在していた低レベルの共雑菌の増殖が認められ、陽性結果が得られることがわかった。これは、検査対象の乳酸菌組換えの体の定量分析の妨げとなった。この結果は、自然界に存在した菌が探知対象とするエリスロマイシン耐性遺伝子を元々保持していたのか、またはエリスロマイシン耐性遺伝子を増菌培養中に組換え体から獲得したものである可能性もあるため、今後の更なる検討課題となった。

③工業原料用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

今年度は、DNA マイクロアレイを用いて組換え遺伝子の検知を行うために、検出感度の向上を目的として標識方法について検討を行った。その結果、プライマー標識法ではな

く、内部標識法を用いること、また、標識の反応液量を増やすことで検出感度が向上することが確認された。また、ビオチンを用いてターゲット DNA を標識したのちに、蛍光標識されたアビジンや抗体を用いて検出を行った場合には、蛍光の増強が確認された。原理的には DNA デンドリマーを用いた場合には、1 分子あたり数百分子の蛍光色素で修飾されていることから蛍光強度が数百倍になるものと期待されたが、実際には数十倍程度の増幅であった。これは、デンドリマー分子が大きいために十分な分子同士の相互作用が十分に行われなかったことや、ターゲット DNA に対する分子数が十分量ではなかったことが考えられた。また、いずれの検出方法においても、SSIIb 遺伝子に比べて、ADH 遺伝子の検出感度が高い傾向が見られた。このことからプローブとして用いる DNA 塩基配列によって検出感度が異なる可能性が示唆された。

④医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

—現在、薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場での作付け状況がインターネットで公開されているのは、米国のみである。2006 年～2010 年の作付け状況の調査の結果、食用作物としては、イネ、オオムギ、トウモロコシ、バナナが作付けされていることが判明した。また、文献等の調査の結果、食用作物としては、イネ、トマトの使用頻度が高く、検知法開発の優先作物として妥当であることが示された。

検知法開発のための陽性対照となるモデル組換え体植物体 (ctxB イネ) の作出を行った。CtxB イネは文献 4 では、ctxB 遺伝子をイネでの発現効率を高めるためにイネで使用頻度の高いコドンに改変しているが、本研究で使用した ctxB はコドン改変をしていない。そのため、文献 4 ではイネ品種キタアケ (道北 36 号、耐冷性強、早生で多収、やや大粒、やや良質、やや良食味) をホストとし、平均 30 µg ctxB/粒、コメ総タンパク質の 2.1% の高効率で ctxB が蓄積されると報告されているが、本研究で作出した ctxB イネのコメ中の ctxB 蓄積量はこの数値よりも

低いと想定される。しかしながら、免疫学的手法による非組換え体イネのコメへの混入検知法や遺伝子レベルでの検知法開発には支障はないと考えられる。

⑤経口ワクチン用遺伝子組換え動物の検知法開発に関する研究

食用に供しうる魚についての非食用バイオテクノロジー応用魚としてはマス 2 報、ナマズ 1 報の論文報告があった。これらの魚は研究用に作成されており、大量に生産されて食品に混入する可能性は低いと思われる。

今年度の調査では 20 報の論文に記載されている情報を追加した。

GM ニワトリを作成するための遺伝子導入法としてはレトロウイルスが広く使われてきたが、ES 細胞や始原生殖細胞 (PGC) などの多能性幹細胞を使う方法が開発中である。これらの方法が確立されると GM ニワトリの作成のための技術は大きく前進することが予想される。

非食用バイオテクノロジー応用ブタの利用目的の一つは臓器移植である。現在では移植片に対する拒絶反応を制御する方法が完全には確立できていないようである。したがって、臓器移植を目的として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達していないようである。しかし、遺伝子導入法の改良のための論文が数報発表されており、その技術は前進していると思われる。

E. 結論

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

GM 体に汎用される CaMV35S 配列が、CaMV の混入によって誤って検出されてしまうことによる、擬陽性の判断を絞っていくことが可能であると考えられる。

②非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究

モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。食品添加物製造用に用いられる遺伝子組換え微生物や、医療用途に用いられる遺伝子組換え微生物に関する情報収集を進め

た。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン開発が注目されはじめていることから、スロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics に参加し、遺伝子組換え乳酸菌に関する研究成果を発表すると共に、遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法の検討では、豚肉中に混入した乳酸菌モデル組換え体を用いて具体的な定量探知法について検討を行った。

③工業原料用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

未知の DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知法の確立が望まれているが、検出感度の低さが問題となっていた。本研究では実験プロトコルを見直すことにより、トウモロコシ 1 粒から抽出した DNA を用いて DNA チップ上で組換え遺伝子を検知することの可能性を示した。今後、様々な遺伝子について検知可能であるか検討する必要があると思われる。

④医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

2006 年～2010 年に公表された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報調査の結果、食用作物としてはイネ及びトマトの使用頻度が高いことが示された。調査研究結果に基づき、検知対象 GMO のモデルとしてミラクリン生産トマト及びコレラトキシン B サブユニット生産イネを設定し、これらの研究試料としての供給系の確立ならびに構築を行った。トマトについては遺伝子検知モデル実験を行い、果実からの標的遺伝子の検知が可能なることを示した。

⑤経口ワクチン用遺伝子組換え動物の検知法開発に関する研究

食用バイオテクノロジー応用魚と動物についての今回の文献調査では多くの論文報告が見出された。特に魚で遺伝子機能の研究を目的とする報告が多かった。鶏卵をバイオリクターとして利用する、あるいはブタの臓器を臓器移植に利用するには乗り越えなければならない障壁がまだ残っ

ており、さらなる研究が必要である。したがって、今後すぐに非食用バイオテクノロジー応用魚と動物が大量に作成される状況には至っていないと思われる。しかし、近年ではニワトリやブタへの遺伝子導入法の研究が活発になされている。近い将来に遺伝子組換え体を作成する技術が大きく進んで高い効率で組換え体を作成できるようになるとと思われる。

また、遺伝子組換え魚や動物を作成する技術は新しい手法が利用されるようになって成熟しつつある。最近では Cre / LoxP システムを使って組換え体を作成するときに使った抗生物質耐性遺伝子を組換え体のゲノムから除去する傾向がある。非食用バイオテクノロジー応用生物を検知するための方法もこれらの新しい傾向に対応する必要がある。本研究では LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞を使って LoxP 配列を検知するためのモデル実験を行う。

参考文献

1. Sun HJ, Kataoka H, Yano M, Ezura H. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *Plant Biotechnol J.* 5, 768-777 (2007)
2. Kim YW, Kato K, Hirai T, Hiwasa-Tanase K, Ezura H. Spatial and developmental profiling of miraculin accumulation in transgenic tomato fruits expressing the miraculin gene constitutively. *J Agric Food Chem.* 58, 282-286. (2010)
3. 「種子特異的プロモーターおよびその利用」
高岩 文雄
(独立行政法人農業生物資源研究所) 出願日: 平成 20 年 2 月 4 日 (2008. 2. 4) 公開番号: 特開 2008-109946 (P2008-109946A)
4. Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, Kiyono H. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 10986-10991 (2007)

5. Wu CY, Suzuki A, Washida H, Takaiwa F. The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants. *Plant J.* 14, 673-683 (1998)

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 清水えり、布藤聡、増渕友子、峯岸恭孝、笠原正輝、穂山浩、手島玲子、日野明寛、真野潤一、古井聡、橘田和美、リアルタイムPCRによるDNA検査に好適なポリプロピレンチューブの選択方法、食品衛生学雑誌, 51, 43-47 (2010)
- 2) Oguchi, T., Onishi, M., Mano, J., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Furui, S., Kitta, K., Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize, DAS-59122-7, MIR604, MON863 and MON88017, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 92-100 (2010)
- 3) Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S.B., Ulberth, F., Van Hengel, A.J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J.M., Wehling, P., Taylor, S.L., Poms, R.E., Delahaut, P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, *JAOAC Int.*, 93, 442-450 (2010)
- 4) Akiyama, H., Sakata, K., Spiegelhalter, F., Furui, S., Nakashima, A., Kitta, K., Teshima, R., Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 maize, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 65-70 (2010)
- 5) Mano, J., Yanaka, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Improvement of polymerase chain reaction-based Bt11 maize detection method by reduction of non-specific amplification, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 32-36 (2010)
- 6) Nakajima, O., Koyano, S., Akiyama, H., Sawada, J., Teshima, R., Confirmation of a predicted lack of IgE binding to Cry3Bb1 from genetically modified (GM) crops, *Regul Toxicol Pharmacol.*, 56, 306-311 (2010)
- 7) 清木興介、織田浩司、柴原裕亮、蒲生玲子、有馬優美、酒井信夫、中村厚、安達玲子、塩見一雄、穂山浩、手島玲子、加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討、食品衛生学雑誌, 51, 133-138 (2010)
- 8) Sakai, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Yano, T., Uchida, K., Nakao, Y., Urisu, A., Adachi, R., Teshima, R., Akiyama, H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, *J Agric Food Chem.*, 58, 8145-8151 (2010)
- 9) 峰松和彦、中村公亮、穂山浩、張替直輝、中島治、橘田和美、手島玲子、飯塚太由、コンニャク製粉含有コメ粉からのコメDNA抽出精製法の検討、食品衛生学雑誌, 51, 247-252 (2010)
- 10) Nakamura, K., Yamada, C., Akiyama, H., Takabatake, R., Kitagawa, M., Kitta, K., Kawakami, H., Teshima, R., Evaluation of tomato DNA fragmentation and PCR amplicon size for detection of tomato DNA in processed products, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 17, 123-128 (2010)
- 11) Harikai, N., Akiyama, H., Kondo, K., Kitta, K., Teshima, R., Yoshida, Y., A novel chromogenic method for determining the genetically modified soybean content in soybean powder with primer extension, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 17, 110-115 (2010)

- 12) Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, K., Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H., Kita, K., Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies, *Parasitology International*, 59, 560-564 (2010)
- 13) 丸山卓郎、近藤健児、四柳雄一、山本豊、川崎武志、司馬真央、寺坂和祥、山根真由、Shu Zhug、坂田こずえ、藤田正雄、穂山浩、西村直行、小松かつ子、水上元、合田幸広、PCR-RELP 法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の妥当性確認試験、生薬学雑誌, 64, 96-101 (2010)
- 14) Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Establishment and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean MON89788, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 242-246 (2010)
- 15) Takabatake, R., Futo, S., Minegishi, Y., Watai, M., Sawada, C., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Akihiro, H., Kitta, K., Evaluation of quantitative PCR methods for genetically modified maize (MON863, NK603, TC1507 and T25), *Food Sci. Technol. Res.*, 16, 421-430 (2010)
- 16) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, *JAOAC Int.* in press (2010)
- 17) Akiyama, H., Makiyama, D., Nakamura, K., Sasaki, N., Minegishi, Y., Mano, J., Kitta, K., Ozeki, Y., Teshima, R., A Novel Detection System for the Genetically Modified Canola (*Brassica rapa*) Line RT73, *Anal. Chem.*, 82, 9909-9916 (2010)
- 18) Takabatake, R., Akiyama, H., Sakata, K., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Development and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean A2704-12, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, in press.
- 19) Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima, R., Nakashima, A., Ogawa, A., Yamagishi, T., Futo, S., Mano, J., Oguchi, T., Kitta, K.: Inter-laboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize, *JAOAC Int.*, in press. (2011)
- 20) Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., and Igimi S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(1):43-48. (2010)
- 21) Kajikawa A., Ichikawa E., and Igimi S.: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2):375-382 (2010)
- 22) Kajikawa A. and Igimi S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19): 3409-3415 (2010)
- 23) Masuda K. Kajikawa A, and Igimi S. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. in press
- 学会発表
- 1) 穂山浩、未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究日本食品衛生学会第99回

- 学術講演会 (2010.5)
- 2) 中村公亮、穂山浩、山田千尋、佐藤里絵、牧山太樹、坂田こずえ、川上浩、真野潤一、橋田和美、手島玲子、カナダ産安全性未審査遺伝子組換え亜麻の検知法について、日本食品衛生学会第99回学術講演会 (2010.5)
 - 3) 張替直輝、吉田雄三、橋田和美、近藤一成、穂山浩、手島玲子、プライマー伸長反応を使用した遺伝子組換え大豆の発色定量法、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
 - 4) 高島令王奈、大西真理、小岩智宏、布藤聡、峯岸恭孝、穂山浩、手島玲子、古井聡、橋田和美、遺伝子組換え(GM)ダイズ新系統MON89788の系統特異的定量検知法開発および妥当性の確認、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
 - 5) 山田千尋、中村公亮、穂山浩、高島令王奈、北川麻美子、橋田和美、川上浩、手島玲子、トマト含有加工食品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に向けて、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
 - 6) 穂山浩、食物アレルギーを誘発する原材料の検知法における最近の進歩について、日本分析化学会表示・起源研究懇談会第3回講演会 (2010.7)
 - 7) 穂山浩、未承認遺伝子組換え食品の検査法について、平成22年度食品安全行政講習会 (2010.6)
 - 8) 笠間菊子、小熊恭代、鈴木達也、穂山浩、大島赴夫、小島幸一、特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 9) 真野潤一、谷中有香、池津陽子、大西真理、布藤聡、穂山浩、手島玲子、日野明寛、高島令王奈、古井聡、橋田和美、スタック品種の混入に影響を受けない遺伝子組換えトウモロコシ混入率評価手法グループテストングの性能確認、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 10) 大森清美、中村公亮、穂山浩、濱岡志津子、牧山太樹、坂田こずえ、笠原正輝、橋田和美、岸弘子、藤巻照久、手島玲子、加工食品からのパパイヤDNA抽出精製法の検討、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 11) 中村公亮、穂山浩、大森清美、濱岡志津子、牧山太樹、坂田こずえ、笠原正輝、橋田和美、手島玲子、ハワイ産遺伝子組換えパパイヤ55-1系統の特異的検知法の開発について、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 12) Mano, J., Shigemitsu, N., Ikezu, Y., Yanaka, Y., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., In-house validation of component reactions on the real-time PCR array for comprehensive GMO analysis, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
 - 13) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta, K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
 - 14) Ito, K., Yamamoto, T., Doi, H., Shoji, M., Kato, M., Akiyama, H., Adachi, R., Novel ELISA for determine food allergen in processed food, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
 - 15) 穂山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橋田和美、手島玲子、2009年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
 - 16) Akiyama, H., Japanese Food Allergen Labeling, Seminar on Food Allergen : Opportunities and Challenges for Thai Food Industries (2010.11, Thailand)
 - 17) Masuda K. and Igimi S.: Observation of *Lactobacillus casei* IGM 393 transport using *in vitro* M cell model. International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics. (2010.6)
 - 18) 五十君静信：乳酸菌・ビフィズス菌の新しい研究と応用—医薬分野への応用の可

能性一。日本乳酸菌学会設立20周年記念
シンポジウム(2010.11)

- 19) 梶田和彌、五十君静信：Caco-2細胞とB
細胞との共培養による*Lactobacillus casei*
IGM393株の透過促進。日本乳酸菌学会
(2010.7)
- 20) 中島治、中村里香、梶山浩、手島玲子：
組換えトウモロコシに導入されたCryタ
ンパクの発現、精製、および抗体との反
応性について。第100回日本食品衛生学
会学術講演会 (2010.9)

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）

平成 23 年度 分担研究報告書

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止のための
検知法開発に関する研究

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究(研究総括)

研究代表者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨：非食用の GM トマトが誤ってトマト加工品に混入される可能性があり、非食用 GM トマトの混入を監視するための検査法が必要になる。そこで市販のトマト加工品を対象に、GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (CaMVP35S) を用いて調査を行った。トマト 55 検体中 2 検体より、CaMVP35S が検出された。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 検出用プライマープローブを設計し、偽陽性 2 検体を分析したところ、CaMV が検出された。従って、CaMV の混入であると判断された。非食用バイオテクノロジーの開発状況のデータベース検索の Web 公開用ソフトを確立した。

研究協力者

中村公亮（国立医薬品食品衛生研究所）山田
千尋、川上浩（共立女子大学大学院）

A. 研究目的

現在、最初に商業化された遺伝子組換え（以下、「GM」という）トマト(FlavrSavr)に続いて、成熟阻害や殺虫剤および除草剤耐性などの特性を持った数多くの GM トマト系統の開発が行われている。非食用に関しても GM トマトで開発される可能性が高い。トマト加工品の消費増加に伴い、非食用の GM トマトが誤ってトマト加工品に混入される可能性があるため、非食用 GM トマトの混入を監視するための検査法が必要になる。そこで市販のトマト加工品を対象に、GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーターを用いて調査を行った。また偽陽性を見極めるために、カリフラワーモザイクウイルスの感染を検知する方法について検討を行った。また非食用 GM 体の開発状況をデータベース化することを検討し、Web 検索用ソフトを開発した。

B. 研究方法

1) 試料 トマト含有加工食品（ケチャップ、ソース、チリソース、ピューレー、ジュース、ペースト、缶詰）は、東京都内のスーパーで購入したものを用いた。また、生トマトも同

様に国産品を東京都内のスーパーで購入したものを用いた。

2) DNA 抽出精製 イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い付属のプロトコルを改変して抽出精製を行った。

3) 試薬調製・リアルタイム PCR リアルタイム PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。Universal Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各 0.9 μ M、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）1 μ M を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (25 ng) を添加した。装置は ABI PRISMTM 7900HT を用いた。

リアルタイム PCR 温度条件は以下の通りである、50°C で 2 分間の条件で保持し、95°C 10 分間加温した後、94°C 30 秒間、60°C 90 秒間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

データベース検索サイト開発のソフトとしては、FileMaker Server II ソフトを用いた。

C. 研究結果

GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (CaMVP35S) を検出するプライマー・プローブを用いたトマト加工品