

表7. 続き 日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品（2／3）

分類	一般名	商品名	承認年
成長ホルモン	ソマトロピン	サイゼン注	1992
成長ホルモン	ソマトロピン	グロウジェクト注	1993
成長ホルモン	ソマトロピン	セロスティム注	1999
成長ホルモン（後続品）	ソマトロピン	ソマトロピン BS 皮下注「サンド」	2009
PEG 化成長ホルモンアナログ	ペグビソマント	ソマバート皮下注用	2007
ソマトメジン C	メカセルミン	ソマゾン注射用	1994
ナトリウム利尿ペプチドカルペリチド		ハンブ注射用	1995
グルカゴン	グルカゴン	注射用グルカゴン G・ノボ	1996
卵胞刺激ホルモン	ホリトロピン アルファ	ゴナールエフ皮下注用	2006
卵胞刺激ホルモン	フォリトロピンベータ	フォリスチム注	2005
GLP-1 アナログ	リラグルチド	ビクトーザ皮下注	2010
副甲状腺ホルモンアナログ	テリパラチド	フォルテオ皮下注	2010
<b>ワクチン</b>			
B 型肝炎ワクチン	組換え沈降 B 型肝炎ワクチン（酵母由来）	ヘプタボックス II	1988
B 型肝炎ワクチン	組換え沈降 B 型肝炎ワクチン（酵母由来）	ビームゲン	1988
B 型肝炎ワクチン	沈降 B 型肝炎ワクチン（huGK-14 細胞由来）	沈降 B 型肝炎ワクチン「明乳」	1996
HPV 感染予防ワクチン	組換え沈降 2 価ヒトパピローマウイルス様 粒子ワクチン（イラクサギンウワバ細胞由来）	サーバリックス	2009
<b>インターフェロン類</b>			
インターフェロン α	インターフェロン アルファ-2b	イントロン A 注射用	1987
インターフェロン α	インターフェロン アルファコン-1	アドバフェロン皮下注	2001
インターフェロン β	インターフェロン ベータ-1a	アボネックス筋注用	2006
インターフェロン β	インターフェロン ベータ-1b	ベタフェロン皮下注	2000
インターフェロン γ	インターフェロン ガンマ-1a	イムノマックス-γ 注	1989
PEG 化インターフェロン α	ペグインターフェロン アルファ-2a	ペガシス皮下注	2003
PEG 化インターフェロン α	ペグインターフェロン アルファ-2b	ペグイントロン皮下注用	2004
<b>エリスロポエチン類</b>			
エリスロポエチン	エポエチンアルファ	エスポー注射液	1990
エリスロポエチン	エポエチン ベータ	エポジン注	1990
エリスロポエチンアナログ	ダルベポエチン アルファ	ネスブ静注用	2007
エリスロポエチン（後続品）	エポエチン カップ<エポエチンアルファ後続 1>	エポエチンアルファ BS 注「JCR」	2010

表 7. 続き 日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品 (3/3)

分類	一般名	商品名	承認年
<b>サイトカイン類</b>			
G-CSF	フィルグラスチム	グラン注射液	1991
G-CSF	レノグラスチム	ノイトロジン注	1991
G-CSF 誘導体	ナルトグラスチム	ノイアップ注	1994
インターロイキン-2	セルモロイキン	セロイク注射用	1992
m インターロイキン-2	テセロイキン	イムネース注	1992
bFGF	トラフェルミン	フィブラストスプレー	2001
<b>抗体</b>			
ヒト化抗 EGF 受容体抗体	トラスツズマブ	ハーセプチン注射用	2001
キメラ型抗 CD20 抗体	リツキシマブ	リツキサン注	2001
ヒト化抗 RS ウイルス抗体	パリビズマブ	シナジス筋注用	2002
キメラ型抗 TNF α 抗体	インフリキシマブ	レミケード点滴静注用	2002
キメラ型抗 CD25 抗体	バシリキシマブ	シムレクト静注用	2002
ヒト化抗 IL6 受容体抗体	トシリズマブ	アクテムラ点滴静注用	2005
カリケアマイシン結合ヒト化抗 CD33 抗体	ゲムツズマブオゾガマイシン	マイロターゲット点滴静注用	2005
ヒト化抗 VEGF 抗体	ベバシズマブ	アバスチン点滴静注用	2007
MX-DTPA 結合マウス抗 CD20 抗体	イブリツモマブ チウキセタン	ゼヴァリン イットリウム (90Y) 静注用セット	2008
MX-DTPA 結合マウス抗 CD20 抗体	イブリツモマブ チウキセタン	ゼヴァリン インジウム (111I) 静注用セット	2008
ヒト抗 TNF α 抗体	アダリムマブ	ヒュミラ皮下注	2008
キメラ型抗 EGFR 抗体	セツキシマブ	アービタックス注射液	2008
ヒト化抗 VEGF 抗体フラグメント	ラニビズマブ	ルセンティス硝子体内注射液	2009
ヒト化抗 IgE 抗体	オマリズマブ	ゾレア皮下注用	2009
ヒト抗補体 C5 抗体	エクリズマブ	ソリリス点滴静注	2010
ヒト抗 EGFR 抗体	パニツムマブ	ベクティビックス点滴静注	2010
<b>融合タンパク質</b>			
可溶性 TNF 受容体-Fc 融合タンパク質	エタネルセプト	エンブレル皮下注用、皮下注シリンジ	2005
CTLA4-改変 Fc 融合タンパク質	アバタセプト	オレンシア点滴静注用	2010

(注 1) 組換えタンパク質の一般名に含まれている” (遺伝子組換え)” は省略して表記

(注 2) 新有効成分医薬品として最初の製剤が承認された年を記載

2010年10月10日 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部が作成したものを参考に一部改変

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金  
「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」

分担研究報告書(平成 22 年度)

研究分担者 小関良宏 東京農工大学大学院共生科学技術研究院教授  
研究協力者 佐々木伸大 東京農工大学大学院共生科学技術研究院助教

研究要旨

近年、様々な遺伝子組換え植物の開発がなされている。特に、食用としたものではなく工業用原材料などのヒトが食した場合に、健康を害するような化合物を生産するような遺伝子組換え植物が開発されてきている。このような非食用の遺伝子組換え植物が食品の原材料となるような作物に混入した場合、深刻な被害が懸念される。そこで本研究では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出できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、多くの遺伝子組換え植物が食品としての安全性評価がなされ、市場に流通している。しかし、近年、食用となる植物種を使って遺伝子組換えによって、工業用原材料となる化合物を生産させる試みがなされている。これらは食用とすることを目的として作出されるものではなく、例えば工業用エタノールや、生分解性プラスチックの原材料など、ヒトが不用意に摂取した場合、健康被害が出る恐れがある。そこで、これらが食品市場に流通していないかについてモニタリングするための方法の開発が必要であると思われる。しかし、様々な遺伝子組換え植物が開発されている昨今では、流通する可能性のある組換え植物を絞り込むことは困難である。そのため、これまでに報告されている組換え遺伝子を網羅的に検出する方法の開発が望まれている。現在、遺伝子組換え植物の検知にはリアルタイム PCR 法が用いられることが一般的である。リアルタイム PCR 法は検出すべき対象の情報が確実に分かっている場合は検出感度や定量性もよく非常に有効な手段である。しかし、検出すべき遺伝子の種類の数が多い場合や、未知の混入物を検出することは困難である。

DNA マイクロアレイ法は検出すべき対象の DNA プローブを基板上に配置し、標識したサンプル DNA を基盤上のプローブとハイブリダイゼーションさせて、対象の遺伝子断片がサンプル中に存在しているかを検出する方法である。DNA マイクロアレイは数 cm 四方のガラス基板上に数万～数十万種類の DNA プローブを固定することが可能であることから、原理的には、一度のハイブリダイゼーションを行うことでそれだけの遺伝子断片を検出することが可能である。

当研究グループではこれまでに DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検出法の確立を目指して、トウモロコシをモデル材料として実験を行ってきた。昨年度までのところ、トウモロコシの内生遺伝子をプローブとして固定した DNA チップを用いて、2 mg のゲノム DNA を標識した場合にそれらの遺伝子を検出することが可能であることを報告した。しかし、実際に組換え遺伝子を検知する際には 2 mg のゲノム DNA を確保することが困難であることが多い。そこで、本年度は、マイクログラムオーダーでの検出を目指して DNA マイクロアレイのプロトコルの改良を行うとともに、実際に遺伝子組換えトウモロコシから抽出したゲノム DNA を用いて DNA マイクロアレイ

上での組換え遺伝子の検知を試みた。

## B. 研究方法

トウモロコシからのゲノム DNA は昨年度と同様に *N,N,N*-cetyltrimethylammoniumbromid (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  $4\mu\text{M}$  random nonamer,  $2\sim 2000\mu\text{g}$  の熱変性を行った鋳型 DNA,  $20\mu\text{M}$  dNTP,  $0.08\text{ U}$  Klenow fragment,  $1\times$  Klenow reaction buffer を含むように  $25\mu\text{l}$  の液量となるように調整した後に  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。  $65^\circ\text{C}$ 、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、 $2\sim 2000\mu\text{g}$  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  $250\mu\text{l}$  の液量となるように調整した後に  $37^\circ\text{C}$  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  $42\mu\text{l}$  の  $3\times$  SSC,  $0.3\%$  SDS 水溶液中で  $4\sim 16$  時間、 $65^\circ\text{C}$  で行った。アレイの洗浄は、標準の方法としては  $37^\circ\text{C}$  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。

## C. 研究結果

### 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  $1\times 10^7$  で検出が可能であった (図 1)。  $50\mu\text{g}$  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 (図 1 矢印)。特に併用法においては、 $10\mu\text{g}$  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 (図 1 矢印)。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、 $250\mu\text{g}$  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  $2\sim 10\mu\text{g}$  のゲノム DNA 量でも検出が可能であった (図 2)。一方、蛍光標識 DNA デンドリマーを用いた系では、 $50\mu\text{g}$  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 (図 2)。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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g 程度の収量であった。20  $\mu$ 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(図 4)。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。

#### D. 考察

今年度は、DNA マイクロアレイを用いて組換え遺伝子の検出を行うために、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。

#### E. 結論

未知の DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検出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出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出可能であるか検討する必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

- 1) 伊東 篤志、田口 朋之、和気 仁志、穠山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山田 晃世、小関 良宏「DNA チップを用いた遺伝子組換え食品の遺伝子非増幅検出法の検討」日本食品化学学会第 16 回 総会・学術大会(大阪) 2010 年 6 月 10 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

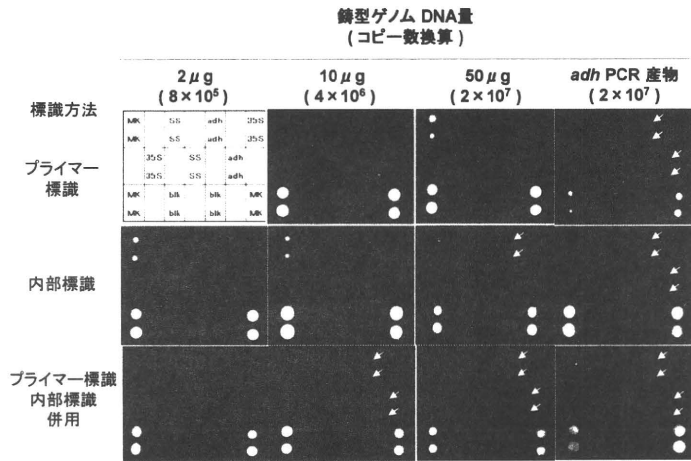


図1 内部標識法を用いた検出感度の確認

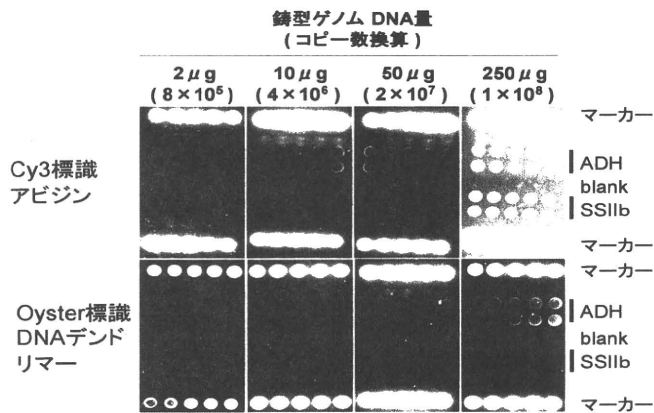


図2 ビオチン標識法を用いた検出感度の確認

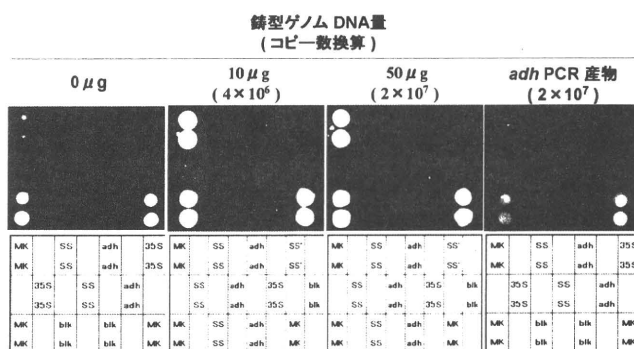


図3 反応条件変更後の検出感度の確認

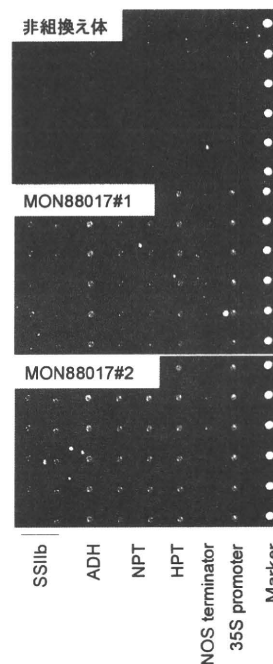


図4 遺伝子組換えトウモロコシゲノムを用いた DNA マイクロアレイ検出

## 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」

#### 医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

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  
研究協力者 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

##### 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、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、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。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。本年度はミラクリントタンパク質を生産するトマト組換え体を入手し、遺伝子レベルでのモデル検知実験を行うとともに、コレラトキシンBサブユニットを生産するイネについて遺伝子コンストラクトの作製及び本コンストラクトを導入したモデル組換えイネの作製を行った。

##### 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く、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、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、非食用バイオテクノロジー応用植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技術の開発を行う。

非食用遺伝子組換え植物の非組換え植物への混入を検知するシステムの構築のためには、陽性対照が必要である。遺伝子レベルでの PCR 等の手法による検知において、組換え体に導入されている遺伝子コンストラクトまたはその一部について、プラスミドベクターの形態で調製が必要である。また、組換え植物の生産するタンパク質を検知対象とする場合は、その対象タンパク質、または、検知対象タンパク質が生産・蓄積される組換え体植物の果実等植物体が必要となる。そこで、

本研究においては、味覚修飾タンパク質ミラクリンを生産するトマト（文献1, 2）、そして、コレラトキシンBサブユニットを生産するイネ（文献3, 4, 5）を対象として、陽性対照となるモデル組換え体植物体の入手、導入遺伝子コンストラクトの構築、そして組換え体の作出を行った。

## 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。ミラクリンタンパク質 (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。

ミラクリントマト (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、図 2 または図 3 に示す遺伝子領域を 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  $\mu$ L、sense-primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L antisense primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L、genome DNA 1  $\mu$ L。温度条件 : 94°C 5 min  $\rightarrow$  (94°C 30 sec  $\rightarrow$  58°C 30 sec  $\rightarrow$  72°C 1 min) x 30 cycle  $\rightarrow$  72°C 10 min  $\rightarrow$  4°C  $\infty$ 。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は図 4 に示す。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 *Hind*III-*Eco*RI 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 (*Nco*I 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、*Bsp*HI サイトを付加)。

(5' 末端が *Nco*I 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)

*Nco*I: C<sup>^</sup>CATGG (compatible)

*Bsp*HI: T<sup>^</sup>CATGA

・ *Bsp*HI 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、*Nco*I 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 *Bsp*HI サイト付加プライマー  
*ctxB*-*Bsp*HI-S  
5' -cccttcctcatgacacctcaaaatattact-3' (30 mer)

下線部: *Bsp*HI サイト

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

*ctxB*-KDEL-*Sac*I-A  
5' -atcggtgagctcacagctcgtccttatttggcactactaat 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*-*Bsp*HI-S + *ctxB*-KDEL-*Sac*I-A  
PCR 反応液: KOD-plus (TOYOBO) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ L, 10 x KOD-plus buffer 5  $\mu$ L, dNTP 5  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ L, Sense-primer (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L, antisense primer (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L, template DNA (plasmid DNA) 1  $\mu$ L。温度条件: 94°C 2 min → (94°C 15 sec → 62°C 30 sec → 68°C 90 sec) x 35 → 4°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°C) / 10 時間暗 (温度 23°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°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。

### C. 研究結果

#### 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](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 (図 1、2011 年 2 月 25 日公表)。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 (図 1)。

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表 1 に示した。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、バナナ、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 (エンドグルカナターゼ: 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tof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。

表1の企業等のうち、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(表2)。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(表3)。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(表4)。

## 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(図5)。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(図6)、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。MMWT及びMMMirの無菌培養物及び閉鎖温室で発芽した植物体の写真を図7に示す。

### 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(図3)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(図8)、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(図4)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(図9)。本組換え体は現在グロースチャンバーで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。

#### D. 考察

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、ベニバ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・g 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。

#### E. 結論

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であることを示した。

#### 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

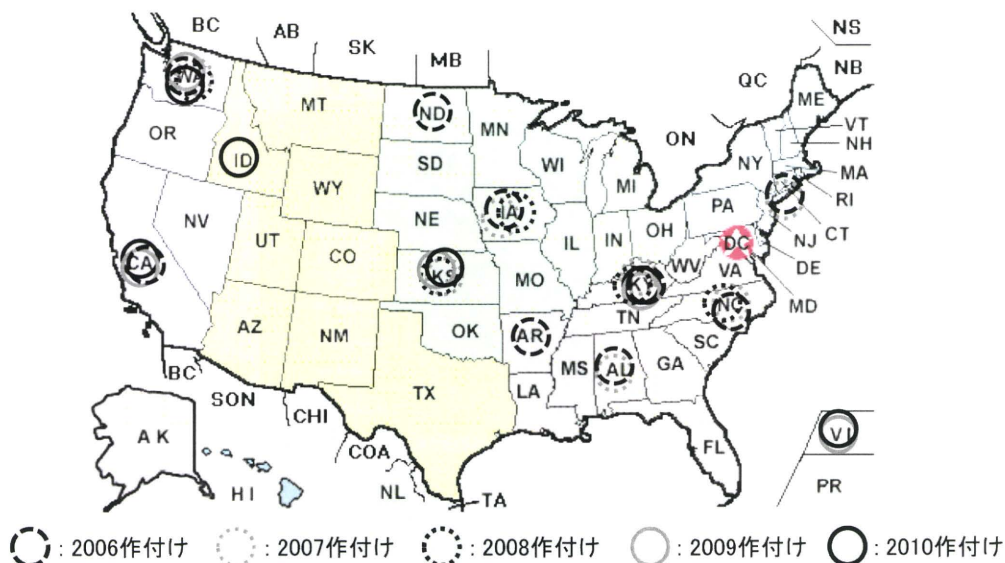
特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年
認可面積(エーカー)	589.00	811.08	2650.50	1554.00	773.00
作付け面積(エーカー)	181.64	176.08	459.28	96.90	64.13
作付け州	AL, AR, CA, CT, IA, KY, NC, ND, WA	AL, CT, IA, KS, KY, NC, WA	IA, KS, KY, NC, WA	CA, KS, KY, VI, WA	CA, ID, KS, KY, VI, WA

図 1. 薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け状況 (2006-2010、Feb. 25, 2011 公表) <sup>1)</sup>

表 1. 薬用及び環境浄化用 GM 植物-米国野外圃場作付け状況 2006-2010 年 (Feb. 25, 2011 公表)

企業等	作付け作物(生産物:作付け州)				
	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年
Applied Biotechnology Institute				トウモロコシ(B型肝炎ウイルス外殻タンパク質表面抗原: CA)	トウモロコシ(ブラゼイン, B型肝炎ウイルス外殻タンパク質表面抗原: CA)
Chlorogen, Inc.	タバコ <sup>*1</sup> (社外秘: KY)				
Edenspace Systems	タバコ(エンドグルカナーゼ: AR)				
Iowa State University	トウモロコシ(大腸菌易熱性腸管毒素Bサブユニット: IA)	トウモロコシ(大腸菌易熱性腸管毒素Bサブユニット: IA)	トウモロコシ(大腸菌易熱性腸管毒素Bサブユニット: IA)		
Kentucky BioProcessing		タバコ <sup>*2</sup> (ウシ肺アプロチニン: KY)	タバコ <sup>*2</sup> (ウシ肺アプロチニン: KY)	タバコ <sup>*2</sup> (ウシ肺アプロチニン: KY)	タバコ <sup>*2</sup> (ウシ肺アプロチニン, レクチン様タンパク質, プ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: KY)
Metabolix, Inc.				タバコ(ポリβヒドロキシブチレート: KY)	アマナズナ(ポリβヒドロキシブチレート: ID)
Novoplant	エンドウ(社外秘: ND)				
Planet Biotechnology	タバコ(抗虫菌抗体, 抗風邪ウイルス抗体: CA, KY)				
SemBioSys Genetics	ベニバナ(コイ成長ホルモン: WA)		ベニバナ(社外秘: WA)	ベニバナ(レンニン: WA)	
Venria Bioscience	イネ(ヒト血清アルブミン, ラクトフェリン, リゾチーム: NC)	イネ(ヒト血清アルブミン, ラクトフェリン, リゾチーム: NC, KS)	イネ(ヒト血清アルブミン, ラクトフェリン, リゾチーム, 社外秘: NC, KS)	イネ(ヒト血清アルブミン, ラクトフェリン, リゾチーム: KS, VI)	イネ(ヒト血清アルブミン, ラクトフェリン, リゾチーム, 社外秘: KS, VI)
Washington State University	オオムギ(ラクトフェリン, リゾチーム: WA)	オオムギ(ラクトフェリン, リゾチーム: WA)		オオムギ(ラクトフェリン, リゾチーム: WA)	オオムギ(ラクトフェリン, リゾチーム: WA)
Applied Phyto Genetics	ポプラ(水銀イオン還元酵素, 有機水銀分解酵素: AL, CT)	ポプラ(水銀イオン還元酵素, 有機水銀分解酵素: AL, CT)			
University of Washington			ハコヤナギ属(チトクローム P450 2E1: WA)		ハコヤナギ属(チトクローム P450 2E1: WA)

作物名あとの()内は, 生産物: 作付け州をしめす。

\*1: 葉緑体形質転換(葉緑体遺伝子への遺伝子導入)

\*2: 組換えタバコモザイクウイルス感染を利用した物質生産(タバコは非組換え植物)

表2. 2006-2010年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する特許及び文献等  
(区分別集計：352件)

区分	作物	件数	開発国
機能性食品	アマ、アビシニアガラシ、イチゴ、イネ、オオアラセイトウ、オリーブ、オレンジ、カラシナ、キャッサバ、クレソン、ゴマ、コムギ、サツマイモ、サトウキビ、ジャガイモ、ダイズ、テンサイ、トウモロコシ、トマト、ナタネ、ニンジン、ヒマワリ、ペニバナ、ラッカセイ、リンゴ、レタス、シロイヌナズナ、シンデッポウユリ、タバコ、タルウムゴヤシ、ペチュニア、ミヤコグサ	106	米国、カナダ、英国、フランス、ドイツ、スペイン、イスラエル、サウジアラビア、インド、オーストラリア、韓国、台湾、中国、日本
経口ワクチン	アルファルファ、イチゴ、オオムギ、サツマイモ、ジャガイモ、トウモロコシ、トマト、ニンジン、ハツカダイコン、レタス、シロイヌナズナ、タバコ、ミヤコグサ	51	米国、カナダ、メキシコ、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、スウェーデン、ロシア、オーストラリア、韓国、台湾、中国、日本
食用医薬	アマ、イチゴ、イネ、ジャガイモ、ダイズ、レタス、タバコ	34	米国、中国、日本
ワクチン抗原	イネ、タバコ	32	米国、カナダ、イタリア、スペイン、ロシア、南アフリカ、インド、ベトナム、韓国、中国、日本
抗体医薬	トウモロコシ、トマト、ウキクサ、シロイヌナズナ、タバコ、ヒメツリガネゴケ	32	米国、カナダ、キューバ、英国、ドイツ、オランダ、ベルギー、イタリア、ギリシア、スペイン、ハンガリー、イラン、オーストラリア、韓国、中国
治療薬	イネ、ウラルカンゾウ、オオムギ、コウケイテン、サツマイモ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ラッカセイ、ウキクサ、ケシ、クソニンジン、スウェルチア・ムソティ、セツレンカ、ゼニゴケ、セリバオウレン、タバコ、ニチニチソウ、ヒメツリガネゴケ、ペラドンナ、マダラハウチワマメ	59	米国、カナダ、英国、フランス、ドイツ、アイスランド、イタリア、フィンランド、ロシア、ヨルダン、イスラエル、韓国、中国、日本
診断薬・試薬	イネ、オオムギ、ジャガイモ、トウモロコシ、トマト、タバコ	12	米国、カナダ、アイスランド、中国、日本
環境浄化	イネ、カラシナ、タバコ、ジャガイモ、カバノキ、シダ、シバ、シャリンバイ、シロイヌナズナ、タバコ、トレンア、ペチュニア、ポプラ	31	米国、カナダ、スペイン、トルコ、イスラエル、インド、韓国、台湾、中国、日本

調査媒体 ・SciFinder 検索語「Transgenic plant」, 2006.1.1~2010.12.31  
・米国及び国内の関連学会講演要旨

複数区分にまたがる研究例は別々に集計した(区分別の集計集は、全件数より多くなる)。

表3. 2006-2010年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する特許及び文献等  
(国別集計：352件)

国名	区分								合計
	機能性食品	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	
米国	23	14	1	16	8	16	3	4	85
カナダ	1	1		1	1	2	4	1	11
メキシコ		2							2
キューバ					1				1
英国	3				5	3			11
フランス	1	1				2			4
ドイツ	9	1			3	1			14
オーストリア									0
オランダ					4				4
ベルギー					1				1
アイスランド						2	1		3
イタリア		1		1	1	1			4
ギリシア					1				1
スペイン	4	1		3	2			2	12
フィンランド						1			1
スウェーデン		1							1
ロシア		1		1		1			3
ハンガリー					1				1
トルコ								1	1
ヨルダン						1			1
イスラエル	1					2		1	4
イラン					1				1
サウジアラビア	1								1
南アフリカ				2					2
インド	1			1				1	3
ベトナム				1					1
オーストラリア	2	1			2				5
韓国	4	5		2	2	3		1	17
台湾	1	3						1	5
中国	16	10	1	1	1	8	2	6	45
日本	42	10	32	3		16	2	13	118
合計	109	52	34	32	34	59	12	31	363

2か国以上での共同開発は、別々に集計(件数より、国数の方が多い)

表4. 2006-2010年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する特許及び文献等  
(作物別集計：352件)

種別	作物	区分								合計
		機能性食品	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	
食用	アマ	2		1						3
	アビシニアガラシ	1								
	アルファルファ		3							3
	イチゴ	1		8						9
	イネ	17	6	13	1		1	2	3	43
	ウラルカンゾウ						1			
	オオアラセイトウ	1								1
	オオムギ		1				1	1		3
	オリーブ	1								1
	オレンジ	1								1
	カラシナ	1							1	2
	コウケイテン						1			1
	キャッサバ	1								1
	クレソン	1								1
	ゴマ	2								2
	コムギ	3								3
	サツマイモ	1	1				1			3
	サトウキビ	1								1
	ジャガイモ	2	8	1			2	2	1	16
	ダイズ	8		3						11
	テンサイ	1								1
	トウモロコシ	5	4				3	1		13
	トマト	14	8				2	1	1	26
	ナタネ	7								7
	ニンジン(細胞含む)	1	3				3			7
	ハツカダイコン		1							1
	ヒマワリ	1								1
	ベニバナ	1								1
	穀類	2								2
	油糧作物	2								2
ラッカセイ	1					1			2	
リンゴ	1								1	
レタス		6	6	7					19	
非食用	ウキクサ					3	1			4
	カバノキ								1	1
	ケシ						1			1
	クソニンジン						1			1
	シダ								1	1
	シバ								1	1
	シャリンバイ								1	1
	シロイヌナズナ	8	3			1			6	18
	シンテツポウユリ	1								1
	スウェルチア・ムソティ						1			1
	セツレンカ						1			1
	ゼニゴケ						3			3
	セリバオウレン						2			2
	タバコ(ウイルスベクター含む)	8	8	1	23	18	22	2	7	89
	タルウマゴヤシ	1								1
	トレニア								1	1
	ニチニチソウ						2			2
	ハルザキヤマガラシ									0
	ヒメツリガネゴケ						1	1		2
	ベチュニア	1							2	3
	ペラドンナ						2			2
	ポブラ								1	1
	マダラハウチワマメ						1			1
ミヤコグサ	1	1							2	
レンギョウ	3								3	
植物(細胞、ウイルスベクター含む)	14	5	1	8	5	11	5	8	57	
合計		109	53	34	24	28	50	9	26	333

複数作物を用いての研究開発は、別々に集計(件数より、作物数の方が多い)



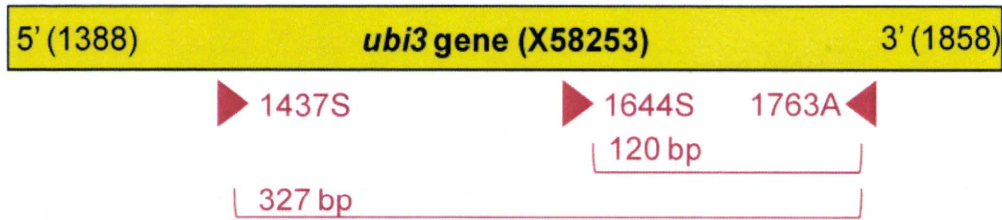


図2. 陽性対照として使用するハウスキーピング遺伝子*ubi3*特異的プライマーの位置

**Miraculin発現用コンストラクト**

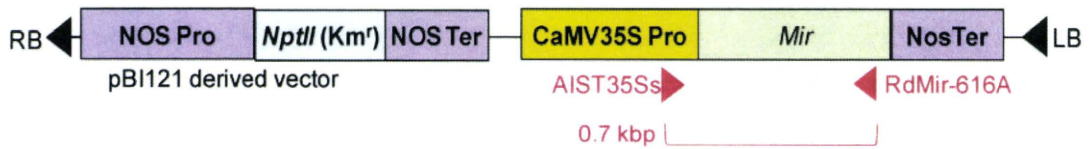


図3. ミラクリン発現用遺伝子コンストラクト及び検出用プライマーの位置

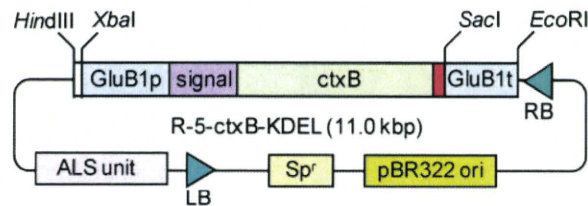
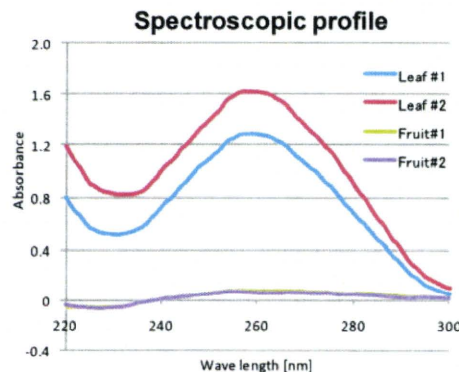
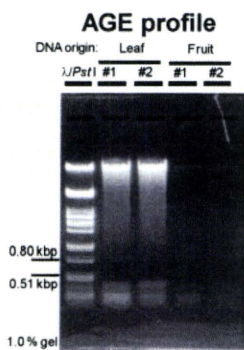


図4. CtxB発現コンストラクトを含むイネ遺伝子導入用ベクターの構造

GluB1p: イネグルテリンB-1プロモーター、signal: イネグルテリンB-1プロモーターシグナル配列、ctxB:コレラトキシンBサブユニット、赤色部分: KDEL配列、GluB1t: イネグルテリンB-1ターミネーター、RB, LB: right border and left border、ALS unit: ビスピリバックNa塩選抜ユニット、Sp<sup>r</sup>: スペクチノマイシン耐性遺伝子、pBR322ori: pBR322複製開始点



**Quality index (Average, n=2)**

Origin	Leaf	Fruit
A <sub>260/280</sub>	1.86	1.30
A <sub>260/230</sub>	2.23	-1.20
Conc.	72.6	3.5 ng/μL

果実より抽出したゲノムDNAは収量、品質が低い

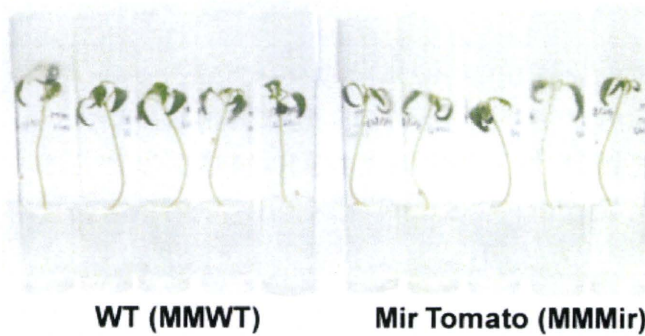
図5. 市販トマトの葉及び果実より調製したゲノムDNAの品質評価  
(左)電気泳動、(中央)吸光スペクトル



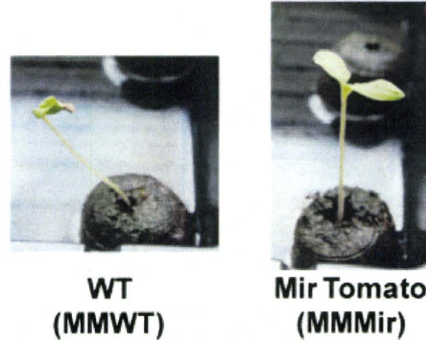
図6. トマト葉及び果実より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCRによる*ubi3*遺伝子の検出  
Lane #1-2: 葉、lane#3-6: 果実。プライマーセット: Slubi3-1437S + Slubi3-1763A (Lane: #1, 3, 5) Slubi3-1644S + Slubi3-1763A (Lane: #2, 4, 6)。

試験管内播種、培養

果実採取のための鉢栽培 (閉鎖温室)



Growth condition  
*In vitro* germination  
1/2MS medium, 2% Sucrose,  
0.25% Gelrite  
25°C, 16 hrs light



Growth condition  
ジフィーポット (サカタノタネ)  
25°C, 14 hrs light,  
55% relative humidity

図7. ミラクリントマト(MMMir)及び野生型株(MMWT)の  
無菌培養物(左)及び閉鎖系温室栽培(右)

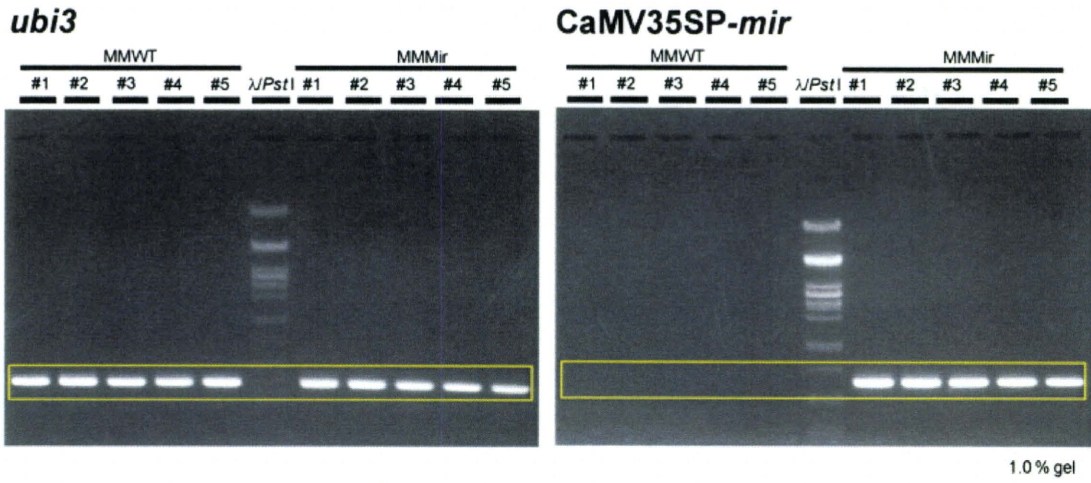


図8. MMWT及びMMMirの葉より調製したゲノムDNAを鋳型とした*ubi3*遺伝子及びミラクリン遺伝子のPCR法による検出の結果

Primer set: for *ubi3*: Slubi3-1437S + Slubi3-1763A (Left)  
 for CaMV35SP-mir: AIST35Ss + RdMir-616A (Right)

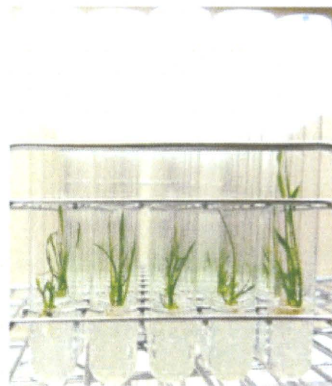


図9. 本研究で作製したモデル*ctxB*イネ無菌培養物

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 22 年度 分担研究報告書

医薬品用遺伝子組換え生物や再生医療用動物の調査研究

研究分担者 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

近年、非食用バイオテクノロジー応用魚や動物が多数報告されている。これらの非食用バイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料の食品への混入危害防止を考える必要がある。今年度は平成 21 年度の報告書以後に発表された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。これらの多くはゼブラフィッシュを使って遺伝子機能を研究した報告だった。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。本調査によって非食用バイオテクノロジー応用魚や動物の開発やその利用がとても活発であることが明らかになった。

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る。LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞を材料としてアダプターライゲーション法によって LoxP 配列の検出を目指す。今年度は GM ニワトリの ES 細胞からゲノミック DNA を抽出するまでを行った。

#### 研究協力者

手島玲子（代謝生化学部 部長）

#### A. 研究目的

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

タを選んでそれらの開発と実用化への動向を調査する。

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。したがって、非食用バイオテクノロジー応用魚や動物を作成するときに利用される抗生物質耐性遺伝子を標的としてそれらの検知法を作ることはできなくなると予想される。Cre / LoxP システムを利用するケースでは、Cre 遺伝子はバイオテク