

図 2-1. モデル乳酸菌 IGM232 株の接種後 24 時間培養におけるリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析

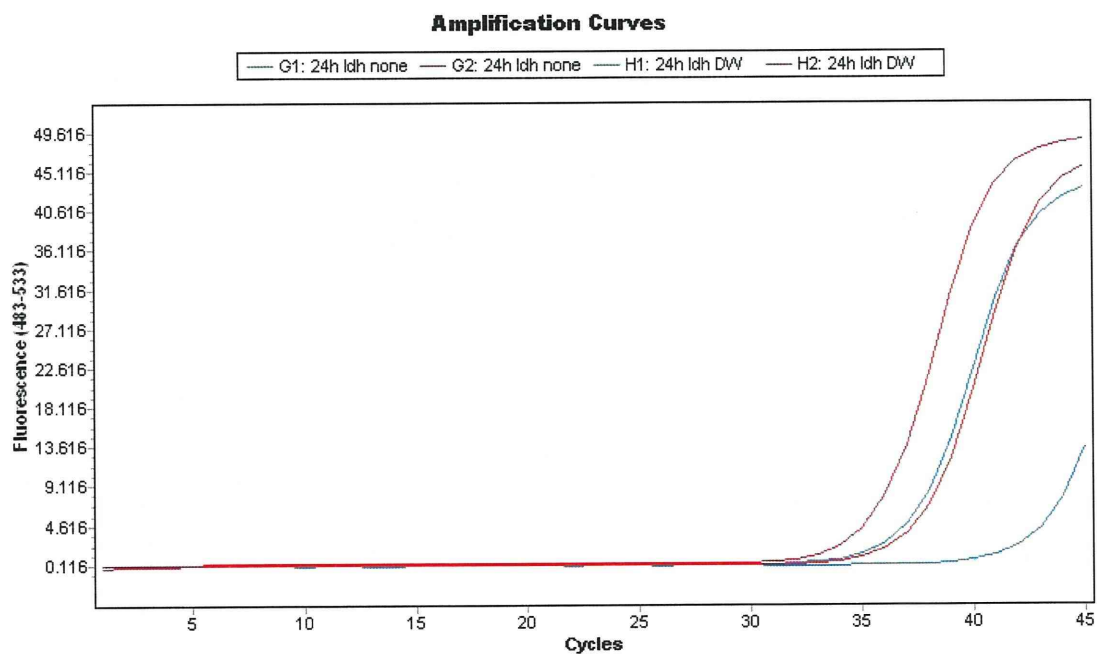
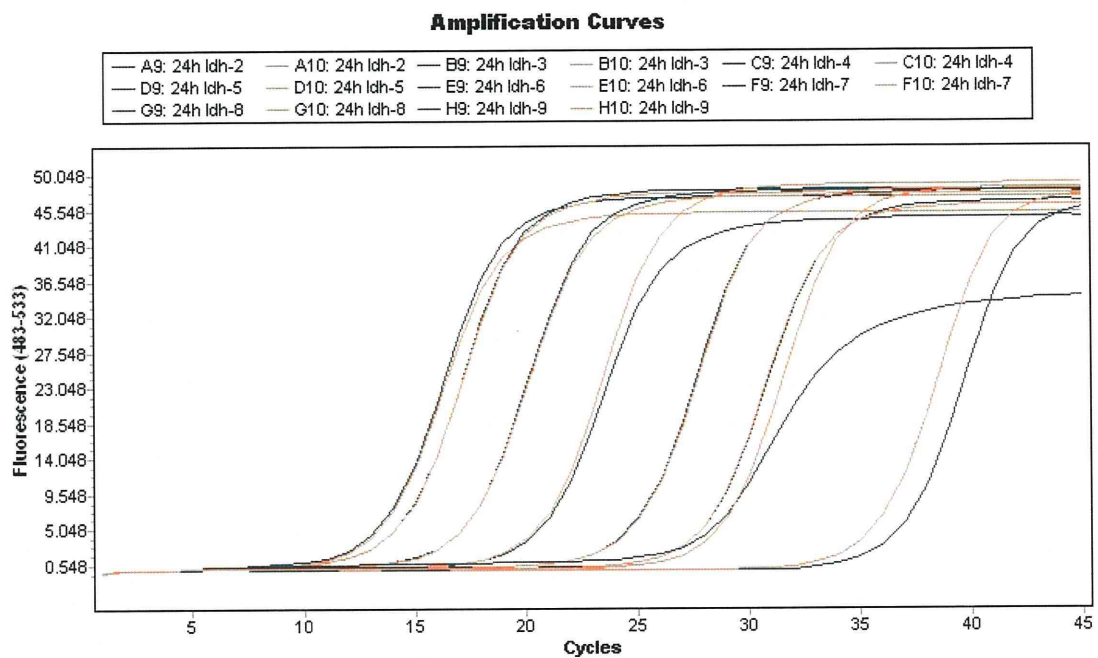


図 2-1. モデル乳酸菌 IGM232 株の接種後 24 時間培養におけるリアルタイム PCR による検知

b) *ery* 遺伝子を標的として分析

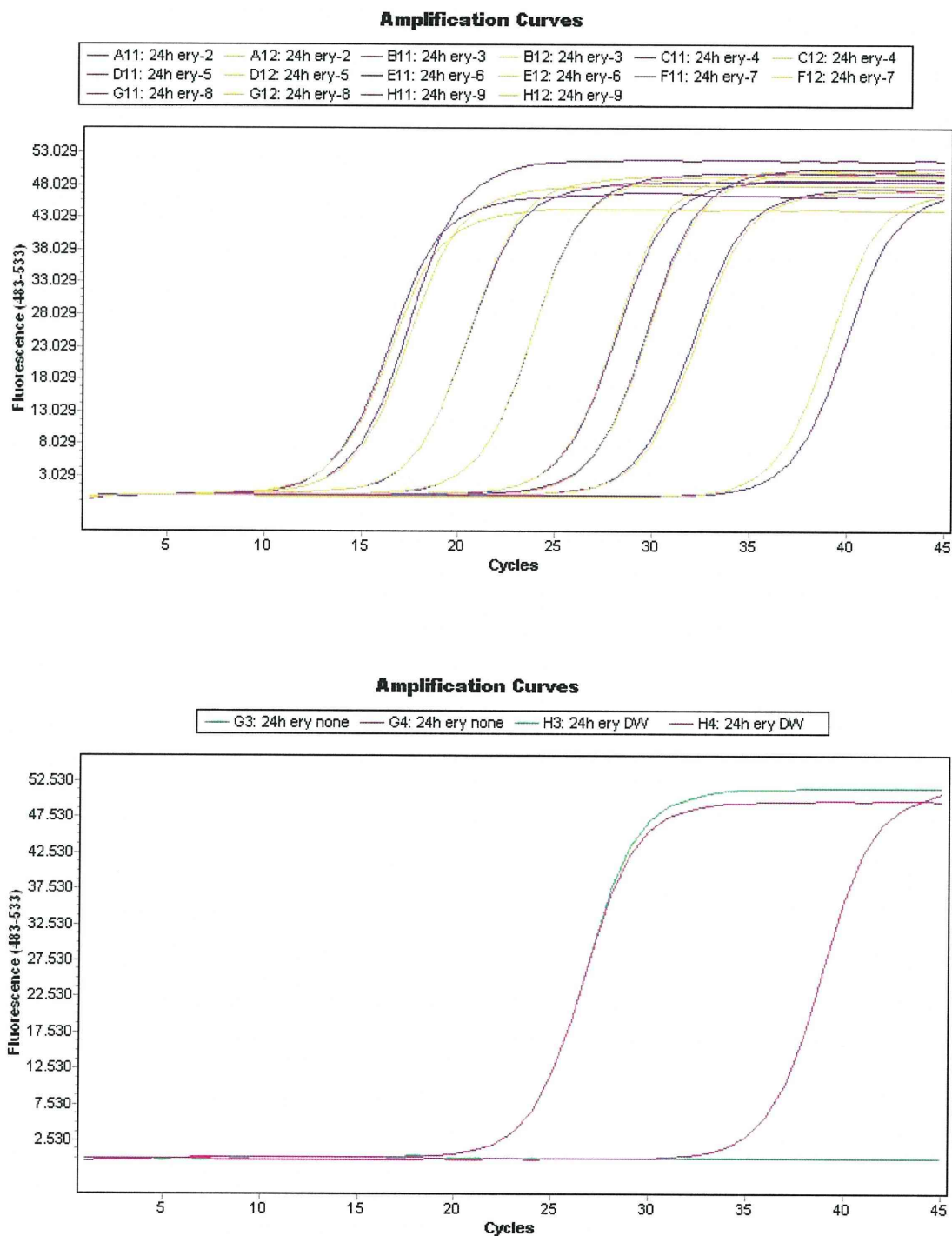


図 2-2. モデル乳酸菌 IGM393 株の接種後 24 時間培養におけるリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析

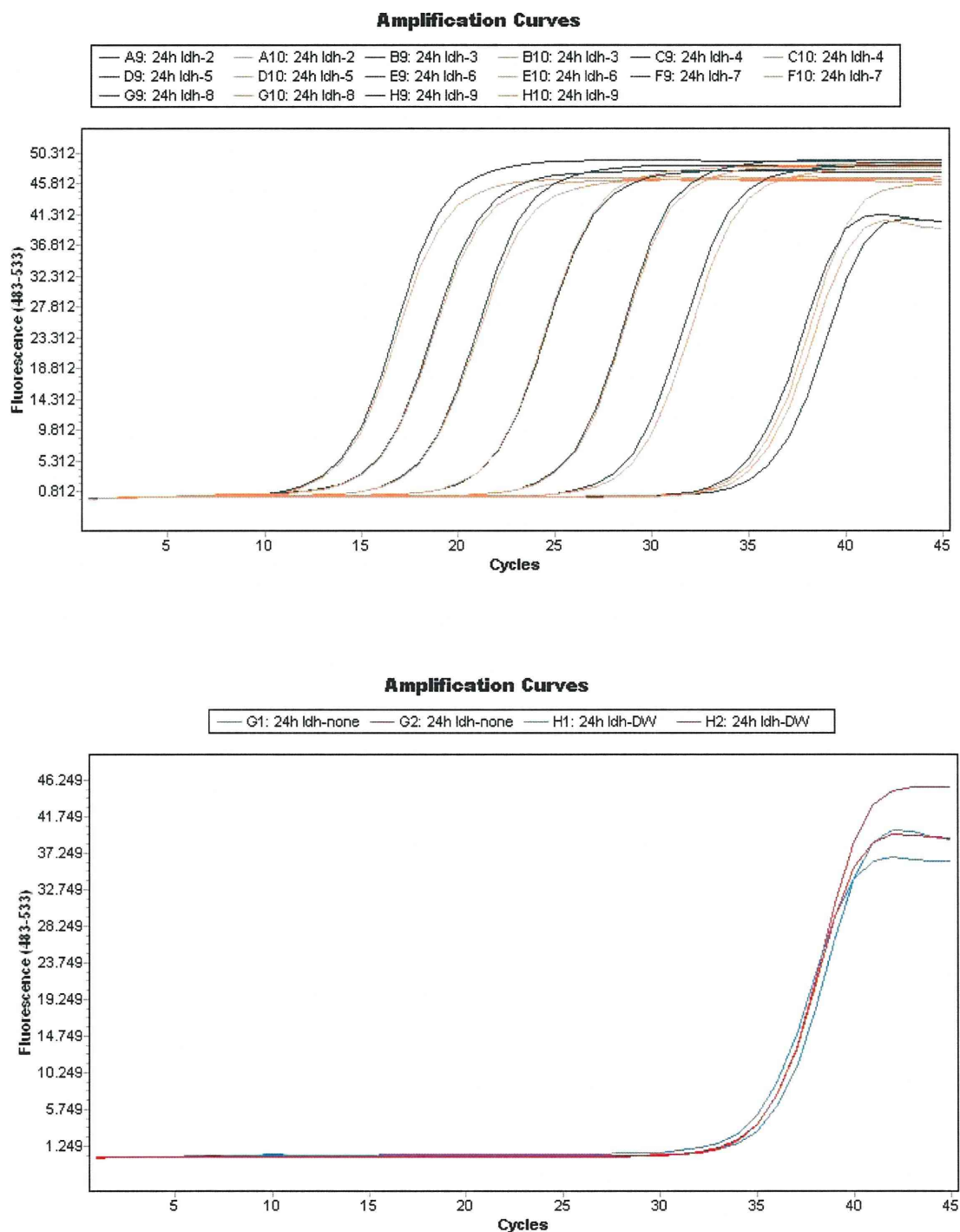
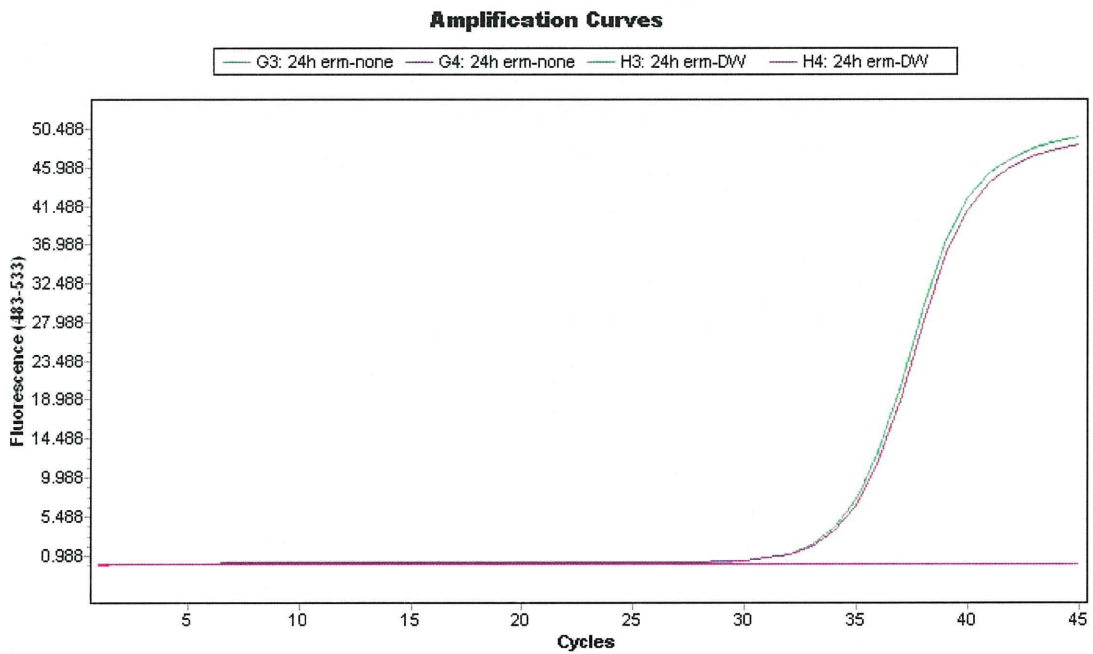
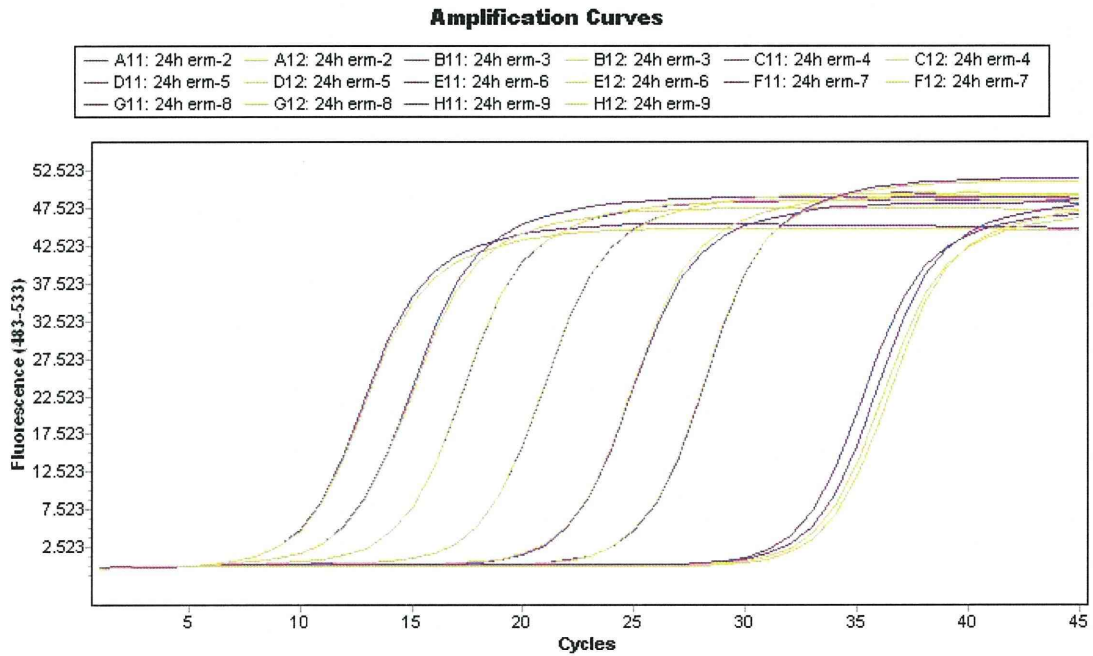


図 2-2. モデル乳酸菌 IGM393 株の接種後 24 時間培養におけるリアルタイム PCR による検知

b) *ermC* 遺伝子を標的として分析



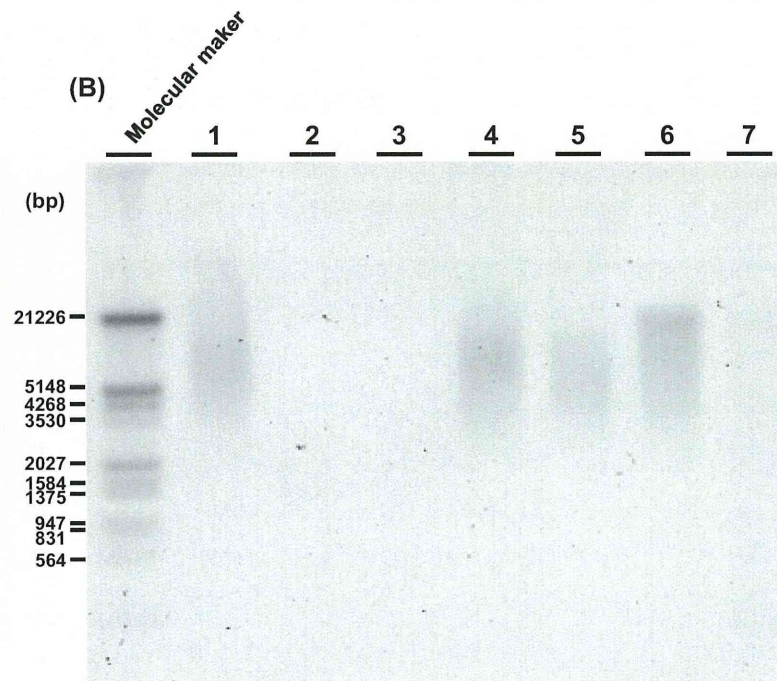
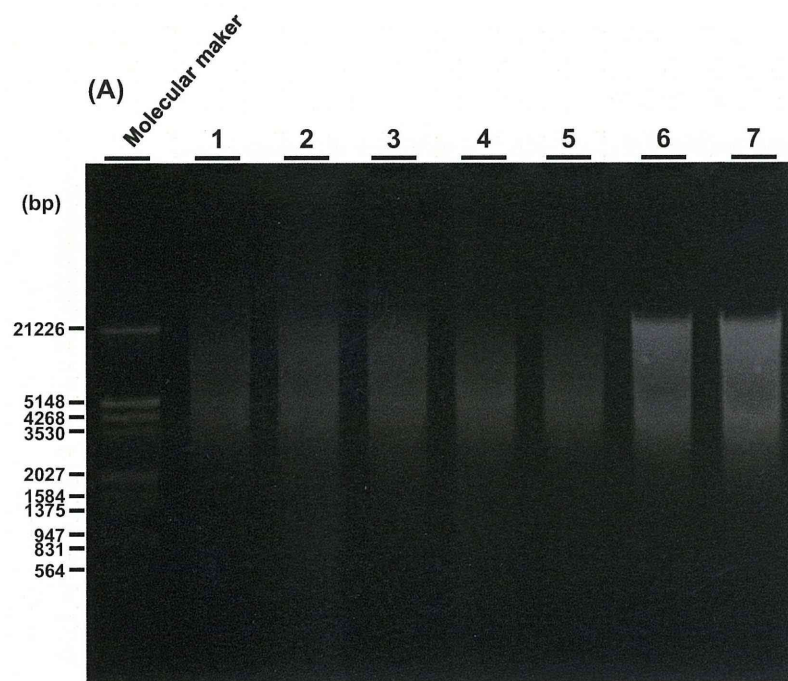


図3. *ery*プローブを用いたサザンブロット解析  
*Streptococcus salivarius* (レーン1, 4, 5)、*Staphylococcus hominis*. (レーン2, 3)、*L. casei* IGM232 (レーン6)、*L. casei* IGM393 (レーン7)のゲノム DNAをアガロース電気泳動した (A)およびそれをメンブレンに転写後、*ery*プローブでSouthern hybridizationを行い、*ery*遺伝子の存在を確認した(B)。



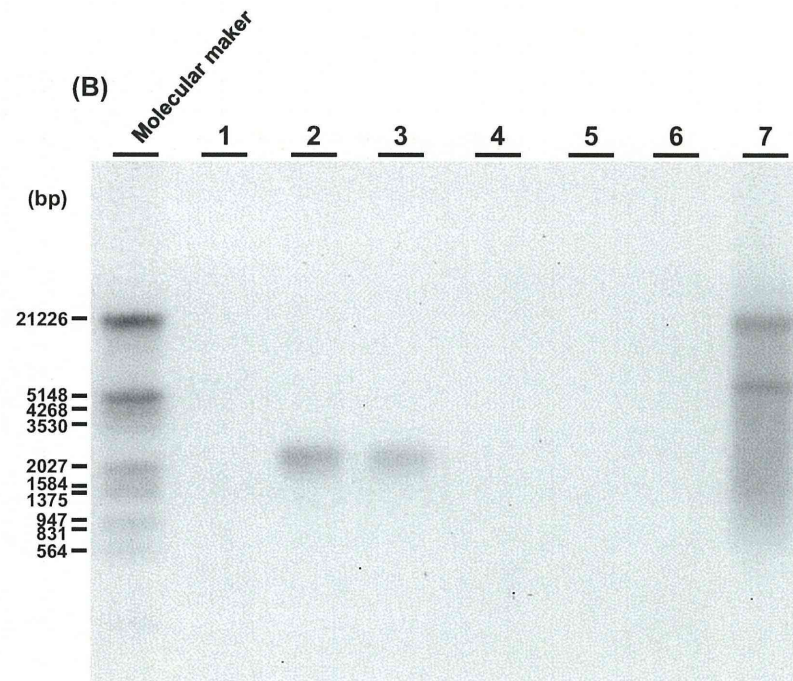
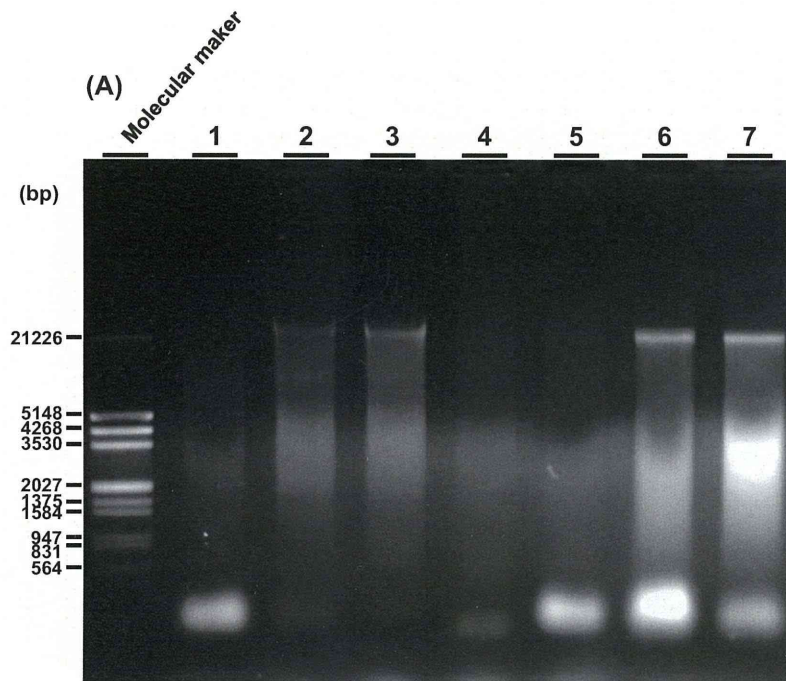


図4. *ermC*プローブを用いたサザンブロット解析

*Streptococcus salivarius* (レーン1, 4, 5)、*Staphylococcus hominis* (レーン2, 3)、*L. casei* (レーン6)、*L. casei* IGM393 (レーン7)のプラスミドDNAをアガロース電気泳動(A)およびそれをメンブレンに転写後、*ermC*プローブでSouthern hybridizationを行い、*ermC*遺伝子の存在を確認した(B)。

図5. *ery* (*erm*(B)) 遺伝子と *erm*(C) 遺伝子の相同性 431 / 729 (59%)

```

ery 1:ATGAAC---AAAAATATAAAATATTCTCAAACCTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAAC 57
ermC 1:ATGAACGAGAAAAATATAAAACACAGTCAAACCTTTATTACTTCAAACATAATATAGAT 60
      *****
ery 58:CAAATAATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATFGGAACAGGT 117
ermC 61:AAAATAATGACAAATATAAGATTAAATGAACATGATAATATCTTTGAAATCGGCTCAGGA 120
      ***** * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * *
ery 118:AAAGGGCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTA 177
ermC 121:AAAGGCCATTTTACCCTTGAATTAGTAAAGAGGTGTAATTTTCGTAACCTGCCATTGAAATA 180
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 178:GACAGTCATCTATTC-AACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAACATTCGTGTCACTTT 236
ermC 181:GACCATAAATTATGCAAAACTACAGAAAATAAACTTGTTGATCAGATAATTTCCAAGTT 240
      *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 237:AATTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTAACAAACAGAGGTATAAAATGTTGG 296
ermC 241:-TTAAACAAGGATATATTGCAGTTTAAATTTCCATAAAACCAATCCTATAAAATATATGG 299
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 297:GAATATTCCTTACCATTTAAGCACACAAATTATTAATAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGC 356
ermC 300:TAATATACCTTATAACATAAGTACGGATATAATACGCAAAATTGTTTTTGTATAGTATAGC 359
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 357:GTCTGCATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT--CTACAAGCGTACCTTGGATATTCAC 414
ermC 360:TAATGAGATTTATTTAATCGTGGAATACGGGTTTGCTAAAAGATTA--TTAAATACAAAA 417
      *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 415:CGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTGCAATTGCTTAAGCTGCCA 474
ermC 418:CGCTCATTGGCATTACTTTTTAATGGCAGAAGTTGATATTTCTATATTAAGTATGGTTCCA 477
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 475:GCGGAATGCTTTTCATCCTAAACCTAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAACTTACCCGCCAT 534
ermC 478:AGAGAATATTTTCATCCTAAACCTAAAGTGAATAGCTCACTTATCAGATTAAGTAGAAAA 537
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 535:ACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTC 594
ermC 538:AAATCAAGAATATCACACAAAGATAAAACAAAGTATAATTTTCGTTATGAAATGGGTT 597
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 595:AATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGCC 654
ermC 598:AACAAAGAATACAAGAAAATATTTACAAAAATCAATTTAACAATTCCTTAAAACATGCA 657
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 655:AAAGTAAACAATTTAAGTACCGTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAATAGTTAT 714
ermC 658:GGAATTGACGATTTAAACAATATTAGCTTTGAACAATTCCTATCTCTTTTCAATAGCTAT 717
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ery 715:CTATTATTTAACGGGAGGAAATAA
ermC 718:AAATTATTTAATAAGTAA-----
      ***** *

```

表1. モデル組換え乳酸菌IGM232株(クロムゾームに $ery$ 遺伝子保持)の接種菌数とThreshold cycle(Ct)値

培養時間	接種菌数 cfu/g	培養における		$ldh$ 遺伝子		$ery$ 遺伝子	
		コロニー形成 (n=3)	Ct値 (n=2)	コピー数	Ct値 (n=2)	コピー数	
0 h	$6 \times 10^5$	3/3	27.27	939	27.51	2003	
	$6 \times 10^4$	3/3	30.81	86	31.08	192	
	$6 \times 10^3$	3/3	34.02		35.11		
	$6 \times 10^2$	3/3	34.41		36.97		
	$6 \times 10^1$	3/3	34.38		39.24		
	$6 \times 10^0$	1/3	36.38		40.00		
	$6 \times 10^{-1}$	0/3	36.68		37.42		
	0	0/3	36.38		36.57		
24 h	$6 \times 10^5$	3/3	13.05	13,812,154	13.18	30,175,429	
	$6 \times 10^4$	3/3	13.94	7,575,872	14.16	15,623,589	
	$6 \times 10^3$	3/3	16.90	1,027,915	17.25	1,960,681	
	$6 \times 10^2$	3/3	20.23	108,654	20.62	203,871	
	$6 \times 10^1$	3/3	24.48	6,173	24.88	11,660	
	$6 \times 10^0$	3/3	27.60	752	26.57	3,747	
	$6 \times 10^{-1}$	3/3	28.06	551	28.90	783	
	0	3/3	35.90		23.52	29,067	

表中、網掛けはPCRにおける定量可能範囲を示す。

表2. モデル組換え乳酸菌IGM393株(プラスミド上に $ermC$ 遺伝子保持)の接種菌数とThreshold cycle(Ct)値

培養時間	接種菌数 cfu/g	培養における		$ldh$ 遺伝子		$ermC$ 遺伝子	
		菌の検知 (n=3)	Ct値 (n=2)	コピー数	Ct値 (n=2)	コピー数	
0 h	$6 \times 10^5$	3/3	27.56	772	23.61	32,246	
	$6 \times 10^4$	3/3	30.87	83	27.07	3,195	
	$6 \times 10^3$	3/3	33.98		31.14	211	
	$6 \times 10^2$	3/3	34.86		34.47		
	$6 \times 10^1$	0/3	34.90		36.13		
	$6 \times 10^0$	0/3	34.05		38.35		
	$6 \times 10^{-1}$	0/3	34.68		36.93		
	0	0/3	36.27		37.41		
24 h	$6 \times 10^5$	3/3	13.65	9,213,439	9.68	355,116,950	
	$6 \times 10^4$	3/3	15.55	2,556,208	11.76	88,479,586	
	$6 \times 10^3$	3/3	17.78	567,622	14.05	19,159,387	
	$6 \times 10^2$	3/3	21.30	52,780	17.71	1,661,131	
	$6 \times 10^1$	3/3	25.30	3,550	21.72	113,991	
	$6 \times 10^0$	3/3	28.61	380	24.95	13,172	
	$6 \times 10^{-1}$	3/3	35.28		32.81	69	
	0	3/3	35.15		34.22		

表中、網掛けはPCRにおける定量可能範囲を示す。



表3. *erm* 遺伝子群の一覧

Class	Gene name	Gene(s) included	GeneBank No.	
A	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (A)	X03216	
	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (TR)	AF002716	
B	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM)	X52632	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM)	Y00116	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM)	K00551	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (B)	M36722	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (B)	M11180	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (B)	X72021	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AMR)	U86375	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (BC)	M19270	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (P), <i>erm</i> (BP)	U18931	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (IP)	U00453	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (Z), <i>erm</i> (BZ1), <i>erm</i> (BZ2)	AF109075	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i>	U48430, X82819	
	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (2)	X64695, X66468	
C	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	J01755, V01278	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	M19652	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	M17990	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	X82668	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	Y09001	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	Y09002	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	Y09003	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (IM)	M13761	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (M)	M12730	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (M)	U82607	
	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (M)	AF019140	
	D	<i>erm</i> (D)	<i>erm</i> (D)	M29832
		<i>erm</i> (D)	<i>erm</i> (J)	L08389
<i>erm</i> (D)		<i>erm</i> (K)	M77505	
E	<i>erm</i> (E)	<i>erm</i> (E)	X51891	
	<i>erm</i> (E)	<i>erm</i> (E2)	M11200	
F	<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (F)	M14730	
	<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (F)	M17124	
	<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (FS)	M17808	
	<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (FU)	M62487	
G	<i>erm</i> (G)	<i>erm</i> (G)	M15332	
	<i>erm</i> (G)	<i>erm</i> (G)	L42817	
H	<i>erm</i> (H)	<i>car</i> (B)	M16503	
I	<i>erm</i> (I)	<i>erm</i> (I)	not done	
N	<i>erm</i> (N)	<i>tlr</i> (D)	X97721	
O	<i>erm</i> (O)	<i>lrm</i>	M74717	
	<i>erm</i> (O)	<i>srm</i> (A)	AJ223970	
Q	<i>erm</i> (Q)	<i>erm</i> (Q)	L22689	
R	<i>erm</i> (R)	<i>erm</i> (R)	M11276	
S	<i>erm</i> (S)	<i>erm</i> (SF)	M19269	
T	<i>erm</i> (T)	<i>erm</i> (GT)	M64090	
U	<i>erm</i> (U)	<i>lmr</i> (B)	X62867	
V	<i>erm</i> (V)	<i>erm</i> (SV)	U59450	
W	<i>erm</i> (W)	<i>myr</i> (B)	not done	
X	<i>erm</i> (X)	<i>erm</i> (CD)	M36726	
	<i>erm</i> (X)	<i>erm</i> (CX)	U21300	
Y	<i>erm</i> (Y)	<i>erm</i> (GM)	AB092817	
Z	<i>erm</i> (2)	<i>srm</i> (D)	AM709783	
30	<i>erm</i> (30)	<i>pikR1</i>	AF079138	
31	<i>erm</i> (31)	<i>pikR2</i>	AF079138	
32	<i>erm</i> (32)	<i>tlr</i> (B)	AJ009971	
33	<i>erm</i> (33)		AJ313523	
34	<i>erm</i> (34)		AY234334	
35	<i>erm</i> (35)		not done	
36	<i>erm</i> (36)	<i>erm</i> (MT)	AF462611	
37	<i>erm</i> (37)		BX842578	
38	<i>erm</i> (38)		AY154657	
39	<i>erm</i> (39)		AY487229	
40	<i>erm</i> (40)		AY570506	
41	<i>erm</i> (41)		EU177504	

Originally modified from FEMS 2008 282:147-159

## (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)

研究分担者 小関良宏 東京農工大学大学院共生科学技術研究院教授

### 研究要旨

近年増え続ける遺伝子組換え技術による遺伝子改変植物種は食品や飼料原料のみならず、工業原料用途での利用を目指したものも多い。これらの工業原料を生産するような遺伝子を組換え植物が食品の原材料等に混入した場合、健康被害をもたらすことが懸念される。そこで、本研究では、工業原材料生産用のモデル遺伝子として生分解性プラスチックの原料合成にかかわる遺伝子である *phbA*, *phbB* 遺伝子の標準プラスミドを構築した。さらにこれを用いて、トウモロコシから抽出したゲノム DNA へスパイク試験を行い、マイクロアレイ法を用いて検出可能であるかについて検討した。その結果、 $1 \times 10^8$  コピー程度の遺伝子断片が存在した場合に検出することが可能であった。また、DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知法がトウモロコシ以外の作物に適応可能であるか検討するために、コムギから抽出したゲノム DNA を用いて DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、 $10 \mu\text{g}$  のゲノム DNA を用いた場合、混入率 1% 程度までの組換え遺伝子を検出可能であることが示唆された。

### 協力研究者

佐々木伸大 東京農工大学大学院共生科学技術研究院助教

### A. 研究目的

近年、モダンバイオテクノロジー技術、すなわち遺伝子組換え技術を用いた生産性や付加価値をもつ植物が生み出されている。最近では大量のバイオマスとして確保可能である植物資源を用いて工業用原料等を植物で生産させるための試みがなされている。その場合には元来宿主となる植物種が生産していない化学物質を植物体内で合成させる必要があるが、それは他種生物の遺伝子を遺伝子組換え技術によって導入することによって達成されている。このような工業用原料となる化学物質は、食用となるものではなくこれらをヒトが食した場合には健康被害を招くおそれがある。これらの非食用となる工業原料を合成させる植物種もトウモロコシやジャガイモといった、元来は食用

として広く用いられ、現在でも食品として広く流通しているものである。そのため、非食用の遺伝子組換え植物が市場に流通している食用のものに混入する可能性も否定できず、そのような混入を避けるために遺伝子組換え植物の流通をモニタリングする必要がある。また、最近是非食用のものも含めて、多種多様の遺伝子組換え植物が生産されており、現在も使用される組換え遺伝子の数は増え続けている。そのため、組換え遺伝子を網羅的に検出する技術の開発が望まれている。

そのため本分担研究においては DNA マイクロアレイ技術を組換え遺伝子の網羅的検知技術へと応用すべく研究を行ってきた。昨年度までにマイクロアレイ上に固定化した組換え遺伝子プローブを用いて組換え遺伝子を高感度で検出するためのプロトコールの開発を行ってきた。そこで、本年度は実際に生分解性プラスチックの原材料である polyhydroxybutylate (PHB) を合成するための遺伝子として頻用され

ている *phbA* と *phbB* 遺伝子を検出することを一つのモデル系として検討することを目的として、それらの標準プラスミドを構築すること、またその標準プラスミドをトウモロコシ由来ゲノム DNA へスパイクした場合の混入率の検出下限を確認するための実験を行った。

また、マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検出技術がトウモロコシ以外の植物材料に対応できるかについて検討するために、コメから抽出したゲノム DNA を用いて、DNA マイクロアレイ上で組換え遺伝子を検出可能であるかについての検討を行った。

## B. 研究方法

*phbA*, *phbB* 遺伝子の標準プラスミドは、バイナリーベクター pBI121 (Accession No. AF485783) のカリフラワーモザイクウイルス 35S(35S)プロモーターと NOS terminator の間に *Alcaligenes eutrophus* 由来の *phbA* 遺伝子あるいは *phbB* 遺伝子 (Accession No. J04987) の first ATG からストップコドンまでを連結したものを pUC19 プラスミドのマルチクローニングサイトの EcoRI サイトと HindIII サイトの間にそれらのサイトが残らないように挿入するように構築した。

トウモロコシからのゲノム DNA の抽出は昨年度と同じ方法で行った。コメからのゲノム DNA 抽出はシリカメンブレンカラムを用いた精製キットである GM quicker ver.2 (ニッポンジーン社製)を用いて行い、抽出方法はキットのマニュアルに従った。ただし、抽出バッファーをマニュアルに記載の 5 倍量を用いた。遺伝子組換えコメとしてアイスプラント由来の ribosomal binding protein (RBP) 遺伝子を 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に連結するように設計したコンストラクトをコメ品種「ニッポンバレ」に導入したものをを用いた。

マイクロアレイに用いるターゲット DNA の標識は Cy3 標識の dCTP を用いてランダムプライム法によって行った。ハイブリダイゼーショ

ン条件等は昨年度と同様の方法で行った (平成 22 年度報告書)。ただしマイクロアレイ上のプローブの位置は各図に示すように配置した。

マイクロアレイを用いたトウモロコシゲノム DNA への *phb* 遺伝子をスパイクした時の検出感度の検討は、非組換えトウモロコシから抽出したゲノム DNA 30 $\mu$ g に、標準プラスミドを鋳型として 35S-*phbA* (*phbB*)-NOS の領域を PCR 法によって増幅した DNA 断片を  $1.0 \times 10^8$  あるいは  $1.0 \times 10^9$  コピーとなるようにスパイクしたものをターゲット DNA として調製してマイクロアレイ解析に供した。

コメを用いた組換え遺伝子の検出感度の検討は、遺伝子非組換えニッポンバレから抽出したゲノム DNA と RBP 組換えニッポンバレから抽出したゲノム DNA を遺伝子組換えコメの割合が 0, 1, 5, 10, 50, 100% となる用に混合し、トータルで 10  $\mu$ g となる用に調整したものをターゲット DNA として標識を行った後にマイクロアレイ解析に供した。

## C. 研究結果

### C-1 *phbA*, *phbB* 標準プラスミドの構築

これまでにアマやイネ、ジャガイモを用いて PHB を生産させるために PHB 合成にかかわる遺伝子である *phbA*, *phbB*, *phbC* 遺伝子を導入した植物体を作成する試みがなされている (Plant Physiology (2002) 128: 1282-1290; Plant Biotechnology Journal (2005) 3:249-258)。これらの研究では遺伝子組換え植物の作出で頻用されているベクター pBI121 の 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus* 由来の *phb* 遺伝子を組み込み、これを用いて組換え植物を作出している例が多く報告されている。しかしこれらの遺伝子組換え植物は研究段階であり、実際に流通している報告は無いため、最もよく使われている 35S プロモーターと NOS ター

ミネーターの間に *phbA*, *phbB* 遺伝子を組み込んだ配列を大腸菌内でのコピー数が多く取り扱いやすいベクターである pUC19 へ導入することで標準プラスミドの構築を行った (図 1)。

#### C-2 マイクロアレイを用いた *phb* 遺伝子の検出

現時点で非食用遺伝子組換え植物は日本国内では流通していないため、作成したプラスミドを鋳型として PCR によって増幅した DNA 断片を遺伝子非組換えトウモロコシゲノム DNA にスパイクした場合にマイクロアレイ法によって検出することが可能であるかについて検討を行った。その結果、*phb* 遺伝子をスパイクした場合、していない場合にかかわらず、トウモロコシ内在性の遺伝子である sucrose synthase IIb (*ssIIb*) 遺伝子のプローブのスポット部分では蛍光が観測された (図 2 点線囲み)。これに対し、*phbA*, *phbB* 遺伝子をそれぞれ  $1.0 \times 10^8$  あるいは  $1.0 \times 10^9$  コピーとなるようにトウモロコシゲノム DNA にスパイクした場合には各々の遺伝子に対応するプローブのスポットでは蛍光が観測され、スパイクしていない場合にはそれらのプローブのスポット位置では蛍光が観測されなかった (図 2 実線囲み)。これらのことから、マイクロアレイ法を用いて *phbA*, *phbB* 遺伝子をそれぞれ特異的に検出することが可能であることが示唆された。

#### C-3 マイクロアレイを用いたコメからの組換え遺伝子の検出

RBP 遺伝子組換え、非遺伝子組換えコメ可食部 500 mg からゲノム DNA を抽出したところ、それらの収量は数  $\mu\text{g}$  ~ 十数  $\mu\text{g}$  程度であった。それら得られたゲノム DNA を遺伝子組換えコメ由来のゲノム DNA が相対比で 0, 1, 5, 10, 50, 100% となる様にトータルで 10  $\mu\text{g}$  となる様に混合し、DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、いずれの遺伝子組換えコメゲノム DNA 混入率においても

コメ内在性遺伝子である sucrose phosphate synthase (SPS) 遺伝子のプローブのスポット位置において蛍光が観測された (図 2)。遺伝子組換えコメ由来 DNA の混入率が 100% の場合には、35S プロモーターと NOS ターミネーター遺伝子のプローブのスポット位置において明らかな蛍光が観測され、その混入率が下がるにつれてその蛍光は弱まり、混合率 0% においては観測されなかった (図 2)。これらの結果から、コメから抽出したゲノム DNA を用いた場合には遺伝子組換え遺伝子を混入率 1% 程度まで検出することが可能であることが示唆された。

#### D. 考察

非食用の遺伝子組換え植物は現在までのところ国内において流通はしていないが、開発自体はなされていることから、これらの組換え遺伝子の検知法を開発しておくことは重要であると考えられる。本研究では一つのモデルケースとして、生分解性プラスチックの原料である PHB 合成にかかわる遺伝子である *phbA*, *phbB* 遺伝子が、トウモロコシゲノムに混入した場合にマイクロアレイ法を用いて検知可能であるかについて検討を行った。その結果、それらの遺伝子断片がトウモロコシゲノム 30  $\mu\text{g}$  あたりに  $1.0 \times 10^8$  コピー存在した場合に検出可能であることが判明した。この検出感度は昨年度までの報告から少なくとも混入率 100% であれば組換え *phb* 遺伝子を検知可能である感度であった。トウモロコシゲノムは約 23 億塩基対であり、食用となる主要な作物の中でもそのサイズが大きい。そのため、トウモロコシゲノムを用いて検出することが可能であれば、他植物への応用が十分可能であると期待される。そこで、日本国における主食であるコメについてマイクロアレイ法による組換え遺伝子の検出が可

能であるかについて検討を行った。その結果、コメを用いた場合には組換えコメの混入率が 1%程度であっても十分に検知可能であることが示唆された。これはコメのゲノムサイズは約 4 億塩基対程度であり、トウモロコシゲノムに比較して十分に小さいことからグラム当量の組換え遺伝子のコピー数が高くなったためであると考えられた。

#### E. 結論

遺伝子組み換え技術によって植物で生分解性プラスチックの原料の一つである polyhydroxybutylate を生産させるために利用されている遺伝子である *phbA*, *phbB* 遺伝子についてその標準プラスミドを構築した。それを用いてトウモロコシゲノム中の *phbA*, *phbB* 遺伝子を検知可能であるかについて検討したところ、昨年度までと同等の感度で、それぞれの遺伝子を特異的に検出することが可能であることが判明した。また、マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知法を日本国における主食であるコメに応用するために、遺伝子組換えコメから抽出したゲノム DNA と非遺伝子組換えコメから抽出したゲノム DNA を一定の割合で混合し、マイクロアレイ解析に供した。その結果、遺伝子組換えコメ中の組換え遺伝子を混入率 1%程度まで検知することが可能であることが示唆された。

#### 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

特になし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし



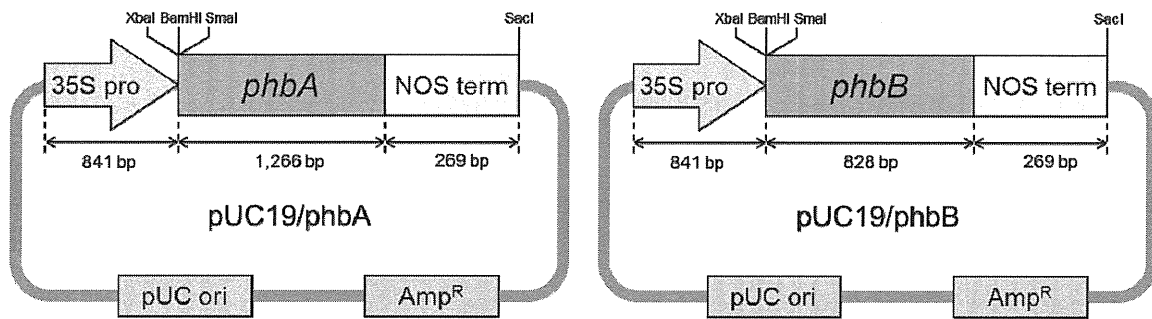


図1 phbA, phbB 遺伝子標準プラスミドのコンストラクト図

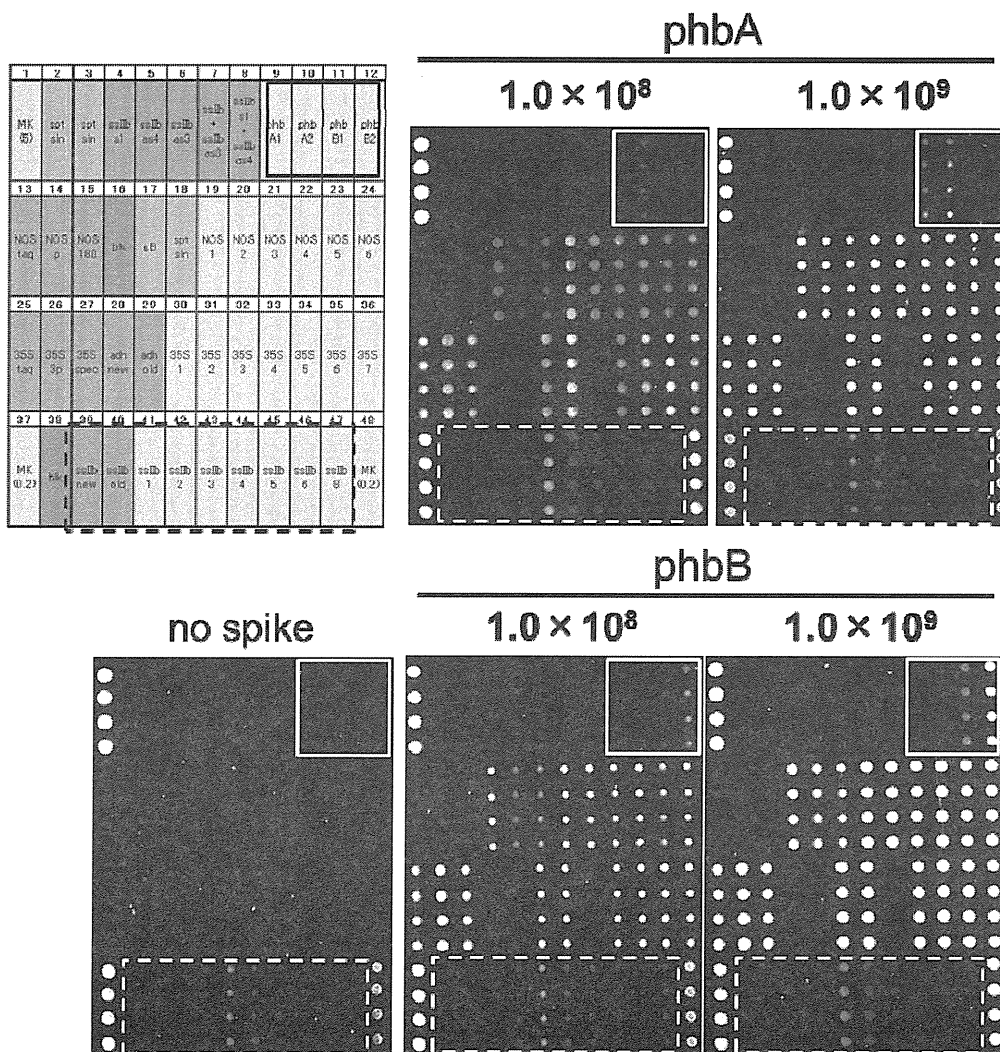


図2 マイクロアレイを用いたトウモロコシゲノム DNA にスパイクした phbA, phbB 遺伝子の検出画像

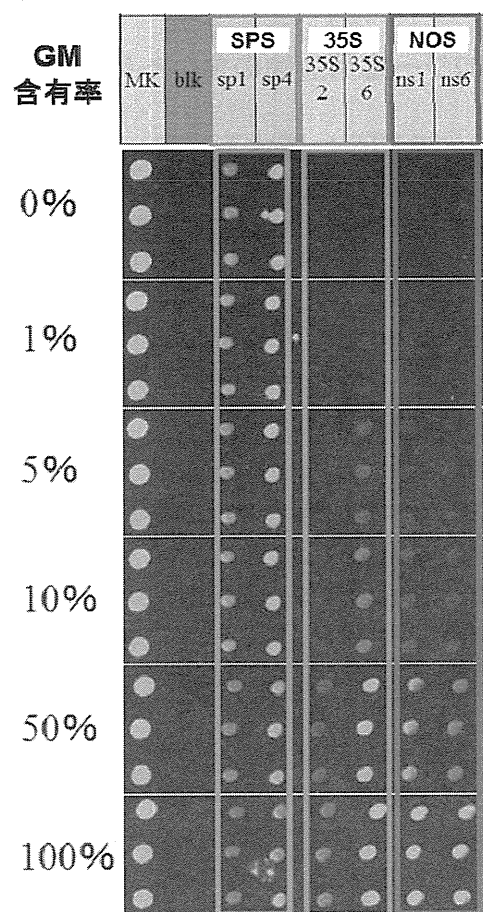


図3 マイクロアレイを用いたコメから抽出したゲノム DNA 中の組換え遺伝子の検出画像

SPS: sucrose phosphate synthase 遺伝子; 35S: カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配; NOS:

## 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)

### 「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、2006～2010年に収集した薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する情報405件を、1) 機能性食品、2) 経口ワクチン、3) 食用医薬、4) ワクチン抗原、5) 抗体医薬、6) 治療薬、7) 診断薬・試薬、8) 環境浄化の8カテゴリー別に集計した結果、機能性食品：120件、経口ワクチン：65件、食用医薬：25件、ワクチン抗原：36件、抗体医薬：36件、治療薬：76件、診断薬・試薬：15件、環境浄化：40件であり、機能性食品、経口ワクチン及び治療薬に関するものが多かった。使用された食用作物は、イネ：51件、トマト：28件、レタス：22件、ジャガイモ：18件、トウモロコシ：15件であった。2011年のSciFinder®での調査結果では、機能性食品：17件、経口ワクチン：9件、食用医薬：1件、ワクチン抗原：0件、抗体医薬：3件、治療薬：8件、診断薬・試薬：1件、環境浄化：8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、又は作出を行った。本年度はミラクリンタンパク質を生産するモデル組換えトマトの自殖種子を取得するとともに、コレラトキシンBサブユニットを生産するモデル組換えイネの導入コンストラクトコピー数のリアルタイムPCR法による見積もり、ならびに自殖種子の取得を行い、コメ1粒を試料とする遺伝子検知法を確立した。

##### 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・蓄積される組換え植物の果実等の植物試料が必要となる。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）、及びコレラトキシン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植物体の入手、導入遺伝子コンストラクトの構築と組換え体の作出を進めている。今年度は、ミラクリントマトについては自殖種子の取得を、コレラトキシンBサブユニット生産イネについては、形質転換体の馴化栽培、リアルタイムPCR法による導入遺伝子コンストラクトコピー数の見積もり、コメ1粒を試料とする組換えイネ検知法の開発を行った。

## 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～2011 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。また、2011 年は、国内学会の情報と SciFinder® の情報は、別々に集計を行った。

#### 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

#### 2011 年

- ・ SciFinder®（キーワード：transgenic plant）
- ・ 第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム（福岡）講演要旨集

### 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

トマト品種 Moneymaker（非組換え）株（MMWT）

'TOMJPF00002' は National BioResource Project (NBRP) より有償で分譲を受けた。ミラクリントマト (Mir) 生産トマト (MMMir) は系統 '5B' cv. MoneyMaker は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。

#### 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)、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 (配列不詳) 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 pSTAR R-5 ベクターはインプラントイノベーションズより購入した。

#### ミラクリントマト (MMMir) の無菌培養系の確立

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、1/2 濃度 Murashige and Skoog (MS)、2% sucrose、0.25% gelrite [1/2MS (2)G] 培地に無菌的に播種した。現在、MS、3% sucrose、0.3% gelrite [MSG (0.3)] 培地で継代培養を行っている。

#### ミラクリントマト (MMMir) の栽培

ジフィーセブン水でふくらむタネまき土ポット (サカタのタネ) に播種後、発芽した実生を 5 寸鉢 (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 55%、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。

#### イネ形質転換体の作製

CtxB タンパク質発現コンストラクトの構築及

び、イネの形質転換 (インプラントイノベーションズ社に委託) については、前年度報告書の通りである (文献 6)。

#### イネ形質転換体の馴化栽培

インプラントイノベーションズより受領したイネ形質転換体候補株 (試験管培養部物 20 本) は、キメラになっている可能性を考慮し、1 本の試験管内のシュートについて、基部で分割できるものは分割し、馴化栽培に供した。

シロイヌナズナ栽培用のアラシシステムに、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) を充てんし、これに分割した幼植物体を定植した。土表面と同じ高さまで灌水し、14 時間明 (温度 28°C) / 10 時間暗 (温度 23°C) のグロースチャンバーに設置した。なお、相対湿度は全期間を通じ 60% とした。野生株は日本晴 WT 種子をシャーレ上播種し、播種 3 日後に芽生えをアラシシステムに定植した。成長に伴い、それぞれの株をアラシシステムのプラスチックチューブで囲い、栽培を継続した。CtxB 系統定植 15 日後、WT 播種 31 日後に、すべての株を 5 寸のポリポット (用土同上) に移植し、土表面の高さまで水を灌水するよう自動灌水装置をセットした。

CtxB 系統移植後 29 日、WT 播種後 61 日後に 10 時間明 (温度 28°C) / 14 時間暗 (温度 23°C) の短日条件へと日長変更を行った。また、同日、くみあい尿素入り窒素加里化成 2 号 NK2 (16-0-16) を鉢ごとに 3 g 追肥した。CtxB 系統定植後 129 日目、WT 播種後 146 日目に収穫し、自然乾燥後、種籾として収穫した。

#### イネ形質転換体 (候補) における ctxB 遺伝子コピー数の解析

イネ形質転換体 (候補) 株における ctxB 遺伝子の導入コピー数の解析は realtime-PCR 法により行った。鋳型遺伝子量の基準となる対照遺伝子にはイネゲノム DNA 上にシングルコピーで存在する *DSH1* 遺伝子 (文献 7) のプロモーター (*DSH1p*) 領域を設定し、*DSH1p* 領域との存在比の比較により、ctxB 遺伝子の存在量 (コピー数) を推定する方法を採った。なお、鋳型となる遺伝子の存在比の計算には  $\Delta \Delta Ct$  法の適用が可能であったため、同法を採用した。

Realtime-PCR に使用したプライマー配列は下



記のとおりである。

for DSH1p (amplicon 67 bp)

DSH1p-rtS1:5' -CCGCATTGCTTCGCTATAAGT-3'

DSH1p-rtA1:5' -GCTCCGAGGTGAGTGGATATG-3'

for *ctxB* (amplicon 91 bp)

*ctxB*-rtS1:

5' -GAATGGTGCAATTTTCAAGTAGAAGT-3'

*ctxB*-rtA1: 5' -CCTCAGGTATCCTTCATCCTTT-3'

また、realtime-PCRには機器：ABI PRISM 7000 (ABI)、試薬：SYBR® Premix Ex Taq™II (TakaraBio)をプロトコルに従い使用した。Ct値の計算は、自動(auto threshold)または手動(manual: 0.1)で行った。なお、鋳型としたゲノムDNAはイネ各株の新鮮葉約100 mgからDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用い調製した。

#### 登熟過程穎果における *ctxB* 遺伝子の発現解析

導入された *ctxB* 遺伝子のコピー数を確認した代表的な3系統について、登熟過程にある未熟種子(穎果)における *ctxB* 遺伝子の発現の有無についてRT-PCR法により解析を行った。

未熟なイネの果実(穎果)3粒を採取し、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用し、total RNAを調製した。TURBO DNA-free Kit (Ambion)を用いDNase処理を行った後、AccessQuick™ RT-PCR System (Promega)を使用し、RT-PCRを行った。プライマーには、*ctxB*-BspHI-S + *ctxB*-KDEL-SacI-Aのセットを使用し、PCR産物の量、すなわち転写産物の量はアガロース電気泳動のバンドの強度により半定量的に推定した。

#### T<sub>1</sub>種子(コメ)1粒における遺伝子導入確認

コメ(種籾)1粒からのゲノムDNA調製にはGM quicker 2 (ニッポンジーン)を使用し、ゲノムDNA溶液30 μLを得た。

遺伝子導入検知PCRは下記のプライマーセットを用い、GoTaq Green Master Mix (Promega)を使用し、Master Mix 3 μL、センス、アンチセンスプライマー各10 pmol 1 μL、コメ抽出ゲノムDNA 1 μLを加え6 μLとし、94°C 5 min - (94°C 30 sec - 58°C 30 sec - 72°C 1 min) x 30 cycle - 72°C 10 min - 4°C ∞のプログラムでiCycler (BioRad)によりPCRを行い、全量を電気泳動で解析した。

*ctxB* 遺伝子検知用プライマー(全長増幅用プライマーと同一)

*ctxB*-BspHI-S:5' -cccttcctatgACACCTCAAATAT TACT-3'

*ctxB*-KDEL-SacI-A:5' -atcgttgagctcacagctcgtc cttatttgcataactaattgcggc-3'

DSH1p 領域増幅用プライマー(陽性対照、antisenseはrealtime-PCR用を使用)

DSH1p-1840S:5' -ttccagtgaagtcaagacagc-3'

DSH1p-1600S:5' -ggcgtgtagtaggcttgacag-3'

DSH1p-rtA1:5' -catatccaactcacctcggagc-3'

#### C. 研究結果

##### 1) 薬用及び環境浄化用GM植物の調査

##### 1. 2011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、2011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(表1、2012年1月3日公表)。2011年は11社(大学及び国立・公的機関を含む)から20件の申請がなされ、9社の15件が承認されているが、実際に作付けが行われたのは、Ventria Bioscienceのイネ(ラク トフェリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミン及び社外秘)1件、Metabolix Inc.のアマナズナ(ポリβヒドロキシブチレート:生分解性プラスチック原料)1件、University of Washingtonのハコヤナギ属植物(ウサギ由来チトクロームP450導入:環境浄化)導入1件のわずか3件であった。

##### 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405件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品:120件、経口ワクチン:65件、食用医薬:25件、ワクチン抗原:36件、抗体医薬:36件、治療薬:76件、診断薬・試薬:15件、環境浄化:40件であり、機能性食品、経口ワクチン及び治療薬に関

するものが多かった。使用された食用作物は、イネ：51件、トマト：28件、レタス：22件、ジャガイモ：18件、トウモロコシ：15件であった。

### 3. 2011年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する論文等

第29回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(福岡)で公表された薬用及び環境浄化用GM植物に関する報告を表3に示した。関連報告22件の内訳は、機能性食品：10件、経口ワクチン：2件、食用医薬：1件、治療薬：4件、診断薬・試薬：1件、環境浄化：4件であり、機能性食品に関するものが最も多かった。

SciFinder®(キーワード: transgenic plant)で調査した2011年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する論文等を表4に示した。得られた情報45件の内訳は、機能性食品：17件、経口ワクチン：9件、食用医薬：1件、ワクチン抗原：0件、抗体医薬：3件、治療薬：8件、診断薬・試薬：1件、環境浄化：8件であり、機能性食品、治療薬、経口ワクチンの順に多かった(2件重複)。

### 2) 非食用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

#### 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継代・維持を開始した。なお、得られた果実は最終的にMMMir 1個、MMWT 2個であった。MMWT及びMMMirの閉鎖温室での栽培状況及び果実の写真を図2に示す。

#### CtxB イネの栽培と T<sub>1</sub> 種子の取得

インプラントイノベーションズ社より受領したイネ形質転換体候補の培養シュート(20本)はキメラになっている可能性があったため、基底部分で分割し、各個体を個別に馴化栽培した。そのため、野生型株10株を含め、馴化個体数は75株に上った。開花までの成長は順調であったが、前回よりも密植栽培であったため、その後の結実、収穫までの期間は、前回の100日程度に比較して大幅な遅延が認められ、WTで播種から146日を要した。栽培の様子を図3及び図4に示す。また、後述するが、栽培棚の風通しの良い通路側と、換

気の不十分な壁側では、稲穂及びコメの成長に差が認められ、密植の影響が出ていると推察された。

#### 導入 *ctxB* 遺伝子コンストラクトコピー数の解析

組換え体候補代表株における realtime-PCR 法による *ctxB* 遺伝子のコピー数の解析の結果、導入コピー数は0から多いものでは7コピーとlineによりばらつきが認められた(図5)。#4-8-1は32コピーと見積もられたが、この株は成長が芳しくなく、抽出ゲノム試料の状態が不良であったと考えられる。コピー数の分布は、1 copy: 7 lines、2 copy: 1 line、3 copy: 7 lines、>5 copy: 3 lines、no insert: 1 lineであった。

コピー数が1と見積もられたlineについて、*ctxB*の遺伝子導入をPCR法によりそれぞれ確認したところ、確かに遺伝子導入が確認された。また、no insertと判断された#2-10-1については、同株と元の試験管が同じline#2-10-2、#2-10-3、#2-10-4について、PCR法にて*ctxB*の導入を確認したが、#2-10-1と同様にいずれも*ctxB*遺伝子は検出されず、no insertであることが判明した。

さらに、コピー数が1と見積もられたlineの一部について、元試験管が同じlineについて同様に*ctxB*遺伝子の導入コピー数を realtime-PCR 法で求めたところ、いずれの分割株もコピー数は1と見積もられた。これは、元の試験管内の培養物がキメラであった可能性が低いことを示すものである。

#### 登熟過程類果における *ctxB* 遺伝子の発現解析

種子(コメ)登熟過程における、*ctxB* 遺伝子の発現の有無は、コメにおける *ctxB* タンパク質生産を確認する指標となる。今回、供試した3系統の *ctxB* 遺伝子のコピー数は#1-6-1系統3コピー、#1-7-1系統1コピー、#2-4-1系統7コピーであったが、*ctxB* 遺伝子の強い発現が確認されたのは#1-6-1系統、また、弱い発現が確認されたのは#2-4-1系統であった。#1-7-1系統では発現は確認されなかった(図6)。

遺伝子組換え植物における、導入遺伝子の発現能は、ゲノム上の導入遺伝子の挿入部位や、コピー数、サイレンシングの有無などの条件によって左右される。今回の試料においても同様の事象が発生していると考えられる。

#### CtxB イネにおける稲穂及びコメの生育状況