

CtxB 遺伝子を導入した系統と、野生型株(WT)における稲穂の生育状況を比較した。両者において、生育良好な稲穂と不良な稲穂(図7)の数を計数したところ、WTの10系統の生育良好穂数の平均値は14.3であったが、#1-6-1系統では生育良好穂数は7とWTの平均値を下回り、一方、#1-7-1系統では22であり、WTの平均値を上回った。#2-4-1系統では生育良好な穂は得られなかった。全系統の稲穂の生育状況のグラフを図8に示す。

つぎに、稲穂の成長と導入遺伝子のコピー数との相関について解析を行った。コピー数の明らかになった各系統の代表株について、コピー数と稲穂の生育良好穂数の相関を解析した結果、導入コピー数が高くなると、生育良好穂数が減少する傾向(相関係数 $r=-0.556$)が認められた(図9左)。また、稲穂の成長にはグロースチャンバーの密植の影響もあると考えられたため、同じ株について、栽培位置(換気の良い通路側か壁側か)と稲穂の生育良好穂数との相関について検討したところ、通路側の方が稲穂の成長がよい傾向が認められた(図9右)。

コメ(種籾)の生育状況については、稲穂の生育状況と同様に、栽培位置の影響が大きいとみられ、図10に写真及び生育の良好または不良な種子(コメ)の収量のグラフを示すが、通路側の方が、コメの成長がよい傾向であることが判明した。

自殖後代(T_1)種子における遺伝子導入の確認

CtxB 遺伝子が3コピー導入されていた#1-6-1系統と同系列の#1-6-*系統の種子(コメ)各1粒について *ctxB* 遺伝子の導入を確認したところ、#1-6-2以外ではPCRで陽性となり、導入が確認された(図11)。#1-6-2のみが非検出であったため、#1-6-2系統の種子、さらに4粒について同様に調査したところ、これらはいずれも *ctxB* 陽性であった(図12)。これは、 T_1 世代で、*ctxB* 遺伝子が遺伝的に分離したことを示すものである。

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。2011年の作付け状況の調査の結果、野外圃場栽培が承認されていても、実際に作付けまで行われたものは非常に少な

いことが判明した。2006-2010年の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。

ミラクリントマトについては、得られた果実数がWTで2個、MMMirで1個と芳しくない結果となった。これは施肥量の不足(Hyponex® 500倍液、週1回)が原因と考えられるため、施肥条件を検討する必要がある。

CtxB イネについては、 T_1 種子を取得するとともに、それらにおける *ctxB* 遺伝子の導入を確認することができた。これらは、 T_1 世代で分離していることが明らかになったため、当世代の育成の際には、播種後のなるべく早い段階で、葉からゲノムDNAを調製するなどし、PCR法等により *ctxB* 遺伝子の存否を確認する必要がある。

また、登熟過程における *ctxB* 遺伝子の半定量的な発現量解析から、系統によって *ctxB* 遺伝子がまったく発現せず、*ctxB* タンパク質が蓄積されていないものと推定される。*CtxB* タンパク質の高生産・蓄積系統を選抜するため、コメ中の *ctxB* タンパク質の競合的ELISA法による定量法を検討している。

グロースチャンバーにおけるイネの栽培では、密植の影響が問題となることがあらためて認識された。グロースチャンバー栽培では、イネ植物体周囲における換気、温度条件に注意しなくてはならない。

なお、本年度は震災に起因する節電対策の影響で、閉鎖温室の使用が制限され、ミラクリントマト及び *ctxB* イネの栽培計画に影響があった。

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GM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。

ミラクリントマトについては、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物の維持を継続して行った。また、コレラトキシンBサブユニット生産イネ(*ctxB* イネ)については、イネグルテリンプロモーターで *ctxB* タンパク質を発現するコンス

トラクトを導入したイネ形質転換体の馴化栽培をグロースチャンバーで行い、realtime-PCR法により導入遺伝子コピー数の解析を行うとともに、T₁種子（コメ）を取得した。さらにT₁世代のコメにおける *ctxB* 遺伝子の導入をPCR法により確認した。

以上のように、遺伝子またはタンパク質レベルでの検知実験に利用可能なモデルGMトマト及びモデルGMイネの、研究試料としての供給体制の構築を完了した。

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、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)
6. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「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」(H22-食品一般-001)平成22年度総括・分担研究報告書, pp.45-57, 平成23年5月

7. Imamura T, Kusano H, Kajigaya Y, Ichikawa M, Shimada H.

A rice dihydrosphingosine C4 hydroxylase (DSH1) gene, which is abundantly expressed in the stigmas, vascular cells and apical meristem, may be involved in fertility. *Plant Cell Physiol.* 48, 1108-1120 (2007)

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshimatsu, K., Kawano, N., Kawahara, N., Akiyama, H., Teshima, R., Nishijima, M.: Current status of application and commercialization of genetically modified plants for human and livestock health and phytoremediation, *YAKUGAKU ZASSHI*, 132 (5), 1-47 (2012).

2. 学会発表

1) 吉松嘉代, 河野徳昭, 川原信夫, 穉山浩, 手島玲子, 西島正弘: 非食用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向
日本食品化学学会第17回総会・学術大会 (2011.5.19-20, 東京)

2) 吉松嘉代, 河野徳昭, 川原信夫, 穉山浩, 手島玲子, 西島正弘: 薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向
第29回日本植物細胞分子生物学会(福岡)大会・シンポジウム (2011.9.6-8)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1. 薬用及び環境浄化用 GM 植物-米国野外地場認可・作付け状況 2011 年 (Jan. 3, 2012 公表)

企業等	作物	生産物	州	審査状況	作付け状況
Planton LLC	ジャガイモ	不明	アイオワ	取り下げ	
Planet Biotechnology	タバコ	抗炭疽菌人工抗体, ポツリヌス毒素抗体, ライノウイルス人工抗体	カリフォルニア	承認	未完了
			ケンタッキー	承認	未完了
Ventria Bioscience	イネ	ラクトフェリン, リゾチーム, ヒト血清アルブミン, 社外秘	バージン諸島 (<10エーカー)	承認	完了
		ラクトフェリン, リゾチーム, ヒト血清アルブミン, 鉄結合タンパク質, 成長因子ベプチド, 抗菌タンパク質, 糖タンパク質サイトカイン, 細胞膜結合タンパク質の中の1種	バージン諸島 (2エーカー)	承認	未完了
			カンザス (<30エーカー)	承認	未完了
			カンザス	承認	未完了
		不明2件	カンザス	審査中	
不明	カンザス	取り下げ			
Kentucky BioProcessing	タバコ (TMV)	ウシ肺アプロチニン	ケンタッキー	承認	未完了
University of Nebraska/Lincoln	アマナズナ	ワックスエステル, 高オレイン酸油	ネブラスカ (<0.5エーカー)	承認	未完了
Applied Biotechnology Institute	トウモロコシ	ブラゼイン (甘味タンパク質), B型肝炎ウイルス外殻タンパク質表面抗原 (HBsAg)	カリフォルニア (<1エーカー)	承認	未完了
MacIntosh & Associates, Inc.	ハマナ	脂肪酸組成改変又はワックスエステル改変	カリフォルニア	承認	未完了
			サウスダコタ (0.51エーカー)	承認	未完了
		不明	カリフォルニア, サウスダコタ	取り下げ	
SemBioSys Genetics	ベニバナ	ヒトプロインスリン	ワシントン (<20エーカー)	承認	未完了
Metabolix, Inc.	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)	テキサス	承認	完了
University of Washington	ハコヤナギ属	チトクロームP450 2E1 (ラビット由来)	ワシントン (<10エーカー)	承認	完了
		不明	ワシントン	承認	未完了
USDA	ワイルドトマト	不明	アイダホ, ワシントン	取り下げ	

(http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html) TMV: タバコモザイクウイルス

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: 405件)

年 Year	情報件数 No. of cases	重複件数 No. of duplication	内訳 Itemization								内訳合計 Sum
			機能性食品 Nutraceuticals	経口ワクチン Oral vaccines	食用医薬 Edible curatives	ワクチン抗原 Vaccine antigens	抗体医薬 Therapeutic antibodies	治療薬 Curatives	診断薬・試薬 Diagnostic agents & reagents	環境浄化 Phytoremediation	
2006	105	1	31	19	3	9	13	17	5	9	106
2007	55	1	15	7	4	5	3	8	3	11	56
2008	71	0	13	13	2	10	9	13	1	10	71
2009	73	2	26	11	6	5	6	12	3	6	75
2010	101	4	35	15	10	7	5	26	3	4	105
合計	405	8	120	65	25	36	36	76	15	40	413

重複 Duplication

2006年 機能性食品 Nutraceuticals : 環境浄化 Phytoremediation

2007年 機能性食品 Nutraceuticals : 環境浄化 Phytoremediation

2009年 機能性食品 Nutraceuticals : 環境浄化 Phytoremediation, 抗体医薬 Therapeutic antibodies : 治療薬 Curatives

2010年 ワクチン抗原 Vaccine antigens : 治療薬 Curatives. ワクチン抗原 Vaccine antigens : 抗体医薬 Therapeutic antibodies, 抗体医薬 Therapeutic antibodies : 治療薬 Curatives (2件)

食用作物の使用件数

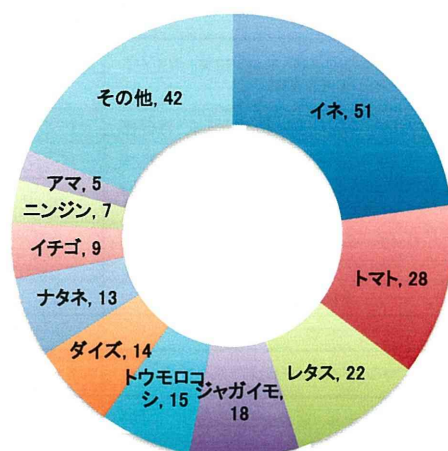


図1. 2006-2010年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する特許及び文献等における食用作物の使用件数

表3. 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（2011年）

区分	導入遺伝子	作物	目的・生産物・機能及び特徴等	研究・開発国
機能性食品	改変型イネアントラニル酸合成酵素	イネ	高トリプトファン含有飼料用イネ	日本・作物研究所、北興化学
機能性食品	phytoene synthase (<i>Psy</i>), carotene desaturase (<i>CrtI</i>)	イネ	β -carotene-biofortified rice	韓国・National Academy of Agricultural Science
機能性食品	HARMLESS TO OZONE LAYER/ <i>AtHOL1</i> 遺伝子T-DNA挿入体	シロイヌナズナ	高ヨウ素蓄積作物の作出	日本・横浜国立大学
機能性食品	ゴマ由来ゴマリグナン精製酵素(CYP81Q1)、レンギョウ内因性ピレジノール代謝酵素PLRのRNAi	チョウセンレンギョウ	ゴマリグナン(がんの予防, 更年期症状の緩和等を注目される機能性食品素材)	日本・サントリー, 神戸大学, 大阪大学
機能性食品	グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)	トマト	GABA(血圧上昇抑制作用等を有する非タンパク質態アミノ酸)	日本・筑波大学
機能性食品	ミラクリン	トマト	ミラクリン(味覚修飾タンパク質)	日本・筑波大学
機能性食品	ミラクリン	トマト	ミラクリン(味覚修飾タンパク質)	日本・筑波大学, 岩手大学
機能性食品	ミラクリン	トマト	ミラクリン(味覚修飾タンパク質)	日本・筑波大学
機能性食品	グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD、C末端領域を欠失)、GABAアミノ基転移酵素(GABA-T)RNAi	イネ	GABA(血圧正常化作用等を有する非タンパク質態アミノ酸)	日本・島根大学
機能性食品	ミラクリン	トマト、レタス、イチゴ	ミラクリン(味覚修飾タンパク質)	日本・筑波大学
経口ワクチン	コレラトキシンBサブユニット(CTB)	イネ	コレラワクチン米	日本・大阪大学、日本製紙・農業生物資源研究所
経口ワクチン	腸管出血性大腸菌志賀毒素2eBサブユニット(Stx2eB)	レタス	ブタ浮腫病経口ワクチン	日本・出光, 奈良県農業総合センター, 日本植生, 帯広畜産大学, 国際医療研究センター, 奈良先端大学
食用医薬	ダニ抗原(Der p1: システインプロテアーゼ)断片(T細胞エピトープを含む)	イネ	ダニアレルギー症状の緩和	日本・農業生物資源研究所、作物研究所、東京大学
治療薬	グリチルリチン生合成酵素CYP88D6	ウラルカンゾウ	グリチルリチン生産	日本・北海道医療大学, 大阪大学, 東京工業大学, 医薬基盤研
治療薬	シロイヌナズナ転写因子(又はキメラリプレッサー)	セリバオウレン	ベルベリン(抗菌活性等を有するアルカロイド)収量増加	日本・医薬基盤研、産総研
治療薬	放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> 由来トランスフェラーゼ	トマト	プレニル化芳香族化合物(抗腫瘍活性, 抗菌活性, 抗NO産生, エストロゲン様作	日本・京都大学, 東京大学, 筑波大学, 神戸

	SCO7190(<i>HypSc</i>), クララ <i>Sophora flavescens</i> 由来トランス フェラーゼ <i>SFN8Dt-1</i>		用, 抗チロシナーゼ活性等)生産	大学, 神戸薬科大学, 滋賀県立大学
治療薬	シロイヌナズナ転写因子(又は キメラリプレッサー)	ペラドンナ	ヒヨスチアミン(副交感神経遮断作用を有 するアルカロイド)生産	日本・医薬基盤研、産 総研
診断薬・試薬	<i>Nepenthes alta</i> (ウツボカズラの1 種)由来ネペンテシンI	タバコ	ネペンテシンI(酸性アスパラギン酸プロテ アーゼ, 広いpHレンジでの安定性, 熱安 定性, 長期常温保存性等を有する)生産	日本・石川県立大学
環境浄化	ヘキサロースリン酸シンターゼ (HPS)、ホスホヘキサロイソメラー ゼ(PHI)	イネ	水田から発生するメタンの減少	日本・近畿大学、島根 大学、理研、京都大学
環境浄化	γ -ヘキサクロシクロヘキサン (HCH)分解菌 <i>Spingobium</i> <i>japonicum</i> UT26株由来デハロゲ ナーゼ	カボチャ	広範囲の土壤中に混在するヘキサクロ シクロヘキサン(HCH, 殺虫剤, 人体への 蓄積や有毒性, 環境中での残留性から 現在では使用禁止)浄化	日本・農業生物資源 研, 筑波大学, 東北大 学, 森総研, 農環研
環境浄化	ヘビノゴザ <i>Athyrium</i> <i>yokoscense</i> 由来鉄ノ亜鉛トラン スポーター (<i>AyZIP1</i>)	シロイヌナ ズナ	カドミウム(動物や植物にとって典型的な 有害・非必須重金属)除去	日本・東京理科大学, 電中研
環境浄化	<i>Portulaca oleracea</i> 由来ポリフェノ ールオキシダーゼ(PoPPO)	タバコ	bisphenolA (BPA,代表的な内分泌攪乱物 質)除去	日本・大阪大学, 奈良 先端大学, 関西電力

表4. 2011年に公表・出版された薬用及び環境浄化用GM植物に関する特許及び文献等 (SciFinder)

区分	導入遺伝子	作物	目的・生産物・機能及び特徴等	研究・開発国
機能性食品	クモ牽引糸タンパク質	イネ	種子中のアミノ酸の改変(高栄養化)	中国・Huazhong Agricultural University
機能性食品	ダイズ、アマ、イネ、コマツナ由 来 ω -3 脂肪酸デヒドロゲナー ゼ	イネ、トウモロコ シ、コムギ、モロ コシ、エンバク、 オオムギ、ライ ムギ	種子中の α -リノレン酸生産	中国・Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences
機能性食品	脂肪酸合成関連タンパク質 GmLEC1B	植物	脂肪酸含量増加	中国・Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences
機能性食品	マッシュルーム由来不飽和化酵 素	植物	一価不飽和脂肪酸、例えばパルミ トレイン酸(16:1)	米国・University of Kentucky Research Foundation
機能性食品	<i>Parietochloris incisa</i> glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT1)	植物	不飽和脂肪酸高含有	イスラエル・Ben Gurion University of the Negev Research and Development Authority
機能性食品	トウゴマ由来 PDAT (phospholipid diacylglycerol acyltransferase)	植物	ヒドロキシン脂肪酸生産量増加	韓国・Rural Development Administration
機能性食品	緑色微細藻類(<i>Parietochloris</i> <i>incisa</i>)由来 Δ 5, Δ 6, or Δ 12 不 飽和化酵素	植物	超長鎖多価不飽和脂肪酸の生産	イスラエル・Ben Gurion University
機能性食品	ミクロウラシキメンシス (<i>Microula</i> <i>sikkimensis</i>)由来 Δ -6 脂肪酸 デヒドロゲナーゼ (Ms- Δ -6 FAD)	植物	種子油の改変、牧草の改変	中国・Lanzhou University
機能性食品	チトクローム(Cb5)、脂肪酸不飽 和化酵素(FAD3)、酵母 (<i>Yarrowia</i>)ATP クエン酸リアー ゼ (ACL)	植物	種子油の含量増加及び改変	米国・The Curators of the University of Missouri
機能性食品	キンセンカ (<i>Calendula</i> <i>officinalis</i>)、ツルレイシ (<i>Momordica charantia</i>)、ダイズ、 ユーホルビア ラガスカエ (<i>Euphorbia lagascae</i>)由来膜結 合性 O-アシル基転移酵素 (MBOAT)及びジアシルグリセロ ールアシル基転移酵素タイプ	植物	脂肪油の改変(伸長、不飽和化及び 性能向上)	米国・E.I. du Pont de Nemours and Company

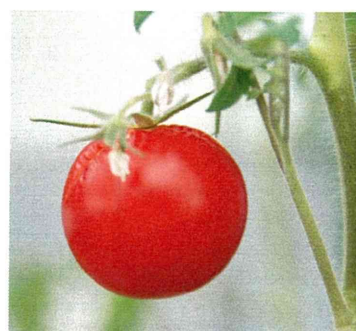
	2(DGAT2)			
機能性食品	サツマイモ桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ (IbC4H)	植物	アントシアニン及びその前駆体含量増加	中国・Southeast University
機能性食品	シロイヌナズナ由来 DOF (DNA binding with one finger)転写因子 (AtDof1.7)RNAi	シロイヌナズナ	脂肪酸代謝の制御(オレイン酸の増加及びリノレン酸の減少)	中国・Oilseed Crops Institute, National Oil Crops Improvement Center Hunan Agricultural University
機能性食品	BnL1L タンパク質(脂肪酸合成関連能)	シロイヌナズナ、ナタネ、ラッカセイ、イネ、コムギ、オオムギ、ターフグラス	油脂含量の改善	中国・Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences
機能性食品	TT1 タンパク質	ナタネ、ダイズ、ワタ、ヒマワリ、ゴマ、トウゴマ、ナンヨウアブラギリ、ラッカセイ	不飽和脂肪酸含量改善	中国・Sichuan Biodesign Biological Gene Engineering Co., Ltd.
機能性食品	ミラクリン	ミカン(ウンシュウミカン)	ミラクリン(味覚修飾タンパク質)の生産	韓国・Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science Jeju National University
機能性食品	転写制御領域を改変した At3g19990	植物	油脂及び脂肪の生産性改善	日本・トヨタ&名古屋大学
機能性食品・治療薬	アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase)、β-ケトアシル ACP 合成酵素 II (KASII)、ケトアシル ACP 合成酵素 I (KASI)、ケトアシル ACP 合成酵素 III (KASIII)、パルミトイル ACP チオエステラーゼ、その他チオエステラーゼ、ステアロイル ACP 不飽和化酵素、その他不飽和化酵素、オレオイル CoA 不飽和化酵素、脂肪酸伸長酵素、オレイン酸ヒドロキシラーゼ、アシル基転移酵素、β-ケトチオラーゼ、スレオニンデアミナーゼ、スレオニンデヒドラターゼ、アセトアセチル CoA 還元酵素、ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 合成酵素	アブラヤシ	種子油収量増加、脂質あるいは非脂質成分の改変、ヤシ油品質向上、産業用オイル・化学工業用オイル・機能性オイル・医療用化合物の生産	マレーシア・Malaysian Palm Oil Board
経口ワクチン	ウェルシュ菌(嫌気性の食中毒菌)α-toxin	植物	ウェルシュ菌(嫌気性の食中毒菌)α-toxin	中国・Northeast Agricultural University
経口ワクチン	草魚出血性病毒症(Grass carp reovirus, GCRV)抗原ペプチド(GCRV-VP6)、大腸菌 LTB	植物	草魚出血性病毒症経口ワクチン	中国・Chinese Academy of Fishery Sciences
経口ワクチン	豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)ORF5 ペプチド、易熱性エンテロトキシン B サブユニット	植物	豚繁殖・呼吸障害症候群予防	中国・不明
経口ワクチン	大腸菌易熱性毒素 B サブユニット	植物	下痢症の予防	韓国・Chonbuk National University, Industrial Cooperation Foundation
経口ワクチン	トリインフルエンザウイルス HA	植物	トリインフルエンザ感染防止	中国・Vaxgene Corporation
経口ワクチン	ブタ呼吸器病原菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae) ApxIIA フラグメント(アミノ酸 619-801) (ApxIIA619-801)、大腸菌易熱性毒素 B サブユニット(LTB)	タバコ	ブタ呼吸器病原菌予防	韓国・Chonbuk National University
経口ワクチン	腸管出血性大腸菌インチミン、Tir 又は EspA タンパク質	タバコ、ナタネ(カノーラ)	畜牛の腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染予防	イラン・Department of Plant Biotechnology National Institute of

				Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)
経口ワクチン	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) グライコタンパク質	タバコ(毛状根)	クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)	イラン・Department of Plant Biotechnology National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology
経口ワクチン・治療薬	ウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 遺伝子 E0	キバナオウギ (Astragalus membranaceus) (抗ウイルス作用を有し、食用可能な薬用植物)	ウシウイルス性下痢症 (BVDV) 予防	中国・Jilin Agricultural University
食用医薬	コレラトキシンBサブユニット+ヒトプロインスリン	タバコ、レタス	経口糖尿病治療薬(ヒトプロインスリン、A、B、C ペプチド)の生産 cholera toxin B subunit fused with human proinsulin (A, B, C peptides) contg. three furin cleavage sites (CTB-PF _x 3)	米国・Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine University of Central Florida
抗体医薬	抗血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体	植物	抗血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体	ロシア・不明
抗体医薬	細胞膜保持性抗マイクロシチン-LR(MC-LR)特異抗体	タバコ	マイクロシチン-LR (MC-LR、シアノバクテリアが産生する毒素、環境中の汚染物質)の除去	英国・Molecular Immunology Unit, Centre for Infection, Division of Clinical Sciences St. George's University of London
抗体医薬	VHH single domain antibody	タバコ	単ドメイン抗体の生産	イラン・Department of Agriculture University of Payame Noor
治療薬	血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、デヒドリン(乾燥から細胞成分を守る蛋白質)	オオムギ	局所療法剤、外用剤、化粧品	アイスランド・ORF Liftaekni HF
治療薬	ニチニチソウ(Catharanthus roseus)由来 HMGR-Co A 還元酵素(hmgr)、クソニンジン (Artemisia annua L.)由来アモルファ-4,11-ジエン 合成酵素 (ads)(どちらも過剰発現)	クソニンジン (Artemisia annua L.)	アルテミシニン(抗マラリア薬)含量増加	インド・Centre for Transgenic Plant Development, Department of Biotechnology, Faculty of Science Jamia Hamdard
治療薬	ヒト血清アルブミン	ジャガイモ、イネ	ヒト血清アルブミン	中国・China Pharmaceutical University
治療薬	ホスホリパーゼ、リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ	植物	エイコサノイド(脂性の局所ホルモン)生産	日本・石川県立大学
治療薬	ヤケヒョウダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) 2 (Der p2) 抗原	タバコ	ヤケヒョウダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) 2 (Der p2) 抗原(経口免疫寛容によるアレルギー疾患の治療)	台湾・Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine China Medical University
治療薬	ヒトアポリポ蛋白質 A-I(ApoA-I)	タバコ	ヒトアポリポ蛋白質 A-I(ApoA-I)	イタリア・Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnological Sciences University of Naples Federico II
診断薬・試薬	pER8:GUS	シロイヌナズナ	エストロゲン様活性の検出(植物成分及び植物からの単離成分、活性があると GUS 酵素の働きにより、基質溶液中でシロイヌナズナが青く染	台湾・Graduate Institute of Natural Products, College of Pharmacy Kaohsiung Medical

			まる)	University
環境浄化	不明	イネ	アルミニウム吸収	日本・岡山大学
環境浄化	サツマイモ由来メタロチオネイン 1 (IbMT1)	植物	重金属耐性	韓国・Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
環境浄化	サツマイモ由来メタロチオネイン 2 (IbMT1)	植物	重金属耐性	韓国・Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
環境浄化	サツマイモ由来メタロチオネイン 3 (IbMT1)	植物	重金属耐性	韓国・Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
環境浄化	イネ由来メタロチオネイン OsMT1e	植物	重金属耐性	インド・不明
環境浄化	単細胞紅藻シアニディオシゾン (Cyanidioschyzon merolae) 由来 遺伝子	植物	重金属耐性	日本・立教大学
環境浄化	<i>Thlaspi caerulescens</i> (アブラナ科 のカドミウム超集積植物) 由来フ イトケラチン合成酵素 1 (TcPCS1)	タバコ	カドミウム耐性・集積	中国・College of Life Science Graduate University of Chinese Academy of Sciences
環境浄化	カワラタケ (<i>Trametes versicolor</i>) 由来リグニン過酸化酵素	タバコ	環境中のビスフェノール A 除去	日本・弘前大学



播種55日後MMMir



播種110日後 MMMir



播種55日後
(左)MMMir (右)MMWT



播種126日後 MMWT

図2. ミラクリントマト(MMMir)及び野生型株(MMWT)の栽培状況及び果実



アラシシステムを用いた馴化



移植直後 2011/3/7

Growth condition
 長日条件(60日間)
 28°C、14 hrs light
 23°C、10 hrs dark
 ↓
 短日条件(12日後 出穂、開花)
 28°C、10 hrs light
 24°C、14 hrs dark
 土壌：JA粒状くみあい合成培土3号
 追肥：くみあい尿素入り
 窒素加里化成2号



右手前WT, 他はctxB 2011/3/30

図3. グロースチャンバーにおけるイネの栽培状況(馴化～生育初期)



右手前WT, 他はctxB 2011/5/24

図4. グロースチャンバーにおけるイネの栽培状況(生育盛期)

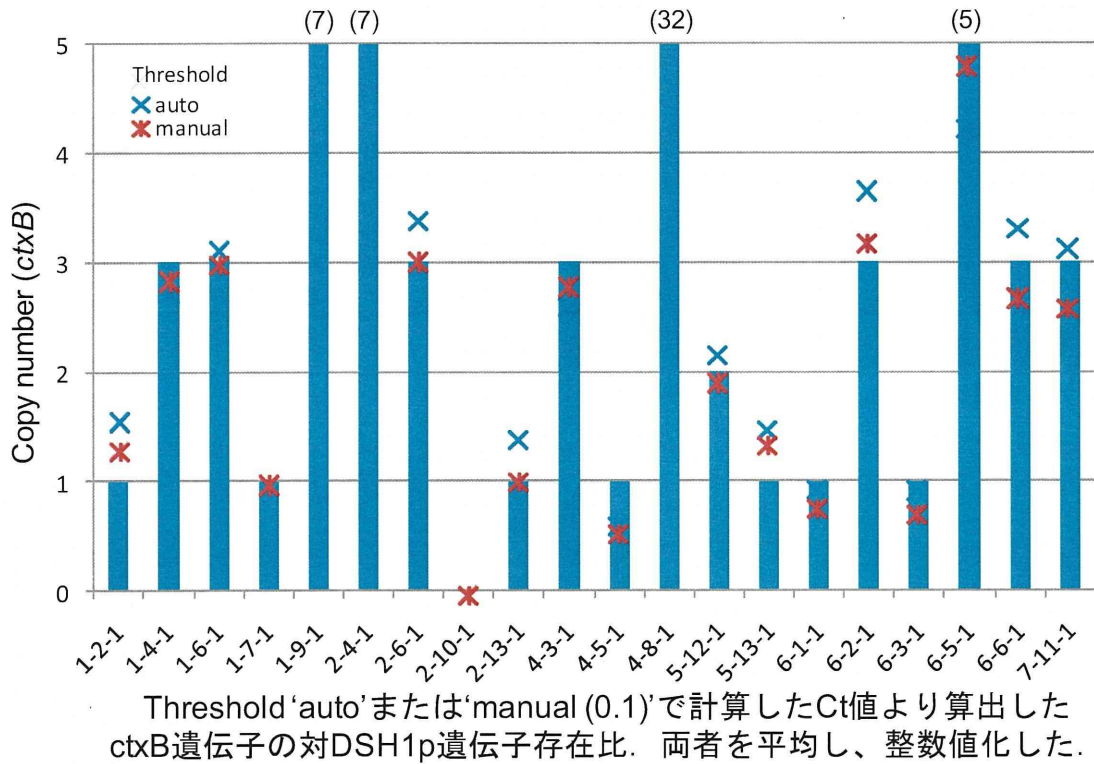
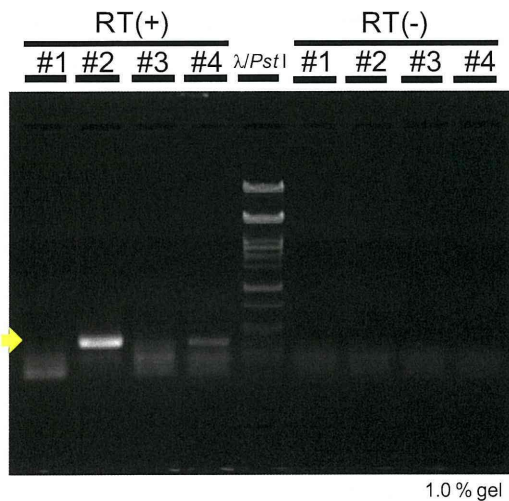


図5. イネ形質転換体候補代表株におけるctxB遺伝子コピー数の解析結果



Primer set for ctxB
 ctxB-BspHI-S + ctxB-KDEL-SacI-A

Lane Line (copy number)

- #1 WT#1 (0)
- #2 #1-6-1 (3)
- #3 #1-7-1 (1)
- #4 #2-4-1 (7)

図6. 登熟過程穎果におけるctxB遺伝子の発現解析結果



(左) 生育良好穂 (右) 不良穂

図7. 稲の生育良好な穂(左)と不良な穂(右)の形態

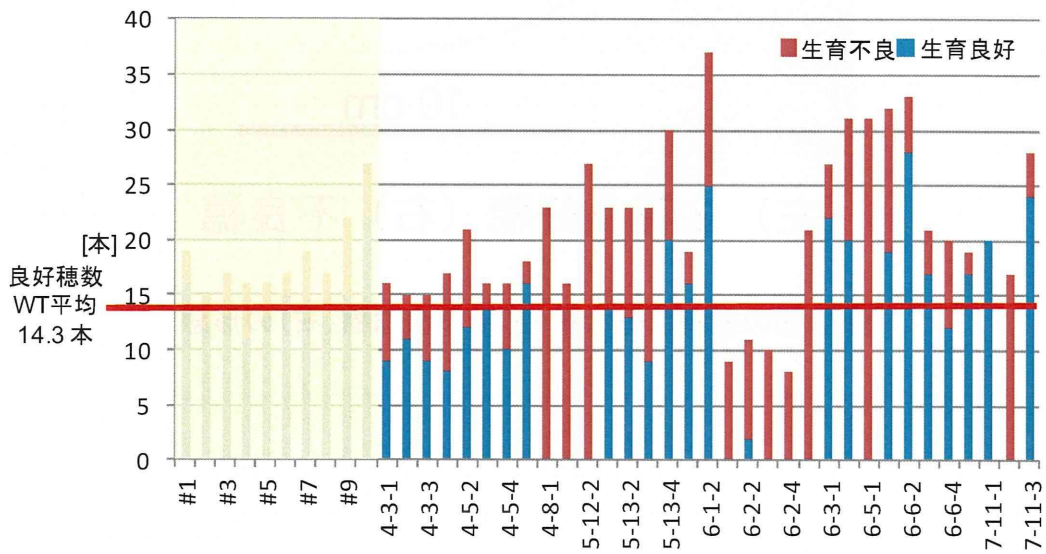
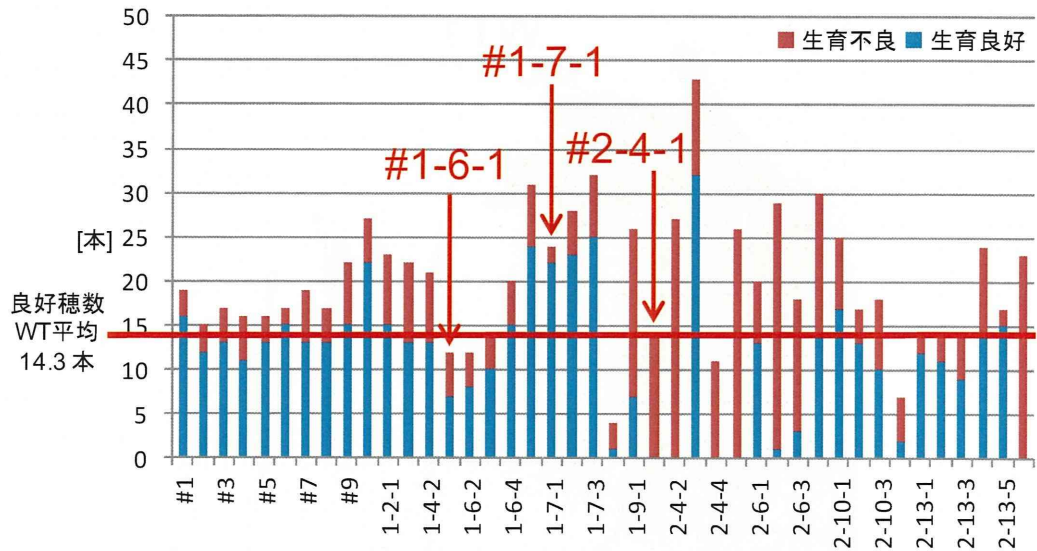


図8. 全栽培株における生育良好な穂と不良な穂の数

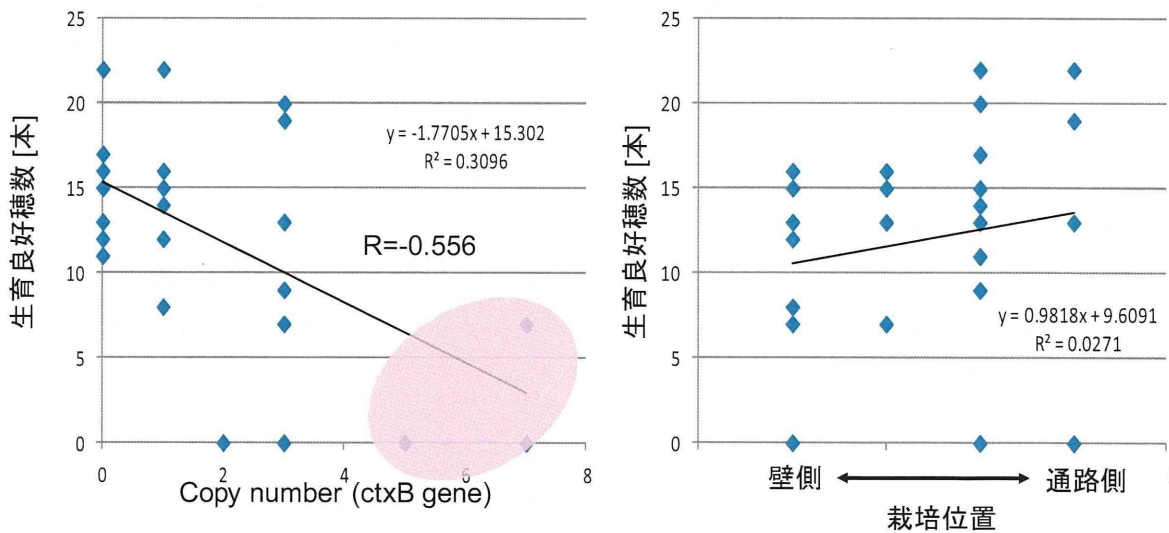


図9. *CtxB*遺伝子導入コピー数と生育良好穂数の相関(左)、

及び、栽培位置と生育良好歩数の相関(右)

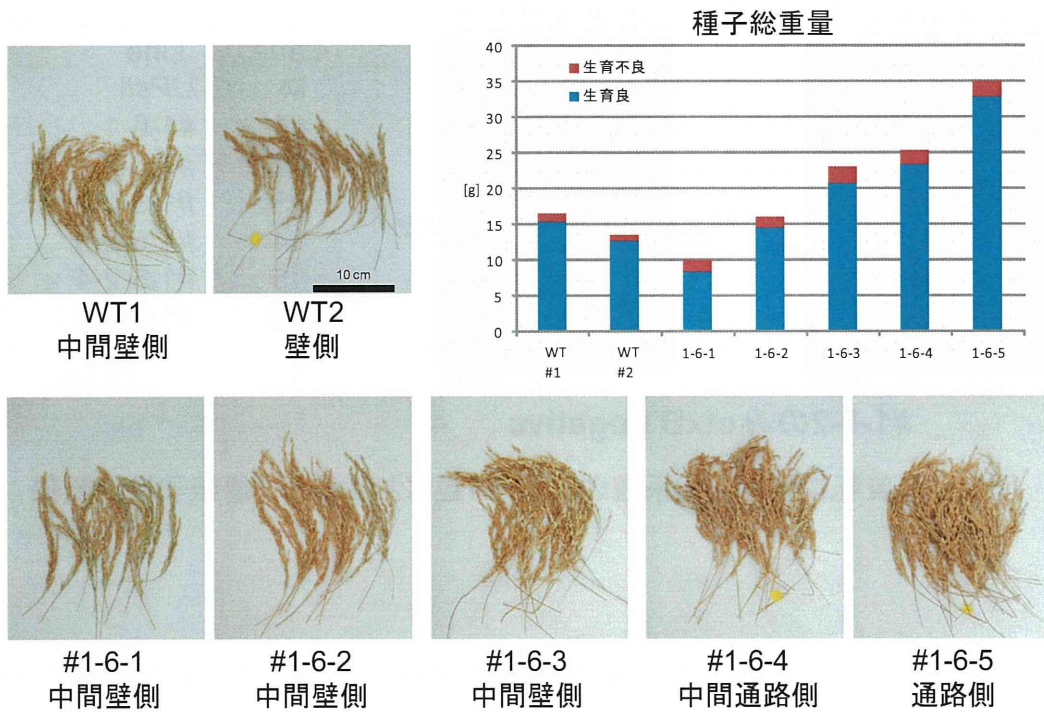
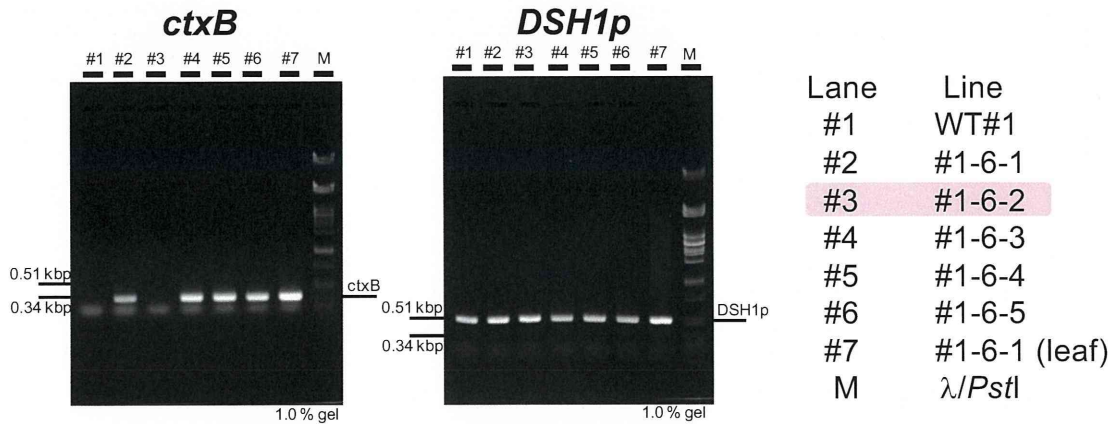
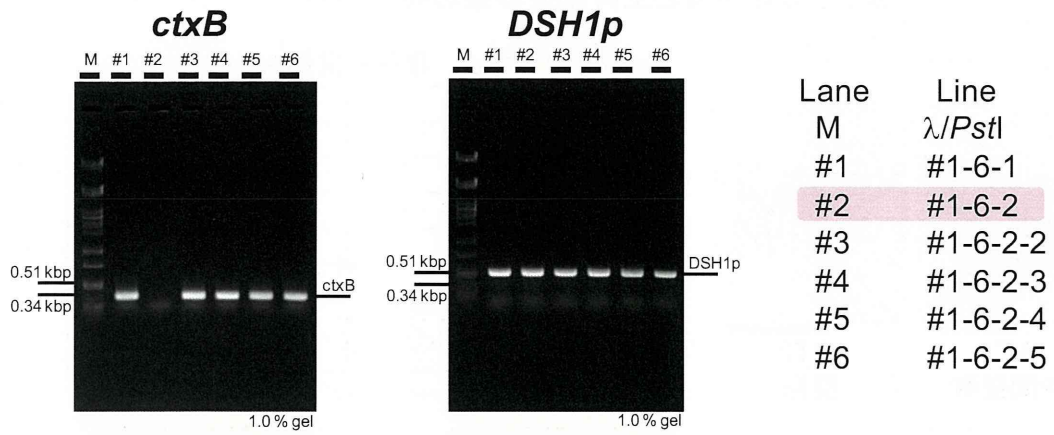


図10. 栽培位置による種子の生育状況



#1-6-2でctxB negative

図11. 形質転換体#1-6-*系統のT₁種子1粒におけるctxB遺伝子検出結果



#1-6-2のみctxB negative

図12. 形質転換体#1-6-2系統のT₁種子1粒におけるctxB遺伝子検出結果

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」

分担研究報告書(平成23年度)

(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)

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

研究要旨

バイオテクノロジー応用技術の拡大によって、医薬品の製造、再生医療への応用、基礎研究などを目的として非食用モダンバイオテクノロジー応用魚や動物が作成されている。このような非食用モダンバイオテクノロジー応用魚や動物が食品に混入してしまう可能性が危惧されている。そこで、報告の多い非食用モダンバイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタを選んで開発・実用化の動向について調査研究を行った。非食用モダンバイオテクノロジー応用魚については基礎研究を目的にゼブラフィッシュを用いた報告が多数あった。また、近年では非食用モダンバイオテクノロジー魚や動物を作成するときに 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ケースが多くなっている。そこで、LoxP 配列のみを手掛かりとして非食用モダンバイオテクノロジー魚や動物に由来する材料を検知する方法を作成することを試みた。研究材料には LoxP 配列をゲノムに組み込んだニワトリの ES 細胞を使った。まず、ES 細胞からのゲノミック DNA の抽出法を検討した。次に、LoxP 配列からプライマーを設計してアダプターライゲーション法の条件検討を行った。

研究協力者

代謝生化学部 手島玲子

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え(以下、「GM」と記す)魚や動物の開発が活発に行われている。非食用に開発された GM 動物や魚はフードチェーンに混入したときに食用に開発されたものよりも大きな健康被害をもたらす可能性がある。そのため、非食用に開発された GM 動物や魚の開発状況を調査することや市場への混入を検知するための方法を作成することが求められている。

そこで、本研究においては非食用 GM 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。

また、近年開発される GM 魚や動物では Cre / LoxP システムを利用してそれらを作成するときに利用される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、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場合が多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 GM 魚や動物のゲノムに残らない場合が考えられる。一方で、LoxP 配列(図1)は GM 魚や動物のゲノムに必ず残る。そこで、本研究では LoxP 配列のみを手掛かりとして GM 魚や動物に由来する材料を検知するためのモデル実験を行う。手法としてはアダプターライゲーション法を試す。

B. 研究方法

(1) 文献調査

論文、インターネット、新聞を使って非食用 GM 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。インターネットを使った調査では PubMed (キーワード:

transgenic fish、transgenic chicken、transgenic pig) を利用した。得られた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 22 年度の調査以後の情報を集めた。

(2) LoxP 配列の検知

図 2 に示した LoxP 配列やその他の配列をゲノムに組み込んだ GM ニワトリの ES 細胞を広島大学・堀内浩幸氏より提供を受けて、研究材料とした。この細胞のゲノム中には 2 つの LoxP 配列が組み込まれている。ネガティブコントロールには非 GM ニワトリの ES 細胞を使用した。

まず、ニワトリ ES 細胞からゲノミック DNA を抽出する方法を比較検討した。マニュアル法と表 1 に示した 3 種類の市販のキットを試した。抽出したゲノミック DNA については以下のプライマーを使用して nested PCR を行い、PCR が可能であることを確認した。これらのプライマーはニワトリ β -アクチン遺伝子の第 3 エクソンの配列から設計した。

ch b-actin F1 (1 段階目の PCR 用)

5'-GGCTGTGCTGTCCCTGTATG-3'

ch b-actin R1 (1 段階目の PCR 用)

5'-CAAGAAAGATGGCTGGAAGA-3'

ch b-actin F2 (2 段階目の PCR 用)

5'-ACTGGTATTGTGATGGACTCTG-3'

ch b-actin R2 (2 段階目の PCR 用)

5'-CCTCGGGGCACCTGAACCTCT-3'

次に、アダプターライゲーション法のポジティブコントロールの実験を行った。ニワトリ β -アクチン遺伝子の第 3 エクソン中の配列を増幅させた。試薬は TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit を用いた。ゲノミック DNA を *Pst*I 消化してカセットをライゲーションさせた。特異的プライマーは上記の ch b-actin F1 と ch b-actin F2 を使った。nested PCR を行ない、増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分析

した。

その後、LoxP 配列を検知するためのアダプターライゲーション法を試した。LoxP 配列に基づく特異的プライマーの組み合わせを 3 組設計した。これらを以下に示した。

一組目のプライマー

LoxP1 (1 段階目の PCR 用)

5'-ATAACTTCGTATAATGTA-3'

LoxP2 (2 段階目の PCR 用)

5'-ACTTCGTATAATGTATGC-3'

二組目のプライマー

LoxP3 (1 段階目の PCR 用)

5'-GGCACCTGGACCGTATAATGTA-3'

LoxP4 (2 段階目の PCR 用)

5'-GGCACCTGGACCGTATAATGTATGC-3'

LoxP5 (2 段階目の PCR 用)

5'-GGCACCTGGACCGTATAATGTATG-3'

LoxP6 (2 段階目の PCR 用)

5'-GGCACCTGGACCGTATAATGTATGCT-3'

下線部は GC リッチな任意の配列である。

三組目のプライマー

LoxP7 (1 段階目の PCR 用)

5'-ATAACTTCGTATAGCATA-3'

LoxP8 (2 段階目の PCR 用)

5'-AACTTCGTATAGCATACA-3'

LoxP9 (2 段階目の PCR 用)

5'-ACTTCGTATAGCATACAT-3'

一、二組目のプライマーは LoxP の 3'側の近接領域を、三組目のプライマーは LoxP の 5'側の近接領域を増幅させることを意図した。また、CAG プロモーターはとても GC リッチであり、PCR が走らないという情報を得ていた。よって、

一、二組目のプライマーを用いたときにはピューロマイシン耐性遺伝子の 3'側の LoxP 配列に由来する 1 種類の増幅産物が得られることを想定した。三組目のプライマーを用いたときには 2 つの LoxP に由来する最多で 2 種類の増幅産物が得られることを想定した。

ゲノミック DNA を 8 通りの制限酵素 (*Sau3A* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I, *Xba* I, *Bam* H I, *Bgl* II) で消化した。対応するカセットをライゲーションさせた。nested PCR ではアニーリング温度を 40~55℃で変えてみた。耐熱酵素は TaKaRa LA Taq と PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を試した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分析し、GM のゲノミック DNA からのみ増幅される DNA 断片を探した。

C. 研究結果

(1) 文献調査

非食用 GM 魚の論文は多数報告されており、活発に研究が行われている。魚への遺伝子導入は技術的に容易になってきていることがうかがえる。非食用 GM 魚について 50 報の論文から情報を収集した。表 2 に結果をまとめた。この中で魚の種類はゼブラフィッシュが 41 報と大多数を占めた。これらのゼブラフィッシュを用いた報告では構造遺伝子の機能の研究やプロモーターの性質の研究が多かった。導入される構造遺伝子では GFP と eGFP で 24 報に達し、タンパクレベルでの検出が容易であるためにレポーター遺伝子として多用されているようである。その他、成長ホルモン、ラクトフェリン遺伝子等の機能を持ったタンパク質をコードする遺伝子の導入も盛んに行われている。報告の大多数を占める GM ゼブラフィッシュは研究室での飼育にとどまると推定される。よって、これらの GM ゼブラフィッシュがフードチェーンに混入する可能性は低いと思われる。

非食用 GM ニワトリを作成した研究報告は 7 報であり、該当する論文は少なかった。これらから情報を収集し、表 3 にまとめた。導入遺伝子では EGFP が 5 報と多数を占めた。これらの研究は遺伝子導入法や発現の制御についての基礎研究が多かった。遺伝子導入法ではウイルスベクターが 3 報で使用された。近年ではニワトリの幹細胞への遺伝子導入が研究されているが、まだ十分な成果が得られていないようである。また、鶏卵をバイオリクターとして使う場合に卵 1 個当たり 300-500 mg の組換えタンパクを発現させてほしいとの産業界からの要望があるが (私信)、まだこの水準には達していないようである。したがって、鶏卵をバイオリクターとして産業的に利用するにはまだ時間がかかりそうである。

非食用 GM ブタについて 24 報の論文から情報を収集した。結果を表 4 にまとめた。研究の目標として臓器移植を目指すと思われる論文は 6 報であり、全体の 4 分の 1 であった。平成 22 年度までの調査と比較すると割合が下がった。一方で研究用と思われる論文報告は 13 報と多かった。近年では GM ブタの臓器をヒトに移植することが試されている。しかし、拒絶反応が完全に抑制できないなど問題が残っているようである。したがって、非食用 GM ブタが大量に飼育されて、フードチェーンに混入する可能性はまだ低いと思われる。

(2) LoxP 配列の検知

ニワトリ ES 細胞からのゲノミック DNA の抽出の結果を表 1 に示した。ニワトリ β -アクチン遺伝子の第 3 エクソン中の配列を増幅させて、いずれの方法で抽出したゲノミック DNA も PCR が可能であることを確認した。市販のキットを利用することを考えると、ゲノミック DNA があまり分解を受けていないこと、収量の点から DNeasy Blood & Tissue Kit、

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit が適していると思われた。これらの2つのキットを比較すると、操作の所要時間が短いことから DNeasy Blood & Tissue Kit が使いやすいと考えられた。以下の実験ではゲノミック DNA の抽出にこのキットを使った。

アダプターライゲーション法のポジティブコントロールの実験においては、約 530 bp の DNA 断片がスミアの中に明瞭に検出された。この DNA 断片の大きさは予想と一致しており、適切なプライマーを使ったときにアダプターライゲーション法が可能であることを確認した。

LoxP 配列を検知するためのアダプターライゲーション法について種々の条件を変えて試した。GM と非 GM のゲノミック DNA を材料としたときの増幅産物を分析すると、スミアが検出されて同様のパターンになってしまった。非特異的な増幅が多いようであった。現在のところ、GM のゲノミック DNA を使ったときだけに増幅される DNA 断片は得られていない。

D. 考察

(1) 文献調査

非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタについて開発状況を調べた。特に、魚については多くの論文が報告されており、研究の目的で様々な非食用 GM ゼブラフィッシュが作成されていた。C. 研究結果の項目に記した理由から、非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタに由来する材料がフードチェーンに混入する可能性は現在はまだ低いと思われる。しかし、今後も同様な調査を続ける必要がある。

(2) LoxP 配列の検知について

ニワトリ ES 細胞からゲノミック DNA を抽出する方法を比較検討した。次に、アダプターライゲーション法を利用して LoxP 配列を検知

することを試みた。現在のところ GM のゲノミック DNA からだけ増幅される DNA 断片は得られていない。

その理由を以下に考察した。 β -アクチン遺伝子を増幅させるポジティブコントロールの実験が成功していることから、LoxP 配列を基にした特異的プライマーが PCR には適していないことが推定される。図 1 に示した LoxP の配列は赤字と青字の部分がパリンδροーム構造を取っている。この部分のみで設計したプライマーでは PCR が両方向に走ってしまい、特異性がない。また、赤字と青字にまたがる長い配列のプライマーを設計するとプライマーが分子内で高次構造を取ってしまい、PCR の効率が落ちると予想される。さらに、LoxP 配列が全体的に AT リッチであるために T_m 値が十分に高いプライマーが設計できない。このような事情から LoxP 配列に基づいて特異的なプライマーを設計することが困難であると考えられた。本研究で試したプライマーも PCR を行うことが難しかったようである。

LoxP 配列のみを手掛かりに検知法を作成するためにはさらなる工夫が必要であり、今後の検討課題である。

E. 結論

平成 22 年度の調査以降の非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタの開発状況を調査した。特に魚で多数の報告があった。また、ニワトリ ES 細胞からのゲノミック DNA の抽出法を比較検討した。さらに LoxP 配列のみを手掛かりとして GM 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、アダプターライゲーション法を試して、その条件検討を行った。

F. 健康危害情報

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

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
TATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATA

図1 LoxP 配列

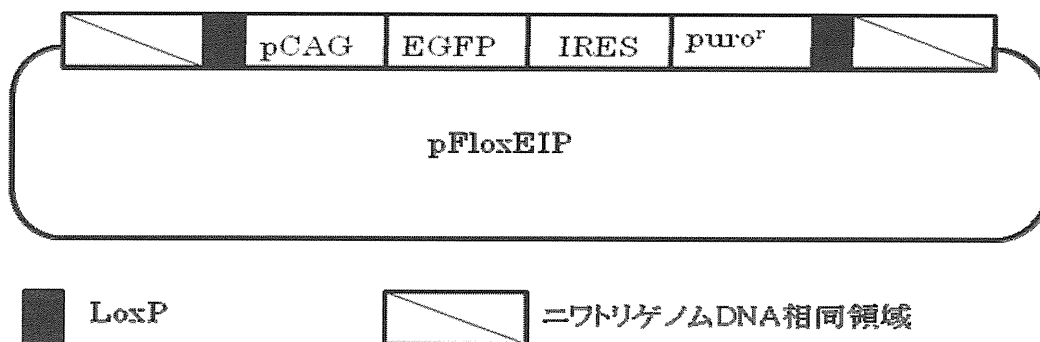


図2 GM ニワトリ ES 細胞に組み込んだ遺伝子配列

	マニュアル	キット1	キット2	キット3
キットの原理		シリカメンブレン スピニングカラム	イオン交換	シリカメンブレン スピニングカラム
収量	35 µg	2.6µg	16 µg	18 µg
A260 / A280	2.0	1.8	2.0	2.0
およその長さ	23 kb	23-4.3 kb	23 kb	23 kb
分解	-	++	±	±
PCR	可能	可能	可能	可能
操作の所要時間		45分くらい	5時間以上	45分くらい

マニュアル：プロテアーゼ K 処理、フェノール抽出、エタノール沈殿

キット1：PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)

キット2：Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen)

キット3：DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

表1 ニワトリ ES 細胞からのゲノミック DNA の抽出法の比較