

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 24 年度 分担研究報告書

非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究

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

研究要旨

昨年度の研究で市販の豚肉中にエリスロマイシン耐性遺伝子を持つ菌が認められた。それにより組換え微生物のマーカー遺伝子として広く利用されているエリスロマイシン耐性遺伝子をターゲットにした PCR 法でそれらが組換え体由来であるか判定するのは困難であることが判明した。今回新たに、組換え体作出時に利用されるベクターに含まれるマルチクローニングサイトの領域での検討を行うため、プローブを合成し、コロニーハイブリダイゼーションによる組換え微生物のスクリーニングを試みた。

協力研究者

食品衛生管理部 江川 智哉

食品衛生管理部 榊田 和彌

を中心に乳酸菌を用いた経口ワクチン開発や腸管内機能製剤開発に関する研究が進んでいることから、これらの研究に関する情報収集を重点的に行い、遺伝子組換え微生物の検知法に関する検討を進めた。

A. 研究目的

非食用モダンバイオテクノロジーを応用した微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微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した。

大腸菌、乳酸菌、枯草菌および酵母などの微生物を対象として、遺伝子組換えに用いるベクター、マーカー、プロモーターなどに関する情報収集を行った後、これらの情報を基に、検知法を検討することにした。

環境浄化目的の遺伝子組換え微生物に関する研究は関連する遺伝子情報を探している状況でその実用化にはかなりの時間が必要と思われた。一方、ヨーロッパやアジア

平成 24 年度は遺伝子組換え微生物をスクリーニングするため、エリスロマイシン耐性遺伝子を検出するプローブとマルチクローニングサイトを検出するプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法を確立し、確立した方法で組換え体を検知することが可能か検討することにした。

B. 研究方法

平成 23 年度までの検討では、グラム陽性細菌の遺伝子組換えに用いられている抗生物質耐性は、実用的にはエリスロマイシンが多用されていることから、エリスロマイシンをマーカーとして食品（市販の生肉）に混入した乳酸菌モデル組換え体の検出を試みた。検討の結果、食品中にエリスロマ

イシシ耐性の常在菌が存在するため、モデル組換え体の検知法としては新たな工夫が求められた。エリスロマイシシ耐性遺伝子とマルチクローニングサイトを標的とし検討した。

エリスロマイシシ耐性には非常に多種類の遺伝子が存在することから、遺伝子組み換えに多用されているエリスロマイシシ耐性遺伝子の特異的に確認するため、新たにコロニーハイブリダイゼーション法を検討した。エリスロマイシシ耐性マーカーについては、*ermB* 遺伝子、*ermC* 遺伝子のプローブである Probe *ermB*、Probe *ermC* を用いた。マルチクローニングサイトとしては、モデル組換え乳酸菌である *L. casei* IGM393 が保持するプラスミド pLPempty のマルチクローニングサイトの配列を基に Probe MCS を合成した (図 1)。

合成したプローブを用い、豚肉から常在菌として単離したエリスロマイシシ耐性菌 5 株との反応性をコロニーハイブリダイゼーションで検討した。まず、コロニーリフトの調製は定法に従い、エリスロマイシシを含む MRS プロスで一晩培養した菌液を、エリスロマイシシを含む MRS アガープレートに塗抹し、コロニーを得た。コロニーを含むプレートの表面にメンブレンディスクを乗せコロニーの転写を試みた。しかしながら、この方法では、コロニーがメンブレンにほとんど転写されなかった。転写を助けるために、メンブレンを乗せてさらに数時間培養する方法や、乗せたメンブレンを滅菌綿棒で上から軽くこする方法についても検討したが、確実にコロニーを転写することは困難で、ハイブリダイゼーションにおいても検出シグナルが弱く、プローブの

特異性を確認することはできなかった。そこで、フィルトレーションユニットにセットしたメンブレンに菌を吸引濾過する方法である Peterkin ら (1989) の示した HGMFs (Hydrophobic Grid Membrane Filtration) 法を参考にし、メンブレン上にコロニーを出現させることにした。

アガープレート上にメンブレンディスクを設置し、その上から培養菌液をスパイラルプレーターで均一に塗抹した。37°C で二晩培養したプレートからメンブレンを剥がし、メンブレンを風乾させてコロニーリフトを調製した。メンブレン上にあるコロニーの変性は、0.5M NaOH、1.5M NaCl で処理し、1.0 M Tris-HCl、1.5 M NaCl、pH 7.4 で中和させた。核酸の架橋は、UV クロスリンカーで 250mJ の紫外線を照射した。コロニーのデブリスはプロテナーゼ K 溶液で処理し取り除いた。

ハイブリダイゼーションには、3 種類の DNA プローブ Probe *ermB*、Probe *ermC*、Probe MCS を使用した。一つのプローブと反応させた後は、プローブを剥離し、新たなプローブと反応させた。

### C. 研究結果

今回調製したコロニーリフトでは、メンブレン上にほとんど重なり合うことなくコロニーを 50 から 150 個出現させることができた (図 2)。メンブレン上のコロニーの大きさは、プレート 1、4、5 が一番小さく、6、7 が中程度の大きさで、2、3 が一番大きかった。出現したコロニーに対して各プローブを用いてハイブリダイゼーションを試みた。probe *ermB* で検出した結果を図 2 に示す。プレート 1、4、5 と *ermB* 遺伝子

を保持する *L. casei* IGM232 のコロニーを高感度で 100% 検出した。また、プレート 3 において数個のコロニーを検出した。プレート 2 および *ermC* 遺伝子を保持する *L. casei* IGM393 は検出しなかった。Probe *ermC* で検出した結果 (図 3)、プレート 2、3 および *L. casei* IGM393 を検出し、プレート 1、4、5、*L. casei* IGM232 は検出しなかった。*L. casei* IGM393 の検出率は 100% であったが、プレート 2 および 3 の検出率は、両方とも 70% で、検出シグナルは明瞭ではなかった。丸が欠けた形状の検出シグナルから、プローブの検出感度が低いのではなく、プレート 2 および 3 のコロニーは他に比べ大きく、今回の方法では、溶菌、DNA の変性が不十分だったと考えられる。次に Probe MCS で検出した結果 (図 4)、*L. casei* IGM232 と *L. casei* IGM393 を 100% 検出し、プレート 1、2、3、4、5 は検出しなかった。Probe MCS は、MCS の配列を保持しないと考えていた *L. casei* IGM232 においても反応した。*L. casei* IGM232 の由来は、その親株にトランスポゾンを用いてクロモソームに *ermB* 遺伝子を挿入したものである。親株は、全ゲノム配列が解読されており、MCS に類似する配列がないことは事前に確認している。実際、Probe MCS を親株に反応させたが検出シグナルは認められなかった (データは示さず)。今回、検出に差は認められたが、3 種類のプローブを用いることにより、エリスロマイシン耐性菌を検出することが可能であった。それらの中で自然界から分離したものは、一つのプローブに反応するものが多いのに対して、組換え体モデル乳酸菌である *L. casei* IGM393 は、Probe *ermC* と

Probe MCS の両プローブで検出が可能であり、これら 2 つのプローブを用いることにより、組換え体を検知することが可能であった。

#### D. 考察

スパイラルプレーターを用いて調製したコロニーリフトはメンブレン上に均一コロニーを出現させることが可能でプローブによる検出シグナルの位置関係の特定が簡単にできた。今回確立した方法はメンブレンリフトが上手くいかない場合には、有用な方法であり、他の菌種にも応用できると考えられる。コロニーの変性は菌種によって、NaOH を用いた変性処理の他にリゾチウムや SDS を加える等の条件検討が今後必要であると考えられる。豚肉より単離されたエリスロマイシン耐性菌は一部の菌で Probe *ermB*、Probe *ermC* の両方で検出されるコロニーが認められたが、ほとんどが Probe *ermB* か Probe *ermC* で検出された。Probe MCS は、*L. casei* IGM393 だけでなく、*L. casei* IGM232 に対して交差性を示した。*L. casei* IGM232 に関しては、*ermB* 遺伝子を挿入する際に必要となるトランスポザーブルエレメントの配列についても確認したが、プローブとの類似配列は認められなかった。そのため、組換え体作出時にマルチクローニングサイトに類似した配列が組換えにより出現した可能性が示唆される。今回の検討結果より、エリスロマイシン遺伝子とマルチクローニングサイトを検出するプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを利用すれば生きた組換え微生物をスクリーニングすることが可能であると考えられる。しかしながら、近年、

組換え体を作成するバイオテクノロジー応用技術は進歩しており、マルチクローニングサイトを残さない方法も確立されている。したがって、今回検討した方法でも、すべての組換え微生物を検出するには不十分であり、塩基配列の情報がない状況において遺伝子組換え微生物を検知するのは容易ではないと考えられる。

#### E. 結論

遺伝子組換え微生物をスクリーニングするためのコロニーハイブリダイゼーション法を確立した。確立した方法で組換え体を検知することが可能か検討し、2つのプローブを用いた方法によりモデル乳酸菌組換え体を食品から検知できることが可能であった。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. 梶川揚申、五十君静信。乳酸菌組換えワクチン。書籍：新しい乳酸菌の機能と応用。in press シーエムシー出版

学会発表

1. 森田英利、Tulika Srivastava、中野章代、高畑宗明、高木孝士、西山英利、藤英博、大島健志朗、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。 *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属における線毛および鞭毛の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察。日本乳酸菌学会。2012.7.12-13。

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

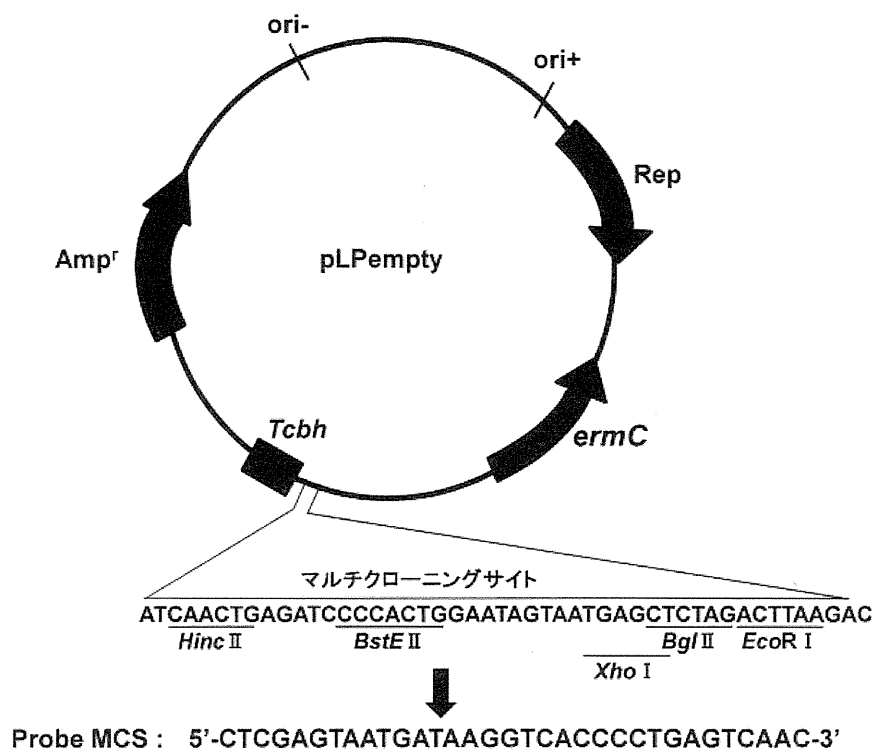


図1 *Lactobacillus casei* IGM393株が保持するプラスミドpLPemptyの構造とProbe MCSの塩基配列

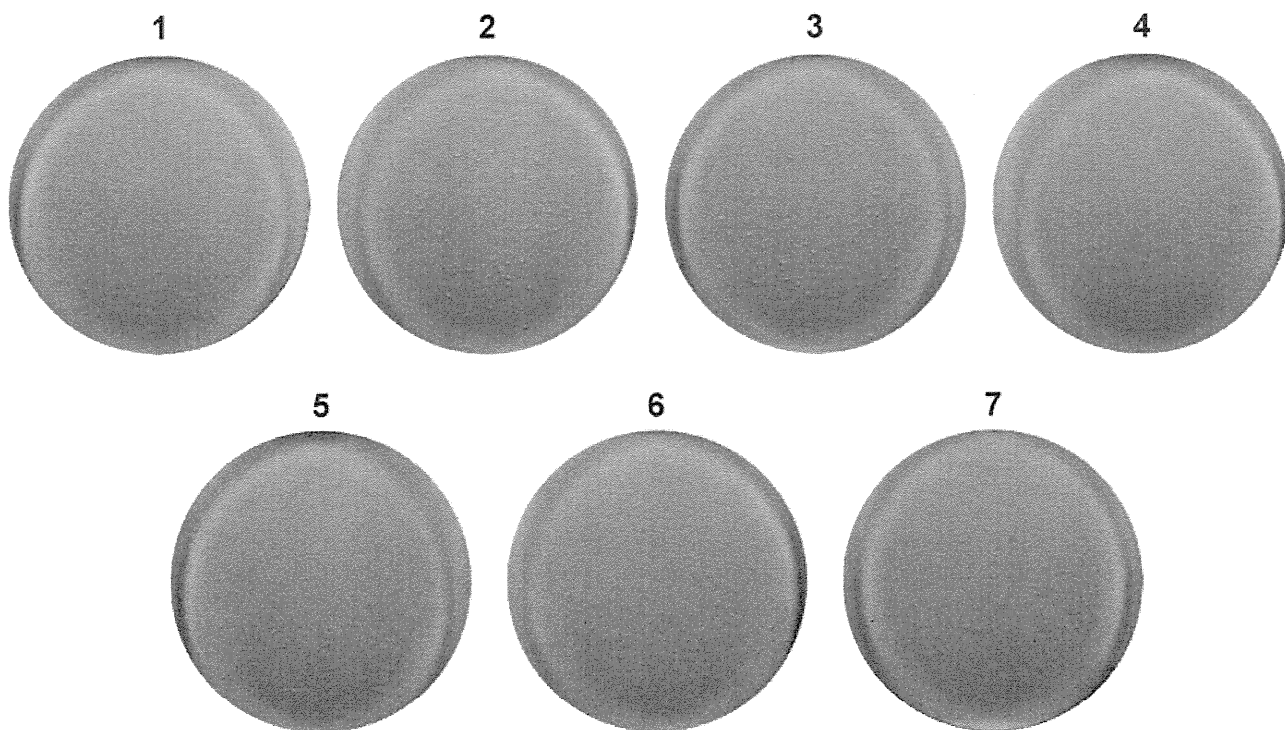


図1 エリスロマイシン含有MRSアガープレート上のメンブレンに増殖した菌のコロニー像  
 1、2、3、4、5: 豚肉検体から単離したエリスロマイシン耐性菌  
 6: *ermB*遺伝子を染色体上に保持する*Lactobacillus casei* IGM232株  
 7: *ermC*遺伝子をプラスミドに保持する*Lactobacillus casei* IGM393株

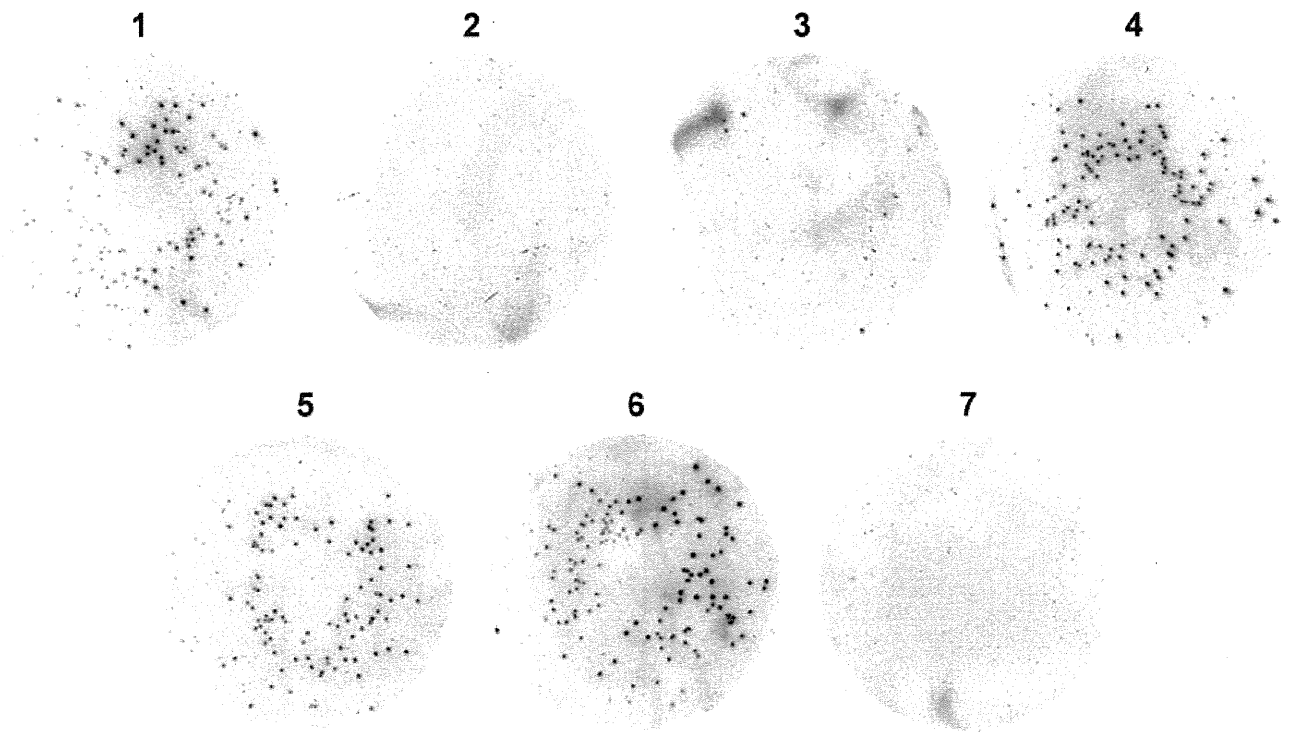


図2 Probe ermBとハイブリダイズしたコロニー像  
 1、2、3、4、5：豚肉検体から単離したエリスロマイシン耐性菌  
 6：ermB遺伝子を染色体上に保持する*L. casei* IGM232株  
 7：ermC遺伝子をプラスミドに保持する*L. casei* IGM393株

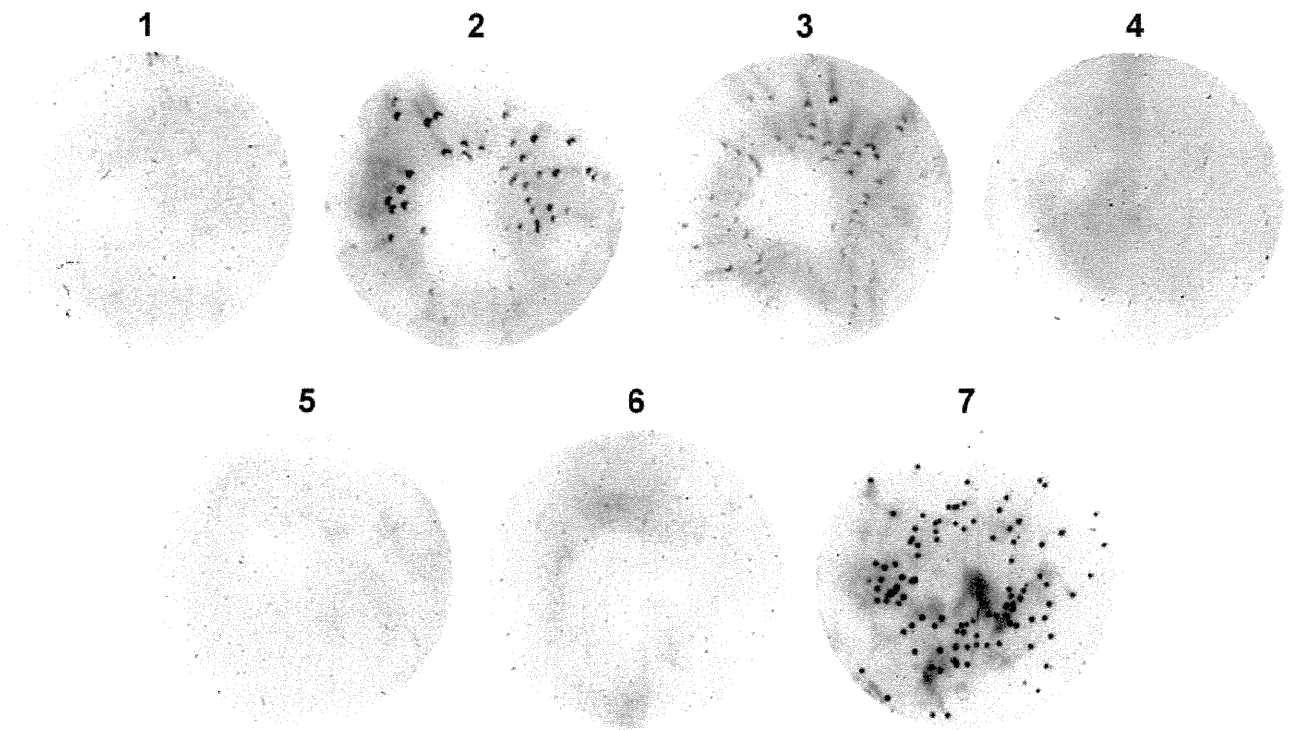


図3 Probe ermCとハイブリダイズしたコロニー像  
 1、2、3、4、5：豚肉検体から単離したエリスロマイシン耐性菌  
 6：ermB遺伝子を染色体上に保持する*L. casei* IGM232株  
 7：ermC遺伝子をプラスミドに保持する*L. casei* IGM393株

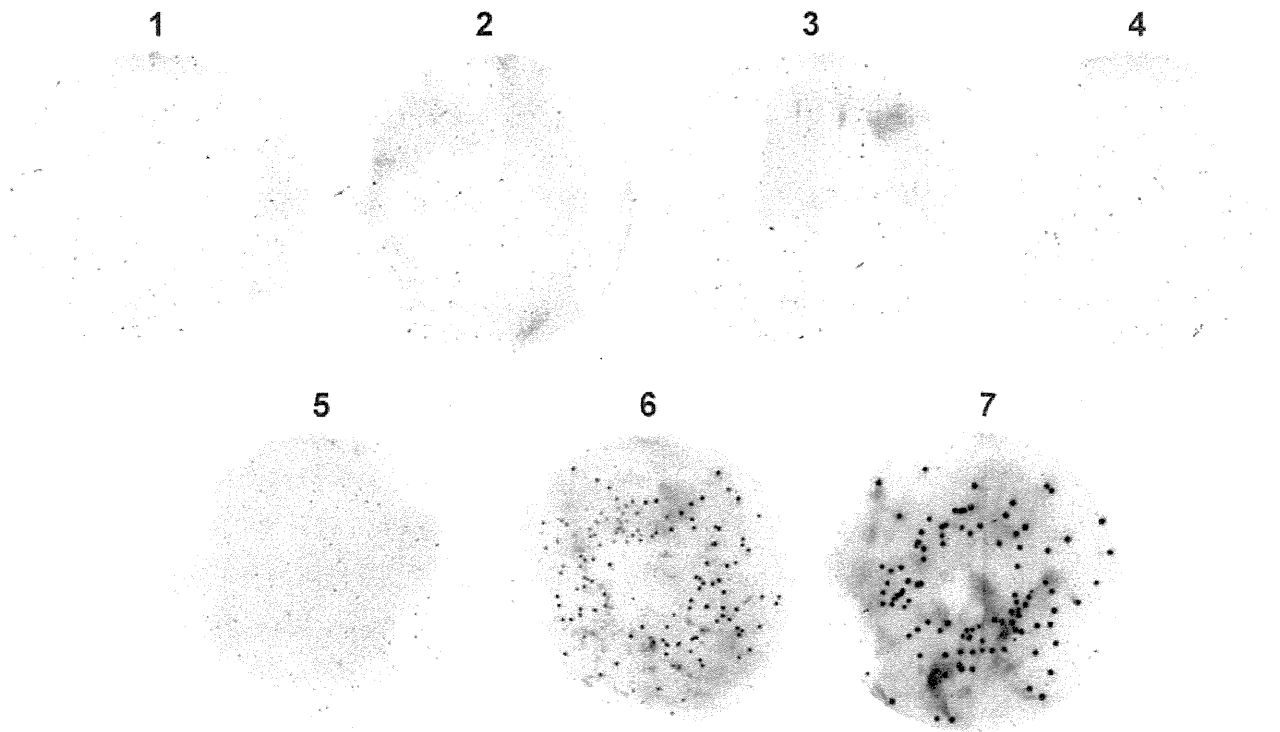


図4 Probe MCSとハイブリダイズしたコロニー像  
1、2、3、4、5: 豚肉検体から単離したエリスロマイシン耐性菌  
6: *ermB*遺伝子を染色体上に保持する*L. casei* IGM232株  
7: *ermC*遺伝子をプラスミドに保持する*L. casei* IGM393株

(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

普及し続けている遺伝子組換え技術によって、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遺伝子組換え植物が開発実用化されつつあり、利用される植物も多岐にわたっている。これらの工業原料を生産するような遺伝子を組換えた植物が食品の原材料等に混入した場合、これまでに実用化されていた食品用途の遺伝子組換え作物よりも、深刻な健康被害をもたらすことが懸念されている。そのため、非食用の遺伝子組換え植物の混入を検出する方法の確立が望まれている。本研究では、多種類の組換え遺伝子を多植物種から一斉に検知するために、DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知の可能性を探った。イネ、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト、ダイズの内生遺伝子を検出するためのプローブと現時点で頻用されている組換え遺伝子のプローブを固定化した DNA マイクロアレイを作成し、各作物種の内生遺伝子が検出されることを確認した。また、非食用の組換え植物の 1 例として用いた工業用デンプン生産のために作出されたジャガイモであるアムフローラにおいても組換え遺伝子を検知することが可能であった。

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

モダンバイオテクノロジー技術である遺伝子組換え技術によって生産性や付加価値を持つ植物が生み出されるようになって久しい。最近では、食品や飼料といった用途以外の工業用原料を生産させるための遺伝子組換え植物が作出されている。これらの工業用原料等の生産は、他種生物の遺伝子を組換えることによって、元来その植物種が生産していない化学物質を作り出すことができるようにして達成されている。これらの化学物質はこれまで食品として用いられてきた経験のないものも含まれており、それをヒトが食した場合には健康被害を招く懸念が指摘されている。これらの工業原料等を生産させる植物種は高いバイオマスが期待

できるトウモロコシやジャガイモといった、一般には食品として利用され、大量に流通している植物種である。このことから、工業原料等生産の目的で作出された非食用の遺伝子組換え作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ない。そのため、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。これまで食品として利用される組換え遺伝子を検出する研究がなされてきたが、今後は、工業量原料等の生産に利用されている組換え遺伝子についても検出が必要となる。また、検査対象となる植物種についてもコメやトウモロコシといった主食以外ものについて、更には加工品として輸入される植物種も多いことから、加工食品へと検査対象を拡大する必要性がある。加工食品においては DNA 抽出の効率が悪い場合や、抽出された DNA にニックなどが入っていることによって、その正味の量が少ないことが



懸念されることから、これらの課題をクリアする方法も要求される。

これらの目的を達成するために、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知するためのプロトコルの開発を行ってきた。本年度は、非食用の遺伝子組換え植物の 1 例として、工業用デンプン生産用の遺伝子組換えジャガイモであるアムフローラを用いて組換え遺伝子の検出が可能であるかについての検討を行った。

## B. 研究材料および方法

組換えポテト品種 EH 92 - 527 - 1 (アムフローラ) は SIGMA-ALDRICH より購入したものをを用いた。遺伝子組換えコメは平成 21 年に当研究室で作成されたものをを用いた。遺伝子組換えコメとして平成 21 年度に当研究室でアイズプラント由来の 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「ニッポンバレー」に導入して作成したものをを用いた。

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。ゲノム DNA の定量は Quant-iT DNA Assay kit, broad range (Invitrogen 社) とて蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL) を用いて行った。

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。他植物種検出用マイクロアレイに用いたプローブの種類は、ハイブリダイゼーション効率評価用の  $\lambda$ -DNA (lm2,4) 2 種類、非特異吸着評価用の gfp 遺伝子 (gf1, 2) 2 種類、コメ pld 遺伝子 (pl1~6) トウモロコ

シ adh 遺伝子 (ad1, 3) と ssIIb 遺伝子 (ss1, 8)、ダイズ lectin 遺伝子 (le1~4) ジャガイモ ugp 遺伝子 (ug1~4)、トマト apx 遺伝子 (ap1~4)、トマト lat 遺伝子 (la1~4)、組換え遺伝子検出用として、35S プロモーター配列 (35S2, 6) nos ターミネーター配列 (ns1, 6)、nptII 遺伝子 (np2, 4)、epsps 遺伝子 (ep3, 4)、pat 遺伝子 (pa1, 4)、小麦 hsp ターミネーター配列 (ta3, 4) を用いた。カッコ内は各図のマイクロアレイの配置に記された略号を示している。

マイクロアレイ解析は横河電機社製読み取り装置を用いて行い、プローブの標識等については横河電機社製のマニュアルに従って行った。

## C. 研究結果

### C-1 多植物種検出用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

トウモロコシ、イネの他に、ジャガイモ、トマト、ダイズの内生遺伝子と、組換え遺伝子として 35S プロモーター、nos ターミネーター、nptII、epsps、pat、小麦 HSP ターミネーターを固定化したアレイを用いて、遺伝子組換えイネをサンプルとして解析を行った。その結果、遺伝子組換え、非組換えサンプルの両方においてマイクロアレイ上のコメ内在性遺伝子である pld とハイブリダイゼーション効率評価用の  $\lambda$  DNA のプローブ群で蛍光が観測された (図 1 破線、点線)。更に遺伝子組換えサンプルにおいてのみ、35S プロモーターと nos ターミネータープローブ群のみで蛍光が検出された (図 1 実線)。この結果から、コメをサンプルとした場合には、今回作成した DNA マイクロアレイを用いて、組換え遺伝子を検出することが可能であることが判明した。しかし、ジャガイモ内生遺伝子のプローブである ugp3 においても蛍光が観測された。このことから、イネゲノム内に ugp3 に似た配列が存在して

いるものと考えられたため、植物種を判別する際には *ugp3* 以外のプローブを使用することが望ましいと考えられた。

## C-2 多植物種検出用マイクロアレイを用いたジャガイモからの組換え遺伝子の検出

遺伝子組換えジャガイモであるアムフローラから抽出したゲノム DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、アムフローラに導入された遺伝子である *nos*, *nptII* 遺伝子と内在性遺伝子である *ugp* 遺伝子のスポットで蛍光が観測された (図2 実線、破線) のに対し、対照として行った遺伝子を組換えていないジャガイモのゲノム DNA をサンプルした場合には、*ugp* 遺伝子のスポットで蛍光が観測された (図2 破線) が、*nptII* のスポットでは蛍光は検出されなかった (図2 実線)。このことから、遺伝子組換えジャガイモの組換え遺伝子を検出することが可能であることが示された。

## D. 考察

本年度はマイクロアレイ解析をコメやトウモロコシ以外の植物種に適応できるかについての検討を行った。植物種については昨年度まで使用してきたイネ、トウモロコシの他に、比較的遺伝子組換えの報告例が多く流通量も多いと思われる、ジャガイモ、トマト、ダイズを検出できるような DNA マイクロアレイを設計した。それぞれの植物種のゲノム DNA を特異的に検出するためのプローブを各遺伝子について4～6種類ずつ設計し、それらを固定化した DNA アレイを製作した。まず、これまでにサンプルとして使用実績のあったコメから抽出したゲノム DNA を用いて解析を行ったところ、内在性遺伝子と、組換え体においては組換え遺伝子が検出されることが判明した。しかし、同じ遺伝子上に設計したプ

ローブでもその配列によって検出されるシグナルの強度が異なっていた。これは、それぞれの配列のハイブリダイゼーションの効率を反映しているものと考えられた。このアレイを用いて各植物種を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、コメではジャガイモのプローブと、ジャガイモではトマトのプローブとで交叉ハイブリが認められた。コメとジャガイモでは同じ遺伝子上に設計した6種類のプローブのうち1種類とだけで交差が見られたことから、プローブ領域を検討することで、特異性を確保することが可能であることが示唆された。ジャガイモを用いた場合には、2種類のトマト内在性の遺伝子検出用のプローブ8種類中7種類で交叉ハイブリが認められた。これは、ジャガイモとトマトが同属の植物種であることからゲノム配列上によく似た配列を多く含んでいるためであると考えられた。しかし、これらのプローブのうち1種類では交叉シグナルが検出されておらず、このプローブを用いることで、トマトとジャガイモのゲノム DNA を区別することが可能であることが示唆された。

## E. 結論

より多くの植物種からの組換え遺伝子の検知に適応するために、新たに DNA マイクロアレイを設計・作製した。このアレイを用いて非食用の組換えジャガイモであるアムフローラの組換え遺伝子の検出を試みたところ、組換え遺伝子を特異的に検出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

Ito A., Taguchi, T, Mogi, T, Wake, H, Tanaami T, Akiyama, H, Teshima, R, Sasaki, N, Yamada, A, Ozeki, Y. Comparison of signal enhancement techniques using DNA microarrays for screening GM crops. Jpn. J. Food Chem. Safety, 19: 141- 148 (2012).

## 2. 学会発表

伊東 篤志、田口 朋之、茂木豪介、田名網健雄、  
穠山 浩、近藤 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山  
田 晃世、小関 良宏. DNA マイクロアレイによる  
GMO スクリーニング検査法の開発. 日本食品化  
学学会 第 18 回総会・学術大会（函館）、2012  
年 6 月 21 日

## 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

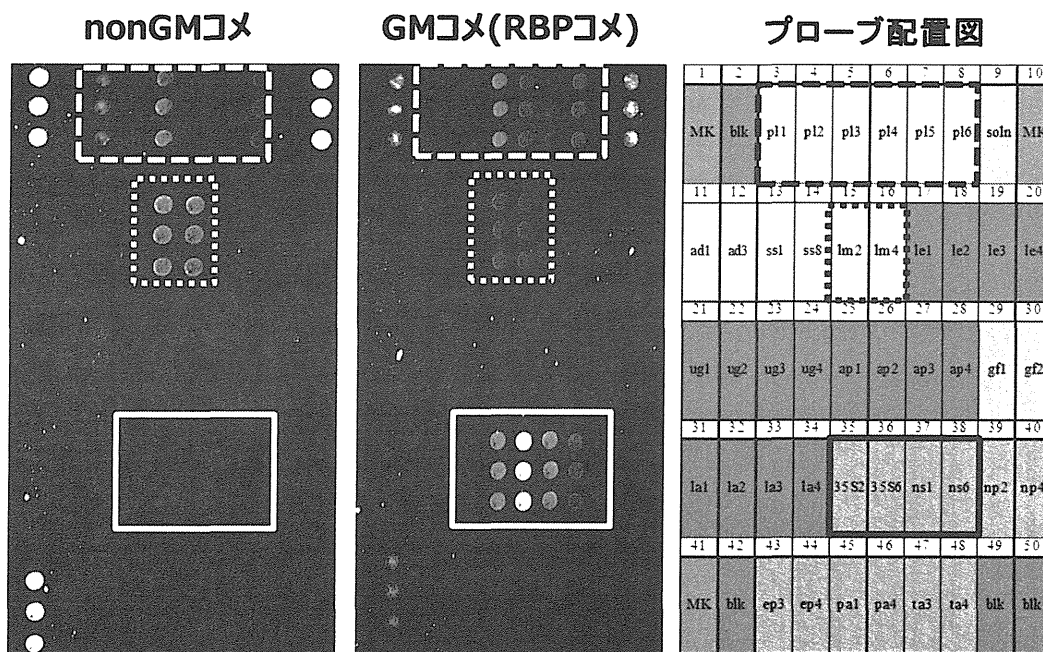


図1 多植物種検出用アレイを用いた遺伝子組換えコマからの組換えDNA 検出画像

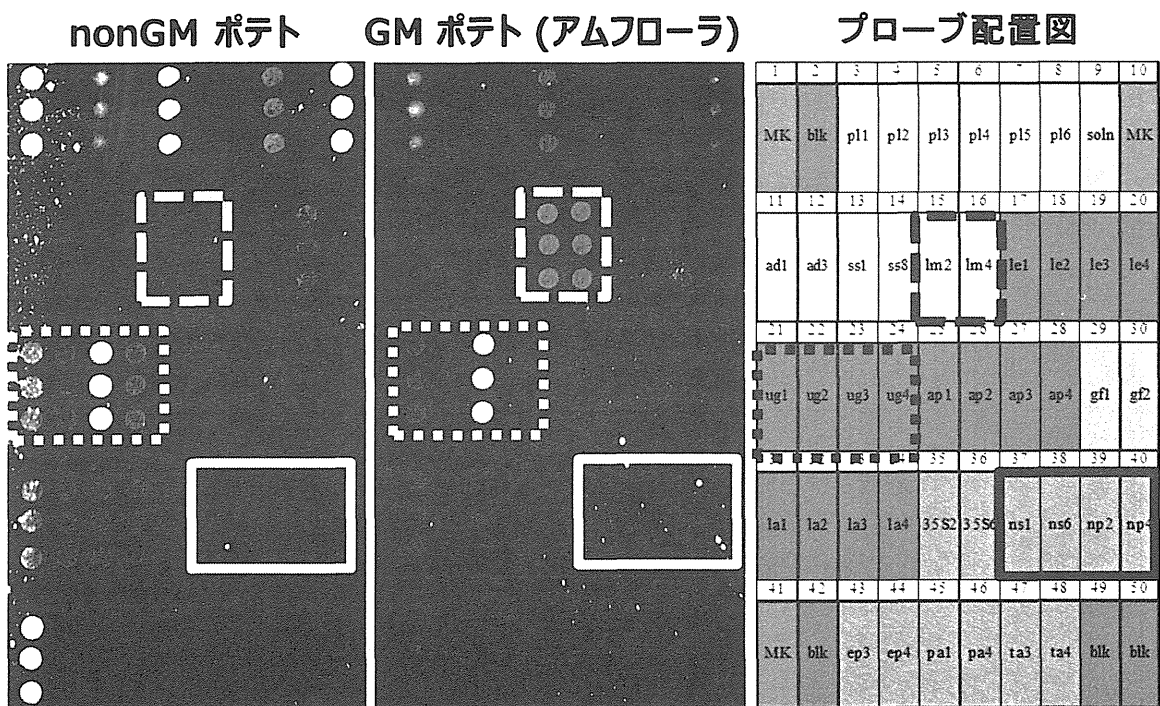


図2 多种植物検出用アレイを用いた遺伝子組換えジャガイモ（アマフローラ）からの組換え遺伝子検出画像

## 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

2008-2012年の米国における医薬品用及び環境浄化用GM植物の野外圃場栽培認可・作付け状況を調査した結果、2008年から2010年にかけては認可面積、作付け面積ともに減少し、2012年は作付けが行われていないことが判明した。また、植物で医薬品類の製造を行っているカナダの企業2社を調査した結果、いずれもタバコ属植物をホストに、一過的な遺伝子発現によるタンパク質生産システムを利用し、閉鎖型栽培施設(温室)で医薬品類の生産を行っている現状が判明した。医薬品用、環境浄化用遺伝子組換え(GM)植物及び新規植物育種法(NBT: New Breeding Techniques)の開発状況を調査した。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、環境浄化及びNBTの9種類を設定した。2012年の国内学会では、25件が得られ、その内訳は、機能性食品:7件、経口ワクチン:1件、食用医薬:2件、ワクチン抗原:0件、抗体医薬:1件、治療薬:6件、診断薬・試薬:1件、環境浄化:2件、NBT:5件であった。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で2012年に公表・出版された論文等を調査した結果、66件が得られ、その内訳は、機能性食品:21件、経口ワクチン:4件、食用医薬:1件、ワクチン抗原:4件、抗体医薬:3件、治療薬:13件、診断薬・試薬:3件、環境浄化:13件、NBT:5件(重複1件)であった。2012年の国別の件数は、中国:32件と中国が全件の半数近くを占め、そのほとんどは中国国内の特許であった。

医薬品及び環境浄化用のGM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GM植物の検知法開発を目的とし、これまでに、検知操作において陽性対照となるモデルGMトマト、及びイネを入手、または作出している。本年度はコレラトキシンBサブユニット(ctxB)を生産するモデルGMイネのT1世代種子(コメ)を検体としたctxBタンパク質の検知法について検討した。また、同試料を検体とするctxB遺伝子の定量的検知法を確立した。

##### 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(医薬品用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。また、遺伝子組換え技術は、近年、多様化・複雑化し、検知が困難な組換え体の作出が進んでいる。そこで本研究においては、医薬品用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、新規植物育種法(NBT: New Breeding Techniques)の開発状況の調査を行い、食品の安全性確保のための基盤情報を整備する。

さらに、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（ctxB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。昨年度までに、ミラクリントマトについては自殖種子の取得を、ctxB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。本年度は、これまでに構築したモデル組換え体を使用した実用的組換え体検知技術の開発を目的とし、モデル組換えイネのT<sub>1</sub>世代のコメを検体としたctxBタンパク質の検知法について検討するとともに、同試料を検体とするctxB遺伝子の定量的検知法を確立した。

## B. 研究方法

1) 医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTの調査  
遺伝子組換え（GM）植物のうち、人や家畜など動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を医薬品用GM植物の範囲とし、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。医薬品用及び環境浄化用GM植物に関する情報を文献データベース（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た。また、同様にNBTに関する情報を収集した。

2) 非食用GM植物の検知法開発に関する研究

## コレラトキシンBサブユニット（ctxB）生産イネ

### CtxBタンパク質発現コンストラクト

コレラトキシンBサブユニット（ctxB）遺伝子は国立衛研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。

これらを用い、GluB1-ctxB-KDEL の発現コンストラクトを構築し、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 pSTARAR-5 ベクター（インプラントイノベーションズ）に導入した。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、イネ形質転換候補株（試験管培養部物 20 本）を薬用植物資源研究センター研究棟グロースチャンバーにて馴化栽培し、種子を得た（文献 6, 7）。

### T<sub>1</sub> 種子（コメ）試料

今回、ctxBタンパク質検知または1粒におけるctxB遺伝子の導入確認に使用した系統は下記のとおり。なお、系統番号の後（）内に数値があるものは、リアルタイムPCR法で*DSH1p*遺伝子（文献8）のプロモーター領域*DSH1p*を対照として検出、測定したctxB遺伝子コンストラクトのコピー数を解析した系統であり、数値はそのコピー数を示す。

非組み換え株：WT#5, WT#8

ctxB 遺伝子導入株：#1-6-1 (3), #1-6-2, #1-6-3, #1-6-4, #1-6-5, #1-7-1 (1), #2-4-1 (7), #2-4-3, #2-10-1 (0)

### コメからのタンパク質調製法の検討

コメに蓄積されていると考えられるctxBタンパク質を免疫学的手法で検知・定量するために、はじめに非組換え体コメからの総タンパク質調製法、とくにタンパク質抽出バッファーについて検討した。PBS-T (phosphate buffered saline, pH=7.4, 0.05% Tween20) または

TBS-T(Tris-buffered saline, pH7.6, 0.05% Tween20)の2種のバッファーで、コメ(あきたこまち、市販品)粉碎試料約100 mgまたは約250 mgより、抽出時間5 min.、3 hr.、16 hr.でタンパク質抽出を行い、抽出液についてタンパク質の定量を行い、抽出効率を比較した。

コメ(あきたこまち、市販品)約3 gを乳鉢・乳棒を用い粉碎

↓ 約100 mgまたは約250 mgを2 mL容アシストチューブに正確に秤量

↓ 1 mLのPBT-TまたはTBS-Tを加え、1 min.ボルテックスミキサーで混和

↓ 5 min.(室温)静置

または、3 hr.(4°C)静置(途中1回ボルテックスミキサーで1 min.混和)

または、16 hr.(4°C)静置(途中1回ボルテックスミキサーで1 min.混和)

↓ 遠心15 krpm, 4°C, 5 min.

上清500 µLを回収し、定量等以後の実験に使用

タンパク質定量(Pierce® BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific)使用)

Test-tube procedure

test-tubeに100 µLのstandardとunknown sampleを入れる

↓ WR 2.0 mLを加えボルテックスミキサーで混和

↓ 試験管の口をパラフィルムでカバーし、37°C, 30 minインキュベート

↓ 室温まで冷ます

↓ 分光計で562 nmの吸収を測定(全sampleを10 min以内に測定する)

↓ 562 nmのブランクの吸収の平均を他の測定結果から減算

標準曲線を作成し、unknown sampleの濃度を求める

#### 競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量(条件検討)

競合ELISA法によるctxBタンパク質の検知、定量システムの構築のための、抗原(ctxB)-一次抗体濃度の最適化について検討した。競合ELISA法の概念図を図1に示す。用いた試薬等は下記のとおり。

ctxBタンパク質: Cholera Toxin B Subunit from *Vibrio cholerae* (C9903, Sigma)

anti-ctxB 一次抗体: Monoclonal mouse anti-cholera toxin, B-subunit (2C4, HyTest Ltd.)

HRP anti-Mouse IgG 二次抗体: HRP Anti-Mouse IgG (Included in the kit, KPL)

ELISA kit: Protein Detector™ ELISA Kit (HRP Anti-Mouse IgG, 54-62-18, KPL)

上記試薬を使用し、ウェルに固相化するctxBタンパク質量及び、anti-ctxB一次抗体の濃度を振って、最適と考えられる吸光度が得られる固相化ctxBタンパク質量及び、anti-ctxB一次抗体濃度を決定した。

#### 競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量(検量線の作製)

上記の抗原-抗体条件で、標準ctxBタンパク質を用い、一次抗体と共に加えるctxB(標準物質)の濃度を振って、検量線を作製した。競合抗原はblocking buffer、または、PBS-Tで希釈して加えた。

#### 競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量(コメ抽出タンパク質中のctxBの定量)

非組み換え株(WT#5), ctxB遺伝子導入株(#1-6-1)のコメ約100 mgよりPBS-Tで16 hr.抽出した総タンパク質試料をそれぞれPBS-Tで1/5, 1/25, 1/125, 1/625に希釈して検体とした。一次抗体と共に加えるctxB(標準物質)の濃度を振って、検量線を作製するとともに、未知試料の濃度を測定した。なお、競合抗原はPBS-Tで希釈して加えた。

#### 直接ELISA法によるctxBタンパク質の検知

競合法での検知が困難であったため、直接ELISA法での検知を試みた。図2に直接ELISA法の概略を示す。本検知法では、コメより調製したタンパク質溶液をwellに固相化し、これを直接一次及び二次抗体で検知する。

検知・定量を検討した試料は下記のとおりである。

非組み換え株2系統: WT#5, WT#8

ctxB遺伝子導入株8系統: #1-6-1, #1-6-2, #1-6-3, #1-6-4, #1-6-5, #1-7-1, #2-4-3, #2-10-1



以下に Protein Detector™ ELISA Kit を用いた直接 ELISA 法のプロトコルを示す。

Coating: add 100 µL of samples per well, 4°C, o/n

blank PBS-T 10 µL + coating buffer 90 µL

negative control PBS -T10 µL + coating buffer 90 µL

positive control ctxB/ PBS-T/ coating buffer (50 ng ctxB/well)

rice extract (in PBS-T) 10 µL + coating buffer 90 µL

↓ seal plate

↓ keep still at 4°C, o/n

↓ empty plate and tap out residual liquid

Blocking: add 200 µL of 1X BSA Diluent/Blocking Solution

↓ react 5 min.

↓ empty plate and tap out residual liquid

React primary antibody: add 100 µL of mouse anti-ctxB (0.5 µg/mL)

↓ react 1 hr.

↓ empty plate and tap out residual liquid

Wash: add 200 µL of 1X Wash Solution

↓ empty plate and tap out residual liquid

↓ repeat 3 times

React secondary antibody: add 100 µL of HRP anti-mouse IgG (1.0 µg/mL)

↓ react 1 hr.

↓ empty plate and tap out residual liquid

Wash: add 200 µL of 1X Wash Solution

↓ empty plate and tap out residual liquid

↓ repeat 3 times (keep still 5 min. during last wash)

React substrate: add 100 µL of ABTS peroxidase Substrate Solution

↓ react 1 hr.

↓ add 100 µL of Stop Solution

Read plate with plate reader at 405 nm

### コメからの総タンパク質の抽出 -タンパク質抽出バッファーの検討-

Tween を添加した抽出バッファーでは直接 ELISA 法ができないため、Tween を添加しない、PBS(phosphate buffered saline, pH=7.4)または TBS(Tris-buffered saline, pH7.6)の2種のバッファーで、コメ(あきたこまち)粉砕試料約100 mg または約250 mg より、抽出時間5 min., 3 hr., 16 hr. でタンパク質抽出を行い、抽出効率について検討した。抽出及び定量法は下記のとおり。コメ(あきたこまち、市販品)約3 g を乳鉢・乳棒を用い粉砕

↓ 約100 mg または約250 mg を2 mL 容アシストチューブに正確に秤量

↓ 1 mL の PBS または TBS を加え、1 min. ボルテックスミキサーで混和

↓ 5 min. (室温) 静置

または、3 hr. (4°C) 静置 (途中1回ボルテックスミキサーで1 min. 混和)

または、16 hr. (4°C) 静置 (途中1回ボルテックスミキサーで1 min. 混和)

↓ 遠心15krpm, 4°C, 5 min.

上清500 µL を回収し、定量に使用

タンパク質定量 (Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) 使用)

Small scale (micro-plate) procedure

Micro-plate (96 well) に25 µL の standard と unknown sample を入れる

↓ WR 200 µL を加えプレートシェーカーで混和

↓ フィルムでカバーし、37°C, 30 min インキュベート

↓ 室温まで冷ます

分光計 (プレートリーダー) で560 nm の吸収を測定

### 直接 ELISA 法による ctxB タンパク質の検知

PBS 抽出タンパク質試料を用い、直接 ELISA 法での ctxB タンパク質の検知を試みた。

供試試料は下記のとおりである。

非組み換え株2系統: WT#5, WT#8

ctxB 遺伝子導入株8系統: #1-6-1, #1-6-2,

#1-6-3, #1-6-4, #1-6-5, #1-7-1, #2-4-3,

#2-10-1

各試料約100 mg より PBS を用い(16 hr.) タンパ

ク質抽出液試料を調製し、これらをコーティングに用いた。なお、*ctxB* 50 ng/ well を陽性対照(PC)、0 ng/ well を陰性対象(NC)とした。

#### T<sub>1</sub>種子(コメ)1粒における遺伝子導入確認

各系統4粒または8粒のコメ(種籾)より、それぞれ独立にGM quicker 2(ニッポンジーン)を用いゲノムDNAを調製し、ゲノムDNA溶液30 µLを得た。

コメからのDNA調製にあたっては、まずコメ1粒を2 mL容のアシストチューブに入れ、GE1 bufferを250 µL加え、MS-100(TOMY精工)で3,000 rpm、60 sec処理した。10分間室温で静置したのちMS-100で3,000 rpm、60 sec処理を2度繰り返し、Proteinase K 10 µL、α-amylase 2 µL、RNaseA 5 µLを加え、以後、キットのプロトコルに従った。

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' -atcggtgagctcacagctcgctc 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*-1600S:5' -ggcgtgtagtagccttgacag-3'

*DSH1p*-rtA1 :5' -catatccactcacctcgagc-3'

#### イネ形質転換体T<sub>1</sub>種子(コメ)における*ctxB*遺伝子コピー数の解析

イネ形質転換体T<sub>1</sub>種子(コメ)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ΔΔCt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' -CCTCAGGGTATCCTTCATCCTT-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)で行った。

なお、鋳型としたゲノムDNAはコメ(もみ殻を除いた玄米)1粒、または粉末(もみ殻を除いた玄米を乳鉢乳棒で粉碎したもの)約50 mgからGM quicker 2(ニッポンジーン)を用い調製した。

#### C. 研究結果

1) 2008-2012年の米国における医薬品用及び環境浄化用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、2008-2012年の医薬品用及び環境浄化用GM植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べた(図3、表1、表2、2013年1月18日公表)。

2008年から2010年にかけては認可面積、作付け面積ともに減少し(図3)、2012年は承認された作物があるにも関わらず、実際の作付けが行われていないことが判明した(表1、表2)。

2) カナダ植物バイオ企業の調査

2012年9月に植物で抗体医薬やワクチンの製造を行っているカナダの企業2社(Plant Form

社及びMedicago社)に直接赴き、生産システム、生産物、開発の段階等を調査した(図2-図6)。調査した2社は、いずれも医薬品類の生産ホストとしてタバコ属植物(*Nicotiana benthamiana*)を用い、植物ウイルスを感染、または、アグロバクテリウムを用いて組換えウイルス遺伝子を一過的にタバコの葉で発現させて生産するシステムを利用していた。その概要は以下である。

#### Plant Form社

組換え植物ウイルスを利用したタバコ葉での一過的遺伝子発現システムによる抗体医薬生産(抗がん剤：ハーセプチン、アバスタチン、セツキシマブ等)

University of Guelph の Tobacco plant expression technology を応用。

RNAiにより植物型糖であるフコース、キシロースの付加を抑制したタバコを使用。

#### Medicago社(図2-6)

カナダ・ケベック市に本社、USA・ノースカロライナ州に生産施設(図4、図8)。

アグロインフィルトレーション法により、ワクチンとして利用可能なワクチン様粒子(virus like particle: VLP)を構成するウイルス遺伝子(インフルエンザなど)を非組換えタバコの葉で発現させ、ワクチン類を生産(図4、5、7)。

ウイルス遺伝子のシークエンスから、インフルエンザVLPの生産までわずか19日間で可能であるため、パンデミックインフルエンザの第一波の間にワクチンの製造が可能な唯一の方法と紹介されている(図5、6、H5パンデミックインフルエンザVLPはフェーズII段階)。

また、本システムで生産されたインフルエンザワクチンは特別なアジュバンドがなくてもワクチン効果が高い(より少量で従来のワクチンと同様の効果が得られる)ことが紹介された。

3) 2012年に国内学会で公表・出版された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する論文等

2012年8月開催の第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウムで公表された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する報告を表3に示した。関連報告25件の内訳は、機能性食品：7件、経口ワクチン：1件、食用医薬：2件、ワクチン抗原：0件、抗体医薬：1件、

治療薬：6件、診断薬・試薬：1件、環境浄化：2件、NBT：5件で機能性食品及び治療薬に関するものが最も多かった。また、図9に同学会で紹介されたNBTに関する情報をまとめた。

4) 2012年に国内外で公表・出版された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する論文等(SciFinder®)

SciFinder®(キーワード：transgenic plant)で調査した2012年に公表・出版された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する論文等を表4-8に示した。合計66件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：21件、経口ワクチン：4件、食用医薬：1件、ワクチン抗原：4件、抗体医薬：3件、治療薬：13件、診断薬・試薬：3件、環境浄化：13件、NBT：5件(重複1件)であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった(表4-7)。

また、2012年の国別の件数は、中国：32件と中国が全件の半数近くを占め、そのほとんどは中国国内の特許であった。

5) 非食用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究

#### コメからのタンパク質調製法の検討

PBS-T(phosphate buffered saline, pH=7.4, 0.05% Tween20)またはTBS-T(Tris-buffered saline, pH7.6, 0.05% Tween20)の2種のバッファで、コメ(あきたこまち、市販品)粉碎試料約100mgまたは約250mgより、抽出時間5min.、3hr.、16hr.でタンパク質抽出を行い、それぞれの抽出効率を求めた。その結果、PBS-Tの方がTBS-Tよりも抽出効率がよいこと、また、サンプル量(コメ粉末量)は少量(約100mg)の方が抽出効率がよい一方、抽出時間(静置時間)延長の抽出効率向上に対する効果は少ないことが明らかになった(図10)。

#### 競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量

ウェルに固相化するctxBタンパク質量及び、anti-ctxB一次抗体の濃度を振り、最適と考えられる吸光度が得られる固相化ctxBタンパク質量及び、anti-ctxB一次抗体濃度を、固相化抗原(ctxB, コーティング)量50ng/well、一次抗体(mouse anti-ctxB)濃度0.5µg/mLと決定した(図11)。

### 競合 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の定量 (検量線の作製)

上記のように決定した抗原-抗体濃度で、標準 *ctxB* タンパク質を用い、一次抗体と共に加える *ctxB* (標準物質) の濃度を振って、検量線を作製した。競合抗原は blocking buffer、または、PBS-T で希釈して加えた。

その結果、競合抗原は blocking buffer で希釈すると、抗原 (固相化) に対する競合抗原の量が等量以上になると吸光度が上昇し、競合抗原 (*ctxB*) 量と阻害率 (B/B0%) の関係を直線として得ることができなかった (図 12)。そこで、競合抗原を PBT-T で希釈して加えたところ、競合抗原が過剰な領域における吸光度の上昇はみられなくなった (図 13)。以上の結果から、以後 PBS-T で競合抗原を希釈することに決定した。

### 競合 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の定量 (コメ抽出タンパク質中の *ctxB* の定量)

非組換え体 WT#5 株と *ctxB* 遺伝子の導入を確認済みの組換え体 #1-6-1 株のコメ粉末のタンパク質抽出液間で顕著な相違は認められず、*ctxB* タンパク質の検出はできなかった (図 14)。

### 直接 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の検知

陽性対照の *ctxB* を含む、いずれの試料についてもシグナルを得ることができなかった。これは PBS-T 抽出液でコーティングを行ったため、Tween20 の作用でコーティングされなかったものと考えられる。そこで、PBS または TBS を用いたタンパク質抽出効率の検討を行った。

### コメからの総タンパク質の抽出 - タンパク質抽出バッファーの検討 -

抽出バッファーから Tween を除いたため、総タンパク質の抽出効率は低下したが、ELISA 法による検知には問題ないレベルと考えられた (図 15)。

### 直接 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の検知

*CtxB* 標準品を固相化した well ではシグナルが検出されたが、コメ抽出試料についてはいずれも非組換え体 WT#5 及び #8 由来の試料と同じレベルであり、発現・蓄積した *ctxB* によるシグナルは検出できなかった (図 16)。

### T<sub>1</sub> 世代種子 (コメ) 1 粒またはコメ粉末を検体とする *ctxB* 遺伝子の検知

*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 #1-6-3 系統について 8 粒のコメを独立に *ctxB* 遺伝子の検知を行ったところ、全てで陽性であった。同様に #1-7-1 系統では 8 粒中 7 粒が陽性で、#2-4-1 系統では 4 粒中 3 粒、#2-4-3 系統では 4 粒中 4 粒が陽性であった (図 17)。なお、対照として検知を行った構成遺伝子 *DSH1p* のプロモーター領域 *DSH1p* については全検体で増幅産物が認められた。なお、*ctxB* 遺伝子導入体の T<sub>1</sub> 種子において、*ctxB* 遺伝子が検出されない場合があるのは、T<sub>0</sub> 世代の後代としてメンデル則的に分離しているためと考えられる。以上のように *DSH1p* 遺伝子を対照として、導入した *ctxB* 遺伝子を特異的に検知可能な PCR 法を確立した。

同様に各系統のコメ粉末 (すなわち、コメの混合物) より調製したゲノム DNA について PCR を行ったところ、T<sub>0</sub> 世代での解析結果と矛盾なく、WT#5 及び #2-10-1 系統では、*ctxB* 遺伝子は検出されず、他の系統では陽性となった。なお、陽性対照の *DSH1p* 遺伝子は全系統で陽性となった (図 18)。

### T<sub>1</sub> 世代種子 (コメ) 1 粒を検体とする *ctxB* 遺伝子コンストラクトコピー数の解析

図 19 に、昨年度行った、*ctxB* イネ T<sub>0</sub> 世代のリアルタイム PCR 法による *ctxB* 遺伝子のコピー数解析の結果を示す (文献 7)。今年度は同様の手法により、T<sub>1</sub> 世代種子 (コメ) を検体とする *ctxB* 遺伝子の定量的検知法について検討した。

図 20 にコメ粉末より調製したゲノム DNA を鋳型とした *DSH1p* 遺伝子のリアルタイム PCR の増幅曲線を示す。また、図 21 に同じ試料を鋳型とした *ctxB* 遺伝子の増幅曲線を示す。なお、陰性対照は TE buffer である。これらは、サイクル数の増加に応じた指数関数的な増幅を示し、また融解曲線 (図 22) に示すように、増幅産物はそれぞれ単一ピークとなり、プライマーの設計や PCR 条件等に問題がないことが確認された。

この条件で、コメ 1 粒またはコメ粉末より調製したゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行った結果を図 23-1 及び図 23-2 に示す。これらの増幅曲線について、基準とする *DSH1p* 遺伝子と解析対象である *ctxB* 遺伝子の Ct 値の差 ( $\Delta Ct$ )