

値)を求め、さらに、基準とする(ここでは#1-7-1-1)との・Ct値の差( $\Delta\Delta Ct$ 値)を求め、存在比を求めた。なお、リアルタイムPCRの増幅曲線で、サイクル数が40サイクルに近くなると*ctxB*の増幅産物のシグナルが高くなるものがあったが、これは、乳鉢、乳棒を用いた試料調製時の微量のコンタミネーションが原因と考えられる。

上述の $\Delta\Delta Ct$ 法により、非組換え体(WT#5)を含む $T_0$ 世代種子(1粒由来サンプル)5系統、各系統4粒におけるリアルタイムPCR法による*ctxB*遺伝子のコピー数を解析した結果、導入コピー数はWT#5及び#2-10-1系統の0から、#2-4-3-2の15コピーまで、同一系統でも種子検体ごとにバリエーションに富むことが明らかになった(図24)。一方、 $T_1$ 世代種子(コメ粉末サンプル)におけるコピー数解析の結果、粉末と鋳型とした場合は、導入コピー数は、各コメ粒のものが平均化され、WT#5及び#2-10-1系統では0であったが、#1-6-3系統では3.1、#1-7-1系統では0.9、#2-4-3系統では9.6と求められた。

$T_0$ 世代において導入遺伝子が認められなかった(0コピー)WT#5系統及び、#2-10-1系統の $T_1$ 世代種子はすべて、*ctxB*遺伝子の増幅が認められず、すなわち、0コピーと判断され、同様にこれら2系統については、粉末を試料とした場合も0コピーと判断された。 $T_0$ 世代において導入遺伝子のコピー数が1と推定された#1-7-1系統では、 $T_1$ 種子(1粒別)では1コピーが3粒、2コピーが1粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の*ctxB*遺伝子のコピー数は0.9と見積もられた。なお、これらの結果は、いずれもコメ1粒検体#1-7-1-1に存在する*ctxB*遺伝子のコピー数を1として求めたものであり、homoであるか、またはheteroであるかを考慮していないため、厳密には「コピー数」ではなく「*DSH1p*遺伝子に対する遺伝子存在比」である。この点を勘案すると、#1-7-1系統では、自殖交配により、 $T_1$ 世代で2コピーの検体はhomoになっていたものと考えられる。

$T_0$ 世代において同じ系統#1-6-1の導入遺伝子のコピー数が3と推定された#1-6-3系統では、 $T_1$ 種子(1粒別)では2コピーが1粒、4コピーが2粒、6コピーが1粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の*ctxB*遺伝子のコピー数は3.1と見積もられた。コメ粒での結果を見ると、

#1-6-3では#1-6-3-1では6コピーとすべてhomo化したと考えられ、4コピーの#1-6-3-2及び#1-6-3-3では、一部がhomo化したと考えられる。一方、#1-6-3-4では2コピーとなり、一部脱落が生じたものと考えられる。

$T_0$ 世代において同じ系統#2-4-1の導入遺伝子のコピー数が7と推定された#2-4-3系統では、 $T_1$ 種子(1粒別)では2、6、11、15コピーが各1粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の*ctxB*遺伝子のコピー数は9.6と見積もられた。この系統では、hetero化及びhomo化の両者が進んでいると考えられる。

以上のように、コメ1粒またはコメ粉末より調製したゲノムDNA試料について、*DSH1p*遺伝子の存在比を基準としたリアルタイムPCR法により、*ctxB*遺伝子の存在比を見積もることができた。

#### D. 考察

今回の調査から、薬用・環境浄化用GM植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国、カナダにおいては、急速に野外圃場栽培面積が減少し、医薬品類の生産は、一過的遺伝子発現システムを用いた閉鎖系栽培施設での生産に移行していることが判明した。その一方で、野外圃場栽培状況は不明であるが、本分野において中国での開発例が、ますます活発化していることが判明した。

PCR法により遺伝子導入を確認した*ctxB*遺伝子導入株の $T_1$ 種子(コメ)について総タンパク質を調製し、*ctxB*タンパク質の検知を試みたが、間接、直接ELISA法いずれにおいても検知することはできなかった。原因として、*ctxB*がタンパク質として生産、蓄積されていない可能性があるが、遺伝子は導入されており、また、*ctxB*イネ#1-6-1系統及び、#2-4-1系統についてはその種子の登熟過程において、*ctxB*遺伝子の発現を確認している。遺伝子発現からタンパク質の生産、蓄積に至る過程になんらかの問題がある可能性は否定できない。

今回、ELISAにおいて、抗*ctxB*モノクローナル抗体を使用したが、ポリクローナル抗体を使用することで、検知できる可能性があるため、今後検討したい。(e.g. Anti-beta subunit Cholera Toxin antibody (Rabbit, polyclonal) (ab34992, abcam)をAnti-Rabbit IgG (H+L) antibody, Peroxidase labeled (074-1506, KPL)と共に使用。)

また、 $T_1$ 種子(コメ)の1粒を検体とする

*ctxB* 遺伝子の検知法については、構成遺伝子である *DSH1p* 遺伝子のプロモーター領域 *DSH1p* を対照として使用することにより、安定した検知法として確立することができた。*CtxB* イネの  $T_1$  種子取得にあたっては、 $T_0$  世代の葉より調製したゲノム DNA について、*DSH1p* を対照として、*ctxB* 遺伝子の存在比率を求めることにより、導入遺伝子コンストラクトのコピー数の見積りを行ったが、今回、種子 1 粒またはコメ粉末を検体として、リアルタイム PCR 法により、導入遺伝子コンストラクトの定量的な検出が可能なが示された。

#### E. 結論

これまで薬用・環境浄化用 GM 植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国、カナダにおいては、急速に野外圃場栽培面積が減少し、医薬品類の生産は、一過的遺伝子発現システムを用いた閉鎖系栽培施設での生産に移行していることが判明した。国内では、機能性食品及び治療薬に関する件数が多く、国内外では機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多いことが判明した。また、国内外での件数の半数近くは中国のものであった。

文献等の調査研究の結果に基づき、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構築を進めるとともに、組換え体検知法の開発を進めている。本年度は、これらのうち、*ctxB* イネの  $T_1$  種子（コメ）を検体とする、免疫学的手法による *ctxB* タンパク質の検知法について検討するとともに、リアルタイム PCR を用いた、*ctxB* 遺伝子の定量的検知法について検討した。その結果、構成遺伝子である *DSH1p* 遺伝子の存在比率を基準として外来の *ctxB* 遺伝子のコピー数を求めることが可能な定量的検知法の確立に成功した。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するとともに、組換え体検知法の基盤技術の整備を完了した。

#### 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) 研究代表者 穂山浩, 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」(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) 研究代表者 穂山浩, 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」(H22-食品-一般-001), 平成 23 年度総括・分担研究報告書, pp. 54-72, 平成 24 年 5 月

8. 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

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。

#### 参考資料

1) 小松晃, 大武美樹, 長谷川久和, 牛田かおり, 高岩文雄, 大島正弘, 寺川輝彦: イネ由来改変型 DHDPS の導入と RSIS 法による LKR/SDH 発現抑制を利用した種子におけるリジン高含有イネの作出, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Ca-11, p.162, 2012年8月.

2) 大江翔太郎, 齊藤雄飛, 萬代悠太, 尾崎真治, 森田重人, 佐藤茂, 黒田昌治, 川浦香奈子, 荻原保成, 奥西智哉, 増村威宏: コムギ貯蔵タンパク質を発現する形質転換イネ種子を用いた製パン性関連因子の解析, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Da-01, p.166, 2012年8月.

3) 松原千枝, 石井祐佳, 吉田薫: フィチン酸の合成および輸送遺伝子の高発現によるフィチン酸合成とリン集積の活性化, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Da-10, p.175, 2012年8月.

4) Shin Youngsup, 高橋竜一, 中西啓仁, 山川隆: イネの亜鉛輸送体遺伝子 OsZIP4 を導入したサツマイモの金属含量, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Da-11, p.176, 2012年8月.

5) 三浦謙治, 芝勇人, 佐藤文香, 太田賢, KangSeung Won, 浅高志, 井上眞理, 鎌田博, 江面浩: トマト

ICE1 による低温耐性増強及び抗酸化物質の蓄積, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Ea-09, p.189, 2012年8月.

6) 黒川奈津子, 平井正良, 高山真理子, 棚瀬(日和佐)京子, 江面浩: ミラクリンタンパク質を例としたトマト成熟果実特異的に目的遺伝子を高発現する技術, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Dp-03, p.226, 2012年8月.

7) 梅基直行, 佐々木勝徳, 大山清, 山下まり, 水谷正治, 關光, 齊藤和季, 村中俊哉: グリコアルカロイドを非常に低下させたジャガイモ, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 2Bp-06, p.64, 2012年8月.

8) 佐生愛, 重光隆成, 齋藤雄飛, 田中愛実, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏: イネ種子 PB-I を経口ワクチン用カプセルとして利用するための外来タンパク質局在化に関する研究, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Da-03, p.168, 2012年8月.

9) 高木英典, 楊麗軍, 廣井隆親, 高岩文雄: インターロイキン 10 発現米の開発と疾患モデルマウスを用いた有効性の調査, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Da-14, p.179, 2012年8月.

10) 高岩文雄, 王スーイー, 高橋英之, 楊麗軍, 川勝泰二: シラカバ改変 Bet v 1 花粉アレルゲンを蓄積させた組換え米の開発, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Da-15, p.180, 2012年8月.

11) 小沢憲二郎, 小郷祐子, 松尾幸毅, 高岩文雄: アグロバクテリウム法による高頻度相同組換え系を用いた  $\beta$  1,2-xylosyltransferase、 $\alpha$  1,3-fucosyltransferase 遺伝子破壊イネの作出と解析, 第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム講演要旨集 3Dp-14, p.237, 2012年8月.

12) 肥塚崇男, 鈴木史朗, 飯島陽子, 杉本貢一, 鈴木秀幸, 渡辺文太, 平竹潤: オイゲノール合成能を付与した形質転換植物の解析, 第30

- 回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 2Bp-02, p. 60, 2012年8月.
- 13) 山崎真巳, 川原田美季, Udomsom Nirin, 齊藤和季: カンプトテシン生産特異的に発現する転写調節因子について, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Ba-07, p. 143, 2012年8月.
- 14) 松島康高, 南博道, 竹村知也, 佐藤文彦: オウレン THB0 遺伝子を導入したハナビシソウ形質転換細胞における代謝改変, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Ba-10, p. 143, 2012年8月.
- 15) 竹村美保, 金本浩介, 長屋進吾, 大山莞爾: プロスタグランジンの生物生産 - 形質転換ゼニゴケを用いて, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Cp-10, p. 219, 2012年8月.
- 16) 廣瀬文昭, 中村英光, 村松昌幸, 高岩文雄, 市川裕章: 光独立栄養性を有するイネ緑化培養細胞による有用タンパク質生産系, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Cp-11, p. 220, 2012年8月.
- 17) 乾貴幸, 河野徳昭, 萩尾高志, 吉松嘉代, 柴田敏郎, 川原信夫, 飯田修: ナイモウオウギへの遺伝子導入法の開発 (2), 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Dp-06, p. 229, 2012年8月.
- 18) 松井健史, 松浦秀幸, 澤田和敏, 瀧田英司, 出村拓, 加藤晃: シロイヌナズナ AGP21 遺伝子の 5' -UTR を利用した双子葉植物における遺伝子高発現, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Cp-13, p. 222, 2012年8月.
- 19) 多田雄一: *Pseudomonas putida* 由来の formaldehyde dehydrogenase を発現するシロイヌナズナのホルムアルデヒド浄化能力, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Ea-14, p. 194, 2012年8月.
- 20) 七里吉彦, 並木小百合, 森内良太, 清家伸康, 大谷卓, 永田裕二, 津田雅孝, 田部井豊: 細菌由来の  $\beta$ -ヘキサクロロシクロヘキサン ( $\beta$ -HCH) 分解酵素 linB\_MI を導入したカボチャ毛根の  $\beta$ -HCH 分解能の解析, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Ea-15, p. 195, 2012年8月.
- 21) 吉川信幸, 山岸紀子, 李春江, 今辰哉: 種子非伝達性かつ非病原性ウイルスベクターの開発と利用, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 S4-02, p. 56, 2012年8月.
- 22) 刑部敬史, 横井彩子, 権容益, 大槻並枝, 遠藤真咲, 雑賀啓明, 土岐精一: 配列特異的な人為的改変を可能にする遺伝子操作技術の開発と利用, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 S4-03, p. 57, 2012年8月.
- 23) 浅田圭祐, 永利麻衣, 寺坂和祥, 水上元, Atumi Masada Sayaka, Salim Vonn, De Luca Vincenzo: セコロガニン合成に關与する配糖化酵素の機能解析, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Ba-13, p. 149, 2012年8月.
- 24) 小谷知代, 安井百合愛, 北野涼一, 小倉里江子, 平塚和之: アグロインフィルトレーション法を用いた遺伝子発現高効率化因子の探索, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Cp-14, p. 223, 2012年8月.
- 25) 板谷恭兵, 大里修一, 佐久間美子, 近藤聡, 村本伸彦, 杉本広樹, 桑田茂, 光川典宏, 大音徳, 太田邦史: 好熱性制限酵素遺伝子を用いたゲノム再編誘発技術「Taq I system」のイネへの適用, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム講演要旨集 3Dp-07, p. 230, 2012年8月.
- 26) Xu, Xiao-hui; Lin, Hai-fang; Zou, Ke-qin, "Analysis on the Fe<sup>2+</sup> tolerance of ferritin transgenic rice", *Anhui Nongye Kexue* (2012), 40(15), 8408-8410.
- 27) Zuo, Jianru; Mou, Jinye, "Application of NF-YA5 gene in cultivating plant with improved content of fatty acids", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102586322 A 20120718
- 28) Kwak, Sang Su; Lee, Haeng Sun; Ahn, Yeong Ok; Jung, Jae Cheol; Kim, Seon Ha, "Application of Or-Ins gene mutant from

- Ipomoea batatas*", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2012), KR 2012054712 A 20120531.
- 29) Deng, Xiaodong; Fei, Xiaowen; Gu, Bo; Luo, Qiulan, "Chlamydomonas reinhardtii oil metabolism-related diacylglycerol acyltransferase (CrDGAT2-5) gene for improving plant oil production", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102321642 A 20120118.
- 30) Xu, Suxia; Lin, Chunsong; Hua", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102827852 A 20121219.
- 31) Huang, Junchao; Zhong, Yujuan; Sandmann, Gerhard; Liu, Jin; Chen, Feng, "Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants", *Planta* (2012), 236(2), 691-699.
- 32) Zuo, Jianru; Mou, Jinye, "Cloning of *Arabidopsis thaliana* transcription factor NF-YA9 gene and application in cultivating transgenic plants with improved fatty acid content", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102558324 A 20120711.
- 33) Zhang, Jinsong; Chen, Shouyi; Song, Qingxin; Man, Weiqun; Luan, Xiaoyan; Du, Weiguang; Zhang, Wanke; Ma, Biao; Lin, Qing; He, Sijie; et al, "Cloning of gene for transcription factor GmbZIP123 of soybeans and its use for regulating fatty acid metabolism in transgenic plants", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102399269 A 20120404.
- 34) Kim, Sun Ha; Ahn, Young Ock; Ahn, Mi-Jeong; Lee, Haeng-Soon; Kwak, Sang-Soo, "Down-regulation of  $\beta$ -carotene hydroxylase increases  $\beta$ -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweet potato", *Phytochemistry* (Elsevier) (2012), 74, 69-78.
- 35) Zuk, Magdalena; Prescha, Anna; Stryczewska, Monika; Szopa, Jan, "Engineering Flax Plants To Increase Their Antioxidant Capacity and Improve Oil Composition and Stability", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012), 60(19), 5003-5012.
- 36) Turano, Frank; Turano, Kathleen, "Enhanced stress resistance in transgenic plants expressing bacterial  $\gamma$ -aminobutyrate biosynthesis genes", U.S. Pat. Appl. Publ. (2012), US 20120030842 A1 20120202.
- 37) Kielkiewicz, Malgorzata; Gajc-Wolska, Janina; Slusarz, Sylwia; Szwacka, Maria, "Growth, development and yield of transgenic 35S-thaumatococin II-expressing cucumber plants - open field evaluation", *Scientia Horticulturae* (Amsterdam, Netherlands) (2012), 143, 82-91.
- 38) Bae, Jeong Myeong; Ahn, Mi Jeong; Ha, Seon Hwa; Baek, Gyeong Hwan; Lee, Sin U., "Haematococcus pluvialis-originated  $\beta$ -carotene ketolase gene and transgenic plants capable of producing keto-carotenoids and higher levels of  $\beta$ -carotene", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2012), KR 2012045631 A 20120509.
- 39) Verdier, Jerome A.; Zhao, Jian; Dixon, Richard A.; Udvardi, Michael K., "Methods for regulating production of proanthocyanidins in transgenic plants using MtPAR (*Medicago truncatula* ProAnthocyanidin Regulator)", U.S. Pat. Appl. Publ. (2012), US 20120278914 A1 20121101.
- 40) Song, Shikui; Hou, Wensheng; Gaoduo, Yitama; Wu, Cunxiang; Yu, Yang; Matiyahu, Yifate; Emier, Rachel; Han, Tianfu "Preparation of transgenic plant with high yield of methionine", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102776230 A 20121114.
- 41) Chen, Wei; Fan, Xingming; Liu, Li; Wang, Kun, "Preparation of vectors pUC19-RNAi-22kd and pUC19-RNAi-19kd expressing RNAi targeting corn protein for enhancing lysine production", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102517314 A 20120627.
- 42) Hua, Jinping; Liu, Zhengjie; Zhang, Yuan; Zhao, Peng; Zhao, Qingcui; Li, Yuhua; Wang, Yumei, "Protein and nucleotide sequences of

- cotton transcription factor WR11 for increasing fatty acid content in plant seed", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102786587 A 20121121.
- 43) Hua, Jinping; Liu, Zhengjie; Zhang, Yuan; Zhao, Peng; Zhao, Qingcui; Li, Yuhua; Wang, Yumei, "Sequence of cotton transcription factor Dof1 for improving the content of seed fatty acid", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102757488 A 20121031.
- 44) Xing, Han; Xue, Chenchen; Wang, Can; Zhao, Jinming; Guo, Na; Xu, Jinyan, "Sequence of soybean GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene GMP1", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102321593 A 20120118.
- 45) Han, Jigang; Lakshman, Dilip K.; Galvez, Leny C.; Mitra, Sharmila; Baenziger, Peter Stephen; Mitra, Amitava, "Transgenic expression of lactoferrin imparts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*", BMC Plant Biology (2012), 12, 33.
- 46) Aoki, Toshio; Akashi, Tomoyoshi, "2-Hydroxyisoflavanone synthetase of Iridaceae, polynucleotide encoding it, vectors having the polynucleotide, recombinant DNA or RNA, host cell transformed with the vector, transgenic plant having the polynucleotide, and production of isoflavonoids by the transgenic plant", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2012), JP 2012095644 A 20120524
- 47) Hu, Jianzhong; Ni, Yanyan; Dryman, Barbara A.; Meng, X. J.; Zhang, Chenming, "Immunogenicity study of plant-made oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)", Vaccine (2012), 30(12), 2068-2074.
- 48) Wang, Guixue; Zang, Guangchao; Huang, Junli; Zhang, Xiaojuan; Wenwen, Yihao, "Method for preparing oral vaccine of Shiga-like toxin Stx1b", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102580118 A 20120718.
- 49) Guan, Zheng-jun; Guo, Bin; Huo, Yan-lin; Guan, Zheng-ping; Dai, Jia-kun; Wei, Ya-hui, "Organogenesis and somatic embryogenesis in callus derived from HBsAg-transgenic tomato mutant", Canadian Journal of Plant Science (2012), 92(4), 747-756.
- 50) Liu, Cheng-Wei; Chen, Jeremy J. W.; Kang, Chia-Chen; Wu, Chia-Hui; Yiu, Jinn-Chin "Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) expressing H1N1 influenza surface antigen (neuraminidase)", Scientia Horticulturae (Amsterdam, Netherlands) (2012), 139, 8-13.
- 51) Lam, Eric, "Edible transgenic plants as oral delivery vehicles for RNA-based therapeutics", PCT Int. Appl. (2012), WO 2012135820 A2 20121004 .
- 52) D'Aoust, Marc-Andre; Lavoie, Pierre-Olivier; Vezina, Louis-Philippe; Couture, Manon, "Rabies virus like particle production in plants and vaccine uses", PCT Int. Appl. (2012), WO 2012171104 A1 20121220.
- 53) Yang, Mun Sik; Kim, Tae Geum, "Recombinant gene containing subunit of cholera toxin B and neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus, transgenic plant expressing sCTB-sCOE fusion gene, and application", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2012), KR 2012079258 A 20120712.
- 54) Guzman, Giorgio; Walmsley, Amanda M.; Webster, Diane E.; Hamill, John D., "Use of the wound-inducible NtQPT2 promoter from *Nicotiana tabacum* for production of a plant-made vaccine", Biotechnology Letters (2012), 34(6), 1143-1150.
- 55) Beuchat, Julien; Campanoni, Prisca; Dai, Shunhong; Facchinetti, Claudio; Lugon-Moulin, Nicolas; Mundell, Richard; Oishi, Karen; Ramirez, Gustavo; Roesti, Sandrine; Laparra, Helene; et al, "Methods for production of influenza hemagglutinin H5, rituximab and other proteins in tobacco plants", PCT Int. Appl. (2012), WO 2012098119 A2 20120726.
- 56) Jamal, Arshad; Lee, Jeong-Hwan; Lee,

- Kyung-Jin; Oh, Doo-Byoung; Kim, Deuk-Su; Lee, Kyoung-Ki; Choo, Young-Kug; Hwang, Kyung-A.; Ko, Kisung, "Chimerism of multiple monoclonal antibodies expressed in a single plant", *Horticulture, Environment and Biotechnology* (2012), 53(6), 544-551.
- 57) Cui, Lijie; Peng, Huizhen; Zhang, Ran; Chen, Yuhui; Zhao, Lingxia; Tang, Kexuan, "Recombinant hHscFv-RC-RNase protein derived from transgenic tobacco acts as a bifunctional molecular complex against hepatocellular carcinoma", *Biotechnology and Applied Biochemistry* (2012), 59(5), 323-329.
- 58) Kwon, Jun-Young; Lee, Kyoung-Hoon; Cheon, Su-Hwan; Ryu, Hyun-Nam; Kim, Sun Jin; Kim, Dong-Il, "Adsorptive loss of secreted recombinant proteins in transgenic rice cell suspension cultures", *Plant Cell Reports* (2012), 31(3), 551-560.
- 59) Yan Chunyan; Wang Jue; Duan Guoyan; Yu Rongmin, "Biotransformation of furannoligularenone by transgenic crown galls of *Panax quinquefolium*", *Pharmacognosy magazine* (2012), 8(30), 124-128.
- 60) Fujiwara, Yoshihiro; Sekikawa, Kenji; Aiki, Yasuhiko; Takaiwa, Fumio; Yang, Lijun, "Buffer and solvent compositions for extraction and purification of foreign proteins from transgenic plants", U.S. Pat. Appl. (2012), US 20120142033 A1 20120607.
- 61) Fan, Yanping; Zheng, Shaoyuan; Li, Xinyue; Yu, Rangcai; Yu, Yunyi, "Cloning and application of terpenes flower fragrance gene Hctps1 promoter from *Hedychium coronarium*", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102586250 A 20120718.
- 62) Jung, In Sik; Kang, Hyeong Sik; Ko, Gi Seong; Jung, Yeong Hui; Yoo, Gi Hyeon; Jang, Yun Ji, "Colorectal cancer immunotherapy agent containing dendritic cell", *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* (2012), KR 2012124963 A 20121114.
- 63) Jha, Shweta; Agarwal, Saurabh; Sanyal, Indraneel; Jain, G. K.; Amla, D. V., "Differential subcellular targeting of recombinant human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor influences yield, biological activity and in planta stability of the protein in transgenic tomato plants", *Plant Science* (Shannon, Ireland) (2012), 196, 53-66.
- 64) Nausch, Henrik; Mischofsky, Heike; Koslowski, Roswitha; Meyer, Udo; Broer, Inge; Huckauf, Jana, "Expression and subcellular targeting of human complement factor C5a in *Nicotiana* species", *PLoS One* (2012), 7(12), e53023.
- 65) Lu, Zhe; Lee, Kyung-Jin; Shao, Yingxue; Lee, Jeong-Hwan; So, Yangkang; Choo, Young-Kug; Oh, Doo-Byoung; Hwang, Kyung-A.; Oh, Seung Han; Han, Yeon Soo; et al, "Expression of GA733-Fc fusion protein as a vaccine candidate for colorectal cancer in transgenic plants", *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012), 364240, 11 pp.
- 66) Inui, Takayuki; Kawano, Noriaki; Shitan, Nobukazu; Yazaki, Kazufumi; Kiuchi, Fumiyuki; Kawahara, Nobuo; Sato, Fumihiko; Yoshimatsu, Kayo, "Improvement of benzyloisoquinoline alkaloid productivity by overexpression of 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase in transgenic *Coptis japonica* plants", *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2012), 35(5), 650-659.
- 67) Wang, Yingjuan; Li, Liwen; Bu, Huaiyu; Zhao, Yuwei, "Method for expression of mussel adhesive protein mefp-5 in plant", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102433357 A 20120502.
- 68) Vainstein, Alexander; Marhevka, Elena; Farhi, Moran, "Methods of producing artemisinin in non-host plants and vectors for use in same", *PCT Int. Appl.* (2012), WO 2012156976 A1 20121122.
- 69) Gong, Yifu; Wang, Heyu; Lu, Peng; Yuan, Quan; Wang, Guilin; Liu, Jianjun, "Obtainment of regeneration plantlet of *Catharanthus roseus* hairy roots and production of

- anticancer alkaloids", *Zhongcaoyao* (2012), 43(4), 788-794.
- 70) Zhang, Lai Jun; Jia, Jing Fen; Xu, Yao; Wang, Yingli; Hao, Jian Guo; Li, Tian Ke, "Production of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants expressing melatonin synthetase genes and their effect on UV-B-induced DNA damage", *In Vitro Cellular & Developmental Biology*: Plant (2012), 48(3), 275-282.
- 71) Hauptmann, Valeska; Gils, Mario; Conrad, Udo; Phan, Hoang Trong, "Producing polymeric proteins in transgenic plants using intein-trans-splicing and ELP (elastin-like polypeptide)-mediated purification thereof", *Eur. Pat. Appl.* (2012), EP 2518081 A1 20121031.
- 72) Wasai, Masafumi; Kasahara, Saori, "The transgenic plants with abilities to accumulate the purpose proteins at higher levels", *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2012), JP 2012024052 A 20120209.
- 73) Zhao, Tiehan; Zeng, Ying; Kermode, Allison R., "A plant cell-based system that predicts a  $\beta$ 42 misfolding: Potential as a drug discovery tool for Alzheimer's disease", *Molecular Genetics and Metabolism* (2012), 107(3), 571-579.
- 74) Fu, Yongfu; Fan, Chengming; Zhang, Xiaomei, "Cloning and application of phosphate transporter protein gene from soybean", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102372768 A 20120314.
- 75) Jiang, Li; Ci, Lingkun; Cao, Shuqing; Lu, Yunfeng, "Cloning and application of plant selenium-tolerant and selenium absorption-improving protein gene", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102603877 A 20120725.
- 76) Ma, Mi; Chen, Yanshan; He, Zhenyan; Xu, Wenzhong, "Cloning of cDNA for arsenic resistance-associated protein PvArrp1 from *Pteris vittata* and its use for plant breeding", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102746391 A 20121024.
- 77) Maruyama, Hayato; Yamamura, Takuya; Kaneko, Yohei; Matsui, Hirokazu; Watanabe, Toshihiro; Shinano, Takuro; Osaki, Mitsuru; Wasaki, Jun, "Effect of exogenous phosphatase and phytase activities on organic phosphate mobilization in soils with different phosphate adsorption capacities", *Soil Science and Plant Nutrition* (Abingdon, United Kingdom) (2012), 58(1), 41-51.
- 78) Nair, Smitha; Joshi-Saha, Archana; Singh, Sudhir; Ramachandran, V.; Singh, Surya; Thorat, Vidya; Kaushik, C. P.; Eapen, Susan; D'Souza, S. F., "Evaluation of transgenic tobacco plants expressing a bacterial Co-Ni transporter for acquisition of cobalt", *Journal of Biotechnology* (2012), 161(4), 422-428.
- 79) Wan Shen; Johnson Amanda M; Altosaar Illimar, "Expression of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri* in transgenic tobacco roots using the root-specific rolD promoter from *Agrobacterium rhizogenes*", *Ecology and evolution* (2012), 2(2), 286-97.
- 80) Wan, Shen; Mottiar, Yaseen; Johnson, Amanda M.; Goto, Kagami; Altosaar, Illimar, "Expression of the nos operon proteins from *Pseudomonas stutzeri* in transgenic plants to assemble nitrous oxide reductase", *Transgenic Research* (2012), 21(3), 593-603.
- 81) Talano, Melina A.; Busso, Debora C.; Paisio, Cintia E.; Gonzalez, Paola S.; Purro, Silvia A.; Medina, Maria I.; Agostini, Elizabeth, "Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol using wild type and transgenic tobacco plants", *Environmental Science and Pollution Research* (2012), 19(6), 2202-2211.
- 82) Chen, Zhen; Zhu, Cheng; Yang, Weijun, "Sequence of *Methanothermobacter thermoautotrophicum* MTH1745 gene in enhancing plant stress resistance", *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102399815 A 20120404.
- 83) Zhu, Bo; Yao, Quanhong; Peng, Rihe; Xiong,



- Aisheng; Xue, Yong; Fu, Xiaoyan; Tian, Yongsheng; Zhao, Wei; Jin, Xiaofen, "Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*-derived OYE3 gene and its use in degrading TNT in transgenic plants", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102533789 A 20120704.
- 84) Nian, Hongjuan; Chen, Limei; Meng, Qingchao; Cheng, Qin, "Sequences of *Brevibacillus brevis* formaldehyde dehydrogenase gene FALDH and its use in breeding transgenic plant with high formaldehyde-absorbing ability", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102337280 A 20120201.
- 85) Wang, Qifeng; Yi, Qiong; Hu, Qingquan; Zhao, Yue; Nian, Hongjuan; Li, Kunzhi; Yu, Yongxiong; Izui, Katsura; Chen, Limei, "Simultaneous Overexpression of Citrate Synthase and Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Leaves Augments Citrate Exclusion and Al Resistance in Transgenic Tobacco", *Plant Molecular Biology Reporter* (2012), 30(4), 992-1005.
- 86) Li, Peihan; Xiang, Taihe; Xie, Jun; Feng, Ting; Lu, Wenyi, "Transgenic plant regeneration of tobacco (*Nicotiana tabacum*) harboring mammalian *cyp2e1* gene", *Shengwu Gongcheng Xuebao* (2012), 28(10), 1195-1204.
- 87) Petri, Cesar; Lopez-Noguera, Sonia; Wang, Hong; Garcia-Almodovar, Carlos; Albuquerque, Nuria; Burgos, Lorenzo, "A chemical-inducible Cre-LoxP system allows for elimination of selection marker genes in transgenic apricot", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2012), 110(3), 337-346.
- 88) Lin, Zhongping; Ma, Hong; Hu, Yuanlei, "Expression vector containing gene Cre capable of high-effective deletion of selection marker gene of transgenic plant", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102311971 A 20120111.
- 89) Yao, Lei; Yan, Xiaohong; Wang, Hui; Ma, Rongcai, "Plant binary expression vector containing Loxp-FRT recombinase site", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102676579 A 20120919.
- 90) Xue, Jing; Zhang, Xiaodong; Yang, Fengping; Chen, Xuqing; Zhang, Liquan; Li, Xianglong, "System for deleting antibiotic marker gene of transgenic plants and its application", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102337292 A 20120201.
- 91) Jia, Guixia; Li, Shuang; Zhang, Xiuhai; He, Hengbin; Liu, Yan; Zhang, Mingfang; Du, Yunpeng; Yuan, Lin, "Transgenic method for lily by deleting selectable marker genes at low temperature", Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102559741 A 20120711.

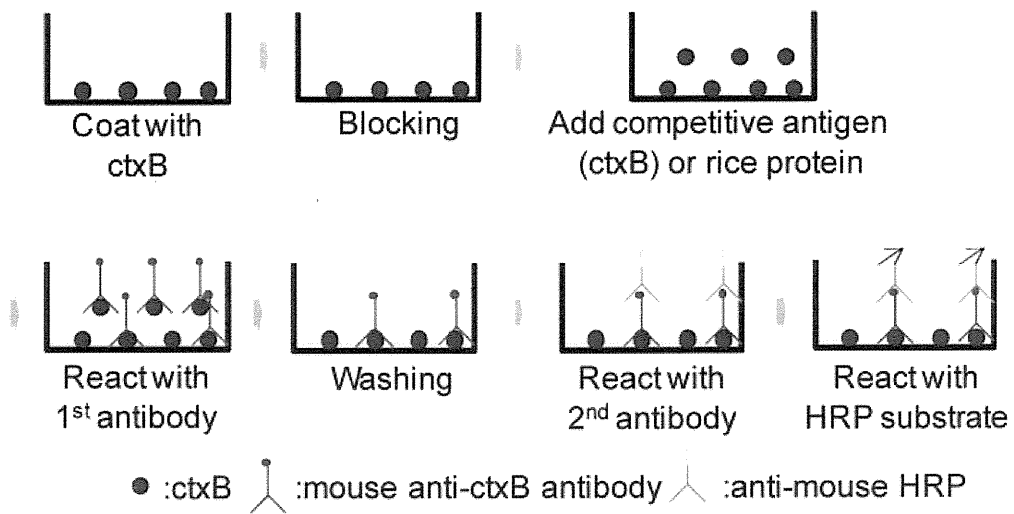


図 1. 競合 ELISA 法による ctxB タンパク質定量の概念図

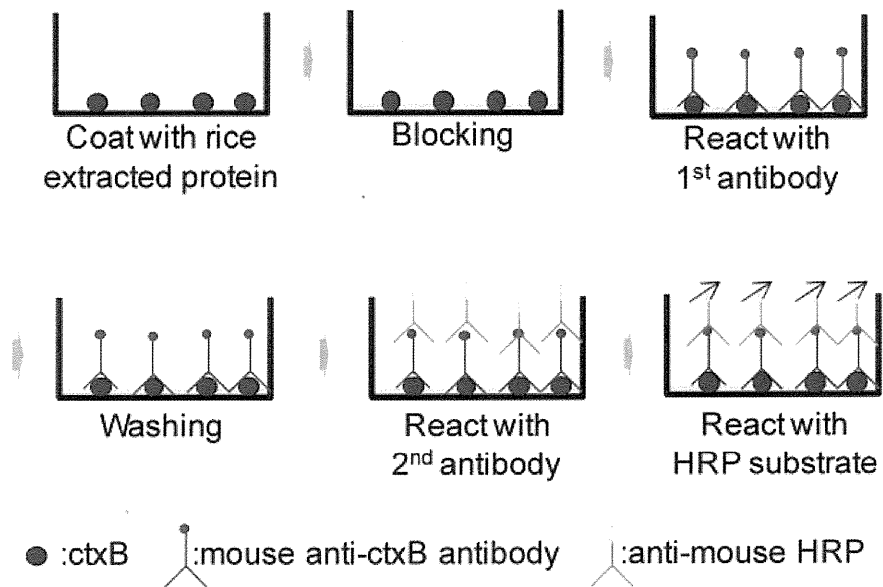
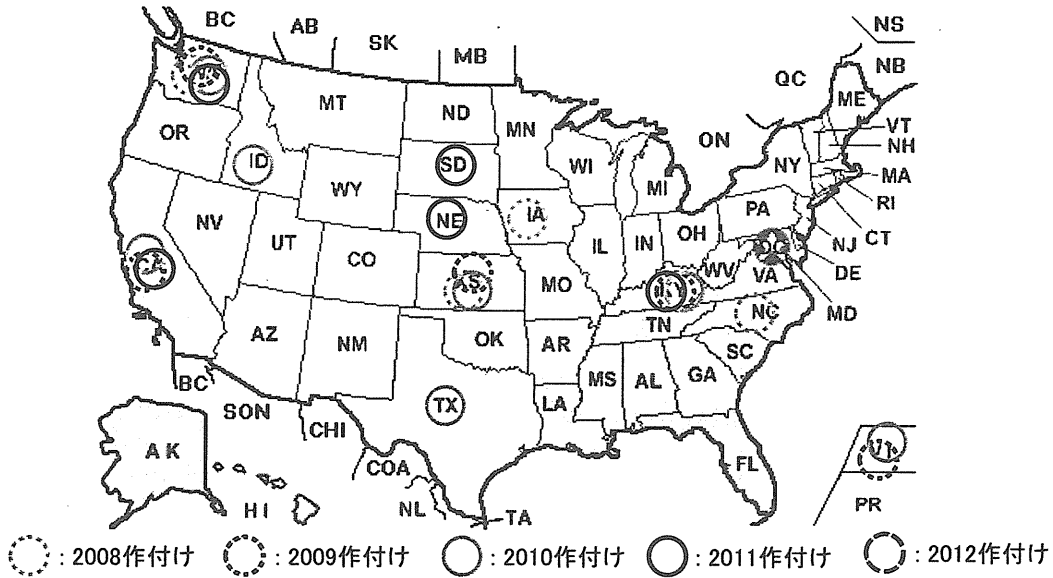


図 2. 直接 ELISA 法による ctxB タンパク質検出の概念図



	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年
認可面積(エーカー)	2650.50	1554.00	773.00	1558.00	
作付け面積(エーカー)	459.28 (17.3%)	96.90 (6.2%)	64.13 (8.3%)		
作付け州	IA, KS, KY, NC, WA	CA, KS, KY, VI, WA	CA, ID, KS, KY, VI, WA, TX	CA, KY, NE, SD, WA	

図 3. 米国における医薬品用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場栽培認可・作付け状況(2008-2012)

[http://www.aphis.usda.gov/brs/ph\\_permits.html](http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html)

\* 作付け面積 / 認可面積 × 100

表 1. 米国における医薬品用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場作付け状況(2008-2012)

企業等	作付け作物(生産物・作付け州)				
	2008年	2009年	2010年	2011年	2012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)		
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)				
Kentucky BioProcessing	タバコ <sup>*1</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, プタ由米セリンプロテアーゼインヒター不活性型前駆体:KY)	タバコ <sup>*2</sup> (ウシ肺アプロチニン:KY)	
MacIntosh & Associates, Inc.				ハマナ(脂肪酸組成改変又はワックスエステル改:CA, SD)	
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)		
Planet Biotechnology				タバコ(抗炭疽菌人工抗体, ポツリヌストキシン抗体, ライノウイルス人工抗体:CA, KY)	
SemBioSys Genetics	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, 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)		
University of Nebraska/Lincoln				アマナズナ(ワックスエステル, 高オレイン酸油:NE)	
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)	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. Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of January 18, 2013 Effective for 2012

企業等	作物	生産物	州	審査状況	作付け状況
Planet Biotechnology	タバコ	不明	カリフォルニア	審査中	
Plankton LLC	ジャガイモ	不明	アイオワ	承認	未完了
SemBioSys Genetics	ベニバナ	不明	アイダホ, モンタナ, ユタ, ワシントン	審査中	
		不明	ワシントン	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 (<10エーカー)	承認	未完了
		不明	ケンタッキー	審査中	
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 (HBsAg), プラゼイン (甘味タンパク質), 社外秘	カリフォルニア (<1エーカー)	承認	未完了
		不明	カリフォルニア	審査中	
MacIntosh & Associates, Inc.	ハマナ	不明	カリフォルニア	取り下げ	
			サウスダコタ	取り下げ	
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, トランスフェリン及び9種の医療用タンパク質 (社外秘) の中の1-2種	カンザス (<30エーカー)	承認	未完了
		ラクトフェリン, リゾチーム, ヒト血清アルブミン, トランスフェリンの中の1種	カンザス (<30エーカー)	承認	未完了
		不明	カンザス	審査中	
Planton LLC	ジャガイモ	不明	バージン諸島	承認	未完了
			アイオワ	取り下げ	完了
University of Washington	ハコヤナギ属	不明	ワシントン	承認	未完了

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

<b>Medicago</b>	
<b>Medicago overview</b>	
Focus	Vaccines
Manufacturing Technology	Transient expression in Tobacco
Vaccine technology	Virus-Like Particles
Headquarters, labs & facilities	Quebec City, Canada Research Triangle Park, NC, USA Genopole d'Evry, France
Employees	200 (130 in Quebec / 70 in NC)
Financing	TSX: MDG (raised \$65M in 2011)

図 4. Medicago 社の概要 1

## Technology

- From gene sequence to flu VLP in 19 days

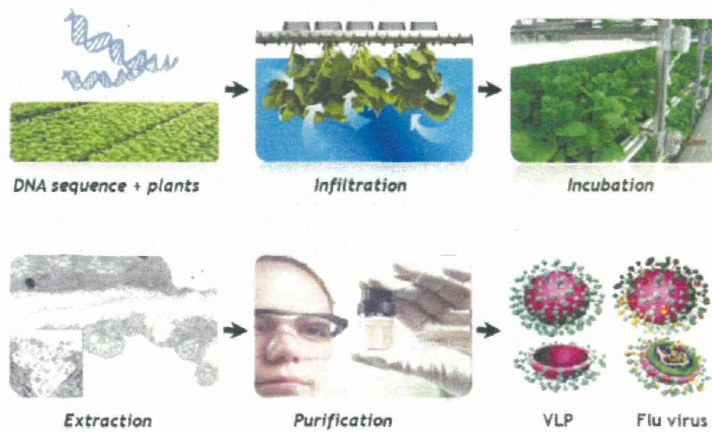


図 5. Medicago 社の概要 2

## First responder solution H1N1 scenario

- 19 days from gene sequence to first batch

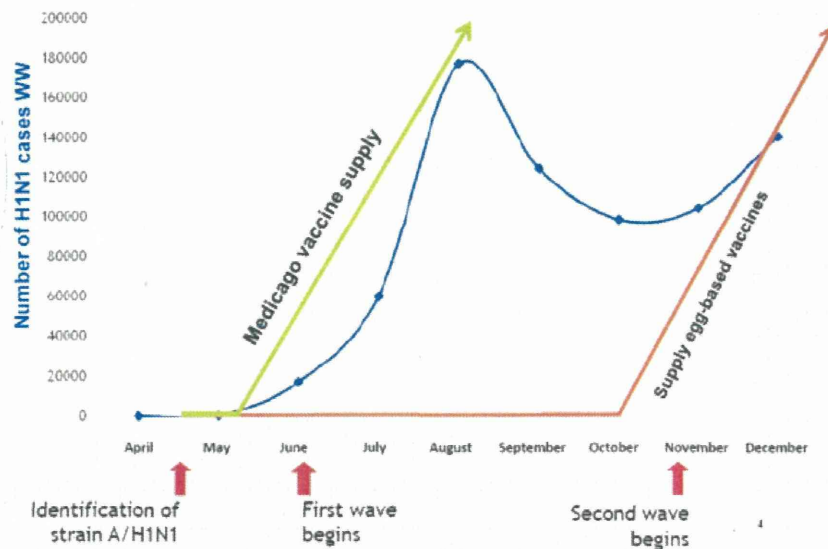


図 6. Medicago 社の概要 3

## medicago Product Pipeline

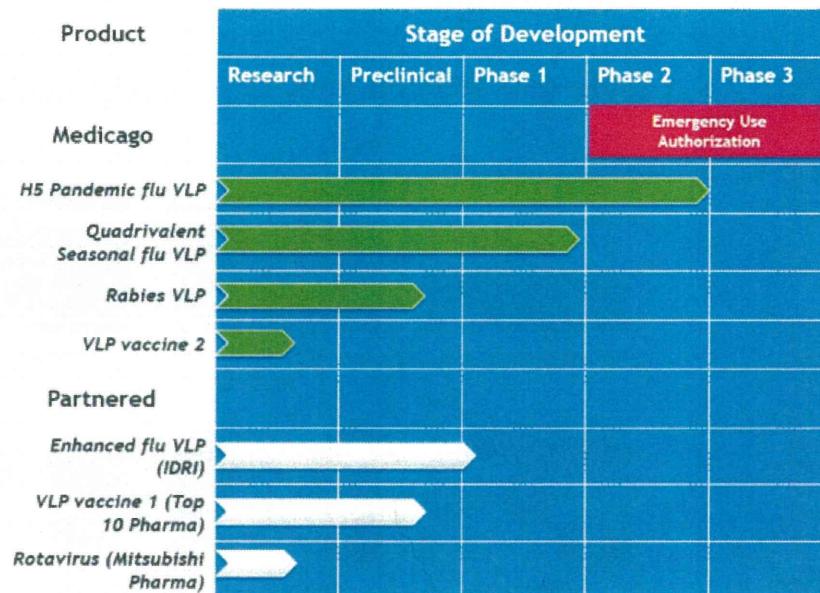


図 7. Medicago 社の概要 4

## medicago Medicago USA: \$21M Funding Award from DARPA

- Based in the Research Triangle Park, North Carolina
  - 120M doses pandemic or 30M seasonal quadrivalent vaccine per year
  - 12 months to build - \$37M
  - 97,000 sq ft total of which 27,000 is green house
  - 70 employees
  - Designed as a multi-product facility
- \$21M in funding from US Department of Defense (DARPA)
  - Primary Goal: produce 10M doses of H1 VLP in one month
  - ***Successfully produced more than 10M doses in 30 days!***
- Positioning Medicago as a 1<sup>st</sup> responder for future pandemics
- DARPA Project now completed - validation ongoing



図 8. Medicago 社の概要 5

表 3. 2012 年の医薬品用、環境浄化用 GM 植物及び NBT に関する特許及び論文等(国内)

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	資料
機能性食品	改良 dihydrodipicolinate synthase (DHDDS)等	イネ	高リジン含有イネの作出	日本・農研機構 作物研究所等	1
機能性食品	イネ貯蔵タンパク質RNA等	イネ	米の硬パン性向上	日本・京都府立大学等	2
機能性食品	フィテン酸生成および蓄積関連酵素	イネ	フィテン酸を高蓄積する米の開発	日本・東京大学	3
機能性食品	イネ由来亜鉛トランスポーター(OsZIP4)	サツマイモ	亜鉛を高蓄積するサツマイモの取得	日本・東京大学	4
機能性食品	トマトICE1(転写因子)	トマト	抗酸化物質(βカロテン、リコピン、ビタミンC)の蓄積	日本・筑波大学、九州大学	5
機能性食品	トマトE8プロモーター、ミラクリン等	トマト	トマト果実へのミラクリンの高蓄積	日本・筑波大学	6
機能性食品	シクロム P450(ノックダウン)	ジャガイモ	ジャガイモに含まれるグリコアルカロイドの減少	日本・キリンHD等	7
経口ワクチン	GFP(ワクチンタンパク質のモデル)	イネ	腸管へ目的タンパク質を輸送する経口薬品用カプセルの開発	日本・京都府立大学等	8
食用医薬	ヒトインターロイキン(hIL-10)	イネ	ヒトインターロイキンの米での発現	日本・農業生物資源研究所等	9
食用医薬	人エタンパク質TPC(tree pollen chimera)	イネ	シラカバ花粉症緩和米の作出	日本・農業生物資源研究所	10
抗体医薬	1,2-xylosyltransferase (xyI) 遺伝子破壊等	イネ	植物特有の糖鎖修飾酵素遺伝子を破壊したイネの作出	日本・農業生物資源研究所等	11
診断薬・試薬	翻訳エンハンサー(AIAGP21 mod 5'-UTR)等	タバコ(培養細胞)	組織タンパク質の高生産(ex. HRP)	日本・出光興産等	12
治療薬	アセチル基転移酵素等	ポプラ	オイゲノール生合成能を付与した形質転換植物の作出	日本・京都大学等	13
治療薬	毛状根特異的に発現する複製転写調節因子	チャボイナモリ	抗癌性アルカロイドであるカンプトテシン生合成機構の解明	日本・千葉大学等	14
治療薬	(S)-tetrahydroberberine oxidase [(S)-THBO]等	ハナビシソウ	代謝改良による有用アルカロイドの生産	日本・京都大学等	15
治療薬	シクロオキシゲナーゼ(GvCOX)	ゼニゴケ	プロスタグランジンの生産	日本・石川県立大学	16
治療薬	Golden2-like I(GLK1)、ヒトインターロイキン-10	イネ(緑化培養細胞)	有用タンパク質(ヒトインターロイキンなど)生産系の確立	日本・農業生物資源研究所等	17
治療薬	sGFP	ナイモウオウギ	ナイモウオウギへの迅速かつ効率的な遺伝子導入法の開発	日本・医薬基盤研究所等	18
環境浄化	formaldehyde dehydrogenase (PFDH)	シロイヌナズナ	ホルムアルデヒドの吸収・分解する空気浄化植物の作出	日本・東京工科大学	19
環境浄化	デハロゲンナーゼ(hnB_M)	カボチャ	土壌中の残留が問題のHCHを分解・無毒化する植物の開発	日本・農業生物資源研究所等	20
NBT	シロイヌナズナ開花促進遺伝子(AiFT)	リンゴ	開花促進など	日本・岩手大学	21
NBT	ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFNs)	シロイヌナズナ	標的遺伝子への変異の導入(標的変異)	日本・農業生物資源研究所	22
NBT	ニチネソウ由来イリド配糖化酵素	ニチネソウ	機能解析のための候補遺伝子の発現抑制	日本・名古屋市立大学等	23
NBT	ウイルスゲノム5'UTR、ルシフェラーゼ	植物	発現効率向上	日本・横浜国立大学	24
NBT	好熱細菌由来の制限酵素Taq I	イネ	大規模なゲノム再編を誘導する育種技術「Taq I system」の開発	日本・明治大学等	25

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(2012.8)シンポジウム4: New Plant Breeding Techniques: NBTを巡る国内外の動向、鎌田博、「はじめに: 現状説明と開催趣旨説明」、講演要旨集S4-01、p.55より

EUがNBTとして取り上げ、その技術開発の現状や今後の動向、規制のための考え方をまとめているもの

- ① Zinc finger nuclease technology (ZFNs)
- ② Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM)
- ③ Cisgenesis & Intragenesis
- ④ RNA-dependent DNA methylation (RdDM)
- ⑤ Grafting
- ⑥ Reverse Breeding
- ⑦ Agro-infiltration (agro-infiltration “sensu stricto”, agro-inoculation, floral dip)
- ⑧ Synthetic Genomics

米国: NBTを用いて開発された植物品種の一部については、個別事例ごとではあるが、遺伝子組換え生物としての規制を適用しないことを既に決定

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(2012.8、生駒)では以下の例が報告

演題	開発機関	詳細
種子非伝達性かつ非病原性ウイルスベクターの開発と利用	岩手大学	リンゴ小型形潜在ウイルス(ALSV)を利用したリンゴ育種への応用(開花促進)及びウイルス誘導ジンサイレンシング(VIGS)ツール(内在性遺伝子のノックダウン誘導)開発
配列特異的な人為的改変を可能にする遺伝子操作技術の開発と利用	農業生物資源研究所	標的遺伝子のみを認識して切断する人工制限酵素(ZFNs及びTALEN)を利用した標的遺伝子に変異を導入する(標的変異)シロイヌナズナでの実験系の構築
セロロガニン合成に関与する配糖化酵素の機能解析	名古屋市立大学	ニチネソウ葉より単離したセロロガニン配糖化酵素候補遺伝子の機能解析のため、VIGS法により植物体での候補遺伝子の発現を抑制し、その影響を調査
アグロインフィルトレーション法を用いた多重遺伝子導入発現高効率化因子の探索	横浜国立大学	キャップ非依存的な翻訳開始を担う植物RNAウイルス由来の5'非翻訳配列(5'UTR)を複数のORF間に介在配列IRES(Internal Ribosome Entry Site)として組み込み、単一のプロモーター・ターミネーターカセット内で転写された単一のmRNAから複数のタンパク質を翻訳させる技術での発現効率向上のため、遺伝子導入後の長期間観察が可能アグロインフィルトレーション法を用いた一過的発現法を利用
好熱制限酵素遺伝子を用いたゲノム再編誘発技術「Taq I system」のイネへの適用	明治大・理研・トヨタ・豊田中研・東大	好熱細菌由来の制限酵素 Taq I を真核細胞内で過剰発現させることで大規模なゲノム再編を誘導する育種技術「Taq I system」を開発して出芽酵母に適用し、相同組換えによる大規模なゲノム再編の促進と新しいゲノム組成をもつ系統の作製に成功した。本技術のイネへの適用を行った。

図 9. New Plant Breeding Techniques (NBT)

表 4. 2012 年の薬用、環境浄化用 GM 植物及び NBT に関する特許及び論文等(国内外)-1

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	資料
機能性食品	ferritin	イネ	Ferritin	中国・China Jiliang University	26
機能性食品	NF-YA5 protein (a transcription factor)	ナタネ等	Improved content of fatty acids	中国・Chinese Academy of Sciences	27
機能性食品	IbO-ins gene mutant	サツマイモ	High carotenoid	韓国・Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	28
機能性食品	diacylglycerol acyltransferase (GdGAT2-5)	植物	Improvement of neutral oil	中国・Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences	29
機能性食品	4,5-dopa-dioxygenase (BsDODA)	ブーゲンディア	Beet pigment-derived functional edible pigment	中国・不明	30
機能性食品	five algal $\beta$ -carotene ketolase (BKT)	タバコ	High-yield astaxanthin	中国・Chinese Academy of Sciences	31
機能性食品	transcription factor NF-YA9	イネ等	Improvement of fatty acid content	中国・Chinese Academy of Sciences	32
機能性食品	transcription factor GmbZIP123	シロイヌナズナ	Increased fatty acids in its seeds	中国・Chinese Academy of Sciences	33
機能性食品	$\beta$ -carotene hydroxylase RNAi	サツマイモ	Increased $\beta$ -carotene contents and total carotenoids ( $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin)	韓国・Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	34
機能性食品	suppression of the chalcone synthase gene	アマ	Increase polyunsaturated fatty acids (mainly $\alpha$ -linolenic acid)	ポーランド・University of Wrocław	35
機能性食品	putrescine aminotransferase (PAT)等	植物	Increased GABA production	米国・Plant Sensory Systems, LLC	36
機能性食品	35S-thaumatin II	キュウリ	Sweet protein - thaumatin II	ポーランド・Warsaw University of Life Sciences-SGGW	37
機能性食品	Haematococcus pluvialis-originated $\beta$ -carotene ketolase (HpBkt)	ニンジン	Producing keto-carotenoids and higher levels of $\beta$ -carotene	韓国・Korea University, Industry & Academy Collaboration Foundation	38
機能性食品	Medicago truncatula proanthocyanidin regulator (MTPAR)	植物	Modulation of proanthocyanidin (PA; condensed tannin) production in plants	米国・The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.	39
機能性食品	Arabidopsis thaliana N-terminal deletion protein of protein cystathionine- $\gamma$ -synthase (CGS) (D-AxCGS)	植物	Produce methionine in high yield	中国・Chinese Academy of Agricultural Sciences	40
機能性食品	Zein gene RNAi	トウモロコシ	Increasing lysine content in maize	中国・Yunnan Academy of Agricultural Sciences	41
機能性食品	Gossypium hirsutum transcription factor WR1 (GhWR1)	植物	High seed fatty acid content	中国・China Agricultural University	42
機能性食品	cotton transcription factor Dof1	植物	High seed fatty acid content	中国・China Agricultural University	43
機能性食品	soybean GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP1)	植物	High content of vitamin C	中国・Nanjing Agricultural University	44
機能性食品	bovine lactoferrin	コムギ	Bovine lactoferrin	米国・University of Nebraska Lincoln	45
機能性食品	2-hydroxyisoflavanone (IFS) synthetase	シロイヌナズナ	Genistein	日本・日本大学	46

表 5. 2012 年の薬用、環境浄化用 GM 植物及び NBT に関する特許及び論文等(国内外)-2

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	資料
経口ワクチン	porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) viral envelope-associated M protein	トウモロコシ	Oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	米国・Virginia Tech	47
経口ワクチン	Shiga-like toxin Stx1B	タバコ	Oral vaccine of Shiga-like toxin Stx1b	中国・Chongqing University	48
経口ワクチン	hepatitis B surface antigen (HBsAg)	トマト	Hepatitis B surface antigen (HBsAg)	中国・Northwest University	49
経口ワクチン	H1N1 influenza surface antigen (neuraminidase)	レタス	Influenza vaccine	台湾・Ming Dao University	50
食用医薬	inhibitory RNA	トマト等	Oral delivery vehicles for RNA-based therapeutics	米国・Rutgers, The State University of New Jersey	51
ワクチン抗原	rabies virus structural protein, matrix protein	植物	Rabies virus like particle production in plants and vaccine uses	カナダ・Medicago Inc.	52
ワクチン抗原	subunit of cholera toxin B, neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus	植物	Porcine epidemic diarrhea virus vaccine	韓国・Chonbuk National University	53
ワクチン抗原	enterotoxigenic Escherichia coli B-subunit of the heat-labile toxin (LTB)	タバコ	Vaccine	オーストラリア・The University of Melbourne	54
ワクチン抗原、抗体医薬	influenza hemagglutinin H5, rituximab and other proteins	タバコ	large-scale production of recombinant polypeptides by the transient expression-based methods	スイス・Philip Morris Products S.A.	55
抗体医薬	murine anti-colorectal cancer mAb, human anti-rabies mAb 57	タバコ	Expression of both murine anti-colorectal cancer mAb and human anti-rabies mAb 57	韓国・Chung-Ang University	56
抗体医薬	single-chain variable fragment of human HAB25 fused to a cytotoxic RNase from Rana catesbeiana	タバコ	Liver cancer therapy	中国・Shanghai Jiao Tong University	57



表 6. 2012 年の薬用、環境浄化用 GM 植物及び NBT に関する特許及び論文等(国内外)-3

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	資料
治療薬	human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-Ig (hCTLA4Ig)	イネ	human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-Ig (hCTLA4Ig)	韓国・Inha University	58
治療薬	T-DNA of Agrobacterium tumefaciens	アメリカニンジン	Biotransformation	中国・Guangdong Pharmaceutical University	59
治療薬	hexahistidine-labeled human interleukin 10	イネ	Hexahistidine-labeled human interleukin 10	日本・プリベンテック等	60
治療薬	terpenes flower fragrance gene Hctps1 promoter	シュクシャ	Hedychium coronarium terpenes flower fragrance	中国・South China Agricultural University	61
治療薬	Human colorectal cancer antigen GA733-2 fused to the immunoglobulin Fc fragment (GA733-2-Fc)	植物	Colorectal cancer immunotherapy agent	韓国・Kyunghee University, Industry Academic Cooperation Foundation	62
治療薬	human $\alpha$ 1-proteinase inhibitor	トマト	Human $\alpha$ 1-proteinase inhibitor	インド・CSIR-National Botanical Research Institute	63
治療薬	recombinant human complement factor 5a (C5a)	タバコ	Recombinant human complement factor 5a (C5a)	ドイツ・University of Rostock	64
治療薬	tumor-assoc. antigen GA733 fused to the Ig Fc fragment (GA733-Fc)	植物	Induces an immune response against colorectal carcinomas	韓国・Chung-Ang University	65
治療薬	Coptis japonica 3'-hydroxy-N-methylcochlorine 4-O-methyltransferase (4'OMT)	セリバオウレン	Improvement of benzyloisoquinoline alkaloid productivity	日本・医薬基盤研究所, 京都大学	66
治療薬	mussel adhesive protein mefp-5	タバコ	Environmentally friendly adhesives for use in aqueous conditions and in medicine	中国・Northwest University	67
治療薬	amorphadiene synthase (ADS), artemisinic aldehyde delta-1(13) reductase (DBR2), amorpha-4,11-diene monooxygenase (CYP71AV1)	クソニンジン	Increasing content of artemisinin in a cell	イスラエル・Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem Ltd.	68
治療薬	T-DNA, octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain (ORCA3), geraniol 10-hydroxylase(G10H)	ニチニチソウ	High production of anticancer terpenoid indole alkaloids (TIAs)	中国・Ningbo University	69
治療薬	arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT)	タバコ	Melatonin synthesis	中国・Northwest University	70
診断薬・試薬	spider silk proteins (spidroins), fibroins, seed storage proteins (such as glutenins), collagen	植物	Producing polymeric proteins	ドイツ・Leibniz-Institut fuer Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)	71
診断薬・試薬	purpose protein, nitrogen transporter	植物	The transgenic plant whose yielding ability of the requested functional component improved	日本・日本製紙	72
診断薬・試薬	amyloid $\beta$ , GFP, HPT	タバコ	Development the basis for a drug screening system based on transgenic plant cells that express A $\beta$ 42 fusion proteins to serve as the reliable indicators of the general conformational status of A $\beta$ 42.	カナダ・Simon Fraser University	73

表 7. 2012 年の薬用、環境浄化用 GM 植物及び NBT に関する特許及び論文等(国内外)-4

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	資料
治療薬	human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-Ig (hCTLA4Ig)	イネ	human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-Ig (hCTLA4Ig)	韓国・Inha University	58
治療薬	T-DNA of Agrobacterium tumefaciens	アメリカニンジン	Biotransformation	中国・Guangdong Pharmaceutical University	59
治療薬	hexahistidine-labeled human interleukin 10	イネ	Hexahistidine-labeled human interleukin 10	日本・プリベンテック等	60
治療薬	terpenes flower fragrance gene Hctps1 promoter	シュクシャ	Hedychium coronarium terpenes flower fragrance	中国・South China Agricultural University	61
治療薬	Human colorectal cancer antigen GA733-2 fused to the immunoglobulin Fc fragment (GA733-2-Fc)	植物	Colorectal cancer immunotherapy agent	韓国・Kyunghee University, Industry Academic Cooperation Foundation	62
治療薬	human $\alpha$ 1-proteinase inhibitor	トマト	Human $\alpha$ 1-proteinase inhibitor	インド・CSIR-National Botanical Research Institute	63
治療薬	recombinant human complement factor 5a (C5a)	タバコ	Recombinant human complement factor 5a (C5a)	ドイツ・University of Rostock	64
治療薬	tumor-assoc. antigen GA733 fused to the Ig Fc fragment (GA733-Fc)	植物	Induces an immune response against colorectal carcinomas	韓国・Chung-Ang University	65
治療薬	Coptis japonica 3'-hydroxy-N-methylcochlorine 4-O-methyltransferase (4'OMT)	セリバオウレン	Improvement of benzyloisoquinoline alkaloid productivity	日本・医薬基盤研究所, 京都大学	66
治療薬	mussel adhesive protein mefp-5	タバコ	Environmentally friendly adhesives for use in aqueous conditions and in medicine	中国・Northwest University	67
治療薬	amorphadiene synthase (ADS), artemisinic aldehyde delta-1(13) reductase (DBR2), amorpha-4,11-diene monooxygenase (CYP71AV1)	クソニンジン	Increasing content of artemisinin in a cell	イスラエル・Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem Ltd.	68
治療薬	T-DNA, octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain (ORCA3), geraniol 10-hydroxylase(G10H)	ニチニチソウ	High production of anticancer terpenoid indole alkaloids (TIAs)	中国・Ningbo University	69
治療薬	arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT)	タバコ	Melatonin synthesis	中国・Northwest University	70
診断薬・試薬	spider silk proteins (spidroins), fibroins, seed storage proteins (such as glutenins), collagen	植物	Producing polymeric proteins	ドイツ・Leibniz-Institut fuer Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)	71
診断薬・試薬	purpose protein, nitrogen transporter	植物	The transgenic plant whose yielding ability of the requested functional component improved	日本・日本製紙	72
診断薬・試薬	amyloid $\beta$ , GFP, HPT	タバコ	Development the basis for a drug screening system based on transgenic plant cells that express A $\beta$ 42 fusion proteins to serve as the reliable indicators of the general conformational status of A $\beta$ 42.	カナダ・Simon Fraser University	73

表 8. 2012 年の薬用、環境浄化用 GM 植物及び NBT に関する特許及び論文等(国・区分別集計)

国名	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	NBT	計
日本	1	0	0	0	0	2	1	1	0	5
中国	12	2	0	0	1	5	0	8	4	32
韓国	3	0	0	1	1	3	0	0	0	8
台湾	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
インド	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
オーストラリア	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
米国	3	1	1	0	0	0	0	0	0	5
カナダ	0	0	0	1	0	0	1	2	0	4
アルゼンチン	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
イスラエル	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ドイツ	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
スイス	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
ポーランド	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
スペイン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
計	21	4	1	4	3	13	3	13	5	67
重複	0	0	0	1(抗体医薬)	1(ワクチン抗原)	0	0	0	0	1

中国からの報告件数:32件(全件数66件の48.5%) うち中国内の特許件数:23件(71.9%)

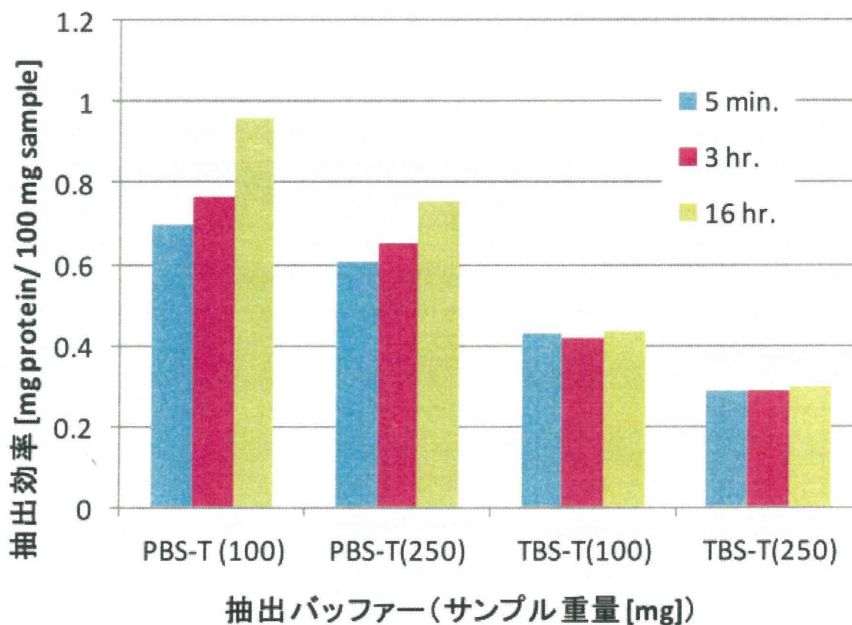


図10. コメからの総タンパク質抽出条件の検討

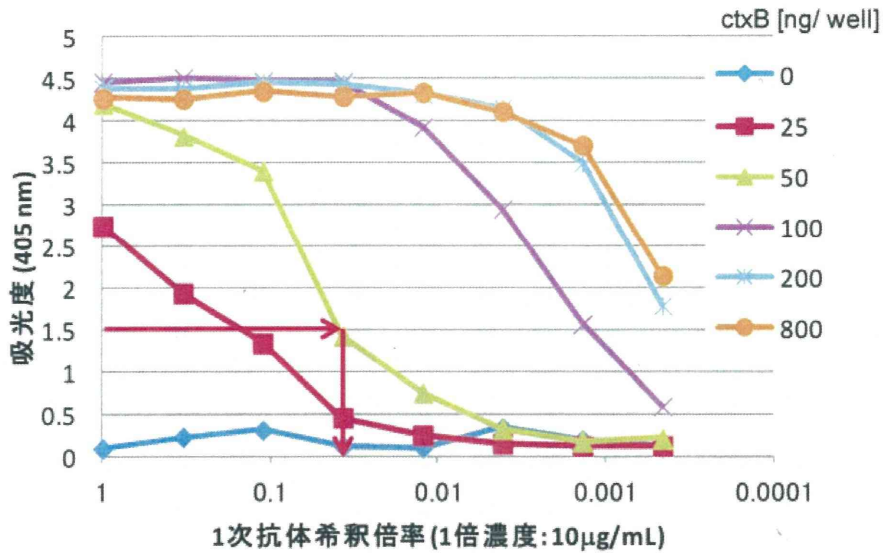


図11. 各抗原(ctxB)量における一次抗体希釈倍率に対する吸光度のプロット

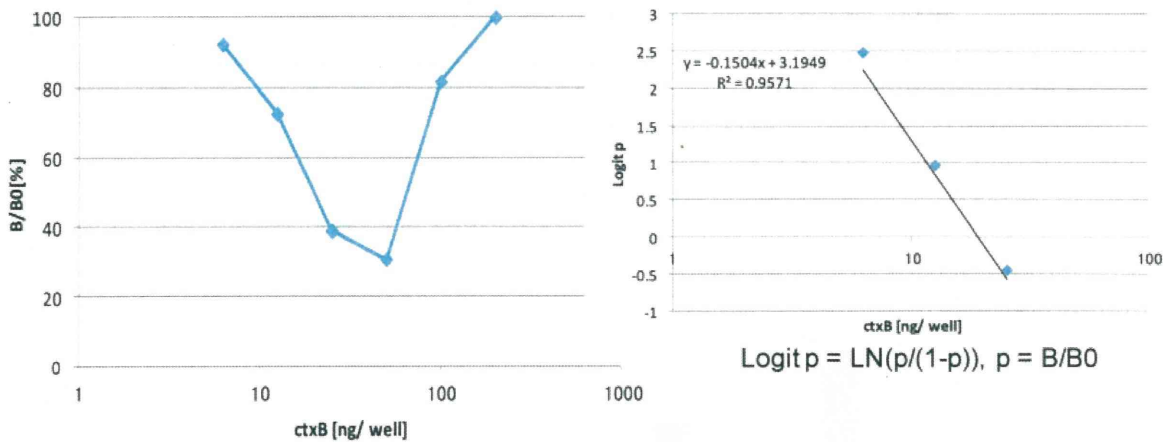


図12. 競合抗原(ctxB)量に対する阻害率(B/B0%)のプロット  
競合抗原をblocking bufferで希釈。

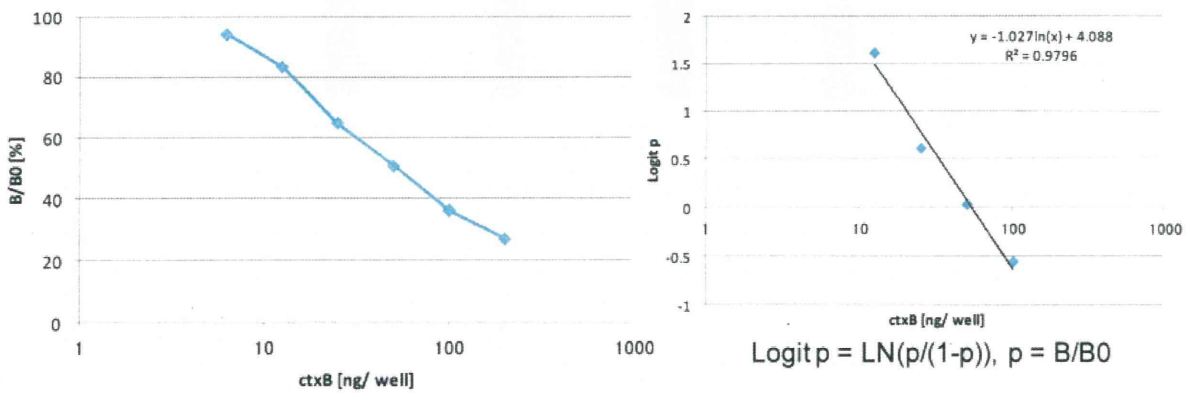


図13. 競合抗原(ctxB)量に対する阻害率(B/B0%)のプロット  
競合抗原をPBS-Tで希釈。

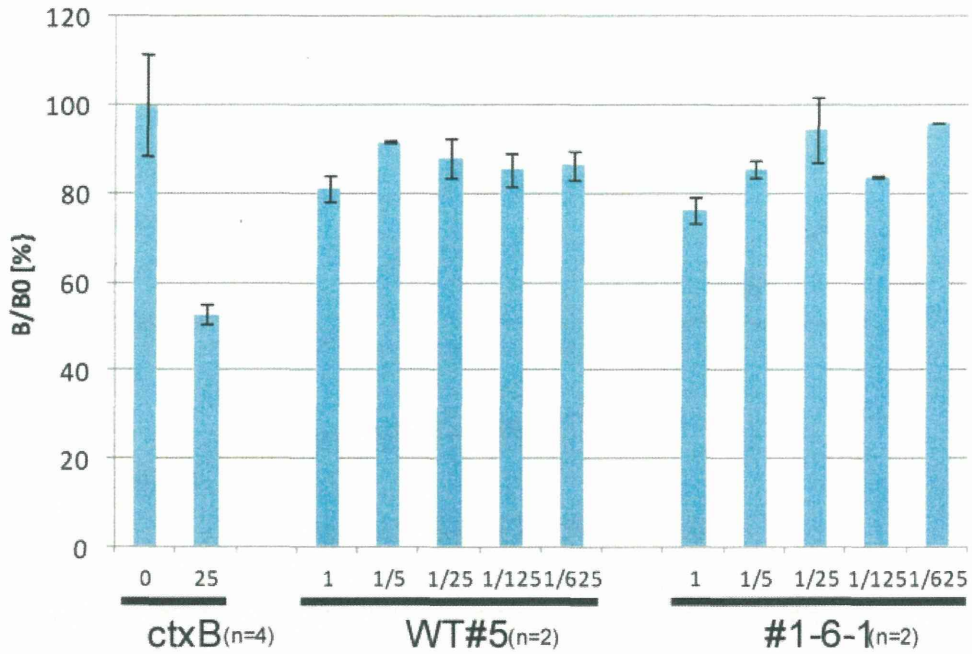


図14. 各検体の阻害率(B/B0%, 低いほどctxBの濃度が高い)  
 CtxBの濃度単位は[ng/ well]。WT#5及び#1-6-1は試料の希釈率を示す。

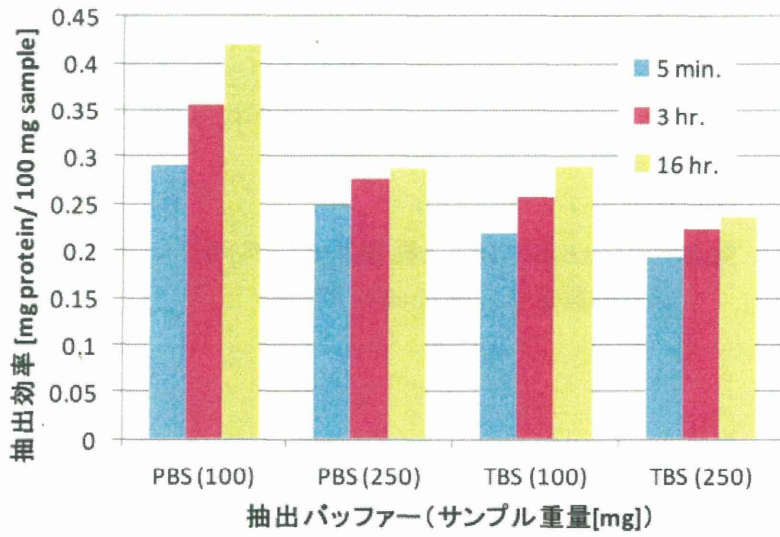


図15. 抽出バッファー及びサンプル重量とタンパク質抽出効率との関係