

201234001B

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

平成22～24年度総合研究報告書

研究代表者 穂山 浩

平成25年3月

目 次

I. 総合研究報告書

- 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 ----- 1
 穉山 浩

II. 分担総合研究報告書

1. 非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究 (総括) - 38
 穉山 浩
2. 非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究 ----- 47
 五十君 静信
3. 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 ----- 60
 小関 良宏
4. 医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究 ----- 68
 吉松 嘉代
5. 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 ----- 80
 中島 治

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
総合研究報告書

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長
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 室長
研究分担者 小関 良宏 東京農工大学大学院共生化学研究院 教授
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 室長
研究分担者 中島治 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 主任研究官

研究要旨：①市販のトマト加工食品を対象に、遺伝子組換え(GM)作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (P35S) を検出するリアルタイム PCR 法を用いて調査を行った。トマト 55 検体中 2 検体より、P35S が検出された。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 検出用プライマー・プローブを設計し、擬陽性 2 検体を分析したところ、CaMV のゲノムが検出された。従って、CaMV の混入であると判断された。リアルタイム PCR 法を用いてジャガイモ加工食品中に混入する可能性のある未承認非食用 GM ジャガイモを検知する方法を開発するため、GM 表示対象のジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモ DNA の断片長の検出下限値を解析した。その結果、ジャガイモ加工食品から精製した DNA を定性 PCR 法に供したところ、すべての加工食品において検出可能な増幅断片長は 51～101 bp 以下であった。この結果から、増幅断片長を 51～101 bp 以下に設計することで、標的遺伝子を検出できることが示唆された。市販のジャガイモ加工食品における GM ジャガイモ混入に関する実態調査を行った。非食用バイオテクノロジーの開発状況に関する Web 公開用データベース検索サイトを確立し、一般公開した。②食品添加物等を生産するための GM 微生物やウクチン等の医療を目的とする GM 微生物は既に実用化あるいは実用化に近い状態であり、さらには工業原料産生及び環境浄化目的の GM 微生物の開発も進みつつある。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、非食用モダンバイオテクノロジー応用微生物が誤って食品に混入してくる可能性が危惧されている。そこで、モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する情報収集を行った。文献等により現在実用化ないしは開発中の微生物組換えに関する情報のデータベース化を行った。上述の組換え微生物が食品などに混入し我々が経口的に摂取してしまうことを想定し、乳酸菌モデル組換え体を用いて、食品からの検知手法について検討した。グラム陽性細菌では、遺伝子組換えに用いる抗生物質耐性マーカーの種類が限られており、エリスロマイシン耐性遺伝子を標的にして組換え体検出のスクリーニングを行うことが有用と考えられた。しかし、生の食肉を対象として人工的に混入させたモデル組換え体の検知を試みたところ、抗生物質マーカー単独では、食品に常在する耐性菌の影響を受け検知は難しいことが示された。これは食品に存在する常在菌がしばしばエリスロマイシン耐性を獲得しているためで、エリスロマイシン耐性などのマーカー以外の組換え体に特有の遺伝子配列を評価する必要性が示された。マルチクローニングサイトは常在菌に存在することは稀であり、コロニーハイブリダイゼーション法を用いれば、グラム陽性の GM 微生物を検知することが可能であると思われた。組換え微生物に関しては、組換え体の遺伝子情報がない場合の検知は容易ではないが、2 種類以上の組換え体に特有と思われる遺伝子配列を標的として、コロニーハイブリダイゼーション法により、評価する方法は有用と思われる。今回の研究によりまとめられた GM 微生物のデータベースを参考にして、この中から検知に有用と思われる遺伝子を 2 種類以上決定し、コロニーハイブリダイゼーションにより評価する方法は、他の微生物組換え体の検知にも利用可能と思われる。③近年、一般化しつつある GM 技術は食品や飼料原料用途みならず、工業原料用途での利用を目指した利用がなされ始めている。また、遺伝子組換えに利用される遺伝子の種類も増加しているうえに、利用される植物も多岐にわたっている。特に問題なのは、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等に利用される植物種と同じ宿主が用いられていることである。そのため、これらの非食用用途の GM 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 GM 作物よりも、深刻な健康被害をもたらすことが懸念される。そのため、

非食用の GM 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。1年目ではトウモロコシ 1 粒から抽出した DNA を用いて、2年目では GM コメから抽出した DNA を用いて、3年目では GM ジャガイモを材料として DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知法について検討を行った。④2008-2012 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 社は、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。2006～2010 年に収集した医薬品用及び環境浄化用 GM 植物の開発・生産に関する情報 405 件を、カテゴリー別に集計した結果、機能性食品：120 件、経口ワクチン：65 件、食用医薬：25 件、ワクチン抗原：36 件、抗体医薬：36 件、治療薬：76 件、診断薬・試薬：15 件、環境浄化：40 件であり、機能性食品、経口ワクチン及び治療薬に関するものが多く、使用された食用作物は、イネ：51 件、トマト：28 件、レタス：22 件、ジャガイモ：18 件、トウモロコシ：15 件であった。2011-2012 年の SciFinder®での調査結果では、機能性食品：38 件、経口ワクチン：13 件、食用医薬：2 件、ワクチン抗原：4 件、抗体医薬：6 件、治療薬：21 件、診断薬・試薬：4 件、環境浄化：21 件であった。国別の件数は、2011 年、2012 年のいずれも中国が最多であり、それぞれ 15 件及び 28 件であった。2012 年は、さらに新規植物育種法(New Breeding Techniques)に関する情報も SciFinder®で収集した結果、5 件の報告があり、そのうち 4 件が中国の報告であった。 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、検知操作において陽性対照となる、トマト及びイネをホストとするモデル GM 植物の入手、または作出を行った。トマトについては、味覚修飾タンパク質であるミラクリンを生産する GM トマトを入手し、モデル検知実験に使用する自殖種子の取得、並びに無菌培養系の立ち上げを行い、PCR による遺伝子レベルでの検知法を確立した。イネについては、コレラトキシン B サブユニット(ctxB)を生産するモデル GM イネを作製し、モデル検知実験に使用可能な自殖種子を取得するとともに、コメ 1 粒を試料とする *ctxB* 遺伝子の定量的検知法を確立した。⑤2008-2012 年に発表された非食用モダンバイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタの文献調査などを行ってそれらの開発状況を調べた。それぞれ 20 報、10 報、71 報の論文や特許が見出され、ブタについて盛んに研究が行われていることが明らかになった。非食用モダンバイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタをまとめて開発国ごとに分類すると、米国 (33 報)、中国 (15 報)、台湾 (11 報)、韓国 (11 報)、ドイツ (10 報) において報告が多かった。また、近年では非食用モダンバイオテクノロジー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。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。鶏卵中で医療目的に応用できる組換えタンパクを生産させる研究が行われている。このような目的で作成された GM ニワトリに由来する鶏肉が市場の鶏肉に混入してしまう懸念が考えられる。非食用モダンバイオテクノロジー応用動物についての検知法の開発として、ヒトエリスロポエチン (hEpo) を生産する GM ニワトリに由来する鶏肉の検知法を作成した。プラスミド中の hEpo cDNA をスタンダードとして利用して、リアルタイム PCR によって鶏肉中から hEpo 遺伝子を検知する方法を作成した。市場調査として生の鶏肉 6 品、加工食品中の鶏肉 6 品をこの検知法で調べた結果、いずれのサンプルからも hEpo 遺伝子は検出されなかった。

研究協力者

中村公亮、近藤一成、手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部) 中村香織、南竹優美、川上浩 (共立女子大学大学院) 江川智哉、榎田和彌、梶川揚申 (国立医薬品食品衛生研究

所食品衛生管理部)、佐々木伸大 (東京農工大学大学院共生科学技術研究院) 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)

A. 研究目的

近年ではモダンバイオテクノロジー応用技術食品の開発が進む一方、とうもろこし等の作物を組換え、医療用の医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。さらには食品添加物を生産するための遺伝子組換え (GM) 微生物は既に应用されており、工業原料産生及び環境浄化目的の GM 植物・生物の開発も急速に行われている。このようなモダンバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来の非食用モダンバイオテクノロジー応用植物・生物が誤って食品に混入する可能性が示唆されている。わが国においては、平成 13 年 4 月から GM 食品の安全性審査を義務付け、安全性審査を行うとともに、輸入時にモニタリング検査等を行っている。また GM 生物に関しても、平成 16 年から GM 生物の多様性確保により法律が施行され、GM 生物の使用等を規制している。

このような状況の中、本申請研究においては、非食用モダンバイオテクノロジーを応用した植物・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植物・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する。

B. 研究方法

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

1) 試料

トマト含有加工食品 (ケチャップ、ソース、チリソース、ピューレー、ジュース、ペースト、缶詰) は、都内のスーパーで購入したものを用いた。また、生鮮トマトも同様に国産品を都内のスーパーで購入したものを用いた。厚生労働省が定めた GM 食品表示対象のジャガイモ加工食品は、都内のスーパーやインターネットで購入した。

2) DNA 抽出精製

イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い付属のプロトコールを改変して抽出精製を行った。

3) 試薬調製・リアルタイム PCR

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。Universal Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プ

ライマー、50 μ mol/L) 各 0.9 μ M、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 1 μ M を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (25 ng) を添加した。装置は ABI PRISM™ 7900HT を用いた。

4)リアルタイム PCR 増幅条件

リアルタイム PCR 装置に 96 ウェルプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は以下のとおりである。50°C 2 分間の条件で保持した後、95°C 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15 秒間、60°C 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行った。ベースラインは 3~15 サイクルに設定した。Ct 値をプロットするための ΔRn threshold は指数関数的な増幅の間、0.2~0.5 に設定した。指数関数的な増幅が確認され Ct 値が 48 未満の場合、陽性であると判定した。Ct 値が得られない場合は、陰性であると判定した。

5) データベース検索ソフトの開発と公開

データベース検索サイトは、FileMaker ServerII ソフトを用いて開発した。インターネットを利用した一般公開は、株式会社エミックのホスティングサービスを利用した。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

1. 微生物組換え体に関する情報収集

バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、論文、書籍、インターネット、業者カタログなどの文献調査に加え、海外の学会やシンポジウム等へ参加しその分野の研究者と情報交換を行った。微生物全てについてデータベース化を行うことは困難であることから、組換え体に関する論文数の多い微生物として大腸菌、乳酸菌、枯草菌および酵母などを対象とし、データベース化を行った。

海外の情報収集では、乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン開発が注目されはじめていることから、平成 22 年度にスロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics に参加し、研究成果を発表すると共に、GM 微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。平成 23 年度は、フランスで開催された国際酪農連盟の分析週間に参加し、微生物の検知法に関する会議に出席し情報収集を行った。その後、オーストリアで開催された腸内細菌に関する国際シンポ

ジウムで乳酸菌組換え体に関する研究成果を発表すると共に、GM 微生物の検知法に関する情報交換を行った。

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をデータベース化した。

ヨーロッパやアジア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が盛んに行われていることから、この分野の研究について重点的に情報収集を行った。

2. モデル組換え体

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。宿主としては、ゲノム DNA にエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*) を組込んだ *Lactobacillus casei* IGM232 株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ermC*) をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393 株の 2 株を用いた。

3. GM 微生物の検知技術の検討

乳酸菌のモデル組換え体を用いて、エリスロマイシン耐性遺伝子を標的としてリアルタイム PCR 法による定量的な検知法を検討した。宿主としては、ゲノム DNA にエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*) を組込んだ *Lactobacillus casei* IGM232 株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ermC*) をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393 株の 2 株を用いた。

標的とした遺伝子は、組換え体上に 1 コピーのみ存在することを確認した (*ldhD*: D-lactate dehydrogenase) と、グラム陽性細菌のマーカーとしてしばしば用いられるエリスロマイシン耐性遺伝子で、同じエリスロマイシン耐性遺伝子でも *L. casei* IGM232 株はゲノム上に組み込まれているため *ery* を 1 コピー持つ。一方、*L. casei* IGM393 株はプラスミド上に *ermC* が組み込まれており、乳酸菌あたり複数コピーが存在する。これらの遺伝子を標的としてリアルタイム PCR 法による定量的な検知法を検討した。

さらに、市販の豚肉に存在したエリスロマイシン耐性菌を単離・同定し、耐性遺伝子の存在

位置をサザンブロッティングで解析した。また、データベースを中心に組換え体に利用されているエリスロマイシン耐性遺伝子に関する情報収集を行った。検討の結果、食品中にエリスロマイシン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。エリスロマイシン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。

エリスロマイシン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ン耐性遺伝子を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。エリスロマイシン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。

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ン耐性菌 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、エリスロマイシンを含む MRS ブロスで一晩培養した菌液を、エリスロマイシンを含む 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ーナーゼ 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。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

トウモロコシからのゲノム DNA は昨年度と同様に *N,N,N*-cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)によって単離した。またトウモロコシ1粒ずつからのゲノム DNA の単離は DNeasy Plant mini kit (キアゲン社)を用いて行った。方法はキットのマニュアルに従った。DNA チップ上のプローブ配列は昨年度と同様にトウモロコシ内在性遺伝子として ADH, SSIIB を、組換え遺伝子の1例としてカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列を用いた。これらのプローブの DNA 塩基配列は昨年度と同じものを用いた。プローブの標識反応はランダムプライム法にて行った。通常法では 4 μ M random nonamer, 2~2000 μ g の熱変性を行った鋳型 DNA, 20 μ M dNTP, 0.08 U Klenow fragment, 1 \times Klenow reaction buffer を含むように 25 μ l の液量となるように調整した後に 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。65 $^{\circ}$ C、10 分間で酵素を失活させた後にハイブリダイゼーションに用いた。改変法では、2~2000 μ g の熱変性を行った鋳型 DNA, random nonamer, dNTP, Klenow fragment, 1 \times Klenow reaction buffer を含むように 250 μ l の液量となるように調整した後に 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。ターゲット DNA の標識は Cy3 標識 dUTP, Cy3 標識 random nonamer, Biotin 標識 dUTP を用いて行った。ハイブリダイゼーションは 42 μ l の 3 \times SSC, 0.3% SDS 水溶液中で 4~16 時間、65 $^{\circ}$ C で行った。アレイの洗浄は、標準の方法としては 37 $^{\circ}$ C の 3 \times SSC, 0.1% SDS 中での洗浄を 1 分間、2 回行った後に、

室温の 0.2 \times SSC 中で 1 分間リンスした。検出方法は Cy3 標識のものは、アレイ洗浄後そのまま、読取装置にセットしてシグナルを検出した。Biotin 標識のものは、アレイ洗浄後に Cy3 標識 avidin あるいは、Oyster550 標識抗 biotin 抗体を用いて染色を行い、洗浄後に蛍光検出を行った。

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

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

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

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

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用いた。GM コメは平成 21 年に当研究室で作成されたものを用いた。GM コメとして平成 21 年度に当研究室でアイスプラント由来の ribosomal binding protein (RBP) 遺伝子を 35S プロモーターと nos ターミネーターの間に連結するように設計したコンストラクトをコメ品種「ニッポンバレー」に導入して作成したものを用いた。

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。

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 λ -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。

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。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

1) 医薬品用、環境浄化用 GM 植物及び NBT の調査

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。

2) 非食用 GM 植物の検知法開発に関する研究 トマト非組換え体及び組換え体

トマト品種 Moneymaker (非組換え体) 株 (MMWT) 'TOMJPF00002' は National BioResource Project (NBRP) より有償で分譲を受けた。ミラクリントマト (MMMir) は系統 '5B' cv. Moneymaker を筑波大学 大学院生命環境科学研究科 遺伝子実験センター 江面浩教授より分譲を受けた。
遺伝子等

コレラトキシシン B サブユニット (ctxB) 遺伝子は国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第一室 五十君静信室長より pET100/D-TOPO ベクターに導入された状態で提供を受けた。pET100B-ctxB vector より、制限酵素サイト (5'-end: BspHI, 3'-end: SacI)、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。

ビスピリバック Na 塩で組換え体の選抜を行う、イネ組換えベクター pSTAR R-5 ベクターはインプラントイノベーションズ社 (神奈川県横浜市) より購入した。

ミラクリントマト (MMMir) の無菌培養系立ち上げ

野生型株 (MMWT, cv. Moneymaker) の種子とともに、定法に従い滅菌処理を行い、MS2G 培地 (Murashige and Skoog 培地、2% sucrose, 0.25% Gelrite) に無菌的に播種した。現在、MSG (0.3) 培地 (Murashige and Skoog 培地、3% sucrose, 0.3% Gelrite) で継代培養を行っている。

ミラクリントマト (MMMir) の栽培

MMWT 及び MMMir はジフィーセブン水でふくらむタネまき土ポットに播種後、発芽したものについて 5 寸鉢 (赤玉土 : 堆肥 : クレハ培養土 = 3 : 1 : 1) に移植し閉鎖温室 (温度 25°C、相対湿度 55%、14 時間明-補光照明使用、10 時

間暗)で栽培した。開花後に振動により自家受粉させ、果実は落果まで放置し、種子を収穫した。

ミラクリン遺伝子検知法の検討

無菌培養物または、温室栽培の植物体より採取した新鮮葉各約 100 mg より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用し、ゲノム DNA を調製した。

果実からは室温下、乳鉢、乳棒を用いホモジナイズしたもの約 120 mg を試料とし、同様に DNeasy Plant Mini Kit を使用しゲノム DNA を調製した。

各試料より調製したゲノム DNA を鋳型として、標的の遺伝子領域を PCR 増幅した。

PCR の条件及びプライマー配列は下記の通り。

・ *ubi3* の検出

Primer set: Slubi3-1437S + Slubi3-1763A
Slubi3-1644S + Slubi3-1763A

[1] Slubi3-1437S (21 mer) :

5'-TTGAGTCTTCCGACACCATCG-3'

[2] Slubi3-1644S (21 mer) :

5'-CCAAGCCAAAGAAGATCAAGC-3'

[3] Slubi3-1763A (20 mer) :

5'-ACTCAGCATTAGGGCACTCC-3'

・ CaMV35Spro-Mir の検出

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

[1] AIST-35Ss (23 mer) : 5'-GAA GTT CAT TTC
ATT TGG AGA GG -3'

[2] Rdmir-616A (21 mer) : 5'-TGA GAG CCA AAC
GCC TTC TTC-3'

PCR 条件

PCR 反応液: GoTaq Green Master Mix (Promega)
3 μ L、sense-primer (10 μ M) 1 μ L antisense
primer (10 μ M) 1 μ L、genome DNA 1 μ L。温
度条件: 94°C 5 min \rightarrow (94°C 30 sec \rightarrow 58°C 30
sec \rightarrow 72°C 1 min) x 30 cycle \rightarrow 72°C 10 min
 \rightarrow 4°C ∞ 。PCR 機器: GeneAmp 2400 (PE)。反
応終了後 6 μ L 全量をアガロース電気泳動解析
に供した。

イネ形質転換用コンストラクトの作製

目標としたコンストラクトは、文献 4 に記
載の *ctxB* 発現コンストラクトである。イネの
胚乳に高濃度に標的タンパク質を蓄積させる
ためのプロモーター *GluB1* プロモーター制御

下で、ER 居留シグナル KDEL を付加した *ctxB*
タンパク質を発現するコンストラクト
GluB1pro-CtxB-KDEL-GluB1ter をイネへ導入
するための形質転換用ベクターの構築の要点
を下記にまとめた。

・ R-5 ベクターの *OsAct1* 発現カセット
(Gateway) を /*HindIII-EcoRI* で切り出し、
GluB1::ctxB-KDEL と置換。

・ KDEL (ER retention signal) を C 末端に付加
(PCR でエンジニアリング)。

・ KDEL をコードする塩基はイネで利用頻度
の高いコドンを選択した。

・ *GluB1* signal 配列末端 (*NcoI* サイト) と読み
枠が合うように 5' 末端の制限酵素サイトを設
計 (PCR でエンジニアリング、*BspHI* サイトを
付加)。

(5' 末端が *NcoI* だと *ctxB* の開始コドン周
辺のアミノ酸が変わってしまうため)

NcoI: C[^]CATGG (compatible)

BspHI: T[^]CATGA

・ *BspHI* サイトは大腸菌でメチル化され、以後
切断できなくなるので、PCR 産物を制限酵素処
理し、*NcoI* サイトと結合した。

・ 形質転換用ベクター (R-5) に組込む前に KDEL
付加等の塩基配列を確認した。

このコンストラクト構築により、*ctxB* のコ
ドンがイネに最適化されていない点は異なる
が、本コンストラクトを導入することにより、
文献記載のものと同様の遺伝子構造を有
するコンストラクトを有するイネ組換え体が
作出できる。

コンストラクト構築に使用したプライマー
配列は下記のとおり。

[1] 5' 末端 *BspHI* サイト付加プライマー

ctxB-BspHI-S

5'-cccttctcatgacacctcaaatattact-3' (30
mer)

下線部: *BspHI* サイト

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

ctxB-KDEL-SacI-A

5'-atcgttgagctcacagctcgtccttatttggccatact
aattgcggc-3' (46 mer)

下線部: KDEL をコードする配列

CtxB 全長増幅時の PCR 条件は下記のとおり。

Primer set: *ctxB-BspHI-S* +

ctxB-KDEL-SacI-A

PCR 反応液 : KOD-plus (TOYOBO) 1 μ L、ddH₂O 35 μ L、10 x KOD-plus buffer 5 μ L、dNTP 5 μ L、MgSO₄ 2 μ L、Sense-primer (100 μ M) 0.5 μ L、antisense primer (100 μ M) 0.5 μ L、template DNA (plasmid DNA) 1 μ L。温度条件 : 94°C 2 min \rightarrow 94°C 15 sec \rightarrow 62°C 30 sec \rightarrow 68°C 90 sec \times 35 \rightarrow 4°C ∞ 。PCR 機器 : GeneAmp 2400 (PE)。
イネ形質転換及び育成

イネの形質転換はインプラントイノベーションズ社に委託した。無菌培養物として受領した組換え体イネは薬用植物資源研究センター 筑波研究部 薬用植物資源研究棟内グロースチャンバーにおいて下記の条件で馴化栽培した。

受領したイネ形質転換体候補株 (試験管培養物 20 本) は、キメラになっている可能性を考慮し、1 本の試験管内のシュートについて、基部で分割できるものは分割し、馴化栽培に供した。シロイヌナズナ栽培用のアラシステム (BMS) に、JA 粒状くみあい合成培土 3 号 (サンアグロ全農) (N 0.4 g, P 0.8 g, K 0.6 g/kg) を充てんし、これに分割した幼植物体を定植した。土表面と同じ高さまで灌水し、14 時間明 (温度 28°C) / 10 時間暗 (温度 23°C) のグロースチャンバーに設置した。なお、相対湿度は全期間を通じ 60% とした。野生株は日本晴 WT 種子をシャーレ上播種し、播種 3 日後に芽生えをアラシステムに定植した。対照とする、非組換えイネ (日本晴) は 2009 年収穫の種籾 (WT2) を 10 粒、シャーレ中、RO 水で十分に湿らせたろ紙上に置き、暗所、30°C で発芽させた。3 日後、全発芽種子をアラシステムに充てんした JA 粒状くみあい合成培土 3 号に植え付け、上記組換え体と同条件で栽培を開始した。

イネの成長に伴い、それぞれの株をアラシステムのプラスチックチューブで囲い、栽培を継続した。CtxB 系統定植 15 日後、WT 播種 31 日後に、すべての株を 5 寸のポリポット (用土同上) に移植し、土表面の高さまで水を灌水するよう自動灌水装置をセットした。CtxB 系統移植後 29 日、WT 播種後 61 日後に 10 時間明 (温度 28°C) / 14 時間暗 (温度 23°C) の短日条件へと明期変更を行った。また、同日、くみあい尿素入り窒素加里化成 2 号 NK2 (16-0-16) を鉢ごとに 3 g 追肥した。CtxB 系統定植後 129 日目、WT 播種後 146 日目に収穫し、自然乾燥後、種籾として収穫した。

イネ形質転換体 (候補) における *ctxB* 遺伝子コピー数の解析

イネ形質転換体 (候補) 株における *ctxB* 遺伝子の導入コピー数の解析は realtime-PCR 法により行った。鋳型遺伝子量の基準となる対照遺伝子にはイネゲノム DNA 上にシングルコピーで存在する *DSH1* 遺伝子 (文献 6) のプロモーター (DSH1p) 領域を設定し、DSH1p 領域との存在比の比較により、*ctxB* 遺伝子の存在量 (コピー数) を推定する方法を採った。なお、鋳型となる遺伝子の存在比の計算には $\Delta\Delta Ct$ 法の適用が可能であったため、同法を採用した。

Realtime-PCR に使用したプライマー配列は下記のとおりである。

for DSH1p (amplicon 67 bp)
DSH1p-rtS1: 5' -CCGCATTGCTTCGCTATAAGT-3'
DSH1p-rtA1: 5' -GCTCCGAGGTGAGTGGATATG-3'
for *ctxB* (amplicon 91 bp)
ctxB-rtS1:
5' -GAATGGTGAATTTTCAAGTAGAAGT-3'
ctxB-rtA1:
5' -CCTCAGGGTATCCTTCATCCTTT-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 はイネ各株の新鮮葉約 100 mg から DNeasy Plant Mini Plant Kit (QIAGEN) を用い調製した。

登熟過程穎果における *ctxB* 遺伝子の発現解析

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

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

T₁ 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)、PBS (phosphate buffered saline, pH=7.4)、TBS-T (Tris-buffered saline, pH7.6, 0.05% Tween20)、TBS (Tris-buffered saline, pH7.6) の4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。タンパク質は Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) により定量した。

競合 ELISA 法による ctxB タンパク質の定量

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、はじめに抗原 (ctxB) 一次抗体濃度の最適化について検討した。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, β -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。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。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、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

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

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。検出試薬等は Protein Detector™ ELISA Kit (KPL) を用いた。

T₁ 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 μ L を得た。コメ 1 粒を 2 mL 容のアシストチューブに入れ、GE1 buffer を 250 μ L 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 μ L、 α -amylase 2 μ L、RNaseA 5 μ L 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 μ L、センス、アンチセンスプライマー各 10 μ M, 1 μ L、コメ抽出ゲノム DNA 1 μ L を加え 6 μ L 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* 遺伝子検出用プライマー (全長増幅用プライマーと同一)

ctxB-BspHI-S:5' -cccttcctatgACACCTCAAAA TATTACT-3'

ctxB-KDEL-SacI-A:5' -atcgttgagctcacagctcgtccttatttgccataactaattgcggc-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' -ggcgtgtagtaggcttgacag-3'
' DSH1p-rtA1 :5' -catatccactcacctcggagc-3'

イネ形質転換体 T₁ 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 T₁ 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 法によりイネ形質転換体 (候補) 株の葉を検体とするコピー数解析と同様の手法で行った。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。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

(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 2008-2011 年に発表された論文については PubMed を利用して検索した。2012 年に発表された論文と特許については SciFinder を利用して検索した。キーワードには transgenic fish, transgenic chicken, transgenic pig を使用した。ヒットした文献や特許の中からタイトルと要旨を読んで将来フードチェーンへの混入につながる懸念のある報告を選んだ。なお、プロモーターの性質の解析、構造遺伝子の機能の解析、病態モデルの作成などの目的で作成された非食用 GM 動物は研究室の閉鎖系の中で飼育されるに留まり、フードチェーンへの混入の懸念はないと判断して本研究の調査対象には含めなかった。また、最近になって注目されている技術や報告なども調査した。

(2) LoxP 配列の検知

LoxP 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。ニワトリ ES 細胞からゲノミック DNA を抽出するために DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用した。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。試薬は TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit を用いた。LoxP 配列に基づく特異的プライマーの組み合わせは以下の 3 組を設計した。

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。

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*, *BamH I*, *Bgl II*) で消化して、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°C 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。

(3) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知

市場調査用の鶏肉サンプル

生の鶏肉 6 品(ムネ、ササミ、レバー、モモ、手羽元、ひき肉)と鶏肉を含む加工食品 6 品(唐揚げ、親子丼、焼き鳥レバー、チキンカツ、照り焼き、チキンカレー)を東京の小売店で購入した。

リアルタイム PCR のキャリブレーション用のスタンダード

hEpo cDNA を組み込んだ市販のプラスミドを購入して使用した(Thermo Fisher Scientific, Cat. No. MHS1010-98053191)。

鶏肉からのゲノミック DNA の抽出

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit(Qiagen)を利用して鶏肉からゲノミック DNA を抽出した。抽出したゲノミック DNA の性質は紫外吸収と 0.8%アガロースゲル電気泳動によって調べた。

リアルタイム PCR による hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーション

リアルタイム PCR の反応液は 25 μ L で以下の物を含む: 12.5 μ L ユニバーサル PCR マスターミックス(Life Technologies), 0.4 μ L プライマー対 (各 25 μ M), 0.5 μ L TaqMan プローブ(10 μ M), 2.5 μ L コントロールプラスミド DNA テンプレート。コントロールプラスミド DNA テンプレートは、リアルタイム PCR のキャリブレーション用のスタンダードの項目に記載したプラスミドを *Nco* I で切断してリニアにした物を 20, 200, 2.0 k, 20 k, 200 k コピーを使用した。

プライマーの配列は hEpo F, 5'-AGCCCAGAAGGAAGCCATCT-3' および hEpo R, 5'-GGAAAGTGTCAGCAGTGATTGTTTC-3' である。プローブの構造は hEpo Pro, 6-carboxy-fluorescein (FAM)-CCTCCAGATGCGGCCTCAGC-tetramethylrhodamine (TAMRA) である。

Δ Rn threshold は 0.20 として、5 回測定を行った。

鶏肉サンプルから抽出したゲノミック DNA の存在

下のスタンダードプロットのキャリブレーション

生の鶏肉サンプルの 1 つから抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/ μ L となるように PCR 反応液に加えた(1 反応当たり 130 ng)。リアルタイム PCR の測定条件は、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載したものと同一であり、5 回測定を行った。

鶏肉の実態調査

上述の生の鶏肉 6 品と鶏肉を含む加工食品 6 品から抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/ μ L となるように PCR 反応液に加えた。コントロールプラスミドは添加しなかった。それ以外の条件については、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載の条件と同じである。リアルタイム PCR の測定を行なって鶏肉中の hEpo 遺伝子の存在を調べた。Ct 値が 38 以上は陰性とした。Ct 値が 38 以下で指数関数的増幅が確認できる反応を陽性とした。

次に、上述の生の鶏肉 6 品と鶏肉を含む加工食品 6 品から抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/ μ L となるように PCR 反応液に加えて、さらにコントロールプラスミドを添加した。リアルタイム PCR の測定条件は、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載したものと同一であり、hEpo 遺伝子が検出されるかを調べた。2 回測定を行った。

リアルタイム PCR の内在性コントロールとしてのニワトリ cytochrome b 遺伝子の検出

鶏肉の実態調査を行うときに、抽出されたゲノミック DNA の品質を評価するために、ニワトリ cytochrome b 遺伝子の検出をリアルタイム PCR によって同時に行った。プライマーは既報の通りとした (Tanabe S., et. al. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 3131-3135 (2007))。プローブは既報の構造のクエンチャーについて FAM に変えた。測定はシングルプレックス PCR として、 Δ Rn threshold を 0.10 とした。

C. 研究結果

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

1. トマト加工食品中の非食用 GM 遺伝子検知に関する研究

GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (P35S) を検出するプライマー・プローブを用いて、トマト加工食品中の GM トマト混入の調査を行った。

P35S 検出用プライマー・プローブ

35S-F : 5' - GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5' - AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C
-3'

35S-P : 5' -FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC
G-TAMRA-3'

市販のトマト加工食品55検体を対象に実態調査を行ったところ、2検体が擬陽性と判断された。再度DNA抽出を行い再現性の確認を行ったところ、2検体において再現性が確認された。以降、この2検体(juice cocktail3, 4)に対して検討を行った。

P35S 擬陽性検体に対しカリフラワーモザイクウイルスターミネーター(CaMVT)部位を標的としたPCRの結果、増幅が確認された。そこで、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)感染混入の可能性が考えられるため、CaMV検出用のプライマー・プローブの設計を行った。

CaMV検出用プライマー・プローブ

CaMV p-t F : 5' - GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA
AGG AA -3'

CaMV p-t R : 5' - GGA ACT ACT CAC ACA TTA TTA
TGG AGA AA -3'

CaMV p-t P : 5' -FAM-TTC ATT TCA TTT GGA GAG
GAC ACG CTG A-TAMRA-3'

このリアルタイムPCRの結果、増幅が確認された。また、P35SおよびCaMV検出のリアルタイムPCRのCt値の比較の結果、juice cocktail 3は34.01±1.47、35.06±1.19で差は0.75、juice cocktail 4は32.36±1.17、33.87±1.11で差は1.07で、ほぼ同量のコピー数が含まれていることが示唆された。

2. ジャガイモ加工食品から精製したDNAの評価

生鮮ジャガイモ10品種、ポテトスナック4製品、冷凍ジャガイモ3製品、乾燥ジャガイモ3製品、ジャガイモデンプン製品7製品、調理済みジャガイモ惣菜食品4製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品4製品は、粉碎後、DNA抽出・精製を行い、検体とした。その検体は、分光光度計を用いて吸光度を測定することにより、DNA収量及び精製度を算出した。全ての生鮮ジャガイモ・加工食品からDNAを抽出することが可能であった。生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ惣菜食品からのDNA収量は多かったが、ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品からのDNA収量は少なかった。

生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ

惣菜食品については、タンパク質の混入指数(A260/A280)と塩などの混入指数(A260/A230)の値は2付近であったため、高い精製度であることが示唆された。ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品については、A260/A280は1.3~1.4で、A260/A230は0.4~0.7であることから高い精製度が得られなかった。

3. ジャガイモ加工食品から抽出したDNAの断片長の評価

ジャガイモ加工食品中に含有するDNAの断片長について解析を行った。設計した定性PCR用プライマーを用いて、51、101、201、301、401、501、601、701bpの断片長で増幅可能であるかを評価した。生鮮ジャガイモについては51~701bpまで全ての断片長の増幅産物が得られた。一方、ジャガイモスナック菓子や冷凍ジャガイモは製品によって差はあるものの、全て製品において401bpまで増幅産物を得られた。乾燥ジャガイモに関しては1つの製品が701bpまで得られたものの下限は301bpであった。ジャガイモデンプンや調理済みジャガイモ惣菜食品は製品によって差はあるものの下限は101bpであった。ジャガイモデンプンを加工した加工食品(春雨)の下限は51bpであった。

4. プライマー・プローブ設計

ジャガイモ加工食品より精製されるDNAの断片長(51~101bp)を考慮し、UGPaseを標的に、増幅断片長を67bpになるようプライマー・プローブ(以下、UGPaseと略す。)を設計した。まず、男爵とメイクインで標的配列の情報を得るためシーケンス解析を行ったところ品種間で塩基配列に差を検出した。よって、スクリーニングに使用するUGPaseの標的配列は、男爵、メイクインの他に8種類のジャガイモ品種間に相同性の高いUGPaseの配列領域を見出し、UGPase検出用プライマー・プローブを設計した。次いで、Tnos検出用のプライマー・プローブの設計を行った。アグロバクテリウムゲノム(GenBank no.V00087.1)のTnos配列を基に設計した。増幅断片長は69bpとした。P35S検出用のプライマー・プローブは、GM Papaya Rainbow品種のゲノム配列(GenBank no.FJ467933.1)に含まれるP35Sを基に設計を行った。増幅断片長は65bpとした。

5. 作成したプラスミドの特異性と感度の評価

UGPase、Tnos、P35S検出用プライマー・プローブを用いて、リアルタイムPCRを行い、それぞれの検出特異性と検出感度について解析を行った。

まず特異性について検討した。コメ、トマト、パパイヤ、ナス、ピーマン、ヒヨコマメ、コムギ、アマ、トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、テンサイ、ワタ及びジャガイモの14種の作物から精製したゲノムDNAを鋳型にリアルタイムPCRを行った。その結果、コメからはコメ由来のコメ内在性アクチンプロモーター(AINT)が、コムギとアマ、テンサイからは抗生物質耐性遺伝子 neomycin phosphotransferase II (NPT II) が、ダイズからは Tnos が、トウモロコシからはトウモロコシ由来ユビオチンプロモーター (Pubi) と NPT II が検出された。ジャガイモに関しては、UGPase のみ検出され、Tnos や P35S は検出されなかった。

次に、感度について検討を行った。プラスミドを用いて希釈系列を作成し、リアルタイムPCRの鋳型とし、それぞれを検出するプライマー・プローブを用いた検知法の検出感度を解析した。UGPase については16回の反復試験、Tnos と P35S については10回の反復試験を行った。その結果、全ての試験より UGPase は 2,500 コピーまで、Tnos・P35S は 12.5 コピーまで検出された。Ct 値は、Tnos と P35S に比べて UGPase を高く検出したが、RSD の値はすべて 3.2% 以下と低かった。定量限界をプラスミドの希釈系列の濃度と Ct 値より求めたところ、UGPase は 250 コピー ($R^2=0.996$)、Tnos・P35S は 12.5 コピー (Tnos, $R^2=0.993$; P35S, $R^2=0.998$) であった。

6. 実態調査

開発したリアルタイムPCR検知法を用いて、市販されているジャガイモ加工食品へのGMジャガイモの混入に関する実態調査を行った。全ての検体は、2試験ずつ行い判定を行った。その結果、15検体中、27-①(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-1(シチューの素)、T-2(缶スープ)、31-②(春雨)の5製品でTnosが、33-①(冷凍ジャガイモ)、K-3(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-2(缶スープ)、31-①(春雨)の5製品でP35Sが検出された。得られたCt値は38以上と高く、いずれもGMジャガイモではなくバクテリアやウイルスの混入による汚染の可能性が示唆された。

7. データベース検索サイトの開発と公開

データベース検索サイトは、FileMaker ServerIIを用いたホスティングサービスを利用し、インターネットより国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部のホームページから公開した。

(アドレス: <http://gmdb.nihs.go.jp/>)

②非食用GM微生物の検知法開発に関する研究

1. 微生物組換え体に関する情報収集

バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、平成21年度までの研究班で研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクター、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌と酵母のベクターに関して一覧表を作成して、ほぼ網羅的にデータベース化を行ったが、その後追加された情報について情報収集を続け、新しい情報の追加を行った。

国内の食品添加物用途に用いられる組換え微生物情報としては、国内の承認済GM添加物リスト、食品安全委員会で現在審査中ないしは、審査を終了した組換え添加物リストを作成した。医療用途としては、食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中のGMワクチンリスト、ヒトの医療用として日本で承認されたGM医薬品・細胞培養医薬品リストを作成した。各リストについては、平成22年度 of 分担研究報告書を確認していただきたい。

海外の情報収集として、平成22年はスロバキアのコシツェ市で開催されたプロバイオティクスとプレバイオティクスの国際会議でポスター発表を行った。乳酸菌を用いたGMワクチンの研究状況について情報収集を行った。ワクチン開発はそのほとんどがウイルスワクチンであり、GM技術で行われている。一方、細菌を用いた組換えワクチンとしては、抗原運搬体とするワクチン(経口粘膜ワクチン)開発が注目されていることから、乳酸菌研究者が集まる国際シンポジウムに参加し、乳酸菌を用いた組換え乳酸菌ワクチンに関する情報収集を行った。

この国際シンポジウムでは、プロバイオティクス乳酸菌の安全性に関する議論も行われていた。プロバイオティクス乳酸菌の遺伝子組換えを用いた育種については、基礎研究として進められているものの、生きた組換え微生物の安全性に関する議論は進んでおらず、実用化にあたってはこの考え方を早急に何とかするべきだとの意見が出されていた。

平成23年はフランスのリヨンで開催された国際酪農連盟の検査法に関する会議に参加し、その後オーストリアのウィーンで開催された腸内細菌国際シンポジウムでポスター発表を行った。GM微生物の検知法に関する情報交換を行った。ヨーロッパでもGM微生物を生き

たまま用いることは実用化には至っていないのが現状であった。

国内の学会としては、腸内細菌学会、日本乳酸菌学会に参加し、研究成果の発表と情報収集を行った。

2. モデル組換え体

ゲノム DNA にエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*) を組込んだ *Lactobacillus casei* IGM232 株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ermC*) をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393 株の 2 株を用いた。標的とした遺伝子は、各組換え体に 1 コピーのみ存在することを確認した (*ldhD* : D-lactate dehydrogenase) と、グラム陽性細菌のマーカーとしてしばしば用いられるエリスロマイシン耐性遺伝子で、同じエリスロマイシン耐性遺伝子でも *L. casei* IGM232 株はゲノム上に組み込まれているため *ery* を 1 コピー持つ。一方、*L. casei* IGM393 株はプラスミド上に *ermC* が組み込まれており、乳酸菌あたり複数コピーが存在する。

3. GM 微生物の検知技術の検討

GM 微生物の検知技術の検討では、DNA を標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を行った。平成 22 年度は、乳酸菌モデル組換え体を対象として、豚肉にモデル組換え乳酸菌を混入し、定量 PCR を行い具体的な検知法を検討した。

L. casei IGM232 株および *L. casei* IGM393 株を、エリスロマイシンを含む MRS プロスで増菌後、10 倍階段希釈したものを検体として、リアルタイム PCR で分析した。等量の乳酸菌から PCR テンプレート溶液を Matsuki ら (2004) の方法に従い調製し、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子 *ldhD* および *ery* をターゲットとするプライマーと、プラスミド上にある遺伝子 *ermC* をターゲットとするプライマーを用いて定量 PCR を行った。

L. casei IGM232 株のクロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子と、クロモゾーム上に組み込まれた *ery* 遺伝子を標的とした結果を得た。*L. casei* IGM393 株のクロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子と、プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的とした結果を得た。菌数と Ct 値の結果から、組換え乳酸菌数として 3000 個程度あれば本法により検出が可能である。プラスミド上の遺伝子を標的とする 300 個程度で検出が可能であること

が示された。モデル組換え乳酸菌を豚肉に接種して同様な検討を行った。接種直後の解析において、豚肉中では、クロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子および *ery* 遺伝子を標的とした場合、 6×10^3 cfu では検出できないが、プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的すると 6×10^3 cfu 以上で検出可能であった。

モデル組換え乳酸菌を生肉に接種後ただちに検知した結果と接種後 24 時間培養した時の結果を検討した。IGM232 株接種直後では、*ldhD* 遺伝子および *ery* 遺伝子ともに菌数として、 6×10^4 cfu、コピー数として 86 および 192 コピーまで検出可能であることが示された。IGM393 株接種直後では、クロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子を標的とした場合、 6×10^4 cfu を検出した。プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的すると 6×10^3 cfu まで検出することが可能であった。コピー数においては、*ermC* 遺伝子の方が *ldhD* 遺伝子より約 40 倍多いことが明らかとなった。

MRS 培地で 24 時間増菌した場合、両菌株接種群とも低レベルの菌の増殖が認められた。*ery* 遺伝子は、非接種においても検知され、自然界に存在した常在菌がエリスロマイシン耐性遺伝子を保持していた可能性が示唆された。そこで、モデル組換え乳酸菌を接種していない豚肉検体からエリスロマイシン耐性菌を 24 株単離し、*ery* プライマーおよび *ermC* プライマーを用いて PCR で評価した。そのうち 3 株は *ery* 遺伝子を保有しており、2 株は *ermC* 遺伝子を保有していた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、*ery* を保有する 3 株は、*Streptococcus salivarius* と同定され、*ermC* を保有する 2 株は *Staphyrococcus hominis* と同定された。

次に、これらの菌がエリスロマイシン耐性遺伝子をどこに保持するのか、サザンブロット解析で検討した。各菌株から抽出したゲノム DNA をブロットしたものに *ery* プロブをハイブリダイズさせた場合、*Streptococcus salivarius* において、スメアなバンドが検出された。また、プラスミド DNA をブロットし、*ermC* プロブをハイブリダイズした場合、*Staphyrococcus hominis* において 1 本のバンドが検出された。これらの結果より、*Streptococcus salivarius* は、*ery* 遺伝子をクロモゾーム上に保有し、*Staphyrococcus hominis* は、*ermC* 遺伝子をプラスミド上に保

有していることが示された。

エリスロマイシン耐性のみで、組換え体を検知しようとしても、常在菌のエリスロマイシン耐性株により、正確な評価は難しいため、コロニーハイブリダイゼーション法により、複数の遺伝子を標的として評価することにした。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。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。複数プレートで、また *ermB* 遺伝子を保持する *L. casei* IGM232 のコロニーでは高感度で 100% 検出した。また、一部のプレートにおいて数個のコロニーを検出した。*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、複数のプレートと *L. casei* IGM393 では検出し、3つのプレートと、*L. casei* IGM232 では検出しなかった。*L. casei* IGM393 の検出率は 100% であったが、2つのプレートの平均検出率は、70% で、検出シグナルは明瞭ではなかった。

Probe MCS で検出した結果、*L. casei* IGM232 と *L. casei* IGM393 を 100% 検出し、常在菌のプレートでは検出しなかった。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ゾームに *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。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。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研

究

1. プライマー標識法と内部標識法を用いた DNA マイクロアレイ検出感度の検討

これまで、ターゲット DNA の蛍光標識は、Cy3 で標識されたランダムプライマーを用いていたが、DNA マイクロアレイでの検出感度を向上させるために、Cy3 標識された dUTP をターゲット DNA 内に取り込ませる内部標識法によって標識を行った。その結果、プローブ配列と同じ配列を鋳型として標識した場合、プライマー標識法、内部標識法、それらを併用した場合ともに 1×10^7 で検出が可能であった。50 μ g のゲノム DNA を鋳型として標識した場合には、プライマー標識法では SSIb、ADH 遺伝子ともに検出されなかったのに対し、内部標識法あるいは併用法において ADH 遺伝子の検出が可能であった。特に併用法においては、10 μ g のゲノム DNA を鋳型として用いた場合でも ADH 遺伝子の検出が可能であった。これらのことから、プライマー標識法よりも、内部標識法を用いた場合に効率よく蛍光を検出することが可能であることが示された。

2. ビオチン標識法と、Cy3-avidin または蛍光標識 DNA デンドリマーを用いた蛍光増強法の検討

更に蛍光検出感度を向上させるために、ビオチン標識された dUTP をターゲット DNA に取り込ませて、DNA チップ上でハイブリダイゼーションを行わせた後に、蛍光標識のアビジンあるいは、抗ビオチン DNA デンドリマーをビオチンと結合させる方法について検討を行った。その結果、Cy3 標識アビジンを用いた系では、250 μ g のゲノム DNA を標識した場合、ADH、SSIb 遺伝子ともに明確な蛍光が検出され、ADH 遺伝子については 2~10 μ g のゲノム DNA 量でも検出が可能であった。一方、蛍光標識 DNA デンドリマーを用いた系では、50 μ g のゲノム DNA を標識した場合、ADH 遺伝子は検出可能であったが、対象としてプローブ DNA を含まないスポット溶液を添着した blank スポットにおいても蛍光が検出され、バックグラウンドノイズの上昇が確認された。これらの結果から、ビオチン標識と、Cy3 標識アビジンの系を用いることで、数十マイクログラム程度のゲノム DNA を鋳型として組換え遺伝子の検出が可能であることが示唆された。

3. 標識反応条件検討による検出感度の向上

続いて、Cy3 dUTP を用いた内部標識法の反応条件を検討することで検出感度が向上できるかについて実験を行った。これまでの方法では、DNA 数十～数千マイクログラムの鋳型に対して、一般的には数マイクログラム程度の DNA を標識する場合に用いる一般的な手順に従って反応を行っていたが、反応に関わる基質や酵素が鋳型 DNA に対して少なすぎる可能性があったため、反応容量を 10 倍に、基質や酵素量の濃度を 5 倍として標識反応を行った。その結果、鋳型ゲノム DNA として 50 μ g を用いた場合に、ADH、SSI**b** 遺伝子ともに蛍光が観察された。また、鋳型ゲノム DNA として 10 μ g を用いた場合には ADH 遺伝子を検出することが可能であった。

4. GM トウモロコシ 1 粒を用いた DNA マイクロアレイ検出

C-3 で数十マイクログラムのゲノム DNA を内部標識法で標識することで ADH 遺伝子の検出が可能であることが分かったため、トウモロコシ 1 粒から抽出したゲノム DNA を用いて内生遺伝子を検出可能であるかについて検討を行った。また、GM トウモロコシの一つである MON88017 1 粒から抽出したゲノム DNA を用いてその組換え遺伝子を検出できるかについても検討を行った。トウモロコシ 1 粒からシリカメンブレンミニカラムを用いて抽出したところ、10～80 μ g 程度の収量であった。20 μ g の抽出したゲノム DNA を C-3 で確立した方法で標識を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、非組換え体から抽出したゲノム DNA を用いた場合、ADH 遺伝子のスポットにおいて蛍光が検出された。また、MON88017 由来のゲノム DNA を用いた場合には SSI**b**、ADH のスポットにおいて蛍光が検出された。また、HPT 遺伝子や 35S プロモーター等にの全てのスポットにおいても蛍光が検出されたことから、検出の選択性については低いものと考えられた。

5 phbA, phbB 標準プラスミドの構築

これまでにアマやイネ、ジャガイモを用いて PHB を生産させるために PHB 合成にかかわる遺伝子である phbA, phbB, phbC 遺伝子を導入した植物体を作成する試みがなされている (Plant Physiology (2002) 128: 1282-1290; Plant Biotechnology Journal (2005) 3:249-258)。これ

らの研究では GM 植物の作出で頻用されているベクター pBI121 の 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus* 由来の phb 遺伝子を組み込み、これを用いて組換え植物を作出している例が多く報告されている。しかしこれらの GM 植物は研究段階であり、実際に流通している報告は無いため、最もよく使われている 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に phbA, phbB 遺伝子を組み込んだ配列を大腸菌内でのコピー数が多く取り扱いやすいベクターである pUC19 へ導入することで標準プラスミドの構築を行った。

6 マイクロアレイを用いた phb 遺伝子の検出

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

7 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

RBPGM、非 GM コメ可食部 500 mg からゲノム DNA を抽出したところ、それらの収量は数 μ g～十数 μ g 程度であった。それら得られたゲノム DNA を GM コメ由来のゲノム DNA が相対比で 0, 1, 5, 10, 50, 100%となる様にトータルで 10 μ g となる様に混合し、DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、いずれの GM コメゲノム DNA 混入率においてもコメ内在性遺伝子である sucrose phosphate synthase (SPS) 遺伝子のプローブのスポット位置において蛍光が観測された。GM コメ由来 DNA の混入率

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

8 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、GM イネをサンプルとして解析を行った。その結果、GM、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 λ DNA のプローブ群で蛍光が観測された。更に GM 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。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。

9 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

GM 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が、*nptII* のスポットでは蛍光は検出されなかった。このことから、GM 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。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

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_permit_s.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。

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。

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。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

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。

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。

ウイルス遺伝子のシーケンスから、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 (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と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) 2006-2010 年に国内外で公表・出版された医薬品用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等

2006~2010 年に収集した医薬品用及び環境浄化用 GM 植物の開発・生産に関する情報 405 件を、カテゴリー別に集計した結果、機能性食品: 120 件、経口ワクチン: 65 件、食用医薬: 25 件、ワクチン抗原: 36 件、抗体医薬: 36 件、治療薬: 76 件、診断薬・試薬: 15 件、環境浄化: 40 件であり、機能性食品、経口ワクチン及び治療薬に関するものが多く、使用された食用作物は、イネ: 51 件、トマト: 28 件、レタス: 22 件、ジャガイモ: 18 件、トウモロコシ: 15 件であった。

4) 2011-2012 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

2011-2012 年の SciFinder®での調査結果では、機能性食品: 38 件、経口ワクチン: 13 件、食用医薬: 2 件、ワクチン抗原: 4 件、抗体医薬: 6 件、治療薬: 21 件、診断薬・試薬: 4 件、環境浄化: 21 件であった。国別の件数は、2011 年、2012 年のいずれも中国が最多であり、それぞれ 15 件及び 28 件であった。2012 年は、さらに新規植物育種法 (New Breeding Techniques) に関する情報も SciFinder®で収集した結果、5 件の報告があり、そのうち 4 件が中国の報告であった。

5) 非食用 GM 植物の検知法開発に関する研究 組換えトマトモデル植物ミラクリントマト (Mir トマト) を使用した遺伝子検知実験

Mir トマトについては、組換え体種子の譲渡を受け、モデル組換え体として栽培を行い、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物

としての維持を開始した。

MMMir トマト及び野生型株 MMWT の無菌培養物各新鮮葉より調製したゲノム DNA を鋳型として、ハウスキーピング遺伝子 *ubi3*、または、Mir タンパク質をコードする遺伝子領域の PCR 増幅による検知を試みた。その結果、*ubi3* 及び、カリフラワーモザイク CaMV35S プロモーターから Mir コード遺伝子間に対応する PCR 増幅産物が得られ、Mir タンパク質をコードするコンストラクトの検知が可能なが示された。

CtxB イネの作製、栽培、T₁ 種子の取得

CtxB イネについては、イネグルテリン B-1 プロモーターで *ctxB* タンパク質を発現するための組換え体作製用遺伝子コンストラクトを含むイネ遺伝子導入用ベクターを構築した。本コンストラクトを導入した組換え体イネはインプラントイノベーションズ社において作製が完了し、20 本の無菌培養物として受領した。このイネ形質転換候補の培養シュート (20 本) はキメラになっている可能性があったため、基底部分で分割し、各個体を個別に馴化栽培した。そのため、野生型株 10 株を含め、馴化個体数は 75 株に上った。開花までの成長は順調であったが、密植の影響か、その後の結実、収穫までの期間は過去の栽培期間と比較し大幅に延長し、これまでは播種から 100 日程度で収穫可能であったが、今回は WT で播種から 146 日を要した。

導入 *ctxB* 遺伝子コンストラクトコピー数の解析

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

コピー数が 1 と見積もられた line について、*ctxB* の遺伝子導入をそれぞれ確認したところ、確かに遺伝子導入が確認された。また、no insert と判断された #2-10-1 については、元の試験管が同じ line #2-10-2、#2-10-3、#2-10-4 と共に *ctxB* の導入を確認したが、い