

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。	なし
H. 知的所有権の取得状況	2. 実用新案登録 なし
1. 特許所得	3. その他 なし

(工業原料用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究)

研究分担者 小関良宏 東京農工大学大学院共生科学技術研究院教授

研究要旨

近年、一般化しつつある遺伝子組換え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遺伝子組換え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。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 年目では遺伝子組換えコメから抽出した DNA を用いて、3 年目では遺伝子組換え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。

協力研究者

佐々木伸大 東京農工大学大学院共生科学技術  
研究院助教

A. 研究目的

近年一般化しつつ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数多く作出されるようになってきている。特に最近では、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、実用化に向けた開発がなされつつある。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。これまでは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。DNA マイクロアレイは DNA チップ上に数万種類の遺伝子を検出するためのプローブを固定化することによって、一度のハイブリダイゼーションによって数多くの組換え遺伝子を検知することが可能であると期待されているものである。また、PCR 増幅を行わないことからこれまで組換え遺伝子の検知法として用いられてきた PCR 法では問題とされてきたクロスコンタミネーションによる偽陽性のリスクを低減させることができるものと期待されていることから、実用化が求められている。

そこで本研究では初年度はトウモロコシを材料として 1 粒から抽出したゲノム DNA から組換え遺伝子をマイクロアレイで検出することを試みた。2 年度目では実際の遺伝子組換えモデル材料として、環境耐性遺伝子を組換えたコメを材料として、マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知について検討した。また、生分解性プラスチックの原材料として用いるためのポリヒドロキシブチレートを合成するための遺伝子として利用されている *phaA*, *phbB* 遺伝子について標準プラスミドを作成し、その遺伝子の検知についても検討を行った。3 年度目では、工業用デンプン合成用に開発されたジャガイモであるアムフローラを材料として DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子検知について検討を行った。

## B. 研究材料および方法

トウモロコシからのゲノム DNA は昨年度と同様に *N,N,N*-cetyltrimethylammoniumbromid (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 $\mu$ M random nonamer, 2~2000 $\mu$ g の熱変性を行った鋳型 DNA, 20 $\mu$ M dNTP, 0.08 U Klenow fragment, 1  $\times$  Klenow reaction buffer を含むように 25 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 サイトの間にこ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。遺伝子組換えコメとして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’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 $\mu$ g に、標準プラスミドを鋳型として 35S-phbA (phbB)-NOS の領域を PCR 法によって増幅した DNA 断片を  $1.0 \times 10^8$  あるいは  $1.0 \times 10^9$  コピーとなるようにスパイクしたものをターゲット DNA として調製してマイクロアレイ解析に供した。

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

組換えポテト品種 EH 92-527-1 (アマフローラ) 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’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。

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。

## C. 研究結果

### C-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  $1 \times 10^7$

で検出が可能であった。50 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

#### C-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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

#### C-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 $\mu$ g を用いた場合に、ADH、SSIb 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 $\mu$ 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。

#### C-4. 遺伝子組換えトウモロコシ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、遺伝子組換え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 $\mu$ g 程度の収量であった。20 $\mu$ 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 SSIb、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。

#### C-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)。これらの研究では遺伝子組換え植物の作出で頻用されているベクター pBI121 の 35S プロモーターと NOS ターミ

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

#### C-6 マイクロアレイを用いた *phb* 遺伝子の検出

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

#### C-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

RBP 遺伝子組換え、非遺伝子組換えコメ可食部 500 mg からゲノム DNA を抽出したところ、それらの収量は数  $\mu\text{g}$  ~ 十数  $\mu\text{g}$  程度であった。それら

得られたゲノム DNA を遺伝子組換えコメ由来のゲノム DNA が相対比で 0, 1, 5, 10, 50, 100% となる様にトータルで 10  $\mu\text{g}$  となる様に混合し、DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、いずれの遺伝子組換えコメゲノム DNA 混入率においてもコメ内在性遺伝子である sucrose phosphate synthase (SPS) 遺伝子のプローブのスポット位置において蛍光が観測された。遺伝子組換えコメ由来 DNA の混入率が 100% の場合には、35S プロモーターと NOS ターミネーター遺伝子のプローブのスポット位置において明らかな蛍光が観測され、その混入率が下がるにつれてその蛍光は弱まり、混合率 0% においては観測されなかった。これらの結果から、コメから抽出したゲノム DNA を用いた場合には遺伝子組換え遺伝子を混入率 1% 程度まで検出することが可能であることが示唆された。

#### C-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、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。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。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-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

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、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

DNA マイクロアレイを用いて組換え遺伝子の検出を行うために、検出感度の向上を目的として標識方法について検討を行った。その結果、プライマー標識法ではなく、内部標識法を用いること、また、標識の反応液量を増やすことで検出感度が向上することが確認された。また、ビオチンを用いてターゲット DNA を標識したのちに、蛍光標識されたアビジンや抗体を用いて検出を行った場合には、蛍光の増強が確認された。原理的には DNA デンドリマーを用いた場合には、1 分子あたり数百分子の蛍光色素で修飾されていることから蛍光強度が数百倍になるものと期待されたが、実際には数十倍程度の増幅であった。これは、デンドリマー分子が大きいために十分な分子同士の相互作用が十分に行われなかったことや、ターゲット DNA に対する分子数が十分量ではなかつ

たことが考えられた。また、いずれの検出方法においても、*SSIIb* 遺伝子に比べて、*ADH* 遺伝子の検出感度が高い傾向が見られた。このことからプローブとして用いる DNA 塩基配列によって検出感度が異なる可能性が示唆された。

非食用の遺伝子組換え植物は現在までのところ国内において流通はしていないが、開発自体はなされていることから、これらの組換え遺伝子の検出法を開発しておくことは重要であると考えられる。本研究では一つのモデルケースとして、生分解性プラスチックの原料である PHB 合成にかかわる遺伝子である *phbA*, *phbB* 遺伝子が、トウモロコシゲノムに混入した場合にマイクロアレイ法を用いて検出可能であるかについて検討を行った。その結果、それらの遺伝子断片がトウモロコシゲノム 30 $\mu$ g あたりに  $1.0 \times 10^8$  コピー存在した場合に検出可能であることが判明した。この検出感度は昨年度までの報告から少なくとも混入率 100%であれば組換え *phb* 遺伝子を検出可能である感度であった。トウモロコシゲノムは約 23 億塩基対であり、食用となる主要な作物の中でもそのサイズが大きい。そのため、トウモロコシゲノムを用いて検出することが可能であれば、他植物への応用が十分可能であると期待される。そこで、日本国における主食であるコメについてマイクロアレイ法による組換え遺伝子の検出が可能であるかについて検討を行った。その結果、コメを用いた場合には組換えコメの混入率が 1%程度であっても十分に検出可能であることが示唆された。これはコメのゲノムサイズは約 4 億塩基対程度であり、トウモロコシゲノムに比較して十分に小さいことからグラム当量の組換え遺伝子のコピー数が高くなったためであると考えられた。

DNA マイクロアレイを用いて組換え遺伝子の

検出を行うために、検出感度の向上を目的として標識方法について検討を行った。その結果、プライマー標識法ではなく、内部標識法を用いること、また、標識の反応液量を増やすことで検出感度が向上することが確認された。また、ビオチンを用いてターゲット DNA を標識したのちに、蛍光標識されたアビジンや抗体を用いて検出を行った場合には、蛍光の増強が確認された。原理的には DNA デンドリマーを用いた場合には、1 分子あたり数百分子の蛍光色素で修飾されていることから蛍光強度が数百倍になるものと期待されたが、実際には数十倍程度の増幅であった。これは、デンドリマー分子が大きいために十分な分子同士の相互作用が十分に行われなかったことや、ターゲット DNA に対する分子数が十分量ではなかったことが考えられた。また、いずれの検出方法においても、SSIIb 遺伝子に比べて、ADH 遺伝子の検出感度が高い傾向が見られた。このことからプローブとして用いる DNA 塩基配列によって検出感度が異なる可能性が示唆された。

本年度はマイクロアレイ解析を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、ダイズに適応することが可能であるかについて検討を行った。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 アレイを作製した。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 を用いてアレイ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

本研究では、増え続ける遺伝子組換え植物からの多種類の組換え遺伝子の検出に、DNA マイクロアレイ法が適応可能であるかについて検討を行った。その結果、コメを材料とした場合には検出感度としては混入率数パーセント程度まで検出が可能であること、また、トウモロコシの場合には一粒から抽出したゲノム DNA を用いた場合でも組換え遺伝子を検出することが可能であった。また、ジャガイモについても適応可能な方法であり、本方法は多種植物種に応用可能であると期待される。

## F. 健康危険情報



特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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

- 1) 伊東 篤志、田口 朋之、和気 仁志、穂山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山田 晃世、小関 良宏 「DNA チップを用いた遺伝子組換え食品の遺伝子非増幅検出法の検討」日本食品化学学会第 16 回 総会・学術大会 (大阪) 2010 年 6 月 10 日
- 2) 伊東 篤志、田口 朋之、茂木 豪介、田名網 健雄、穂山 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

## H. 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

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遺伝子組換え植物の開発・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。

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。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、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ことから、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、陽性対照が必要となる。遺伝子レベルでのPCR等の手法による検知においては、当該組換え体または、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が、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、もしくは、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体が必要となる。

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）、そして、コレラトキシンBサブユニットを生産するイネ（文献 3, 4, 5）を対象として、陽性対照となるモデル組換え植物体の入手、導入遺伝子コンストラクトの構築、そしてモデル組換え体の作出を行い、それぞれを検体として、遺伝子レベル、またはタンパク質レベルでの検知法モデルを確立することを目的とした。

## 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。

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。ミラクリンタンパク質 (Mir) 生産トマト (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-TOP0 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。

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 pSTARA R-5 ベクターはインプランティアノベーションズ社 (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'-TTGAGTCTCCGACACCATCG-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  
μL、sense-primer (10 μM) 1 μL antisense primer  
(10 μM) 1 μL、genome DNA 1 μL。温度条件 : 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 ∞。PCR 機  
器 : GeneAmp 2400 (PE)。反応終了後 6 μL 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 滞留シグナル *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<sup>^</sup>CATGG (compatible)

*BspHI*: T<sup>^</sup>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'-cccttctctcatgacacctcaaaatattact-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'-atcggtgagctcacagctcgtccttatttgcataacta

tgcggc-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  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ L、  
10 x KOD-plus buffer 5  $\mu$ L、dNTP 5  $\mu$ L、MgSO<sub>4</sub> 2 $\mu$ L、  
Sense-primer (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L、antisense primer  
(100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L、template DNA (plasmid DNA) 1  
 $\mu$ L。温度条件: 94°C 2 min → (94°C 15 sec → 62°C  
30 sec → 68°C 90 sec) x 35 → 4°C  $\infty$ 。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' -GAATGGTGCAATTTTTCAAGTAGAAGT-3'

ctxB-rtA1: 5' -CCTCAGGTATCCTTCATCCTTT-3'

また、realtime-PCR には機器: ABI PRISM 7000 (ABI)、試薬: SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takarabio) をプロトコルに従い使用した。Ct 値の計算は、自動 (auto threshold) または手動 (manual) 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。

### 登熟過程結果における 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。

### 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)、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,  $\beta$ -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。

#### 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・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 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 度繰り返す、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 μM、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' -atcgttgagctcacagctcgctc tttatttgccataactaattgcggc-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' -ggcgtgtagtagcttgacag-3'

DSH1p-rtA1 :5' -catatccactcacctcggagc-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。

#### 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。

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

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 (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) 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遺伝子組換え植物の開発・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) 非食用遺伝子組換え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、T<sub>1</sub> 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、いずれも *ctxB* 遺伝子は検出されず、no insert であることが判明した。

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

#### 登熟過程結果における *ctxB* 遺伝子の発現解析

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

遺伝子組換え植物における、導入遺伝子の発現能は、ゲノム上の導入遺伝子の挿入部位や、コピー数、サイレンシングの有無などの条件によって

左右される。今回の試料においても同様の事象が発生していると考えられる。

#### CtxB イネにおける稲穂及びコメの生育状況

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

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

#### 自殖後代( $T_1$ )種子における遺伝子導入の確認

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

#### 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、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100 mg)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。

#### 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 50 ng/well、一次抗体(mouse anti-*ctxB*)濃度 0.5 µg/mL と決定した。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。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。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、定量を試みたが、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。

#### 直接 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の検知

Tween を除いた抽出バッファを使用し検体を調製したところ、*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。

#### 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。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。

#### 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

コメ粉末より調製したゲノム DNA を鋳型とした *DSH1p* 遺伝子及び *ctxB* 遺伝子のリアルタイム PCR の増幅曲線は、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、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。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(ΔCt 値)を求め、さらに、基準とする(ここでは #1-7-1-1) との ΔCt 値の差(ΔΔCt 値)を求め、存在比を求めた。

上述の ΔΔCt 法により、非組換え体(WT#5)を含

む  $T_1$  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。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、粉末と鑄型とした場合は、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、医薬品用・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。

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

CtxB イネについては、 $T_1$  種子を取得するとともに、それらにおける *ctxB* 遺伝子の導入を確認することができた。これらは、 $T_1$  世代で分離していることが明らかになったため、当世代の育成の際には、播種後のなるべく早い段階で、葉からゲノム DNA を調製するなどし、PCR により *ctxB* 遺伝子の存否を確認する必要がある。グロースチャンパーにおけるイネの栽培では、密植の影響が問題となることがあらためて認識された。グロースチャンパー栽培では、イネ植物体周囲における換気、温度条件に注意しなくてはならない。

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

子の登熟過程における *ctxB* 遺伝子の半定量的な発現量解析から *ctxB* 遺伝子の発現を確認しているが、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

これまで医薬品用・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。国内外での医薬品用・環境浄化用 GM 植物に関する研究・報告件数のうち、最近は、中国の報告が最も多くなっていることが判明した。

本研究では、文献等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た。

ミラクリントマトについては、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物を確立し、遺伝子検

知モデル実験を行い、果実からの標的遺伝子の検知が可能なが示した。

コレラトキシン B サブユニット生産イネ(*ctxB* イネ)については、イネグルテリンプロモーターで *ctxB* タンパク質を発現するコンストラクトを導入したイネ形質転換体の馴化栽培をグロースチャンパーで行い、realtime-PCR法により導入遺伝子コピー数の解析を行うとともに、 $T_1$  種子(コメ)を取得した。さらに *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