

## medicago Product Pipeline

Product	Stage of Development				
	Research	Preclinical	Phase 1	Phase 2	Phase 3
<b>Medicago</b>				Emergency Use Authorization	
<i>H5 Pandemic flu VLP</i>	[Green arrow spanning Research, Preclinical, Phase 1, and Phase 2]				
<i>Quadrivalent Seasonal flu VLP</i>	[Green arrow spanning Research, Preclinical, and Phase 1]				
<i>Rabies VLP</i>	[Green arrow spanning Research and Preclinical]				
<i>VLP vaccine 2</i>	[Green arrow spanning Research]				
<b>Partnered</b>					
<i>Enhanced flu VLP (IDRI)</i>	[Grey arrow spanning Research and Preclinical]				
<i>VLP vaccine 1 (Top 10 Pharma)</i>	[Grey arrow spanning Research]				
<i>Rotavirus (Mitsubishi Pharma)</i>	[Grey arrow spanning Research]				

5

図 5. 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



7

図 6. Medicago 社の概要 5

表 3. 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)

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	文献
機能性食品	改変dihydrodipicolinate synthase (DHSPS)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RNAi等	イネ	米の製パン性向上	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(OeZIP4)	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	シトクロム 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	人工タンパク質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(AcG21 mod 5'-UTR)等	タバコ(培養細胞)	組換え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数の転写調節因子	チャボイナモリ	抗癌性アルカロイドであるカンボテンシン合成機構の解明	日本・千葉大学等	14
治療薬	(S)-tetrahydroberberine oxidase [(S)-THBO]等	ハナビシソウ	代謝改変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 1(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	デハロゲナーゼ(linB_M1)	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(AtFT)	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	ニチニチソウ由来イリド配糖化酵素	ニチニチソウ	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	リンゴ小型形質在ウイルス(ALSV)を利用したリンゴ育種への応用(開花促進)及びウイルス誘導ゾーンサイレンシング(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
セロロガン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	ニチニチソウ葉より単離したセロロガン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な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	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 7. 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	文献
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	IbOr-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 (CrDGAT2-5)	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)	ブーゲンビリア	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 Wroclaw	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 (GGS) (D-AtGGS)	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 WR11 (GhWR11)	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-hydroxyisoflavone (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	文献
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 enterotoxigenic Escherichia coli B-subunit of the heat-labile toxin (LTB)	植物	Porcine epidemic diarrhea virus vaccine	韓国・Chonbuk National University	53
ワクチン抗原	influenza hemagglutinin H5, rituximab and other proteins	タバコ	large-scale production of recombinant polypeptides by the transient expression-based methods	オーストラリア・The University of Melbourne	54
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	文献
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 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	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 <i>Hcpts1</i> promoter	シュクシヤ	<i>Hedychium coronarium</i> 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	<i>Coptis japonica</i> 3'-hydroxy-N-methylcoumarin 4'-O-methyltransferase (4'OMT)	セリバオウレン	Improvement of benzylisoquinoline alkaloid productivity	日本・医薬基盤研究所, 京都大学	66
治療薬	mussel adhesive protein <i>mefp-5</i>	タバコ	Environmentally friendly adhesives for use in aqueous conditions and in medicine	中国・Northwest University	67
治療薬	amorphaadiene synthase (ADS), artemisinin 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 <i>Catharanthus AP2</i> -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	文献
環境浄化	phosphate transporter protein GmPHT15	ダイズ等	Improving P utilization rate	中国・Chinese Academy of Sciences	74
環境浄化	plant selenium-tolerant and selenium absorption-improving protein	植物	Improvement of Se tolerance and Se absorption	中国・Hefei University of Technology	75
環境浄化	<i>Pteris vittata</i> arsenic resistance-associated protein PvArpp1	植物	Arsenic resistance	中国・Chinese Academy of Sciences	76
環境浄化	acid phosphatase (APase)(LASAP2), <i>Lupinus albus</i> phytase (LASAP3)	タバコ	phosphorus (P) accumulation from organic P in soils	日本・広島大学	77
環境浄化	Co-Ni permease	タバコ	Improved capacity to uptake cobalt	インド・Bhabha Atomic Research Centre	78
環境浄化	<i>Pseudomonas stutzeri</i> nitrous oxide reductase (N(2)OR)	タバコ	Reduction of N(2)O emissions	カナダ・University of Ottawa	79
環境浄化	nitrous oxide reductase	植物	Reduction of global warming	カナダ・University of Ottawa	80
環境浄化	thioredoxin peroxidase 1 (TPX1), thioredoxin peroxidase 2 (TPX2)	タバコ	2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) removal	アルゼンチン・Universidad Nacional de Rio Cuarto	81
環境浄化	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicum</i> MTH1745	イネ等	Heavy metal resistance	中国・Taizhou University, China Jiliang University, Zhejiang University	82
環境浄化	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> -derived old yellow enzyme (OYE3)	トマト等	Degrading organic pollutants	中国・Shanghai Academy of Agricultural Sciences	83
環境浄化	<i>Brevibacillus brevis</i> formaldehyde dehydrogenase (FALDH)	植物	High formaldehyde-absorbing ability and high formaldehyde tolerance	中国・Kunming University of Science and Technology	84
環境浄化	citrate synthase (CS), mutant phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)	タバコ	Enhance AI resistance	中国・Kunming University of Science and Technology	85
環境浄化	mammalian CYP2E1	タバコ	Degradation of low mol. wt. organic pollutants	中国・Hangzhou Normal University	86
NBT	<i>gfp</i> reporter gene encoding for the green fluorescent protein	アブリコット	Marker gene elimination	スペイン・Universitario de Espinardo CEBAS-OSIC	87
NBT	<i>Cre/loxP</i> gene expression cassette等	植物	High-effective deletion of selection marker gene of transgenic plant	中国・不明	88
NBT	<i>Cre/loxP</i> gene expression cassette等	植物	Remove marker gene expression frame	中国・Beijing Agro-Biotechnology Research Center	89
NBT	<i>Cre/loxP</i> gene expression cassette等	植物	Deleting antibiotic marker gene of transgenic plants	中国・Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences	90
NBT	<i>Cre/loxP</i> gene expression cassette等	植物	Deleting selectable marker genes at low temperature	中国・Beijing Forestry University	91

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%)

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)  
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」  
分担研究報告書(平成24年度)

ゲノム編集動物由来食品の安全性評価に関する研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

研究要旨:

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術は、新しい農畜産物の育種技術として注目されている。そこで本研究では、本技術を用いて今後開発される食品を想定し、食品としての安全性を担保する上で必要な科学的な要件を整理することを目的とした。平成24年度は、ゲノム編集技術を用いたアレルゲンの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏卵をモデルケースにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの設計並びに構築、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件を検討した。その結果、対照として利用する緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)とアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの設計と構築を終了させた。また対照である GFP 破壊人工ヌクレアーゼエフェクターを用いて導入条件を決定し、GFP 発現胚性幹(ES)細胞において、GFP 遺伝子に変異が導入され GFP のノックアウトが観察された。さらにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの設計と構築を行なった。

協力研究者

堀内 浩幸 国立大学法人広島大学 大学院  
生物圏科学研究科 教授

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方遺伝子組換え動物では、水域における魚類において流通の許可待ちの段階までできている。その安全性評価や対策が進められている。しかし陸域の遺伝子組換え動物は、現在、研究段階であるものが多く、今後5-10年後の実用化を目指すものが多い。

一方、最近、遺伝子の組換えを伴わないゲノム編集という技術が開発され、次世代の遺伝子

改変技術として注目されている。ゲノム編集技術では、最初に DNA の塩基配列に特異的に結合する zinc-finger を用いる方法が報告された(図1, A)。zinc-finger は、約3塩基を認識する約30残基からなるペプチドを3-6個連結したものである。連結した zinc-finger には、その末端にヌクレアーゼである Fok I をつけ(人工ヌクレアーゼ)、これを zinc-finger nuclease (ZFN) として DNA の2本鎖で標的領域を挟み込むように、2種の ZFN が準備される。この2種の ZFN を細胞内に導入すると、zinc-finger のペプチドが標的領域を挟み込むようにゲノム DNA に結合し標的領域に Fok I が作用し、ゲノム DNA の二重鎖切断(DSB)が誘導される。DSB は、自然界でも、例えば紫外線や放射線の影響により起こる現象であり、生体にとっては生死に関わる問題である。そこで、細胞は非同末端連結という修復機構を有し、この切断面

を修復する能力を有している。ところが、細胞は極稀にこの修復過程で塩基の欠失や挿入といったエラーを起こしてしまう場合が生じてしまう(図1, C)。このエラーを利用した遺伝子改変技術がゲノム編集技術と呼ばれるものである。例えば、このエラーがゲノム上の翻訳領域で起こった場合、そのゲノム上にコードされた遺伝子の翻訳産物は正常なものとは異なるかもしくは翻訳されなくなり、これがゲノム編集技術を用いた新しい遺伝子のノックアウト技術となる。しかしながら、ZFNは標的配列に特異的に結合する zinc-finger array の構築が煩雑であり、いろいろな生物種に対応した機能的な ZFN を作製することが困難であった。

この問題点を克服した技術が、次世代の人工ヌクレアーゼである transcription activator-like (TAL) effector nuclease (TALEN) である(図2, B)。TALENは、植物病原細菌キサントモナスの TAL エフェクターに由来する人工ヌクレアーゼであり、その DNA 結合ドメインは、1 リピート 33-35 残基が 1 塩基を認識して結合する。これにより、ZFN よりも分子的に大きい人工ヌクレアーゼとなるが、構築するリピートは、完全なモジュール性を示すことが明らかとなっており、これによりいろいろな塩基配列に対応した TALEN を比較的容易に作製できるようになっている。TALEN の開発以降、いろいろな細胞や生物でこの技術を用いたゲノム編集生物が作製できるようになり、遺伝子組換えに変わる新規の遺伝子改変生物の作出が加速している。

そこで本研究では、TALEN の技術を用いたゲノム編集動物が5年以内に実用化されることを想定し、そこから得られる食品の安全性の評価基準を考える上で必要な科学的な知見を整理することを目的とした。

## B. 研究方法

本研究では、今後想定されるゲノム編集技術を用いた食品のアレルゲンノックアウト技術を念頭に、鶏卵をモデルケースに選択し、本年度は GFP と鶏卵のアレルゲンであるオボムコイドの TAL エフェクターの設計と構築を行なった。

### 1) GFP 破壊 TAL エフェクターの設計と構築

ニワトリの多能性幹細胞を標的として、ゲノム編集技術を導入するために、TAL エフェクターの導入条件とその効果を視覚的にまた既存の研究材料が利用できる利点から、まず GFP 破壊 TAL エフェクターの設計と構築を行なった。

GFP 破壊 TAL エフェクターの設計では、TAL エフェクターの構築キットを提供している Addgene のエフェクター配列検索サイトを利用し、標的領域の絞りこみを行なった。

次に、標的領域に対して得られたエフェクター配列(3条件を選択)し、Addgene の Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit を用いて、モジュールの構築、アッセムブリ、Fok I の導入を行なった。作製した GFP 破壊 TAL エフェクター発現ベクターは、right および left エフェクター発現ベクターを1セットとして3セット準備した。エフェクターセットは、標的領域を人工的に組込んだ HEK293T 細胞を用いた single-strand annealing (SSA) assay により、ルシフェラーゼの発現活性を指標に評価した。

### 2) GFP 破壊 TAL エフェクターの導入条件の検討

SSA assay により高活性が得られた GFP 破壊 TAL エフェクターは、GFP 発現ニワトリ ES 細胞を用いて導入条件の検討に使用した。エフェクターの導入には、Gene Pulser XLII システムを使用し、2種の導入条件(通常の ES 細胞への遺

伝子導入条件とヒト iPS 細胞への導入条件) を検討した。

3) GFP 破壊 TAL エフェクターによる変異導入  
2 種の条件で GFP 破壊 TAL エフェクターを導入した GFP 導入ニワトリ ES 細胞は, GFP 遺伝子の発現解析並びにゲノム解析に供試し, ゲノム編集による遺伝子のノックアウト効果の解析を行なった。

4) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの設計と構築

鶏卵のアレルゲンであるオボムコイドの TAL エフェクターの設計と構築を「B. 研究方法」の 1) の GFP の場合と同様に行なった。

## C. 研究結果

1) GFP 破壊 TAL エフェクターの設計と構築

GFP 破壊 TAL エフェクターの設計と構築では, 図 2 に示した下線の塩基配列の領域に TAL 結合領域が設計できた。5' 側の下線の塩基配列部分を left のエフェクターとし, 3' 側の下線の塩基配列部分を right のエフェクターとした。またこの 2 つのエフェクターに挟まれる領域を FoK I 標的領域とした。その他, FoK I 標的領域は, 同一で TAL 結合領域をエフェクター配列検索サイトの情報に基づき, そらに 4 配列 (2 セット) 設計した。設計した TAL エフェクター配列は, Addgene の Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit を用いてモジュールのアッセンブリを行い, 最終的に Fok I を結合させた 6 種, 3 セットの GFP 破壊 TAL エフェクターベクターの構築を完了した。GFP 破壊 TAL エフェクターベクターは, 標的となる GFP 配列を人工的に合成し, 2 分割したルシフェラーゼ遺伝子の間にこの標的配列をもつ HEK293T 細胞を作製し, SSA assay に供試した。その結果, 図

2 に示した標的配列をもとに作製した GFP 破壊 TAL エフェクターベクターセット 1 種で高いルシフェラーゼ活性の発現 (対照値の 2 倍) が得られた (結果は示していない)。

2) GFP 破壊 TAL エフェクターの導入条件

SSA assay で高活性が得られた GFP 破壊 TAL エフェクターベクターセット 1 種は, これまでにニワトリ ES 細胞への遺伝子導入で実績のある Gene Pulser XLII システムを用いて導入実験に供試した。導入条件は, 通常の ES 細胞への遺伝子導入条件とヒト iPS 細胞への導入条件の 2 種で left 及び right のエフェクター発現ベクターを GFP 発現ニワトリ ES 細胞に導入した。エフェクターを導入したニワトリ ES 細胞は, 支持細胞上に播種し, 培養 3~4 日後に GFP の蛍光観察とゲノム DNA の抽出を行なった。

3) GFP 破壊 TAL エフェクターによる変異導入

GFP 破壊 TAL エフェクターによる GFP 発現ニワトリ ES 細胞の変異導入試験では, 導入後 3 日後から GFP の発現がない ES 細胞のコロニーの出現が観察された (図 3)。そこでこれらのコロニーを顕微鏡下でマイクロピペットにより回収し, ゲノム DNA を抽出後, 核酸の変異が予想される領域を増幅できるように設計した PCR プライマー対を設計し, PCR 後アガロースゲル電気泳動により解析した。その結果, 通常を増幅バンドである約 280 bp のバンド以外に, ゲノム編集後に見られるシフトバンドである約 300 bp の位置にも増幅バンドが確認された (図 4)。

4) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの設計と構築

鶏卵中のアレルゲンタンパク質であるオボムコイドを標的に, オボムコイド破壊 TAL エフェク



ターの設計と構築を行なった。エフェクター配列検索サイトの情報に基づき、オボムコイドの遺伝子座領域のうち開始コドンがあるエクソン1で検索し、3セットのオボムコイド破壊 TAL エフェクターの設計を行い、「B. 研究方法」の1)の GFP の場合と同様に TAL エフェクターの構築を行なった。構築した TAL エフェクターは、SSA assay に供試したところ、シフェラーゼ活性の発現を確認することができなかった。そこで次にエクソン2で検索したが、エクソン2はコード領域が短く検索できないことがわかった。最終的に、エクソン3の領域で TAL エフェクターの設計を行い、3セットのオボムコイド破壊 TAL エフェクターの構築を行なったところ、SSA assay において、1種で高いシフェラーゼ活性の発現（対照値の2倍）が得られた（結果は示していない）。

#### （倫理面への配慮）

本研究で実施している組換え DNA 実験は、我が国が定める「生物の多様性確保に関する法律」を順守し、協力研究者が研究を実施する広島大学において規定されている「広島大学組換え DNA 実験安全管理規則」に従い適正に研究計画を立案し、機関承認を得ている。また実験動物の使用に関しては、同じく同機関が定める「広島大学動物実験実施規則」に従い研究計画書（承認番号 C09-1）を提出するとともに、本実施規則に従い適切に実験動物を使用している。

#### D. 考察

2010年に初めて、ZFNを用いたゲノム編集技術が報告されて以降、続いてTALENの技術開発が行なわれ、いろいろな培養細胞や生物種でこの技術を用いた遺伝子改変がおこなわれるようになってきた。2013年には、多能性幹細胞を用いた遺伝子組換え技術が進まないラットにおいて、メラニ

ン色素合成遺伝子をTALENにより破壊した人為的なアルビノラットも作出されている。人工ヌクレアーゼの利点は、細胞内に導入した人工ヌクレアーゼの発現でゲノムDNAに変異を導入できる点であり、遺伝子を組換える必要がない点である。即ちこれは、ノックアウトやノックインなど多能性幹細胞の樹立が必須であった技術から培養細胞でない受精卵への適応を可能とし、ほぼマウスのみで可能であった遺伝子組換え技術を微生物、植物からさまざまな動物種への適応を可能にしている。よって今後、ゲノム編集技術を活用した新開発バイオテクノロジー応用食品が比較的短期間に研究、開発されていくことが予想される。

現状、ゲノム編集技術を活用したノックアウト技術は、ナチュラルオカレンス扱いであり、組換えDNA実験を規制するカルタヘナ法適応外であるが、この技術を活用した応用食品は、現行の食品安全委員会で検討される事項である。そこで本研究では、その科学的な評価基準の設定に必要な要件の整理を目的にモデルケースの構築をおこなった。

ゲノム編集技術を活用した応用食品の開発では、アレルギーのノックアウトが非常に現実的な開発項目であり、鶏卵はその最も身近な対象食品である。しかし、未だ鳥類ではゲノム編集技術の導入は進んでおらず、まずゲノム編集技術が鳥類細胞で可能かどうかを試験した。その結果、GFP発現ニワトリES細胞を用いた実験では、ゲノム編集が鳥類細胞を標的にした場合でも他の生物種の場合と同様に十分に機能することが明らかとなった。今後は、ゲノムの編集領域においてどのような変異が誘導されているかモデルケースを用いて明らかにする必要がある。また本研究で構築したオボムコイド破壊TALエフェクターの変異導入についても、ニワトリES細胞を用いた評価が必要である。

今後は、ますます技術の進展と応用が拡散することが予想されるゲノム編集技術について、さまざまなモデルケースを想定するとともに、この技術導入により生産される応用食品の安全性評価をいかに科学的に整理していくかが大きな課題となる。

## E. 結論

平成 24 年度は、ゲノム編集技術を用いて可能なアレルゲンの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏卵をモデルケースにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの設計並びに構築、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件を検討した。その結果、対照として利用する緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)とアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの設計と構築を終了させた。また対照である GFP 破壊人工ヌクレアーゼエフェクターを用いて導入条件を決定し、GFP 発現胚性幹(ES)細胞において、GFP 遺伝子に変異が導入され GFP のノックアウトが観察された。さらにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの設計と構築を行なった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 堀内浩幸, アレルゲンフリー遺伝子組換え鶏の作出, 日本植物細胞分子生物学会 2012 公開シンポジウム, 2011 年 11 月 3 日 (東京)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

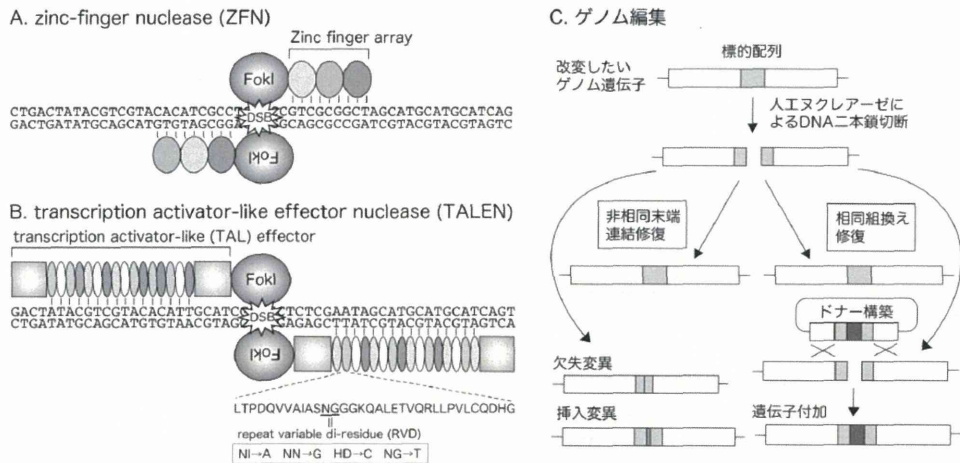


図1 ゲノム編集技術に活用されるZFN とTALEN並びその作用機序

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCT  
 GGACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG  
 CCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTG  
 CCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTA  
 CCCCACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG  
 TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAG  
GTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT  
 CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACA  
 ACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TCAAGATC  
 CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC  
 CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC GACAACCACTACCTGAGCACCCAGT  
 CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTC  
 GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

図2 GFP配列と構築したTALエフェクター結合領域 (下線)

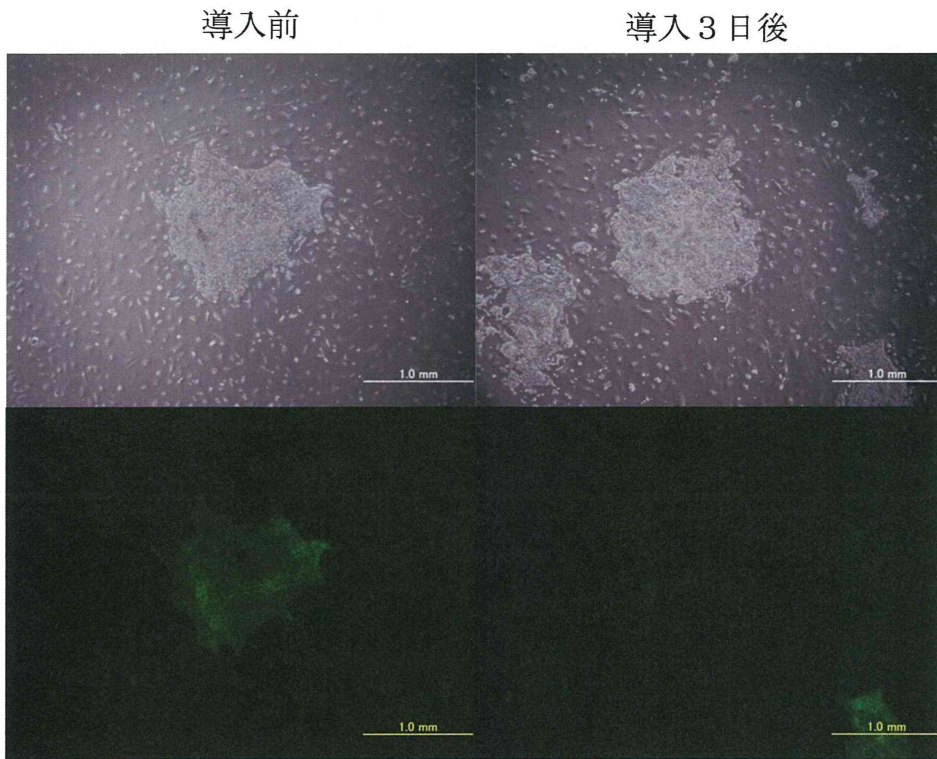


図3 GFP破壊TALエフェクター導入ES細胞におけるGFPの発現



図4 変異導入確認のためのゲノムPCR電気泳動

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)  
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」  
分担研究報告書(平成24年度)

組換え魚の安全性に関する研究

研究分担者 名古屋 博之 独立行政法人水産総合研究センター 増養殖研究所  
養殖技術部育種グループ グループ長

研究要旨:

米国において成長ホルモン(GH)遺伝子を導入した遺伝子組換え大西洋サケはFDAの審査が終了し、パブリックコメントを求めている状況になった。また、その他の国でもコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚を作出し、一部では食用として利用することを想定している。遺伝子組換え魚の安全性に関する資料はAquaBounty Technologies社がFDAの審査を受ける際に提出した資料が公開されているだけで、その他の魚類で安全性に係わる資料が公開された例はない。そこで、日本で開発されているGH遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴを実験動物として、安全性に関する研究を行う。本年度は現在用いている遺伝子組換えアマゴに導入した配列にベクター領域が含まれていることから、遺伝子組換え大西洋サケと同様にベクター領域を除去したプロモーターとGH遺伝子だけの配列をアマゴにマイクロインジェクションして新しい系統の作出を試みるとともに、未だ明確な報告がなされていないGH遺伝子組換え魚の高成長とエネルギー生産系に関するシステムを脂質代謝の視点から解析することを目的とした。さらに、GH遺伝子組換え魚でみられる臓器の形態形成異常に関連する遺伝子発現のプロファイルを明らかにすることも目的とした。その結果、本研究で行った網羅的イルミナ解析によって、GH transgenic アマゴは肝臓での脂肪酸の異化作用を活発にさせることで、高成長の維持に必要なエネルギーを生産していることが明らかとなった。また、GH transgenic アマゴ肝臓の形態変化には微小管繊維の減少や安定性の低下が関与していることが示唆された。また、現在アメリカで行われている遺伝子組換え大西洋サケの審査における状況はFDAによって求められた環境アセスメントを行った結果を提出し、その審査も終了し、最終的なパブリックコメントを求めている、当初60日間としていた期間が、更に延長されている状況である。

協力研究者

森 司 日本大学生物資源科学部 教授

A. 研究目的

米国において成長ホルモン(GH)遺伝子を導入した遺伝子組換え大西洋サケはFDAの審査が終了し、パブリックコメントを求めている状況になった。また、その他の国でもコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚を作出し、一部では食用として利用することを想定している。遺伝子組換え魚の安全性に関する資料はAquaBounty Technologies社がFDAの審査を受ける際に提出した資料が公開されているだけで、その他の魚類で

安全性に係わる資料が公開された例はない。そこで、日本で開発されているGH遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴを実験動物として、安全性に関する研究を行う。

B. 研究方法

1. 遺伝子組換えアマゴの作出

米国で申請中の遺伝子組換え大西洋サケに導入されている遺伝子配列にはベクター領域は挿入されていない。そこで、ベクター領域の入っていない遺伝子組換え魚を作出するため、ベクター部分を取り除いたベニザケメタロチ

オネインプロモーターとベニザケ成長ホルモン遺伝子をつなげた配列を準備し、200ng/ $\mu$ l になるように調整し、アマゴ受精卵に $\mu$ インジェクションした。

## 2. 遺伝子組換えアマゴの肝臓における脂質代謝の解析

導入遺伝子がホモに入っている遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴ(コントロール)のそれぞれ 5 検体ずつの肝臓から抽出した mRNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し、そのライブラリーを Illumina GA IIx sequencer で解析した。さらに、ガスクロマトグラフィー用いて、GH 遺伝子組換えアマゴとコントロール肝臓の脂肪酸分析を行った。

## 3. 遺伝子組換え魚の情報収集

文献やインターネットを用いて、遺伝子組換え魚の開発状況について収集を行った。

## C. 研究結果

### 1. 遺伝子組換えアマゴの作出

2 組のアマゴの受精卵、計 352 粒を用いてベニザケメタロチオネインプロモーターの下流にベニザケ GH ゲノム遺伝子をつなげた配列を 200ng/ $\mu$ l になるようにリバース PBS で調整して $\mu$ インジェクションした結果、211 尾がふ化した。しかし、疾病と思われる原因で斃死が多く、現在 5 尾を飼育中である。

### 2. 遺伝子組換えアマゴの肝臓における脂質代謝の解析

肝臓から抽出した mRNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し、解析した結果、導入遺伝子がホモの状態に挿入されている遺伝子組換えアマゴ (Tg/Tg) は約 130 万、非遺伝子組換えアマゴ (コントロール) は約 160 万リードの遺伝子断片がシークエンスされた。そして、解析された塩基配列は NCBI に登録されている Atlantic salmon (*Salmo salar*) と Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) の遺伝子配列とのマッピングを行い、Tg/Tg とコントロールの肝臓における約 8000 種類の遺伝子に関する発現量変化を比較することができた。

次に、イルミナ解析で得られたデータから脂質代謝に関連する遺伝子の発現変化を調べた。その

結果、Tg/Tg の肝臓では脂肪酸の伸長や修飾に関与する  $\Delta 6$ FAD、delta 9 desaturase、elongation of long chain fatty acids 5b、thioesterase-B 遺伝子の発現低下がみられた。このことから、GH transgenic の肝臓では脂肪酸組成に変化があることが推測された。

そこで、ガスクロマトグラフィー用いて、GH transgenic アマゴ (Tg/Tg、導入遺伝子がヘテロの状態に挿入されているアマゴ (Tg/+)) とコントロール肝臓の脂肪酸分析を行った。その結果、GH transgenic とコントロール間で総脂肪酸量に殆ど差はなかったが、GH transgenic の肝臓では飽和脂肪酸 (SFA) やモノ不飽和脂肪酸 (MUFA) の割合が減少し、PUFA の割合が増加していることが明らかとなった。このことから、GH transgenic の肝臓では脂肪酸の異化反応が活発になっていることが予測された。そこで、脂肪酸の異化反応に関連する遺伝子の発現変化をイルミナ解析のデータから調べた結果、脂肪酸の生分解や生合成の代謝中間体である脂肪酸-acyl CoA の合成に関与することが知られている Long-chain-fatty-acid-CoA ligase1 (ACSL1) と分岐脂肪酸の  $\beta$  酸化に関与する Acyl-CoA oxidase 3 遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。合成された脂肪酸-acyl CoA は  $\beta$  酸化によって Acetyl-CoA となってエネルギー産生に利用されるか、トリアシルグリセロール (TAG) の形で蓄積される方向に代謝される。血清 TAG を測定した結果、GH transgenic ではコントロールに比べ有意に低下 ( $P < 0.05$ ) しており、さらにはケトン体として知られる 3-hydroxybutyric acid (3-HB) が GH transgenic の肝臓では増加していることがメタボローム解析によって明らかとなった。

その一方で、GH transgenic では魚類にとって重要なエネルギー源である脂肪組織が著しく減少していることと、GH transgenic の肝臓で 3-HB が増加していることから、飢餓の状態にある可能性が示唆された。そこで血清グルコースを測定した結果、GH transgenic ではコントロールに比べ有意に低下 ( $P < 0.05$ ) していた。また、イルミナ解析の結果から、Tg/Tg の肝臓では飢餓応答遺伝子である glucose-regulated protein 78kDa 遺伝子の発現が増加し、Mid1 interacting protein 1 (Midlip1) 遺伝子の発現が低下していた。Midlip1 は de novo 脂肪酸合成にも関与するため、

GH transgenic の肝臓では SFA や MUFA などの脂肪酸合成経路が抑制されていることも示唆された。

### 3. 遺伝子組換え魚の情報収集

マスコミ報道によれば 2012 年 12 月 21 日 FDA は、AquaBouty Technologies 社の遺伝子組換え大西洋サケに対する環境影響評価を発表し、仮承認を行った。今後 60 日間のパブリックコメントの手続きを経て承認することになる、としていたが、現在、パブリックコメントを求める期間が延長されている。

## D. 考察

肝臓における脂質代謝の解析結果から GH transgenic の肝臓は脂肪酸を蓄積するよりも、 $\beta$ 酸化を活発にさせて高成長の維持に必要なエネルギーの生産を増加させていることが示唆された。

## E. 結論

本研究で行った網羅的イルミナ解析によって、GH transgenic アマゴは肝臓での脂肪酸の異化作用を活発にさせることで、高成長の維持に必要なエネルギーを生産していることが明らかとなった。また、GH transgenic アマゴ肝臓の形態変化には微小管繊維の減少や安定性の低下が関与していることが示唆された。

遺伝子組換え大西洋サケはすべての審査が FDA で終了し、パブリックコメントを求めている状況である。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 正岡・岡本・名古屋・荒木・藤原・小林 (2012)、遺伝子組換え生物の検査に向けたサケ科魚類発眼卵からの DNA 抽出法の開発. DNA 鑑定、4、19-28.

2. Sugiyama, Tagenaga, Kitani, Yamamoto, Okamoto, Masaoka, Araki, Nagoya, Mori (2012). Homozygous and heterozygous GH transgenesis alters fatty acid composition and content in the liver of Amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*). *Biology Open*, 1(10), 1035-1042.

### 2. 学会発表

無し

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

1) 名古屋博之、成長ホルモン遺伝子組換えアマゴの作出. 「遺伝子組換え食品の最前線」平成 24 年 11 月 3 日、日本植物細胞分子生物学会

## 組換え微生物の安全性に関する研究

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長

### 研究要旨:

組換え微生物を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え乳酸菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を行う。

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの *Invasin* を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜を用いて、評価を行った。大腸菌では、*Invasin* を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。今回の細胞を用いた評価系が示した結果は、動物やヒトの M 細胞でも実際に同様に起こっているかは大変興味深く、今後更なる検討が必要と思われる。

### 協力研究者

梶田 和彌 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部

する腸管上皮細胞に存在する M 細胞に関する検討を中心に行った。平成 24 年度には、エルシニアの侵入因子である *Invasin* を発現する遺伝子組換え大腸菌および乳酸菌を用いて（これらのモデル組換え体とその宿主菌の挙動を比較しながら、分子レベルでの比較検討を行う。動物愛護の精神から、動物による評価を最小限に留めるため、免疫系への影響の概要については継代細胞を用いた評価系を作成し、その細胞評価系を用いて、遺伝子組換えモデル乳酸菌と宿主乳酸菌での免疫への影響の違いについて検討した。

### A. 研究目的

モデル組換え体を作成し組換え微生物で特に重要と思われる安全性に関する知見を集積し、この検討により得られた有用と思われる安全性評価手法を提供する。これまでの研究により、遺伝子組換え乳酸菌の免疫系への影響は、組み込む遺伝子産物単独の性質を必ずしも反映しないことが示されており、用いた宿主乳酸菌と挿入遺伝子産物の組合せにより多様な免疫影響を示されており、本来の挿入遺伝子産物のもつ免疫影響とは異なった影響が観察されることがある。平成 24 年度はこの点について重点的に検討を行った。

免疫系に影響を及ぼすことが期待される遺伝子を組み込み、モデル組換え体を作成する。消化管からの免疫抗原の取り込みに重要な働きを

### B. 研究方法

1. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への大腸菌、乳酸菌の接着菌数の測定

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBel 細胞を 24 穴プレートに播種後、2 週間培養し単層膜を形成させた。



エルシニアの侵入因子である Invasin を発現する遺伝子組換え大腸菌 (*Escherichia coli* JM109) および乳酸菌 (*Lactobacillus casei* IGM393)、コントロールとしてそれらの宿主菌を C2BBe1 単層膜に  $10^7$  個添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。単層膜を洗浄後、界面活性剤により細胞を破碎、寒天培地に接種し CFU により単層膜への接着菌数をそれぞれ算出した。

## 2. ヒト腸管モデル細胞 C2BBe1 単層膜が取り込む大腸菌、乳酸菌の菌数測定

C2BBe1 単層膜を調整後、各細菌を添加し 1 時間インキュベートした。単層膜を洗浄後、ゲンタマイシンを含む培地を加え、さらに 37 °C で 3 時間インキュベートし細胞外に残る細菌を取り除いた。単層膜を洗浄後、界面活性剤により細胞を破碎、寒天培地に接種し細胞が内部に取り込んだ菌数を CFU により算出した。

## 3. ヒト腸管モデル細胞 C2BBe1 単層膜の組換え大腸菌の取り込みに対する抗 Invasin 抗体の影響の検討

Invasin を発現する組換え大腸菌に、異なる濃度の抗 Invasin 抗体を添加し、室温で 30 分インキュベートした。

C2BBe1 単層膜に調整した菌を抗体と共に添加し、前述の方法と同様に細胞内に取り込まれた菌数を CFU により算出した。

## 4. エンドサイトーシス阻害剤による組換え大腸菌の取り込み経路の検討

C2BBe1 単層膜にエンドサイトーシス阻害剤であるクロロプロマジン、メチルベータシクロデキストリン、ナイスタチンをそれぞれ添加し、37 °C で 20 分間インキュベートした。

前述の方法と同様に C2BBe1 単層膜に調整した菌を添加、細胞内に取り込まれた菌数を CFU により算出し、エンドサイトーシス阻害剤の影響を検討した。

## 5. 海外の腸内細菌叢と遺伝子組換え微生物研究に関する情報収集

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムに参加して、腸内細菌叢に関する最新の研究成果並びに腸内細菌叢を介した安全性に関する研究動向について情報収集並びに情報交換を行った。

### C. 研究結果

#### 1. ヒト腸管モデル細胞 C2BBe1 単層膜への組換え大腸菌、乳酸菌の接着菌数

C2BBe1 単層膜を用いて組換え大腸菌および乳酸菌の接着菌数を測定した。大腸菌の場合、Invasin 発現株では非発現株に比べ約 2 倍の接着菌数の増加が確認された (図 1)。一方、乳酸菌では Invasin 発現株と非発現株の接着菌数に有意な差は確認されなかった。

#### 2. ヒト腸管モデル細胞 C2BBe1 単層膜が取り込んだ大腸菌、乳酸菌の菌数

C2BBe1 単層膜による各細菌の取り込み菌数の比較を行った。大腸菌の場合、非組換え株では細胞内部への取り込みは確認できなかった。一方、Invasin 発現株では細胞内部へ取り込まれた菌数はおおよそ  $10^2$  個であった。乳酸菌の場合、組換え、非組換えいずれも細胞内部への取り込みが確認できたが、取り込まれた菌数に有意な差は見られなかった (図 2)。

#### 3. 抗 Invasin 抗体処理が C2BBe1 単層膜の組換え大腸菌の取り込みに及ぼす影響

Invasin 発現大腸菌に抗 Invasin 抗体を添加し、細胞による取り込みに対する Invasin の影響を検討した。

C2BBe1 単層膜が取り込んだ組換え大腸菌の菌数は、抗体濃度依存的に減少した (図 3)。

#### 4. C2BBe1 細胞が組換え大腸菌を取り込む経路の検討

各種エンドサイトーシス阻害剤で処理を行った

C2BBel 単層膜に組換え大腸菌を加え、取り込み菌数の減少を指標に取り込み経路の検討を行った。

ナイスタチンを添加した単層膜では、エンドサイトーシス阻害剤を添加しないコントロール単層膜に比べ約 3 割の取り込み菌数の減少が確認された。また、クロルプロマジン添加をした場合、コントロールに比べおよそ 9 割の取り込み菌数の減少が確認された (図 4)。

## 5. 海外の腸内細菌叢と遺伝子組換え微生物研究に関する情報収集

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムでは、腸内細菌叢がヒトの健康に多大な影響を与えることを示す最新の研究が多数報告されていた。細胞レベルの研究から、ヒトにおける健康への影響に関する多様な研究成果が発表されていた。

### D. 考察

Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBel 細胞の単層膜を用いて、エルシニアの侵入因子である Invasin を発現する大腸菌、および乳酸菌組換え体を作成し、それらの機能評価を行った。この実験では、ヒト腸管上皮由来である C2BBel 細胞のもつ M 細胞様活性を利用し、腸管内の免疫抗原の取り込まれ方に関する評価を行うことを想定している。

C2BBel 単層膜への接着菌数、単層膜による取り込み菌数は大腸菌と乳酸菌では異なる結果となった。大腸菌では Invasin 発現の影響が見られ、Invasin を発現する大腸菌は接着菌数が有意に増加した (図 1)。また、単層膜内に取り込まれた菌数は、非組換え大腸菌が取り込まれていないのに対し、Invasin 発現大腸菌では顕著な取り込み菌数の増加が見られた (図 2)。一方、乳酸菌では接着菌数、取り込み菌数共に Invasin の発現の有無による差が見られなかった (図 1、2)。乳酸菌は大腸菌と細胞表面の構造が大きく異なることから、挿入遺伝子産物である Invasin の発現方法や乳酸菌が発現する Invasin の活性を含め今後の

検討が必要ではあるが、グラム陽性菌の乳酸菌 *L. casei* とグラム陰性菌である大腸菌にそれぞれ同一の遺伝子を挿入したところ、それぞれの組換え体の細胞への取り込みに関して異なる結果が得られたことは非常に興味深い。

C2BBel 単層膜を用いた場合、大腸菌では Invasin の発現による細胞内部への取り込みに影響が見られたことから、次にその取り込み機構の検討を行った。まず、Invasin 発現大腸菌の取り込み菌数の増加が Invasin に依存するかを確認するため、抗 Invasin 抗体を用いた阻害実験を行った。その結果、Invasin 抗体の濃度の上昇に伴い、単層膜内部へ取り込まれる菌数が減少した (図 3)。このことから単層膜内部への取り込み菌数の増加は遺伝子組換えにより発現させた Invasin 依存的事であることが示唆された。

C2BBel 単層膜による組換え大腸菌の取り込み菌数の増加に遺伝子組換えにより発現させた Invasin の影響が確認されたことから、次にその取り込み経路の検討を行った。本研究では特に飲作用を中心に、クラスリンあるいはカベオリンを介したエンドサイトーシス、およびマクロピノサイトーシスを評価した。

カベオリン依存的エンドサイトーシス阻害剤であるメチルベータシクロデキストリン添加群では組換え大腸菌の取り込み菌数の減少は見られなかった (図 4)。マクロピノサイトーシス阻害剤であるナイスタチン添加群では、阻害剤非添加群に比べ 3 割程の取り込み菌数の減少が確認された。そのため組換え大腸菌の一部はマクロピノサイトーシスにより細胞内部へ取り込まれていることが予想された。

クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジンは取り込み菌数への影響が最も大きく、阻害剤非添加群に比べ約 9 割の取り込み菌数の減少が確認された。Invasin を発現する組換え大腸菌を C2BBel 細胞が内部へ取り込む経路はクラスリンを介した機構が主であることが示唆された。

以上のことからエルシニアの侵入因子である Invasin は、C2BBel 単層膜のクラスリン依存的エ

ンドサイトーシスを促進し、取り込み菌数を増加させる機能を大腸菌に付与することが示唆された。乳酸菌に発現させた Invasin では、細胞への取り込みに影響を与えず、何故か大腸菌組換え体で示された取り込みメカニズムが働いていない。宿主により同一の抗原が異なった結果を示す理由については不明であり、更なる検討が必要と思われる。

また、今回の結果から、Invasin を発現する組換え大腸菌の機能評価に C2BBel 単層膜の利用が有用であることが示された。今回の実験により、C2BBel 細胞が Invasin を発現する組換え大腸菌を内部へ取り込む経路はクラスリンを介した機構が主であるが、このメカニズムは動物やヒト腸管 M 細胞で実際に起こっているかどうかについては、今後更なる検討を行う必要があると思われる。

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムに参加し、遺伝子組換え微生物に関する情報収集を行った。サイトカイン IL-10 を産生する乳酸菌が、マウスの実験や慢性腸疾患のヒトへの治験で劇的な治療効果を示したにもかかわらず、実用化に関してはなかなか進展していない状況について情報収集を行った。ヨーロッパでも遺伝子組換え微生物を生きたまま利用することについてはコンセンサスが得られておらず、今後の方針は未だはっきりしていないようである。生きたままの遺伝子組換え微生物の利用に関しては、環境への放出の問題が最も懸念されているようである。

## E. 結論

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M 細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの Invasin を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜を用いて、評価を行った。大腸菌では、Invasin を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。今回の細胞を用いた評価系が

示した結果は、動物やヒトの M 細胞でも実際に同様に起こっているかは大変興味深く、今後更なる検討が必要と思われる。

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムに参加して、現在ヨーロッパではこの分野の研究が非常に熱心に行われており、腸内細菌叢が人への健康に強く関わっていることが分子レベルで明らかにされていた。遺伝子組換え微生物の利用については、環境放出の問題が最も重要であると捉えられているようである。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

### 2. 学会発表

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

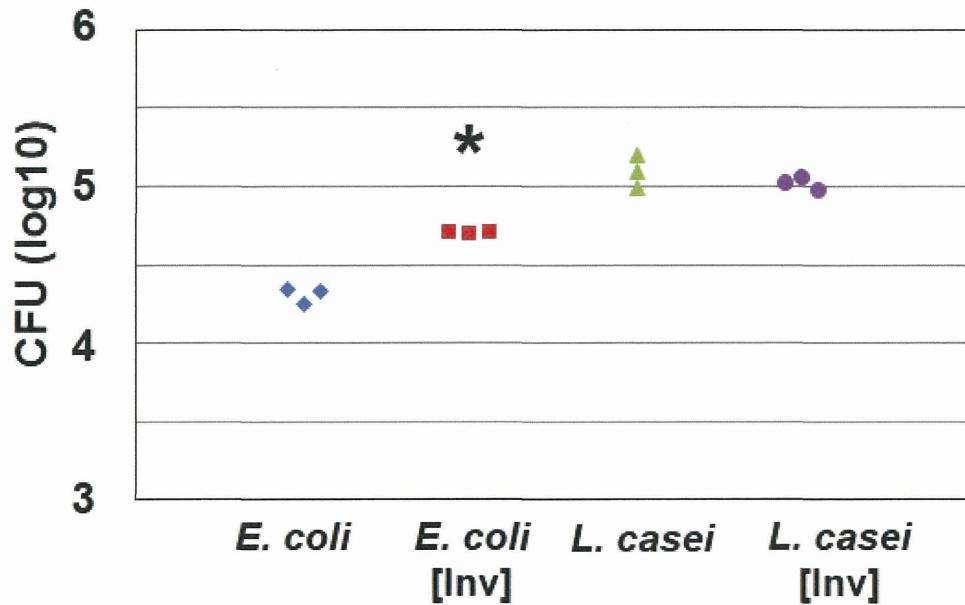


図1 C2BBel 単層膜への接着菌数

約2週間24穴プレートで培養したC2BBel単層膜に各細菌を $10^7$ 個添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした際の接着菌数をCFUにより算出した。(\* $p < 0.01$ )

◆は非組換え *Escherichia coli* JM109、■は Invasin を発現する組換え大腸菌、▲は非組換え *Lactobacillus casei* IGM393、●は Invasin 発現組換え乳酸菌。

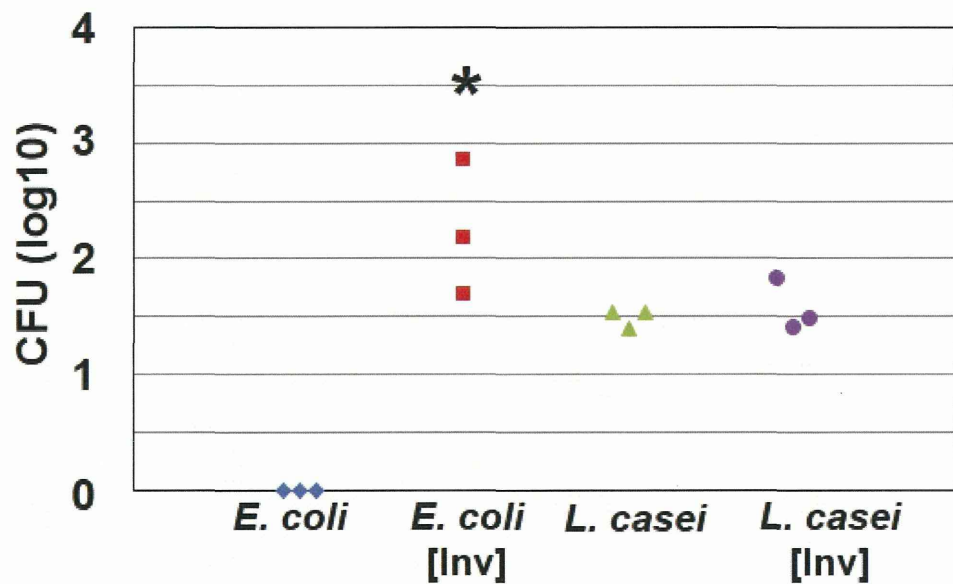


図2 C2BBel 単層膜による取り込み菌数

約2週間24穴プレートで培養したC2BBel単層膜に各細菌を $10^7$ 個添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベート後、ゲンタマイシンを添加し細胞外に残る細菌を取り除き、細胞内に取り込まれた菌数をCFUにより算出した。(\* $p < 0.01$ )

◆は非組換え大腸菌、■は Invasin を発現大腸菌、▲は非組換え乳酸菌、●は Invasin 発現乳酸菌。