

201426005B

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

平成24-26年度 総合研究報告書

(H24-食品-一般-005)

研究代表者 手島 玲子

平成27年3月

目次

I. 総括研究報告書

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	1
手島 玲子	

II. 分担研究報告書

1. 遺伝子組換え生物の動向調査	
手島 玲子	
(i) 薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査研究	9
(ii) ゲノム編集動物由来食品の安全性評価に関する研究	13
2. 組換え魚の安全性に関する研究	17
名古屋 博之	
3. 組換え微生物の安全性に関する研究	27
五十君 静信	
4. 遺伝子組換え食品の国民受容に関する研究	41
今村 知明	
5. 遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入の ための調査研究(1)(2)	137
小関 良宏	
6. バイオテクノロジー応用食品のメタボローム解析	147
太田 大策	
7. 遺伝子組換え植物のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析	169
手島 玲子	
8. 組換え生物の検知技術の開発	179
近藤 一成	
9. 承認組換え生物の検知技術の開発	207
野口 秋雄	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	219
別刷り	

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

研究代表者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部部長

研究要旨

生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている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を遂行するため、1主任研究者、7分担研究者を中心として、16機関にわたる研究グループを組織した。(1)多様化、複雑化する新機能遺伝子組換え食品の安全性評価に対応するためのオミックス手法の整備、定量解析手法の開発並びに規格への反映化をめざすための科学的知見の蓄積、(2)消費者に受容されにくい状況が続いている組換え食品の本質的原因の究明並びに社会的受容の促進を大きな柱とし、(3)組換え食品の違法な流通を監視するための未承認組換え食品の検出技術の開発及び合法的な流通を検証するためのスタック品種の検査法についての検討を行った。なお、(1)の対象となる新機能遺伝子組換え食品には、代謝改変や環境抵抗性に関わる機能性タンパク質が新機能として付与された遺伝子組換え植物およびそれらの後代交配品種スタックに加えて、植物以外のサケや乳酸菌等の遺伝子組換え生物も含めることとした。

研究分担者

今村 知明 奈良県立医科大学健康政策医学講座教授
小関 良宏 東京農工大学工学部教授
太田 大策 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部部長
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グループ長
近藤 一成 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部室長
野口 秋雄 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部主任研究官

換え食品の安全性確保のための科学的知見の蓄積、当該食品並びに未承認組換え食品の検知に関する試験法の確立、安全性審査基準への反映並びに社会的受容の促進を図るためのリスクコミュニケーションを行うことを目的とする。

B. 研究方法

生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている新開発バイオテクノロジー応用植物由来食品の安全性評価のためのポストゲノム(網羅的オミクス)手法を用いる意図的並びに非意図的生成物の解析のための研究を小関班員、太田班員、手島班員、組換え微生物または遺伝子組換え魚由来食品の安全性評価のための研究を五十君班員、名古屋班員が担当した。安全性確保に有用な試験方法の確立のための未承認遺伝子組換え体の検知に関する研究を近藤班員がまた、承認済遺伝子

A. 研究目的

本研究は、多様化、複雑化する新機能遺伝子組

組換え体の検知に関する研究を野口班員が担当し、研究代表者は、研究班全体の総括を行った。また、遺伝子組換え食品に関する開発・実用化の動向や安全性に関する調査研究の一環として、リスクコミュニケーション(遺伝子組換え食品の社会的受容に関する研究)に関する調査が奈良県立医科大学で、遺伝子組換え薬用植物に関する文献調査が医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部で、遺伝子組換え動物の開発並びに調査研究が広島大学生物圏科学研究科で行われ、研究代表者がとりまとめを行った。

C. 結果およびD. 考察

遺伝子組換え食品の国民受容に関する研究：

GM 作物とそれに由来する食品に対する消費者の受容性は、その登場以来一貫して低い水準で推移しており、日本国内における商業栽培や本格的な販売には至っていない。一方で世界での栽培は広がっており、また、近年 NBT (New Plant Breeding Techniques) と呼ばれる新たな技術も出てきており、GM をはじめとしたバイオテクノロジーの植物育種技術への適用はどんどん進んでいる。GM 作物や食品をはじめとした、新たな技術を用いた食品の普及にあたっては、GM が受容されない本質的な要因を究明し、国内消費者の意識や受容性の現状を把握し、これを踏まえた適切なリスクコミュニケーションを展開していくことが必要不可欠である。本研究は、この基礎的な知見を得るために、先進諸国の取組みを調査し、わが国の施策への示唆を把握するとともに、GM 作物・食品に対する消費者等の意識や評価を把握するための手法を探る研究を実施し、リスクコミュニケーションの実践を試みた。具体的には、遺伝子組換え作物・食品に関するリスクコ

ミュニケーションについて、今後我が国で取り組むべき方策に対する示唆を得るため、遺伝子組換え作物・食品の社会的受容の調査研究として、① 社会的受容の推移の調査、② 社会的受容の水準の調査、③ 社会的受容の国内外の比較調査、④ 消費者と専門家の認識のギャップの調査、⑤ 食品に対する安心感の調査を実施し、⑥ 安全から安心に至る意思決定モデルを構築した。また、リスクコミュニケーション方策の調査研究として、⑦ GM 動物に関する海外動向の調査、⑧ GM 及び NBT に関するリスクコミュニケーションの検討と実践を実施した。詳しい結果については、上記項目のうち、①、②、③、④については平成 24 年度の報告書に、③、⑤、⑦、⑧については平成 25 年度の報告書に、⑥、⑦、⑧については平成 26 年度の報告書に記述した。

薬用遺伝子組換え植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究：

遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人や家畜などの動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」と定め、その開発及び生産に関する情報を、環境浄化目的の植物に関する情報及び食用作物を用いた産業用 GM 植物に関する情報とともに収集した。また、新規植物育種法 (NBT: New Breeding Techniques) の開発状況を調査した。2009-2014 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場栽培認可・作付け状況を調査した結果、2009 年から 2013 年にかけて作付けが行われた州が著しく減少し、2014 年においては野外圃場への作付けは行われておらず、米国での野外圃場栽培は縮小していることが判明した。得られた情報を分類するカテゴリーとして、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環

環境浄化、工業用（食用作物）及び NBT の 10 種類を設定した。国内の状況について、関連学会講演要旨集で調査した結果、2012-2014 年に 68 件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：15 件、経口ワクチン：4 件、食用医薬：6 件、ワクチン抗原：1 件、抗体医薬：3 件、治療薬：11 件、診断薬・試薬：1 件、環境浄化：3 件、工業用：1 件（但し 2013-2014 年）、NBT：26 件であり、3 カ年では NBT に関連した研究・開発が最多であった。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2012-2014 年に公表・出版された論文等を調査した結果、214 件が得られ、その内訳は、機能性食品：59 件、経口ワクチン：11 件、食用医薬：7 件、ワクチン抗原：8 件、抗体医薬：13 件、治療薬：47 件、診断薬・試薬：11 件、環境浄化：41 件、工業用：3 件、NBT：23 件であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった。また、2012-2014 年の国別の件数は、中国：90 件が最も多かった。

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究：

近年開発されたゲノム編集技術は、これまで遺伝子改変が困難であった生物種での遺伝子の改変が可能になった。特にゲノム編集によるノックアウト技術は、生物のゲノムの一部に変異を導入するのみであり、これまでの組換え技術と大きく異なっており、今後、畜産動物におけるゲノム編集動物由来食品の開発が予想される。そこで本研究では、そのモデル動物としてニワトリを選択し、ゲノム編集ニワトリの生産物に起こる性状解析を行い、食品としての安全性を評価する基準の整理を行なうことを目的に以下の研究を行なった。平成 24 年度はゲノム編集ツールのひとつである

TALEN がニワトリ多能性幹細胞に適応可能であることを証明した。平成 25 年度は、鶏卵中のアレルギーをゲノム編集の標的としてアレルギーをノックアウトするための TAL エフェクター発現ベクターの開発を行い、in vitro での解析を行なった。平成 26 年度は、平成 25 年度に生じた問題点を克服し、アレルギーノックアウト幹細胞を樹立し、モデル系として活用できるノックアウトキメラニワトリの作出に至った。

遺伝子組換え魚の安全性に関する研究：

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る期間（2013 年 4 月）が終了したにもかかわらず、その後、何の進展もない。進展のない理由は公表されていない。他の国で開発されているコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚のうち、コイやティラピアでは食用として利用することを想定しているが、これらの情報も公表されていない。遺伝子組換え魚類の安全性に係わる資料が公開された例は遺伝子組換え大西洋サケのみである。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った。すでに作出している遺伝子組換えアマゴを用いた実験では、肝臓から抽出した mRNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し次世代シーケンサーで解析し、NCBI に登録されている大西洋サケとニジマスの遺伝子配列と比較し、遺伝子組換えアマゴと非組換えアマゴの肝臓における約 8000 種類の遺伝子に関して発現量の変化を比較した結果、 $\Delta 6FAD$ 、delta 9 desaturase、elongation of long chain fatty acids 5b、thioesterase-B 遺伝子の発現低下を認めた。さら

に、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 遺伝子のみの配列をアマゴにマイクロインジェクションした個体から次世代を作出した。すべてを検査していないが、現在までに遺伝子組換えアマゴは検出されていない。

組換え微生物の安全性に関する研究

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するためにあ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、組換え微生物のヒトや動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細菌を作出し、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。細胞を用いた評価系が示した結果は、ヒトや動物の腸管の M 細胞でも実際に同様に起こっているかは大変重要であり検討を進めた。また、この現象のメカニズムの解明に向けて、実用性が高いヒト M 細胞モデル系の更なる改良を行った。

サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現

した遺伝子組換え乳酸菌と、非組換え乳酸菌（宿主菌）について、網羅的オミクス解析を行い両者の違いについて検討した。オミクス解析は、プロテオーム解析（手島博士）、メタボローム解析（太田博士）、トランスクリプトーム解析（小関博士）が分担しておこなった。プロテオーム解析については、大腸菌で鞭毛抗原—アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、非組換え乳酸菌にふりかけアンカーにより菌体表層に結合させた組換え遺伝子を含まない乳酸菌についても解析し、遺伝子組換え乳酸菌、宿主菌との比較を行った。プロテオーム解析により、膜上のプロテアーゼの発現が変化していることが観察された。メタボローム解析では、GM と non-GM を区別するような明確なクラスター分離、および代謝物蓄積の相違は認められなかった。トランスクリプトーム解析では、コントロール株の一群の遺伝子の脱落が確認されたものの、それ以外には、両者の差は、トランスポゼースを除き見られなかった。

遺伝子組換え体のトランスクリプトーム解析並びに成分分析:

これまでの遺伝子組換え植物は害虫抵抗性や除草剤抵抗性といった比較的単純なものであったが、最近では、機能性を付与したものや遺伝子組換え植物同士の交配によって、複数の機能を持たせるなど、複雑かつ多様な植物が生み出されている。また、植物にとどまらず、バクテリア、魚、ニワトリなど植物以外の遺伝子組換え生物も実用化されつつある。これらのように多様化、複雑化しつつある遺伝子組換え生物を由来とする食品の安全性について評価する場合、その複雑性や多様性、また安全性評価すべき観点もはっきりとしないとといった問題点がある。そこで本研究では、

これらの安全性を評価するうえでどのような評価が可能であるか検討するために、1年目では遺伝子組換えレタスを使用して、2年目では遺伝子組換えコメ、遺伝子組換えアマゴ、3年目では遺伝子組換えシロイヌナズナのスタックシステムを使用して DNA マイクロアレイ解析を行った。また、3年目には遺伝子組換え乳酸菌では次世代シーケンサーを用いた mRNA 網羅的解析も行った。

また、安全性評価に際しての成分分析によって得られるデータの有効性の検証を目的とし、モデル組換え体を材料に、一斉分析も実施した。平成 24 年度は、遺伝子組換えアマゴを用いた食品成分分析を行い、遺伝子組換えサケの食品安全審査に必要な項目の調査を行った。平成 25 年度は、低アレルゲンイネ玄米を分析対象とし、食品五成分の分析を行い、分析値を従来品種の値と比較した結果、大きな差異は認められないことを確認した。平成 26 年度は、高温ストレス耐性サツマイモの可食部である塊根を分析対象とし、食品五成分の栄養成分分析を行い、分析値を従来品種の値と比較した結果、大きな差異は認められないことが確認された。

遺伝子組換え体のメタボローム解析:

先端的バイオテクノロジーが食料・食品の生産の幅広く応用されている。特に遺伝子組換え作物の開発は多岐にわたり、除草剤耐性や耐病性、昆虫食害耐性の付与などの従来型技術をはじめとして、機能性成分産生能の付与や環境抵抗性増強、すでに実用化された組換えシステムの交配による複数の有用形質付与のための技術開発などが進んでいる。遺伝子組み換え技術は作物育種にとどまらず、ニワトリやサケなどの動物の育種にも利用されている。本研究では、メタボロミク

スによる代謝物一斉解析によって、バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する総合的評価のための基礎データ取得を目的とする。研究期間中、アスタキサンチン産生能を高めた遺伝子組換えレタス、低アレルゲン米、ヒト成長ホルモン(GH)を高発現させた組換えアマゴ系統(GH アマゴ)および遺伝子組換え乳酸菌を対象としたメタボローム解析を実施した。いずれの場合においても代謝プロファイルへの著しい影響は認められず、生物が具有する柔軟性・可塑性は、遺伝子導入による無作為な代謝機能攪乱を許容することは無かった事が示唆された。

遺伝子組換え体のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析:

新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関するアレルギー性評価並びにプロテオーム解析に関する調査研究として、(1) アスタキサンチン発現レタス、低アレルゲン化コメ、成長ホルモン導入遺伝子組換えアマゴ、サルモネラ鞭毛抗原(フラジェリン)を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌を用いて、アレルゲンを含むタンパク質の網羅的解析手法の検討、(2) マウスを用いる組換え生物のアレルゲン性の検討、(3) アレルゲンデータベース(ADFS)のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行った。具体的には、(1) 2D-DIGE 法を用いたプロテオーム解析で組換え体(GM)及び非組換え体(non-GM)に発現するたんぱく質の定量比較を行い、発現変動のみられたタンパク質について可能な限り質量分析で同定を行った。アスタキサンチン発現レタスでは、GMと non-GM でタンパク質の発現変動はほとんどみられなかったが、低アレルゲンコメでは、ターゲットタンパク質である RAG2 ファミリータ

ンパク質の発現減少および、非ターゲットの Glutenin の発現増加が明らかとなった。成長ホルモン導入導入遺伝子組換えアマゴでは、GM 体と non-GM 体で 100g, 125g, 150g と体重を揃えた個体の間での筋肉タンパク質の発現比較を行ったが、100g で 63 spots、125g で 50 spots、150g で 100 spots のタンパク質で、2 倍以上の発現差異がみられた。GM アマゴで non-GM アマゴと比較して、発現量の増加していたタンパク質に、ピルビン酸キナーゼがあり、解糖系の活性化の起きていることが示唆された。一方、発現の大きく低下していたタンパク質として、Creatine kinase 等のエネルギー代謝に関連するタンパク質があった。Parvalbumin 等のアレルゲンについては、GM の方で低下傾向が認められた。フラジェリンを菌体表層に固定化発現した乳酸菌では、GM の方で発現の増加したタンパク質には、挿入遺伝子産物であるフラジェリン以外に、細胞壁の分解酵素が確認された。(2) アスタキサンチン発現レタスの抽出蛋白質と non-GM レタスタンパク質で感作されたマウスが示したアナフィラキシー症状のスコアに差は認められず、抗原特異的 IgG1 抗体価は両群ともほとんど検出されなかったことから、アスタキサンチン発現レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。また、低アレルゲン化コメタンパク質と non-GM コメタンパク質で感作されたマウスモデルが示したアナフィラキシー症状においても、GM の方が低下傾向が認められた。また、本アレルギーモデルマウスを経口以外の感作モデルと比較したところ、本モデルは、消化管での反応性が特徴的なアレルギーモデルであると考えられた。また、本モデルによって抗原を経口投与したドナーマウスの腸間膜リンパ節から採取した CD4⁺細胞

を移入したレシピエントマウスは抗原特異的な IgG1 抗体を産生した。(3) ADFS のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、3 年間で新たに 50 種のアレルゲンについて、総エピトープ数 396 の情報を追加し、本年度のアレルゲンおよびエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1777 となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は 141 種となった。

未承認組換え生物の検知技術の開発に関する研究：

遺伝子組換え作物は、多様な系統が開発されている。安全性が確認されていない遺伝子組換え食品が国内に流通しないように監視するためには検査基盤技術の開発が不可欠である。本研究では、主に作物特異的な内在性遺伝子検知法、効率的なスクリーニング手法、加工食品からの DNA 抽出法精製法の最適化、デジタル PCR を用いたコピー数評価を中心に行った。具体的には、1) インドやバングラディッシュなど南アジアの国々では、害虫抵抗性を獲得させた GM ヒヨコマメの商業栽培に向けた開発が進められている。加工品として混入する可能性があることから、内在性遺伝子検知法を検討し、ゲノム上 1 コピーの 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase (CaNCED) をクローニングして特異性の高いリアルタイム PCR 法を確立した。2) カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA プロモーター (P35S) の DNA メチル化修飾パターンを解析することで、ウイルス自身が原因で起こる遺伝子組換え食品の擬陽性判定することなくスクリーニングを行うことができる新規分析手法を確立した。3) デジタル PCR を用いて、過去に陽性であった中国由来の遺伝子組換えコ

メ加工品を用いて標的配列のコピー数を算出し、コメ加工品の特性（多コピー導入系統かどうか）を明らかにする事ができた。4)加工食品中の DNA は断片化されており、そのような短い DNA 断片を効率よく抽出する方法として陰イオン交換樹脂を用いた方法が用いられるが、多糖など添加物が DNA 精製に与える影響することがあるためその影響を検討した。その結果、添加物増粘多糖類カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)がコメ由来 DNA の収量および精製度に与えることが判明した。

承認済組換え生物の検知技術の開発に関する研究：

我が国に輸入される安全性承認済みの遺伝子組換え（GM）作物の種類は増加の一途を辿っている。なかでもトウモロコシは品種数が多く、表示の妥当性を検証するために多くの検査法が開発されているが、消費者庁から通知されている現行の検査法は新開発 GM 品種には対応しておらず、また実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。そこで本研究では、新開発 GM 品種を検出できるシステムを導入し、実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法ならびに改良型粒検査法の開発を行った。新開発 GM 品種を検出するために、GM 品種に広く存在している組換え遺伝子 P35S および tNOS を検出対象とした。新規スクリーニング検査法においては、実験操作の簡便化のために表示義務の閾値である GM 混入率 5%の判定に multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子 (*SSI1b*) と組換え遺伝子 (P35S および tNOS) の Ct 値あるいは Cq 値の差 (ΔCt 値あるいは ΔCq 値) を用いた。プラスミドや genomic DNA を用いた実験から、本検査法は十分

な定量性と検出感度を有していることが示され、擬似試料を用いた検証試験から、本スクリーニング検査法は実際のトウモロコシ検体にも適用できることが示唆された。改良型粒検査法においては、実験操作の簡便化のためにダルマピンおよび紙ヤスリを用いた DNA 抽出法を検討した。その結果、ダルマピンを用いた場合のほうが紙ヤスリを用いた場合に比べ、良好な結果が得られ、さらに紙ヤスリを用いた場合にはコンタミネーションや大きな労力が懸念された。以上のことから、DNA 抽出にはダルマピンを用いた方法を採用することにした。DNA 抽出液を蒸留水で希釈する条件で PCR 増幅の効率が低下したことから、GM 系統の検出試験には DNA 試料液の原液を用いた。本検査法は高い感度を示し、抽出バッファー成分による PCR 阻害の影響は少なかった。これらの検査法は、新規開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、簡便化により実験の労力を減らすことによって検査の精度を向上させることができ、現行の検査法に置き換わる新規検査法として期待される。

E. 結論

生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている新開発バイオテクノロジー応用食品のより一層の安全性確保のため、安全性評価に資するための研究として、成長ホルモン導入組換えアマゴ、低アレルギー化コメ、フラジェリン表層発現乳酸菌をモデル植物として用い、意図的並びに非意図的影響を知るためのポストゲノム手法による解析を行い、非組換え体との発現の違いの解析、遺伝子組換えにより発現の違いのみられる mRNA、代謝産物、タンパク質の同定を行い、規格への反映化をめざすための科学的知見の蓄積を行った。また、2 種以上の形質を掛け合わせたい

わゆるスタック品種の安全性試験に資するため
のモデル植物としては、環境耐性遺伝子を導入し
たシロイヌナズナスタック個体を使用し、その個
体から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を委
託した。また、未承認遺伝子組換え食品の検知に
ついては、安全性が確認されていない遺伝子組換
え食品が国内に流通しないように監視するため
の検査基盤技術の開発のため、作物特異的な内在
性遺伝子検知法、効率的なスクリーニング手法、
加工食品からの DNA 抽出法精製法の最適化、デジ
タル PCR を用いたコピー数評価を中心に研究を行
った。さらに、安全性承認済の組換え作物の定量
検査法の開発においても、GM 品種に広く存在して
いる組換え遺伝子 P35S および tNOS を検出対象と
して、実験操作を簡便化した新規スクリーニング
検査法の開発を行い、ダルマピンを用いた DNA 抽
出操作を簡便化した改良型粒検査法の開発も行
った。社会的受容に関する調査研究では遺伝子組
換え作物・食品の社会的受容の調査研究として、
安全から安心に至る意志決定モデルの構築、消費
者意識の国内外比較調査、食品に対する安心感の
調査を実施した。また、リスクコミュニケーション
方策の調査研究として、遺伝子組換え動物に関
する海外動向の調査並びに、NBT と総称される新
たな育種技術に関して消費者に提示する試料 (GM
及び NBT 説明書) に関する調査も開始し、わかり
やすさの検証を行った。さらに、組換え微生物を
用いた食品や遺伝子組換え魚、遺伝子組換え動物、
遺伝子組換え薬用植物の諸外国での開発動向、各
国の規制状況等についても調査が行われた。

バイオテクノロジー応用食品については、多様
化、複雑化する新機能遺伝子組換え食品が開発さ
れている現状に鑑みて、新開発食品の安全性に関
する研究、当該食品の検知に関する試験法の確立

は、安全性審査への反映、監視体制に直接つな
がる社会的に要請の高い研究である。これら研究を
さらに進めると共に、社会的受容に関する研究等
も持続することにより、透明性を確保しつつ、よ
り一層の安全確保、消費者の不安解消に努める必
要があると考えられる。

F. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

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」
協力研究報告書(平成24-26年度)

薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査研究

研究分担者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人や家畜などの動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」と定め、その開発及び生産に関する情報を、環境浄化目的の植物に関する情報及び食用作物を用いた産業用 GM 植物に関する情報とともに収集した。また、新規植物育種法 (NBT : New Breeding Techniques) の開発状況を調査した。2009-2014 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場栽培認可・作付け状況を調査した結果、2009 年から 2013 年にかけて作付けが行われた州が著しく減少し、2014 年においては野外圃場への作付けは行われておらず、米国での野外圃場栽培は縮小していることが判明した。得られた情報を分類するカテゴリーとして、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、工業用 (食用作物) 及び NBT の 10 種類を設定した。国内の状況について、関連学会講演要旨集で調査した結果、2012-2014 年に 68 件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品 : 15 件、経口ワクチン : 4 件、食用医薬 : 6 件、ワクチン抗原 : 1 件、抗体医薬 : 3 件、治療薬 : 11 件、診断薬・試薬 : 1 件、環境浄化 : 3 件、工業用 : 1 件 (但し 2013-2014 年)、NBT : 26 件であり、3 カ年では NBT に関連した研究・開発が最多であった。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2012-2014 年に公表・出版された論文等を調査した結果、214 件が得られ、その内訳は、機能性食品 : 59 件、経口ワクチン : 11 件、食用医薬 : 7 件、ワクチン抗原 : 8 件、抗体医薬 : 13 件、治療薬 : 47 件、診断薬・試薬 : 11 件、環境浄化 : 41 件、工業用 : 3 件、NBT : 23 件であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった。また、2012-2014 年の国別の件数は、中国 : 90 件が最も多かった。

協力研究者

吉松嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

A. 研究目的

活発に研究開発が進んでいる高栄養、高機能または医薬品類を生産する遺伝子組換え (GM) 植物や環境浄化を目的とする GM 植物、さらに食用作物を使用した工業用の GM 植物は、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃場栽培も行われている。また、

遺伝子組換え技術は、近年多様化・複雑化し、検知が困難な組換え体の作出が進んでいる。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。

そこで本研究では、薬用 GM 植物、環境浄化 GM 植物、食用作物を用いた工業用 GM 植物及び新規植物育種法 (NBT : New Breeding Techniques) ¹⁾ の開発状況・生産実態に関する情報を収集して整理し、食品の安全性確保のための基盤情報を整備する。

B. 研究方法

GM植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用GM植物の範囲、土壌、水源、大気中の有害物質を高蓄積あるいは分解するGM植物を環境浄化用GM植物の範囲、生分解性プラスチック、バイオ燃料等の工業用途の物質を生産するGM植物を工業用GM植物の範囲（但し、食用作物のみ）とした。これらGM植物及びNBT（図1）に関する情報を文献データベース（Scifinder®、検索語「transgenic plant」）、インターネット（Google）、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリ別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。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、工業用及びNBTの10種類を設定した（図2）。

C. 研究結果

1) 2009-2014年の米国における薬用及び環境浄化用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) で、2009-2014年の薬用及び環境浄化用GM植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べた。

2009年から2013年にかけては作付け州が著しく減少し、2014年においては、4件の承認がおりているのにも関わらず、野外圃場への作付けは行われていないことが判明した。

2) 2012-2014年に国内学会で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等

2012-2014年の日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウムで公表された薬用、環境浄化用、工業

用（但し食用作物のみ）GM植物及びNBTに関する報告を調査した。3カ年で68件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：15件、経口ワクチン：4件、食用医薬：6件、ワクチン抗原：1件、抗体医薬：3件、治療薬：11件、診断薬・試薬：1件、環境浄化：3件、工業用：1件（但し2013-2014年）、NBT：26件であり、NBTに関連した研究・開発が最も多かった。

3) 2012-2014年に国内外で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等（SciFinder®）

SciFinder®（キーワード：transgenic plant）で2012-2014年に公表・出版された薬用、環境浄化、工業用（但し食用作物のみ）GM植物及びNBTに関する論文等を調査した。3カ年で214件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：59件、経口ワクチン：11件、食用医薬：7件、ワクチン抗原：8件、抗体医薬：13件、治療薬：47件、診断薬・試薬：11件、環境浄化：41件、工業用：3件、NBT：23件であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった。また、2012-2014年の国別の件数は、いずれの年も中国が最多であった。

D. 考察

今回の調査から、薬用・環境浄化用GM植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国においては、急速に野外圃場栽培面積が減少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研究開発が、2012-2014年の3カ年を通じて活発（214件中90件）であることが判明した。

E. 結論

これまで薬用・環境浄化用GM植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国においては、急速に

野外圃場栽培面積が減少していることが判明した。

国内では NBT に関する件数が多く、国内外では機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多いことが判明した。また、国内外での研究・開発のうち、件数が最も多い国は中国であった。

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

なし。

G. 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。

F. 参考文献

1) 鎌田博：遺伝子組換え植物・食品を巡る最近の状況～新植物育種技術 (New plant Breeding Techniques) への対応～

<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002tccm-att/2r9852000002tcgt.pdf>

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 [New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development, the European Commission's Joint Research Center (JRC)-Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) and JRC-Institute for Health and Consumer Prospection (IHCP), 2011年]

- ① Zinc finger nuclease technology (ZFNs) ゲノム編集(人工ヌクレアーゼによる塩基配列の改変)
- ② Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM) ゲノム編集による新塩基配列の挿入
- ③ Cisgenesis & Intragenesis 同種・遺伝子交換可能種由来遺伝子のみの挿入
Cisgenesis プロモーター・ターミネーター等も同じ
Intragenesis プロモーター・ターミネーター等を変更
- ④ RNA-dependent DNA methylation (RdDM) エピゲノム編集(DNAのメチル化状態のみの変化)
- ⑤ Grafting on GM rootstock 組換え体を用いた接ぎ木
- ⑥ Reverse Breeding 育種途中で組換え遺伝子を挿入、しかし育成した品種中には組換え遺伝子がない
- ⑦ Agro-infiltration (agro-infiltration "sensu stricto", agro-inoculation, floral dip)
agro-infiltration "sensu stricto" 体細胞組織で局所的に非増殖性核酸を導入
agro-inoculation 体細胞組織にウイルス等を導入
floral dip 花芽組織にAgrobacteriumを接種し、次世代で組換え体を選抜
- ⑧ Synthetic Genomics 人工染色体

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

図 1. New Plant Breeding Techniques (NBT)¹⁾

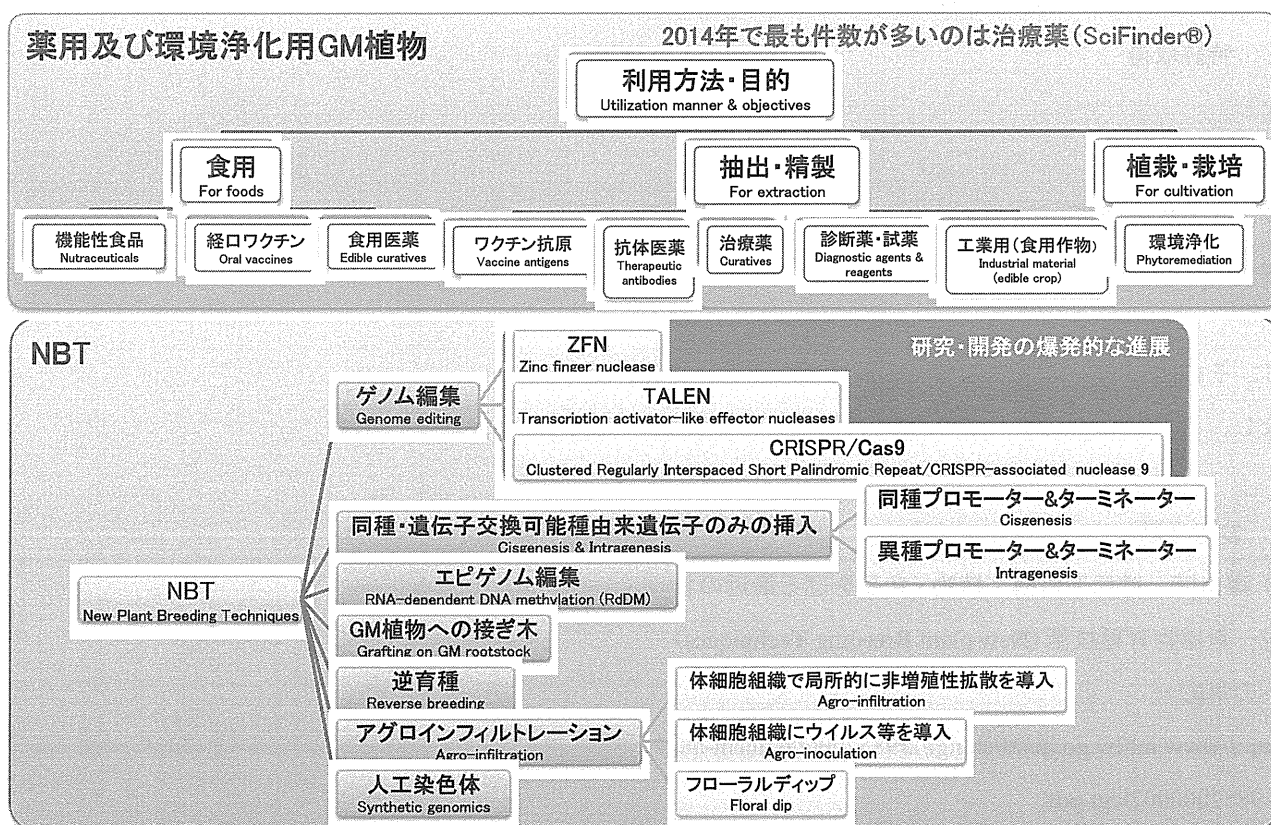


図 2. 薬用、環境浄化用、工業用 GM 植物及び NBT の開発状況・生産実態の調査

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食品部長

研究要旨:近年開発されたゲノム編集技術は、これまで遺伝子改変が困難であった生物種での遺伝子の改変が可能になった。特にゲノム編集によるノックアウト技術は、生物のゲノムの一部に変異を導入するのみであり、これまでの組換え技術と大きく異なっており、今後、畜産動物におけるゲノム編集動物由来食品の開発が予想される。そこで本研究では、そのモデル動物としてニワトリを選択し、ゲノム編集ニワトリの生産物に起こる性状解析を行い、食品としての安全性を評価する基準の整理を行なうことを目的に以下の研究を行なった。平成24年度はゲノム編集ツールのひとつであるTALENがニワトリ多能性幹細胞に適応可能であることを証明した。平成25年度は、鶏卵中のアレルゲンをゲノム編集の標的としてアレルゲンをノックアウトするためのTALエフェクター発現ベクターの開発を行い、in vitroでの解析を行なった。平成26年度は、平成25年度に生じた問題点を克服し、アレルゲンノックアウト幹細胞を樹立し、モデル系として活用できるノックアウトキメラニワトリの作出に至った。

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きており、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、基本的にDNAの塩基配列に特異的に結合するタンパク質

とFok Iというヌクレアーゼを細胞内で一過性に発現させ、標的領域に二重鎖切断(DSB)を誘導する手法である。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ことがある。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。現在、ゲノム編集に利用される人工ヌクレアーゼには、zinc-finger nuclease (ZFN) と transcription activator-like (TAL) effector nuclease (TALEN) があるが、認識配列のバリエーションが豊富な

TALEN が主流である。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。さらに最近では、CRISPR/Cas9 システムという新たなゲノム編集ツールも開発され、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て平成 24~26 年度の三年間でゲノム編集由来食品の評価に利用可能なモデルニワトリの開発に取り組んだ。

B. 研究方法と結果

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。構築したエフェクター発現ベクターは、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。その結果、構築した GFP 破壊 TAL エフェクターは、標準活性値の 2 倍の強さがあり、GFP に変異を導入するに十分な活性を持つ事がわかった。

2. GFP 破壊 TAL エフェクターによる変異導入

ニワトリ多能性幹細胞において、TAL エフェクターが機能するかどうかを試験するために、GFP 導入

ニワトリ多能性幹細胞に、構築した TAL エフェクター発現ベクターを導入した。その結果、ベクターを導入した多能性幹細胞では、GFP の発現が消失し、TAL エフェクターにより GFP 遺伝子が破壊されたことがわかった。

3. アレルゲンノックアウト TAL エフェクターの構築

アレルゲンノックアウト TAL エフェクター発現ベクターの構築では、まず改良型 TALEN and TAL Effector Kit を用いて、left TALEN と right TALEN 発現ベクターの 2 種を作製した。次に、ベクターを 2 種同時に導入するよりは、1 種で導入した方が導入効率の上昇が期待されたため、left TALEN と right TALEN 発現ベクターの one ベクター化を行なった。各構築ステップでは、HEK293 細胞を用いた SSA assay により切断活性が維持されていることを確認しながらおこなった。構築した one ベクターを用いてニワトリ多能性幹細胞に対して変異導入を行い、Cel-1 assay 並びに塩基配列の確認による変異導入効率の算定を行なったが、Cel-1 assay で陽性は得られたものの、塩基配列の確認では一塩基多型 (SNP) を検出していたことが判明した。これは、構築した TAL エフェクター発現ベクターがニワトリ多能性幹細胞では、変異導入効率が低いと考え、次に構築した one ベクターにさらに薬剤耐性遺伝子のカセットを挿入した。これは、ベクターが導入された細胞を一過性に薬剤により選抜し濃縮するためである。新たに構築したベクターは、上記と同様に SSA assay に供試し、切断活性に変化がないことを確認した。

4. アレルゲンノックアウト幹細胞の樹立

新たに構築したアレルゲン破壊 TAL エフェクター発現ベクターは、ニワトリ多能性幹細胞に導入後、一過性の薬剤選抜に供試し、Cel-1 assay による変

異導入効果を確認した。その結果、薬剤選抜を行っていない幹細胞では、変異導入を示す分断されたバンドは確認されなかったが、薬剤選抜を行なった幹細胞からは、変異導入を示すバンドが確認された。次に薬剤選抜を行なった幹細胞から、ゲノム DNA を抽出し、変異導入領域の塩基配列の解析を行なった。43 クローンの塩基配列を決定した結果、欠失変異 10 クローン、挿入変異 1 クローン、置換変異が 2 クローン検出された。また、これらの変異クローンの中に、フレームシフトにより終止コドンが生じるノックアウト変異が 3 クローン含まれていることがわかった。塩基配列の解析結果から、新たに構築したアレルゲン破壊 TAL エフェクター発現ベクターのニワトリ多能性幹細胞に対する変異導入効率は 30%、ノックアウト変異効率は 7%であった。最終的にアレルゲン破壊 TAL エフェクター発現ベクターを導入した幹細胞から、限界希釈法により 3 種のノックアウト幹細胞を樹立した。

5. アレルゲンノックアウトニワトリの作出

樹立したノックアウト幹細胞は、受精卵胚の胚盤葉へ移植し、アレルゲンノックアウトキメラニワトリの作出試験に供試した。その結果、5羽のアレルゲンノックアウトキメラニワトリの作出に成功した。

(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 C11-29）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。

C. 考察

動植物における遺伝子組換え技術は、年々高度化が進み、単純に遺伝子を強制発現させるだけではなく、いわゆる遺伝子組換えマウスと同様にノックインやノックアウトが可能になりつつある。また、近年開発されたゲノム編集技術は、受精卵操作が可能な動物には全て適応可能であり、これまで遺伝子改変が困難であった動物種においても遺伝子のノックアウトが簡便に行なえるようになった。現在、世界レベルでゲノム編集生物の取扱いについて議論が行なわれているのが現状であるが、すでにこの技術を用いた家畜等の品種改良に向けた研究が進められている。そのため、これらの高度化した遺伝子改変動物由来の生産物を食品に利用していく場合、その性状を明らかにすることは、我国の食の安全を確保していく上で重要な研究課題でもある。本研究では、そのひとつのモデルケースとして、ゲノム編集ニワトリの作出に取組んだ。

その結果、最終的に研究期間内に 5羽のモデルとして使用可能なゲノム編集キメラニワトリの作出に成功した。今後は、このモデルニワトリを活用して、ゲノム編集動物もしくはその動物由来生産物の詳細な性状解析が可能となり、ゲノム編集動物由来食品の安全性評価の基準策定や国民への情報発信に活用できるものと考えられる。

現状の組換え食品の安全性評価基準に照らし合わせて考えるなら、ゲノム編集由来食品では、編集に使用したベクター配列が組込まれていない事が前提での評価が必要であろう。この条件のもとに、ゲノム編集を行なう事で、予定外の栄養成分の変化

がないかの解析が必要となる。本研究では、鶏卵のアレルゲンを破壊したモデル系となっていることから、今後は、モデルニワトリ由来の鶏卵中の成分の解析、またニワトリ自体の影響等の解析が進むものと思われる。

D. 結論

本研究では、ゲノム編集動物由来食品の安全性を評価する上で必要なモデル動物の作出研究に取組み、ゲノム編集技術により鶏卵中のアレルゲン遺伝子を破壊したモデルニワトリの作出に成功した。今後はこれらのニワトリもしくは交配試験によりアレルゲンを含まない鶏卵の性状解析を行なう事でゲノム編集により利用される食品の安全性と国民受容に関する研究に資する成果が得られるものと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Alev, C., Nakano, M., Wu, Y., Horiuchi, H. and Sheng, G. Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cell. *Methods Mol. Biol.* 1074: 151-173, 2013.

2) 堀内浩幸, ニワトリ胚性幹細胞研究と培養技術, 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, pp375-379, 2014.

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)

2) 堀内浩幸, 「鳥類多能性幹細胞の遺伝子改変技術の現状とこれから」 第 2 回実験動物科学シンポジウム, 公益社団法人日本実験動物学会主催, 名古屋, 2013 年 12 月 (招待講演)

3) 堀内浩幸, 「鳥類多能性幹細胞を用いた鶏卵の低アレルゲン化」, 第 1 回タマゴシンポジウム, タマゴ科学研究会主催, 東京, 2013 年 5 月 (招待講演)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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」
総合研究報告書(平成24~26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
育種研究センター基盤グループ 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る期間(2013年4月)が終了したにもかかわらず、その後、何の進展もない。進展のない理由は公表されていない。他の国で開発されているコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚のうち、コイやティラピアでは食用として利用することを想定しているが、これらの情報も公表されていない。遺伝子組換え魚類の安全性に係わる資料が公開された例は遺伝子組換え大西洋サケのみである。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った。すでに作出している遺伝子組換えアマゴを用いた実験では、肝臓から抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを構築し次世代シーケンサーで解析し、NCBIに登録されている大西洋サケとニジマスの遺伝子配列と比較し、遺伝子組換えアマゴと非組換えアマゴの肝臓における約8000種類の遺伝子に関して発現量の変化を比較した結果、 $\Delta 6$ FAD、delta 9 desaturase、elongation of long chain fatty acids 5b、thioesterase-B 遺伝子の発現低下を認めた。さらに、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た個体から次世代を作出した。すべてを検査していないが、現在までに遺伝子組換えアマゴは検出されていない。

協力研究者

(森司・日本大学生物資源学部)

A. 研究目的

現在、短期間に成長を促進する遺伝子組換え大西洋サケが米国FDAに食品として認可の申請中で

ある。また、中国においても遺伝子組換えコイの開発が進んでいる。本研究では、遺伝子組換え大西洋サケを中心に、これらの遺伝子組換え魚類の情報を収集するとともに、この遺伝子組換え大西洋サケの食品としての安全性を調査する実験魚として、日本で作出されている同じサケ科魚類の

遺伝子組換えアマゴを用いて、安全性や生物特性について研究を行う。また、実験モデルの遺伝子組換えアマゴは導入遺伝子を増幅するためのベクター領域が含まれている。ベクター配列の影響を除くため、新たにプロモーターと成長ホルモン遺伝子のみを配列を導入した実験魚の作出を試みる。さらに、これまで遺伝子組換え魚類の形態観察から肝臓が形態異常を示す個体が観察されているが、これらの原因や高成長を維持するための代謝系の詳細な調査は行われていないので、その解析を行う。

B. 研究方法

1. 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。

2. 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/ μ l になるように調整し、アマゴ受精卵に μ インジェクションした。

3. 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を用いて、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。

C. 研究結果

1. 遺伝子組換え魚類の情報収集

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。60 日間のパブリックコメントと、その後の延長期間が終了したにもかかわらず、FDA が遺伝子組換え大西洋サケを承認したとの情報は未だに無い。FDA のホームページを見ても何も情報が無く、どのような理由によって認可が遅れているかはわからない状況である。一方、カナダ環境省は AquaBouty Technologies 社の遺伝子組換え大西洋サケを飼育する施設が研究施設としてだけで無く、環境や人間の健康に害を与えることなく、商業規模で遺伝子組換え大西洋サケの受精卵を生産する施設であることを認めた。既に、パナマにある施設で受精卵から出荷するまでの許可は FDA によって承認済みである。

また、遺伝子組換え魚に関する論文では Lian *et al.* (2013)¹⁾が遺伝子組換え魚は生産性に有利な展が無く、稚魚期の生存率も低いので、逃げたとしても自然集団を破壊するようなことは無いと結論した。他に Zhong *et al.* (2013)²⁾は組換え魚の餌の摂取量の増加は視床下部で発現している因子で食欲を促進させる AgRP I の発現増加によるものであることを報告した。

2014 年に公表された遺伝子組換え魚類に関する論文を参考文献にあげる^{3~15)}。リスク分析に関する論文が 3 報、生理・生態に関する論文が 10 報及び遺伝子組換え魚を用いた染色体操作に関する論文が 1 報であった。

中国で遺伝子組換えコイの研究を盛んに行っている中国科学アカデミー・水生生物研究所の Zhu 教授らのグループはそれぞれ 2 つの遺伝子組換えゼブラを作り、A 家系の遺伝子組換えゼブラフィッシュには B 家系のゼブラフィッシュに入れた遺伝子(始原生殖細胞の移動を抑える遺伝子)の発現を誘導するような遺伝子を入れておき、A と B はそれぞれ単独では生殖能力を持ち、継代で