遺伝子組換え食品の安全性

とかく近頃、遺伝子組換え食品の安全性が話題になっている。特に消費者は組換え食品に対しアレルギーを抱いているようである。

ここでは、遺伝子組換え作物の安全性について、ジャガイモとコメに大豆の貯蔵タンパク質であるグリシニンの遺伝子を挿入した組換え作物をつくり、非組換え体と比較し、その成分組成や動物飼育実験結果からの安全性評価を解説していただいた。また、組換え体の容易な判別法（モニタリング）を使用して遺伝子組換え大豆の検出法をも紹介していただいた。

門 間 敬 子, 橋 本 渉, 村 田 幸 作

1 はじめに

現在、世界人口はアフリカやアジア諸国などの発展途上国を中心に増加を続け、21世紀中頃には100億人に達すると予想されている。従って、この人口増加に見合う食糧の確保が大きな問題となる。しかしながら、地球温暖化、塩害、砂漠化など地球環境が悪化する中で、耕地面積の拡大は難しく、既存の食糧生産体系を維持することで食糧の増産を図ることは困難である。一方、先進諸国では、食に起因した糖尿病、肥満、高血圧などの生活習慣病疾患が増加し、大きな社会問題となって来ている。

このような現在と将来の食糧問題に対処するためには、食糧の「増産」と「質的改善」が必要である。そのため、新たな技術として、遺伝子導入を主体とするバイオテクノロジーによる作物の改良が期待される。既に、除草剤耐性作物や病虫害抵抗性作物など食糧の「増産」を目的とした第一世代の遺伝子組換え作物が実用化され、その一部はわが国でも食品として利用されはじめている。また、耐塩性や耐乾索性植物も作製され、未開地利用への期待が高まっている。一方、生活習慣病疾患予防性作物、病原性細菌予防性作物（植物ワクチン）、マラリアやB型肝炎予防性作物、あるいは免疫増強性作物など、食糧の「質的改善」を目的とした第二世代の遺伝子組換え作物の開発も始まって

いる。

現在、「増産」を目的とした第一世代遺伝子組換え作物、及びそれから作られる食糧・食品に対しては、安全性や導入遺伝子が微生物由来である点などから、社会的受容態勢は未だ十分ではない。従って、将来的な食糧問題を解決するためには、遺伝子組換え食品に対する高度な安全性評価基準を確立し、遺伝子組換え作物の内容と安全性が消費者に広く理解される必要がある。

2 遺伝子組換え食品の安全性評価

遺伝子組換え食品の安全性は、「実質的同等性」という概念に基づいて評価される¹⁻³⁾。この概念においては、導入する遺伝子の起源と性質が明らかであり、遺伝子の導入により作物の成分組成や含量に大きな変動が認められない場合、遺伝子組換え作物は非組換え作物と実質的に同等であり、安全であるとみなされる。作物の品種改良は、従来交配や突然変異といった方法が殆どであった。人間はこれらの偶然性に依存した方法によって育種された作物を、長期にわたり、また大量に摂取してきたが、これまでに危険性や有害性が指摘されたことはない。交配や突然変異もまた遺伝子組換えが起こっているわけであるが、非計画的であり、制御しにくい内容を含む。また、これらの現象は自然環境下でも起こり得るものである。これに対して、バ

Safety Assessment of Genetically Engineered Foods
Keiko MOMMA, Wataru HASHIMOTO, Kousaku MURATA (Research Institute for Food Science, Kyoto University)

イオテクノロジーによる遺伝子組換え作物の育種においては、目的の遺伝子を正確にしかも計画的に導入することができる。従って、この方法は従来の品種改良の延長線上にあり、目的となる形質導入を人為的に促進させるに過ぎないと考えられる。

「実質的同等性」の概念に基づき、厚生省により遺伝子組換え作物に関して「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」が作製されている⁴⁾。この指針には、導入作物の成分組成、導入された遺伝子産物（抗生物質耐性マーカーも含む）の安全性（アレルゲン性、毒性、代謝経路への影響、加熱・酸・消化酵素に対する安定性）などの検査項目が設定されている。これは、従来の食糧・食品の安全性評価法に対する基準と基本的に同じである。また、農林水産省により環境に対する影響を調べるための「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」が策定されている。これらの指針を基本として、ここでは血清コレステロール値低下作用や血圧低下作用を持つダイズグリシニンの遺伝子を導入した第二世代遺伝子組換え作物（ジャガイモとコメ）の安全性評価、および環境への安全性評価に重要となる遺伝子組換え作物のモニタリングについて述べる。

3 遺伝子組換え作物（ジャガイモ・コメ）の安全性評価

グリシニンは、ダイズ種子の主要な貯蔵タンパク質であり、前駆体（53 kDa）から翻訳後修飾により生じた酸性サブユニット（33 kDa）と塩基性サブユニット（20 kDa）が会合した状態で存在する⁵⁾。グリシニンは、ゲル化性や乳化性などの加工特性に優れ、さらに血清コレステロール値や血圧低下作用などを持つ機能性タンパク質である^{6,7)}。ダイズグリシニン遺伝子をジャガイモやコメに導入することにより、栄養性すなわち、これらの作物に不足しているアミノ酸（ジャガイモ：ロイシン、リジン、スレオニン；コメ：必須アミノ酸であるリジン）⁸⁾と同時に加工性・生理機能性を付与することができる。特にコメは主食として食されるために多量のダイズグリシニンを経常的に摂取することになり、生活習慣病の予防や病状の改善など医薬的な効果が期待される。

3-1 遺伝子組換えジャガイモの安全性評価⁹⁾

市販ジャガイモであるメイクイーンに、ダイズグリシニン遺伝子をアグロバクテリウム形質転換法により導入し、遺伝子組換えジャガイモが作出された¹⁰⁾。組

第1図 グリシニン遺伝子組換えジャガイモとコメの品質（主要成分とアミノ酸含量）

A, グリシニン遺伝子組換えジャガイモ；B, グリシニン遺伝子組換えコメ

換え体ジャガイモは、非組換え体（メイクイーン）と形態的な相違は認められなかった。組換え体には、全タンパク質の約1～3%に相当するグリシニン前駆体が発現していた。この発現グリシニンは、人工消化液により速やかに分解された、アグロバクテリウム形質転換法では、導入遺伝子の挿入位置をコントロールすることができないため、導入される作物の染色体DNAの破壊や未発現遺伝子の活性化を引き起こす可能性を否定できない。また、著量に発現したグリシニンが、ジャガイモ本来の代謝系に影響を及ぼすことも考えられる。そこで、代謝変動を調べるためにダイズグリシニン遺伝子組換えジャガイモの栄養学的・生理学的に重要である細胞成分約50種類について、非組換え体と比較した。主要成分（水分、タンパク質、脂質、繊維、灰分、糖質）、アミノ酸18種類、脂肪酸12種類、ビタミン5種類及びミネラル5種類の含量は、両者の間で有意な差は認められなかった（第1図A）。ジャガイモには、食中毒を引き起こす有害なグリコアルカロイド（主にソラニンとチャコニン）が含まれる。非組換え体のグリコアルカロイド量に比べ、組換え体では1.5～2倍増加していたが、その最大値（15 mg/100g-ジャガイモ）は許容量（約20 mg/100g）以下であり、健康に影響を及ぼすことはないと判断された。また、このアルカロイドの増加はベクターのみで形質転換した組換え体においても認められ、導入されたグリシニン遺伝子に起因するものではないと考えられる。しかしながら、このことは遺伝子導入操作により代謝変動が生じることを示唆しており、遺伝子組換え作物及びそれから作られる食糧・食品の安全性をさらに詳しく調べる必要があると考えられる。

グリシニン遺伝子組換えジャガイモの食品としての

安全性を評価するために、実験動物（ラット）を用いた反復経口投与毒性試験（亜急性毒性試験）を行った¹¹⁾。市販飼料に加えて組換えジャガイモあるいは非組換えジャガイモを投与した。ジャガイモ投与量は、食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針で定められている上限値（1,000 mg/kg-体重）の2倍量に設定した。また、市販飼料投与のみを対照群とした。4週間反復投与したところ、ラットの体重増加及び飼料摂取量は組換え体、非組換え体を飼料としたときで殆ど差は認められなかった（図2）。投与終了後のラットの血液性状（赤血球、白血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、総コレステロール、トリグリセライド、総タンパク質、尿素窒素、クレアチン、総ビリルビン、ブドウ糖、無機リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、塩素含量）及び器官（脳、下垂体、唾液腺、甲状腺、胸腺、肺、肝臓、脾臓、腎臓、生殖器）の形態と重量について、差は認められなかった。組換えジャガイモ投与群ラット血液中のアルカリ性フォスファターゼ値は、対照群のそれよりも低かった。心臓と副腎については、非組換え体投与群と対照群で有意な差が認められた。しかし、総体的に非組換え体と組換え体投与群との間で大きな差は認められなかった。さらに、肝臓及び腎臓の病理学的検査においても、両飼料で生育したラット群に異常は認められなかった。形質転換体選択の際に用いられたマーカータンパク質（ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼII）の安全性は、米国農務省、米国食品医薬品局及び米国環境保全庁で公認されており、食品添加物として扱われている。

第2図 グリシニン遺伝子組換えジャガイモ摂取ラットの飼料摂取量と体重増加

以上、組換え体での発現グリシニンの消化性、各種成分の比較、実験動物を用いた毒性試験の結果より、グリシニン遺伝子組換えジャガイモは非組換えジャガイモと実質的に同等であり、安全であると判断された。さらに、栄養性の増強を目的として、メチオニン残基を付加した設計グリシニン遺伝子もジャガイモやコメに導入されている。最近、遺伝子そのものが生体の免疫系を攪乱することが明らかにされてきており¹²⁻¹⁴⁾、設計遺伝子を用いる場合には、その産物である非天然型タンパク質の安全性だけでなく遺伝子の構造毒性も評価している。

3-2 遺伝子組換えコメの安全性評価¹⁵⁾

コメの一品種である松山三井に、エレクトロポレーション法によりダイズグリシニン遺伝子を導入したグリシニン遺伝子組換えコメが作出された¹⁶⁾。組換え体と非組換え体で形態的な相違は認められなかった。遺伝子組換えコメの塩可溶性タンパク質画分にグリシニンの発現が認められ（図3 A, B）、その発現率は全タンパク質の約5%であった。また、発現グリシニンは、人工消化液（胃液、腸液）により速やかに分解された（第3図C）。エレクトロポレーション法もまた導入作物の染色体DNAに影響を及ぼす可能性があり、また大量に発現したグリシニタンパク質による代謝変動の可能性もある。ジャガイモの場合と同様に、まず組換え体と非組換え体の主要成分60種類を比較した。

組換え体では、タンパク質量（20%）及びアミノ酸含量に有意な増大が認められた（第1図B）。増加したアミノ酸の種類がグリシニンの構成アミノ酸組成に対応していることから、タンパク質及びアミノ酸含量の増大は、主にグリシニンの発現に起因していると考えられる。組換え体ではコメに不足している必須アミノ酸であるリジン含量が約20%増大し、コメの栄養性の改善が期待できる。この他、脂肪酸12種、ビタミン4種及びミネラル6種については、ビタミンB₆を除きほとんど有意な差は認められなかった。ビタミンB₆含量は組換え体で1.5倍に増加したが、健康への影響はないと考えられる。

以上の結果から、組換え体はタンパク質とアミノ酸含量の増加を除けば、非組換え体と実質的に同等であり、安全であると評価される。動物実験については、現在解析中である。タンパク質及びアミノ酸分子種の増加は、コメの呈味性や栄養性への影響も考えられる。第二世代遺伝子組換え食品の実用化には、その安全性だけでなく、生体の食品受容性や感覚特性を合わせて、総合的に評価する必要がある。

4 遺伝子組換え作物のモニタリング

遺伝子組換え作物は食品としての安全だけでなく、その栽培における自然環境への影響も考慮されなければならない。長期にわたる導入遺伝子の安定性や野外

第3図 グリシニン遺伝子組換えコメにおけるグリシニンの発現

A, タンパク質染色; B, 抗グリシニン抗体によるイムノ染色; C, 発現グリシニンの消化性: レーン M, 分子量マーカー; レーン 1, 塩可溶性タンパク質 (非組換え体); レーン 2, 塩可溶性タンパク質 (組換え体); レーン 3, 全タンパク質 (非組換え体); レーン 4, 全タンパク質 (組換え体); レーン 5, 組換え体抽出塩可溶性タンパク質の胃液処理前; レーン 6, 組換え体抽出塩可溶性タンパク質の胃液処理後; レーン 7, 組換え体抽出塩可溶性タンパク質の腸液処理前; レーン 8, 組換え体抽出塩可溶性タンパク質の腸液処理後。P, グリシニン前駆体; Ac, グリシニン酸性サブユニット。

栽培の影響を研究するためには、組換え体を容易に判別（モニタリング）できる必要がある。遺伝子組換え作物のモニタリング法として、（１）導入遺伝子産物の機能性あるいは免疫性による検出；（２）特異的プローブを用いた導入遺伝子の検出；（３）マーカーの性質を利用した検出の３つがあげられる。このうち、導入遺伝子を直接検出する方法（２）は特異性が高く、他の組換え植物の検出にも適用できる。筆者らは、遺伝子組換え作物のモニタリング系を確立するため、除草剤耐性ダイズが混入したアメリカ産 IOM ダイズ（インディアナ、オハイオ、ミシガン州産）について除草剤耐性遺伝子組換えダイズの検出を試みた。現在、厚生省が認可した遺伝子組換え食品は 6 品種 20 品目に上っている。このうち、IOM ダイズは日本に輸入されているダイズの 80% を占め、ダイズ油や豆腐の原料に使用されている。

まず、検出法（１）に分類されるジャーミングテストを行った。これは実際に除草剤を散布し非枯死体を確認する方法である。IOM ダイズを三葉期まで約 2 週間栽培し、除草剤ラウンドアップを散布したところ、96 年度産で約 1.1%¹⁷⁾、97 年度産については約 8.6% が除草剤耐性を示した¹⁸⁾。これは、アメリカでの除草剤耐性ダイズ作付面積が 96 年約 1.6%、97 年 12% と見積もられているのほぼ対応する値である。さらに、98 年では作付面積は 35~40% と見積もられている。

次に、除草剤耐性を示したダイズに対して、検出法（２）に分類される導入遺伝子の検出を行った。除草剤耐性遺伝子は、カリフラワーモザイクウィルス 35 S プロモーターとノパリンシンターゼターミネーターとの間に挿入する形で構築されている。そこで、プロモーター及びターミネーターの遺伝子配列よりプライマーを設計し、ダイズ葉ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った（第 4 図）。除草剤耐性を示したダイズでは、遺伝子の増幅が認められた。この塩基配列を解析し、増幅遺伝子がプロモーター及びターミネーター遺伝子であることを確認した。カリフラワーモザイクウィルス 35 S プロモーター及びノパリンシンターゼターミネーターは、遺伝子組換え植物を作製する際によく用いられることから、この検出法は広くそれらの組換え作物に対しても適用可能であると考えられる。また、前述のグリシニン遺伝子組換えジャガイモについても、この検出法を用いてグリシニン遺伝子を検出

第 4 図 除草剤耐性ダイズの遺伝子構成とプロモーター、ターミネーター遺伝子の検出

A, 除草剤耐性ダイズの遺伝子構成（35 S, プロモーター；CP 4 EPSPS, 除草剤耐性遺伝子；NOS, ターミネーター）；B, プロモーター及びターミネーター遺伝子の検出；レーン M：分子量マーカー；レーン 1, 除草剤耐性ダイズ DNA とプロモーター認識プライマーを用いた PCR 産物；レーン 2, 除草剤感受性ダイズ DNA とプロモーター認識プライマーを用いた PCR 産物；レーン 3, 除草剤耐性ダイズ DNA とターミネーター認識プライマーを用いた PCR 産物；レーン 4, 除草剤感受性ダイズ DNA とターミネーター認識プライマーを用いた PCR 産物

した²⁾。遺伝子組換え作物のモニタリングは、導入遺伝子の環境安全性の評価だけでなく、今後、流通する作物の品質管理にも重要となる。

5 お わ り に

食糧の「増産」を目的とした第一世代の遺伝子組換え作物で発現しているタンパク質は概して微量であり、例えば病虫害抵抗性作物において殺虫性タンパク質が占める割合は全タンパク質の 0.01% 以下に過ぎない。一方、健康の維持・増進性や加工特性など作物の「質的改善」を目的した第二世代遺伝子組換え作物では、機能性タンパク質を大量（数%程度）に発現させることが望まれる。計画性、正確性をもった遺伝子組換え技術により作製される遺伝子組換え作物は、従来の品種改良により作製される作物と比べて安全性が劣るとは考えられていない。しかし、遺伝子組換えジャガイモやコメの場合に見られるように、予期せぬ成分変動も生じ得る。また、今後は天然遺伝子だけでなく、意図した機能を発現するように分子設計された遺伝子が

使われる。したがって、非天然型タンパク質の大量発現を必要とする第二世代遺伝子組換え作物の安全評価には、従来の安全性評価法は必ずしも充分ではなく、ケースバイケースで動物実験を含めた詳細な健康に対する安全性評価が必要である。特に、植物ワクチンや免疫増強性作物など医薬的效果を目的とした遺伝子組換え作物においては、その作用機構を含めたより厳密な安全性の評価が求められることになるであろう。一方、葉緑体 DNA に遺伝子を導入することによって、懸念される導入遺伝子の拡散を防止する方法も検討されているが¹⁹⁾、環境への安全性評価のためには遺伝子組換え作物のモニタリングは必要である。21 世紀に懸念されている食糧問題を少しでも克服するためには、有用な遺伝子組換え作物を開発し、詳細な安全性評価を行うことにより、遺伝子組換え食品に対する社会的受容態勢を確立することが重要である。

(京都大学食糧科学研究所)

文 献

- 橋本 渉, 村田幸作: デイリーフーズ, 春季号, 14 (1997).
- 橋本 渉, 小澤祥子, 門間敬子, 村田幸作: 日本調理科学会誌, 31, 321 (1998).
- 橋本 渉, 門間敬子, 村田幸作: 「遺伝子組換え食品の光と影」, 学会出版センター (印刷中).
- 厚生省: 「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」 (1996).
- P. E. Stawick, M. A. Hermodson & N. C. Nielsen: *J. Biol. Chem.*, 256, 8752 (1981).
- M. Kito, T. Moriyama, Y. Kimura & H. Kambara: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 354 (1993).
- M. Sugano, S. Goto, Y. Yamada, K. Yoshida, Y. Hashimoto, T. Matsuo & M. Kimoto: *J. Nutr.*, 120, 977 (1990).
- FAO/WHO/UNU: "Energy and protein requirements", WHO Tech. Rep. Ser. No.724, WHO, Geneva, 1985, p. 120.
- W. Hashimoto, K. Momma, T. Katsube, Y. Ohkawa, T. Ishige, M. Kito, S. Utsumi & K. Murata: *J. Sci. Food Agric.*, (1998) (投稿中).
- S. Utsumi, S. Kitagawa, T. Katsube, T. Higasa, M. Kito, F. Takaiwa & T. Ishige: *Plant Sci.*, 102, 181 (1994).
- W. Hashimoto, *et al.*: (未発表).
- L. R. Gardon, C. Burge, D. A. Clayton & S. Karlin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3799 (1994).
- D. M. Klinman, A. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover & A. Krieg: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2879 (1996).
- A. M. Krieg, A. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, & D. M. Klinman: *Nature*, 374, 546 (1995).
- K. Momma, W. Hashimoto, S. Ozawa, S. Kawai, T. Katsube, F. Takaiwa, M. Kito, S. Utsumi & K. Murata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (印刷中).
- S. Utsumi, *et al.*: (未発表).
- N. Shirai, K. Momma, S. Ozawa, W. Hashimoto, M. Kito, S. Utsumi & K. Murata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1461 (1998).
- W. Hashimoto, S. Ozawa, N. Shirai, K. Momma, S. Kawai, S. Utsumi & K. Murata: *Recent Res. Devel. in Agricultural & Food Chem.*, (印刷中).
- H. Daniell, R. Datta, S. Varma, S. Gray & S.-B. Lee: *Nature Biotech.*, 16, 345 (1998).