



ディフェンシン産生の遺伝子組換えイネ が高感染性のヒト病原菌を生み出す

金川 貴博

研究者が自由に研究を行いたいと思うのは当然のことであるが、明らかに危険な行為は許されない。しかし、専門分野が違ふと、その危険性に気がつかないかもしれない。2005年と2006年に野外栽培されたディフェンシン産生組換えイネは、人類を滅ぼしかねない危険性を含んでいるが、この危険性をなかなか理解していただけない。

はじめに

遺伝子組換え技術は、開発の最初の段階から危険性が認識され、最初は、厳しい規制が行われたが、それが、どんどんと緩められた。遺伝子組換えの歴史は、規制緩和の歴史である。とはいえ、遺伝子組換え生物を開放系（野外など）で利用するに当たっては、さまざまな影響が考えられるので、さまざまな分野の専門家を集めて事前審査が行われる。今回の組換えイネが持つ独自の危険性（耐性菌問題）についても、事前審査で当然議論されるべき問題であったと思うが、残念ながらそれが見過ごされて承認され、農林水産省管轄の研究機構の北陸研究センター（新潟県上越市）において、2005年に野外栽培が行われた。

私がこのイネの危険性に気づいたのは、このイネの栽培差し止めを求めた裁判が起こされたという話を聞いて、申立書を読んだのがきっかけであり、2005年7月に陳述書を裁判所に提出して¹⁾、

●金川貴博（かながわ・たかひろ）●

1951年生まれ。京都学園大学バイオ環境学部教授。応用微生物学。元産業技術総合研究所研究グループ長・東京工業大学大学院教授。著書（分担執筆）「おもしろい環境汚染浄化のはなし」（日刊工業新聞社）など。

イネの栽培者に危険性を指摘したが、どうも理解してもらえなかったようである。しかしながら、同年11月にこの危険性に関連する問題が、世界的に有名な学術誌である Nature に記載された^{2,3)}こともあって、ようやく栽培者も危険性を理解したように思えたのであるが、2006年7月に、再度、野外栽培が強行された。

1 栽培されたイネ

今回野外栽培された遺伝子組換えイネは、抗菌剤を常時産生するイネである。イネの細胞内で作られた抗菌剤がイネの病原菌を殺すことで、イネが病気にかからないようにしてある。

似たような発想で作られて、すでに流通しているのが、害虫抵抗性の組換えトウモロコシ（Bt コーン）である。このトウモロコシは、害虫を殺すタンパク質（殺虫タンパク質）を細胞内で常時産生するので、害虫がこのトウモロコシのどこを食べても（葉でも茎でも花粉でも）死ぬ。しかしながら、このトウモロコシの栽培を続けると、やがてこの殺虫タンパク質が効かない害虫（耐性虫）が出現して、これが繁殖し、このトウモロコシも害虫の被害を受けると予測される。そこで、耐性虫が繁殖しないようにと、普通のトウモロコ

キーワード：遺伝子組換え生物（genetically modified organism）、抗菌タンパク質（antimicrobial peptide）、耐性菌（resistant microbe）、ディフェンシン（defensin）、病原菌（pathogen）

シで圃場を取り囲むなど、栽培に工夫がされている。

抗菌剤産生イネの場合にも、第一に考えるべきは、抗菌剤が効かない菌（耐性菌）の出現である。抗菌剤を常時産生する組換えイネの栽培によって、やがて耐性菌が出現して繁殖し、この組換えイネも病気にかかることは、誰でも予測できるが、問題はそんな単純なことだけではない。ここには、人類を滅亡させかねない耐性菌の大きな問題が隠れている。

2 挿入された遺伝子

この組換えイネが産生するのは、ディフェンシン（以下、DEF と略記する）という名前の抗菌性のタンパク質（抗菌タンパク質）である。DEF は、ヒトを含む多くの動植物が体内で産生する抗菌剤で、動植物が病原菌から身を守るための最初のバリアーとして使っている物質であり⁴⁾、名前からもわかるとおり、防御（ディフェンス）に重要な物質である。DEF には多くの種類があって、ヒトの場合でも、数種の DEF が知られている。今回のイネに挿入されているのは、アブラナ科のカラシナ（芥子菜）の DEF の遺伝子である。

遺伝子組換えで、もしもヒトの DEF 遺伝子を挿入すると提案しても、それは危険すぎて許可されるはずがない。今回のイネに挿入されたのは、カラシナの DEF 遺伝子であるが、実際にはこれが、ヒトの DEF 遺伝子を挿入したのと同じような効果を発揮するおそれがある。それは「交差耐性」という現象に起因する。この現象は後で説明するとして、DEF 耐性菌が、どれほどのおそろしい性質を持つかを、まずご理解いただくために、DEF の役割から説明する。

3 ヒト DEF の役割

私たちは、飲食や呼吸を通じて様々な種類の菌と接触しており、呼吸器や消化器の表面は、常に病原菌侵入の危険性を有している。そこで、呼吸器や消化器の上皮細胞が、必要に応じて DEF を

分泌し、病原菌を撃退する。とは言っても、DEF については、まだ研究の歴史が浅く、解明されている部分が少ないが、ヒト DEF の作用が顕著にわかる例として、2つの報告がある。まず、喘息患者の例で、治療に吸入ステロイド薬を使った場合、ステロイド薬は免疫を抑える作用があるので、肺炎や気管支炎にかかる危険性が高まる。しかしながら、気管支へ病原菌が来たときに、ステロイド剤吸入の患者では、気管支から普段よりも大量の DEF を分泌して、感染を防いでいることが明らかになっている⁵⁾。

また、エイズ感染者であっても長期間発症しない人を調べた結果、体内の免疫細胞が何かユニークな物質を作っていることが明らかになり、最近になって、その正体が α -DEF であると突き止められた⁶⁾。実際に、ヒトの α -DEF がエイズウイルスの増殖を抑制することも実験で確認された。

4 DEF 耐性菌の脅威

DEF で死ぬはずの菌が耐性を獲得した場合の恐ろしさを示す直接の実験例はまだないが、参考になる事例として、効力のある DEF を作れないマウスに、食中毒菌であるサルモネラを食べさせた実験がある⁷⁾。まず、この DEF 欠損マウス 6 匹と普通のマウス 6 匹に、約30万個のサルモネラを与えた実験では、DEF 欠損マウスでは7日目に2匹死に、8日目にさらに2匹が死んで、20日後には1匹しか残らなかったのに対し、普通のマウスでは10日後、12日後、16日後に1匹ずつ死んで、20日後でも3匹が生き残っていた。このように、DEF でサルモネラを攻撃できるかできないかで、マウスの生残に明らかな差が出た。また、マウスの半分が死ぬサルモネラの菌数は、普通のマウスでは約11万個なのに対し、DEF 欠損マウスでは1万個余だった。これらの実験結果から、もしも DEF 耐性のサルモネラが出現した場合、DEF による攻撃の効果が無いので、普通のマウスでもわずかの数のサルモネラで死んでしまうと予想される。このように、DEF 耐性菌は、普通の病原菌よりもはるかに大きな感染力を持つと考

えられる。もしも、ヒト DEF 耐性を持ったサルモネラが出現して蔓延したら、今まで以上に食品の殺菌を厳密にしないと、食中毒を起こすおそれがあり、食品の加工や流通に大きな影響が出てくる。また、もしも、DEF 耐性の肺炎菌が出たなら、ステロイド吸入をした喘息患者は肺炎にかかる危険性が非常に高くなるだけでなく、健康人でも、ストレスなどで免疫系が弱ると肺炎になるかもしれない。また、肺炎患者に近づいただけで、健康人でも肺炎になるかもしれない。もしも、肺炎が次々に伝染したなら、大パニックになるに違いない。

5 耐性菌は出やすいか出にくいのか

抗菌タンパク質の専門家として有名な Zasloff 教授は、2002年に Nature に発表した総説論文⁸⁾で、抗菌タンパク質耐性菌の出現は起こりそうにない (improbable) と記載し、多くの研究者がこれを引用している。これに対し、反論を書いたのが進化生物学者の Bell 博士である⁹⁾。そこで、この議論に決着をつけるべく、両者は共同研究を行った。大腸菌などを用いた実験の結果、24本の試験管のうち22本で耐性菌が出現して繁殖した¹⁰⁾。この結果を見て、Zasloff 教授は自説を変更し、「試験管内で起こった出来事は、実際の世界でも起こるだろう」と述べて、耐性菌の出現を警告している。

Zasloff 教授らは、抗菌タンパク質を病気治療に使う研究をしているので、その分野の研究発表しか調べなかったようであるが、植物 DEF については、すでに実験室内で簡単に耐性菌が得られている。パンや酒の製造に使われるごく一般的な酵母である *Saccharomyces cerevisiae* を、ブドウ糖や植物 DEF などと共に2日間放置しただけで耐性菌が出現して繁殖している¹¹⁾。また、アカパンカビの胞子を、ジャガイモ抽出物や植物 DEF などと共に5日間放置した場合でも、耐性菌の出現と繁殖が確認されている¹²⁾。このほかにも、欧米でチーズなどの殺菌に使われている抗菌タンパク質であるナイシンの耐性菌の報告もある¹³⁾。

6 すでに存在する DEF 耐性病原菌

実は、ヒトの病原菌には、DEF 耐性をすでに持っている菌が何種類かいる¹⁴⁾。その1つに、院内感染で有名な黄色ブドウ球菌がある。ヒトは、黄色ブドウ球菌が皮膚に付着すると、DEF を分泌して菌を殺そうとするのであるが、これが逆に、DEF 耐性を持つ黄色ブドウ球菌に住みやすい環境を与える結果になってしまう。つまり、黄色ブドウ球菌の競争相手となるはずの菌が、皮膚から分泌された DEF によって死んでしまうために、黄色ブドウ球菌の生育余地が増える。実際にヒトの鼻腔上皮を調べた結果では、ヒトの30-40%に、黄色ブドウ球菌の繁殖が確認されている¹⁵⁾。とはいえ、黄色ブドウ球菌は毒力が弱いので、上皮で繁殖しても問題ない。これが体内へ侵入して繁殖したら一大事であるが、健康人なら DEF 以外の撃退手段を繰り出すことで、侵入や繁殖を防ぐことができる。しかし、老人とか、手術直後のヒトなど、体調が落ちたヒトには、黄色ブドウ球菌を DEF で殺せないことが致命的になり、菌が体内に侵入して繁殖し、重篤な症状が出る。

もしも、毒力の強い病原菌が DEF 耐性を持った健康人でも大変なことになる。このことが次第に世界的に認識されるようになり、2005年11月2日付けの Nature の on line 版 News には、「(抗菌タンパク質の)耐性菌が出現したなら、私たちの防御システムの大部分を菌の攻撃にさらすことになる。耐性菌が広まったら、わずかな切り傷や火傷でさえも治らないかもしれない」という研究者からの警告の言葉が掲載され²⁾、2005年11月10日号の Nature にも、抗菌タンパク質の使用を慎重にするようにという研究者の見解が出た³⁾。

7 過去の耐性菌の事例に学ぶ

基本的な話として、耐性菌が出る(出現して繁殖する)かどうかは、抗菌剤と微生物との接触頻度が問題であり、接触する機会が多ければ多いほど、耐性菌が出る確率が高くなる。そのことを端的に示したのが、抗生物質の濫用である。抗生物

質は、微生物が作り出す抗菌剤で、病気の治療に頻繁に使用されている。ペニシリンは、最初に発見された抗生物質で、これが最初によく効いたのであるが、やがて耐性菌が出てきて効かなくなった。その後、新しい抗生物質が次々に登場したが、どれにも耐性菌が出てしまった。そして、最後に残った「究極の抗生物質」がバンコマイシンである。バンコマイシンの話は、DEF 耐性菌を考える上で、大いに参考になるので、以下に紹介する。

バンコマイシンは、細胞壁の生合成を阻害する物質であり、病原菌が耐性を獲得するには、細胞壁の構造変化が必要で、それは無理だと思われた。しかし、それでも耐性菌が出た¹⁶⁾。それも、バンコマイシンとは別の抗生物質であるアボパルシンの使用によって耐性菌が出現した¹⁷⁾。つまり、アボパルシン耐性菌が、バンコマイシンにも耐性を示したのである。この現象は、交差耐性とよばれるもので、病原菌にとって、アボパルシンの攻撃を回避する対策（細胞壁の構造変化）が、バンコマイシンの攻撃回避にも有効だったのである。このアボパルシンは、鶏の生育促進剤として多量に農業利用された薬剤であり、これがバンコマイシン耐性の腸炎菌を蔓延させる原因になっていることがわかったので、欧米で使用禁止となり、わが国でも農林水産省が1987年にアボパルシンの使用を禁止した。これによってバンコマイシン耐性菌の数は劇的に減少したが、消え去ったわけではなくて、やがてこの耐性の遺伝子がMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）に入り込んで（水平伝達されて）、2002年にはバンコマイシン耐性のMRSAが出現した¹⁸⁾。院内感染で有名なMRSAにとってバンコマイシンは最後の抗生物質であったのに、これも効かないということは、結局どの抗生物質も効かないということで、撃退が難しい黄色ブドウ球菌が出現してしまったのである。つまり、

- (1) バンコマイシン耐性菌は、アボパルシンの使用によって出現し蔓延した（交差耐性）。
- (2) バンコマイシン耐性を最初に獲得したのは腸炎菌であり、その影響は少なかったが、その

耐性遺伝子が、MRSAに水平伝達されて、被害が大きくなった。

この事例をDEFにあてはめると、以下の事態が予測される。

- (1) ヒトDEF耐性菌は、カラシナDEFの使用によって出現し蔓延する。
- (2) ヒトDEF耐性を最初に獲得したのは病原性の弱い（もしくは病原性のない）菌であり、その影響は少ないが、その耐性が悪性の病原菌に水平伝達されて、大きな被害が出ることになる。

さて、ここで取り上げた黄色ブドウ球菌は、前述のとおり、DEF耐性をすでに持っている。それも、あらゆる種類のDEFに対して有効な耐性である。一般に、DEFをはじめとして、すべての抗菌タンパク質は表面がプラスに荷電していて、マイナスに荷電しているカビや細菌の細胞表面に付着し、殺菌力を発揮する。これに対し、黄色ブドウ球菌は、細胞表面の構造変化でプラス荷電を増やしており、どの抗菌タンパク質も寄せ付けない¹⁴⁾。このため、ヒトDEFだけでなく、あらゆる種類のDEFに対して耐性を示す。もしも、組換えイネが産生したカラシナDEFが原因で、さまざまな菌がDEF耐性を獲得した時に、この耐性が黄色ブドウ球菌と同様であったとしたら、これらの耐性菌は、そのままヒトDEF耐性菌になる。つまり、イネがヒトDEFを産生したのと同じ効果をもたらすことになる。ここが交差耐性の怖いところである。

DEF耐性の黄色ブドウ球菌がバンコマイシン耐性を獲得して被害を出すといっても、これに感染するのは体力が落ちている人に限られており、健康人にはほとんど関係ない。しかし、もっと毒力の強い病原菌がDEF耐性を獲得すると、これは、健康人にも大きな脅威になる。何せ、今まで病原菌の侵入を防いでいた最初のバリエーをDEF耐性菌は突破してしまうのであるから、その脅威の度合いは、抗生物質耐性菌よりもはるかに大きい。

8 DEF 産生組換えイネのどこが問題か

生物が抗菌剤を作る場合は、必要なときにだけ作ることで、攻撃対象の菌が抗菌剤と接触する機会をできるだけ少なくし、耐性菌の出現を防いでいる。したがって、畑にカラシナをたくさん植えても、カラシナ DEF 耐性菌は出てこない。同様に、抗生物質の場合でも、抗生物質生産菌は、必要性を感じた時にしか抗生物質を作らないから、自然状態で抗生物質耐性菌がはびこることなど起こりえず、したがって、抗生物質第一号のペニシリンは、最初は劇的に効いた。

さて、今回の組換えイネが従来の生物と大きく異なる点は、挿入されたカラシナ DEF 遺伝子の生産を調節する部分にある。カラシナの場合なら、必要の度合いに応じて DEF 生産量を適切に調整しているはずであるが、イネにカラシナ DEF 遺伝子を挿入する時に、この調節部分を切り離して、その代わりに、調節の効かない別物がくっつけてある。この結果、病原菌が来るか来ないかにかかわらず、常に多量のカラシナ DEF を作り続けるイネが誕生した。DEF の常時多量産生が菌と DEF との接触の機会を大いに増やすことになり、耐性菌出現の確率を大幅に高める結果になる。

9 DEF 産生イネの栽培で何が起こるか

DEF 産生組換えイネは、水田で栽培されるので、畑で栽培される作物よりも耐性菌の出現や流出のおそれが高いと考えられる。土 1 g には、10 億個ほどの菌が存在していて、植物の病原菌だけでなく、ヒトの病原菌も常在している。それに、水田では様々な昆虫が成育し、また、魚、蛙、蛇、鳥などさまざまな生物も来るので、そこにいる菌の多様性も大きく、菌の移動も大きい。引き込んだ河川水の中の病原菌（大腸菌 O-157 など）も水田に入って来て、この水がまた周囲へ流出していく。このような多種多様の菌がいる水田でこの組換えイネを栽培したら、多種多様の DEF 耐性菌が生まれ、広く周囲へ散っていくと考えられる。

DEF と接触して耐性を獲得した菌が非病原性

であっても、たとえば、その非病原菌が、草などとともに牛や豚に摂食されたり、昆虫に取り込まれたりした後に、その体内で耐性遺伝子が病原菌に移動（水平伝達）する可能性がある。動物の腸管では、病原菌排除のために DEF を分泌するので、耐性菌の競争相手になる菌が DEF で排除されて、耐性菌が選択的に増殖する格好の場になる。

今回は、ヒトへの影響を中心に、この組換えイネの危険性を論じたが、他の動植物も DEF 耐性菌の影響を受ける。他の動植物が耐性菌の影響を受けて生態系が変化し、その影響が人類に及ぶという可能性も大きい。

10 見逃された危険性

抗菌タンパク質を生産するイネが野外栽培されたのは、今回が初めてではない。また、外国においても、抗菌タンパク質を生産する植物がすでに野外栽培されている。しかしながら、ここから生じる耐性菌の危険性を指摘した人がこれまで誰もいなかったようである。そこで私は 2005 年 9 月に英文の open letter を発信して¹⁹⁾、注意を促した。私のような微生物学の専門家なら、当然に気が付く問題であると思うが、対象が組換え植物という専門違いの分野の実験では、目にとまる機会が少ない。私も今回は、イネの栽培が裁判沙汰になったので初めて気が付いたが、裁判を起こす人がいなかったら、私も気がつかなかっただろう。

遺伝子組換え技術には、技術そのものに内在する危険性だけでなく、今回のイネのように、挿入される遺伝子とそれを受け取る生物の組み合わせから来る個別的な危険性がある。専門分野が違えば、気づかないということは当然に起こることであり、遺伝子組換えについては、見逃されてしまっている個別的な危険性が他にもあるように思う。

おわりに

DEF 耐性菌は、私たちの病原菌撃退のための最初のバリヤーを突破するものであり、非常に危険である。その危険性を考えたなら、万が一にも耐性菌を出ささせてはいけないのであり、したがっ

て、耐性菌出現につながるような行為は絶対に行ってはならない。一個でも耐性菌が出現し、その環境が増殖に適しておれば、億単位にまで増殖するのにたいした時間を要しない。抗生物質耐性菌の場合は、アボパルシンの例でも、使用禁止にすることで耐性菌を劇的に減らすことができたが、DEF耐性菌の場合はそうはいかない。病原菌が来た時に、DEFを分泌してこれを撃退しようとするのは、私たちの体が自然に行う行為であって、相手がDEF耐性菌だから分泌をやめようというわけにはいかない。したがって、DEFを分泌することで、耐性菌を選択的に増殖させる場を、私たち自身が与えてしまうことになる。このようなDEF耐性菌独特の危険な側面について、あまりにもまだ認識が遅れているのが現状である。

参考文献

- 1) 金川貴博：陳述書，新潟地裁高田支部，2005年7月7日。
- 2) Schubert, C.: Microbes overcome natural antibiotic: Might we create superbugs that resist our bodies' ancient defences?, Nature News on line, 2 November 2005.
- 3) Buckling, A., Brockhurst, M.: RAMP resistance, *Nature*, **438**, 170-171 (2005).
- 4) 川田元滋, 黒田秧, 田中有司: 抗菌蛋白質ディフェンシンの多様な機能特性, *化学と生物*, **43**, 229-234 (2005).
- 5) Homma, T., Kato, A., Hashimoto, N., Batchelor, J., Yoshikawa, M., Imai, S., Wakiguchi, H., Saito, H., Matsumoto K.: Corticosteroid and Cytokines Synergistically Enhance Toll-Like Receptor 2 Expression in Respiratory Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 463-469 (2004).
- 6) Zhang, L., Yu, W., He, T., Yu, J., Caffrey, R. E., Dalmaso, E. A., Fu, S., Pham, T., Mei, J., Ho, J. J., Zhang, W., Lopez, P., Ho, D. D.: Contribution of human α -defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science*, **298**, 995-1000 (2002).
- 7) Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchel, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M., Parks, W. C.: Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*, **286**, 113-117 (1999).
- 8) Zasloff, M.: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**, 389-395 (2002).
- 9) Bell, G., Gouyon, P.-H.: Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins, *Microbiology*, **149**, 1367-1375 (2003).
- 10) Perron, G. G., Zasloff, M., Bell, G.: Experimental evolu-

tion of resistance to an antimicrobial peptide, *Proc. R. Soc. B*, **273**, 251-256 (2006).

- 11) Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P., Broekaert, W. F.: Specific binding sites for an antifungal plant defensin from *Dahlia* (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **13**, 54-61 (2000)
- 12) Ferket, K. K. A., Levery, S. B., Park, C., Cammue, B. P. A., Thevissen, K.: Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to antifungal plant defensins, *Fungal Genet. Biol.*, **40**, 176-185 (2003).
- 13) Gravesen, A., Axelsen, A.-H. J., Mendes da Silva, J., Hansen, T. B., Knochel, S.: Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness cost in *Listeria monocytogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 756-764 (2002)
- 14) Peschel, A.: How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.*, **10**, 179-186 (2002).
- 15) Fedtke, I., Gotz, F., Peschel, A.: Bacterial evasion of innate host defenses - the *Staphylococcus aureus* lesson, *Int. J. Med. Microb.*, **294**, 189-194 (2004).
- 16) 平松啓一：高度バンコマイシン耐性MRSAの出現，<http://www.staphylococcus.org/jp/srl.html>，2002年9月1日
- 17) Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Jensen, L. B., Hammerum, A. M., Bager, F.: Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe, *Emerging Infect. Dis.*, **5**, 329-335 (1999).
- 18) CDC: *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-- United States, 2002, *MMWR*, **51**, 565-567 (2002).
- 19) Open letter from Dr. Takahiro Kanagawa: <http://www.gmwatch.org/archive2.asp?arcid=5689>, 2005年9月7日