

19990704

厚生科学研究費補助金研究報告書

(生活安全総合研究事業)

課題名：組換えDNA食品の安全性の確保に関する研究

課題番号：H11-生活-033

研究代表者氏名：鎌田 博  
所属：筑波大学生物科学系

平成11年度報告書

## 組換えDNA食品の安全性の確保に関する研究

主任研究者 鎌田 博 筑波大学生物科学系教授・遺伝子実験センター長

研究要旨 厚生省が安全性を既に確認し、我が国に輸入され、流通している遺伝子組換え農作物（ダイズとトウモロコシ）のうち数系統とその加工食品を検知するための簡便なDNA抽出法とPCR法を開発し、その有効性を確認した。さらに、この技術を基礎としたモニタリング法についてもマニュアル化を進め、このマニュアルをもとに一部の検疫所におけるモニタリングを実施した。一方、後代交配種における導入遺伝子の安定性を調査するため、導入遺伝子とその周辺の配列を増幅するためのPCR法を開発し、増幅断片の塩基配列決定が可能であることも明らかにした

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

豊田 正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部・部長  
小関 良宏 東京農工大学工学部・助教授  
石田 寅夫 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部・教授

プルを取り扱うことを可能とする簡便なDNA抽出法を開発することとした。具体的には、従来から広範に利用されているCTAB法を改良することとした。また、このようにして開発された方法をモニタリング手法として適用するためにマニュアル化し、その方法を輸入種子や加工食品に適用し、実際に適用可能か否かについても検討することとした。

一方、導入遺伝子の後代交配種における安定性を調査する手法として、導入遺伝子内に設定したプライマーと任意のプライマーを用いるPCR法が適用できるか否かについて検討し、もし目的とするDNA断片が得られるならば、その塩基配列決定が可能か否かについても検討することとした。

## A. 研究目的

遺伝子組換え技術の進展に伴って、多種多様な遺伝子組換え植物が育成され、そのうちの一部については既に農作物としての利用が行われている。このような農作物については、申請者からの情報に基づいて厚生省が定めた安全性評価指針に則って食品としての安全性が確認されている。しかし、実際に遺伝子組換え農作物やその加工食品がどの程度我が国に輸入され、流通しているかについては具体的なデータはほとんどなく、モニタリング調査を実施することが強く求められている。そこで、本研究では、遺伝子組換え農作物とその加工食品について、それを検知するための方法を開発し、検疫所等におけるモニタリングを実施するための方策を検討することを大きな目的としている。また、遺伝子組換え農作物についてはその後代交配種における導入遺伝子の安定性が大きな問題となることから、導入遺伝子の安定性を確認するための方法を開発することも目的としている。

## B. 研究方法

遺伝子組換え植物の検知方法としては、導入遺伝子産物であるタンパク質を用いる方法もあるが、本研究では、検出感度が高く、再現性・汎用性も高いPCR法を主に開発することとした。本年度は、厚生省で既に安全性が確認されている農作物のうち、我が国に大量に輸入され、利用されているダイズとトウモロコシについて、数種系統を特異的に検出するためのプライマーを決定するとともに、大量のサン

## C. 研究結果

3年計画の初年度である本年度は、既に厚生省によって食品としての安全性が確認されており、我が国に大量に輸入されていると考えられているダイズとトウモロコシの系統のうち、数系統（ラウンドアップレディダイズ、Event176、Bt11、Mon810、T14/T25）を特異的に検知するために必要なプライマーの設計を行った。このプライマーを用いることで、実際に種子やスナック菓子についてこれらの系統を特異的に検知できることが示された。同時に、従来から広範に用いられてきたCTAB法をさらに改良した簡便なDNA抽出法を開発した。この改良法は、ダイズやトウモロコシの種子ばかりでなく、その加工食品である豆腐やスナック菓子からのDNA抽出にも利用可能であることが確認され、さらに、この方法で抽出したDNAを用いてPCRを実施することが可能であることも明らかにすることができた。

そこで、このようにして開発されたDNA抽出法やPCR法をマニュアル化し、そのマニュアルを利用して、輸入ダイズの一部についてモニタリング調査を検疫所および主任研究者によってロット毎（同じロットを両者で分割して調査）に実施した。モニタリング調査の結果は、検疫所と主任研究者で同一となったことより、このマニュアルによって信頼性あ

るデータが得られることが明らかとなった。

一方、後代交配種における導入遺伝子の安定性を調べる方法の1つとして、導入遺伝子とその挿入位置周辺の配列を決定し、親品種と後代交配種における変化の有無を検討する方法が有力と考えられる。そこで、導入遺伝子内のプライマーとランダムプライマーを用いるPCR法によって導入遺伝子とその挿入位置周辺の植物DNA配列を含むDNA断片を増幅することが可能であることが示され、さらに、その増幅断片の塩基配列を決定することも可能であることが示された。

#### D. 考察

本年度の研究により、厚生省が既に食品としての安全性を確認しているダイズとトウモロコシのうち数系統については、適切なプライマーの決定と簡便なDNA抽出法を確立することで、各々の系統を見分けながら検知するPCR法を確立することができた。また、実際にこの方法を検疫所における輸入ダイズのモニタリングや市場に出回っているトウモロコシを原料とするスナック菓子に適用できることも明らかとなった。今後は当初計画に基づいて、さらに多くの遺伝子組換え農作物の各系統を検知することができるプライマーを決定することで、より多くの種類を個別に検知することが可能となり、遺伝子組換え農作物とそれを原料とする加工食品のモニタリングが可能になるものと思われる。

一方、後代交配種における導入遺伝子の安定性を調査する一般的な方法の一つとして、導入遺伝子とその挿入位置周辺の配列を増幅するためのPCR法を開発した。この方法で増幅した断片の塩基配列を決定することも可能であった。この方法で決定された塩基配列を活用することで、系統毎の検知がより容易になるため、今後は、系統毎の検知技術としての活用についても検討する必要がある。さらに、今後は、この方法を用いることで、輸入農作物やその加工食品について導入遺伝子の安定性を調査することが可能となろう。

#### E. 結論

我が国に現在輸入されている遺伝子組換え農作物のうち量的に最も多いダイズとトウモロコシについて、厚生省で既に安全性が確認されている数系統を対象とし、それらを特異的に検知するための簡便なDNA抽出法とPCR法を開発することができた。さらに、実際にこの新たな検知法を用い、輸入時点でのダイズ種子とトウモロコシから作成されたスナック菓子について遺伝子組換え体の含有の有無をモニタリングすることができた。一方、後代交配種については、導入遺伝子とその周辺配列を含むDNA断片を増幅し、その塩基配列を決定する方法を確立することができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 松岡猛、川島よしみ、穠山浩、三浦裕仁、合田幸広、瀬畑環、一式賢司、豊田正武、日野明寛「ダイズ及びダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検知法(第1報)」食衛誌. 40(2) 149-157 (1999).
- 2) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusaba, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., "A method of detecting recombinant DNA from genetically modified maize" J. Food Hyg. Soc. Japan, 41(2): in press, 2000
- 3) Yamaguchi, H., Sasaki, K., Kidachi, Y., Shirama, K., Kiyokawa, S., Ryoyama, K., Matsuoka, T., Hino, A., Umetsu, H., Kamada, H., "Detection of recombinant DNA in genetically modified soybean and tofu", Japan. J. Food Chem., in submission, 2000

##### 2. 学会発表

- 1) 日野明寛、松岡 猛、川島よしみ、三浦裕仁、日下部祐子、一色賢司、穠山 浩、合田幸広、豊田正武「農産物・加工食品からの組換え遺伝子の検知法」第農芸化学会、東京、2000年4月。
- 2) 合田幸広、穠山 浩、佐々木真紀子、豊田正武、松岡 猛、日野明寛「コーンスナック菓子からのCP4EPPSPS遺伝子の検知について」第79回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2000年5月。
- 3) 日野明寛、松岡 猛、合田幸広、穠山 浩、佐々木真紀子、豊田正武「コーンスナック菓子からのbarnase遺伝子の検知について」第79回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2000年5月。
- 4) 佐々木和生、山口秀明、木立由美、白間和志、清川繁人、狛山一雄、松岡猛、日野明寛、梅津博紀、鎌田博「ダイズおよび豆腐における導入組換え遺伝子の検出」日本食品化学学会第6回学術大会、東京、2000年5月。

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
（分担研究報告書）

後代交配種等の安全性に関する研究

主任研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授・遺伝子実験センター長

研究要旨

新たに開発した組換えダイズの簡便な検知法を用いて、海外から輸入されているダイズのモニタリングへ適用し、輸入ダイズに含まれる遺伝子組換えダイズの実態調査を行った。また、組換え遺伝子の発現産物の安定性を調査するために、カナマイシン耐性遺伝子の発現ベクターの構築を行い、継続中である。

また、組換えトウモロコシの検知技術の開発を行った。Novartis Seeds 社の Event176 と Bt11 の 2 品種に由来するハイブリッド種子を用いて、ダイズで開発した技術に若干の変更を加えて簡便な DNA の抽出方法を確立した。得られた DNA をテンプレートとし、害虫抵抗性遺伝子、除草剤耐性遺伝子、抗生物質耐性遺伝子などを増幅するプライマーを用いて、導入された組換え遺伝子を検出する組換えトウモロコシの簡便な検知法を確立した。さらに、この検知方法が市販のスナック菓子に適用可能であることを明らかにした。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀（青森大学工学部）

日野明寛、松岡猛（農水省食総研）

A. 研究目的

遺伝子組換え農作物およびそれらを利用して作出された加工食品の検知法については、遺伝子組換え食品の表示問題とも絡み、世界各国で技術開発が行われているが、導入遺伝子や導入遺伝子産物を検出するための一般的な方法は未だ確立されておらず、このような検知方法が開発されなければ、遺伝子組換え食品の表示に問題が残る。日本においては、JAS 法の下に遺伝子組換え食品の表示が義務付けられるため、遺伝子組換え食品の検知技術が早急に開発されることが不可欠の現状になっている。我々は、昨年度までに、除草剤耐性遺伝子を導入した組換えダイズとその加工食品から、導入した遺伝子を簡便に検知する方法を開発してきた。本年度は、この技術を利用して、海外から輸入されたダイズを用いて、遺伝子組換えダイズのモニタリングへの適用を検証した。また、タンパク質レベルでの後代における安定性を調査するために、カナマイシン耐性遺伝子（Km<sup>R</sup>）

の発現ベクターの構築に着手した。さらに、トウモロコシにおける組換え遺伝子の検知技術の開発を行った。また、この技術の有効性を検証するために、市販されているスナック菓子を用いて、組換え遺伝子の検知を行った。

B. 研究方法

＜試料＞

輸入ダイズは、モニタリング用に検疫所で採取したものをを用いた。

除草剤耐性遺伝子を導入した組換えダイズ種子は、安全性確認を申請した企業である Monsanto 社から供与されたものをを用いた。

組換えトウモロコシの Event176 と Bt11 のハイブリッド種子およびこれらと遺伝的バックグラウンドの異なる非組換えトウモロコシ種子(control)は、Event176 と Bt11 の安全性確認を申請した企業である Novartis Seeds 社から供与されたものをを用いた。アメリカ産のキャルコーン 90 および国産の白縮

と黒縮は、市販されているものを用いた。

トウモロコシ加工食品であるスナック菓子は、市販されている4種（カルビー”焼きもち”、ハウス”とんがりコーン”、湖池屋”ポリンキー”、東京スナック食品”ポップコーン”）を用いた。

#### <方法>

##### ダイズ種子からの DNA の抽出

昨年度報告した、改変 CTAB 法により抽出を行った。

##### トウモロコシ種子からの DNA の抽出

ダイズで確立した改変 CTAB 法を一部改良した。乳鉢で粉碎した試料 10mg をチューブに入れ、CTAB-buffer 200  $\mu$ l を加えマイクロミキサーでホモゲナイズした。転倒混和してから 65°C で 10 分間静置した後、200 $\mu$ l のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え、5 分間転倒混和した。次いで 15,000 rpm で 5 分間室温遠心後、水層（上層）を新チューブに移し 200 $\mu$ l のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、転倒混和後、15,000 rpm で 5 分間室温で遠心し、水層（上層）を新チューブに移した。等容（約 160 $\mu$ l）の CTAB-ppt.-buffer を加え、転倒混和してから室温に 30 分間静置した。8,000 rpm で 15 分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てた。沈澱を 200 $\mu$ l の high salt TE buffer に完全に溶解し、200 $\mu$ l のイソプロパノールを加え、転倒混和してから、15,000 rpm で 10 分間室温で遠心後、デカンテーションで上澄み液を捨てた。さらに、200 $\mu$ l の 70%エタノールを側面から静かに加え、15,000 rpm で 5 分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てた。もう一度、200 $\mu$ l の 70%エタノールを加え、15,000 rpm で 5 分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てた後、減圧下で乾燥し、20 $\mu$ l の TE を加えて完全に溶解したものを DNA 抽出溶液とした。

##### スナック菓子からの DNA の抽出

トウモロコシ種子からの抽出と同様に行った。

##### PCR

PCR 反応液は、1 $\times$ PCR 緩衝液(宝酒造(株))、0.2mM dNTP、0.2 $\mu$ l プライマーおよび 1unit Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、DNA 溶

液 1 $\mu$ l を加え、全量を 25 $\mu$ l にした。ダイズ種子の導入遺伝子の増幅は、95°C に 5 分間保った後、95°C で 30 秒間、57°C で 30 秒間、74°C で 1 分間に設定し、30 サイクルの増幅反応を行った後、74°C で 5 分間終了反応を行った。トウモロコシ種子の導入遺伝子の増幅は、95°C に 3 分間保った後、95°C で 30 秒間、62°C で 30 秒間、74°C で 30 秒間に設定し、45 サイクルの増幅反応を行った後、74°C で 5 分間終了反応を行った。

##### 電気泳動

PCR 反応液 5 $\mu$ l を 1.5% のアガロースゲルにアプライし、100V の電圧下 TAE 緩衝液で約 30 分間泳動を行った。次いでゲルをエチジウムブロマイド溶液で 10 分間処理し、青色 LED (470nm) により励起された PCR 増幅バンドを、CCD カメラを用いて撮影した。

##### Km<sup>R</sup>発現ベクターの構築 (図 1)

組換えダイズより DNA を抽出し、これをテンプレートとして、Km<sup>R</sup>全長を増幅するように新たに設計したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 増幅産物は、pCR2.1<sup>TM</sup> ベクターを用いてクローニングを行った。挿入方向を制限酵素処理により確認し、正方向に挿入されたプラスミドより NdeI 及び EcoRI を用いて切り出した。また、pET23d(+) ベクターを制限酵素処理により開環した。

#### C. 結果・考察

##### C.1. 輸入ダイズのモニタリング (表)

検疫所より送付された輸入ダイズの調査は、検体より 10~20 粒をサンプリングし、1 粒ずつ DNA を抽出し、PCR により導入遺伝子の検知を行った。結果は、表に示した。現在までに、アメリカ合衆国からの輸入ダイズ以外では、除草剤耐性遺伝子は検出されていない。

##### C.2. Km<sup>R</sup>発現ベクターの構築

Km<sup>R</sup>を大腸菌で発現させるために、組換えダイズに導入されている Km<sup>R</sup>を PCR で増幅させ、これを発現ベクターに組み込み発現ベクター構築を行うこととした。その概略は、図 2 に示してある。現在までに、PCR 産物をクローニングしたプラスミドからの制限酵素による目的遺伝子の切断と発現用ベクター

pET23d(+)の開環を済ませており、今後両者のライゲーションと大腸菌への導入を行い、発現を確認する予定である。得られたタンパク質は精製し、抗体を作成し、Km<sup>R</sup>に由来するタンパク質の検出を試みる。

### C.3. Event176 及び Bt11 の導入遺伝子の検知

Novartis Seeds 社より供与された 3 種類の種子より DNA を調製し、導入遺伝子の検出を行った。PCR には、V. B. Ehlers et al. (1997) により報告されたプライマーと日野らにより設計されたプライマーを用いた (図 2)。その結果、Event176 においては、害虫抵抗性遺伝子(cryIA(b))、除草剤耐性遺伝子(bar)、抗生物質耐性遺伝子(amp<sup>R</sup>)及び CaMV 35S プロモーター(P35S)の増幅が確認された。Bt11 においては、cryIA(b)、除草剤耐性遺伝子(pat)、amp<sup>R</sup> 及び P35S の増幅が確認された。非組換えトウモロコシの control では、害虫抵抗性遺伝子と除草剤耐性遺伝子の増幅は認められなかったが、amp<sup>R</sup> 及び P35S の増幅が確認された。

Event176 及び Bt11 においては、用いた全てのプライマーが導入遺伝子の検知に有効であることが確認されたが、amp<sup>R</sup> 及び P35S を増幅するプライマーでは、非組換えトウモロコシにおいても、組換え体と同じサイズの増幅断片が得られたため、キャルコーン 90 と国産トウモロコシ(黒縮、白縮)より DNA を抽出し、上記全てのプライマーを用いて PCR を行った。その結果、cryIA(b)、bar、pat および amp<sup>R</sup> の増幅は認められなかったが、P35S の増幅が確認された。

以上の結果より、amp<sup>R</sup> は Novartis Seed 社より供与された非組換え体の control だけで増幅されること、P35S は、全てのトウモロコシ種子において増幅されることが明らかとなり、組換え体の特定には、P35S は使えないことが示唆された。また、Novartis Seed 社より供与された非組換え体の control で増幅された amp<sup>R</sup> は、その塩基配列からバクテリ

ア由来と考えられるが、トウモロコシ種子に組み込まれているのか、なんらかの汚染によるものかは、さらに検討が必要である。

### C.4. スナック菓子の組換え遺伝子の検出

スナック菓子より抽出した DNA をテンプレートとし、種子における導入遺伝子の検出に用いたプライマーを用いて PCR により組換え遺伝子の検出を試みた。その結果、検討した 4 種類のスナック菓子全てにおいて、cryIA(b)と除草剤抵抗性遺伝子(bar, pat)は検出されず、P35S と amp<sup>R</sup> が検出された。P35S は非組換えトウモロコシにおいても増幅が確認されたことより、スナック菓子の原材料のトウモロコシに組換え体が使われているとすることはできない。また、amp<sup>R</sup> は、Novartis Seed 社から供与された非組換え体(control)からも検出されていることから、これについても原材料への組換えトウモロコシの使用を断定することはできない。スナック菓子で増幅された amp<sup>R</sup> は、現在塩基配列の確認を行っている。

## D. 研究発表

(論文発表)

H. Yamaguchi, K. Sasaki, Y. Kidachi, K. Shirama, S. Kiyokawa, K. Ryoyama, T. Matsuoka, A. Hino, H. Umetsu and H. Kamada, "Detection of recombinant DNA in genetically modified soybean and tofu", *Jpn. J. Food Chem.*, in submission.

(学会発表)

佐々木和生、山口秀明、木立由美、白間和志、清川繁人、猿山一雄、松岡猛、日野明寛、梅津博紀、鎌田博「ダイズおよび豆腐における導入組換え遺伝子の検出」日本食品化学学会第 6 回学術大会、東京、2000 年 5 月。

輸入ダイズモニタリング

No.	品名	生産国	検体採取地	供試サンプル数	組換え遺伝子検出個体数	(%)	備考
N-1	大豆	アメリカ合衆国	名古屋	20	0	0	
N-2	大豆	アメリカ合衆国	名古屋	20	0	0	
N-3	大豆	アメリカ合衆国	名古屋	10	0	0	
N-4	大豆	カナダ	名古屋	10	0	0	
T-1	大豆	アメリカ合衆国	東京	20	0	0	
T-2	大豆	オーストラリア	東京	10	0	0	
T-3	大豆	中国	東京	10	0	0	
T-4	大豆	アメリカ合衆国	東京	10	0	0	
T-5	大豆	アメリカ合衆国	東京	10	0	0	
Y-1	大豆	アメリカ合衆国	横浜	20	8	40	
Y-2	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	21	11	52	
Y-3	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	20	5	25	
Y-4	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	25	0	0	
Y-5	黄大豆	カナダ	横浜	20	0	0	
Y-6	黄大豆	ブラジル	横浜	20	0	0	
Y-7	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	25	8	32	
Y-8	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	25	14	56	
Y-9	黄大豆	中国	横浜	20	0	0	
Y-10	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	10	4	40	
Y-13	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	10	6	60	
Y-16	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	10	0	0	H11年度産
Y-17	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	10	0	0	H11年度産
Y-18	黄大豆	アメリカ合衆国	横浜	10	6	60	H11年度産

主任研究者の結果

## グリホサート耐性遺伝子検知結果

### 検疫所での結果

	検体番号	検体名	輸出国	検体採取日	試験結果
1	Y-1	大豆	アメリカ	H11.9.7	EPSPS(+)
2	Y-2	黄大豆	アメリカ	H11.9.13	EPSPS(+)
3	Y-3	黄大豆	アメリカ	H11.9.17	EPSPS(+)
4	Y-4	黄大豆	アメリカ	H11.9.20	EPSPS(+)
5	Y-5	黄大豆	カナダ	H11.9.24	EPSPS(-)
6	Y-6	黄大豆	ブラジル	H11.9.29	EPSPS(-)
7	Y-7	黄大豆	アメリカ	H11.10.7	EPSPS(+)
8	Y-8	黄大豆	アメリカ	H11.10.13	EPSPS(+)
9	Y-9	黄大豆	中国	H11.10.16	EPSPS(-)
10	T-1	大豆	アメリカ	H11.10.25	EPSPS(-)
11	Y-10	黄大豆	アメリカ	H11.10.15	EPSPS(+)
12	Y-11	大豆	ブラジル	H11.10.19	EPSPS(-)
13	T-2	大豆	オーストラリア	H11.10.22	EPSPS(-)
14	Y-12	黄大豆	アメリカ	H11.11.5	EPSPS(+)
15	T-3	大豆	カナダ	H11.11.19	EPSPS(-)
16	T-4	大豆	アメリカ	H11.11.29	EPSPS(-)
17	T-5	大豆	アメリカ	H11.12.3	EPSPS(-)
18	Y-13	黄大豆	アメリカ	H11.11.19	EPSPS(+)
19	Y-14	黄大豆	中国	H11.12.1	EPSPS(-)
20	Y-15	黄大豆	カナダ	H11.11.30	EPSPS(-)
21	Y-16	黄大豆	アメリカ	H11.12.11	EPSPS(+)
22	Y-17	黄大豆	アメリカ	H11.12.10	EPSPS(-)
23	Y-18	黄大豆	アメリカ	H11.12.14	EPSPS(+)
24	Y-19	黄大豆	アメリカ	H11.12.14	EPSPS(-)
25	Y-20	黄大豆	アメリカ	H11.12.20	EPSPS(-)
26	T-6	大豆	アメリカ	H11.12.21	EPSPS(-)
27	T-7	大豆	アメリカ	H11.12.24	EPSPS(-)
28	T-8	大豆	カナダ	H11.12.24	EPSPS(-)
29	T-9	大豆	アメリカ	H12.1.11	EPSPS(-)
30	Y-21	黄大豆	アメリカ	H12.1.5	EPSPS(+)
31	T-10	大豆	カナダ	H12.2.2	EPSPS(-)

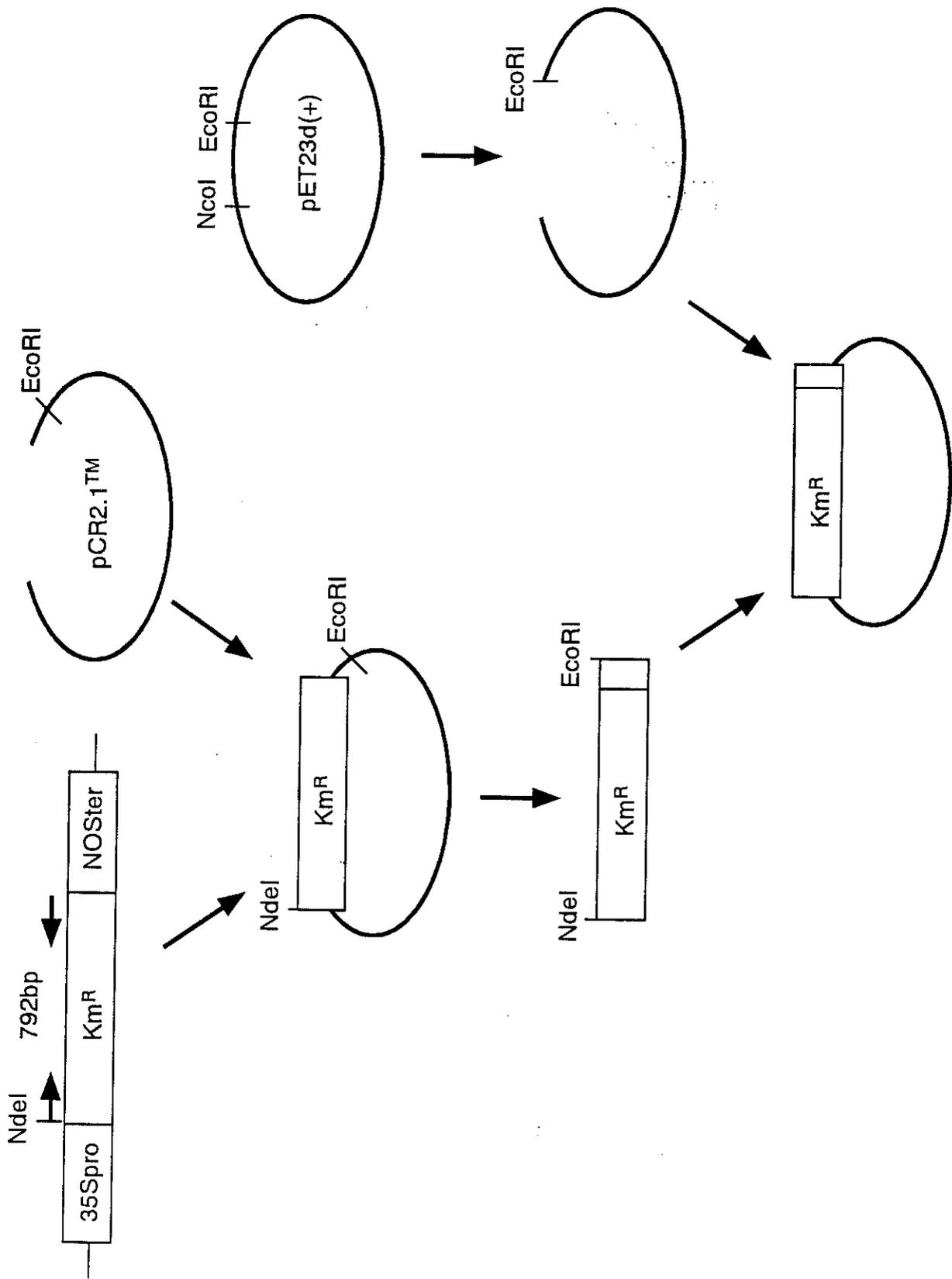
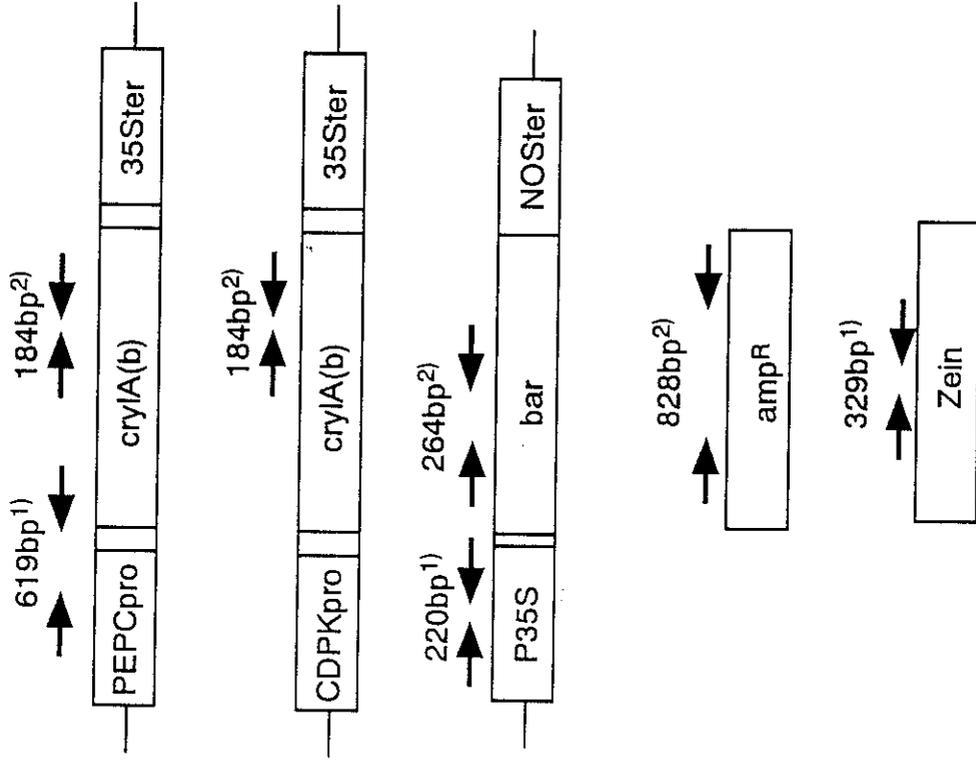


図1 Km<sup>R</sup>発現ベクター構築の概略

Event176



Bt11

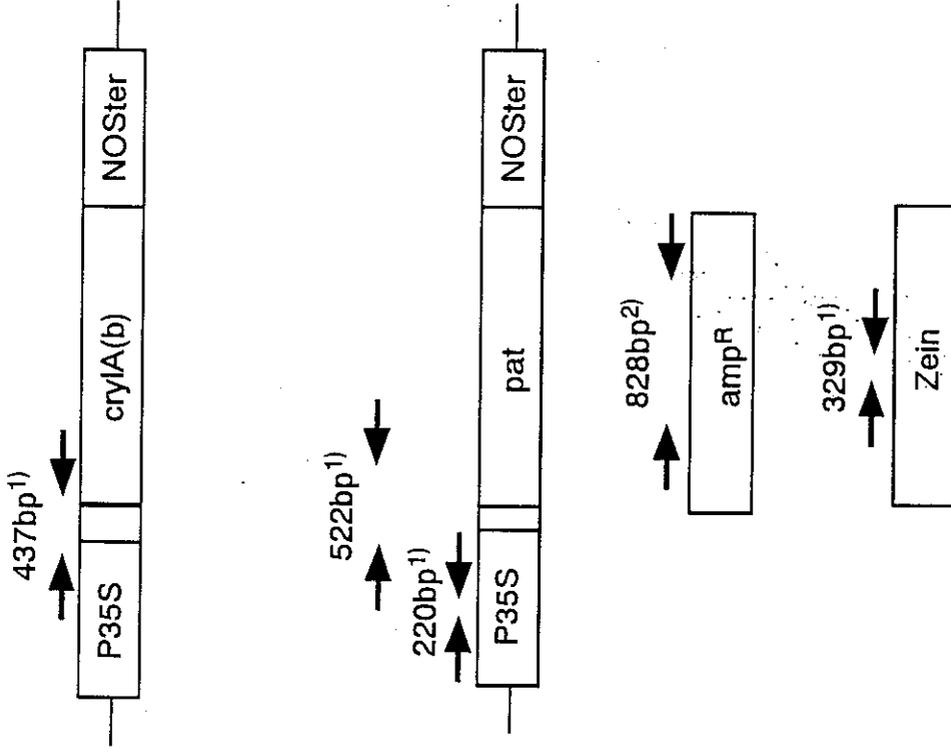


図2 Event176およびBt11に導入されている遺伝子と内在遺伝子(Zein)

→←は、PCRに用いたプライマーとその増幅長

¹) 日野ら (personal communication) ²) V.B.Ehlers *et al.* (1997)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
（分担研究報告書）

組換え体の検知に関する研究

分担研究者 豊田正武 国立衛研医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

組換えトウモロコシを検知する方法について検討を行った。安全性確認済みトウモロコシ4品種（Event176, Bt11, Mon810, T14/T25）について、個別の品種を識別できる信頼性の高い方法を開発する目的で、2つ以上の生物種由来の配列をプライマーとして組み合わせ、PCR法で増幅する方法を試み、検知法を確立した。さらに、これらの品種について、マルチプレックスプライマーを用いる迅速検知法についても検討した。次に、安全性未確認トウモロコシ（平成11年11月確認済み）のうち、米国でRoundUP Readyの名で市販されているトウモロコシGA21について、PCR増幅バンド長の差で検知する方法の開発に成功した。さらに、入手できた組換えトウモロコシを利用し、PCRで個別の遺伝子領域内を増幅し、その遺伝子が含まれているかどうかを確認する、個別遺伝子の検知についても検討を行った。また、市販のELISAを用いた検知法についても検討した。

協力研究者

合田幸広、穂山 浩（国立衛研食品部）  
日野明寛、松岡 猛（農水省食総研）

A. 研究目的

近年、食糧需要増加に伴い、世界的に遺伝子組み換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいる。我が国においても安全性が確認されたとしたダイズ、トウモロコシ等20種類の輸入が許可されており、米国、カナダ等から輸入されている。これらは、すでに様々な食品の素材として使われており、加工食品の原材料として、あるいは家畜の飼料として、様々なかたちで我々の口に入ってきている。これら組換え食品の安全性は既に確認されているが、我が国の消費者の間では依然として安全性に不安感があり、購入の際に選択できるよう表示を要望する声が強くなって来た。ヨーロッパ各国では社会的に遺伝子組換え食品に対して不安が残っており、また自国の農産物保護の意味合いも含め、近年組換え食品の表示が義務付けられた。このような背景の中、我が国でも平成12年4月からJAS法品質表示基準に基づく表示

制度がスタートすることになり、表示制度に対応した検知技術の開発が要求されている。現在のところ、日本に輸入されている組換え農作物で、表示制度の対象となりうる農作物は、ダイズとトウモロコシである。我々は、昨年度の研究で、既に除草剤耐性遺伝子組換えダイズを特異的に高感度検知する方法の開発に成功している<sup>1)</sup>。本年度の研究では、対象をトウモロコシに絞り、PCR法を用いた組換え品種特異的な検知法について開発した<sup>2)</sup>。さらに、入手できた組換えトウモロコシを利用し、PCRで個別の遺伝子領域内を増幅し、その遺伝子が含まれているかどうかを確認する、個別遺伝子の検知についても検討を行った。

B. 研究方法

<試料>

Event176は、European Commission-Joint Research Centerの標準品及び、国内商社から供与されたものを用いた。Bt11は、米国オ

ハイオ州の種子会社から購入した。Mon810、T14/T25、GA21及び、NonGMトウモロコシは、国内商社から供与されたものを用いた。GM及びNonGMダイズは、昨年度と同様のものを用いた。

#### <方法>

DNAの抽出：ダイズで確立したCTAB法を一部改良した。チューブにCTAB-buffer 500  $\mu$ Lを入れ、粉碎した試料90mgを加えマイクロミキサーで30秒ホモゲナイズした。チューブの先を洗浄するようにCTAB-buffer 400  $\mu$ Lを加え、転倒混和してから60  $^{\circ}$ Cで60分間静置した。500  $\mu$ Lのフェノールクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、転倒混和した。次いで14,000 rpmで10分間室温遠心後、水層（上層）を新チューブに移し500  $\mu$ Lのクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、12,000 rpmで15分間室温で遠心し、水層（上層）を新チューブに移した。等容（約400 $\mu$ L）のイソプロパノール（室温）を加え、転倒混和してから12,000 rpmで10分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てた。500  $\mu$ Lの70%エタノールを壁面から静かに加え、ピペットで上清を除去した後、12,000 rpmで1分間室温遠心し、さらにピペットで上清を除いた。沈殿を2-3分間アスピレーターを用い乾燥後、50  $\mu$ LのTEを加えてタッチミキサーかけてから、室温に15分間静置して、時々転倒混和して完全に溶かした。次にRNase溶液を5  $\mu$ L加え、37  $^{\circ}$ Cで30分間静置した。さらに200  $\mu$ LのCTAB-bufferを加えた後に、250  $\mu$ Lのクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、12,000 rpmで15分間室温遠心後、水層（上層）を新チューブに移した。200  $\mu$ Lのイソプロパノールを加え、転倒混和してから、12,000 rpmで10分間、室温で遠心後、デカンテーションで上澄み液を捨てた。さらに、500  $\mu$ Lの70%エタノールを側面から静かに加え、12,000 rpmで1分間室温遠心し、ピペットで上清を除いた。次いでアスピレーターで2-3分間乾燥し、50  $\mu$ LのTEを加えて室温下転倒混和して完全に溶解したものをDNA抽出溶液とした。

PCR：PCR反応液は、1 $\times$ PCR緩衝液(宝酒造(株))、0.2 mmol/L dNTP、0.5  $\mu$ mol/L プライマーおよび0.625 units Ex-Taq DNAポリメラーゼを含む液に、100 ng/mLに調製したDNA溶液2.5  $\mu$ Lを氷中で加え、全量を25  $\mu$ Lにした。94  $^{\circ}$ Cに3分間保った後、94  $^{\circ}$ Cで1分間、60  $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間に設定し、40サイクルの増幅反応を行った後、72 $^{\circ}$ Cで7分間終了反応を行った。マルチプレックスプライマーを用いて反応を行う場合には、各プライマー濃度を0.25  $\mu$ mol/L (Zein検知プライマーは、0.125  $\mu$ mol/L)とした。

電気泳動：PCR反応液8  $\mu$ Lを0.5  $\mu$ M/mLのエチジウムブロミドを含む最適濃度のゲルに負荷し、100 Vの電圧下TAE緩衝液で約30分間泳動を行った。次いで得られたゲルをUV (312 nm) 照射し、CCDカメラを用いて撮影し、PCR増幅バンドを検知した。

#### <ELISAによる方法>

市販のELISAキット(ダイズ：SGI社製キット、トウモロコシ：Agdia社製キット)を用い、キットの使用法に従い、ダイズのCP4EPSPSタンパクと、トウモロコシ(Mon810, Bt11, Event176)中のCryIa(b)タンパクが検知できるかどうか検討した。

#### C. 結果・考察

##### C.1.安全性確認済み組換えトウモロコシの検知

これまで、確認ずみの組換えトウモロコシは、4品種(Event176, Bt11, Mon810, T14/T25)あり、それぞれTable 1に示した外来遺伝子が組み込まれている。本研究では、組換え体検知の特異性をあげ、個別の品種を識別できる信頼性の高い方法を開発する目的で、2つ以上の生物種由来の配列をプライマーとして組み合わせ、PCR法で増幅する方法を試みた。また、確実に目的遺伝子が組み込まれた組換え体であることを確認するため、下流のプライマーは、目的遺伝子である害虫抵抗性遺伝子(CryIA(b))または、除草剤耐性遺伝子(PAT)の遺伝子上の配列を選択した。さらに、検疫所等での検知の迅速化を目的として、複数のプライマーペアを同時に添加し、増幅DNAの長さから、個別の品種を識別する方法(マルチプレックスプライマーを用いる迅速検知法)について検討した。

Table 1 組換え植物に挿入されている遺伝子

Event 176 (Novartis, Ciba)  
 PEPCpro+cryIA(b)+PEPCint.#9+35Ster  
 CDPKpro+cryIA(b)+PEPCint.#9+35Ster  
 P35S+bar+35Ster  
 amp<sup>r</sup>  
Bt11 (Novartis, N-King)  
 P35S+IVS6int.+cryIA(b)+NOSter  
 P35S+IVS2int.+PAT+NOSter  
Mon810 (Monsanto)  
 P35S+hsp70int.+cryIA(b)+NOSter  
T14,T25 (AgrEvo)  
 P35S+PAT+35Ster  
 b-lactamase

上記の遺伝子配列の中から、Table 2 に示す遺伝子間を増幅するプライマーペアを設計した。また、トウモロコシの遺伝子が確実に抽出されていることを確認するため、トウモロコシのゲノムに内在的に存在する Zein 遺伝子を認識するプライマーを設計し、コントロールとして用いた。

設計したプライマーを使用し、Event176, Bt11, Mon810, T14/T25 について PCR 法で検知を行ったところ 0.1% の濃度まで品種特異的に検知できることが判明した。また、非組換えコーンでは、これらのプライマーで増幅するバンドがないことを確認した。これまでの報告では、PCR を用いたコーンの組換え遺伝子の検知は、P35S プロモーター、NOS ターミネーター、CryIa(b) 遺伝子単独の検知であり、このように 2 つ以上の生物種由来の配列をプライマーとして組み合わせ、個別の品種を識別できる方法は、非常に信頼性の高いものと考えられる。

Table 2 個別の検知に用いるプライマーペアの認識する遺伝子と増幅長

Event 176 (Novartis, Ciba)  
 CDPKpro $\longleftrightarrow$ cryIA(b) 635bp ( $\beta$ -9)  
Bt11 (Novartis, N-King)  
 P35S $\longleftrightarrow$ cryIA(b) 718bp (5-4)  
Mon810 (Monsanto)  
 hsp70int. $\longleftrightarrow$ cryIA(b) 280bp (3- $\alpha$ )  
T14,T25 (AgrEvo)  
 P35S $\longleftrightarrow$ PAT 601bp (5-10)  
Control  
 Zein $\longleftrightarrow$ Zein (490bp)

次に、マルチプレックスプライマーを用い

る迅速検知法を検討した。即ち、Event 176, Bt11, Mon810 の上流側のプライマーは、各コーンに特異的プライマーとする一方、下流側は、CryIa(b) 上の一配列を選択し、さらにコントロールとして 326bp の増幅がみられる Zein primer ペア (Z02F-Z02R) も含め、6 種のプライマーを同時に添加し、マルチプレックス PCR を行い、増幅バンド長で、各品種を区別する。Table 3 に、選択したプライマーの認識する遺伝子を示す。

Table 3 マルチプレックス PCR 時のプライマーペアの認識する遺伝子と増幅長

Event176  
 PEPCpro $\longleftrightarrow$ cryIA(b) 619bp (2-4)  
Bt11  
 IVS6int. $\longleftrightarrow$ cryIA(b) 437bp (1-4)  
Mon810  
 hsp70int. $\longleftrightarrow$ cryIA(b) 194bp (3-4)  
Zein  
 Zein $\longleftrightarrow$ Zein 326bp (Z02F-Z02R)

T14/T25 の検知は別途、上述のプライマー 5-10 で行う必要があるが、その際にも Z02 のプライマーを同時添加し、マルチプレックス PCR を行うことが可能である。マルチプレックス PCR の結果を Figs. 1,2 に示す。なお、プライマー 5-10 の組み合わせでは、Bt11 においても、890bp のバンドが検出される。

マルチプレックス PCR は、プライマー同時添加のため、検出感度が単独 PCR と比較してやや劣るが、組換え体が 5% 存在すれば、余裕をもって検知できる。検出限界は、Event176 で 2%、それ以外のトウモロコシで 1% である。

### C.2. 未確認トウモロコシの検知

次に、安全性未確認トウモロコシのうち、米国で RoundUP Ready の名で市販され、日本に輸入される可能性のあるトウモロコシ GA21 (平成 11 年 11 月 29 日付けで厚生省の安全性確認済み) について、検知法の開発を試みた。GA21 は、site-directed mutagenic EPSPS (m-EPSPS) 遺伝子が挿入された除草剤耐性トウモロコシで、タンパクレベルでは、NonGM トウモロコシのもつ EPSPS と比較して、2 つのアミノ酸しか変異がない。従って、GA21 のみに特異的なプライマーを設計することは困難である。しかし、GA21 では、

m-EPSPS 遺伝子を挿入する際、イントロン部分を除去して挿入してある点を考慮して、増幅 DNA 断片長の差で、m-EPSPS 遺伝子 (193bp) と、通常の EPSPS 遺伝子 (292bp) を検知するプライマーペアを設計した。本プライマーを用い PCR を行った結果、GA21(RoundUP Ready) では、m-EPSPS 遺伝子と通常の EPSPS 遺伝子に対応する 2 本のバンドが、それ以外のトウモロコシでは、EPSPS 遺伝子のみに対応するバンドのみが検出され、GA21 について、特異的に検知することが可能になった。また、rice actin1 gene promoter (r-actin)部を認識するプライマーペアを用いて、PCR を行ったところ、GA21 のみに、増幅断片 (121bp) が現れることを確認した。

### C.3.個別遺伝子の検知

入手できた組換えトウモロコシを利用し、PCR で個別の遺伝子領域内を増幅し、その遺伝子が含まれているかどうかを確認する、個別遺伝子の検知についても検討を行った。プライマーペアとして、P35S プロモーター (35Spro) は、ダイズの検知用に報告されたもの、NOS ターミネーター (NOSter) は、ドイツ公定法のもの、bar (除草剤耐性遺伝子)、r-actin、CryIa(b)、epsps (除草剤耐性遺伝子)、amp<sup>r</sup> (アンピシリン耐性遺伝子) 及び P35S ターミネーター (35Ster) は、新たに設計されたものを用いた。その結果、P35Spro、NOSter、bar、r-actin、CryIa(b)、epsps 各品種において、挿入遺伝子の報告通り、検知されることを確認した。一方 amp<sup>r</sup> は、挿入遺伝子の報告通り検知されるが、一部 NonGM トウモロコシでも弱いバンドが検出されることがあった。これは、付着菌由来のバンドである可能性がある。また、35Ster 遺伝子は、Bt11 でも検知されたが、これは、Bt11 の挿入された CaMV の 35S プロモーターの配列が他の組換え体のものより長く、組み込まれた領域に、CaMV の 35Ster 遺伝子の検知に用いた配列も存在していた為と判明した。35Ster 部分は、遺伝子の長さが短いため、選択的なプライマーを設計することが難しく、これ以上選択的なプライマーの設計は断念した。

### C.4.ELISA による検知

ダイズでは、感度が高いが、検知幅がせまいため (検知幅 GM 混入率 0.3-2.5%)、試料ダイズを non-GMO ダイズで希釈して実験する必要があるが、その範囲では、定量性もあることが判った。一方、トウモロコシでは、感度が低いうえ (検出限界 GM10-20%)、厳密な定量性はなく、また CryIa(c)との交差反応性があるが、トウモロコシ一粒ごとの GM の確認には、簡便で有効であることが判った。

### D. 研究発表

(論文発表)

- 1) 松岡 猛、川島よしみ、穂山 浩、三浦裕仁、合田幸広、瀬畑 環、一色賢司、豊田正武、日野明寛「ダイズ及びダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検知法 (第1報)」食衛誌. 40(2) 149-157 (1999).
- 2) T. Matsuoka, Y. Kawashima, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, T. Sebata, K. Isshiki, M. Toyoda, A. Hino, "A method of detecting recombinant DNA from genetically modified maize," *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 41(2), in press (2000).

(学会発表)

- 1) 日野明寛、松岡 猛、川島よしみ、三浦裕仁、日下部祐子、一色賢司、穂山 浩、合田幸広、豊田正武「農産物・加工食品からの組換え遺伝子の検知法」第農芸化学会、東京、2000年4月。
- 2) 合田幸広、穂山 浩、佐々木真紀子、豊田正武、松岡 猛、日野明寛「コーンスナック菓子からの CP4EPSPS 遺伝子の検知について」第 79 回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2000年5月。
- 3) 日野明寛、松岡 猛、合田幸広、穂山 浩、佐々木真紀子、豊田正武「コーンスナック菓子からの barnase 遺伝子の検知について」第 79 回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2000年5月。

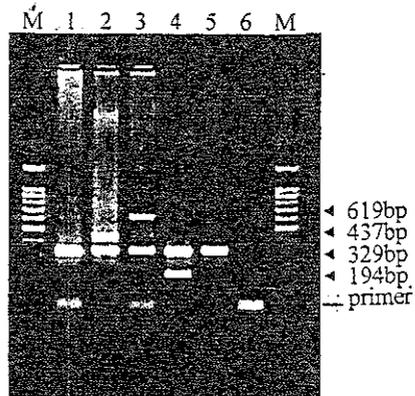


Fig. 1 PCR products amplified from maize DNA by a multiplex method using a primer mixture containing primer No. 1, 2, 3, 4, Z02F and Z02R

Lane 1: amplification of non GM maize; lane 2: amplification of GM maize (Bt 11) maize; lane 3: amplification of GM maize (Event 176) maize; lane 4 amplification of GM (MON 810) maize; lane 5 amplification of GM (Liberty) maize; lane 6: negative control (no maize DNA); M: 100 bp ladder size standard.

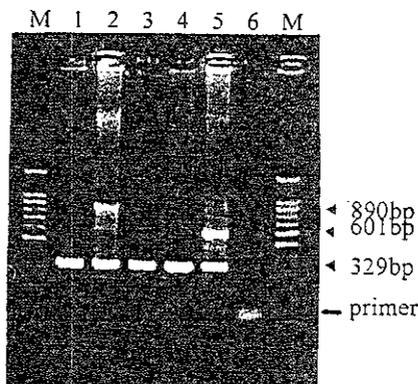


Fig. 2 PCR products amplified from maize DNA by a multiplex method using a primer mixture containing primer No. 5, 10, Z02F and Z02R

Lane 1: amplification of non GM maize; lane 2: amplification of GM maize (Bt 11) maize; lane 3: amplification of GM maize (Event 176) maize; lane 4 amplification of GM (MON 810) maize; lane 5 amplification of GM (Liberty) maize; lane 6: negative control (no maize DNA); M: 100 bp ladder size standard.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
（分担研究報告書）

組換え体の検知に関する研究

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部助教授

研究要旨

遺伝子組換え食品に含まれる遺伝子組換え植物の検出・同定のための方法として、導入遺伝子が挿入された植物遺伝子の挿入境界領域の塩基配列をもとに作成したプライマーを用いることによって、これまで検出に用いられてきたプライマーよりも PCR 反応の感度および正確性の高い検出が行えることを明らかにした。

協力研究者

合田幸広（国立衛研食品部）

佐々木和生（青森大学工学部）

A.研究目的

近年、遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進められ、商品化され栽培されている。その中で、たとえばトウモロコシで見た場合、1つの遺伝子組換え体を作成するにあたっては、同一の遺伝子を導入した遺伝子組換えトウモロコシ個体を多数得て、これをフィールドにおいて育てて育種する。その過程において遺伝子発現の不安定なもの、あるいは導入した遺伝子発現は強くとも、たとえば実りが悪い、生長が遅いなどのものは廃棄され、最終的にはその中から1本から数本のみが品種として固定され商品化される。実際に安全性評価にかけられた品種においても、安全性評価をおこなっている間に、別の品種の方がより優れていることがわかり、その品種を廃棄し、途中で安全性評価の取り下げが願い出られることがある。すなわち、安全性評価を行い、安全性が確認された遺伝子組換え個体（品種）はごく限られたものであり、その他多くの同一の遺伝子が組み込まれている品種は市場に出回ってい

ない。

現在、遺伝子組換え植物の検出・同定については PCR 法を用いるのが一般的である。しかし、これまでの方法では、組み込みに用いた遺伝子内の塩基配列をもとに作成されたプライマーを用いているため、その遺伝子が導入された個体であるかどうかの判定はできるが、しかし、その遺伝子が導入されてはいるが安全性の確認がなされた品種であるかどうかは区別することは難しい。すなわち、安全性確認の行われた品種であっても、あるいはその品種を作成する過程において育種された育種途上の別の品種であっても安全性が確認されていない品種であっても、どちらの植物体でも導入されている遺伝子は同一であるために、導入遺伝子内の塩基配列を調べる方法ではこの両者を区別できない。

そこでこの両者を区別するためには導入した遺伝子が植物体の遺伝子のどの領域に挿入されているのかで判定することが必要となる。アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクル・ガン法、い

ずれの方法においても、1つの細胞内において植物遺伝子のどの領域に外来遺伝子が挿入されるかは、完全にランダムである。もちろんホット・スポットのように外来遺伝子が挿入されやすい領域は存在するが、その領域の塩基配列のどこに挿入されるかはランダムである。このため、外来遺伝子が挿入された部分の境界領域の塩基配列は細胞ごとにすべて異なる。従って、この植物遺伝子における挿入境界領域の塩基配列が決定できれば、その領域と挿入された外来遺伝子の塩基配列に対するプライマーを作成し、PCRを行うことによって、その位置に外来遺伝子が挿入された1細胞から由来した組換え植物体のみを特定できる。すなわち、遺伝子組換えのイベントの特定を行うことができ、これによって安全性が確認された品種であるのか、それとも別の品種であって安全性が確認されていない品種であるかを特定することができる。

そこで、今回は EPSPS 遺伝子を導入した遺伝子組換えダイズにおける遺伝子挿入領域をクローニングし塩基配列を決定して、挿入境界領域と挿入された外来遺伝子の塩基配列に対するプライマーを作成し、PCRを行うことによって遺伝子組換えダイズの同定が行えるかどうかの検討を行った。

## B. 研究方法

### <試料>

青森大学の佐々木博士が育成した遺伝子組換えダイズ（以下、GMO ダイズと呼ぶ）および非組換えダイズ（以下、非 GMO ダイズと呼ぶ）の植物体の葉を液体窒素で凍結して -80 °C で保存したものをを用いた。

### <遺伝子挿入領域のクローニング>

GMO ダイズおよび非 GMO ダイズの葉約 5 g を液体窒素中でポリトロンで破碎し、

70°C に加熱した等量の 2×CTAB を加え、55°C で 30 分間振とうした。2 倍量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1 混液)を加え、室温で 30 分間振とうし、12,000rpm で 15 分間遠心分離した。上層に 1/10 容の 10% CTAB を加え、下層には等容の 1% CTAB を加えそれぞれ 10 分間振とうした。これを 12,000rpm で 5 分間遠心分離し、上層に 1/10 容の 10% CTAB を加え、さらに等容の沈殿バッファーを加えて 30 分間放置した。3,000rpm で 20 分間遠心分離し、沈殿に 1 ml TE-1M NaCl を加えて 55°C で 20 分間攪拌しながら溶解し、氷上に 20 分間置いた。これにクロロホルムを 300 μl, Nucleon PhytoPure DNA 液を 25 μl 加え、10 分間振とうした。4,800rpm で 10 分遠心分離し、上清に等量のイソプロパノールを加え、緩やかに振とうし、15,000rpm で 5 分間遠心分離して沈殿をエタノールで洗浄し、水に溶解した。

こうして得られたゲノム DNA から遺伝子挿入領域をクローニングするにあたってはインバース PCR 法およびアンカー PCR 法を用いた。200 ng のゲノム DNA をとり、エタノールで沈殿、洗浄、乾燥し、BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, PstI, SalI, SphI, XhoI, XbaI の 9 種の制限酵素で 37°C で一晩反応させた。切断したゲノム DNA をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱によって精製した。インバース PCR 法においては、この制限酵素処理した DNA を Ligation Kit Ver.2 (宝酒造)を用いて環状化した。その後エタノール沈澱、洗浄、乾燥した。またアンカー PCR 法においては、おのおのの制限酵素切断配列に適合するアダプターを Ligation Kit Ver.2 (宝酒造)を用いて結合した後、エタノール沈澱、洗浄、乾

燥した。これらをテンプレートとして、インバース PCR 法においては 35S プロモーターの塩基配列に対する 5' 方向および 3' 方向のプライマーを作成して 35S プロモーターから外向きになるように PCR を行った。またアンカー PCR 法においてはアダプターの塩基配列に対応するプライマーと 35S プロモーターの塩基配列に対する 5' 方向のプライマーを作成し PCR を行った。ともに 35S プロモーターの塩基配列に対するプライマーを数種類作成して nested PCR を行い、GMO サイズ由来の DNA からは増幅されるが、非 GMO サイズ由来の DNA からは増幅されないバンドを見出し、これをクローニングして塩基配列を決定し、この塩基配列に対するプライマー CHM1 を作成した。また 35S プロモーター領域の配列を含むプライマーとして CHM2 を作成した。

＜遺伝子挿入領域プライマーを用いた GMO サイズおよび非 GMO サイズにおける PCR 反応の検討＞

上記で作成した遺伝子挿入領域プライマー CHM1、および CHM2 の反応特異性を調べるため、もう1つのプライマーとして 35S-cRV プライマーおよび 35S-bRV プライマーを用いて GMO サイズおよび非 GMO サイズから得たゲノム DNA をテンプレートとして、各社の Taq DNA polymerase を用いて PCR を行い、その特異性を検討した。

### C. 結果

ここで得られた PCR プライマー CHM1、および CHM2 を用いて GMO サイズおよび非 GMO サイズの葉から得たゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行った。その結果、CHM1 プライマーを用いた場合には、もう1対のプライマーとして

35S-cRV プライマーおよび 35S-bRV プライマーを用いた場合においても、シングル・バンドとして検出することができることがわかった (Fig. 1)。またこのプライマー・セットを用いて国立医薬品食品衛生研究所・食品部・合田博士により、輸入されたダイズのマメから抽出された DNA をテンプレートとして PCR を行っていただいたところ、シングル・バンドが検出されたことが報告された (data not shown)。さらに同博士がコーン・スナック菓子から抽出した DNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、やはりシングル・バンドが検出され、しかも従来この EPSPS の検知に用いられていたプライマー・セットよりも明瞭なバンドとして見出すことができ (Fig. 2)、これまで検出用に用いられてきたプライマーよりも感度および正確性が高いことが示唆された。

これに対し、CHM2 プライマーを用いた場合には複数本のバンドが検出された (Fig. 3)。しかもバンドは GMO サイズから得た DNA のみならず、非 GMO サイズから得た DNA をテンプレートとして用いた場合にもバンドが検出された。さらに、このバンドは、LA-Taq DNA polymerase (宝酒造) では増幅されるが、Ex-Taq DNA polymerase (サワデー) では増幅されず、用いる Taq DNA polymerase の違いによって検出できる場合とできない場合とがあることがわかった。

### D. 考察

EPSPS 遺伝子を導入した遺伝子組換えダイズにおける遺伝子挿入領域をクローニングし塩基配列を決定して、挿入境界領域と挿入された遺伝子の塩基配列に対するプライマーとして CHM1、さらに CHM2 を作成

し、PCR を行ったところ、CHM1 プライマーではこれまで検知に用いられてきたプライマーよりも PCR 感度および正確性が高い検出が可能となった。これに対し、CHM2 プライマーを用いた場合には、複数本のバンドが検出されてしまった。この原因として、植物細胞内にもともと CHM2 プライマーと相同性のある配列が複数箇所存在し、このため非 GMO ダイズ由来のゲノム DNA を用いた場合においても PCR によって DNA 断片が増幅されてしまったと考えられる。CHM2 プライマーの 3' 側の配列のおそらく 10 ~ 15 bp の間で 85% 以上の相同性があり、しかもそのプライマーの 3' 末端の 3 bp 程度が完全に一致する塩基配列がダイズのゲノム内に存在することが考えられた。

#### E. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし

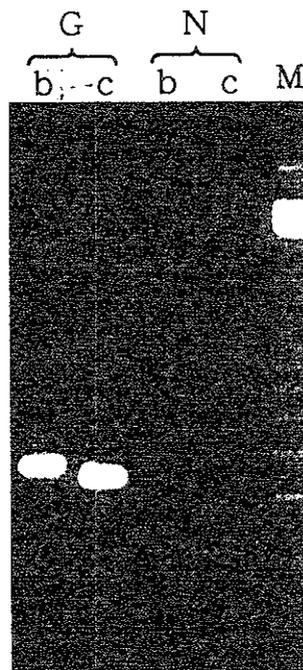


Fig. 1 GMO ダイズおよび非 GMO ダイズの葉から調製したゲノム DNA をテンプレートとして CHM1 プライマーと 35S-b RV プライマー (b) および 35S-c RV プライマー (c) を用いて PCR を行い増幅された DNA 産物。G, GMO ダイズ DNA; N, 非 GMO ダイズ DNA; M, 123 bp DNA ラダー・マーカ。

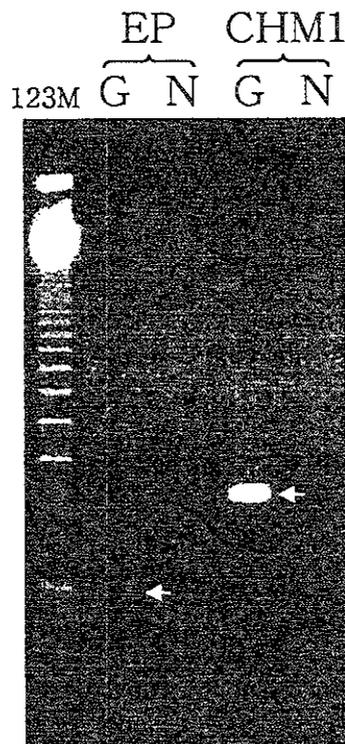


Fig. 2 コーン・スナック菓子から調製した DNA をテンプレートとしてこれまで用いられてきた EP プライマー・セット (EP) および CHM1 プライマー・セット (CHM1) を用いて PCR を行い増幅された DNA 産物。G, GMO ダイズ DNA; N, 非 GMO ダイズ DNA; 123M, 123 bp DNA ラダー・マーカ。矢印で示したバンドが GMO ダイズ特異的に検出されるバンドにあたる。