

平成14年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」
分担研究報告書
DNA組換え体の検知に関する研究
分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

(1) 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発と評価

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモNewLeafならびにNewLeaf Plusのそれぞれについて、定量PCR法を用いた分析法確立のための検討を昨年度に継続して行い、定量用プライマー対、プローブセットに加え、定量用標準分子を開発した。さらにスクリーニングを目的とし、*Cry IIIA*を標的遺伝子とした定量系の開発も行った。また、ジャガイモを対象に既存法を用いた場合、定量分析法に供するのに適したDNAを抽出することが困難であったため、DNA抽出法の検討を行った。さらに、開発された定量分析法の評価を行うに当たり必要となる疑似混入試料についての検討を行った。

(2) 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発

遺伝子組換えジャガイモNewLeafならびにNewLeaf Plusに加え、平成15年1月に開催された食品衛生バイオテクノロジー部会において、審査継続中であるNewLeaf Y3系統中2系統が了承された。この事を受け、NewLeaf Y系統別特異的定性検知法の開発を行った。またさらに、モニタリングを目的とし、上記NewleafならびにNewLeaf Plusを含む安全性審査を終了した品種についても定量分析法の一部を準用し、定性分析法への適用可能性についての検討を行った。

(3) 安全性審査が終了していない食品の簡易定性法の確立と評価

新たに抗ウイルス性遺伝子組換えパパイヤの簡易検知法としてGUS (β -glucuronidase) アッセイによる組織化学的検知法を確立した。

(4) 遺伝子組換え食品定量分析法における加工影響の評価

現在までに開発されたトウモロコシ5品種を対象とした定量分析法の適用範囲は、穀物に限定されている。これは理論上、加熱等の加工を受けた食品においては測定対象であるDNAが変質し、真値を求めることが難しいと予想されるためである。この事について知見を深める事を目的に、遺伝子組換えトウモロコシGA21穀粒を原材料としたモデル加工食品を作成し、加工による定量値への影響を、原材料を対象とした場合に得られる定量値との比較として調査した。

(5) 新規遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

平成15年2月現在、新たな遺伝子組換えトウモロコシとしてMON863、TC1507、NK603の3品種が安全性審査を終了し、法的に流通可能な状態となっている。このため、今後これら新品種が実際に国内流通することが予想され、それらをモニタリングする必要性が生じる。そこで、新品種遺伝子組換えトウモロコシ3品種を対象にした定量分析法開発のための検討を行った。

協力研究者

日野明寛、松岡猛、栗原秀夫（農林水産省食品総合研究所）、小関良宏（東京農工大学）、

松木容彦、笠間菊子（食品薬品安全センター秦野研究所）、穉山浩、合田幸広、渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

1. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発と評価

近年、バイオテクノロジー技術を応用し開発された遺伝子組換え食品、ならびにそれらを原材料とする加工食品が流通するようになってきている。また、食品表示全般に亘る消費者の要望も高まってきており、遺伝子組換え食品についても非常に高い関心が寄せられている。厚生労働省では遺伝子組換え食品について平成13年から食品衛生法に基づく安全性審査を義務づけるものとし、それに合わせてその表示についても法的に義務化することとした。また平成13年4月からは、安全性審査を受けていない遺伝子組換え食品またはこれを原材料とする食品については、輸入ならびに販売等が法的に禁止されることとなっている。遺伝子組換えジャガイモについては平成13年以前にNewLeafが、平成13年7月にNewLeaf Plusがそれぞれ安全性審査を終了しており、法的に市場流通可能な段階にある。また、平成15年1月からは1年間の経過措置期間を経て、表示制度も施行されている。これらの事を背景に、表示内容の検証を行うための定量分析法の開発が急務とされている。

本研究では、昨年度に引き続き、NewLeaf、ならびNewLeaf Plusの定量分析法を開発することを目的として検討を行った。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発

平成15年2月現在、安全性審査継続中の遺伝子組換え食品として、遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf Y3 系統 (SEMT15-15、SEMT15-02、RBMT15-101) が挙げられる。このうち、SEMT15-15ならびにRBMT15-101の2系統は、平成15年1月に開かれた、バイオテクノロジー部会における了解が得られ、今後、食品衛生分科会での審議を経て、大臣答申されるものと予想される。一方、SEMT15-02系統に関しては引き続き安全性

審査が継続する見通しである。このため、NewLeaf Yの市場流通を監視するにあたっては、上記3系統について安全性審査を終了したものとそうでないものを区別し、特異的に検知する必要がある。そこでNewLeaf Y3系統別特異的分析法として、導入遺伝子と植物ゲノムDNA配列との境界領域を標的配列とした定性分析法を開発した。さらに、安全性審査済み遺伝子組換えジャガイモについても定性分析法の確立を目的とし、定量分析法用として開発されたプライマー対の定性分析法への準用を試み、検討を行った。

3. 安全性審査が終了していない食品の簡易定性法の確立と評価

現在、安全性審査が終了していない食品の定性検知法として、定性PCR法が主要な役割を果たしている。一方で、本法においては、実験環境ならびに実験機器の整備、技術の習熟等に一定のコストと労力を要する。これに対し、より簡便な定性試験法としてラテラルフロー法やELISA法の開発が行われてきた。本研究においては抗ウイルス性遺伝子組換えパパイヤを対象とした簡易定性法の確立を目的として、その特性を生かし、GUS (β -glucuronidase)アッセイを応用した組織化学的な方法の検査法への応用を検討した。

4. 遺伝子組換え食品定量分析法における加工影響の評価

遺伝子組換えトウモロコシの定量分析法としては、厚生労働省通知食発第110号においてTaqMan Chemistryを応用し、導入遺伝子の標的配列を特異的に増幅し定量化する定量的PCR法が示されている。本定量分析法は基本的に穀物を対象としており、加工食品への適用ならびにその適用範囲については検証がなされていない。しかしながら本定量分析法を加工食品のモニタリング分析法として応用したいとの要望は強い。

本研究においては、当該定量分析法の加

工食品への適用可能性についての検証試験の一貫として、安全性審査済み遺伝子組換えトウモロコシGA21穀粒を原材料に用いてエクストルーダによるモデル加工食品を数種作成し、各モデル加工食品を対象とした定量試験を実施した。

5. 新規遺伝子組換え食品を対象とした定量分析法の開発

平成14年10月、安全性審査申請のあった遺伝子組換えトウモロコシのうち、MON863、TC1507、NK603の3品種が審査を終了し、法的に市場流通可能な状態となった。これら新品種についても、これまでに示された遺伝子組換えトウモロコシ旧5品種同様に定量分析法を示す必要がある。また、上記3品種中、TC1507に関しては導入遺伝子が、旧5品種中のT25と同一のものであるため、これらを区別する事が可能な分析法とする必要もある。これらの事を背景に、新品種を対象とした定量分析法の確立に向けての検討を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発と評価

厚生労働省医薬局食品保健部を通じ入手した遺伝子非組換えジャガイモ3品種 (Russet Burbank, SuperiorおよびShepody)、安全性審査を通過した遺伝子組換えジャガイモ2品種 (NewLeaf : SPBT0205系統ならびにRBBT0206系統、NewLeaf Plus : RBMT21-356系統) の凍結乾燥済み粉末を試料として用いた。また、特異性確認試験に用いた各種植物種に関し、遺伝子組換え食品については同様に厚生労働省医薬局食品保健部を通じて、また、それ以外の植物種については東京都内のスーパーマーケットで購入した物を凍結乾燥処理し、粉末とした後に試料として用いた。ジャガイモ品種に関しては(独)食品総合研究所より供与して頂いた。これら試料よりQIAGEN DNeasy Plant Miniキット、QIAGEN DNeasy Plant Maxiキット、

Phytopureキット、CTAB法など種々の方法を用いてDNAを抽出し、DNA試料溶液として実験に供した。定量的PCR機器にはABI PRISM 7700を使用し、その際の反応液組成は以下の通りである。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー0.5 μ mol/L、対象プローブ0.2 μ mol/L、20 ng/mL DNA試料溶液2.5 μ L。これらを混合し最終液量を25 μ Lとした。

NewLeaf検知用には*Bacillus thuringiensis*由来の害虫抵抗性遺伝子(*CryIIIA*)および、その発現を制御するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列(p-35S)の異種生物由来の2塩基配列にまたがる領域を標的としたプライマー対を設計した。一方NewLeaf Plusの検知を目的とし、*PLRV-rep*とその上流に位置し、当該遺伝子の発現を制御するゴマノハグサモザイクウイルス由来のプロモーター配列(p-FMV)の異種生物由来の2塩基配列領域にまたがる領域を標的とし、プライマー対を設計した(Fig.3)。また、定量分析法において内部標準となる内在性遺伝子についてはBrovkovらによってジャガイモゲノム中に1コピー存在することが明らかにされているUDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGPase) 遺伝子を選定し、当該遺伝子を標的とするプライマー対を設計した(Fig.1)。さらに、スクリーニング目的として使用可能なように、NewLeafならびにNewLeaf Plusに共通して導入されている*CryIIIA*遺伝子を標的とした定量系の開発についても検討した(Fig.5)。定量用標準分子の構築は、各検知用プライマー対を用いて得られる増幅産物を定法に従いクローニングし、シーケンスを確認した後、プラスミドベクターに連結する事で行った(Fig.3)。プライマーの合成はすべて(株)ファスマックに委託し、逆相カートリッジ精製品を用いた。プライマーは蒸留滅菌水で50 μ mol/Lになるよう希釈し、-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発と評価

1) NewLeaf Y 3系統別特異的定性分析法の開発

厚生労働省医薬局食品保健部を通じ入手した安全性審査継続中の遺伝子組換えジャガイモ1品種3系統(NewLeaf Y: SEMT15-15、SEMT15-02、RBM15-101)の凍結乾燥済み粉末を試料として用いた。NewLeaf Yに加え、特異性確認試験においては研究方法B-1記載の試料を用いた。これら試料よりQIAGEN DNeasy Plant Mini キットを用いてDNAを抽出し、DNA試料溶液として実験に供した。反応組成液は、1×PCR緩衝液(アプライドバイオシステムズ社製:ABI社製)、0.20 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L塩化マグネシウム、0.5 μmol/Lプライマー及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼになるように混合し、DNA試料溶液2.5 μLを加え、全量を25 μLにした。PCRはABI社製GeneAmp PCR System 9700をサーマルサイクラーとして使用し、条件は以下の通りである。ABI AmpliTaq Gold を用いたホットスタート法; 前熱変性95°C 10 min; 熱変性95°C 0.5 min, アニーリング60°C 0.5 min, 伸長72°C 0.5 min, 繰り返し40回; 終了反応72°C 7 min。

NewLeaf Y系統別特異的検知を目的としたプライマー対としては、SEMT15-15、SEMT15-02、RBM15-101各系統に導入されている導入遺伝子とジャガイモゲノムDNAとの境界領域を標的とし、それぞれ増幅バンド長が164 bp、86 bp、150 bpとなる系統特異的検出用を設計した(Fig.7)。

2) NewLeaf、NewLeaf PlusならびにNewLeaf Y 3系統共通定性分析法の開発

反応液組成ならびにPCR条件についてはB-2-1)と同一とした。遺伝子組換えジャガイモを品種によらず検知する事を目的としたスクリーニング用としては、B-1.記載の定量分析用に開発したCryIIIA遺伝子を標的配列としたプライマー対を準用した。安全性審

査を通過したNewLeaf ならびにNewLeaf Plus特異的検知用プライマー対としては昨年度本報告書において報告したの定量分析用に開発したプライマー対を準用した(Fig. 1、3ならびに5)。NewLeaf Y3系統共通の検知を目的としたプライマー対については、NewLeaf Yにのみ導入され、かつ各系統共通であるジャガイモYウイルス外被タンパク質遺伝子(PVYcp)とその上流に位置するp-FMVの異種生物由来の2塩基配列領域にまたがるプライマー対(増幅バンド長123bp)を設計した(Fig.7)。プライマーの合成はすべて(株)ファスマックに委託し、逆相カートリッジ精製品を用いた。プライマーは蒸留滅菌水で50 μmol/Lになるよう希釈し、-20°Cにて保存した。

3. 安全性審査が終了していない食品の簡易定性法の確立と評価

厚生労働省医薬局食品保健部を通じ入手した遺伝子組換えパパイヤ(55-1)、ならびに非遺伝子組換えパパイヤから胚を取り出し、試料とした。この際、検査法とすることを目的としたため、作業効率ならびに判定に必要な十分な数を勘案し、1検体より12個の胚を取り出すものとした。取り出した胚は乾燥から防ぐため、1ウェルあたり50 μLの200 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を分注した96ウェルプレートに浸潤した。試験に供する全ての胚を取り出した後、リン酸緩衝液を1 mM X-Gluc溶液に置換し、浸透を促すためアスピレーターを用いて15分間の脱気処理を行った。脱気処理後、プレートをパラフィルムで密封し、37°C、10~15時間の条件で加温した。加温処理後、各ウェルに70%エタノールを50 μLずつ加え反応を停止し、それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数え、GUS陽性率を算出した。また、インハウスでの検証を終えた後、5機関の分析機関の方々のご協力をいただき、インターラボラトリーバリデーションを行った。

4. 遺伝子組換え食品定量分析法における加工影響の評価

1) GA21穀粒を原材料とするモデル加工食品の作成

厚生労働省医薬局食品保健部を通じ入手した遺伝子組換えトウモロコシGA21穀粒20 kgを国立衛研にて粉碎し、コーングリッツを調製した後、加工原材料とした。加工は食品研究用2軸エクストルーダ（日本製鋼所製ラボルーダマークII-S）を用い、126℃（低温）、162℃（適温）、184℃（高温）の温度条件下、スナック菓子加工を行った。

2) モデル加工食品からのDNA抽出ならびに定量PCR法による分析

加工後の試料は再粉碎後、QIAGEN Genomic-tip 20/Gを用いてDNA抽出を行い、DNA試料溶液として実験に供した。上記抽出法にてDNAが抽出されなかった試料についてはQIAGEN DNA Plant Maxi キットを用いた抽出を試みた。定量分析法としては食発第110号記載のGA21系統特異的定量法に準拠した。定量的PCRの反応液25 μ Lの組成はUniversal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー0.5 μ mol/L、対象プローブ0.2 μ mol/L、20ng/mL DNA試料溶液2.5 μ Lまたは検量線用標準液2.5 μ Lである。定量的PCR装置にはABI PRISM 7700を用いた。

5. 新規遺伝子組換え食品を対象とした定量分析法の開発

厚生労働省医薬局食品保健部を通じ入手したMON863種子、NK603種子、TC1507種子、ならびにT25種子をそれぞれ粉碎し、試料として用いた。これら試料よりQIAGEN DNeasy PlantMiniキットを用いてDNAを抽出し、DNA試料溶液として実験に供した。定量的PCR機器にはABI PRISM 7700ならびにABI PRISM 7900HTを使用し、その際の反応液組成は以下の通りである。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー0.5 μ mol/L、対象プローブ0.2 μ mol/L、20 ng/mL DNA試料溶液2.5 μ L。これらを混合し最終液

量を25 μ Lとした。MON863、NK603、T25検知用には、遺伝子組換えトウモロコシ旧5品種と共通した外来遺伝子が導入されているため、それらとの差別化を図り、特異的な検知を可能とすることを目的に、導入遺伝子と植物ゲノムDNA配列との境界領域を標的配列としてプライマー対を設計した（Fig.12、14ならびに18）。TC1507品種に関しては、*Bacillus thuringiensis* 由来の害虫抵抗性遺伝子（*CryIFa2*）および、その発現を制御する*Agrobacterium tumefaciens*由来のpolyadenylation signal配列の異種生物由来2塩基配列にまたがる領域を標的配列としたプライマー対を設計した（Fig. 16）。

C. 研究結果及び考察

1. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発と評価

現在開発を進めているGM作物の定量分析法においては、純粋なGM作物における導入遺伝子のコピー数と内在性遺伝子のコピー数を相対比（内標比）として求め、これを係数とすることで未知試料中のGM作物混入率を算出する。この際、内在性遺伝子に求められる条件として、GM作物だけではなく、該当する非遺伝子組換え作物においても高い保存性を保ち分布していること、シングルコピー遺伝子であることが挙げられる。文献検索の結果として、シングルコピー遺伝子でありかつジャガイモゲノムに普遍的に存在する内在性遺伝子としてUGPase遺伝子を選定し、当該遺伝子の塩基配列情報（Accession No. U20345）をもとに、111 bpのバンド長を持つ増幅産物を生じるようプライマー対を設計した（Fig.1）。当該プライマー対を使用した定量系をジャガイモ品種間での保存性、ならびに他植物種との交差反応性を指標に検証したところ、非特異的なシグナルの増幅は認められず良好な結果を得た（Fig.2）。

定量分析法においては、測定対象におけるコピー数の算出に当たり、標準分子が必

RBMT15-101については了承が得られ、近々のうちに食品衛生分科会の審議を経て大臣答申される見通しとなった。この事は、単一品種(同じ導入遺伝子を持つ)のうち、系統によっては安全性審査の終了したものとそうでないものが混在することを意味しており、品種特異的検知法に加え、系統特異的検知法の必要性を示唆している。導入されている外来遺伝子は同一であるため、この内部に標的配列を設定した場合、各系統を識別することはできない。そのため、各系統に特異的な領域として、導入遺伝子と植物ゲノムDNA配列との境界領域に標的領域を設定した。設計したプライマー対を用いて定性PCR法を実施した場合、SEMT15-15系統においては164 bp、RBMT15-101系統においては150 bp、SEMT15-02系統においては86 bpの増幅産物をそれぞれ生じる。各種遺伝子組換えジャガイモならびに非遺伝子組換えジャガイモを対象とした特異性確認試験において、それぞれのプライマー対を用いたPCR法により対象とするNewLeaf Y各系統の各を特異的に検知することが可能であることが示された(Fig. 8)。

また、各系統から抽出したDNAを小麦DNAをマトリクスとして希釈し調製した疑似混入DNAを鋳型とした試験において、SEMT15-15ならびにRBMT15-101の検知下限値はそれぞれ0.005%(w/w)、SEMT02-05の検知下限値は0.1%であることが示された(Fig. 9)。

2) NewLeaf、NewLeaf PlusならびにNewLeaf Y 3系統共通定性分析法の開発

食品衛生法上、安全性審査を終了した遺伝子組換え食品については量的監視を行う必要があり、定性分析法は必要がない。しかしながら、定性分析法をモニタリング目的として活用する事には、検査法としての簡便化を図る上で十分な利便性が考えられる。そこで、安全性審査の終了した遺伝子組換えジャガイモ、NewLeaf ならびに

NewLeaf Plus を対象とした定性分析法の開発を行った。NewLeaf ならびにNewLeaf Plus 特異的検知法に加え、遺伝子組換えジャガイモのスクリーニングを目的としたCry IIIAを標的遺伝子とした定性分析法についても開発を行った。この際、使用するプライマー対は定量分析法において開発したプライマー対の準用を図った。また、NewLeaf Yに関する、先に示した3系統別特異的検知法に加え、3系統を区別なく検知することが可能な3系統共通定性分析法を開発した。さらに、定量分析法において内在性遺伝子として選定したUGPaseに関しては定性分析法への準用を図る際、遺伝子組換え、非遺伝子組換えを合わせて品種に関わりなく普遍的に検知する事が可能であるかの検証を行った。NewLeaf特異的、NewLeaf Plus特異的、スクリーニング用Cry IIIA、NewLeaf Y3系統共通、内在性UGPaseの各定性分析法における増幅バンド長は113 bp、125 bp、117 bp、123 bp、111 bpである。それぞれの定性系を同一の反応組成ならびにPCR条件のもとで特異性確認試験に供したところ、いずれの系も各々が対象とする検体でのみ、予想されたバンド長を持つ増幅産物を生じるという大変良好な結果を得た(Fig.10)。なお、Fig. 10のPanel 4に示されたNewLeaf Plus 特異的定性系において、NewLeaf Yを対象とした場合にも増幅産物が得られる結果となっているが、これは、供与された試料におけるコンタミネーションによる結果であることが判明している。さらに内在性UGPase定性系に関して、国内ジャガイモ品種8品種を含む16試料を対象とした普遍性確認試験においては、試験に供したいずれの品種においても同一の増幅バンド長を有する増幅産物が得られており、この事は、内在性UGPase定性系が非常に高い普遍性をもった系であり、検査法における陽性対照とするのに適していることを示している(Fig. 11)。

要となる。前述の結果を受けUGPaseを対象に、また、昨年度の報告において検証作業の終了していたNewLeaf ならびにNewLeaf Plus定量系を合わせて、標準分子の構築を行った(Fig.3)。開発した標準分子について濃度を基準とし、コピー数を20コピーから500 kコピーまで調製した non-template control (NTC)を含む7点の希釈系列を作成し、直線性を試験した。その結果、UGPase、NewLeaf、ならびにNewLeaf Plusいずれの定量系においても非常に良好な直線性が得られた(Fig.4ならびにTable1)。

上記の結果により、定量分析法において重要な道具となる定量系(プライマー対ならびにプローブのセット)、ならびに定量用標準分子の開発が終了した。一方、良好な定量分析値を得るためには、分析に供する試料から抽出されるDNAの質もまた非常に重要な要素となる。特に、ジャガイモは可食部が塊茎であり、デンプン等のDNA抽出において阻害物質として働く物質が試料中に多量に含まれているため、現行のDNA抽出法を準用することが困難であった。また、現行のDNA抽出法を準用した場合、品種によりDNA抽出効率が大きく異なることが明らかとなり、この差違を小さくするためにも検討が必要となった(Table 2-1ならびに2-2)。このため、これら阻害物質の影響を受けにくいDNA抽出法の開発と最適化のための検討を行った。検討の結果、通知110号記載のCTAB法を元に、抽出時間、抽出温度、酵素処理濃度等に改変を加え、最適化を図る事により、品種間の抽出効率の差違が最小かつ、質の高いDNAを抽出する事が可能なDNA抽出法を開発した(Table 2-3)。この結果は、キットタイプの抽出法を使用した場合にはデンプン及び多糖類の除去効率が低く、一方、CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)による効率が高いためと考えられた。改変CTAB法を用いて各遺伝子組換えジャガイモからDNAを抽出し、当該

DNAを鋳型に先に示した定量系、ならびに標準分子を使用しての定量分析を行い、内標比を算出した。その結果、NewLeaf 2系統(SPBT0205ならびにRBBT0206)の内標比はそれぞれ0.19ならびに0.18、NewLeaf Plus(RBMT21-350)の内標比は0.51と算出された(Table 3-1)。各遺伝子組換えジャガイモにおける理論上の内標比は、導入遺伝子のコピー数についての情報からNewLeaf 2系統がそれぞれ0.2、NewLeaf Plus が0.5となると考えられており、実測された内標比が非常に理論値に近い数値であることが明らかとなった。次いで、算出された内標比の検証を目的とし、NewLeaf Plusを対象にShepody をマトリクスとした5%(w/w)疑似混入試料を調製し、混入率測定試験を行った。試料数を5とし、独立並行にて試験を実施した結果、各試料間での測定値のばらつきは非常に小さく(RSD%=11)、また、算出された平均混入率の値も4.7%と非常に良好な結果であった(Table3-2)。またさらに、各遺伝子組換えジャガイモ特異的定量系に加え、スクリーニングを目的とした検査が可能となるよう、各遺伝子組換えジャガイモに共通して導入されているCry IIIA を標的遺伝子とした定量系を開発を試みた(Fig.5)。Cry IIIA のORF中に117 bpの増幅産物を生じるようにプライマー対を設計し、定量的PCR機器ABI PRISM 7900 HTを用いて特異性の確認試験を実施した結果、遺伝子組換えジャガイモのみに特異的にシグナルを生じることが示された(Fig. 6)。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発と評価

1)NewLeaf Y 3系統別特異的定性分析法の開発

平成15年2月現在、NewLeaf Y品種として3系統 (SEMT15-15、SEMT15-02、RBMT15-101)が安全性審査に諮られている。この内、先頃行われたバイオテクノロジー部会において、SEMT15-15ならびに

3. 安全性審査が終了していない食品の簡易定性法の確立と評価

安全性審査を終了していない遺伝子組換えパパイヤ(55-1)には抗ウイルス抵抗性を付与するタンパク質の他に、目的の外来遺伝子が導入された事を確認するためのマーカー遺伝子として β -glucuronidase (GUS) 遺伝子が導入されている。本遺伝子の産物であるGUSは5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide(X-Gluc)を基質とし、その酵素反応の結果として青色を呈する水不溶性インジゴチン色素を生成する。本研究においては、上記GUSの特性を応用することにより、供する試料が青色を呈するか否かを判断基準とした簡便な検査法を確立することを試みた。当検査において試料として供する組織には細胞密度が高く、また色素含有量の低い胚が適切であろうと考えた。

市場流通する遺伝子組換えパパイヤ(55-1)はF1ハイブリッドであるため、GUS遺伝子を持つ胚がメンデルの法則に従って分布する。そのため、理論上試験に供する胚の75% (9胚/12胚) が青色を呈する事となる。しかし、条件検討を行ったインハウスの結果においても、また、操作上試験に供する胚を無作為に選出する事からも、必ずしも上記理論値には合致しない事が示されていた。そのため、5機関参加のインターラボラトリバリデーションにおいては、GUS陽性率が30%以上 (青色を呈した胚の数が4以上) の場合を遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定し、GUS陽性率が30%未満 (青色を呈した胚の数が4未満) の場合を陰性と判定する事とした。

インターラボラトリバリデーションの結果、各機関において試験に供された胚のうち、最小50%の確率を持って青色を呈する胚が遺伝子組換えパパイヤ特異的に検出され、判定結果の正答率は100%であった(Fig. 12)。この事からGUS活性を指標とした本試験法が遺伝子組換えパパイヤ検知法として

適応可能であることが示された。

4. 遺伝子組換え食品定量分析法における加工影響の評価

現在示されている遺伝子組換えトウモロコシの定量分析法は、TaqMan Chemistryを応用し開発されたものであり、本分析法の適用範囲は基本的に穀物に限定されている。これは、食品が加工を受けるに当たり、DNAが分解を受け、定量分析法に供する質を失うことに起因する。しかしながら、本定量分析法を加工食品に適応したいとの要望は強く、また、今後実際に適応することが可能となるよう改良を加えていかなければならない。これに先立ち、本定量分析法を用いて得られる数値が加工によりどの程度の影響を受けるのかについての知見を得るため、GA21穀粒を試料として作成したスナック菓子を対象にDNAの抽出効率、定量分析法により得られるSSIbならびにGA21特異的定量系における数値(Raw copy numbers)の比較検討を行った。加工影響を段階的に調査するため、試験に供したスナック菓子は126°C (低温)、162°C (適温)、184°C (高温) の温度条件下でそれぞれ作成した。その結果、加工食品からのDNA抽出法として通常使用されているイオン交換樹脂タイプキットであるQIAGEN Genomic-tip 20/Gキットを用いた場合、適温以上の強度の加工を施した試料からはDNAが抽出されないことが明らかとなった(Table 4-1)。これはDNAの分解が進み、イオン強度が劇的に変化したため、イオン交換樹脂への吸着性が失われた事によるものと考えられた。この結果に対し、上記DNA抽出法を用いてDNAの抽出されなかった試料を対象にシリカゲル膜タイプキットであるQIAGEN DNeasy Plant Maxi kit を用いての抽出を試みたところ、定量分析法に供する事が可能なレベルでのDNAが抽出された(Table 4-2)。これらの結果は、加工程度に合わせて最適なDNA抽出法を選択する必要性を示唆している。次いで各ス

ナック菓子から抽出されたDNAの定量実験を行ったところ、数値が得られたものは低温加工品についてのみであり、その値もSSIIb、GA21特異的共に、未加工品において得られる値の0.1から0.5%程度と非常に低い数値であった(Table 5-1)。また、遺伝子増幅の指標となるCt値において比較を行った場合も同様の結果であった(Table 5-2)。以上の結果は加工食品を対象とする場合、吸光度的にはDNAが抽出されていると判断される試料であっても、性状としては未加工品由来のものとは全く異なっており、PCRによる増幅の鑄型となり得ない低分子量の断片にまで分解されている試料が存在する事を示唆しているものと考えられた。

5. 新規遺伝子組換え食品を対象とした定量分析法の開発

平成14年10月、安全性審査申請のあった遺伝子組換えトウモロコシのうち、MON863、TC1507、NK603の3品種が審査を終了し、法的に市場流通可能な状態となった。これら新品種は旧5品種と同様、今後主として市場流通する事になると予想されている。そのため、旧5品種同様に定量分析法を示す必要がある。また、上記3品種中、TC1507に関しては導入遺伝子が、旧5品種中のT25と同一のものであるため、これらを区別する事が可能な分析法とする必要がある。本研究においてはT25を対象とした分析法の再開発を含め、4種の定量分析法を開発するための検討を行った。NK603、MON863、およびT25検知用としては、各遺伝子組換えトウモロコシに導入されている導入遺伝子とトウモロコシゲノムDNAとの境界領域を標的配列とし、TC1507検知用としては導入遺伝子中の害虫抵抗性遺伝子*Cry IFa2*とその下流に位置するORF25と呼ばれる*Agrobacterium tumefaciens*由来のターミネーター領域の異種生物由来の2塩基配列領域にまたがる領域を標的配列とした(Fig. 13、15、17ならびに19)。NK603、MON863、T25

ならびにTC1507それぞれの検知を目的としたプライマー対(NK603: NK603u 01-5'ならびに NK603u 01-3'、MON863: MON863c5'-1-5'ならびにMON863c5'-1-3'、T25: T25c5'-1-5'ならびに T25c5'-1-3'、TC1507: Cry1F014-5'ならびにCry1F011-3')により増幅される増幅バンド長は113 bp、111 bp、111 bpならびに111 bpである。

上記プライマー対を用い、定量的PCR機器を用いて特異性確認試験を行ったところ、いずれの遺伝子組換えトウモロコシ品種を対象とした定量系においても特異的な遺伝子増幅産物の増加が観察され、またその効率も良好であった(Fig.14、Fig.16、Fig. 18ならびにFig.20)。

D. 結論

1. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発と評価

安全性審査の終了したNewLeaf ならびにNewLeaf Plus の2品種を対象とした定量分析法を開発した。また、*Cry IIIA*を標的遺伝子とした定量分析法のモニタリング法としての可能性を示唆した。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発と評価

- 1) NewLeaf Yに対し、同一品種中の異系統を特異的に検知することが可能な定性分析法を開発した。
- 2) 遺伝子組換えジャガイモを普遍的に検知することが可能な*Cry IIIA*を標的としたスクリーニング用定性検知法ならびに、NewLeaf、NewLeaf Plus、NewLeaf Yのそれぞれを特異的に検知可能な定性分析法を開発した。

3. 安全性審査が終了していない食品の簡易定性法の確立と評価

GUSアッセイを応用した方法を用い、遺伝子組換えパパイヤを定性検知するための簡便法を開発した。また5機関参加の共同試験により、本法をバリデートした。

4. 遺伝子組換え食品定量分析法における加

工影響の評価

加工強度依存的に分析値が大きく影響を受けることを明らかにし、現行の定量分析法の適用範囲に対する知見を深めた。

5. 新規遺伝子組換え食品を対象とした定量分析法の開発

今後市場流通が予測される安全性審査を終了した新規遺伝子組換えトウモロコシを対象とした定量分析法の開発段階を前進させた。

E. 参考文献

1) Borovkov A.Y., McClean P.E., Secor G.A. "Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase" *Gene*, **186(2)**, 293-297(1997)

2) Sowokinos J.R., Thomas C., Burrell M.M. "Pyrophosphorylase in potato. V. Allelic polymorphism of UDP-Glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold" *Plant Physiol.*, **113(2)**, 511-517(1997)

F. 研究業績

論文

1) Y. Goda, Y. Kakihara, H. Akiyama, T. Matsuoka, A. Hino, M. Toyoda, "Detection of recombinant DNA from genetically modified maize grain," *J. Food Hygienic. Soc. Japan*, **43**, 74-79 (2002)

2) 穂山浩、杉本和恵、松本美佐緒、五十鈴川和人、渋谷雅明、合田幸広、豊田正武、"遺伝子組換えジャガイモ (NewLeafPlus potato) からの組換え遺伝子検知法の確立及びスナック菓子からの検知" *食品衛生学雑誌*, **43**, 24-29 (2002)

3) T. Matsuoka, H. Kuribara, K. Takubo, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, A. Hino, "Detection of recombinant DNA segments Introduced to genetically modified maize (*Zea*

maize)," *J. Agric. Food Chem.*, submitted.

4) Y. Kakihara, Y. Goda, H. Akiyama, H. Matsufuji, M. Chino, M. Toyoda, M. Takeda, "Detection of Recombinant DNA from Commercial Tofu and Estimation of GM Contents in Material Soybean," *Jpn. J. Food Chem.*, **9**, 60-66 (2002)

5) H. Kuribara, Y. Shindo, T. Matsuoka, K. Takubo, S. Futo, N. Aoki, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, A. Hino, "Quantification methods using nobel reference molecules for detection of genetically modified maize and soybean," *J. AOAC Int.*, **85**, 1077-1089 (2002)

6) Y. Shindo, H. Kuribara, T. Matsuoka, K. Takubo, S. Futo, C. Sawada, J. Shono, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, A. Hino, "Validation studies of real-time PCR analyses for ine-specific quantification of genetically modified maize and soybean using new reference molecules," *J. AOAC Int.*, **85(5)**, 1119-1126 (2002)

学会発表等

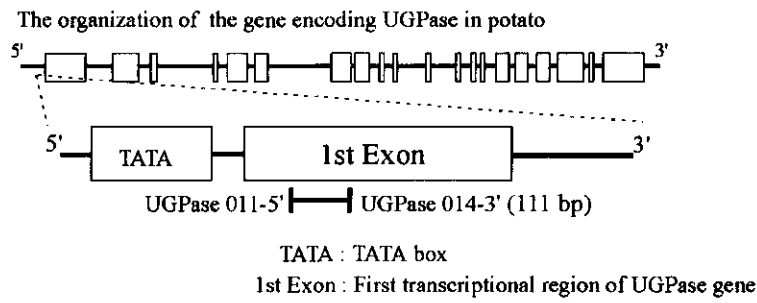
1) 第83回日本食品衛生学会学術講演会「マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムによる遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズの定量法」和久井千世子、渡邊敬浩、三浦嘉巳、穂山浩、豊田正武、吉村倫彰、紀雅美、山本敦史、富岡千鶴子、日野明寛、酒井栄一、松岡猛、布藤聡、小川真智子、梶原淳睦、島津光伸(2002.5.)

2) 第84回日本食品衛生学会学術講演会 GUS 試験法を用いた遺伝子組換えパパイヤ (55-1) の検知法について 和久井千世子、渡邊敬浩、穂山浩、米谷民雄、千葉良子、内川誠司、紀雅美、高橋邦彦、藤井明美

3) 第 39 回全国衛生化学技術協議会年会
“遺伝子組換え食品定性検査法の外部精度
管理について” 渡邊敬浩、和久井千世子、
穠山浩、米谷民雄、笠間菊子、松木容彦
(2002.10.)

4) 第 84 回日本食品衛生学会学術講演会
“表示対象加工食品からの DNA 抽出法と定
量 PCR の検討” 児玉貴志、松岡猛、西山武
夫、栗原秀夫、穠山浩、米谷民雄、日野明
寛(2002.10.)

Fig. 1 ジャガイモ定量分析法における内在性遺伝子の選定



Schematic diagram of designed PCR primers to detect intrinsic UGPase gene

UGPase is one of the key enzymes of carbohydrate metabolic pathway
The gene was isolated from potato cultivar (cv.) *Lemhi*, and consists of a 6.6 Kb structural and a 1 Kb regulatory region.

Fig.2 内在性遺伝子 *UGPase* を標的とした定量系の特異性確認

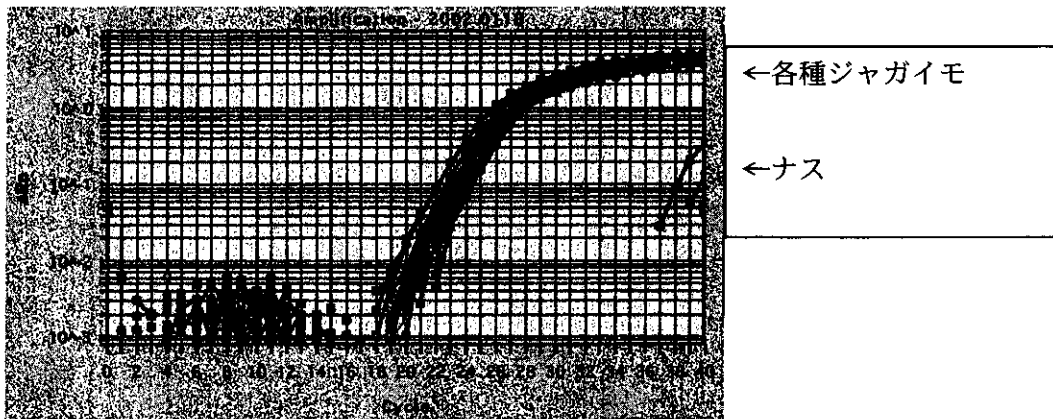
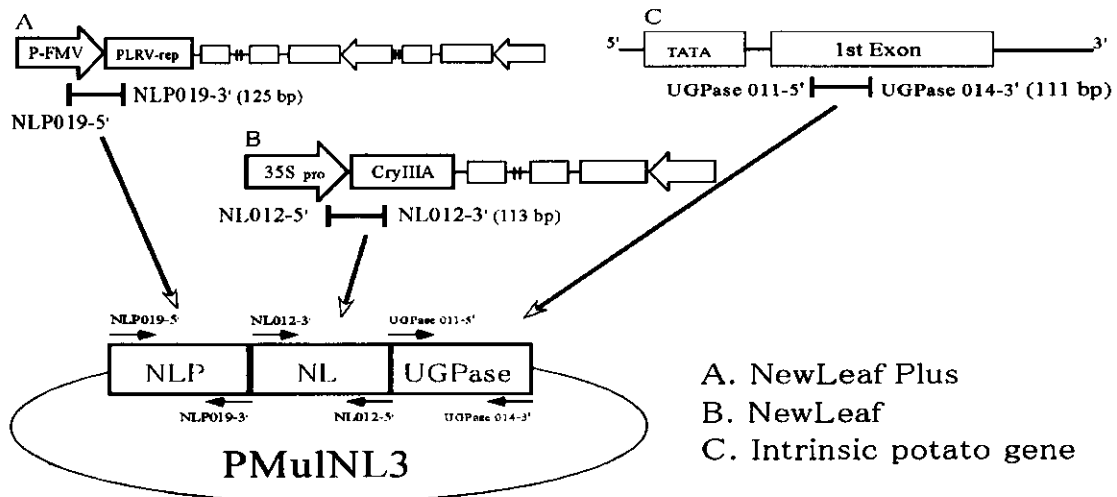


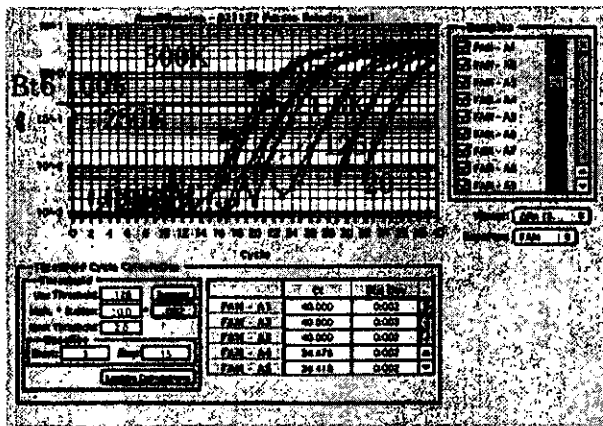
Fig.3 遺伝子組換えジャガイモ定量用標準分子構築



Construction of plasmid DNA as reference molecule and schematic diagram of the plasmid DNA

Fig.4 遺伝子組換えジャガイモ定量用標準分子の直線性試験

Fig.4-1 定量系 : UGPase set (内在性遺伝子)



標準分子 Dose:20, 125, 1.5K, 20K,
250K, 500K

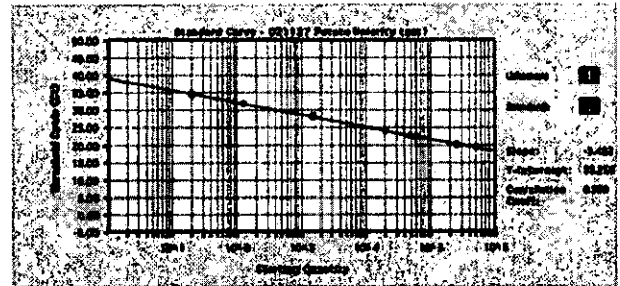


Fig.4-2 定量系 NL012 set (NewLeaf 特異的)

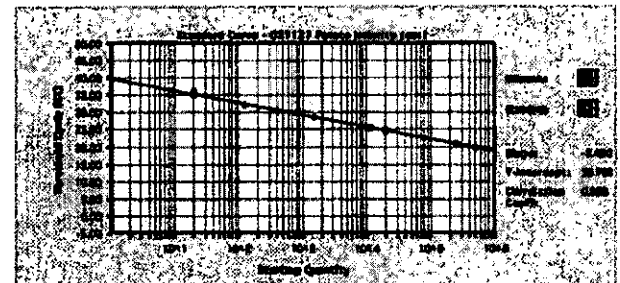
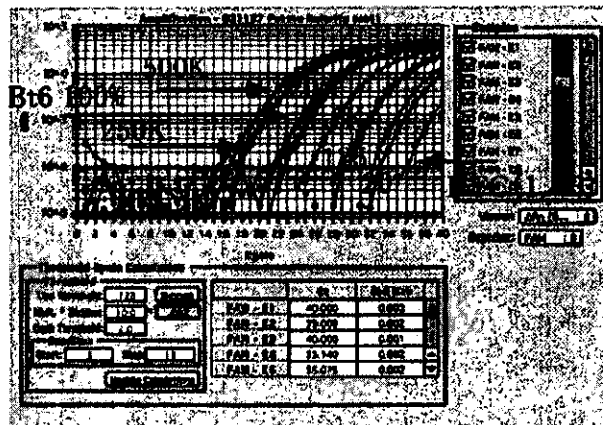


Fig.4-3 定量系 NLP019 set (NewLeaf Plus 特異的)

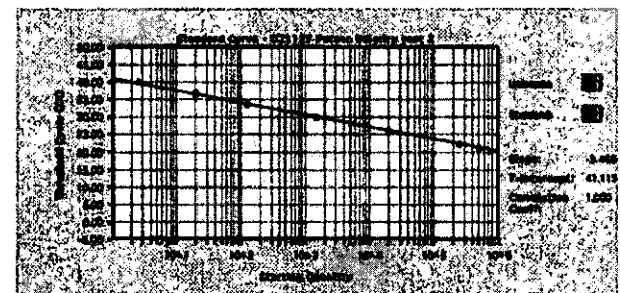
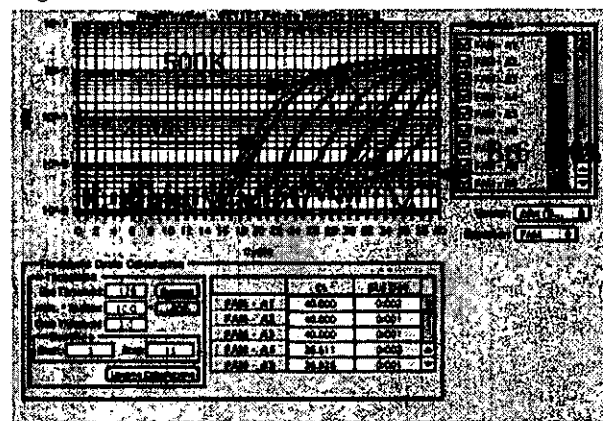


Table 1 ジャガイモ定量用標準分子直線性試験のまとめ

定量系	パラメーター		
	Slope	Y-intercept	Correlation
UGPase	-3.482	39.266	0.999
NL012	-3.490	39.786	0.998
NLP019	-3.466	41.115	1.000

Table 2 DNA 抽出法の検討結果

Table 2-1. QIAGEN DNA Plant Maxi kit

sample	ABS (AU)				260/280	260/230	DNA Conc. (ng/uL)	DNA Conc. CV %
	230nm	260nm	280nm	320nm				
Shepody	0.14	0.24	0.14	0.00	1.73	1.80	120.80	15.55
NL RB	0.17	0.25	0.14	0.01	1.74	1.43	123.10	20.27
NL SP	0.11	0.19	0.11	0.00	1.73	1.78	96.20	18.15
NLP	0.01	0.02	0.02	0.00	1.54	1.76	12.60	42.03

Shepody: non-GM potato, NL RB: NewLeaf Russert Burbank 種, NL SP: NewLeaf Superior 種, NLP: NewLeaf Plus

Table 2-2. QIAGEN DNA Plant Maxi kit (α -amylase 処理 2hrs)

sample	ABS (AU)				260/280	260/230	DNA Conc. (ng/uL)	DNA Conc. CV %
	230nm	260nm	280nm	320nm				
Shepody	0.20	0.41	0.23	0.01	1.82	2.06	207.00	2.82
NL RB	0.14	0.20	0.11	0.01	1.76	1.42	98.20	17.55
NL SP	0.09	0.15	0.08	0.01	1.77	1.63	74.60	30.64
NLP	0.02	0.04	0.02	0.00	1.63	1.73	18.00	18.84

Table 2-3 改変 CTAB 法

sample	ABS (AU)				260/280	260/230	DNA Conc. (ng/uL)	DNA Conc. CV %
	230nm	260nm	280nm	320nm				
Shepody	0.19	0.46	0.23	0.00	1.97	2.37	229.10	14.42
NL RB	0.07	0.17	0.09	0.00	1.86	2.37	86.13	6.19
NL SP	0.06	0.15	0.08	0.00	1.91	2.56	77.25	17.82
NLP	0.09	0.18	0.09	0.00	1.97	2.04	89.10	4.90

Table 3-1 各品種・系統別暫定内標比

	SPBT0205 (NL SP)		RBBT0206 (NL RB)		RBMT21-350 (NLP)	
	UGP	Target	UGP	Target	UGP	Target
Mean of Raw copy numbers	20599	3804	15649	2779	28668	14608
SD	2937	638	2285	260	3363	1288
RSD(%)	14	17	15	9	12	9
Mean of CoV	0.19		0.18		0.51	
SD	0.02		0.02		0.03	
RSD(%)	12.11		12.40		5.88	

Target: 品種・系統特異的配列

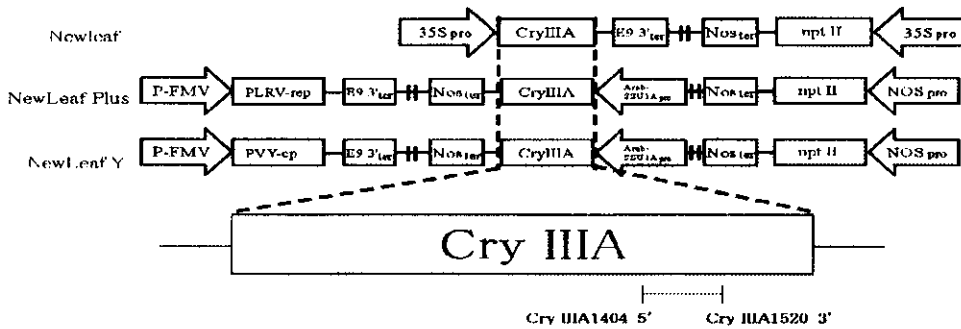
CoV: 内標比

試験は n=5 で実施し、表記した数値はその平均値を示す

Table 3-2 NewLeaf Plus 疑似混入
試料での混入率分析値

疑似混入試料	
混入率 5%	5
CV=0.51	
5% 検体 1	4.2
5% 検体 2	5.3
5% 検体 3	4.4
5% 検体 4	4.4
5% 検体 5	5.2
Mean (%)	4.7
Blas (%)	-6
SD	0.53
RSD (%)	11

Fig.5 *Cry IIIA* を標的遺伝子とした定量系の開発



Schematic diagram of designed PCR primers to detect GM potato generally

Fig.6 *Cry IIIA* 遺伝子を標的とした定量系の特異性確認

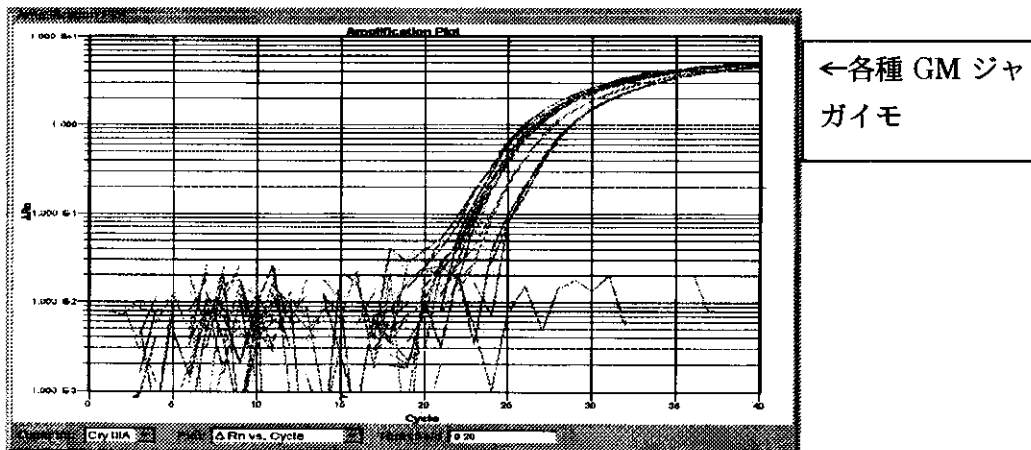
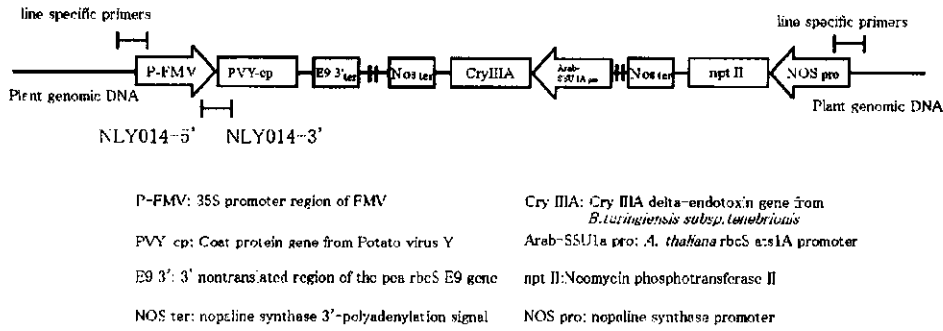


Fig. 7 NewLeaf Y 3 系統別特異的定性検知法の開発



Schematic diagram of designed PCR primers to detect NewLeaf Y

Fig. 8 NewLeaf Y 3 系統別特異的定性検知法における特異性確認

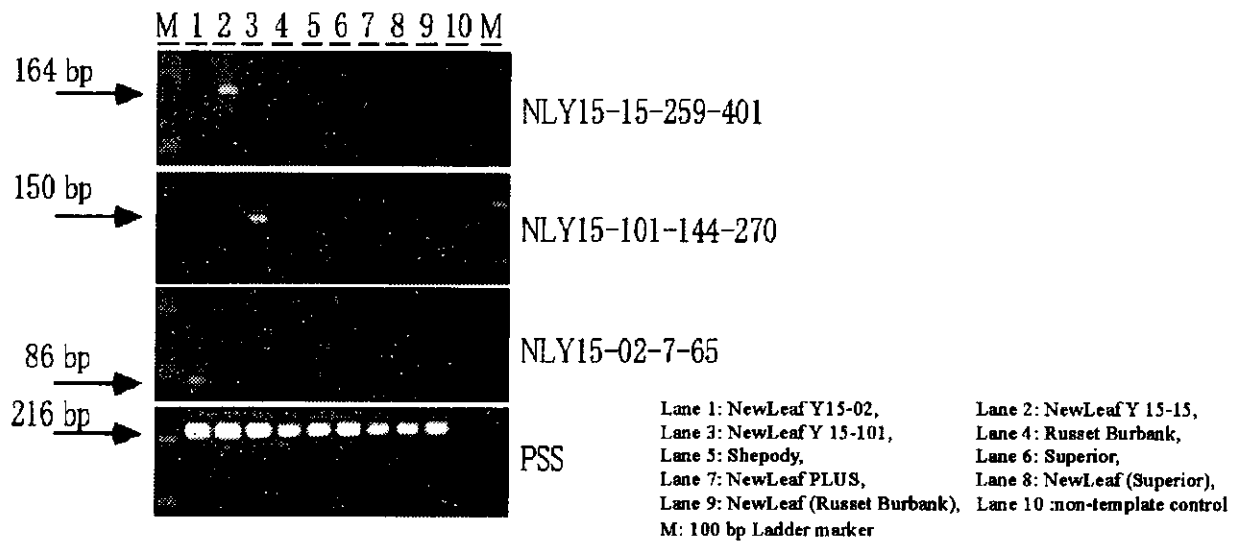


Fig. 9 NewLeaf Y 3 系統別特異的定性検知法における検知下限値の検証

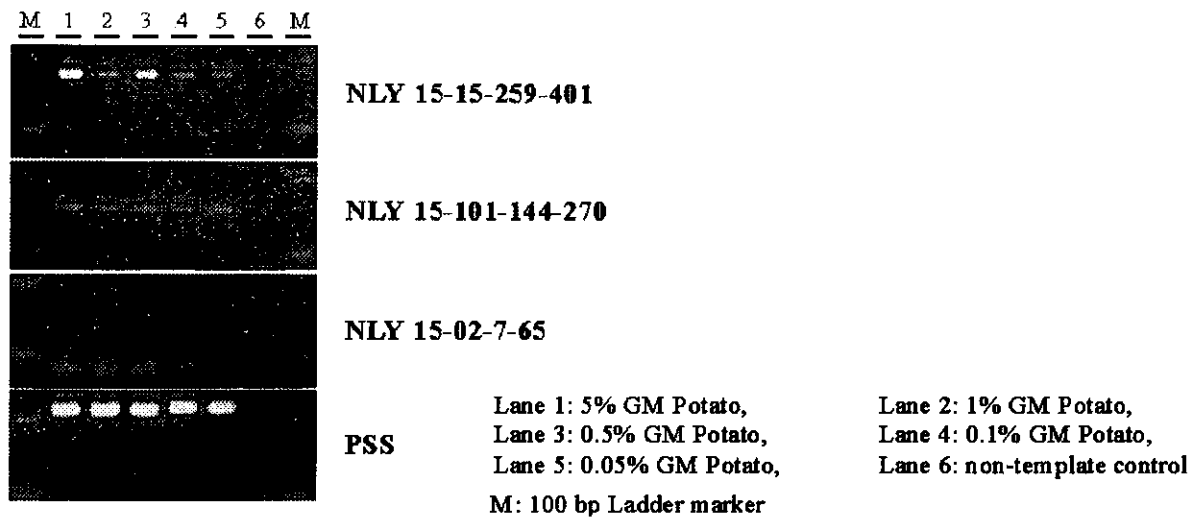


Fig. 10 各遺伝子組換えジャガイモを対象とした定性検知法の特異性確認

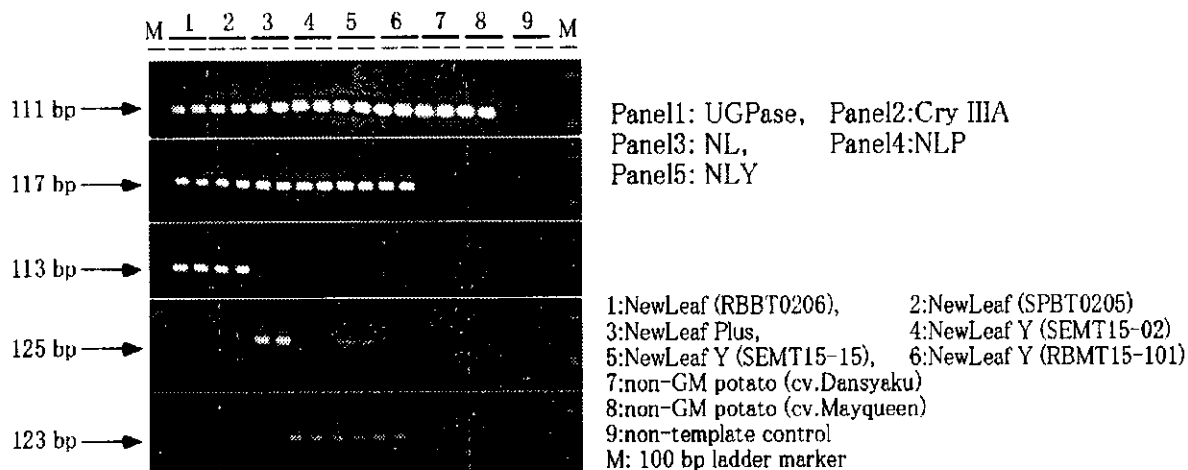


Fig. 11 各種ジャガイモにおける *UGPase* 定性系の増幅確認

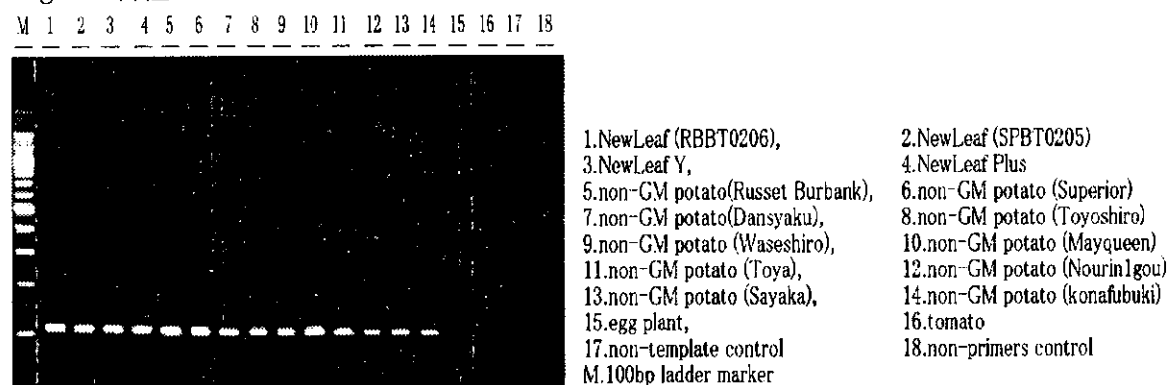


Fig. 12 GUS 試験法インターラボラトリーバリデーションの結果

参加機関	non-GM	GM-1	GM-2
1	0.0	58.3	66.7
2	0.0	75.0	50.0
3	0.0	58.3	66.7
4	0.0	66.7	83.3
5	0.0	83.3	91.7
平均GUS陽性率	0.0	68.3	71.7
正答率	100 (5/5)*	100 (5/5)	100 (5/5)

単位；%，上段の数値は各検体におけるGUS陽性率を表す。

*括弧内の数値は、正答機関数/参加機関数を表す。

Table 4 GA 21 モデル加工食品からの DNA 抽出

Table 4-1 QIAGEN Genomic-tip 20/G
を用いた DNA 抽出

グリップの処理条件	吸光度					DNA 濃度 (ng/μL)
	230	260	280	320	Quality	
未処理						
抽出 1	0.889	0.882	0.528	0.098	1.591	882
抽出 2	0.429	0.897	0.552	0.047	1.825	897
抽出 3	0.294	0.628	0.395	0.081	1.577	628
抽出 4	0.435	0.882	0.595	0.049	1.588	882
抽出 5	0.864	0.777	0.497	0.082	1.562	777
低温						
抽出 1	0.027	0.052	0.041	0.008	1.288	52
抽出 2	0.022	0.049	0.081	-0.005	1.581	49
抽出 3	0.024	0.048	0.081	0.002	1.548	48
抽出 4	0.026	0.054	0.087	0	1.459	64
抽出 5	0.02	0.087	0.028	-0.001	1.423	87
適温						
抽出 1	0.001	-0.002	-0.005	-0.002	0.400	-2
抽出 2	0.002	-0.001	-0.004	-0.001	0.250	-1
抽出 3	-0.002	-0.006	-0.008	-0.007	0.667	-6
抽出 4	0.002	0.001	-0.008	0.001	-0.333	1
抽出 5	0.002	0.002	-0.001	0.002	-2.000	2
高温						
抽出 1	0.002	0.001	-0.001	0	-1.000	1
抽出 2	0.002	-0.001	0	-0.001	0.000	-1
抽出 3	0.025	0.012	0.014	0.025	0.967	12
抽出 4	0.022	0.01	0.012	0.012	0.888	10
抽出 5	0.019	0.008	0.01	0.011	0.800	8

Table 4-2 QIAGEN DNeasy Plant
Maxi kit を用いた DNA 抽出

グリップの処理条件	吸光度					DNA 濃度 (ng/μL)
	230	260	280	320	Quality	
適温						
抽出 1	0.04	0.034	0.024	0.009	1.417	34
抽出 2	0.022	0.034	0.024	0.011	1.417	34
抽出 3	0.025	0.035	0.025	0.008	1.400	35
抽出 4	0.023	0.033	0.024	0.009	1.375	33
抽出 5	0.02	0.025	0.012	0	2.063	25
高温						
抽出 1	0.048	0.045	0.032	0.016	1.406	45
抽出 2	0.036	0.037	0.025	0.009	1.480	37
抽出 3	0.087	0.067	0.05	0.026	1.340	67
抽出 4	0.137	0.098	0.071	0.037	1.380	98
抽出 5	0.19	0.13	0.086	0.052	1.354	130

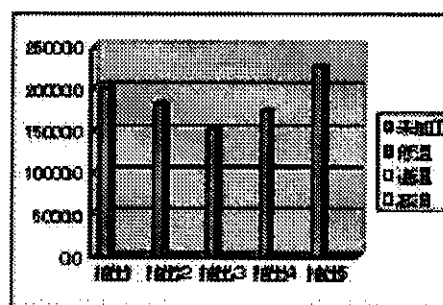
Quality: 260/280

Table 5 各加工食品の定量分析結果

Table 5-1 Raw copy numbers の比較

各加工食品における SSIIb コピー数

加工サンプル	未加工	低温	適温	高温
抽出 1	20097.0	7.2	0.0	0.0
抽出 2	18086.0	5.9	0.0	0.0
抽出 3	15056.0	6.3	0.0	0.0
抽出 4	17248.0	4.8	0.0	0.0
抽出 5	22597.0	6.2	0.0	0.0



各加工食品における GA21 specific trait コピー数

加工サンプル	未加工	低温	適温	高温
抽出 1	36929.0	52.3	0.0	0.0
抽出 2	36484.0	52.1	0.0	0.0
抽出 3	28154.0	45.3	0.0	0.0
抽出 4	31903.0	46.3	0.0	0.0
抽出 5	37475.0	54.8	0.0	0.0

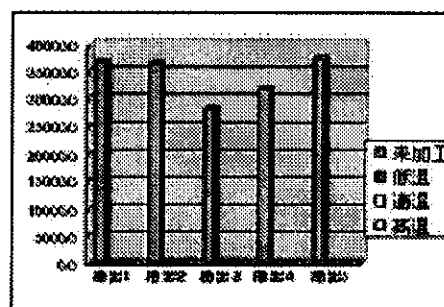
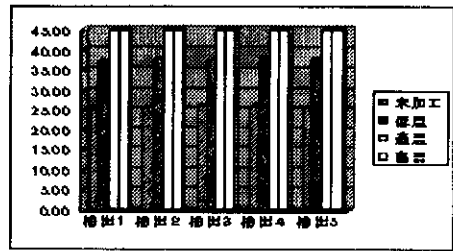


Table 5-2 Ct 値の比較

各加工食品における SSIB 定量系での Ct 値

加工サンプル	未加工	低温	適温	高温
抽出1	25.64	37.37	40.00	40.00
抽出2	25.80	37.65	40.00	40.00
抽出3	26.07	37.53	40.00	40.00
抽出4	25.87	37.99	40.00	40.00
抽出5	25.47	37.61	40.00	40.00



各加工食品における GA21 specific 定量系での Ct 値

加工サンプル	未加工	低温	適温	高温
抽出1	24.56	34.45	40.00	40.00
抽出2	24.58	34.46	40.00	40.00
抽出3	24.98	34.68	40.00	40.00
抽出4	24.78	34.65	40.00	40.00
抽出5	24.54	34.38	40.00	40.00

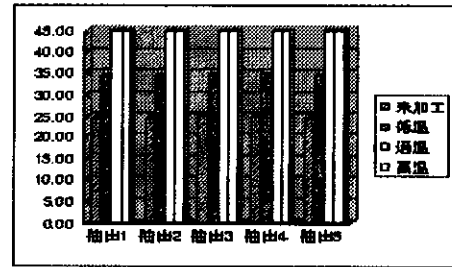
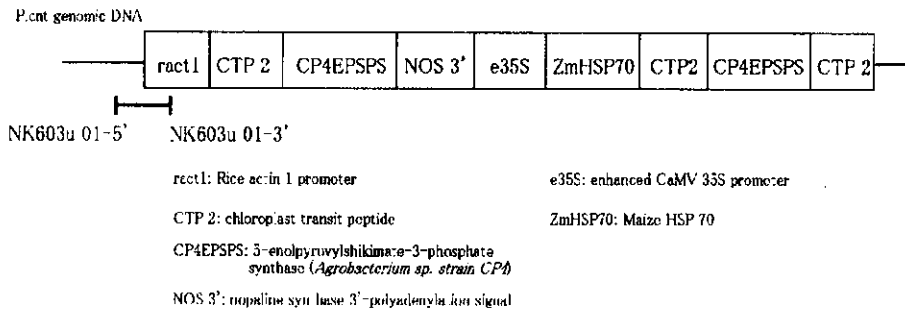


Fig. 13 NK603 を標的とした定量系の開発



Schematic diagram of designed PCR primers to detect NK603

Fig. 14 NK603 を標的とした定量系の特異性確認

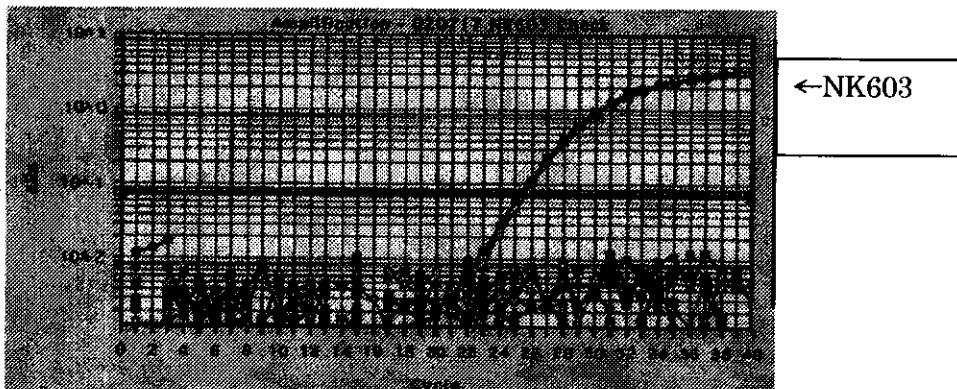
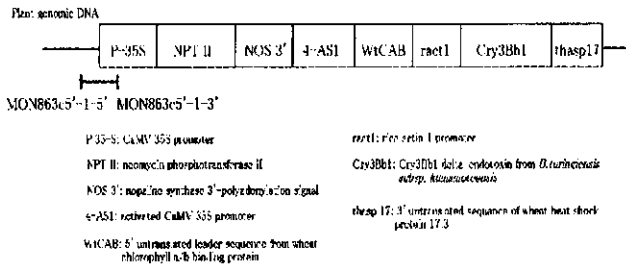
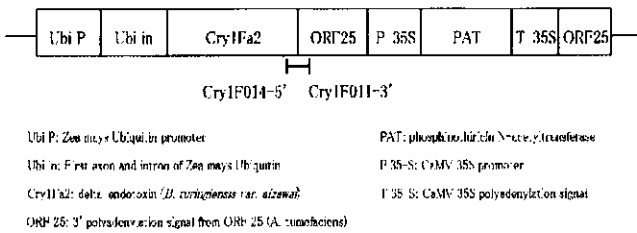


Fig. 15 MON863 を標的とした定量系の開発



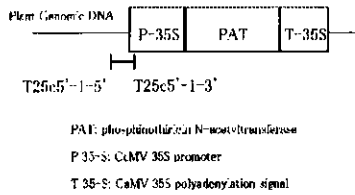
Schematic diagram of designed PCR primers to detect MON863

Fig. 17 TC1507 を標的とした定量系の開発



Schematic diagram of designed PCR primers to detect TC1507

Fig. 19 T25 を標的とした定量系の開発 (再設計)



Schematic diagram of designed PCR primers to detect T25(redesigned)

Fig. 16 MON863 を標的とした定量系の特異性確認

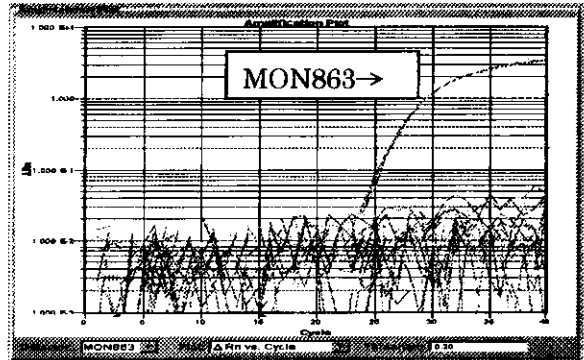


Fig. 18 TC1507 を標的とした定量系の特異性確認

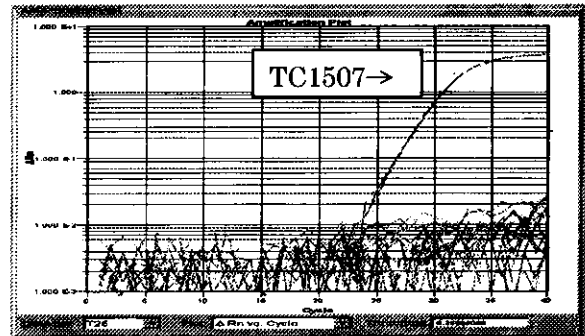


Fig. 20 T25 を標的とした定量系の特異性確認

