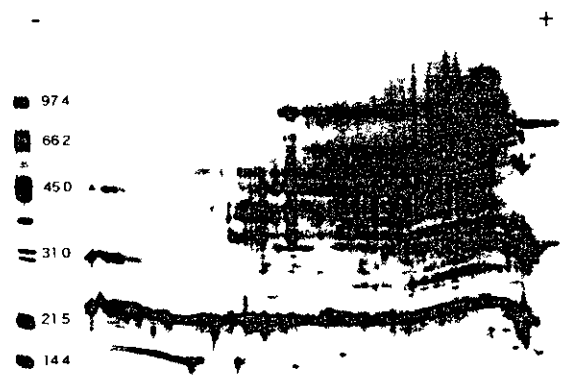
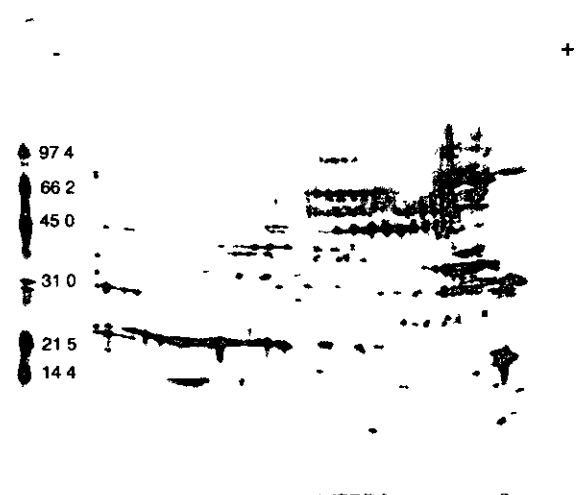


☒ 1



☒ 2



☒ 3

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究（４）  
分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

遺伝子組換え作物と非組換え作物の非タンパク性成分（低分子代謝産物）の組成と含量を比較し、遺伝子組換えによって作物の栄養素の増減、あるいは有害成分の増加などが起こっているかどうかを判別するためには、代謝産物動態（メタホローム）の一斉解析基盤を整備することが必須である。そこで本研究では、超高精度・超高感度の質量分析器であるフーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置（FT-ICRMS）を用いた組換え作物の代謝産物の一斉解析を開始した。FT-ICRMS による高分解能マススペクトル測定では、1 ppm 以下の感度で精密質量数を求めることかできると同時に、試料の粗抽出物に含まれる成分を未精製のままで一斉に分析に供することか可能である。すなわち、FT-ICRMS は、多検体のメタホロームを高速でプロファイリングする目的において、最も適した質量分析法である。まずペチュニアの花弁を用い、メタノールで抽出される全化合物をエレクトロスプレーイオン化（ESI）法によりイオン化し、FT-ICRMS に直接導入し、得られたデータ（質量数と各ピーク強度）に対して主成分分析を行った。その結果、異なる色素を合成するペチュニア花弁のメタホロームを構成する代謝産物の種類と量は、主成分分析において異なるクラスターとして存在することか明らかとなった。続いて、ダイス種子のメタノール抽出液を FT-ICRMS に供した結果、単一試料から 400 の化合物イオンを検出することかできた。本研究により、遺伝子組み換えダイスのメタホロームプロファイルを得ること、およびそれを非遺伝子組み換えダイスの化合物のプロファイルと比較か可能となった。

協力研究者

太田大策（大阪府立大学農学部）

A 研究目的

現在、遺伝子組換え農作物はその安全性審査か義務付けられている。その安全性審査において、導入遺伝子の塩基配列か検討され、その塩基配列由来のタンパク質において毒性やアレルキー性のないことか審査され、安全性か確認されている。一方、植物において、世代を経るこ

とによって核 DNA の塩基配列に点突然変異か生することは一般的であり、広く認められている。しかし、この点突然変異の生じる頻度か導入された遺伝子と内生の遺伝子とて同一であるのか、ということについての研究はなされていない。さらに、実際に含まれる非タンパク性成分（代謝成分）の種類や量に差があるかどうかは全く解明されていない。そこで、遺伝子組み換えダイスと非遺伝子組み換えダイスに含まれる代謝成分（メタホロ

ーム)を一斉分析し、作物の栄養素の増減、あるいは有害成分の増加などのメタホロームを評価することを目的とした。

## B 研究方法

### <試料>

ペチュニアは大阪府立大学農学部において栽培されているものを用いた。輸入タイスは、検疫所においてモニタリング用に採取されたものを用いた。

### <方法>

#### ペチュニア花卉に含まれる化合物の一斉分析

採取したペチュニア花卉(新鮮重約 130 mg)を赤色、白色、紫色ごとに、以下の方法によって花卉に含まれる化合物を分析した。花卉を液体窒素により凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。2 ml のメタノールを加え、さらに磨砕した後、フィルター(Advantec, DISMIC-13JP, pore size, 0.2 μm)濾過した。この粗抽出液を溶媒(0.1% 蟻酸 / 50% メタノール / 水)に 1000 倍希釈し、7 テスラの超伝導磁石を備えた FT-ICRMS (IonSpec) に供した。FT-ICRMS は positive モードで分析し、イオン化は ESI で行った。サンプルは 100 μl 容のシリンジ(Hamilton)とシリシポンプ(Harvard)を用いて、3 μl/min の流速で直接導入した。また、実験はそれぞれ 3 連で行った。各分析パラメーターは以下の通り Capillary High Voltage, 4800 V, End Plate High Voltage, 4500 V, Data point, 1024 k, ADC rate, 4 MHz

#### タイス種子に含まれる化合物の一斉分析

タイス種子を外見により 3 種類に分類し、

それぞれに含まれる化合物を以下の方法で抽出した。タイス 3 粒(新鮮重約 200 mg)をスピノツ管に入れ、メタノールを 4 ml 加えた。水上に移し、ホモナイザー(IKA labortechnik, Ultra Turrax T25 basic)によって 10 分間磨砕した。ホモナイザーの刃を 1 ml のメタノールで洗い、抽出液にその洗液を加え、1000 g で 15 分間遠心分離した。上清をフィルター濾過し、ペチュニアと同様にして希釈し、FT-ICRMS に供した。FT-ICRMS の分析はペチュニアの実験と同じ条件で行った。また、実験はそれぞれ 3 連で行った。

### テータ解析

FT-ICRMS 分析で得られた分子イオン観測テータに対する主成分分析は、独自の Pearl プログラムおよび R プログラムを開発して行った。

## C 結果・考察

### C1 ペチュニア花卉に含まれる化合物の一斉解析

ペチュニア花卉を色によって「Red」「White」「Purple」に分け、FT-ICRMS を用いて化合物の一斉解析を行った。その結果、各サンプルにつき、約 600 のピークが検出された(図 1)。これらのピーク全てに対して主成分分析を行ったところ、花卉の色の違いによって、それぞれ独立した分布を示した(図 2)。この結果は、ペチュニア花卉のメタホロームは、赤色花卉、白色花卉、紫色花卉に含まれる色素成分の相違だけではなく、メタホローム全般において組成と含量が異なることを示している。すなわち、植物

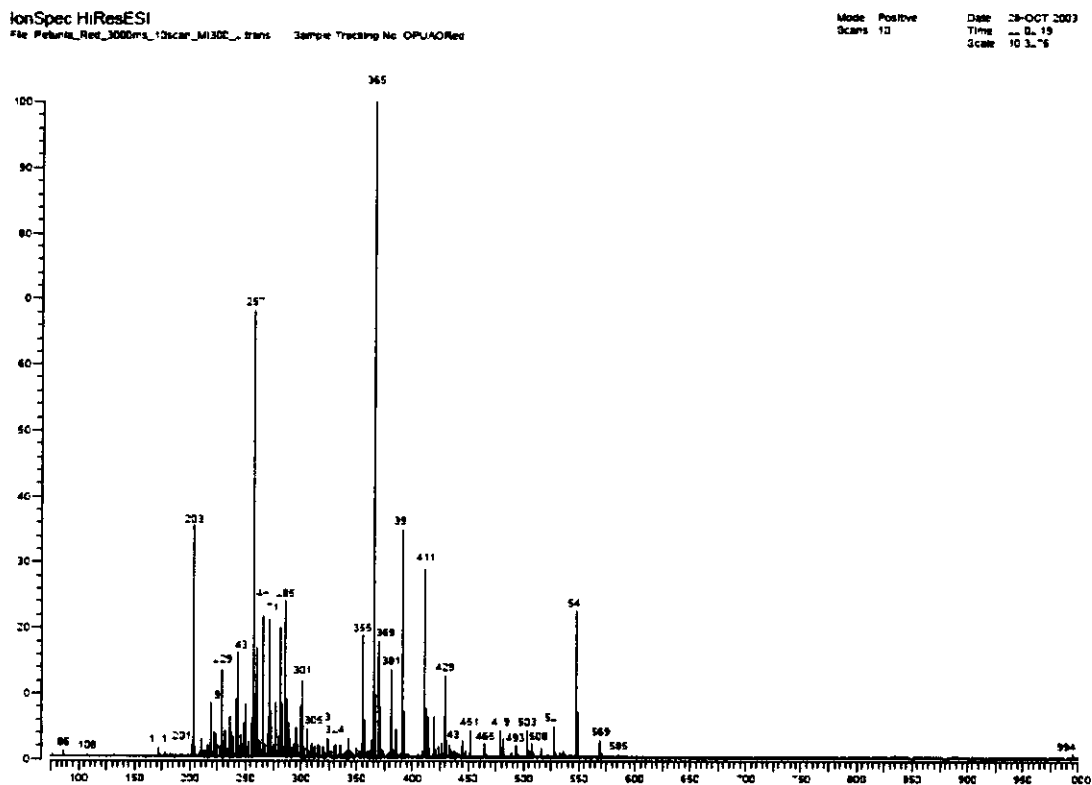
組織に含まれる代謝産物の一斉解析によってメタボロームのプロファイリングが可能である。ここで示されたメタボロームプロファイルの相違は、各花卉に含まれる代謝産物の相違を代謝表現型の相違として把握できることを示している。すなわち、メタノール抽出したサンプルをFT-ICRMSで分析することによって、同一植物種内、例えばダイス種子での代謝表現型の違いを示すことが可能であることが示された。

### C2 ダイスのメタボロームの一斉解析

ペチュニアと同様にして、ダイス種子に含まれる成分のメタノール抽出物を、

FT-ICRMSで分析した。その結果、一つのサンプルに対しておよそ400のピークを得ることが出来た(図3)。これらの結果は、組換えダイスと非組換えダイスの代謝成分を、FT-ICRMSによる一斉解析と主成分分析によるマクロなレベルでの比較とともに、各分子イオンについては、~1ppmの精度で質量が得られるので分子式の推定も可能である。このようなメタボローム解析で明らかとなった成分は、他の質量分析実験によって構造同定が可能である。

(A)



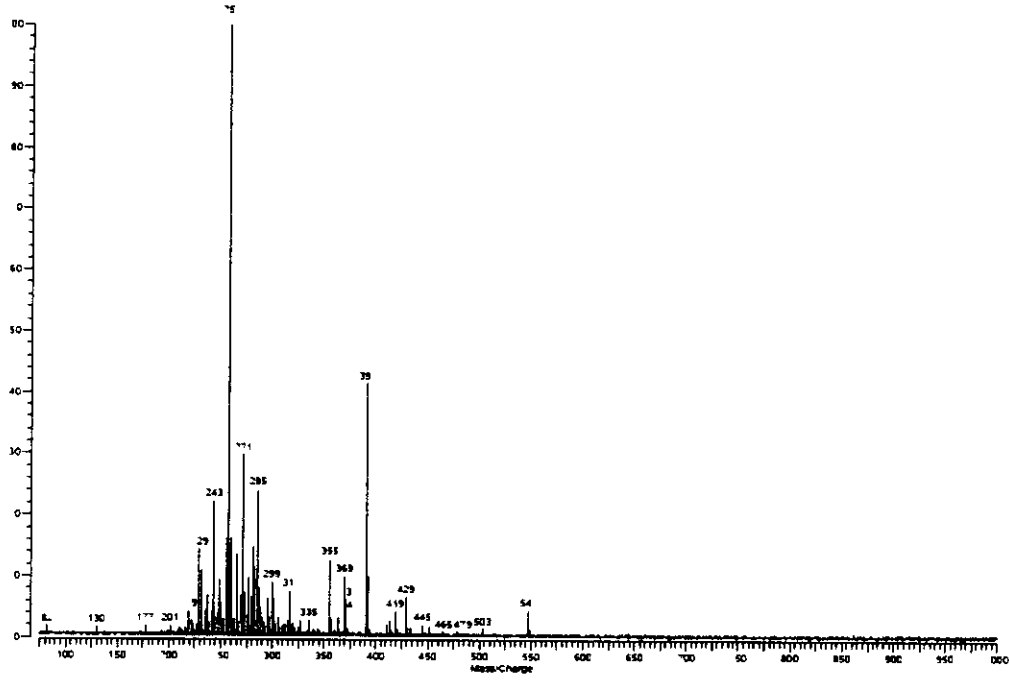
(B)

IonSpec HiResESI

File: Petunia\_White\_3000ms\_10scan\_M300\_1 ions Sample Tracking No: OPLAOWHite

Mode: Positive  
Scans: 10

Date: 19-OCT-2003  
Time: 13:15:53  
CBE: 15 ... 5



(C)

IonSpec HiResESI

File: Petunia\_Purple\_3000ms\_10scan\_M300\_1 ions Sample Tracking No: OPLAOPurple

Mode: Positive  
Scans: 10

Date: 11-OCT-2003  
Time: 11:18:53  
Scan: 15 ...

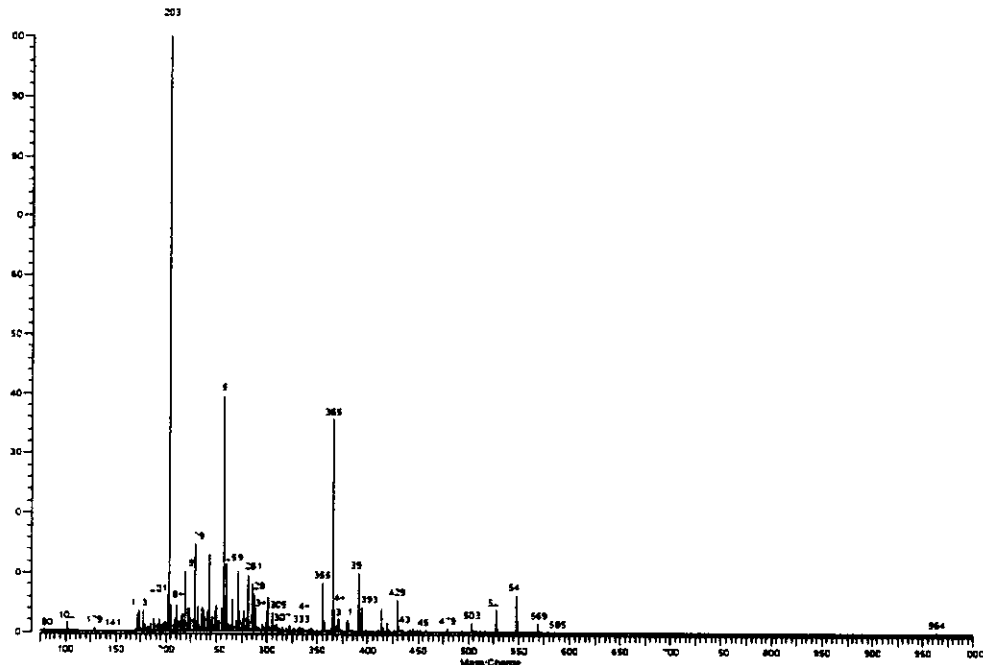


図1 ペチュニア花卉メタノール抽出物のマクロマトグラム

(A) 「Red」、(B) 「White」、(C) 「Purple」。

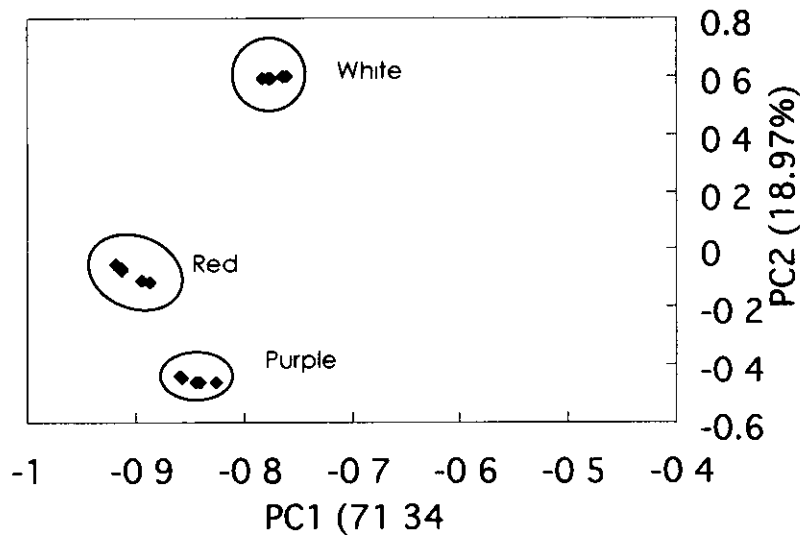


図2 ペチュニア花卉に含まれる化合物の主成分分析

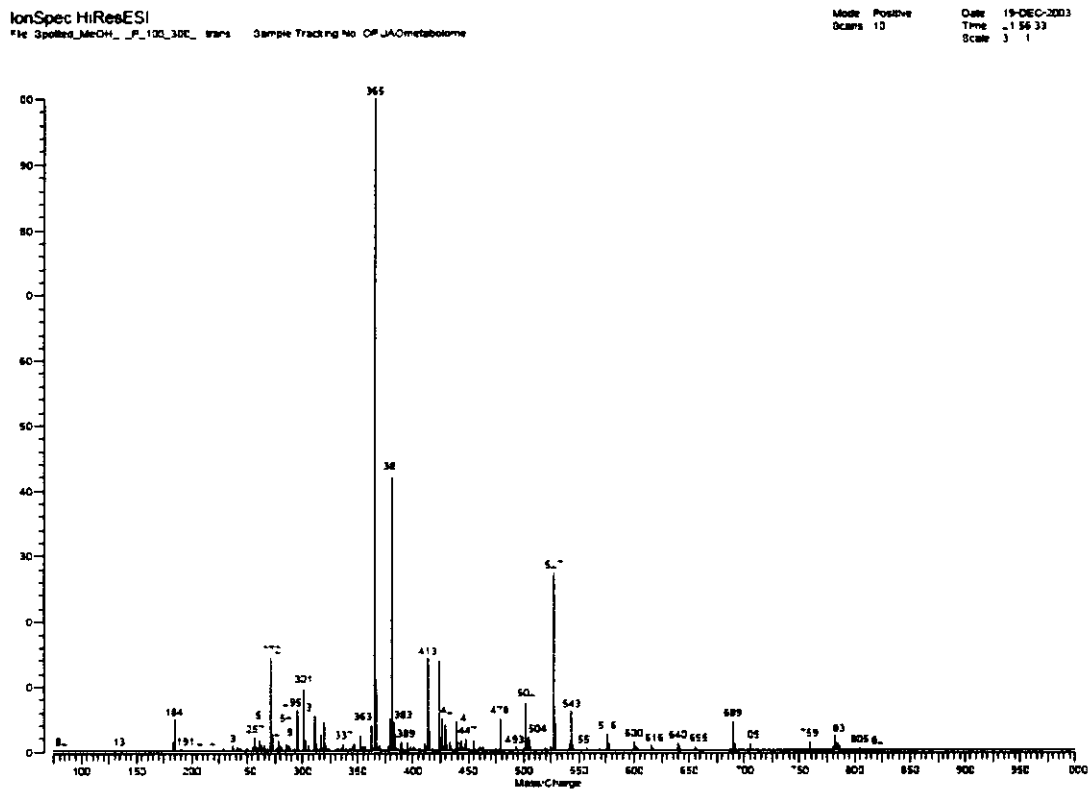


図3 ダイス種子中に含まれる化合物のマスキロマトグラム

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書  
遺伝子組換え体の検知に関する調査研究  
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性分析法の開発ならびに共同試験による評価

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ全8系統を対象とした定性検知法を開発した。本検知法には8系統を網羅的に検知するためのスクリーニング法、導入されている recombinant DNAに特異的な方法、および系統に特異的な方法が含まれる。開発した全ての方法の6機関参加による協同試験を実施し、精度および頑健性のある検知法であることを実証した。

(2) 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発ならびにin house validation

昨年度までに報告している遺伝子組換えジャガイモNewLeafならびにNewLeaf Plus特異的定量系に加え、スクリーニングを目的としたCryIIIA 定量系を新たに開発し、これに基づく標準プラスミドDNA分子の改良を行った。また、未加工ジャガイモからPCRに適合した性質をもつDNAを安定して抽出する方法としてCTAB抽出液を用いた方法を開発した。これら開発された方法を用い内標比の算出試験、得られた内標比の検証試験 (in house validation)を実施し、開発した方法が半定量法として適応可能であることを明らかにした。

(3) スタック品種トウモロコシ定性検知法の開発

測定対象検体中にスタック品種が混入している際に、現在公定法とされている定量分析法により算出される混入率が過剰評価になる可能性が考えられるため、スタック品種とうもろこしの混入と粒単位での混入率を明らかにすることを目的に、簡便で迅速な検知法を開発した。

(4) 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発

現在までに定量分析法が確立されている6系統の遺伝子組換え作物(トウモロコシ5系統およびタイズ1系統)を対象に、簡便なスクリーニング試験の開発を目的に、競合PCR法の原理に基づく簡易型定量分析法の開発について検討を行った。

(5) 定量分析法の加工食品適用可能性検証法の検討

加工影響を科学的に数値化し、対象検体における定量可能性の基礎的検討をするために、ダイズ中の2つの内在性遺伝子の加工による変質を科学的に数値化することを可能にした。

(6) 遺伝子組換えトウモロコシ5系統 ダイズ1系統を対象とした定量分析法の改良

現在までに開発され公定法とされている遺伝子組換えトウモロコシ5系統およびダイズ1系統を対象とした定量分析法における再現性の向上を目的に、使用試薬等についての改良を行った。また、改良後の定量分析法を用いてコラボレーションスタディーを実施し、その妥当性について検証した。さらに定量分析実施可能な定量PCR機器の拡充を目的に、基幹機種であるABI PRISM 7700に加え、同7000ならびに7900、およびRoche LightCycler Systemを用いた検証試験を実施し、全ての定量PCR機器が実際上適応可能であることを明らかにした。

(7) モデル加工食品を使用した遺伝子組換え食品定量分析法の適用可能範囲の検証  
現行の定量分析法の加工食品への適用可能性について検証するため、大豆、とうもろこしそれぞれ3種のモデル加工食品を作製し検討した結果、加工影響の小さな品目においては、現行の定量分析法が適応可能性であることを明らかにした。

協力研究者

日野明寛、栗原秀夫、児玉貴志（農林水産省食品総合研究所）、小関良宏（東京農工大学）、吉村倫彰（アサヒビール(株)）、小笠原健、荒川史博（三栄源FFI(株)）、加藤久（昭和産業(株)）、中出晋介、安井修二（(株)安井器械）、穂山浩、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性分析法の開発ならびに協同試験による評価

昨年度は安全性未承認として取り扱われていた遺伝子組換えジャガイモNewLeaf Y (SEMT15-02系統)も、すでに安全性審査を終了し、これを加えた全8系統の遺伝子組換えジャガイモが表示したうえで流通可能な状況にある。そのため、表示内容をモニタリングするための簡便法として定性検知法の開発を引き続き検討した。本年は、開発したスクリーニング法、construct特異的検知法(導入されたrecombinant DNAに特異的な方法)、系統特異的検知法の各検知法について、特異性にくわえ検知感度についても検証した。さらに、協同試験により、その妥当性についても評価することを目的とした。

##### 2. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発ならびにin house validation

昨年度までの検討に引き続き、安全性審査を終了した遺伝子組換えシャカイモ全8系統中、NewLeaf 2系統 (Bt-6ならびにSPBT 02-05系統)およびNewLeaf Plus 3系統 (RBMT21-350、RBMT22-82ならびにRBMT21-129)を対象とした定量分析法の開発検討を行った。本年は、昨年度報告したCry IIIA遺伝子を標的遺伝子としたスクリーニング法も考慮した標準プラスミドDNA分子を開発した。また、DNA抽出法を含む開発された全て

の定量分析法に対し、方法の頑健性や妥当性について検証することを目的にin house validationを実施した。

##### 3. スタック品種トウモロコシ定性検知法の開発

異なる遺伝的特性が付与された遺伝子組換え作物を交配し、交配親の両特性を獲得させた品種が作出されている。これらの品種はスタック品種と呼ばれ、すでに4種のトウモロコシスタック品種(MON863とNK603を交配させたスタック品種、GA21とMON810を交配させたスタック品種、MON810とNK603を交配させたスタック品種、ならびにMON810とT25を交配させたスタック品種)が安全性審査を終了し、流通可能な状況にある。これらスタック品種は親系統と同一のrecombinant DNAを有するため、多粒粉碎物を検体とした場合には、親系統が2系統混入しているのか、該当スタック品種が1品種混入しているのかを区別することが出来ない。また、定量的検知を行った場合には、スタック品種が混入した検体からは実際にはスタック品種が1倍量のみ混入している場合においても、異なる系統の遺伝子組換えトウモロコシが2倍量含まれていることと同義の結果が得られることが予想され、混入率は実際の混入率に比べ過剰評価されることとなる。このため、定量的検知法によって得られる分析値の正確さを担保するためにも、スタック品種を特異的に検知するための方法が必要とされる。本研究においては一粒粉碎物を用い、スタック品種をスクリーニング的に、さらには品種判別可能なよう特異的に検知できる方法の開発を目的とした。

##### 4. 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発

遺伝子組換えトウモロコシおよびダイズ



を対象とした定量分析法としては、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法が公定法として採用されている。本定量分析法は定量PCR機器を使用することから、実験環境の整備と、試薬等に一定のコストを要する。このため、定量PCR機器を必要とせず、簡易なスクリーニング定量検知を可能にする事を目的とし、競合PCRの原理に基づいた検知法の開発を行った。

#### 5. 定量分析法の加工食品適用可能性検証法の検討

加工食品においてはDNAが加工の影響により質的に変化することが予測されるため、DNAを直接の測定対象とする定量分析法は適用することが出来ないとされている。しかしながら、加工食品の表示内容を検証したいとの要望は年々高まる一方である。このため、加工食品におけるDNAの質的変化の大きさをより詳細に検証し、加工食品の定量分析法適合性を評価可能な評価系の確立を目的とした。

#### 6. 遺伝子組換えトウモロコシ5系統・ダイズ1系統を対象とした定量分析法の改良

公定法として定められている遺伝子組換え作物定量分析法においては、標準DNAプラスミド溶液と呼ばれる標準物質を使用する。この標準物質の安定性を向上させることを目的に溶解溶液の変更について検討した。さらに遺伝子組換えトウモロコシを対象とした定量系においては、より安定した結果が得られるよう改良することを目的に、内在性遺伝子を標的としたプライマー対の設計を変更した。全ての変更点を含む改良定量分析法については、その妥当性を検証する事を目的にコラボレーションスタディーを実施した。

#### 7. モデル加工食品を使用した遺伝子組換え定量分析法の適用可能範囲の検証

加工食品の定量分析法適用可能性について検証することを目的に、ダイズ、トウモ

ロコシのそれぞれに対して3種のモデル加工食品を作成し、定量試験をおこなった。得られた定量値について加工原料から得られた定量値との比較を行うことにより、加工影響の大きさについて評価した。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発ならびに共同試験による評価

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ8系統の内、入手可能であった6系統(Bt-6、SPBT02-05、RBMT21-350、RBMT15-101、SEMT15-02およびSEMT15-15系統)、また、それらの親系統である非遺伝子組換えジャガイモ3品種(Russet Burbank、SuperiorならびにShepody)は、現厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じて入手した。また国産ジャガイモ(男爵ならびにメークイン)、およびその他の野菜(ナスならびにトマト)、穀物類(ダイズ、トウモロコシ、および小麦)は、世田谷区内のスーパーマーケットで購入した。国産ジャガイモ(男爵ならびにメークイン)は凍結乾燥処理した後に粒径が200 μm 均一になるよう粉砕した。入手した遺伝子組換えジャガイモならびにその親系統の非遺伝子組換えジャガイモは、その性状が粉体であったため凍結乾燥処理は行わず、粒径をそろえることを目的に粉砕のみ実施した。また、検知感度の検証に際しては、国産ジャガイモのうち男爵を遺伝子組換えジャガイモの混入かないことを確認した上でマトリクスとし、混入率が重量換算で0.1、1.0%となるよう既報<sup>1)</sup>に従い粉体混合し、疑似混入試料を調製した。この際、過去の栽培実績を鑑み、また多量に入手可能でもあった、Bt-6系統をNLの、RBMT21-350系統をNLPの、SEMT15-15系統をNLYの、それぞれの代表系統とし、被験物質とした。また、NLY 3系統の各系統を個別対象とした系統特異的検知法の検知感度の検証に際しては、男爵から抽出したDNAをマトリクスとし、各系統

から抽出したDNAを混入率が重量換算で0.05、0.1、0.5、1.0、5.0%となるよう混合し試験に用いた。特異性試験に用いた各種野菜、穀粒についても十分な粉碎操作を行った後、試料とした。各種ジャガイモ試料およびダイズ、トウモロコシ試料を検体とし、既報<sup>1)2)</sup>に記載の方法に準じてDNA溶液を調製した。小麦、ナス、トマト試料を検体とした場合には、ジャガイモ試料を対象とした場合に採用したDNA抽出法を準用した。また、抽出したDNA溶液の吸光度を測定し、O.D 260 nm/280 nmの比を求め精製度の確認をおこなった。なお、この比が1.7以上であった場合に良好な精製が行われたものと判断した。PCR条件は検知の特異性を向上させ、かつ全ての検知法において同じ条件でPCR増幅が行えるよう、既報<sup>2),3),4)</sup>の条件を以下のように変更した。PCR反応液は、1XPCR緩衝液、0.2 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ mol/Lプライマーおよび0.625 unit Amp l iTaq™ Goldを含む溶液に10 ng/ $\mu$ L DNA溶液2.5  $\mu$ Lを加え、全量を25  $\mu$ Lとした。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5分間、60°C 0.5分間、72°C 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行った。次いで終了反応として72°Cで7分間保った後、4°Cで保存した。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  $\mu$ mol/Lになるよう希釈し、-20°Cにて保存した。

検討した検知法の妥当性について検証するため、以下のように共同試験を実施した。国産シャカイモであるメイクインならびに男爵、また入手可能であった遺伝子組換えジャガイモ(6系統)の調製済み粉体をそれぞれ200 mgとなるよう15 mL用遠沈管に秤量分注し、小分け試料とした。小分け試料の総数は参加機関数が6であったことから、その4倍数の24点とした。小分け試料の均一性について確認

するため、それぞれの小分け試料につき3点を無作為選出し均一性試験を実施した。均一性確認後、小分け試料を乱数表を用いて無作為選出しblind duplicateの検体とした上で各機関に送付した。この際、検体にはアルファベットでAからPまでの識別記号を附した。

各機関に送付した検体総数ならびにその内容は以下の通りである。NLとしてBt-6ならびにSPBT02-05、NLPとしてRBMT21-350、NLYとしてRBMT15-101、SEMT15-02ならびにSEMT15-15の各遺伝子組換えジャガイモ系統(計6系統)。これらに陰性対照として男爵ならびにメイクインを加えた計8種各2検体(検体総数16)。また、検体送付時には各種プライマー溶液(5  $\mu$ M)に加え、DNA抽出法、PCR条件、判定法を規定した試験要領を合わせて送付した。

試験の流れと結果の判定は以下の通りとした。まず、全ての検体に対してUGPaseとCry IIIAを標的遺伝子としたスクリーニング試験を実施し、遺伝子組換えジャガイモ陽性を判断する。次いで、NLの特定試験を行い、陰性であった検体につきNLYの特定試験を行った。NLY陰性検体についてはNLP、の特定試験を行い、NLY陽性であった検体についてはNLY 3系統の特定試験を行うものとした。判定は遺伝子組換えジャガイモ陰性、NL陽性、NLP陽性、RBMT15-101陽性、SEMT15-02陽性、およびSEMT15-15陽性のいずれかで行っていただいた。

## 2. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発と評価

### 1) 未加工ジャガイモからのDNA抽出法

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)抽出液を用い、未加工ジャガイモを対象とするDNA抽出法を開発した。以下方法について示す。

粉碎試料200 mgをポリエチレン製遠沈管(15 mL容)に量り採り、CTAB抽出液5.0 mLとProteinase Kを30  $\mu$ Lに加え、試料粉末の塊が見えなくなるまで充分均一化させた後、室温で60分間振とうさせた。その後、8000 x g、室温下で10分間遠心後、上清4 mLを

新しい遠沈管 (15 mL容) に分取した。分取した上清にTE飽和フェノールを2 mL加え2分間激しく攪拌し、さらにCIA ( クロロホルム / イソアミルアルコール=24 / 1 ) を2 mL 加え2分間激しく攪拌した後、8000 x g、室温下で10分間遠心後、上清4 mLを別の遠沈管に分取した。分取した上清にCIAを4 mL加え2分間激しく攪拌した後、8000 x g、室温下で10分間遠心後、上清4 mLを別の遠沈管に分取した。分取した上清に等量のイソプロピルアルコールを加え、10回反転させ攪拌した後、8000 x g、4°Cで10分間遠心後、上清を捨てた。遠沈管に残存した沈殿物に対し70%エタノールを4 mL加え、沈殿物が遊離したのを確認し、8000 x g、4°Cで5分間遠心後、上層を捨てアスピレーターにより3分間乾燥させた。

次いでTE緩衝液200  $\mu$ Lを加えDNAを溶解し、溶解後のDNA溶液をマイクロ遠沈管 ( 15 mL容 ) に移した。溶解液にRNaseA(10 mg / mL)を5  $\mu$ L加え、37°Cで1時間保温した。CTAB抽出液を800  $\mu$ L、CIAを1 mL加え、タッチミキサーにより攪拌した。その後、7000 x g、室温下で10分間遠心し、上清を別の遠沈管に移した。得られた上清と等量のイソプロピルアルコールを加え、遠沈管を10回反転させ攪拌した後、10000 x g、室温下で10分間遠心した。遠心後、上層を捨て70%エタノール1 mL加え沈殿物が遊離したのを確認し、3000 x g、4°Cで5分間遠心し上清を捨て、アスピレーターにより3分間真空乾燥させた。TE溶液100  $\mu$ L加えてDNAを溶解させたものをDNA試料原液とした。DNA試料原液は-20°Cにて保存した。

## 2) 遺伝子組換えジャガイモのスクリーニングおよびconstruct特異的定量分析法に使用する標準分子の開発

定量的PCR法実施に当たり必要となる標準物質(標準プラスミドDNA)を既報<sup>5)</sup>に従い開発した。

## 3) 定量的 PCR 法において採用した反応液組成および反応条件

反応液組成は、2 X Universal Master Mix 12.5  $\mu$ L、プライマー溶液とプローブ溶液の混合液 10  $\mu$ L ( 対象プライマーの濃度は1.25  $\mu$ mol / L、対象プローブの濃度は0.5  $\mu$ mol / L )、これに20 ng /  $\mu$ Lに濃度を調製したDNA試料液を2.5  $\mu$ L、または標準プラスミドDNA溶液2.5  $\mu$ L加え、全量を25  $\mu$ Lとした。

反応条件は50°C 2分間保持の後、95°Cで10分間保ち、95°C 30秒、59°C 1分を1サイクルとして40サイクルの増幅反応を行った。

## 4) 内標比の算出およびその妥当性検証

開発された定量系を用いて、試料入手が可能であったNL2系統およびNLP1系統を対象とした内標比測定試験を実施した。得られた内標比に対しては以下に示す疑似混入試料を調製し、その妥当性について検証を行った。疑似混入試料としては、本研究において採用したDNA抽出法に必要な初期試料量が200 mgであったため、この0.5%、5.0%に当たる該当遺伝子組換えジャガイモ系統の粉体を正確に秤量し非遺伝子組換えジャガイモ粉体に加え、その全量を抽出に用いることとした。なお、非遺伝子組換えジャガイモにはRusset Burbank種を使用した。ジャガイモ粉体の調製法についてはB-1に記載した。

## 3 スタック品種トウモロコシ定性検知法の開発

### 1) 1粒別多粒同時DNA抽出法

スタック品種の検知および品種判別には1粒検査が不可欠であるため、極力省力化された1粒別多粒同時DNA抽出法について検討した。以下、その方法について示す。まず1粒検査を確実なものとするために、コンタミネーションを予防する目的から1% SDSを用いた種子洗浄を行った。洗浄後、十分に乾燥させた種子1粒をメタルピースを含む専用のチューブに分取し、安井器械(株)製の48検体同時粉碎可能な振幅型試料粉碎器 (Multi beads shocker)を改良して粉碎した。粉碎後、粉碎物を含むチューブに直

接QIAGEN 社製 DNeasy 96 Plate キット付属の抽出buffer を加え、以降、キット付属のマニュアルを最適化した方法を用いてDNA抽出を行った。なお、上記キットの使用により、96検体(96粒)からの同時DNA抽出が可能となる。

#### 2) Multiplex real-time PCR 法を用いたスタック品種スクリーニング法

スタック品種判別に先立ち、遺伝子組換えトウモロコシであるか否かを簡便にスクリーニングする事を目的に、TaqMan chemistry を応用したMultiplex real-time PCR 法による検知法を検討した。安全性審査を終了しているスタックトウモロコシには35Sプロモーター配列もしくはGA21系統に特異的な配列が含まれている。このことから、内在性遺伝子、35Sプロモーター配列、GA21系統特異的配列を1反応液から同時に検知することが可能となるよう、以下に示す反応組成を持つMultiplex 反応系を検討した。反応液組成は、2 X Universal Master Mix 12.5  $\mu$ L、3種のプライマー対およびプローブを含む混合溶液 10  $\mu$ L (各プライマーの濃度は125  $\mu$ mol / L、また、各対象プローブの濃度は0.5  $\mu$ mol / L)、これに20 ng /  $\mu$ Lに濃度を調製したDNA試料液を2.5  $\mu$ L、またはnon template control 用DNA溶液2.5  $\mu$ L加え、全量を25  $\mu$ Lとした。なお、プライマー対およびプローブに関しては、現公定法において使用されるSSIb-3・SSIb-Taq、P35S-1 P35S-TaqおよびGA21-3 GA21-Taqを使用しているが、プローブの蛍光標識をmultilayerでの解析が可能ないようにP35S-TaqならびにGA21-TaqはFAM、SSIb-TaqはVICへと変更している。

#### 3) Multiplex PCR 法を準用したスタック品種判別

B-3-2)に示したスタック品種スクリーニング法により陽性判定された検体について、スタック品種であるのか、通常の遺伝子組換えトウモロコシ系統であるのかの特定が必要となる。このため、松岡ら<sup>6)</sup>により報告された multiplex PCR 法を準用し、スタ

ック品種判別可能性について検討した。

#### **4. 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発**

##### 1) ダイズおよびトウモロコシ試料からのDNA抽出

ダイズ、トウモロコシ試料からのDNA抽出は均一に粉砕した試料1 g もしくは0.5 g を初期試料とし、既報<sup>5) 6)</sup>に従って行った。

##### 2) PCR反応液の調製ならびにPCR条件

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製した。反応液は、PCR緩衝液、0.2 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、0.2  $\mu$ mol/L 5' および3' プライマー、および0.625 units Taq DNAポリメラーゼを含む液に、20 ng/ $\mu$ L に調製したDNA試料液 2.5  $\mu$ L (DNAとして50 ng) を水中で加えた。さらに、その反応液に競合プラスミドDNA溶液を2  $\mu$ Lずつ加え、全量を25  $\mu$ Lとした。

反応条件は次の通りである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5分間、60°C 0.5分間、72°C 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行った。次に終了反応として72°C で7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とした。調製に際しては、PCR反応で生じる誤差を減少させるため、1 DNA試料液あたり2回 (2 tubes) のPCR用反応液を調製した。また、競合プラスミドDNAのコピー数は5点のDoseを用意した(各コピー数については遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの混入量に応じて変化させる必要がある。詳細については結果に示す)。なお、ダイズに関しては、プライマー対として内在性、遺伝子組換えダイズ検知用ともに現行通知記載のLe1-n02およびRRS-01を、トウモロコシに関しては同じくSSIb-3、P35S-1、GA21-3を使用した。

##### 3) 競合プラスミドDNAの合成

競合プラスミドDNAの合成に当たっては、競合PCRの原理上、同一の反応液中で検体由来および競合DNAプラスミド由来両方のPCR増幅産物を競合的に増幅させる必要がある

ため、以下のような増幅断片長の異なる産物かそれぞれから増幅されるように設計を行った。B-4-2)記載のプライマー対Le1-n02およびRRS-01を用い検体由来ゲノムDNAを対象としたPCRを行うと、それぞれ118および121 bpの増幅産物を生じる。これらに対し、競合プラスミドDNAを対象としてPCRを行った場合には、139および142 bpの増幅産物を生じるようスペーサー配列を挿入した。ついで、これら139ならびに142 bpの増幅産物を既報<sup>5)</sup>に従い連結し、競合プラスミドDNA分子として構築した。

トウモロコシに関してもダイズ同様に、S SIIb由来の増幅産物として172 bp、P35S由来またGA21由来の増幅産物としてそれぞれ122 bpあるいは154 bpの増幅産物を生じるようスペーサー配列を挿入し、競合プラスミド分子を構築した。

#### 4) PCR増幅産物の電気泳動ならびに定量化

0.5 mM EtBrを含む4%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動後、UV照射によって得られた像をCCDカメラで撮影した。次いで、撮影した画像を画像解析用ソフトウェアによって解析し、各増幅産物由来の蛍光強度を積算値として数値化した。

#### 5) 結果の判定法

検体DNA由来のLe1-n02増幅産物のハンド強度(ゲノム積算値)を求めた。また一方で、同一の反応液中に含まれる競合プラスミドDNA由来のLe1-02増幅産物のハンド強度(競合積算値)を求めた。これらゲノム積算値および競合積算値は反応に供した一連の反応液(競合プラスミドDNAのDoseを5点で変動させているため、その5点全て)から求め、競合積算値/ゲノム積算値としてその比率(競合ゲノム値)を求めた。競合ゲノム値は競合プラスミドDNAのDose1点に対し、2反応液の並行試験を行ったことから、2反応液の平均値とした。次いで、反応液に添加した競合プラスミドのコピー数の対数を

横軸に、対応する競合ゲノム値の対数を縦軸にプロットした。プロットから近似直線を求め、 $y=0$ すなわち競合ゲノム値が1となる点を求め、その点に相当するコピー数を検体由来のコピー数とした。Le1-n02に対して行ったのと同様の解析をRRS-01に対しても行い、コピー数を求めた。内在性およびRRS特異的配列のコピー数を算出した後に、混入率算出式に代入し、混入率の算出を行った。

トウモロコシにおいてもダイズ同様の方法に従って混入率の算出を行った。

#### 5. 定量分析法の加工食品適用可能性検証法の検討

加工影響を評価する検証法として、異なる複数の内在性遺伝子における質的変動(加工強度の変動に伴うコピー数の変動)を様々な加工食品を対象に検証することにより、加工影響を科学的に評価可能であると考えた。そこで評価法において標的とする2つの内在性遺伝子に、現行の定量分析法において採用されているLectin遺伝子と新規内在性遺伝子HMG(high-mobility group)遺伝子を選択し、検討を行った。

##### 1) 新規内在性遺伝子 HMG (high mobility group) 遺伝子を標的とした定量系の開発

文献情報を精査する事により、Lectin遺伝子と同様にsingle copy geneであるとの情報が得られたHMG(high-mobility group)遺伝子<sup>7)</sup>を標的としたプライマー対ならびにプローブ(GmaxHMG-01およびHMG-Taq)の設計を行った。設計の際には対象とするLectin定量系(Le1-n02プライマー対およびLe1-Taq)との加工影響感受性に差異を生じさせることを目的に、PCR増幅産物長がより短くなるよう設計した(HMG定量系 84 bp、Lectin定量系 118 bp)。設計したプライマー対プローブについては遺伝子組換えダイズ、非遺伝子組換えダイズ、ダイズ近縁マメ科植物、および主要穀物類から抽出したDNAを鋳型とした特異性確認試験を実施した。

## 2)加工影響評価用標準分子の開発

特異性の確認された定量系を用いて、加工影響を評価するに当たり標準物質とするプラスミドDNA(PMulSLH)の開発を行った。PMulSLHはPUC19ベクターを基本骨格として開発し、GmaxHMG-01、Lc1-n02各プライマー対に加え、遺伝子組換えダイズ特異的配列を増幅するRRS-01、P35S-1およびNOSter-2プライマー対によって増幅される増幅産物を連結、導入し、構築した。

## 6 遺伝子組換えトウモロコシ5系統・ダイズ1系統を対象とした定量分析法の改良

### 1) 試薬等改良点

試薬等の改良点は主に以下の2点である。標準プラスミドDNAをサケ精子DNAを含むDWに溶解していたところを、大腸菌由来プラスミドDNAを含むTE緩衝液に溶解するものとした。トウモロコシ定量系において内在性遺伝子に採用されているSSIIb遺伝子を標的としたプライマー対の設計を、安定性の向上を目的にSSIIb-1からSSIIb-3に変更した。

### 2) 内標比測定試験

ABI PRISM 7700、同7900、および7000、またRoche LightCycler System を改良定量分析法の実施可能機種とすべく、以下に示す数の機関の協力を得て内標比の算出を目的とした協同試験を行った。ABI PRISM 7700 14機関。ABI PRISM 7900(96 well) 6機関。ABI PRISM 7900(384 well) 6機関。ABI PRISM 7000 8機関。Roche LightCycler System 11機関。参加各機関へは100%種子から抽出し、濃度調製を行ったDNA溶液、各定量反応に使用する試薬、および試験マニュアルを送付し、得られた測定値は食品総合研究所、もしくは国立医薬品食品衛生研究所(とりまとめ機関)にて集計し、解析を行った。

### 2) ブラインド試験

得られた内標比の妥当性について検証することを目的に、ブラインド試料を各機関

に送付し、測定試験を行っていただいた。ブラインド試料は、対象遺伝子組換えトウモロコシもしくはダイズの各系統を規定量、重量混合(0.1、0.5、1.0、3.0、5.0および10.0%)した粉体試料から抽出したDNAとした。得られた測定値はとりまとめ機関において集計し、機種間における相関性を含めて詳細な統計解析を行った。

## 7 モデル加工食品を使用した遺伝子組換え定量分析法の適用可能範囲の検証

### 1) タイズモデル加工食品の調製

遺伝子組換えダイズを対象とした定量分析法における加工影響について検討することを目的に、以下のようにモデル加工食品を調製した。まず、加工原料として1および5%疑似混入試料(粒のまま混合)を調製した。次いで、上記加工原料を用いて豆腐、豆乳および煮豆を調製した。豆腐・豆乳の調製においては98°C、1kg/cm<sup>2</sup>の条件で3分間、加熱加圧処理を行い、凝固剤を添加したものを豆腐、しなかったものを豆乳とした。煮豆の調製においては85°Cで40分間前処理した後、110°C、1.44kg/cm<sup>2</sup>の条件で60分間加熱加圧処理を行った。なお、これらの加工処理は市販製品の調製に使用される一般的な方法として採用された。

### 2) トウモロコシモデル加工食品の調製

遺伝子組換えトウモロコシを対象とした定量分析法における加工影響について検討することを目的に、以下のようにモデル加工食品を調製した。まず、加工原料として1および5%疑似混入試料(粒のまま混合)を調製した。次いで、上記加工原料を用いてコーンスターチ、コーンハフおよびコーンチップを調製した。それぞれの加工条件は以下の通り。コーンスターチ 0.2%亜硫酸中て53°Cの加温処理を48時間行い、粉碎・篩別の後、遠心分離によって精製。コーンハフ 200°Cの条件でハフマシーンを使用して粗加工し、その後、カッターで切断した。コーンチップ 蒸煮後、油揚げをし

た。なお、これらの加工処理は市販製品の調製に使用される一般的な方法として採用された。

### 3 DNA抽出法の比較検討

加工食品を対象としたDNA抽出法としての適合性を検討するために、DNeasy Plant Maxi法とGenomic-tip法の2法をDNA抽出法として選択し、得られる混入率の精度比較を行った。

### 4 定量的PCR法

定量的PCR法は、既報<sup>5)</sup>に従っておこなった。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発と評価

#### 1) ジャガイモ内在性遺伝子ならびに各種遺伝子組換えジャガイモ検知用プライマーの設計

ジャガイモの内在性遺伝子であり、single copy geneであることが明らかにされているUDP-glucose pyrophosphorylase(UGPase)をコードする遺伝子を陽性対照の標的遺伝子に選択し、同遺伝子を検知するためのプライマー対としてUGPase 01-5' とUGPase 01-3' を、Genbank™ Accession No U20345および文献情報<sup>7)</sup>を基に設計した。本プライマー対により111 bpのハント長をもつPCR増幅産物を生じる。安全性審査を終了した8系統の遺伝子組換えジャガイモの全てに、コロラドハムシに対する抵抗性を付与する目的で、*Bacillus thuringiensis*由来のCry IIIA をコートする遺伝子が導入されている<sup>3),4)</sup>。この情報に基づき、遺伝子組換えジャガイモ8系統を網羅的に検知することを目的に、Cry IIIAを標的としたプライマー対(Cry IIIA 01-5' とCry IIIA 01-3') を、Genbank™ Accession No.X70979の配列情報を基に設計した。本プライマー対により117 bpのハント長をもつPCR増幅産物を生じる。NL 2系統を検知するためのプライマー対としては、NL に導入されたrDNAの全

塩基配列中、Cauliflower mosaic virusの3' 5Sプロモーター配列(Genbank™ Accession No AF078810)と上記Cry IIIAをコードする配列にまたがるNL特異的な境界領域を標的配列とし、NL 01-5' とNL 01-3' を設計した。本プライマー対により113 bpのハント長をもつ増幅産物を生じる。NLP 3系統およびNLY 3系統を検知するためのプライマー対としては、穂山ら<sup>2),3)</sup>によって報告されたp-FMV02-5' とPLRV01-3' のプライマー対、およびp-FMV05-5' とPVY02-03' のプライマー対によってそれぞれ増幅される領域内部に、増幅効率を高め安定した結果を得る事を目的とし、より短いハント長をもつ増幅産物を生じよう、NLP 01-5' とNLP 01-3'、およびNLY 01-5' とNLY 01-3' を設計した。本プライマー対により125 bpおよび123 bpのハント長をもつ増幅産物をそれぞれ生じる。さらにNLY 3系統を個別に検知することを目的としたプライマー対(NLY15-01-5' とNLY15-01-3' SEMT15-15系統特異的)、(NLY02-01-5' とNLY02-01-3' SEMT15-02系統特異的)および(NLY101-01-5' とNLY101-01-3' SEMT15-101系統特異的)は安全性審査資料に記載された情報を基に、rDNAとジャガイモゲノムDNAとの境界領域を標的配列として設計した。上記3種のプライマー対により164 bp、86 bp、150 bpのハント長をもつ増幅産物をそれぞれ生じる。本研究において開発された各種プライマー対の検知対象系統ならびに標的配列の位置をFig. 1に、各プライマー配列をTable 1に示す。

#### 2) ジャガイモ内在性遺伝子(UGPase)検知用ならびに遺伝子組換えジャガイモスクリーニング検知用プライマー対の特異性検証

擬陰性判定を避けるためにも、試験に供するDNAが十分に精製されており、また分解等により変質していないことを確認することは、PCRを用いた検知法において重要である。そこで本研究においては、PCRに適した質を持つジャガイモ由来DNAが試験に供さ

れていること確認するため、シャカイモ内在性遺伝子である *UGPase* を標的遺伝子としたプライマー対 (*UGPase* 01-5' と *UGPase* 01-3' ) を設計した。本プライマー対の特異性を検証する目的で、5品種の非遺伝子組換えシャカイモ、6系統の遺伝子組換えシャガイモ、シャガイモの属するナス科植物2種、主要穀物の代表としてトウモロコシ、大豆、ならびに小麦からそれぞれ抽出したDNAを鋳型としたPCRを行った。その結果、遺伝子組換えてあるなしを問わず、シャガイモ試料から抽出したDNAを鋳型とした場合にのみ予想された長さの増幅産物が得られた。これに対し、ジャカイモに近縁の植物種であるナス科植物を含む他の植物種から抽出したDNAを鋳型とした場合には、増幅産物が認められなかった (Fig. 2A)。これらの結果から、*UGPase* 01-5' ならびに *UGPase* 01-3' をプライマー対として用いることによりシャカイモを特異的に検知可能であり、さらに予定バンド長の増幅産物が得られるか否かを指標に、DNAの質について評価可能であると考えられた。

次に、安全性審査を終了した遺伝子組換えシャカイモ全8系統を網羅的に検知する事を目的とし設計したプライマー対 (*CryII IA* 01-5' と *CryII IA* 01-3' ) の特異性を確認する目的でPCRを行った。その結果、本研究において入手可能であった6系統の遺伝子組換えシャガイモ全てから、予定ハント長の増幅産物が特異的に得られた (Fig. 2B)。

検討に供することの出来なかったRBMT21-129ならびにRBMT22-82の2系統についても、試験に供された他の遺伝子組換えジャカイモに導入されたものと同じの配列をもつ *CryII IA* が導入されていることから、これらの系統においても同等の結果が得られると考えられる。

以上の結果から、ジャガイモ内在性遺伝子検知用プライマー対、ならびに遺伝子組換えシャガイモスクリーニング検知用プラ

イマー対を用いた試験を並行して行うことにより、供したDNAのPCR適合性を担保しつつ、安全性審査の終了している遺伝子組換えジャカイモ全8系統を特異的かつ網羅的に検知する事が可能であると考えられた。

### 3) NL、NLPおよびNLY特異的検知用プライマー対の特異性検証

遺伝子組換えシャガイモスクリーニング検知用プライマー対を用いた試験により遺伝子組換えジャカイモが検知された場合、その流通実体を把握するために、NL、NLPあるいはNLYのいずれかが混入しているかを明らかにすることは有益である。本研究においてはNL、NLP、およびNLYを特異的に検知可能なプライマー対 (NL特異的検知用プライマー対 NL 01-5' と NL 01-3'、NLY特異的検知用プライマー対 NLP 01-5' と NLP 01-3'、NLY特異的検知用プライマー対 NLY 01-5' と NLY 01-3' ) を設計し、その特異性を確認する目的でPCRを行った。Fig. 3AならびにB、およびFig. 4Aに示されるように、NL特異的検知用プライマー対を用いた場合には、NL 2系統を対象とした場合にのみ、NLP特異的検知用プライマー対を用いた場合には試験に供したNLP 1系統を対象とした場合にのみ、NLY特異的検知用プライマー対を用いた場合には、NLY 3系統を対象とした場合にのみ、それぞれ予定ハント長をもつ増幅産物が特異的に得られた。試験に供することの出来なかったNLP 2系統についても、NLP 特異的検知用プライマー対が標的とする塩基配列が導入されているため、同様の結果が得られるものと考えられる。これらの結果により、NL、NLP およびNLYを識別するための特異的検知が可能であると考えられた。しかし、前述の3種のプライマー対を用いた場合、同一のrDNAを導入された複数の遺伝子組換えシャカイモ系統を識別する事は出来ない (Fig. 3AならびにFig. 4A)。この識別を可能とするためには、遺伝子組換えシャカイモに特異的に存在し、か



つ、系統間での差違が明確な塩基配列を標的配列としプライマー対を設計しなければならない。そこでさらに、rDNAとジャカイモゲノムとの境界領域を目的に合致する標的配列と考え、安全性審査資料に記載のあった塩基配列情報に基づき、NLY3系統の系統識別が可能な特異的プライマー対(NLY15-01-5' とNLY15-01-3' SEMT15-15系統特異的、NLY02-01-5' とNLY02-01-3' SEMT15-02系統特異的、およびNLY101-01-5' とNLY101-01-3' SEMT15-101系統特異的)を設計した。Fig.4BからFig.4Dまでにその結果を示すが、いずれのプライマー対においても、目的系統を対象としたときにのみ予定ハンド長を持つ増幅産物が特異的に得られた。これらの結果から、上記プライマー対を用いたPCR法を実施することにより、系統間を識別して検知することが可能であると考えられる。

#### 4) 検知下限の検証

次に、本法による検知下限について確認を行った。遺伝子組換えジャカイモスクリーニング検知用プライマー対、NL、NLP、およびNLY特異的検知用プライマー対の検証には、Bt-6系統、RBMT21-350系統、あるいはSEMT15-15系統の粉体試料をそれぞれ重量換算で0.1、1.0%となるよう国産シャカイモ(男爵)の粉体試料に混入させた疑似混入試料を用いた。NLY 3系統にそれぞれ特異的なプライマー対の検証には、NLYの各系統から抽出したDNAと男爵から抽出したDNAをそれぞれ等しい濃度になるように調製した後、NLY各系統由来のDNAが重量比として0.05、0.1、0.5、1.0、5.0%となるように混合した疑似混入DNA試料を用いた。Fig. 5Aに示されるように、遺伝子組換えシャカイモスクリーニング検知用プライマー対、NL、NLPおよびNLY特異的検知用プライマー対のいずれを用いた場合にも、0.1%混入試料を対象に予定ハンド長を持つ増幅産物が特異的に得られた。また、NLY 3系統のそれぞれに特異的なプライマー対のうち、SEMT15-02系

統特異的プライマー対を用いた場合には0.5%よりも混入率が低い場合に増幅産物が得られなかったが、残りの2系統については0.05%混入試料においても増幅産物が得られた。PCRを用いた検知法における感度は供するDNAの質、プライマーの物理的な特性、PCR条件、標的配列のゲノムDNA上の位置ならびにコピー数など、様々な影響を受けることが予想される。本研究においては検知法としての簡便性の点から、同一の反応条件下で試験可能であることを検討目的の一つとした。SEMT15-02系統特異的プライマー対の感度に影響を与えた要因については現段階において特定することが出来ないが、PCR条件の最適化を含め、今後検知感度の向上を目的とした改変を加えることは可能であると考えられる。

#### 5) 共同試験による妥当性評価

本試験法の妥当性を評価するため、6機関参加の共同試験を実施した。判定結果の一例ならびに全機関から報告された結果の正答率をTable 2およびTable 3に示す。遺伝子組換えジャカイモであること、またNL、NLPおよびNLYのいずれであるか、さらにはNLY 3系統の内いずれの系統であるかということが明確に検知され、その正答率は全ての試験において100%であった。これらの結果から、本検知法の妥当性が検証された。

## 2. 遺伝子組換えジャカイモ定量分析法の開発と評価

### 1) 未加工シャカイモからのDNA抽出法

未加工シャカイモを対象とし、Cetyltrimethylammoniumbromide(CTAB)抽出液を用いたDNA抽出法を開発した。開発した方法の妥当性を検証することを目的に、定量的PCR法の検証に用いる系統としたNewLeaf Potato (Bt-6ならびにSPBT02-05系統)、NewLeaf Plus Potato (RBMT21-350系統)、および非遺伝子組換えジャカイモ(Russet Burbank)の各ジャカイモ6検体を対象にDNA抽出を実施し、DNAの平均収量ならびにばらつき、ま

たその質について評価を行った。Fig.6 に示したとおり、4種のシャガイモ間でDNA収量に大きな差異は認められなかった。また、6検体間でジャガイモ種ごとに算出した変動係数が10%を下回っていたことから、良好な並行再現性が示された。さらに、抽出されたDNAの質についての判断指標となるO.D. 260/280ならびに260/280比についても、良好な質を持つと判断される2.0前後および1.7~2.0の値となることが示された。

## 2) 遺伝子組換えシャカイモのスクリーニングおよびconstruct-特異的定量分析法に使用する標準分子の開発

定量分析法に供する鋳型DNA中に含まれる標的配列のコピー数を算出するため、標準分子として使用するプラスミドDNA(標準プラスミドDNA PMuLNL3 1)を開発した。本プラスミドDNAにはC-1-1)において示したシャガイモ内在性遺伝子検知用、遺伝子組換えジャガイモスクリーニング検知用(*Cry IIIA*)、NL特異的検知用、NLP特異的検知用の各プライマー対により得られる増幅産物が連結されている(Fig.7)。結果は示さないが、本プラスミドを分子量とモル数から計算し、規定コピー数となるよう段階希釈(20、125、1500、20000、250000コピー)した標準プラスミドDNA溶液を用いた試験においては、良好な直線性が確認されている。

## 2) 内標比の算出およびその妥当性検証

混入率算出の係数となる内標比の測定を行った。内標比とは、内在性遺伝子と、導入された組換えDNA配列との量的比率を意味しており、理論的には特定の遺伝子組換え作物を対象とする場合、常に一定の値を示す。遺伝子組換えシャカイモに導入されている組換えDNA配列のコピー数は、NL2系統において1、NLP(RBMT21-350系統)において2と報告されており、また、ジャガイモが4倍体植物であることから、それぞれの理論的内標比は0.25および0.50となる。測定対象となるNL 2系統およびNLP1系統を対象に、

スクリーニングおよび各遺伝子組換えシャカイモ特異的定量系を使用し内標比を実測した。各対象6検体から独立してDNAを抽出し、2回の繰り返し測定を行い、得られたデータの平均をTable 4に示した。NL 2系統、およびNLP 1系統のそれぞれから異なる定量系を用いて得られた内標比の実測値は、その全てにおいて理論値から大きな異ならないと判断された。

ついで、実測された内標比か混入率算出の際に用いる係数として实际的に機能するか、その妥当性について検証することを目的に、疑似混入試料を対象とした混入率算出試験を行った。疑似混入試料は、被検物質となる各遺伝子組換えシャカイモ粉体を正確に秤量し、非遺伝子組換えシャカイモ(Russet Burbank種)の粉体に混ぜ合わせることで調製した。各疑似混入試料につき、6点の検体を調製し、それらから抽出したDNAを2回繰り返し測定することでデータをえた。解析の結果、検証を行った全ての系統において混入率が真値(重量混合比)に比べ、低い値で算出される傾向が認められた(Table 5)。特にNL SPBT02-05系統においては、そのbiasが-40を下回っている検体もあり、この系統を対象とした定量分析法の適用は難しいと判断される。一方、Bt-6系統ならびにRBMT21-350系統においては、混入率が低めに算出される傾向には変わりがないものの、その大きさがCODEX/CCMASで議論されている定量分析値の精度推奨値であるBias  $\pm 25\%$ の範囲に概ね収まっており、この事から判断して適用可能性は高いものと思われる。混入率が低めに算出される原因については、SPBT02-05系統においてその傾向が特に顕著であったことから、遺伝子組換えシャカイモの親品種とマトリクスの品種との差異が混入率に影響を与えている可能性が示唆される。これは、異なるジャガイモ品種がマトリクスとなった場合に、対象遺伝子組換えジャガイモの混入量が同じで

あっても、算出される混入率が変動する場合を予測させ、本定量分析法の準用にあたっては、結果の判断については慎重にならざるを得ないとする。

### 3 スタック品種トウモロコシ定性検知法の開発

#### 1) 多粒同時DNA抽出法の開発と評価

スタック品種であることを判別するためには、一粒ごとの特性を明らかにする方法が必要となる。また、全体に対し、既定量(5%)以上の混入があるか否かを判別するためには、一定数以上の検証を行わなければならない。このため、1粒ずつ独立して試験し、かつ、同時に多粒を処理可能なDNA抽出法の開発を試みた。既存の粉碎装置やチューブでは穀粒粉碎が不十分であることやチューブに破損が生じるため、粉碎装置のサンプルトレイ、粉碎チューブ等を新たに試作し改良を加えた。その結果、トウモロコシの粒径の大きさに拘わらず、48粒を1分間に精度良く同時粉碎することが可能となった。粉碎後、シリカ膜タイプや磁気ビーズタイプの96穴抽出キットを用いてDNA抽出方法を検討したところ、シリカ膜タイプキットを用いて1粒から十分量のDNAを抽出できる最適なDNA抽出方法を粉碎法と併せて確立した。その結果、収量について若干のはらつきが認められたが、抽出法に続き実施するMultilayer解析においては定量的にはなく、定性的検知を目的としていること、また、供するDNAが特定の1粒に由来することから、十分に要件を満たしたDNAが抽出されたものと判断された。

#### 2) TaqMan chemistry を応用したMultiplex real-time PCR法の開発

スタック品種の判別に先立ち、対象検体が遺伝子組換えトウモロコシであるか否かを簡便に判別することを目的に、TaqMan chemistry を応用したMultiplex real-time PCR法について検討を行った。スタック品種の親系統にあたる遺伝子組換えトウモロコ

シ各系統には、cauliflower mosaic virus由来の35S プロモーター配列もしくはGA21特異的配列が導入されている。このため、それらのうちいずれかを検知することによって、遺伝子組換えトウモロコシの判別が可能となる。このためすでにスクリーニング法に採用されているP35S-1 P35S-TaqおよびGA21-3・GA21-Taq定量系、また、これに合わせPCR反応の可否を確認するためにSSIIb-3・SSIIb-Taq定量系の3定量系を組み合わせたmultiplex real-time PCR法を検討した。この際、P35S-TaqおよびGA21-TaqとSSIIb-Taq由来のシグナルを識別し、multilayer解析を可能とするため、前記2つのプローブには蛍光色素としてFAMを標識し、SSIIb-TaqはVICを蛍光標識した。プライマーおよびプローブ量、さらにPCR条件等の検討を行い開発されたmultiplex real-time PCR法を用い、非遺伝子組換え、遺伝子組換えトウモロコシ(GA21ならびにMON810)を対象とした特異性確認試験の結果をFig. 8に示す。

Fig. 8 BにはSSIIb由来のシグナル増幅を示しているが、遺伝子組換え、非遺伝子組換えを問わず、全ての検体からのシグナル増幅が確認された。これに対し、35S配列、あるいはGA21特異的配列由来のシグナルは、対象となるGA21系統ならびにMON810系統のみから得られた。これらの結果から、開発されたmultiplex real-time PCR法によって、DNAのPCR適合性を確認すると同時に、遺伝子組換えトウモロコシの定性的スクリーニングが可能であることが示唆された。今後、実際のスタック品種を用いたmultiplex real-time PCR法の検証、さらには定性multiplex PCR法を適用することによりスタック品種の特定が可能であるかといった検討を継続して行う。

### 4 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発

#### 1) 競合プラスミドDNA添加量の検討

競合PCR法においては、ゲノムDNAを対象とした場合と同等の増幅効率を保ちながら、異なる断片長をもつ増幅産物を生じるように、競合プラスミドDNAを構築する。さらに当該競合プラスミドDNAのコピー数を規定しておき、同等のコピー数で標的配列を含むゲノムDNAと同一反応系で反応させた場合、増幅産物量が等しくなるという原理に基づき、ゲノムDNA中の標的配列のコピー数を算出する。競合PCRの実施例をタイズを例にFig 9に示す。遺伝子組換え作物を本法を用いて簡易に定量する場合には、混入する量が様々であることから、競合させるプラスミドDNAの量(反応系に添加する量)の目安を決める必要がある。本競合PCR法においては遺伝子組換え作物の定量範囲を1~5%と想定し、それぞれが定量可能となるよう、添加する競合プラスミドDNAの量について検討を行った。その結果、同じ混入率(重量比)であっても、標的とする配列のコピー数が異なるため、競合に必要なプラスミドDNA量が定量系毎に異なっていることが明らかとなった(Table 6)。

## 2) 内標比の算出

また、対照とした検体から得られた内在性遺伝子と標的遺伝子のコピー数の比率から、混入率を算出するための係数が必要となる。これは、現行定量的PCR法においても採用されている内標比に相当する。B-4に示した方法に従い、内標比を算出した結果をTable 8に示す。得られた内標比は、それぞれ定量的PCR法において採用されている内標比とは若干異なっており、競合PCR法に固有の数値と考えられた。今後、疑似混入試料を対象とした試験を行うことにより、内標比を含む方法の妥当性について検証していく。

## 5. 定量分析法の加工食品適用可能性検証法の検討

加工食品においては直接の測定対象となるDNAの変質がおこっており、これに起因

して正確な定量値を求めることが難しく、定量分析法の適用範囲外とされている。しかしながら、加工食品には多種多様な品目が含まれることから、加工影響の大きさによってはそのまま、あるいは補正を行うことによって十分な精度を保ちつつ定量が可能となる場合が考えられる。しかしながら、そのためには加工影響を科学的に評価し、定量分析法の適用が可能であるかを判断するための検証法が必要となる。本研究においては2つのダイズ内在性遺伝子の加工による変質を科学的に数値化すること加工影響の評価、さらには定量分析法の適用可能性についての判断を可能とする検証法について検討を行った。

### 1) 新規内在性遺伝子の選定および定量系の開発

上記検証法の開発に当たり、2つの内在性遺伝子のうち、一方は現行定量分析法に採用されているLectin遺伝子を選択することとした。これに加え、文献情報を精査することにより、Lectin遺伝子同様にsingle copy geneであるとの情報が得られたHMG遺伝子(high mobility group 遺伝子)を新規内在性遺伝子として選択した<sup>8)</sup>。塩基配列情報に基づきプライマー対を複数組成し、それぞれについて特異性を確認するため、定性PCR法を用いた試験を行った。試験の結果、プライマー対GmxHMG-01によって高い特異性が確認された(Fig.10)。主要穀物はもとより、ダイズの近縁マメ科植物においても交差反応性が認められなかったことから、非常に高い特異性を有していると判断される。さらに、定法に従いプローブ(GmaxHMG-Taq)を合成し、定量系においても同様の確認試験を実施したが、それにおいても高い特異性が確認された(Fig.11)。さらに遺伝子組換え、非組換えタイズから得られたシグナルの数値(Ct値)についてLectin 遺伝子を標的遺伝子とした定量系(Le1-n02およびLe1-Taq)のそれと比較したところ、ほぼ