

表 7. 薬用 GM 植物-治療薬

導入遺伝子	作物	生産物・用途・薬理・開発段階	研究・開発国	文献等
Non-Hodgkin's lymphoma 腫瘍マーカー、イデオタイプ	タバコ (TMV)	非ホジキンリンパ腫カスタムワクチン: NHL の治療 個々人で病状が異なるため、患者特異的な治療用ワクチンを 6-10 週間で生産: 臨床試験の初期段階が終了し、安全性と免疫効果を確認	米・ラージスケールバイオロジー社	111
αガラクトシダーゼ A	タバコ (TMV)	AGa1A (ENZAGAL™): ファブリー病治療薬: 2003 年 1 月 FDA によりオーファンドラッグとして認められ、商品化をめざしている前臨床の動物モデル試験で効果を確認	米・ラージスケールバイオロジー社	112
アプロチニン	タバコ (TMV)	アプロチニン (APRONEXIN™): 研究用試薬としては商品化 (2004 年シグマアルドリッチより販売) 心肺バイパス手術時の出血量の減少: 医療用として開発中	米・ラージスケールバイオロジー社	113
アプロチニン	トウモロコシ	アプロチニン (AproliZean™): 試薬 (商品化、プロテアーゼ阻害剤)、医療用としても開発中	米・プロディジーン社	114
イスロニダーゼ	タバコ	イスロニダーゼ: ムコ多糖症治療	米・クロップテック社	1
ウシインターロイキン 1 & 2 (bIL-1, 2)	ジャガイモ	bIL-1, 2: 植物粗抽出液に細胞増殖活性	日本・産総研	115
ウロキナーゼ	タバコ	ウロキナーゼ: 血栓溶解薬	米・クロップテック社	1
グルコセレブロシダーゼ	タバコ	グルコセレブロシダーゼ: ゴーシュ病治療	米・クロップテック社	1
ゾマトロピン (成長ホルモン)	タバコ (葉緑体)	ゾマトロピン: 遺伝的欠乏疾患の治療、老化防止	米・Integrated Protein Technologies Inc.	116
ゾマトロピン (成長ホルモン)	ペニバナ	ゾマトロピン: 遺伝的欠乏疾患の治療、老化防止	カナダ・セムバイオシスジェネティック社	117
ヒトインスリン様成長因子 1	タバコ (葉緑体)	IGF-1: 細胞増殖: タバコでの生産確認 (最高値: 可溶タンパク質の 34%)	米・中央フロリダ大	69
ヒトインターフェロン α (hIFNα)	ジャガイモ	hIFNα: 植物粗抽出液に抗ウイルス活性	日本・産総研	115
ヒトインターフェロン α (hIFNα, 2b)	ウキクサ	hIFNα-2b: 抗ウイルス、抗癌活性	米・バイオレックス社	118
ヒトインターフェロン α (hIFNα, 2b)	タバコ (葉緑体)	hIFNα-2b: 抗ウイルス、抗癌活性: タバコでの生産確認	米・中央フロリダ大	69
ヒトインターフェロン α (hIFNα, 8, 2b)	ジャガイモ	hIFNα: ウイルス感染症治療	日本・北海道大&北海道グリーンバイオ研	119
ヒトコラーゲン	タバコ	ヒトコラーゲン: 治療、外科治療	仏・メリステム社	120
ヒトコラーゲン	タバコ	ヒトコラーゲン: 治療、外科治療	米・フィブロゲン&米・モンサント	121
ヒトゼラチン	タバコ	ヒトゼラチン: 賦形剤、安定剤	米・フィブロゲン&米・モンサント	122
ヒトラクトフェリン	イネ	ヒトラクトフェリン: 乳児感染症予防 (下痢症): 2005 年商業栽培申請中	米・ベントリア バイオサイエンス社	123
ヒトラクトフェリン	タバコ	ヒトラクトフェリン: 抗菌	仏・リール工科大&仏・メリステム社	124
ヒトラクトフェリン	タバコ	ヒトラクトフェリン: 抗菌	韓国・韓国生命科学研究院	125
ヒトラクトフェリン	トウモロコシ	ヒトラクトフェリン: ドライアイ症、抗菌: フェーズ I 臨床試験中	仏・メリステム社	21
ヒト血清アルブミン	タバコ	ヒト血清アルブミン: 重篤な火傷の治療、緊急外科手術時の処置	米・クロップテック社	1
ヒト血清アルブミン	タバコ (葉緑体)	HAS: 輸血: タバコでの生産確認 (最高値: 可溶タンパク質の 11.1%)	米・中央フロリダ大	69
ヒト腫瘍壊死因子 α (hTNFα)	ジャガイモ	hTNFα: 植物粗抽出液に細胞毒性活性	日本・産総研	115
ヒト粗換えリソソーム酸リパーゼ	タバコ (TMV)	lysosomal acid lipase, LAL: アテローム性動脈硬化症治療薬: LAL は、前臨床の動物試験で、効果が認められている、これを治療薬として共同開発する権利を得、LAL の効率的生産に着手	米・ラージスケールバイオロジー社	126
ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (hG-CSF)	タバコ	hG-CSF: 白血球減少症治療剤	韓国・全北大学校	127
ヒルジン	キャノーラ、ナタネ	ヒルジン: 抗血液凝固剤: 食用・飼料用作物への混入を懸念し、生産中止	カナダ・セムバイオシスジェネティック社	128
ヘモグロビン	タバコ、トウモロコシ	ヘモグロビン: 輸血等	仏・メリステム社	21
リゾチーム	イネ	リゾチーム: 抗菌: 2005 年商業栽培申請中	米・ベントリア バイオサイエンス社	129
ロイエンケファリン	シロイヌナズナ、ナタネ	ロイエンケファリン: 鎮痛薬	ベルギー・ゲント大	130
胃リパーゼ	トウモロコシ	胃リパーゼ: 囊胞性繊維症治療、慢性膵炎: フェーズ II 臨床試験 (2004.6 まで)	仏・メリステム社	21

表 8. 薬用 GM 植物-診断薬・試薬

導入遺伝子	作物	生産物・用途	研究・開発国	文献等
B 型肝炎コアタンパク質 (HBc)	タバコ	HBV 抗原; B 型肝炎の診断	日本・農研機構中央農業総合研究センター	131
アプロチニン (プロテアーゼ阻害剤)	トウモロコシ	アプロチニン (AproliZean TM): 試薬	米・プロディジーン社 (商品化)	113
アプロチニン (プロテアーゼ阻害剤) 遺伝子	タバコ (TMV)	アプロチニン (APRONEXIN TM): 試薬	米・ラージスケールバイオロジー社 (2004 年商品化)	114
大腸菌 β グルクロニダーゼ (GUS)	トウモロコシ	β グルクロニダーゼ (GUS): 試薬	米・プロディジーン社 (1997 年商品化)	61
トリプシン	トウモロコシ	トリプシン (TripZean TM): 試薬 (インシュリンの製造に使用)	米・プロディジーン社 (2002 年商品化)	61
鶏アビジン	トウモロコシ	アビジン: 試薬	米・プロディジーン社 (1997 年商品化)	61
ヒト β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ	タバコ	ガラクトース転移酵素: 試薬 (単クローン抗体産生タバコと交配し、後代で糖鎖がついた抗体を産生)	オランダ・ワーニンゲン大	132

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
(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
後代交配種等の安全性に関する研究(1)
分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

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、MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニングを試みた。35S プロモーター領域の塩基配列に対するプライマーを合成して、環状化した MON810 ゲノム DNA をテンプレートとして inverse PCR 法によるクローニングを行ったが、トウモロコシゲノム内に多数存在するレトロトランスポゾンおよび repetitive sequence にプライマーが結合してしまい、プライマーの 35S プロモーター領域への特異的な結合が阻まれたために 5' 近傍塩基配列は増幅されなかった。また、既報の MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列をもとに、イネ全ゲノム塩基配列からその挿入領域をスクリーニングし、そこで見いだされた塩基配列をもとに 5' 挿入近傍塩基配列を推定し、その領域に対するプライマーを設計して MON810 ゲノム DNA をテンプレートとして PCR 法によるクローニングを行ったが、5' 挿入近傍塩基配列は増幅されなかった。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀(青森大学工学部)

A. 研究目的

後代交配種における導入遺伝子の安定性を明らかにするために、昨年度までにラウンドアップ・レディー(RR)ダイズにおける導入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列をクローニングし、「不分別」として輸入されてきたダイズから RR ダイズを 72 粒検出し、それらにおける導入遺伝子の安定性を調べた。その結果、内生遺伝子よりも導入遺伝子のアミノ酸配列における突然変異率は低く抑えられており、またその安定な高発現に必要なプロモーター領域の塩基配列の突然変異率も低く抑えられていた。この結果は、導入遺伝子 (EPSPS) に突然変異が導入され、その酵素活性が失われたり、発現が低くなると、除草剤耐性という商品価値が全くなくなるため、そのようなことがないように育種や種子生産の上で突然変異が入らないように人為的なバイアスが強くかけられているためであると考えられた。そこで、このことが正しいかどうか、さらに検証するために、遺伝子組換えトウモロコシにおいても同様であるかを明らかにする目的で、本年

度においては、もっとも広く栽培されて輸入量も多い MON810 トウモロコシに焦点をあて、まず、その導入遺伝子の挿入近傍塩基配列をクローニングすることを試みた。

B. 研究方法

<方法>

Inverse PCR 法による MON810 トウモロコシに導入された挿入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニング

MON810 の種子は国立医薬品食品衛生試験所より分与されたものを用いた。その種子から厚生労働省から出された通知の方法により核 DNA を抽出した。その核 DNA 1 µg を 180 µl の反応液で Bam HI, Eco RI, Hind III, Xba I, もしくは Xho I で切断した。フェノール抽出、エタノール沈殿によって精製した後、10 µl の TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解し、10 µl の TaKaRa Ligation Kit ver 2 液を加えて 16°C, 30 分間、セルフ・ライゲーションを行った。エタノール沈殿によって精製した

後、10 µl の水に溶解し、これから 1 µl を取ってこれを inverse PCR のテンプレートとした。プライマーとして、RR ダイズに導入された挿入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニングに用いたのと同様、図 1 に示すような 35S プロモーターに対するプライマー (35S-x, 35S-y, 35S-bRV, 35S-cRV) を設計した。これらプライマー 10 pmol と上記で調製した核 DNA を含む 20 µl の反応溶液を調製し、50 µl のミネラル・オイルを重層した。これを PCR 機にセットし、98°C、2 分間処理した後、92°C に下げ、PCR 反応チューブのフタを開け、ピペットマンでチューブ底の反応液に 0.5 units の LA-Taq polymerase (TaKaRa) を加え、92°C 30 秒、55°C 45 秒、72°C 3 分の PCR サイクルを 35 回行い、最後に 72°C 10 分間反応させ、4°C で保存した。反応液の 1 µl を PCR 反応チューブの底からピペットマンで取り出し、これを 9 µl の水に入れて希釈し、これから 1 µl をとって、nested PCR のテンプレートとした。Nested PCR においては、最初の PCR に用いたプライマーと同じ、もしくはその内側に位置するプライマーを用いて反応液を調整し、PCR 反応は上記と同一で行った。反応終了後、50 µl のクロロホルムと 4 µl の電気泳動用色素緩衝液を加えて混ぜ、軽く遠心した後、反応液を回収し、1.5% アガロース電気泳動にかけた。

イネ全ゲノム塩基配列情報に基づいた MON810 トウモロコシからの 5' 挿入近傍塩基配列のクローニング

Hernandez ら (Hernandez, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P. and Ferrando, A. (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard^R based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res.*, 12: 179-189.) によって報告された MON810 トウモロコシの 3' 挿入近傍塩基配列情報を用いて、fasta 検索によってイネ全ゲノム塩基配列の中で、その塩基配列と相同性を示す塩基配列領域を見いだした(図 3)。そのイネの塩基配列をもとに degenerate プライマー(図 3, M1, M2, M3)を設計した。このプライマーと 35S-bRV もしくは 35S-cRV プライマーを用い、テンプレートとしてはセルフ・ライゲーションしていない MON810 核 DNA 100 ng を用いて、アニーリング温度を 50°C とした以外は同上の反応条件で PCR を行い、1.5%

アガロース電気泳動で分析した。コントロールとして、Hernandez ら (2003) が報告した 3' 挿入近傍塩基配列をもとに、その領域に対する 3'A および 3'B プライマー(図 3)を合成して PCR を行った。

C. 結果・考察

C.1. Inverse PCR 法による MON810 トウモロコシに導入された挿入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニング

35S プロモーターに対するプライマー、35S-x, 35S-y および 35S-bRV, 35S-cRV を用いて nested PCR を行ったところ、非常に数多くの DNA 断片が増幅されてきた(その一例を図 2 に示す)。様々な組み合わせを用いても、数多くの DNA 断片が増幅されてきてしまい、上記で示したプライマー以外の 35S プロモーター領域に対するプライマーを設計して PCR を行っても、同じような結果となってしまった。これらのバンドをクローニングしてその塩基配列を決定したところ、そのほとんどがトウモロコシのレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列と高い相同性があることがわかった。トウモロコシのゲノム・サイズは大きく、全ゲノム内のかかなりの領域がレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence によって占められていることが知られている。このようなレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence は、もともとウィルス由来であることが知られている。トウモロコシの進化の過程において RNA 型ウィルスが感染し、これから逆転写された DNA がトウモロコシのゲノム内に挿入される際、不完全な形で挿入されたため、そこから再び転写される RNA がウィルスのゲノム RNA となれず、再び逆転写をされた後に、トウモロコシ・ゲノムの別の位置に挿入される、という形でトウモロコシ・ゲノム内にレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence が生じたと考えられている。さらにこれが繰り返されることによって、トウモロコシ・ゲノム中の広範囲にわたってこれらレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列が散在するようになったと考えられている。このため、レトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列はもともとは RNA ウィルス由来であり、ここで用いたプライマーの塩基配列である 35S プロモーターはカリフラワー・モザイク・ウィルス由来であり、トウモロコシの内在性のレトロトランスポゾンあるいは

repetitive sequence の塩基配列と相同性があるために、プライマーがこれらレトロトランスポゾンあるいは repetitive sequence の塩基配列にアニールしてしまって増幅されてきたものと考えられる。

C.2. イネ全ゲノム塩基配列情報に基づいた MON810 トウモロコシからの 5' 挿入近傍塩基配列のクローニング

Hernandez ら (2003) によって報告された MON810 トウモロコシの 3' 挿入近傍の塩基配列を用いて、イネ全ゲノム塩基配列に対して fasta 検索を行ったところ、80.7% の塩基配列の相同性がある領域が見いだされた。そこで、そのイネの塩基配列をもとに、挿入位置の上流に相当する領域に対する degenerate プライマーを作成し、これと 35S プロモーターに対するプライマーである 35S-bRV もしくは 35S-cRV プライマーを用い、トウモロコシ核 DNA をテンプレートとして PCR を行った(図 4)。コントロールとしては、Hernandez ら (2003) が報告した 3' 挿入近傍塩基配列の領域に対する 3'A および 3'B プライマーを用いた。3'A および 3'B プライマーを用いた場合には DNA 断片が増幅されてきた(図 4, レーン C)が、挿入位置の上流に相当する領域に対する degenerate プライマーと 35S-bRV もしくは 35S-cRV プライマーを用いた場合には DNA 断片の増幅が見られなかった(図 4, レーン 1 ~ 6)。この結果から、今回設計した degenerate プライマーのもととした塩基配列がイネ由来であるために、トウモロコシとその領域の塩基配列が全く異なる、もしくは相同性が低い可能性が考えられる。もう1つの可能性として、トウモロコシ・ゲノムに MON810 の導入遺伝子が挿入された際、トウモロコシ・ゲノムの大きな欠失や重複などのリアレンジメントが生じ、イネ・ゲノム塩基配列に相同性を有する領域が欠失してしまった、あるいは PCR で DNA 断片として増幅できないほど遠くの領域として大きく離れてしまった可能性が考えられる。このことを明らかにするためには、MON810 における 5' 挿入近傍塩基配列のクローニングとその塩基配列の決定が必要であると考えられる。

D. 研究発表 (論文発表)

Ogasawara, T., Arakawa, F., Watanabe, T.,

Akiyama, H., Hino, H., Maitani, T., Goda, Y. and Ozeki, Y. Genomic DNA fragmentation of genetically modified corn during food processing. Jpn. J. Food Chem., 11: 137-143 (2004).

Ogasawara, T., Chikagawa, Y., Arakawa, F., Nozaki, A., Itoh, Y., Sasaki, K., Umetsu, H., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Toyada, M., Kamada, H., Goda, Y. and Ozeki, Y. Mutations of the transgene of Roundup Ready[®] soybeans, which could result in the loss of the glyphosate-tolerant phenotype, might be reduced using an artificial selection bias. J. Health Sci., (in press)

(学会発表)

荒川史博, 小笠原 健, 村上隆之, 小関良宏, 高畑能久, 森松文毅, 穂山 浩, 米谷民雄「食品中の特定原材料の分析について(2)」日本食品化学学会第 10 回総会・学術大会, 大阪, 2004 年 6 月。

佐々木和生, 梅津博紀, 山川 隆, 太田大策, 小関良宏「プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用, 1. 安全性評価のためのプロファイリング条件の検討」日本食品化学学会第 10 回総会・学術大会, 大阪, 2004 年 6 月。

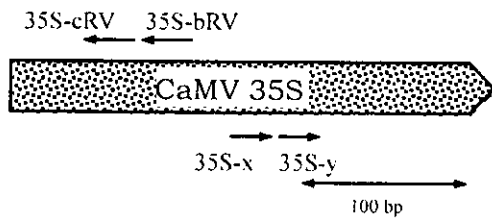


図 1. MON810 トウモロコシに導入された挿入遺伝子の 5' 挿入近傍領域塩基配列をクローニングするために用いた 35S プロモーター領域に対するプライマーの位置。

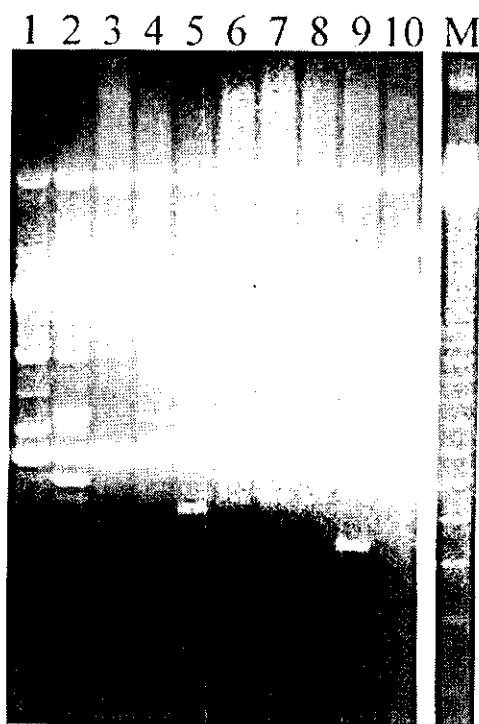


図 2. 10 個体の MON810 トウモロコシ核 DNA を HindIII で切断した後、ライゲーションして環状化した DNA をテンプレートとして 35S-y と 35S-bRV プライマーを用いて第 1 回目の inverse PCR を行い、これを 10 倍に希釈したものをテンプレートとして 35S-y と 35S-cRV プライマーを用いて第 2 回目の nested PCR を行って得られた増幅 DNA 断片。番号は個体番号を示す。M, 123 bp DNA マーカー。

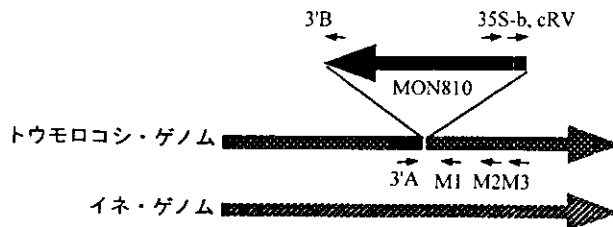


図 3. Hernandez ら (2003) が報告した MON810 トウモロコシに導入された挿入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列に対するイネ・ゲノム上の相同領域とそれから想定される 5' 上流域に対するプライマー (M1, M2, M3) の設計領域。上記領域において、イネ・ゲノムとトウモロコシ・ゲノムにおいて 80.7% の塩基配列の相同性が見られた。PCR のコントロールとして、Hernandez ら (2003) が報告した 3' 挿入近傍領域に対する 3'A および 3'B プライマーを設計して PCR に用いた。

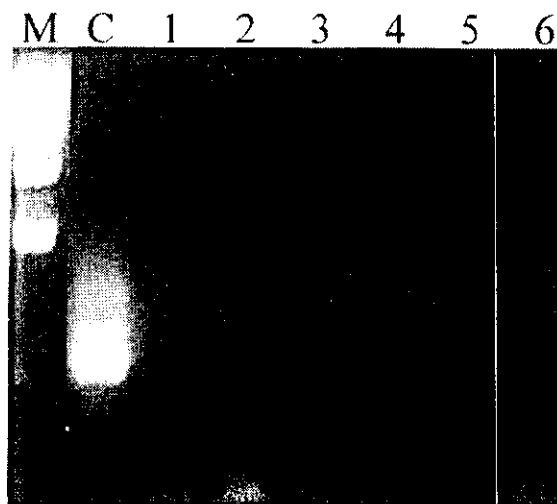


図 4. 想定される 5' 上流域に対するプライマー, M1, M2, M3 と 35S-bRV および 35S-cRV を用いて MON810 核 DNA をテンプレートとした PCR 反応の結果。プライマーの組み合わせは以下の通り; 1, M1 ⇔ 35S-bRV; 2, M2 ⇔ 35S-bRV; 3, M3 ⇔ 35S-bRV; 4, M1 ⇔ 35S-cRV; 5, M2 ⇔ 35S-cRV; 6, M3 ⇔ 35S-cRV; C, 3'A ⇔ 3'B。M, λDNA/HindIII DNA マーカー。

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
(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
後代交配種等の安全性に関する研究(2)

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

プロテオームおよびメタボローム解析による大豆の遺伝子発現分析の可能性を検討するために、その第一段階にあたるトランスクリプトーム解析の予備的な調査として、解析の障害となる大豆種子からの RNA の抽出とその RNA の質的量的ばらつきを検討を昨年より継続して行なった。今年度は国産品種を用いて品種間でどの程度データのばらつきがあるか検討するため抽出法を検討した。大豆の RNA 抽出にあたっては大豆種子の個体差、抽出方法による差、ロット差をそれぞれ消すために、開発が進んできた多検体破砕機を使用し、多数の標品を同時に用いた。その結果、多検体破砕機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの RNA を抽出することが可能となり、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。RNA 抽出にあたって当初の条件(安全性試験のための再現性、多検体処理が可能、簡便、安価)の目標は満たされたと考えられる。

協力研究者

山川 隆(東京大学大学院農学生命科学研究科)

A. 研究目的

将来、植物の遺伝子改変は種間組換えを複数起こすなど、より複雑になると考えられる。このような場合、プロファイリング技術により、既存種との差異が認められたときは、その差異が健康に及ぼしうる影響について検討されなければならない。

遺伝子組換え作物の後代交配種では導入された遺伝子と宿主固有の遺伝子が、既存種との差異が認められるほど変化するか検討するために、構造レベル、発現レベル、タンパク質レベル、あるいは代謝産物レベルでおこる非意図的な変化の評価としてプロファイリング技術が個々の標的を定めた化学分析の代替方法として考えられる。

本研究は第一世代の遺伝子組換え農作物の後代交配種において、導入された遺伝子塩基配列の安定性、およびその遺伝子発現量の安定性を調査することを目的としたものである。

平成 16 年度は昨年度に続き、プロテオームおよびメタボローム解析による大豆の遺伝子発現の分析の可能性を検討することを目標にした。昨年度は国産発芽大豆でも個体差、また抽出法によるの差がみられた。また、個体によってストレスが異なり、RNA 組成が変わることが予想された。このために、多数の大豆種子から安価にそれぞれの RNA を簡便に抽出できる条件を検討し、さらに国内産大豆の RNA の品種間の差を検討するためにその抽出法を探った。

B. 研究方法

< 試料 >

国内産の非組換え大豆種子(品種はムラユタカ:2002 年度福島産、およびコクユタカ:2002 年度広島産)を用いた。

< 方法 >

大豆一粒ずつ(×20 粒)を粉碎混合し、キット試薬による RNA 抽出の後、全量を合わせて

RNA 精製を行った。破碎には国立衛研穉山氏が、安井器械(株)と共同開発した機械 Multi-beads shocker, MB601NIHS を使用した(穉山氏の御好意による)。RNA 抽出にはナカライテスク社製の試薬キット Total RNA 抽出試薬 Sepasol-RNA を用いた。

抽出にあたっては大豆種子の個体差、抽出方法による差、ロット差をそれぞれ消すために、開発が進んできた多検体破碎機を使用し、多数の標品を用いた。少し大きく改良したセルに大豆をひと粒ずつ入れて、Total RNA 抽出試薬 1ml を加え 1cm 程度の破碎用ビーズ 1 つを入れて 8 の字攪拌した。2500rpm 60 秒 2 回(むらゆたか 2002 年度福島産)、2,500rpm 60 秒 2 回 + 1,900rpm 30 秒 2 回(こくゆたか 2002 年度広島産)の条件で大豆を破碎するとともに Total RNA を抽出した。サンプルは 20 粒を合計 4 セット(全部で 80 粒)使用した。Total RNA 抽出後、抽出液にクロロホルムを加えて親油性化合物を除去し、水層からイソプロパノール沈澱で Total RNA を得た。また、必要に応じてエタノール沈澱によって Total RNA の精製を行った。

C. 結果

本実験の結果、多検体破碎機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの大豆種子ごとの RNA を抽出することが可能となり、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。今年度も大豆一粒あたり 400-1000 μ g の RNA

が抽出された。

D. 考察

大豆の RNA 抽出にあたって、多検体破碎機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの大豆種子ごとの RNA を抽出することは可能となり、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。抽出にあたってコクユタカは粘性の高い懸濁液になり、追加破碎抽出が必要であった。大豆がつぶれてセル内に詰まり破碎できなくなる場合も 1-2 割あった。品種により改良が必要と考えられる。RNA 抽出にあたって当初の条件(安全性試験のための再現性、多検体処理が可能、簡便、安価)の目標は満たされたと考えられる。

E. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

1) 佐々木 和生、梅津 博紀、山川 隆、太田 大策、小関 良宏:プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用 1. 安全性評価のためのプロファイリング条件の検討、日本食品化学学会第 10 回学術大会 2004 年 6 月 17 日発表 2) 佐々木 和生、梅津 博紀、山川 隆、太田 大策、小関 良宏:プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用 2. 非組換えダイズのプロファイリング、日本食品化学学会第 11 回学術大会 2005 年 4 月 27 日発表予定

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
(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
後代交配種等の安全性に関する研究(3)

分担研究者 小関良宏 東京農工大学工学部教授

研究要旨

遺伝子組換え作物の後代交配種における導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現産物の変動と変動の幅を解析することを目的として、本年度は各種非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を行い、遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を行う上での基礎データを集積した。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀(青森大学工学部)

A. 研究目的

遺伝子組換え農作物の国際的な流通が広まり、我が国においても安全性審査を済ませた農作物が輸入され、食品として利用されている。これら食品の安全性を確保するためには、継続的な科学的知見の集約が必要であり、特に、遺伝子組換え農作物の後代交配種における導入遺伝子の安定性、発現産物であるタンパク質の変動および種々の要因による発現タンパク質の変動を詳しく調査することが必要である。これらの知見は次世代の遺伝子組換え農作物の安全性を評価する上でも重要であると考えられる。本研究では、既に食品としての安全性審査を済ませている第一世代の遺伝子組換え農作物の後代交配種について、導入遺伝子の発現産物であるタンパク質の発現量の変動とその変動幅および内在性遺伝子の発現量とその変動幅を二次元電気泳動法を利用して網羅的にタンパク質を解析するプロテオーム解析により調査することを目的としている。本年度は、昨年度確立した方法を用いて、各種非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を行った。

B. 研究方法

<試料>

非遺伝子組換えダイズ種子(フクユタカ、ムラユタカ、ビントン、ピーソン)は、国立医薬品食品衛生研究所穂山博士より供与して頂いた。

<方法>

タンパク質抽出

それぞれの品種のダイズ種子 50 個を選び、まとめて乳鉢で粉砕した。粉砕した種子の一部をマイクロチューブにとり、10mg/100ml の割合で抽出バッファー(8M Urea, 4%(W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl (pH8.8), 2% IPG buffer (Amersham Pharmacia Biotech))を加え、氷上でさらにすりつぶした。15,000rpm で 20 分間遠心分離し、上清を別のマイクロチューブに移し、再度 15,000rpm で 20 分間遠心分離して得られた上清を粗抽出物とした。

電気泳動用サンプル調製

粗抽出物から 2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて電気泳動用サンプルを調製した。さらに、限外濾過膜(Ultrafree, Millipore)により低分子性物質を除去し電気泳動に供した。

電気泳動

・1次元目電気泳動(IEF)

Immobiline DryStrip pH3-10NL (Amersham Pharmacia Biotech) を 2% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて膨潤させ、Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて泳動した。500V で 1 時間、1000V で 1 時間通電した後、8000V で 4 時間泳動した。

・2次元目電気泳動(SDS-PAGE)

IEF 終了後の Immobiline DryStrip を SDS を含むバッファーで平衡化し、ExcelGel SDS XL Gradient 12-14 (Amersham Pharmacia Biotech) 上で、Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて泳動した。1000V

20mA で 45 分間通電した後、1000V 40mA で 2 時間 40 分間泳動した。

タンパク質の検出

PhastGel Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて銀染色により、タンパク質を検出した。染色後、ゲルを室温で乾燥させ、スキヤナを用いてコンピュータに画像を取り込んだ。得られた画像は Image Master Platinum (Amersham Pharmacia Biotech) により画像解析を行った。

C. 結果・考察

国産非遺伝子組換えダイズ(フクユタカ(図1)、ムラユタカ(図2))とアメリカ産非組換えダイズ(ビントンの(図3)、ビーソンの(図4))から得られたタンパク質抽出液について1次元目の電気泳動(IEF)は同時に行い、2次元目の電気泳動(SDS-PAGE)はそれぞれ個別に行った。

各品種の電気泳動像を解析したところ、それぞれ608、569、721、672個のスポットが検出された(表1)。これらのスポットの中で2品種間で共通するスポット数は、同じアメリカ産のビントンとビーソンの間で330個と最大となり、ビントンと日本産のフクユタカの間では89個と最も少なくなった(表2)。また、スポット数の最も少ないムラユタカ(569点)を対照として解析すると4品種全てに共通するスポットは74個あり、他の3品種と全く一致していないスポットが185個あった。

残りは3品種もしくは2品種間で共通するものとなった。

これらの結果は、電気泳動像の染色の度合い、画像を取り込む際の各種パラメーターや画像解析の際の各種パラメーターの設定により変動するため、今後詳細にこれらのパラメーターについて検討する必要がある。また、解析の結果得られた品種間の検出されるタンパク質の違いが品種間差を反映しているのか、プロファイリングを進めていく上で慎重に検討する必要がある。

今回の結果は、個体差を検出しないように各品種50個体をまとめて粉碎しているため、品種間差を反映したものであり、さらに個体ごとのタンパク質の一斉解析を行い、個体間差およびその変動幅を検討する必要がある。

今後は、これら非遺伝子組換えダイズのプロファイリングを集約し、遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を進めることが必要である。

D. 研究発表

(学会発表)

佐々木和生、梅津博紀、山川隆、太田大策、小関良宏「プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用」日本食品化学学会第10回学術大会、大阪、2004年6月。

(論文発表)

なし

表1 各品種で検出されたタンパク質スポット数

品種	検出スポット数
フクユタカ	608
ムラユタカ	569
ビーソン	721
ビントン	672

表2 2品種間で共通するタンパク質スポット数

	フクユタカ	ムラユタカ	ビーソン	ビントン
フクユタカ		197	143	89
ムラユタカ			260	218
ビーソン				330
ビントン				

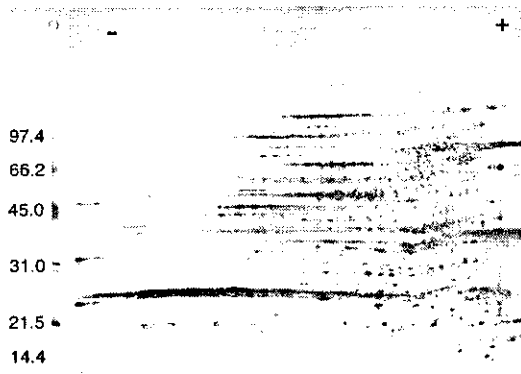


図1 フクユタカ

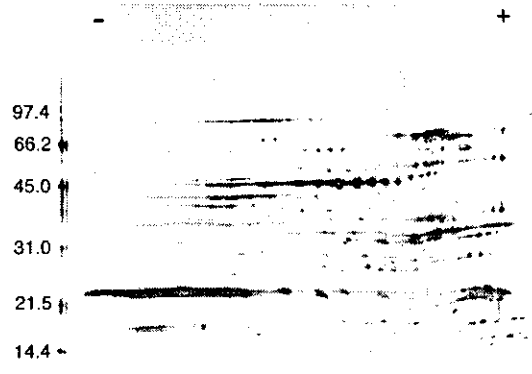


図2 ムラユタカ

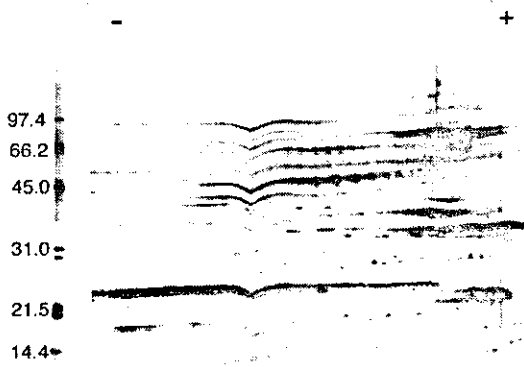


図3 ビーゾン

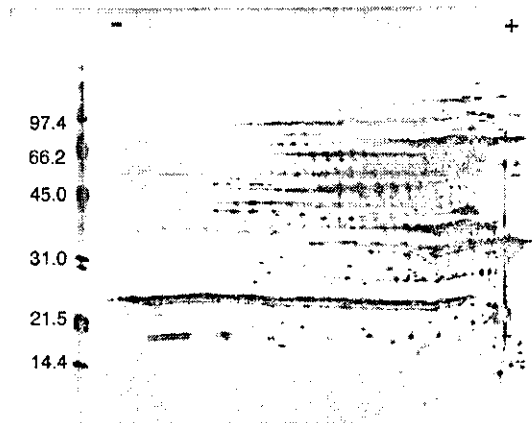


図4 ビントン

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
（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
後代交配種等の安全性に関する研究（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（代謝成分）の組成と含量を比較し、遺伝子組換え作物において栄養素の増減、あるいは有害成分の蓄積などが起こっていないかどうかを判別するためには、そこに含まれる代謝成分の総和（メタボローム）を解析する研究（メタボロミクス）が必須である。メタボロミクス研究においては、様々な質量分析実験の組み合わせによって代謝成分の分析が行われる。本研究では、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）を使用した高分解能マスペクトル測定によって代謝成分の分析を行う。FT-ICRMS 法では、試料抽出物に含まれる成分を未精製のまゝ一斉分析することが出来るため、後代交配種等の安全性評価のためのメタボローム情報を迅速に取得することが可能である。昨年度、FT-ICRMS を用いた組換え作物のメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法による FT-ICRMS 分析、マスペクトルデータ（質量数と各ピーク強度）の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。今年度は、国内産ダイズ 2 品種（フクユタカ、ムラユタカ）および米国産ダイズ 2 品種（Benson, Binton）の合計 4 品種の種子を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。ダイズ種子の代謝成分はメタノールで抽出し、フィルター濾過・蒸発乾固の後、50%（v/v）アセトニトリルに溶解し FT-ICRMS にて分析した。それぞれの試料において観測した約 600 の分子イオンについて多変量解析を行った。主成分分析の結果は、日本産ダイズ品種と米国産ダイズ品種のそれぞれを特徴づけるメタボロームの差が無いことを示していた。また、各品種のメタボロームにおいて、第一主成分の寄与率が 90%以上となった。この結果は、この分析法によって解析したダイズ品種メタボロームは、それぞれの品種に特徴的に存在する代謝産物によって形成されるものではなく、同一品種内におけるサンプル間の代謝産物組成と含量の差によるものと推測された。今後は、整備したメタボロミクス実験プラットフォームをもとにして、遺伝子組換え作物と非組換え作物の代謝成分の迅速な比較が可能となった。

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が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が検討され、その塩基配列由来のタンパク質において毒性やアレルギー性のないことが審

査され、安全性が確認されている。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が生じることが一般的であり、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が導入された遺伝子と内生の遺伝子とで同一であるの

か、ということについての研究はなされていない。さらに、遺伝子組み換え操作によって、非タンパク性成分(代謝成分)の種類や量に差異が生じること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ズと非遺伝子組み換えダイズに含まれる代謝成分(メタボローム)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を評価することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

<試料>

国内産ダイズ種子(フクユタカ、ムラユタカ)および米国産ダイズ種子(Benson, Binton)を供試した。

<方法>

各ダイズ品種から種子10粒を無作為に選別し、これらをまとめて1回の抽出と分析に供試した。各品種から10粒ずつ、合計5回のサンプリングを行った。ダイズ種子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)濾過して粗抽出液とした。この粗抽出液を蒸発乾固した後、溶媒(50% (v/v) アセトニトリル / 水)に溶解した。分析に際し、正イオン測定時には0.1% (v/v) ギ酸を含む50% (v/v) アセトニトリルで10倍希釈、負イオン測定時には0.1% (v/v) NH_3 を含む50% (v/v) アセトニトリルで100倍希釈した。質量補正のため内部標準物質としてリドカイン (MW 234.34) とレゼルピン (MW 608.69) を用いた。これらの内部標準は、正イオン測定時には1 μM 、負イオン測定時には10 μM の濃度にて添加した。このようにして調製した抽出液は、7テスラの超伝導磁石

を備えたFT-ICRMS (IonSpec 社製) 分析に供した。サンプルは100 μl 容のシリンジ (Hamilton) とシリンジポンプ (Harvard) を用いて、3 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で直接導入した。分析パラメーターを以下に示す。

Needle Voltage; 3000 V, Capillary DC; 75 or -75 V (Positive mode or Negative mode), Skimmer Voltage; 15 or -15 V, Shutter Voltage; -50 or 50 V, ADC Rate; 4 MHz, Number of Sample; 512 or 1024 k (Pos or Neg). Accumulation Time at Hexapole; 5000 or 8000 msec (Pos or Neg)

Flow rate; 0.5 or 0.35 ml/min (Pos or Neg). この分析条件で、各抽出液から50回の分析マススペクトルを得た。それぞれのマススペクトルから約600のイオンピークを観測した。観測したすべてのイオンピーク(50回分析 \times 600個のイオンピーク)は添加した質量補正用の内部標準物質の質量理論値を用いて補正した。得られた精密質量と存在比データは、多変量解析によって含まれる代謝産物の成分の種類と含量の傾向としてクラスター化して比較した。

C. 結果・考察

ダイズのメタボロームの一斉解析

ダイズ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。FT-ICRMS分析は、正イオンモードと負イオンモードにて行った。各品種から10粒ずつ5回をサンプリングし、それぞれを50回分析して独立したスペクトルデータとして取得した。これらのスペクトルデータにおいて、イオンピークのm/z値は質量、ピーク強度は存在比を示す。すなわち、それぞれのスペクトルデータからm/z値とその強度を定量化し、それぞれの品

種間のメタボローム(代謝産物の種類と存在量)の比較が可能である。図1には、FT-ICRMSによって取得したダイズ種子を分析した時のスペクトルの例を示す。

図2と図3に、それぞれ正イオンモードと負イオンモードでダイズ種子成分をFT-ICRMSで分析し、品種間のメタボロームクラスターを主成分分析によって解析した結果を示す。正イオンモード分析においても、負イオンモードでの分析においても、第一主成分の寄与率だけでそれぞれ全体の91.9%と96.9%を説明している。この結果は、品種間でのメタボローム変動よりも、同一品種内での異なるサンプル間での代謝成分の組成と含量のばらつき方が大きいことを示していると考えられる。

正イオンモードでのFT-ICRMS分析にお

いて第二主成分は全体の約3.2%にしか過ぎないが、米国産ダイズ種子が形成するメタボロームクラスターが国内産ダイズ種子メタボロームクラスターよりも変動しやすい傾向にあることを示している(図2)。負イオンモードでのFT-ICRMS分析では、米国産と国内産の差は認められなかった(図3)。

これまでに構築したFT-ICRMSを基礎とした実験系において、組換え体と非組換え体ダイズ種子の代謝成分の一斉分析と主成分分析によって、マクロなレベルでのメタボロームの比較が可能である。さらに本研究のFT-ICRMS分析法では、各分子イオンの質量が1ppm以下の精度で得られるので、そのデータを基にして分子式の推定も可能であり、メタボロームクラスターを形成に寄与する代謝成分の同定も可能である。

図1 ダイズ種子成分のFT-ICRMSによる一斉分析マススペクトル

横軸がm/z値、縦軸は各イオンの強度(存在量)を示す。約600のイオンを観測した。

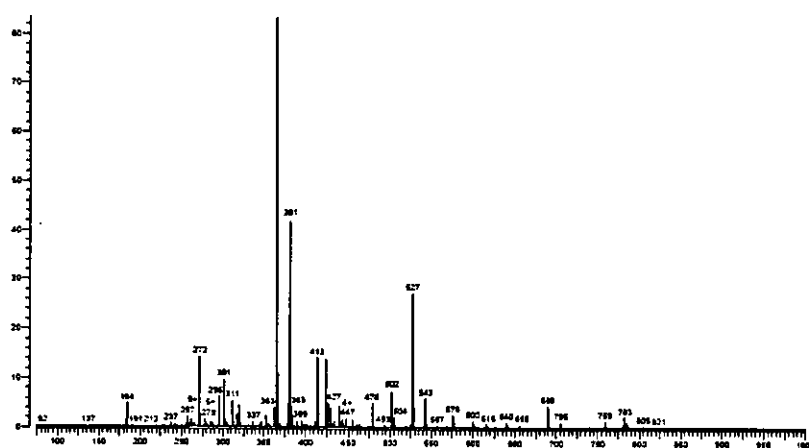


図2 正イオンモード FT-ICRMS 分析による代謝産物プロファイルの比較

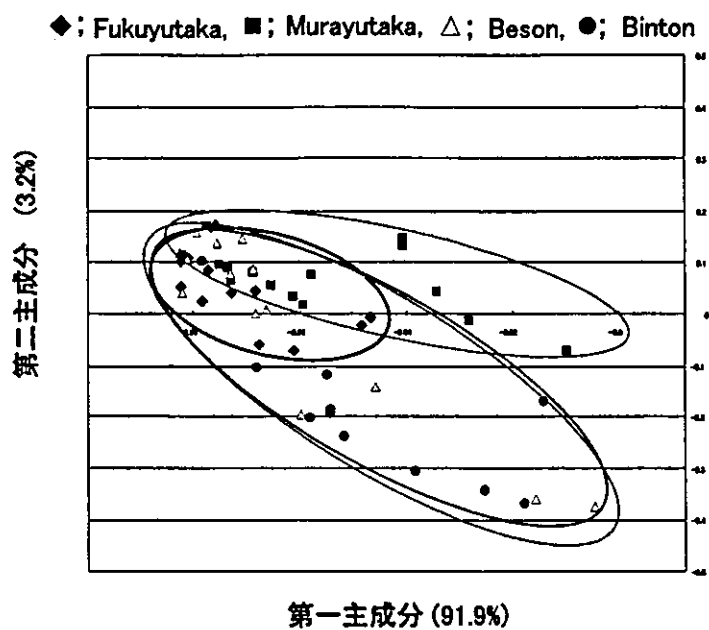
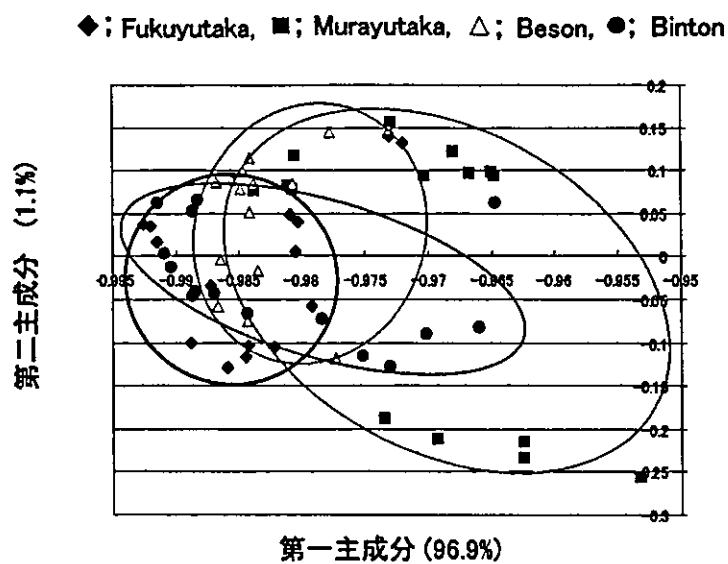


図3 負イオンモード FT-ICRMS 分析による代謝産物プロファイルの比較



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
「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) 遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討

加工食品に含有される遺伝子組換え作物の定量検知を目的とし、現行公定法に規定されている定量PCR法を実施した場合、直接の測定対象となるDNAが加工処理による様々な影響を受けているため、正確な定量値を求めることが困難とされている。本研究においては、遺伝子組換えダイズを対象とし、加工処理の影響を極力受けることのない新規定量系の開発を試み、さらに、モデル加工食品を用いた基礎的検討をおこなった。その結果、遺伝子の種類により加工処理に対する感受性が異なることを明らかにし、さらに、より広範な加工食品を対象に精度良く定量分析を行うためには、加工処理の影響を極力受けず、かつ、その大きさの等しい2種の定量系を組み合わせる必要があることを示した。また得られた結果に基づき、加工影響を推定し、これを用いた算術式により定量値を求めることが可能となるよう、解析方法の開発を試みた。

(2) 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発

遺伝子組換えトウモロコシを両親として交配させることにより、複数の遺伝的特性を併せ持たせた、新たな遺伝子組換えトウモロコシ品種(スタック品種)の開発が進められている。平成17年3月現在、国内において流通可能なスタック品種には7品種が挙げられ、今後その数が増加すると予測されている。これらが混入した粉碎混合試料を検体として定量試験を実施した場合、1粒中に複数のrecombinant DNA配列が含まれているため、重量換算で求められる遺伝子組換え作物の混入率を過剰評価する可能性が高い。この過剰評価を避けるためには、1粒毎に遺伝子組換えであるか否かを判別し、粒数として混入率を算出する事が有効であると考えられる。本研究においては、昨年度にひきつづき、粒数に基づき混入率を評価するために必要となる迅速かつ簡便な検知法を開発することを目的に、1粒毎の試料調製法、DNA抽出法、遺伝子組換えトウモロコシ粒の判別法、また、スタック品種の同定法について検討を行った。さらに今年度は、開発された方法を用いてモニタリング調査研究を実施した。

(3) 各種定量PCR機器により得られる定量値の同等性評価

現行公定法においては、遺伝子組換えダイズ1系統、遺伝子組換えトウモロコシ5系統を対象とする定量分析法として、TaqMan Chemistry を応用した定量PCR法が規定されている。これまでの研究の成果として、各分析法に使用可能な定量PCR機器として、ABI PRISM 7700、7900(96ならびに384 well)、7000、5700を定めてきた。これら各機種を使用して得られる定量値の妥当性については、すでにコラボレーション試験により評価されているが、機種毎に得られる定量値の同等性については明らかにされていなかった。そこで本研究においては、各機種により得られる定量値の同等性を検証することを目的とし、試験を行った。その結果、全ての機種により得られる定量値には機種依存的な偏りは認められず、いずれの機種を比較した場合にも同等の結果が得られると判断された。

協力研究者

稲山浩、渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所）、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）、小笠原健、荒川史博（三栄源FFI(株)）、中出晋介、安井修二((株)安井器械)

A.研究目的

1. 遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討

現行公定法に記載されている定量分析法については、その適用可能範囲がダイズならびにトウモロコシ穀粒、およびその半加工品に限定されている。これは昨年度に報告したとおり、加工処理の種類によっては直接の測定対象となるDNAが大きく変質し(主として分解による低分子化)、信頼性の高い定量値を求めることが難しいためである。しかしながら、表示の妥当性をより直接的に検証することが可能な、加工食品を対象とした定量分析法への要望は強く、定量分析法の適用可能範囲を拡充あるいは明確化できるよう、新たな検知技術の開発が望まれている。本年度は、昨年度検討を行った、2種のダイズ内在性遺伝子(HMG遺伝子ならびにLectin遺伝子)に加え、遺伝子組換えダイズ特異的recombinant DNA配列についても検討項目とし、新規定量系の開発および、モデル加工食品を用いた基礎的検討を行った。さらに、加工食品における2種の内在性遺伝子の測定値(コピー数)の比を基に、加工影響(DNAの変質の大きさ)を推定し、算術的に遺伝子組換え作物の混入率を求めることを可能とするための解析方法についても検討を行った。

2. 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発

異なる遺伝的特性が付与された遺伝子組換え作物を両親とした交配育種により、交配親の両特性を獲得させた品種が作出され

ている。これらはスタック品種と呼ばれ、平成17年現在、7品目の遺伝子組換えトウモロコシ・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。また、平成16年のアメリカにおける遺伝子組換え作物の栽培実績を調査すると、総遺伝子組換えトウモロコシの8%をスタック品種が占めるとの報告がされており、今後、実際に日本国内においてもこれらスタック品種が流通する可能性が高まっている。スタック品種は親系統と同一のrecombinant DNAを有するため、多粒粉砕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、現行定量分析法においては、特定のrecombinant DNA配列のコピー数を、内在性遺伝子のコピー数で補正し、混入率を算出する。このため、異なる2種のrecombinant DNA配列が計測された場合には、それぞれの系統について別個に混入率が算出され、その合算値が該当検体における混入率とされる。よって、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、算出された混入率は、実際の混入率に比べ過剰評価されることとなる。この過剰評価を避けるためには、多粒粉砕物を検体とするのではなく、各粒を検体とし、規定粒数あたりの遺伝子組換え作物粒数を求めることで混入率(粒/粒)を算出することが必要であると考えられる。本研究においては、昨年度に引き続き、迅速、簡便に1粒毎の分析を可能とすることを目的に、試料調製法、DNA抽出法、およびスクリーニング法についての検討を進めるとともに、スタック品種の同定法についても検討を行った。さらに、平成16年に輸入されたトウモロコシを検体とし、開発された方法を用いたモニタリング調査を実施した。

3. 各種定量PCR機器により得られる定量値の同等性評価

遺伝子組換え作物(ダイズ1系統およびトウモロコシ5系統)を対象とした定量分析法として、TaqMan Chemistry を応用した定量PCR法が開発され、その妥当性についてはコラボレーションスタディによって検証されてきた。また、昨年度の報告にあるとおり、当該分析法の適用範囲を拡充することを目的に、複数の定量PCR機器を使用した検証を進めてきた。その成果として、現行公定法においては ABI PRISM 7700、7900(96ならびに384 well)、7000、5700が適用可能機種として示されている。このように、各機種を用いて得られる定量値の妥当性についてはすでに検証され、担保された状態にあるが、各機種を比較した場合、それぞれから得られる定量値が同等と判断しうるか否かについては明らかにされていなかった。このことは、同一検体を異なる機種で測定した場合、得られる定量値が有意に異なる可能性を否定しておらず、早急に明らかにすべき点と考えられていた。本研究においては、各機種により得られる定量値の同等性を明らかにすることを目的に、各機種を用いて同一試料を測定し、得られた定量値の比較検証を行った。

B.研究方法

1. 遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討

1) 試料

遺伝子組換えダイズ(Roundup Ready soy: RRS)は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、疑似混入試料およびモデル加工食品の調製には、アメリカ産非遺伝子組換えダイズの種子を用いた。

2) 疑似混入試料およびモデル加工食品の調製

遺伝子組換えおよび、非遺伝子組換えダ

イズの種子のいずれもについて、粒径が 500 μm となるよう粉碎した。疑似混入試料として、渡邊ら¹⁾および栗原ら²⁾の報告にある方法を改良して用い、RRS を 0、1、5、100% (w/w)の割合で含有する試料を調製した。モデル加工食品の調製に当たっては、各疑似混入試料に対し、等重量の蒸留水を加えた後、ミキサーミルを用いて十分な均一化を行った試料を加工原材料とした。加工原材料は1実験区当たり 2.4 g (n=3)を小分けにし、以下に示す条件で処理した。低压加工; 1+0.49 atm、111 $^{\circ}\text{C}$ 、高压加工; 1+0.79 atm、117 $^{\circ}\text{C}$ 。加工処理時間は 0、20、40、60、80、100 分間とした。処理済み試料は凍結乾燥後、粉碎し、1 検体当たり 0.5 g を秤量して DNA 抽出に供した。(1 実験区あたり 3 つの独立検体を使用して試験した)

3) DNA抽出法

未加工の疑似混入試料からの DNA 抽出には、JAS 分析ハンドブックに記載されている DNeasy Plant Maxi kit 法と、食発第 1106001 号(平成 14 年 11 月 6 日)記載の Genomic-tip 20/G を用いた方法に若干の改良を加えた方法を併用した。モデル加工食品からの DNA 抽出には、Genomic-tip 20/G を用いた抽出法を改めて検討し、用いた。その概略を以下に示す。

ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採った 0.5 g の試料に対し、G2 緩衝液 7.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで激しく混合し、混合後さらに G2 緩衝液 7.5 mL、ならびに α -アミラーゼ(1 mg/mL) 200 μL を加え、再びボルテックスミキサーで混合した。混合処理後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間加温した。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌した。加温処理後、100 μL の Proteinase K (20 mg/mL)ならびに 20 μL の RNase A (100 mg/mL)を加えボルテックスミキサーで混合し、その後、50 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間加温した。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌した。次いで、低温下 (4 $^{\circ}\text{C}$)、8,000 x g の条件で

25 分間遠心し、上清 9 mL をシリンジ(10 mL)に分取した。分取後、フィルター膜(Millex-HV^{†1})に負荷し、上清をろ過した。次いで、ろ液を平衡化済み QIAGEN Genomic-tip 20/G に 2 mL ずつ 3 回に分けて負荷した。上清の負荷操作を終了した後、tip に QC 緩衝液 2 mL を負荷し、洗浄した。同様の洗浄操作を合計 3 回繰り返した後、tip を新しいポリプロピレン製遠沈管(15 mL 容)に移し変えた。洗浄操作終了後の tip に予め 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を加え、DNA を溶出した。同 tip に対し、再度同様の溶出操作を行った。得られた計 2 mL の溶出液に対し、2.5 倍量の 100% EtOH (5 mL)、および、1/10 倍量の 3M 酢酸ナトリウム(200 μ L)を加えよく混合し、低温下(4°C)、8,000 x g の条件で 20 分間遠心し、沈殿を除かないよう上清のみを除去した。上清を除いた後の遠沈管に 70% エタノール 5 mL を加え、低温下(4°C)、8,000 x g の条件で 10 分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて 5 分間程度の真空乾燥処理を行った。乾燥した沈殿に対し TE 緩衝液 200 μ L を加え、65°C、5 分間の条件での加温処理、ならびにピペッティング操作により DNA を溶解させ、DNA 試料原液とした。

^{†1}Millex-HV:PVDF(0.45mm)

4) 2 種のダイズ内在性遺伝子、*HMG (high mobility group)* 遺伝子ならびに *Lectin* 遺伝子、および遺伝子組換えダイズ(RRS) 特異的配列を標的とした定量系の開発

昨年度報告したダイズ新規内在性遺伝子 *HMG (high-mobility group)* 遺伝子³⁾ を標的としたプライマー対ならびにプローブ(HMG-01およびHMG-Taq)に加え、同遺伝子を対象とし、異なる断片長のPCR増幅産物を生じるようにHMG-02プライマー対を新たに設計した(プローブはHMG-Taqを共通して使用。HMG-TaqはVICにより蛍光標識した)。HMG-01および02により増幅される

PCR増幅産物の断片長は、それぞれ110および84 bp。*Lectin*遺伝子を標的とした定量系には、現行定量分析法に採用されているLe1n02、および吉村ら⁴⁾によって報告されたLe1n03を使用した。Le1n02および03により増幅されるPCR増幅産物の断片長は、それぞれ118および89 bp。(プローブはLe1-Taqを共通して使用)。さらに、RRS特異的配列を標的とした定量系には、現行定量分析法に採用されているRRS01に加え、異なる断片長のPCR増幅産物を生じるよう、RRS02を新たに設計した。RRS01および02により増幅されるPCR増幅産物の断片長は、それぞれ121および83 bp (プローブはRRS-Taqを共通して使用)。各定量系により得られるPCR増幅産物長についてFig.1にまとめた。

5) ダイズ加工食品定量分析用標準分質

基礎的検討を行うにあたり、昨年度開発したプラスミドDNA (PMulSLH)を標準物質として用いた。PMulSLHは、PUC19ベクターを基本骨格として開発し、HMG01および02、Le1n02および03、ならびにRRS01および02を用いてPCR増幅産物を生じるよう、鋳型DNA配列を導入した(Fig.1)。なお、プラスミドDNAは0、20、125、15,00、20,000、250,000 コピー /reaction となるようにCoIE1/TE溶液*を用いて希釈し、キャリブレートスタンダード(標準プラスミド溶液)として用いた。

*大腸菌プラスミドDNA中のnon coding regionについて5ng/ μ Lの濃度でTE緩衝液に溶解したもの。

6) 定量PCR条件

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

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

7) 内標比の測定およびその妥当性検証

内在性遺伝子を標的とする4種(HMG01、02およびLe1n02、03)、RRS特異的配列を標的とする2種(RRS01、02)の定量系を組み合わせ、計8種の定量系の組み合わせを用いて内標比測定を行った。試料には100%RRS粉砕試料を用いた。さらに1および5%疑似混入試料を用い、得られた内標比の検証試験を行った。いずれの試料からも、DNeasy Plant Maxi kit法、およびGenomic tip 20/G法の両法を併用してDNAを抽出し、各抽出DNAを検体とした。

8) モデル加工食品を対象とした測定試験

B-1-3)記載のDNA抽出法を用いて、各モデル加工食品からDNAを抽出し、コピー数の測定を行った。また、本研究において求められた内標比を用い、混入率を算出した。

2. 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発

1) 試料

各遺伝子組換えトウモロコシ品種の種子は、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。

2) 1粒毎多粒同時試料調製法

昨年度に引き続き、1粒粉砕機を用いた多粒同時粉砕試料調製法の検討を行った。検討の結果、最終的に以下の条件により最適な試料の調製が可能であった。

ダイズ種子に付着した粉末等によるコンタミネーションを予防する目的から1% SDSを用いた洗浄を行った。洗浄後、十分に乾燥させた種子1粒をメタルビーズを含む専用のチューブに分取し、安井器械(株)製の48検体を同時に粉砕可能な振幅型試料粉砕器(Multi beads shocker)を改良した装置を用い、粉砕した。粉砕条件は4,500 rpmの回転数で1分間の処理を1回とし、これを2

回繰り返すことで最適な粉砕試料の調製が可能であった。

3) 1粒毎多粒同時DNA抽出法

QIAGEN社DNeasy Plant 96 Plate kitを用い、以下に示す改良法に従いDNAを抽出した。

粉砕試料にAPI緩衝液1 mL (65℃) およびRNaseA 1 μLを加え、試料塊が残らないよう十分に混合し、その後、65℃で30分間加温した。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌した。加温処理後、AP2緩衝液を170 μLを加え、-20℃の条件で30分間静置した。処理後、低温下(4℃)、3,000 rpmの条件で20分間遠心した。遠心後、上清600 μLを新しい1.5 mL容の微量遠心管に分取し、低温下、12,000 rpmの条件で5分間遠心した。遠心後の上清(400 μL)を新しい1.5 mL容の微量遠心管に分取し、1.5倍量(600 μL)のAP3・エタノール混液を加え、十分に混合した。吸引器にDNeasy 96 Plateをセットし、調製した混液1 mLを負荷し、シールにより密閉した後、吸引した。吸引後、各wellにAW緩衝液を800 μL加え、吸引することでwellを洗浄した。洗浄後、100%エタノール800 μL加え、吸引洗浄した後、wellを乾燥させるため、15分間、連続して吸引した。乾燥後のDNeasy 96 Plateをコレクションチューブ上に設置し、各wellに予め65℃に温めておいた蒸留水75 μLを加え、室温で5分間静置した後、吸引することでDNAをカラムより溶出した。同操作を2回繰り返す、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液とした。

4) Multiplex real-time PCR法を用いた遺伝子組換えトウモロコシ・スクリーニング法

遺伝子組換えトウモロコシを対象とした迅速かつ簡便なスクリーニング法として、TaqMan chemistryを応用したMultiplex real-time PCR法について引き続き検討を行った。最終的に、反応液組成は、2×Universal Master Mix 12.5 μL、3種のプライマー対およ