

表 1. GeneChip Soybean Genome Array を用いてラウンドアップ・レディー・ダイズの 3 個の穀粒間で発現の違いの見られた遺伝子 (シャドウをかけてある遺伝子が発現に大きな差の見られた遺伝子)

Soybean_00651	Gma_10709.2.S1.at	2.4 NC	0.4 NC	-2.2 NC	klb_C18354
Soybean_00652	Gma_10711.A1.at	1 NC	-0.2 NC	-1.6 NC	klb_B19457
Soybean_00653	Gma_10711.S1.x.at	0.4 D	0 NC	0.4 I	gh_G03054
Soybean_00654	Gma_10711.2.S1.at	0.8 D	-0.3 MD	1 I	gh_BM094
Soybean_00655	Gma_10713.S1.x.at	-3.4 NC	3.3 NC	-0.2 NC	gh_G0406
Soybean_00656	Gma_10713.S1.at	-3.4 NC	2.8 NC	1.8 NC	gh_G0406
Soybean_00657	Gma_10713.S1.x.at	0.1 NC	0 NC	0.4 NC	klb_CD405
Soybean_00658	Gma_10713.2.S1.at	-0.3 NC	-2.6 NC	2.2 NC	klb_CD416
Soybean_00659	Gma_10716.2.S1.at	-3.6 NC	2 NC	0.9 NC	klb_BM885
Soybean_00660	Gma_10716.3.S1.at	0.1 NC	0.6 NC	-0.4 NC	klb_BM885
Soybean_00661	Gma_10717.S1.x.at	2 I	-3.8 D	1.5 I	klb_AW706
Soybean_00662	Gma_10717.2.S1.x.at	2.5 I	-4 D	1.5 I	gh_A14405
Soybean_00663	Gma_10718.A1.at	-0.3 NC	0.8 MI	0.5 NC	gh_G0417
Soybean_00664	Gma_1072.S1.at	0.2 NC	0.2 NC	0.9 NC	gh_G0417
Soybean_00665	Gma_1072.2.S1.at	0.6 NC	0.3 NC	0 NC	gh_B14246
Soybean_00666	Gma_10720.2.S1.x.at	-1.3 D	0.6 MI	0.9 I	gh_AW396
Soybean_00667	Gma_10720.2.S1.x.at	-1 D	-0.4 NC	0.9 I	klb_AW396
Soybean_00668	Gma_10721.S1.at	0 NC	0.5 D	0.3 I	klb_AF0745
Soybean_00669	Gma_10721.S1.x.at	0.1 NC	-0.3 NC	0.2 NC	klb_AF0745
Soybean_00670	Gma_10722.S1.at	-0.7 D	1.8 I	-1 D	klb_B18235
Soybean_00671	Gma_10723.S1.at	0.3 NC	-0.4 D	0.2 NC	klb_B17009
Soybean_00672	Gma_10725.S1.at	0.2 NC	-0.1 NC	0.1 NC	gh_B11545
Soybean_00673	Gma_10725.2.S1.x.at	2 NC	0.9 NC	-2.4 NC	gh_AW760
Soybean_00674	Gma_10725.2.S1.at	-2.4 NC	0.2 NC	1.5 NC	gh_AW760
Soybean_00675	Gma_10726.S1.at	-0.1 NC	0 NC	0.2 NC	gh_B11572
Soybean_00676	Gma_10727.S1.at	0.3 NC	-0.7 D	0.3 NC	gh_G0305
Soybean_00677	Gma_10728.A1.at	-0.2 NC	-0.2 NC	0.5 I	klb_CD410
Soybean_00678	Gma_10729.S1.x.at	0.6 I	-1.7 D	1.2 I	klb_AW201
Soybean_00679	Gma_10729.2.S1.at	0.3 NC	-1.6 D	1.4 I	klb_C1801
Soybean_00680	Gma_10730.S1.at	0.4 I	-0.5 D	0.1 NC	klb_CD404
Soybean_00681	Gma_10731.S1.x.at	0.1 NC	2.5 NC	-3.2 NC	gh_BF55R1
Soybean_00682	Gma_10732.S1.at	0.8 I	0.2 D	0.4 D	gh_G0301
Soybean_00683	Gma_10732.A1.at	0.9 I	0.8 D	-0.3 NC	gh_BF55R1
Soybean_00684	Gma_10734.A1.at	0.4 NC	0 NC	0.2 NC	gh_BF55R1
Soybean_00685	Gma_10737.2.S1.at	-0.3 NC	-0.4 NC	0.5 NC	gh_G0414
Soybean_00686	Gma_10737.2.S1.x.at	-0.3 NC	0.1 NC	0 NC	klb_CD414
Soybean_00687	Gma_10737.2.S1.x.at	-0.2 NC	0.2 NC	0.1 NC	klb_CD414
Soybean_00688	Gma_10738.S1.at	0.1 NC	0.4 NC	0.8 D	klb_B06531
Soybean_00689	Gma_10738.2.S1.x.at	-0.7 D	0.7 I	0 NC	klb_B06531
Soybean_00690	Gma_10739.S1.at	0 NC	1.2 I	-1.2 D	klb_B18205
Soybean_00691	Gma_10739.2.S1.at	-2.1 NC	4.5 NC	-1.3 NC	gh_BF425C
Soybean_00692	Gma_10742.S1.at	0 NC	-0.9 D	0.7 I	gh_BF55R1
Soybean_00693	Gma_10742.S1.x.at	-0.2 NC	0 NC	0.3 MI	gh_BF55R1
Soybean_00694	Gma_10745.A1.at	-3.7 NC	0.2 NC	2.7 NC	gh_G0403
Soybean_00695	Gma_10747.S1.at	-0.2 NC	0.2 NC	0.2 NC	gh_A1435
Soybean_00696	Gma_10747.2.S1.at	-0.5 NC	0.7 I	-0.6 NC	klb_B0661
Soybean_00697	Gma_10749.S1.at	-0.4 NC	-0.3 NC	0.6 NC	klb_AW349
Soybean_00698	Gma_10750.S1.at	-0.8 NC	-0.5 NC	1.8 I	klb_BM525
Soybean_00699	Gma_10751.S1.x.at	-0.2 NC	0.1 NC	0.2 NC	klb_B19704
Soybean_00700	Gma_10751.S1.at	-0.2 NC	0.2 NC	0 NC	klb_B19704
Soybean_00701	Gma_10751.S1.x.at	-0.2 NC	0.2 NC	0.1 NC	gh_B19704

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、本年度は輸入ダイズから選抜された遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズについて、プロテオーム解析によりそれぞれのプロファイルを比較検討した。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀（青森大学薬学部）

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、輸入ダイズより選抜された遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を行い、それぞれのプロファイルを比較検討した。

B. 研究方法

<試料>

輸入ダイズは、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

輸入ダイズより ELISA 法により組換えダイズおよび非組換えダイズを選抜した。破碎したサンプル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,）を加え、氷上ですりつぶした。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

粗抽出物を 2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。得られた沈殿を 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (Amersham Pharmacia Biotech) に溶解し、限外濾過膜 (Ultrafree, Millipore) により低分子性物質を除去した。2-D Quant Kit によりタンパク質量を定量し、30µg 相当を電気泳動に供した。

電気泳動

・ 1 次元目電気泳動 (IEF)

サンプルおよび 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution を用いて Immobiline DryStrip 3-10NL 18cm (Amersham

Pharmacia Biotech) を膨潤させ、Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて電気泳動した。500V で 1 時間、1000V で 1 時間通電した後、8000V で 5 時間 30 分泳動した。

#### ・ 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、スキャ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

#### 個体差の検討

遺伝子組換えダイズ 8 個体について個体差を検討するために、2次元電気泳動によるプロファイリングを行った。電気泳動像をコンピュータに取り込む際のパラメーターや画像解析ソフトによるスポット認識のためのパラメーターを精査し、タンパク質量が過剰のためにスケールオーバーでスポットとしては認識されない領域を除いて、平均して1,000個のスポットを検出することができた。それぞれのスポットについて解析したところ、90%以上のスポットがいずれかの個体間で共通に検出された。

#### 遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズそれぞれ 4 個体について、1次元目の電気泳動 (IEF) を同時に行い、2次元目の電気泳動 (SDS-PAGE) をそれぞれ個別に行い、可能な限り同じ条件で染色し、前項で精査したパラメータをもとに画像の取り込みを行った。遺伝子組換えダイズ 4 個体と非遺伝子組換えダイズ 4 個体をそれぞれ 1 つのグループとし、2つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

非遺伝子組換えダイズのグループ内での解析を行ったところ、いずれのグループにおいても平均して1,000個のスポットを検出し、90%以上のスポットがいずれかの個体間で共通に検出された。

非遺伝子組換えダイズのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図 (図 1) をリファレンスとして解析したところ、いずれかの個体間で 1150 個のスポットが共通に検出された。この中で非遺伝子組換えダイズのグループと遺伝子組換えダイズのグループで共通して検出されたスポットは、92.8%に相当する 1067 個であった (図 3)。残りの 7.2% (83 個) は非遺伝子組換えダイズのグループのみで検出された。また、遺伝子組換えダイズのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図 (図 2) をリファレンスとして解析したところ、いずれかの個体間で 1052 個のスポットが共通に検出された。この中で非遺伝子組換えダイズのグループと遺伝子組換えダイズのグループで共通して検出されたスポットは、95.8%に相当する 1008 個であった (図 4)。残りの 4.2% (44 個) は遺伝子組換えダイズのグループのみで検出された。それぞれ、数%のグループ特異的スポットが検出されているが、このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要があると考えられる。また、タンパク質の分画などを行って、2次元電気泳動による分離をより鮮明にして解析を行う必要もあると考えられる。

### 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 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、大阪、2005 年 4 月。

#### (論文発表)

Sasaki, K., Umetsu, H., Yamada A., Kamada, H. and Ozeki, H., "Construction of ELISA System to Detect NPTII Protein in Genetically Modified Foods", Jpn. J. Food Chem., 12(3), 140-144 (2005).

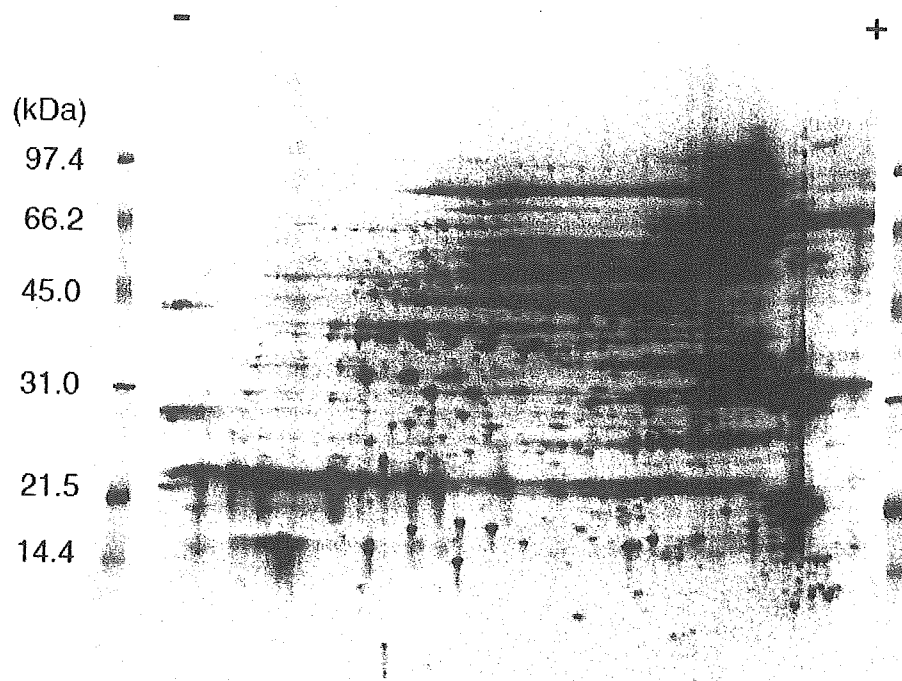


図1 非組換えダイズから抽出したタンパク質の2次元電気泳動図

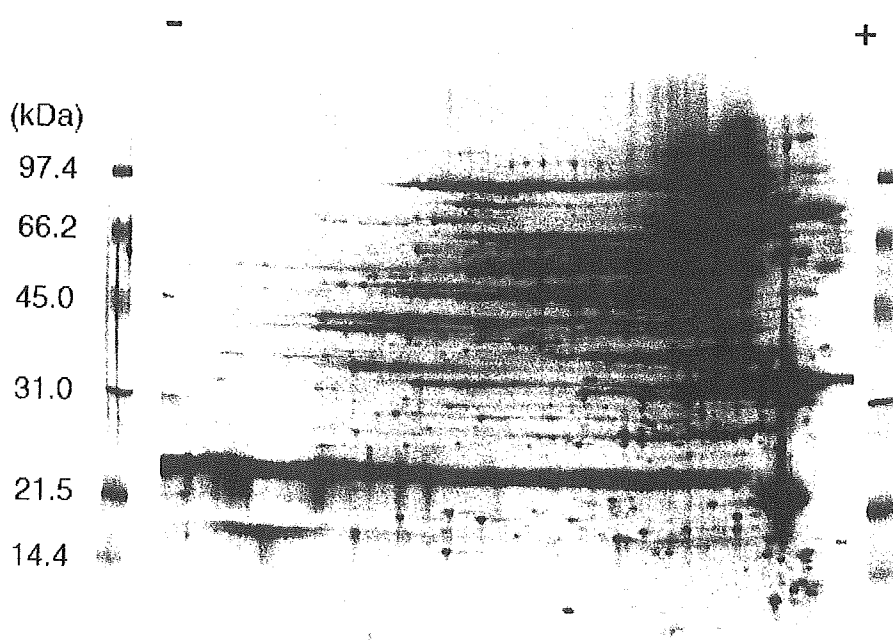


図2 組換えダイズから抽出したタンパク質の2次元電気泳動図

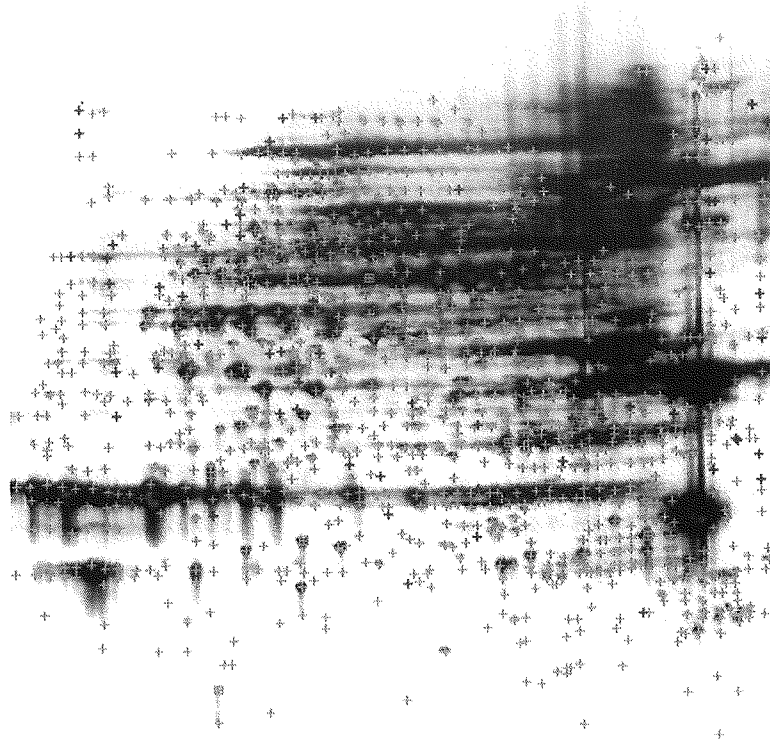


図3 非組換えダイズをリファレンスとした解析  
緑は、組換えダイズと共通しているスポット。  
赤は、非組換えダイズのみで検出されたスポット。

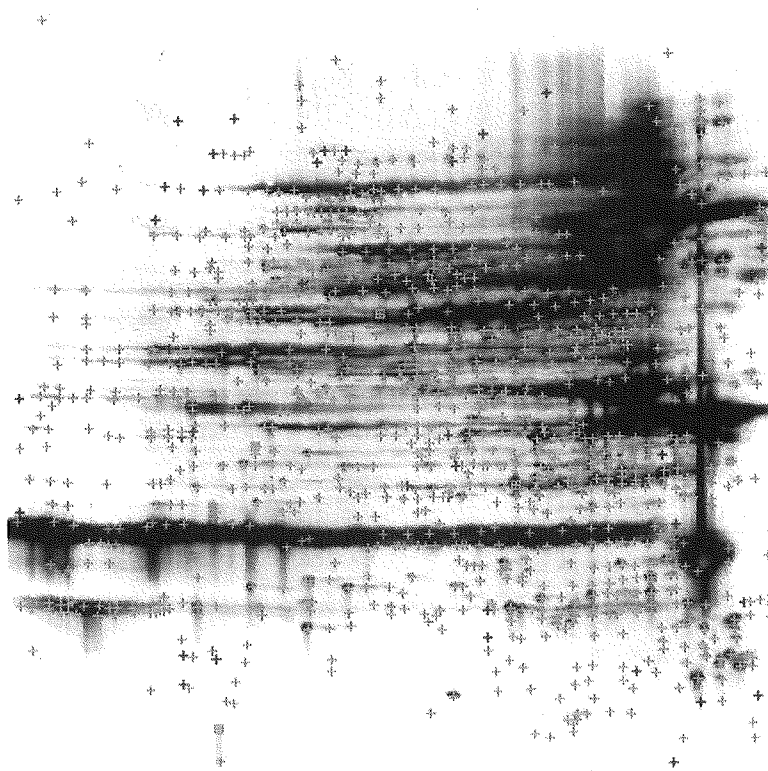


図4 組換えダイズをリファレンスとした解析  
緑は、非組換えダイズと共通しているスポット。  
赤は、組換えダイズのみで検出されたスポット。

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スペクトル測定によって代謝成分の分析を行った。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。平成 15 年度には、FT-ICRMS を用いた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。平成 16 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た。その結果から、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した。本年度は、遺伝子組換えダイズ種子と非組換えダイズ種子のメタボロームを比較したところ、組換え体と非組換え体の間ではメタボロームに差が認められないことが明らかとなった。

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>

無作為に選別した組換え体ダイズ種子 30 検体と非組換えダイズ種子 4 検体をメタボローム解析に供試した。

### <方法>

#### ダイズ種子に含まれる化合物の一斉分析

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  $\mu\text{m}$ )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)  $\text{NH}_4\text{OH}$  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  $\mu\text{M}$ 、負イオン測定時には 10  $\mu\text{M}$  の濃度にて添加した。

質量分析実験調製した抽出液は、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  $\mu\text{l}$  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 100 回の分析マススペクトルを取得した。それぞれのマススペクトルから約 300 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(100 回分析  $\times$  300 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自動補正した。得られた精密質量データと存在比データは、多変量解析によって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。本研究においては FT-ICRMS 分析で得られた分子イオン観測データに対する主成分分析のため、独自に開発した FT-ICR MS メタボロミクス計算アルゴリズムを使用した。

## 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。取得した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と図2に、正イオンモードと負イオンモードで組換え体ダイズ種子成分と非組換え体ダイズ種子成分のメタボローム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(第一主成分の寄与率31.0%と第二主成分の寄与率18.8%)および負イオンモード分析(第一主成分の寄与率23.1%と第二主成分の寄与率16.3%)において、組換え体と非組換え体の間でのメタボローム変動は認められなかった。平成16年度には、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。その際の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おり、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。これらの結果は、供試したダイズ種子の代謝成分の組成と含量の変動が、遺伝子操作の有無よりも、各試料の由来(産地、保存状態など)に大きく依存していることを示唆している。

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の代謝成分の一斉分析と主成分分析によるマクロなレベルでのメタボローム比較が可能である。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同定も可能である。

正イオンモードでのメタボローム解析

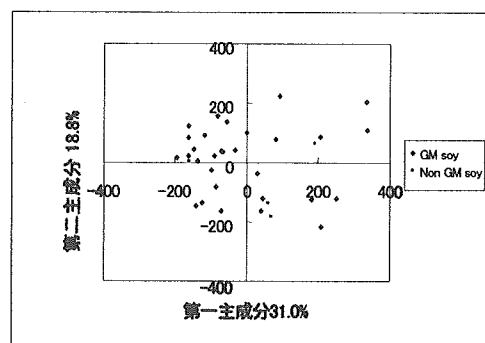


図1. ダイズ種子成分(組換え体30サンプル, 非組換え体4サンプル)をそれぞれ一斉解析し, 100連のスペクトルから再現性を持って出現する300種類のイオンについて多変量解析した結果を示す。各データポイント(◆, 組換え体; ◇, 非組換え体)は独立したサンプルに対応する。

負イオンモードでのメタボローム解析

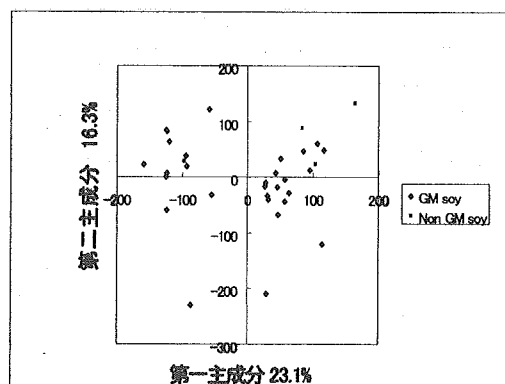


図2. ダイズ種子成分(組換え体30サンプル, 非組換え体4サンプル)をそれぞれ一斉解析し100連のスペクトルから再現性を持って出現する300種類のイオンについて多変量解析した結果を示す。各データポイント(◆, 組換え体; ◇, 非組換え体)は独立したサンプルに対応する。



平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「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) 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした検知技術の開発

遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)が、2001年から2004年までの4年間に亘り米国において誤って栽培され、さらには流通していた事実が報道された。しかし、Bt10系統は安全性審査に諮られていないことから、国内流通が禁止されている。そこで、Bt10系統特異的検知技術の開発と標準化を試みた。

(2) 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

2005年4月13日に公開された環境保護団体の報告により、中国湖北省において安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメが流通していた事実が明らかになった。本報告に依れば、当該安全性未審査遺伝子組換えイネは、すでに安全性審査を終了している遺伝子組換えワタ等にも導入されているCry1Acタンパク質を発現している。そこで、Cry1Acタンパク質を標的タンパクとして開発されていたラテラルフロー法が、コメを対象とした検知に適用可能であるかの検討を行った。

(3) LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良

安全性審査を終了した遺伝子組換え作物を対象とした定量分析法として、定量PCR法が開発されてきた。LightCycler systemは多機関検証試験を経て、本定量PCR法に適用可能な定量PCR機器の1機種に定められてきた。しかし、その後の検討により分析結果の安定性に問題が認められたため、新たなPCR試薬の検討も含め、LightCycler systemを用いた定量PCR法の改良について検討した。

(4) ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発

遺伝子組換え作物を対象とした定量PCR法の適用可能機種の拡大を目的に、複数挙げられる定量PCR機器のうち比較的安価なABI PRISM 7500を用い、遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とする定量PCR法について開発を検討した。

(5) 新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良

2001年以降に安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ5系統のうち、MON863、NK603、TC1507系統は今後の流通量増加が予測されている系統であり、これらを対象とした定量分析法の開発が求められている。また、新たな遺伝子組換えトウモロコシが安全性審査を終了し流通可能な状態となったことから、これまでに開発及び標準化を終了し、公定分析法として公開された分析法のうち、T25系統を対象とした分析法の改良が必要となった。これらのことから、上記3系統及びT25系統を対象に新たな定量PCR法を開発し、その標準化を検討した。

(6) シリカベースレジソタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良

現行公定分析法には、遺伝子組換えダイズを対象とした定量PCR法に供されるDNAを抽出するための方法として、2種の方法が規定されている。これらのうち、シリカベースプレジエンタイプキットを用いた方法は、他の方法に比較して操作が簡便であるもの、長時間を要し、また高価であることが指摘されていた。このため、シリカベースタイププレジエンタイプキット法をより短時間かつ安価に実施可能とすることを目的に改良を検討した。

協力研究者

穂山浩、渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所）、大森清美（神奈川県衛生研究所）、豊田安基江（広島県保健環境センター）、日野明寛、古井聡、児玉貴志（独立行政法人食品総合研究所）、栗原秀夫（独立行政法人農林水産省消費技術センター）、峯岸泰孝（㈱フッソ）、小笠原健、荒川史博（三栄源エフ・エフ・アイ（株））、小関良宏（東京農工大学）

#### A. 研究目的

##### 1. 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ (Bt10 系統) を対象とした検知技術の開発

2005年3月22日に公開された、オンライン版 Nature 誌の News<sup>1)</sup>をはじめとする各種メディアを介して、安全性審査に諮られていない遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)が、2001年から2004年までの4年間に亘り米国において誤って栽培され、さらには流通していた事実が報道された。報道に依れば、150 km<sup>2</sup>の範囲において栽培され、その流通量は4年間を通して数百トンに上ると推算されている。Bt10 系統は、我が国をはじめとする各国において、すでに安全性審査を終了している Bt11 系統に導入されたものと同じ構成をもつ一連の DNA 配列(発現カセット)を用いて組換えられた遺伝子組換えトウモロコシ系統であり、よって、Bt10 並びに Bt11 両系統は、同一の組換えタンパク質を発現する。Bt10 系統としての安全性が確認されていないことに加え、さらに Bt11 系統とは異なる点として、DNA 組換え時の選択マーカーとして使用されるアンピシリン耐性遺伝子が残存しているとの報告もあり、環境中への当該遺伝子の放出を危惧する EU においては、その点についても議論を生じている。我が国において

も、当然ながら安全性審査に諮られていないため、これまでにスターリンク(CBH351 系統)等に対してとられたものと同様、少なくとも食品としては国内流通を禁止する施策がとられるものと考えられる。また、上記施策を講じるためには、Bt10 系統を特異的かつ高感度に検知可能な科学的検証法が必要とされる。本研究においては、迅速な検査体制の整備に対応するため、まず、Bt10 系統の開発企業であるシンジェンタ社から提供された系統特異的なプライマー対(JSFR3)及び、これまでに定量 PCR 法として開発済みであった Bt11 構造特異的プライマー対(Bt11-3-5'-3')を用いた定性 PCR 法の検討及び標準化を行った。さらに、その後の試料の入手にあわせ、新たな Bt10 系統特異的 DNA 配列情報の取得及び、取得情報に基づく系統特異的定性 PCR 法の開発を検討した。

##### 2. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

2005年4月13日に公開された環境保護団体の報告により、中国湖北省において安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメが流通していた事実が明らかになった。本報告に依れば、当該遺伝子組換えイネには、すでに安全性審査を終了している遺伝子組換えワタ等に導入されている Cry1Ac タンパク質が導入されている可能性が示唆されているが、中国当局による正式な発表はない。現在、遺伝子組換えコメの流通は、中国をはじめとする世界各国において承認されておらず、仮に報道が事実であった場合、我が国においても流通を監視するための検査体制を整備する必要があると考えられた。このため、本研究においては、Cry1Ac タン

パク質を標的タンパク質として開発されていたラテラルフロー法が、コメを対象とした検知に適用可能であるかを明らかにするため、基礎的な検討を行った。なお、本報告においてはCry1Acタンパク質を発現する遺伝子組換えコメをBtコメと仮称することとする。

### 3. LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良

定量PCR法は、安全性審査を終了した遺伝子組換え作物(トウモロコシ5系統、同ダイズ1系統)を対象とする定量分析法として、現行公定法(最新は食安発0517001号(一部改正)、平成17年5月17日)<sup>2)</sup>において示されている分析方法である。本定量PCR法の適用可能機種としては、ABI PRISM 7700、7900(96並びに384 well)、7000、5700及び、LightCycler systemが指定されているが、平成15年度に実施された外部精度管理試験の結果として、LightCycler systemを用いることにより真値とは異なる分析結果が得られる場合があり、また結果の安定性にも問題があることが指摘された<sup>3)</sup>。さらにその原因として、機器個体の精度差及び定量PCR試薬による影響が考察されている。また、LightCycler systemは公定分析法に示されている他の定量PCR機器と異なり、キャピラリー型の専用の反応チューブを用いてサーマルサイクル反応を行う仕様となっている。このため、反応に供されるDNA試料の質が定量結果に影響を与えている可能性も考えられた。本研究においては、公定分析法に示されている方法とは異なるDNA抽出法の適用及び定量PCR試薬の変更も含め、遺伝子組換えダイズを対象にLightCycler systemを用いて得られる定量結果の安定性向上のための検討を行った。

### 4. ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発

先述のとおり、遺伝子組換え作物を対象

とした定量PCR法に適用可能な定量PCR機種には、ABI PRISM 7700、7900(96並びに384 well)、7000、5700及び、LightCycler systemが指定されている。しかし、これらの定量PCR機器のうち最も安価であったABI PRISM 7000の製造停止が報告され、分析法が広く用いられるためには、今後当機にかわる安価な定量PCR機器を使用した分析法が求められている。また、現在の遺伝子組換え作物の流通状況及び今後の分析法の動向を勘案すると、スクリーニング分析法の重要性が再認識される場所である。このため本研究においては、ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象としたスクリーニング定量分析法について開発を検討した。

### 5. 新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良

2001年以降、5系統の遺伝子組換えトウモロコシが安全性審査を終了している。これらのうち、MON863、NK603、TC1507系統の3系統は、現在、主として流通している遺伝子組換えトウモロコシ各系統の後継にあたる系統であり、今後の流通量が増加する可能性が考えられる。このため、これら3系統を明確に区別し、精度良く分析可能な定量分析法の開発が求められている。また、上記3系統中、TC1507系統には、現行公定分析法の分析対象であるT25系統と同一のDNA配列が導入されており、T25系統を対象とした分析法がこの共通のDNA配列を標的としていることから、T25系統のみに存在する特異的なDNA配列を標的とした定量PCR法の開発についても検討した。

### 6. シリカベースレジスタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良

現行公定分析法には、遺伝子組換えダイズを定量分析するための方法として、ELISA法と定量PCR法が規定されている。ま

た定量PCR法に関しては、当該分析法における直接の分析試料となるDNAを抽出するための方法として、CTAB法及びシリカベースレジソタイプキット法が併記されている。これらのうち、シリカベースレジソタイプキット法はCTAB法に比べて操作が簡便であるもの、長時間を要し、また高価であることが指摘されていた。このため、シリカベースレジソタイプキット法をより短時間かつ安価に実施可能とすることを目的に改良を検討した。

## B.研究方法

### 1. 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした検知技術の開発

#### 1)試料

遺伝子組換えトウモロコシ各系統(Bt10系統を含む)及び、Bt10系統の親系統に相当する非遺伝子組換えトウモロコシ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。その他の非遺伝子組換え作物については、東京都内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。

#### 2)Bt10系統特異的プライマー対(JSFR3)並びにBt11構造特異的プライマー対

#### (Bt11-3-5'-3')を用いた定性PCR法のインハウス試験及び多機関検証

Bt10系統の開発企業であるシンジェンタ社から公開されたBt10系統特異的プライマー対(JSFR3)並びに、すでに定量PCR法として開発されていたBt11構造特異的プライマー対(Bt11-3-5'-3')を用いた各定性PCR法について、それらの特異性及び検知感度をインハウス試験にて検証した。特異性の検証試験には、遺伝子組換えトウモロコシ各系統(Bt10、Bt11、GA21、Event176、MON810、T25、NK603、MON863、TC1507系統)、非遺伝子組換えトウモロコシ、遺伝子組換えダイズ(Roundup Ready soy)、非遺伝子組換えダイズ及び、その他の主要穀物としてオオムギ、コムギ、コメから改変CTAB法により抽出したDNAを用いた。検知感度の検証試

験には、Bt10系統から抽出したDNAを非遺伝子組換えトウモロコシから抽出したDNAを用いて0.01、0.05、0.10%(DNA質量比)となるように希釈した擬似混合DNA試料を用いた。

インハウス試験終了後、6機関参加の共同試験により、試験法を用いて得られる結果の再現性を確認した。共同試験においては、前述の擬似混合DNA試料に100%及び0%Bt10試料、non template controlとしてのdistilled water(DW)を加えた計6種の試料をblind duplicatesの被検試料として用いた。これら被検試料に加え、プライマー対を含む各種PCR試薬、共同試験プロトコール、結果の報告様式をあわせて送付し、指定期間内に返送された結果について解析した。

#### 3)Bt10系統特異的DNA配列情報の取得とそれに基づく新規Bt10系統特異的検知技術の開発

Bt10系統特異的DNA配列情報の取得を目的に、Thermal asymmetric interlaced (TAIL)PCR法、Inverse PCR法等を用いてシス配列近傍DNA領域の単離を試みた。これらの検討の結果得られたDNA配列情報を基に、新たなBt10系統特異的プライマー対(Bt10LS)を設計し、それを用いたPCR法の特異性及び検知感度について検証した。また、先に共同試験を実施した定性PCR法のうち、JSFR3プライマー対を用いた方法の改良法としてJSFR5プライマー対を用いる方法が新たに報告されたため、本方法についても同様の検証試験を実施した。試料としては先述の各種試料から抽出したDNA及び擬似混合DNA試料を用いた。

#### 4)DNA抽出法

DNA抽出法には、食安発第0517001号記載のトウモロコシを対象としたシリカゲル膜タイプキット法及び、CTAB法の改変法を使用した。

#### 5)定性PCR条件

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）、0.16 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、0.6 μmol/L プライマー及び0.8 units Taq DNAポリメラーゼ(AmpliTaq Gold:ABI社製)になるように混合し、10 ng/μL DNA試料溶液5.0 μLを加え、全量を25 μLになるように調製した。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、サイクル条件は以下のとおりとした。94°Cで10分間加温した後、25秒間の熱変性(94°C)、30秒間のアニーリング(62°C)、45秒間の伸張反応(72°C)を1サイクルとして45回繰り返した後に、7分間の伸張反応(72°C)を行った。なお、Bt10LSをプライマー対に用いた定性PCR法においては、アニーリング温度を65°Cに変更した。

## 2. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

### 1) 試料

組換えCry1Acタンパク質には、オハイオ州立大学Donald H.博士により開発された大腸菌株を国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部にて培養し、抽出・精製して得られた標品を、同所・機能生化学部手島博士より供与して頂き用いた。精製及び未精製コメ試料は東京都内のスーパーマーケットで購入したものを十分に粉碎した後に用いた。また、組換えCry1Acタンパク質をコメ試料1gあたり0.012、0.058、0.089μgの割合で混合したスパイク試料を調製した。

### 2) Cry1Ac タンパク質を標的とするテストストリップ

Cry1Acタンパク質を標的タンパク質とするテストストリップには、Strategic Diagnostic社(SDI社)のSeed Bt1Ac Test Stripを使用した。なお、本テストストリップは抽出緩衝液付属のキットとして入手した。

### 3) Seed Bt1Ac Test Strip を用いたラテラルフロー法

Seed Bt1Ac Test Strip を用いたラテラルフロー法は以下に示す手順で行った。

コメ試料(コメ粉碎物)9gに対し、キット付属の抽出緩衝液27mLを加え、ボルテックスミキサーで十分に混合した。混合後、遠心操作により上精を分離し、分取した。分取した上精にテストストリップを浸し、10~60分間静置した。判定は、赤色の判定ラインが1本確認された場合を陰性、2本確認された場合を陽性とした。

## 3. LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良

### 1) 試料

遺伝子組換えダイズ(Roundup Ready Soy:RRS) 試料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。ダイズ擬似混合粉碎試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換えダイズ試料(米国産ダイズ)は、食品総合研究所を通じて入手した。入手した全ての試料は、500μmのスクリーンを取り付けた高速遠心式粉碎器を用いて粉碎した後に用いた。

### 2) 擬似混合粉碎試料及び標準試料

既報<sup>5),6)</sup>に従い、RRS試料を重量換算で0.0、1.0、または5.0%となるよう混合した擬似混合粉体試料を調製し、それぞれRRS0、RRS1、及びRRS5として用いた。また、RRS混入標準試料として、Institute for reference materials and measurements (IRMM)から供給されている5% RRS試料(IRMM5)を用いた。

### 3) DNA抽出法

各試料からのDNA抽出は以下のとおり行った。ポリプロピレン製遠沈管(50mL容)に量り採った0.5gの試料に対し、G2緩衝液7.5mL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7.5mL、ならびにα-アミラーゼ(1mg/mL)200μL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°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、100μLのProteinase K(20mg/mL)ならびに20μLのRNase A(100mg/mL)を加えボルテックスミ

キサーで混合し、その後、50°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°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<sup>\*1</sup>)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 µL)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 µL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。

<sup>\*1</sup>Millex-HV:PVDF(0.45mm)

#### 4)定量PCR条件

食安発第0517001号に従い、ダイズ内在性遺伝子(Lectin)及びRRS特異的DNA配列を標的とする定量系\*(Le1定量系及びRRS定量系)を用いた。反応液組成はLightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit 2 µL、プライマーとプローブ溶液の混合液8 µL(対象プライマー濃度は25 µmol/L、対象プローブ濃度は10 µmol/L)、MgCl<sub>2</sub>溶液(25mM) 2.4 µL、こ

れに10 ng/µLに濃度調製したDNA試料液を5 µL(50ng)、または標準プラスミド溶液5 µLを加え、全量を20 µLとした。

反応条件は、検討の結果、以下のとおりとした。95°Cで10分間保持した後、95°C 15秒間(1°C/秒)、59°C 30秒間(20°C/秒)を1サイクルとして50サイクルの増幅反応を行った(括弧内は標的の温度までの到達速度)。\*本報告において定量系とは、対象プライマー対と対象プローブの組み合わせをさす。

#### 5)内標比の測定

内標比の測定試験は、2機関所有の3機体を用いた共同試験として実施した。100%RRS試料から抽出したDNAを規定濃度に調製した後に分注し、RRS内標比測定用試料とした。

#### 6)混入率測定試験

規定した内標比の妥当性を検証するため、擬似混合粉碎試料(RRS1及び5)あるいはRRS混入標準試料(IRMM5)から抽出したDNAを対象に定量PCRを行い、得られた測定値及び規定した内標比を用いてRRS混入率を算出した。また、RRS5を用い、得られるRRS混入率の日差変動についても検討した。いずれの検討も特定の1機関で実施した。

#### 4. ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発

##### 1)試料

遺伝子組換えトウモロコシ(MON810並びにGA21系統)試料、遺伝子組換えダイズ(RRS)試料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。トウモロコシ擬似混合粉碎試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換えトウモロコシ試料(米国产トウモロコシ)は、米国の商事会社を通じて入手した。また、ダイズ擬似混合粉碎試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換えダイズ試料(米国产ダイズ)は、食品総合研究所を通じて入手した。入手した全ての試料は、500 µmのス

クリーンを取り付けた高速遠心式粉碎器を用いて粉碎した後に用いた。

## 2) 擬似混合粉碎試料の調製

トウモロコシ擬似混合粉碎試料：非遺伝子組換えトウモロコシ試料については粉碎後、定量PCR法を用いた分析を行い、0.4%程度の遺伝子組換えトウモロコシの混入(MON810系統)を確認した上で、マトリクス試料として用いた。マトリクス試料に対し、GA21並びにMON810試料を重量換算でそれぞれ1.0%となるよう混合した試料をMaize-Low、GA21試料を5.0%、MON810試料を1.0%となるよう混合した試料をMaize-Highとした。

ダイズ擬似混合粉碎試料：非遺伝子組換えダイズ試料については粉碎後、定量PCR法を用いた分析を行い、遺伝子組換えダイズが混入していないことを確認した上でマトリクス試料として用いた。マトリクス試料に対し、RRS試料を重量換算で1.0%あるいは5.0%となるよう混合した試料をそれぞれ低濃度試料(RRS-Low)及び高濃度試料(RRS-High)とした。

## 3) DNA抽出法

トウモロコシ試料からのDNA抽出は、食安発第0517001号記載のトウモロコシ穀粒を対象としたシリカゲル膜タイプキット法(mini法)を用いた。また、ダイズ試料からのDNA抽出は、食安発第0618001号記載のダイズ穀粒を対象としたシリカゲル膜タイプキット法を改良して用いた。

## 4) 定量PCR条件

ABI PRISM 7700を定量PCR機器として用いる場合、反応液組成を含むすべてのPCR条件は現行公定分析法(食安発第0517001号)に準拠した。

ABI PRISM 7500を定量PCR機器として用いる場合の反応液組成を含むすべてのPCR条件は、検討の結果、以下のとおりとした。反応液組成は、2×Universal Master Mix 12.5 µL、プライマー溶液とプローブ溶液の混合

液 10 µL (対象プライマーの濃度は1.25 µmol/L、対象プローブの濃度\*は0.5 µmol/L)、これに20 ng/µLに濃度を調製したDNA試料液2.5 µL、または標準プラスミドDNA溶液2.5 µLを加え、全量を25 µL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秒間、59°C 1分間を1サイクルとして45サイクルの増幅反応を行った。

定量系としては、現行公定分析法において遺伝子組換えトウモロコシを対象としたスクリーニング法に規定されているCaM定量系並びにGA21系統特異的定量系及び、遺伝子組換えダイズを対象とした定量分析法に規定されているRRS定量系の計3種を使用した。

\*35S定量系使用時には0.25 µmol/L

## 5) 内標比の測定

内標比の測定試験は3機関参加の共同試験として実施した。遺伝子組換えトウモロコシ試料(MON810並びにGA21系統)及び、遺伝子組換えダイズ試料から抽出したDNAを規定濃度に調製した後に分注し、各遺伝子組換え作物の内標比測定用試料とした。各種内標比測定用試料及びPCR試薬に加え、試験内容を規定したプロトコールと報告様式もあわせて送付し、規定期間内に報告された結果について解析した。

各機関においては、1測定あたり1試料を分析し、これを3回繰り返した(n=1、3回繰り返し測定)。1種の遺伝子組換え作物につき、1機関内で得られた3データの平均値を当該機関の機関報告値とし、これら機関報告値の中央値を対応する遺伝子組換え作物における内標比として規定した。

## 6) 混入率測定試験

規定した内標比の妥当性を検証するため、擬似混合粉碎試料から抽出したDNAを対象に定量PCRを行い、得られた測定値及び規定した内標比を用いて遺伝子組換え作物の混入率を算出した。4種の擬似混合粉碎試料(Maize-Low並びにHigh、Soy-Low並びに

High)から抽出したDNAを規定濃度に調製した後に分注し、各遺伝子組換え作物を含む擬似混入率測定用試料とした。各種擬似混入率測定用試料及び各種PCR試薬に加え、試験内容を規定したプロトコールと報告様式を特定の1機関に送付し、規定期間内に報告された結果について解析した。混入率測定試験を実施した機関においては、1測定あたり同一の3試料を併行で測定し、これを3回繰り返した(n=3、3回繰り返し測定)。1測定あたり得られた3データの平均値をその測定分の代表値とし、3測定分の代表値の平均値を対応する擬似混合粉碎試料を対象に得られた混入率とした。

#### 7) 認証値の決定とABI PRISM 7500により得られた混入率の評価

特定の1機関から報告された各種混入率について基本統計量を求め、平均値、標準偏差(SD)、相対標準偏差(RSD)を明らかにした。これらのうち平均値に関しては、以下に示す方法で決定した認証値との比較を行った。

認証値の決定にはABI PRISM 7700を定量PCR機器として用いた。食安発第0517001号記載の定量PCR条件に従い、1測定あたり同一の擬似混入率測定用試料10試料を併行で測定し、これを2回繰り返した(n=10、2回繰り返し測定)。得られた20データの平均値及びSDを求め、平均値±2SDを対応する遺伝子組換え作物を測定した場合に得られる認証値とした。

### 5. 新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良

#### 1) 試料

遺伝子組換えトウモロコシ(MON863、NK603、TC1507、T25系統)試料の100%粉碎物を内標比測定用試料とした。また、非遺伝子組換えトウモロコシ試料(米国オハイオ産)を擬似混合粉碎試料調製用のマトリ

クス試料として用いた。上記各遺伝子組換えトウモロコシ試料を重量混合比として0.25、0.5、1.0、5.0、10.0%の割合でマトリクス試料と混合し、均一性を確認した試料を擬似混合粉碎試料とした。共同試験においては、上記試料からJAS分析試験ハンドブック<sup>6)</sup>に記載のMAXI法を用いてDNAを抽出し、濃度調製した後のDNA試料を被検試料として用いた。

#### 2) 定量PCR機器

MON863、NK603、TC1507、T25系統を対象とする系統特異的な定量PCR法の適用可能機種としてABI PRISM 7700、7900(96well)、7500を選定した。

#### 3) (MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的 DNA 配列を標的とした定量系の開発

MON863、NK603、TC1507、T25系統をそれぞれ特異的に検知可能な定量系(プライマー対及びプローブ)を開発した。それぞれのプライマー対によって生じるPCR増幅産物の予定断片長は以下のとおり。MON863系統特異的プライマー対: 111 bp、NK603系統特異的プライマー対: 113 bp、TC1507系統特異的プライマー対: 111 bp、T25系統特異的プライマー対: 111 bp。各定量系が標的とするDNA配列についてFig. 16にまとめた。

#### 4) (MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的定量系の特異性検証

開発された各遺伝子組換えトウモロコシ系統特異的定量系のうち、プライマー対(MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的プライマー対)を用いた定性 PCR を行うことにより、各定量系の特異性について検証した。

#### 5) MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的定量分析用標準分質の開発

新たに開発した定量系を用いた定量PCR法を構築するため、プラスミドDNAを標準物質として開発した。当該プラスミドDNAはPUC19ベクターを基本骨格として開発し、MON863、NK603、TC1507、T25系統特異的



プライマー対を用いてPCR産物を生じるよう、鋳型DNA配列を導入した(Fig. 18)。なお、プラスミドDNAは0、20、125、15,000、20,000、250,000 コピー /reaction となるようにColE1/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/μL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 × Universal Master Mix 12.5 μL、プライマー溶液とプローブ溶液の混合液 10 μL (対象プライマーの濃度は1.25 μmol/L、対象プローブの濃度\*は0.5 μmol/L)、これに20 ng/μLに濃度を調製したDNA試料液を2.5 μL、または標準プラスミドDNA溶液2.5 μLを加え、全量を25 μL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分間を1サイクルとして40サイクル\*\*の増幅反応を行った。

\*TC1507並びにT25系統特異的定量系を用いた場合。MON863並びにNK603系統特異的定量系の場合には、0.25 μmol/Lの濃度で用いた。なお、各遺伝子組換えトウモロコシ系統特異的定量系と組み合わせて使用するトウモロコシ内在性遺伝子(SS11b)を標的とした定量系については、公定分析法に記載の反応液組成に従った。

\*\*定量PCR機器にABI PRISM 7700を用いた場合。それ以外の機器を用いた場合には、45サイクルの増幅反応を行った。

#### 7)内標比の測定及び検証試験

内標比の測定試験は、計13機関(ABI PRISM 7700:5機関、7900:5機関、7500:3機関)による共同試験として実施した。各遺伝子組換えトウモロコシ系統(MON863、NK603、TC1507、T25系統)から抽出したDNAを規定濃度に調製した後に分注し、内標比測定用試料とした。

各機関において得られた測定値を集計し、統計解析処理後に決定された内標比の妥当性を検証することを目的に、擬似混合粉砕試料から抽出したDNAを盲検試料として調製し、これを被検試料とした共同試験を実施した。本共同試験には、国内外併せて計34機関(ABI PRISM 7700:16機関、7900:15機関、7500:3機関)が参加した。

#### 8)共同試験計画及び統計解析手法

盲検試料の調製、参加機関数の設定を含む共同試験計画及び、共同試験結果の解析に使用した統計解析手法の選択は、AOAC インターナショナルにより報告されている共同試験ガイドライン<sup>7)</sup>に従った。

#### 6. シリカベースレジソタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良

##### 1)試料

非遺伝子組換えダイズ試料として国内産ダイズ(品種:ムラユタカ)を用いた。ダイズ試料は粉砕機を用いて粉砕し、粉体試料として用いた。

##### 2)DNA抽出法

現行公定分析法(食安発第 0517001 号)において、ダイズ穀粒を対象としたDNA抽出法として規定されているシリカベースレジソタイプキット法を基本とし、Proteinase K添加量、抽出操作時間、カラムからのDNA溶出に要するTE緩衝液量について検討した。

#### C.研究結果及び考察

##### 1. 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした検知技術の開発

##### 1)Bt10系統特異的プライマー対(JSFR3)並びにBt11構造特異的プライマー対(Bt11-3-5'-3')を用いた定性PCR法のインハウス試験及び多機関検証

Bt10系統を検知対象とした検査体制の構築が急務とされたことから、当時入手可能であったBt10系統特異的プライマー対(JSFR3)並びにBt11構造特異的プライマー対(Bt11-3-5'-3')を用いた定性PCR法を開発し、

インハウス試験及び、多機関参加の共同試験によってその特異性と頑健性について検証した。

その結果、Fig.1に示したとおり、JSFR3を用いた場合、予定増幅断片長以外のPCR産物(エクストラバンド)が多数観察されるものの、予定増幅断片長(130 bp)のPCR産物はBt10系統に特異的に観察されることが明らかになった。また、Bt11-3-5'-3'を用いた場合、Bt10系統とBt11系統に共通に存在する構造遺伝子領域をPCRの標的DNA配列としていることから、両系統からともに予定断片長(127 bp)のPCR産物が得られた(Fig.2)。これらの結果から、JSFR3によりBt10系統のみを特異的に検知することが可能であり、Bt11-3-5'-3'によりBt10系統とBt11系統を区別することはできないものの、標的とした構造遺伝子領域を特異的に検知することが可能であることが示唆された。

ついで、検討当時入手可能であった試料がDNA試料のみであったため、これを用いて擬似混合DNA試料(0.05、0.01、0.10%:DNA質量比)を調製し、検知感度についてインハウス試験により検証した。その結果、各濃度あたり併行で試験した10試料のうち、濃度が0.01%の試料に関してのみ、JSFR3並びにBt11-3-5'-3'のいずれを用いた場合にも特異的PCR産物を得ることができない試料があることが明らかになった(Fig.3並びに4)。これらインハウス試験の結果から、JSFR3およびBt11-3-5'-3'の検知感度は同等と判断可能であり、その濃度はDNA質量換算で0.05%であることが示唆された。

インハウス試験によって得られた結果に基づき、共同試験による頑健性の確認試験を計画し、実施した。本共同試験には6機関の試験検査機関が参加した。報告された全試験データの一例として、1機関から報告された電気泳動像をFig.5に示す。Fig.5に明らかなおと、当該機関においてもインハウス試験に依って得られた結果と矛盾のない

結果が得られていると判断された。最終的に全6機関から報告された結果についてTable1にまとめた。これらインハウス試験及び共同試験の結果に基づいた検査法を作成し、当該検査方法は食安発第0517001号として通知された。

## 2)Bt10系統特異的DNA配列情報の取得とそれに基づく新規Bt10系統特異的検知技術の開発

先述の食安発第0517001号において通知された検査方法では、JSFR3を用いた定性PCR法を1次検査、Bt11-3-5'-3'を用いた定性PCR法を1次検査で得られた結果を確認するための2次検査として実施することが規定されている。しかし、先述のとおり、Bt11-3-5'-3'がBt11系統とBt10系統の両系統に共通して存在する構造遺伝子領域を標的DNA配列としていることから、これらを区別することはできず、Bt10系統検知の結果を正しく確認するためには、新たな検知技術の開発が必要であった。そこで、その後入手されたBt10系統の粉碎試料からDNAを抽出し、TAIL PCR法等の手法を用いてBt10系統特異的DNA配列情報の取得を試みた。TAIL PCR法の原理をFig.6に示した。これらの検討により得られたBt10系統特異的DNA配列の情報に基づき、Bt10系統特異的プライマー対(Bt10 LS)の設計を行った。PCR反応液組成、PCR条件の検討を行った後、決定された条件に基づいて実施した特異性確認試験の結果をFig.7に示した。この結果により、Bt10 LSをプライマー対とする定性PCR法を用いることで、Bt10系統のみを特異的に検知可能であることが示された。さらに、先の共同試験に用いた試料と同一の擬似DNA混合試料を用い、検知感度について検証した結果、Bt10 LSを用いた定性PCR法の検知感度は0.05%であることが確認された(Fig.8)。これらの結果から、Bt10 LSを用いた定性PCR法は、先に検討されたJSFR3並びに、Bt11-3-5'-3'を用いた定性PCR法と

同等の能力を有していることが示唆される。

一方で、エクストラバンドが多数観察されたJSFR3を用いた定性PCRの改良法として、新たなプライマー対(JSFR5)を用いた定性PCR法が、開発企業であるシンジェンタ社から報告された。このため、JSFR5及びBt10 LSを用いた定性PCR法により新たな検査体制を構築することを目的に、JSFR5を用いた定性PCR法についてもその特異性及び検知感度について検討した。その結果、JSFR5を用いた定性PCR法においては、エクストラバンドを増幅することなくBt10系統を特異的に検知することが可能であり(Fig.9)、その検知感度は0.05%(DNA質量換算)であることが示唆された(Fig.10)。

今後、Bt10 LS及びJSFR5を用いた定性PCR法について、多機関参加の共同試験により頑健性を確認する必要があると考える。また、その際には、擬似混合粉碎試料を被検試料として配布することにより、DNA抽出法も含めた検知感度として検証すべきである。

## 2. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

### 1)ラテラルフロー法を用いた組換えCry1Acタンパク質の検知

検知技術開発の対象である遺伝子組換えコメ(Btコメ)の標準試料が入手できず、また詳細な情報も得られない状況において、Cry1Acタンパク質が発現している旨の情報を支持するのであれば、これを標的としたラテラルフロー法の適用可能性を検証することは有効な手段であると考え。まず、本検討に用いた組換えCry1Acタンパク質(rCry1Ac)がラテラルフロー法によって検知可能かについて確認した。Fig.11に示したとおり、大腸菌からゲル濾過精製されたrCry1Acタンパク質をSDS-PAGE法によって分離した結果、単一のバンドが確認されたことから、十分に精製された単一タンパク質が得られていることが示唆された。つい

で精製rCry1Acタンパク質をPBS緩衝液によって種々の濃度に希釈した後、ラテラルフロー法に使用するSeed Bt1Ac Test Stripを用いて検知を試みた結果、明確にCry1Acタンパク質の存在を示す結果が得られ、その検出限界は0.01 µg/mLであった(図は示していない)。

### 2)ラテラルフロー法を用いたコメ中Cry1Acタンパク質の検知

rCry1Acタンパク質がSeed Bt1Ac Test Stripによって検知可能であったことから、次に、コメ試料にrCry1Acタンパク質を添加し、マトリクスの影響について検討した。まず、流通が考えられるコメのうち未精製コメについて検討した。その結果、未精製コメ中に混入した場合であってもCry1Acタンパク質の検知が可能であり、その感度は0.012µg/g(rCry1Ac タンパク質重量/コメ重量)であった(Fig.12)。次に、精製コメについても同様の検討を行った結果、未精製コメと同様の結果を得た(Fig.13)。テストストリップを試験液に浸潤させる時間については、未精製及び精製コメともに20分以上(60分以下)が適当であると考えられた。

本検討の結果から、コメにCry1Acが含まれていた場合、Seed Bt1Ac Test Stripによる検知が可能であることが強く示唆されたため、食安輸発第0421002号(平成17年4月21日)<sup>8)</sup>によって、中国産コメを対象とした安全性未審査Btコメのスクリーニング検査法が示された。なお、本研究において検討したラテラルフロー法のより実際的な実効性について検証するためには、コメ中でCry1Acタンパク質を発現した場合の抗原性の変化、またコメ細胞中で発現しているCry1Acタンパク質の抽出効率について、標準試料を用いて検討すべきであると考え。

## 3. LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良

### 1)定量PCR条件の最適化

定量PCRの一般において、PCR条件が最適

化されていない場合、PCR産物が指数関数的に増幅せず、これにともなって蛍光シグナル量の増加が不安定になる。また、遺伝子組換え作物を対象とした定量PCR法においては、キャリブレーションスタンダードとして用いるプラスミドDNAから生じる蛍光シグナル量を指標に、未知試料DNA(ゲノミックDNA)から得られたシグナル量を初期鋳型DNA量(コピー数)に変換する。このため、PCR産物が指数関数的に増幅するように反応条件が最適化されていることと、ゲノミックDNAとプラスミドDNAをそれぞれ鋳型DNAとした場合のPCR効率が一致していることが、正確なコピー数の計測、ひいては混入率の算出に重要である。

PCR条件の最適化を目的に、標的溫度到達速度を含めて検討した結果、Fig.14 に示したとおり、ゲノミックDNA及びプラスミドDNAのそれぞれを鋳型にした場合に、良好にPCR産物が増加する条件が見出された。また、ゲノミックDNA及びプラスミドDNAを用いて得られる検量線について比較した結果、非常に高い相関を示すことが明らかになった(Fig.15、Table2)。ついで、決定したPCR条件を用いて、ゲノミックDNAとプラスミドDNAのそれぞれを鋳型に用いた場合のPCR効率について比較した。その結果、Le1定量系を用いた場合のPCR効率は、標準プラスミドにおいて1.964、ゲノミックDNAにおいて1.953であった。また、RRS定量系を用いた場合のPCR効率は、標準プラスミドにおいて1.980、ゲノミックDNAにおいて1.996であった(Table3)。得られたPCR効率について、標準プラスミドとゲノミックDNAを水準として統計的に解析した結果、有意な差は認められなかった。これらの結果から、遺伝子組換えダイズを正確に定量分析するために必要とされる定量PCR条件が確立されたものと判断した。

## 2)内標比測定試験

定量PCR法においては、内標比とよばれ

る係数を用いて混入率を算出する。内標比とは、純粋種子における内在性遺伝子と遺伝子組換え作物特異的配列の比である。内標比は、各遺伝子組換え食品の系統に固有の係数であり、理論的には、その遺伝的組成が同一であれば普遍である。遺伝子組換えダイズ(RRS)においては、RRS特異的配列がハプロイドゲノムあたり1コピー存在していることが明らかにされており、また、標的としている内在性遺伝子(*Lectin*)がsingle copy geneであるため、理論的に推測される内標比は1となる。しかしながら、使用する定量系の特性により若干の変動が観察される場合があるため、現行定量分析法においては、実測値を内標比として使用している。

共同試験として実施した内標比測定試験の結果、2機関所有の3機体のLightCycler systemを用いて測定されたRRS内標比は0.83(室間再現性;RSD<sub>R</sub>は5.5%)であった。

## 3)混入率測定試験

共同試験によって測定されたRRS内標比(0.83)の妥当性を評価するため、既報に基づき調製した擬似混合粉体試料(RRS1並びにRRS5)及び、RRS混入標準試料(IRMM5)を対象としたRRS混入率測定試験を実施した。その結果、1%RRS含有試料であるRRS1を対象とした場合には0.86%、5%RRS含有試料であるRRS5を対象とした場合には4.74%の混入率が算出された。また、5%のRRSを含有する標準試料(IRMM5)を対象とした場合には、4.62%の混入率が算出された。抽出間差も含む全試料を通じての室内再現性(RSD<sub>r</sub>)は最大で22.8%、最小で7.00%であった(Table4)。さらに、RRS5を用いて抽出間差を含む混入率の日差変動について検討した結果、3日間を通じ各日に得られた混入率は4.35~4.95%、各日のRSD<sub>r</sub>は2.01~4.51%であり、日差の影響を受けず良好な分析が可能であることが示唆された(Table5)。これらの結果から、共同試験によって