

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。

組換え大豆の場合は実験操作上、大豆のRNA抽出にあたって、検体大豆を -80°C の冷凍庫から取り出して瞬時に抽出用の緩衝液中で破碎しないとRNAが分解されて発現解析が困難になるため、転写産物の分析にはDNA、タンパク質の扱いと比較して迅速に行なう必要があった。大豆のDNAチップで転写産物の発現が確認された遺伝子は調べたうちの約1/3ではあるが、同一品種を用いた今回の実験でも8-12%程度は有意に2倍以上(あるいは1/2以下)の発現変動が見られたが、これらの遺伝子群には共通の特徴が見あたらないため、遺伝子発現には全体的なばらつきがあるものと考えられた。

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。

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、遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズについて、二次元電気泳動法を利用したプロテオーム解析により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。

B. 研究方法

<試料>

遺伝子組換えダイズ種子は、国立医薬品食品衛生研究所より供与して頂いた。

<方法>

タンパク質抽出

乳鉢ですりつぶした乾燥種子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, 2% IPG buffer（Amersham Pharmacia Biotech）、または 8M Urea, 4% (W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl）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20-80%飽和硫酸で硫酸塩析した後、泳動バッファーに懸濁し電気泳動に供した。または、2-D Clean-Up Kitを用いて調製したサンプルを限外濾過膜（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 pH3-10 または pH3-10NL（Amersham Pharmacia Biotech）をサンプルおよび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。

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

<サンプル調製および二次元電気泳動条件の検討>

Immobiline DryStrip pH3-10を1次元目の展開に用いた2次元電気泳動では、タンパク質のスポットが多数存在する領域での展開幅が少なく、十分にタンパク質を展開できていなかった。また、低分子領域において銀染色にポジティブな夾雑物が認められた。そこで、Immobiline DryStrip pH3-10NLを用いてタンパク質のスポットが多数存在する領域での分離幅が広がるようにし、さらに低分子領域の夾雑物を除くために、硫酸塩析または限外濾過膜による電気泳動用サンプルの精製を行った。硫酸塩析での精製の場合は、高分子側のタンパク質のスポットが鮮明ではなく、全体として解像度が低い泳動像であることに比べ、限外濾過膜を用いて精製したサンプルでは、全体的に解像度の高い泳

動像が得られた。このことから、2-D Clean-Up Kit および限外濾過膜を利用してサンプルを精製することでプロテオーム解析に適した電気泳動像が得られると考えられる。

<非遺伝子組換えダイズを用いた品種間差の検討>

国産非遺伝子組換えダイズ(フクユタカ、ムラユタカ)とアメリカ産非組換えダイズ(ビントン、ビーソン)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。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。また、スポット数の最も少ないムラユタカ(569個)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。また、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。

<遺伝子組換えダイズおよび非遺伝子組換えダイズのプロファイルの比較検討> 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。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。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、小関良宏「遺伝子組換え食品における NPTII 発現産物の ELISA 法による検知」日本食品化学学会第 9 回学術大会、東京、2003 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」日本食品化学学会第 10 回学術大会、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 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)

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、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、それぞれのメタボロームを比較した。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。すなわち、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。平成 17 年度には、本メタボロミクス手法によって、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。その結果、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。

査において、導入遺伝子の塩基配列が検

協力研究者

太田大策(大阪府立大学農学部)

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

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

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>

メタボロミクス研究のための基礎データ取得のため、ペチュニア花卉成分の分析を行った。輸入ダイズは、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。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。さらに、無作為に選別した組換え体ダイズ種子と非組換えダイズ種子についてもメタボローム解析に供試した。

<方法>

ペチュニア花卉化合物の一斉分析

大阪府立大学実験圃場にて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% ギ酸 / 50% メタノール / 水)に 1000 倍希釈した。

ダイズ種子に含まれる化合物の一斉分析

ダイズ種子成分のメタボローム解析に着手するため、非組換えダイズ品種(フクユタカ、ムラユタカ、Benson、Binton) 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。また、遺伝子組み換えダイズと非組換えダイズの成分比較においては、試料供給が極めて限定されていたため、種子1粒ずつを独立して抽出操作に供し、それぞれの成分を比較することとした。ダイズ種子は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_4OH 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。

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 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のとおりである。

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 50~100 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(~100 回分析 x ~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

ペチュニア花卉メタボロームの一斉解析

ペチュニア花卉を色によって分別し、FT-ICRMS を用いて化合物の一斉解析を行った。その結果、各サンプルの分析スペクトルから、約 600 のピークが検出された。それぞれの試料を連続して分析し 50 の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、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。この結果は、ペチュニア花卉のメタボローム(代謝産物の種類と存在量)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、メタボローム全般においても組成と含量が異なることを示唆している。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。本法を基礎として、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、例えばダイズ種子での代謝産物組成の違いを解析するメタボロミクス実験が可能であることが示された。

ダイズのメタボロームの一斉解析

ペチュニア花卉を供試して行った FT-ICRMS 分析によるメタボロミクス実験が、ダイズ種子成分の分析に適用可能であるかどうかを確認するため、ダイズ種子のメタノール抽出物を、正イオンモードと負イオンモードにて FT-ICRMS 分析に供試した。フクユタカ、ムラユタカ、Benson、および Binton 各品種から 10 粒ずつ 5 回をサンプリングし、それぞれの品種間のメタボロームを比較した。FT-ICRMS 分析の後、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ところ、正イオンモード分析においても負イオンモード分析においても、第一主成分の寄与率だけでそれぞれメタボロームクラスター形成の 91.9%と 96.9%を説明していた。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の寄与率は全体の約 3.2%であったが、米国産ダイズ種子が形成するメタボロームクラスターと国内産ダイズ種子メタボロームクラスターの比較では、米国産ダイズ種子成分がより変動しやすい傾向にあることを示していた。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。

引き続き、遺伝子組換えダイズと非組換えダイズ種子成分を比較するため、メタボロミクス実験を行なった。遺伝子組み換えダイズ種子は 30 検体、非組換えダイズ種子は 4 検体をそれぞれ液体窒素で凍結し磨砕した後、メタノールにて抽出し、フィルター濾過した。得られた粗抽出液を溶媒(0.1% 蟻酸 / 50% メタノール / 水)に 1000 倍希釈し FT-ICRMS 分析に供試した。得られた質量分析データを独自に開発したメタボロミクス計算アルゴリズムによって処理し多変量解

析を行った。主成分分析の結果、ダイズ種子成分のメタボロームクラスターは、組換え体と非組換え体の差別化するものではなかった。正イオンモードと負イオンモードの両方において、同様の結果が得られた。これらの結果は、本実験条件下では、組換え体ダイズ種子と非組換え体ダイズ種子成分には、顕著な差がないことを示している。

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となった。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、供試した試料間で異なるメタボロームクラスター形成が認められるならば、その変異メタボローム形成に寄与する代謝成分の同定も可能である。

研究要旨

- (1) 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発並びに共同試験による標準化
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分析法を開発し、多機関参加の共同試験により標準化を検討した。
- (2) 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発並びに一試験室内検証
上記遺伝子組換えジャガイモを対象とした定量分析法を開発し、その妥当性について一試験室内での検証試験を実施した。
- (3) 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知技術の開発
遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種の試料への混入を想定し、粒数に基づき遺伝子組換えトウモロコシ混入率を評価するための検知技術として、1)1粒毎の試料調製法、2)DNA抽出法、3)遺伝子組換えトウモロコシ粒の判別法、また、4)スタック品種の同定法を開発した。さらに、開発された検知技術を用いてモニタリング調査研究を実施した。
- (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開発されている6系統の遺伝子組換え作物を対象に、より簡便かつ安価にスクリーニング試験を実施可能とするため、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した。
- (5) 定量PCR法の加工食品適用可能性検証法の検討
加熱等の加工を受けた食品においては直接の分析対象であるDNAの変質により、真値を求めることが難しいと考えられるため、定量PCR法の適用可能試料は穀粒に限定されている。しかし、DNAに対する加工影響を科学的に評価した例はない。そこで、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を明らかにするための検証法について検討した。
- (6) 遺伝子組換え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
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。また得られた結果に基づき、加工影響の大きさを推定し、これを用いた算術式により混入率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。
- (7) 各種定量PCR機器により得られる分析結果の同等性評価
定量PCR法の適用可能機種であるABI PRISM 7700、7900(96ならびに384 well)、7000、5700を用いて得られる混入率の同等性について明らかにするため、共通試料を用いた一試験室内検証を行った。
- (8) 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性分析法の開発
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)を対象とした定性PCR法を開発し、共同試験により標準化について検討した。

(9)安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした定性分析法の検討

安全性未審査遺伝子組換えコメが流通していた旨の情報が得られたことから、当該情報に基づき、Cry1Acタンパク質を標的タンパクとするラテラルフロー法のコメへの適用可能性について検討した。

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

LightCycler systemを定量PCR機器として使用する遺伝子組換えダイズを対象とした定量PCR法について、分析結果の安定性向上を目的に改良を検討した。

(11)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

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。

(12)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及び、TC1507系統の3系統に、改良が必要とされたT25系統を含めた計4系統を対象とする定量PCR法を開発し、共同試験により標準化について検討した。

(13)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

現行公定分析法に記載されたシリカベースレジソ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。

協力研究者

穂山浩、渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所）、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）、小関良宏（東京農工大学）、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）、吉村倫彰（アサヒビール(株)）、加藤久（昭和産業(株)）、中出晋介、安井修二（(株)安井器械）、峯岸泰孝（(株)ニッポン）、小笠原健、荒川史博（三栄源エフ・エフ・アイ(株)）

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並びに共同試験による標準化

平成18年現在、NewLeaf (NL) 2系統 (Bt-6並びに SPBT02-05 系統)、NewLeaf Plus (NLP) 3系統 (RBMT21-350、RBMT22-82並びに RBMT21-129)及び、NewLeaf Y (NLY) 3系統 (RBMT15-101、SEMT15-02並びに SEMT15-15)、計8系統の遺伝子組換えジャガ

イモが安全性審査を終了しており、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、定性分析法の開発を検討した。さらに、開発された分析法の妥当性について、多機関参加の共同試験により評価した。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発並びに一試験室内検証

前述のとおり、8系統の遺伝子組換えジャガイモが流通可能な状態にある。そこで、スクリーニング分析法も併せ、遺伝子組換えジャガイモを対象とした定量分析を可能とすることを目的に、定量PCR法の開発について検討した。具体的には、ジャガイモを対象としたDNA抽出法、遺伝子組換えジャガイモを特異的に検知可能な定量系(対象プライマー対並びにプローブ)、キャリブレーションスタンダードとして使用する標準物質(プラスミドDNA)の開発、最適PCR条件の確立等を目的とした。さらに、開発

された定量分析法の標準化を目的に、妥当性について一試験室内試験により検証した。

3. 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知技術の開発

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18年現在、13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。スタック品種は親系統と同一の組換えDNA配列を有するため、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、特定の組換え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種の組換え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、迅速かつ簡便に1粒毎の分析を可能とすることを目的に、試料調製法、DNA抽出法及び、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した。さらに、平成16年に輸入されたトウモロコシを検体とし、開発された分析法を用いたモニタリング調査を実施した。

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及びダイズを対象とした定量分析法として、定量PCR法が公定分析法に採用されている。本定量PCR法に使用する機器(定量PCR機器)が高額であることから、実験環境の整備に一定の初期費用が必要であることに加え、使用試薬も比較的高額であるため、分析に要する費用が高額になることが指摘されている。このため、定量PCR機器を必要とせず、比較的安価な試薬を用いた簡便なスクリーニング定量分析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技術の開発を試みた。

5. 定量PCR法の加工食品適用可能性検証法の検討

定量PCR法については、その適用可能範囲がダイズ並びにトウモロコシ穀粒及び、その半加工品に限定されている。これは、加工処理の種類によっては、直接の分析対象であるDNAが大きく変質し、信頼性の高い混入率を算出することが難しいためである。しかし、DNAに対する加工影響について科学的な評価を行った例はない。そこで、定量PCR法の加工食品への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モデル加工食品を作成し、検討を行った。得られた混入率について加工原材料から得られた混入率と比較することにより、加工影響の大きさを評価した。

6. 遺伝子組換え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

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PCR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。そこで、2種のダイズ内在性遺伝子(HMG遺伝子並びにLectin遺伝子)に加え、遺伝子組換

えダイズ特異的組換えDNA配列についても検討項目とし、新規定量系の開発及び、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、加工影響の大きさ(DNAの変質の大きさ)を推定し、算術的に遺伝子組換えダイズ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。

7. 各種定量PCR機器により得られる分析結果の同等性評価

遺伝子組換え作物を対象とした定量PCR法の適用可能機種として、ABI PRISM 7700、7900(96並びに384 well)、7000、5700及び、LightCycler systemが公定分析法に記載されている。これら機器を用いた個別の分析法については、多機関検証によりその妥当性が検証されてきたが、機種間差について比較した場合、それぞれから得られる混入率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。本研究においては、各定量PCR機種により得られる混入率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、得られた混入率の比較検証を行った。

8. 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性分析法の開発

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一の構成をもつ一連の DNA 配列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。しかし、Bt10 系統としての安全性が確認されていないため、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。そこで、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 法の開発について検討した。

9. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした定性分析法の検討

2005年4月13日、環境保護団体の報告により、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可能性が示された。本報告を支持すれば、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ものと考えられた。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、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。

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

先述のとおり、LightCycler systemは現行公定分析法において定量PCR法の適用可能機種の一つとされているが、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、当該機種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。さらにその原因として、機器固体の精度差及び、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。そこで、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。

11. 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

定量PCR法に適用可能な定量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、今後当機種に代わる安価な定量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。

12. 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。

13. 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並びに共同試験による標準化

ジャガイモの内在性遺伝子としてUDP-glucose pyrophosphorylase(UGPase)を選定し、同遺伝子を標的としたプライマー対としてUGPase 01-5'-3'を設計した。安全性審査を終了した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、CryIIIAを標的としたプライマー対(CryIIIA 01-5'-3')を設計した。NL 2系統を検知するためのプライマー対としては、NL 01-5'-3'を設計した。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、NLP 01-5'-3'及び、NLY 01-5'-3'を設計した。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'-3':SEMT15-15系統特異的)、(NLY02-01-5'-3':SEMT15-02系統特異的)及び、(NLY101-01-5'-3':SEMT15-101系統特異的)を設計した。

上記各プライマー対を用いた定性PCR法について検討し、すべての方法において目

的に合致したPCR増幅産物が特異的に得られることを確認した。さらに、6機関が参加した共同試験の結果からは、良好な室内再現性が示されており、本定性PCR法の妥当性が確認されたものと判断された。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発並びに一試験室内検証

未加工ジャガイモを対象とし、Cetyltrimethylammoniumbromide(CTAB)抽出液を用いたDNA抽出法を開発した。本DNA抽出法について検討した結果、対象とするジャガイモ品種が異なる場合にも安定した収量のDNAを抽出することが可能であり、また、その質についても精製度の高いDNAの基準として考えられているO.D. 260/280並びに、260/280比が良好な値を示すことが明らかにされた。また、遺伝子組換えジャガイモ定量分析用準分子(プラスミドDNA)としてPMuLNL3.1を開発し、キャリブレーションスタンダードとした。

前述のDNA抽出法を用いて各種遺伝子組換えジャガイモ系統から抽出したDNA試料を対象に、内標比を測定した。ついで、得られた内標比の妥当性を検証するため、各遺伝子組換えジャガイモ系統を含む疑似混入粉体試料を対象とした混入率算出試験を行った。解析の結果、検証を行った全ての遺伝子組換えジャガイモ系統と定量系の組み合わせにおいて、混入率が真値(重量混合比)に比べ低値で算出される傾向が認められたが、室内再現性(RSD_r)は十分に良好であることが明らかになった。これらのことから、準用に当たっては注意が必要であるが、遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の妥当性は確認されたものと判断された。

3. 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知技術の開発

現行公定分析法に記載の定量PCR法を用い、全180粒のトウモロコシ穀粒中に9粒のMON810あるいは、GA21穀粒を含む試料、MON810並びにGA21穀粒を9粒ずつ、計18

粒を含む試料、さらにMON810とGA21とを交配して作出されたスタック品種(MON810 x GA21)の穀粒9粒を含む試料の計4種を対象とした混入率測定試験を実施した結果、スタック品種を9粒含む試料から算出された混入率は、MON810並びにGA21穀粒を9粒ずつ含む試料から算出された混入率を上回り、約15%と計算された。この結果により、スタック品種が混入した試料を対象に、現行の定量PCR法を用いて分析を行った場合、単位重量を基準とした混入率としては過剰評価されることが初めて示された。

1粒毎多粒同時試料調製法並びに、DNA抽出法について検討を行った。その結果、非遺伝子組換えトウモロコシ、遺伝子組換えトウモロコシ(MON810及びGA21系統)、スタック品種(MON810 x GA21)の如何を問わず、精製度の高いDNAを安定した量で抽出可能な方法が開発された。

遺伝子組換えトウモロコシの簡便なスクリーニング試験法として、multiplex real-time PCR法について検討を行い、35S promoter配列、GA21系統特異的DNA配列及び、トウモロコシの内在性遺伝子である*SSI1b*遺伝子を同時に検知可能なmultiplex real-time PCR法を開発した。確立したmultiplex real-time PCR法を用い、前述のDNA抽出法により調製したDNA試料を対象とした試験を行った結果、*SSI1b*遺伝子由来の蛍光シグナルは、非遺伝子組換えトウモロコシを含む全検体から、また遺伝子組換えトウモロコシに特異的な35S promoter配列あるいはGA21特異的配列由来の蛍光シグナルは、MON810、GA21系統及び、スタック品種のみから特異的に得られた。これらの結果から、本法を用いることにより、遺伝子組換えトウモロコシをより簡便、かつ迅速に判別可能となると考えられた。

さらに、スタック品種の同定分析法として、遺伝子組換えトウモロコシ 8 系統を対象とした multiplex 定性 PCR 法を開発した。

平成16年当時に入手可能であった通常の遺伝子組換えトウモロコシ系統及び、スタック品種を試料として用い検討した結果、本法により互いを明確に区別することが可能であった。これらの結果から、平成16年までに安全性審査を終了しており、かつ栽培実績のある遺伝子組換えトウモロコシについては、スタック品種を含めた同定が可能になるものと考えられた。

開発された分析法を用い、不分別トウモロコシ検体を対象としたモニタリング調査を行った結果、試験した180粒のうち100粒以上が遺伝子組換えトウモロコシであった検体も含まれており、この検体について粒換算の混入率を算出した結果、62.22%の値が得られた。

4. 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発

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。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、混入する遺伝子組換え作物の量が様々であることから、競合させるプラスミドDNAの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

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PCR法の加工食品適用可能性検証法の検討

定量PCR法を用いて遺伝子組換え作物の定量分析を行うに当たり、加工処理が混入率に与える影響の大きさについて検討した。その結果、モデル加工食品として調製した豆腐、豆乳においては、1及び、5%RRS混入加工食品共に加工原材料とほぼ同等の混入率を算出することが可能であった。しかし、煮豆においてはDNAの変質が原因と考えられる混入率の大きな変動が観察された。これらの結果から、現行公定分析法に記載の定量PCR法用い、豆腐、豆乳を対象に分析を行った場合には、信頼性の高い混入率を算出することが可能であることが示唆された一方で、煮豆を対象として得られる混入率は、信頼性が低いものと考えられた。

トウモロコシモデル加工食品として、コーンスターチ、コーンパフ及び、コーンチップを調製し検討した結果、いずれのトウモロコシ加工食品においても、穀粒を対象とする方法によってDNAを抽出することができず、DNAの変質が著しい事が示唆された。定量分析の結果としては、コーンスターチについては加工原材料と同等の混入率を算出することが可能であったが、残り2品目においては内在性遺伝子、組換え作物特異的標的DNA配列のコピー数共に加工により大きく変化、減少しており、算出された混入率についても加工原材料から得られるものとは大きく異なっていた。これらのことから、コーンスターチを対象とした定量分析は可能であるが、コーンパフ、チップを対象とした分析は不可能であることが示唆された。また、コーンスターチについても、製造工程によりDNAが残存しにくいものがあることが知られており、定量分析を行う場合には、それらの情報を考慮した慎重な取り組みが必要と考えられた。

6. 遺伝子組換え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

新たに開発した定量系を含む計6種の定量系及び、加工食品定量用標準分質(プラスミドDNA: PMulSLH)を用いて検討を行った。1あるいは5%のRRSを含有する疑似混入粉碎試料から得られた測定値及び、決定した内標比を用いて混入率を算出した結果、重量混合比を真値とした場合、biasが25%未満の真度で混入率が算出された。この結果から、決定された内標比の妥当性が確認された。

開発された方法が、未加工原材料粉に含有されるRRS量を精度良く定量可能であることが確認されたことを踏まえ、次に、加工処理による測定コピー数への影響について検討した。その結果、各定量系を用いて測定されるコピー数は、加工処理時間依存的かつ対数的に減少することが明らかとなった。また、加工処理方法によってコピー数の減少率が明らかに異なっており、加工処理条件により測定対象であるDNAが受ける影響が異なることを示唆していると考えられた。さらに、標的とするDNA配列の長さ、加工処理による測定コピー数の減少との相関について検討した結果、1種類の遺伝子を標的遺伝子として複数の定量系を開発した場合、より短いDNA配列を標的配列とする事により、加工処理による影響を受けにくい定量系が開発される可能性が示唆された。

先述の通り、各定量系を用いて測定されたコピー数が、加工処理時間依存的かつ、対数的に減少していることが明らかとなったことから、その反応様式は一次反応であると考えられた。そこで、定量系毎に得られたコピー数をy軸、加工処理時間をx軸にプロットし、指数近似曲線を作成すると、 $y=ae^{-kx}$ の一般式で表すことのできる数式が得られた。この式において、yはある時点におけるコピー数、aは初期コピー数(加工処理

時間0分におけるコピー数)、kは反応速度定数、xは加工処理時間を表す。また、各定量系に対して作成された一次反応式を比較すると、反応速度定数は基本的に、各定量系及び、加工処理条件に固有の値であり、試料に含まれているRRSの量には依らず、一定であることが明らかになった。さらに、内在性遺伝子を標的とする定量系と、RRS特異的DNA配列を標的とする定量系とを組み合わせる場合には、反応速度定数の値がより近い2定量系を組み合わせることが、加工食品中の遺伝子組換え作物混入率を正確に定量するために重要であることが示唆された。

また一方で、内在性遺伝子を標的とした異なる定量系を組み合わせ、それらから得られるコピー数の比を求めることで、加工処理時間を推定できるのではないかと考え、検討を行った。その結果、いずれの定量系を組み合わせても検討した場合にも、コピー数比は、処理時間と良好な相関を保ちながら変動していることが明らかになった。また、先述のとおり、モデル加工食品におけるコピー数の減少が一時反応であることに基づき、加工食品における遺伝子組換えダイズ混入率算出のための解析方法を構築した。

7. 各種定量PCR機器により得られる分析結果の同等性評価

定量PCR法の適用可能機種のうち、ABI PRISM 7700、7900 (96 並びに384 well)、7000、5700を用いて得られる混入率の同等性について検証するため、定量分析の対象とされている遺伝子組換え作物を0.1、0.5、5、10% (w/w)の割合でそれぞれ含有する疑似混入粉碎試料を共通の試料として用い、得られた混入率の比較検討を行った。比較検討は、これまでの検討において最も信頼性の高い機種として判断されたABI PRISM 7700を用いて得られた混入率に対し、他の機種で得られた混入率を比較するという方法で行っ

た。その結果、特定の遺伝子組換え作物については、重量混合比を真値とした場合、真値に比べて、高めあるいは低めの混入率が得られる傾向が認められたが、機種の異なりによる有意な差は認められなかった。これらの結果から、上記混入率を与える作物・系統については内標比の見直しが必要である可能性が示唆されたが、異なる機種を用いた場合にも同一の試料を対象とした場合には、同等と判断される混入率を求めることが可能であることが明らかになった。

8. 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性分析法の開発

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、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。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、擬似混合DNA試料(0.05、0.01、0.10%:DNA質量比)を用いて検知感度についてインハウス試験により検証した。その結果から、JSFR3及び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。さらに6機関参加の共同試験により、インハウス試験結果の検証を行い、それら結果に基づき作成した検査法が食安発第0517001号として通知された。

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、Bt10系統特異的プライマー対(Bt10 LS)の設計を行った。Bt10 LSを用いた定性PCR法はBt10系統のみを特異的に検知可能であり、その検知感度はDNA重量換算で0.05%であることが明らかにされた。

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、JSFR 5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、その検知感度は0.05%(DNA重量換算)であることが示唆された。

9. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした定性分析法の検討

安全性未審査遺伝子組換えコメ中で発現しているタンパク質がCry1Acであると予測されたため、同タンパク質を標的タンパク質としたラテラルフロー法のコメへの適用可否について検討した。

大腸菌からゲル濾過精製された組換えCry1Ac(rCry1Ac)タンパク質を対象に、ラテラルフロー法に使用するSeed Bt1Ac Test Stripを用

いた検知を試みた結果、明確にrCry1Ac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。

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、マトリクスの影響について検討した結果、未精製、精製コメの両方においてrCry1Ac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。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)によって、中国産コメを対象とした安全性未審査遺伝子組換えコメのスクリーニング検査法が示された。

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

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、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。同条件を規定し実施した共同試験の結果、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_Rは5.5%)であった。

RRS内標比の妥当性を確認するため、RRS混入率測定試験を実施した。その結果、1%RRS含有試料を対象とした場合には0.86%、5%RRS含有試料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(IRMM)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_r)は最大で22.8%、最小で7.00%であった。さらに、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_r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。これらの結果から、共同試験によって測定された内標比は妥当であり、本検討において決定された測定条件を適用することにより、LightCycler systemを用いたRRSの定量分析が可能になるものと考えられた。

11. 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

ABI PRISM 7500を用いた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分析を可能にするためのCaM内標比(MON810系統)及びGA21内標比、また、ダイズ定量分析を可能にするためのRRS内標比をそれぞれ3機関参加の共同試験によって測定した。測定された各内標比の妥当性について、擬似混合粉砕試料を用いた試験により検証した結果、算出された混入率のRSD_rはすべての試料を通して2.55～13.90%であり、良好な室内再現性が確認された。またABI PRISM 7700を用いて得られた混入率を真値として比較した結果、すべての試料を通じてバイアスは25.0%を下回り、他の定量PCR機器を用いた方法によって得られる結果とも大きな差異は認められなかった。これらの結果から、ABI PRISM 7500を用いた定量PCR法の妥当性が確認されたと判断した。

12. 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

MON863、NK603、T25系統については組換えDNA配列とトウモロコシゲノムDNA配列との境界領域、TC1507系統については、発現タンパク質であるCry 1Fa2をコードするDNA配列とその制御配列との境界領域をそれぞれのPCRにおける標的領域と定め、定量系を開発した。各定量PCR機器(ABI P

RISM 7700、7900、7500)に固有の値として内標比を決定した後、各内標比の妥当性を検証するために擬似混合粉体試料を被検試料とした共同試験を実施した。その結果、各試料における各遺伝子組換えトウモロコシ系統の重量混合比を真値とした場合、NK 603系統以外の系統について得られた混入率のバイアスは、+7.2~48.5%(最大はMON 863系統の0.25%混入試料から得られた結果)と高めの傾向を示した。また、すべての試料と定量系の組み合わせを通して、室間再現性(RSD_R)の最大値はT25系統の0.25%混入試料で観察された25.7%であり、ISOの規格として示されている25%以下の基準を概ね満たした。さらに、測定値が検量線の最下点を下回ることを基準に定量下限値を判断した場合、すべての定量PCR法における定量下限値は0.25%であると考えられた。先述のとおり、各遺伝子組換えトウモロコシ系統の重量混合比を真値とした場合、測定の結果得られた混入率のバイアスが高めの傾向を示す場合があるものの、室間再現性が良好であったことから、本研究において開発された定量PCR法の妥当性が確認されたと判断した。

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

食安発第0517001号記載のシリカベースレジンタイプキット法(通知レジン法)をより安価かつ短時間に実施可能とするため、添加する Proteinase Kの量及び、DNA抽出操作時間について検討した。その結果、100 µLの20 mg/mL Proteinase Kの添加及び、30分間~1時間の加温処理により、通知レジン法と比較して遜色のない収量のDNAを抽出することが可能であった。

また、1回あたり50 µLのTE緩衝液を負荷し溶出する操作を2回繰り返すことにより、DNAのカラムからの溶出効率は最大であり、また、吸光度測定を問題なく実施可能な濃度のDNA試料液を調製可能であるこ

とが明らかになった。

さらに通知レジン法に含まれるグアニジン化合物の定量PCRに与える影響について検討した。その結果、PCR効率に対する明確な影響は認められなかったため、通知レジン法により得られるDNA試料液中に通常含まれる濃度のグアニジン化合物は、定量PCRの効率や特異性に影響を与えないことが示唆された。

C.まとめ

定性分析法の開発

定性分析法として、1)8系統の遺伝子組換えジャガイモを対象とした定性PCR法、2)安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性PCR法、3)安全性未審査遺伝子組換えコメを対象としたラテラルフロー法を開発した。また、これらの定性分析法のうち、遺伝子組換えジャガイモを対象とした定性PCR法とBt10系統を対象とした定性PCR法については、多機関検証試験を実施することにより標準化を行った。

定量分析法の開発及び改良

新たな定量分析法として、1)遺伝子組換えジャガイモを対象とした定量PCR法、2)遺伝子組換えトウモロコシ(MON863、NK603、TC1507及び、T25系統)を対象とした定量PCR法を開発した。また、遺伝子組換えトウモロコシを対象とした定量PCR法については、多機関検証試験を実施することにより標準化を行った。

ABI PRISM 7500を用いたトウモロコシを対象とするスクリーニング分析法を開発し、妥当性を検証した。また、同定量PCR機種を用いた、遺伝子組換えダイズを対象とする定量PCR法を開発し、妥当性を検証した。

LightCycler systemを用いた定量PCR法について、安定して遺伝子組換えダイズを定量可能となるよう改良を加えた。

その他の検討

遺伝子組換え作物を対象とした簡便な定

量分析法として、競合PCR法の原理に基づく分析技術について検討した。

遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種の流通に対応するため、新たな定量分析法として1粒毎の検知技術を開発した。また、開発された方法を用いたモニタリング調査を実施した。

定量PCR法の適用可能品目を評価するための検討を行った。さらにダイズに関しては、新たな定量系を開発し、種々のモデル加工食品を対象とした検討を行うことにより、加工食品中の遺伝子組換えダイズをより正確に分析するための技術開発を行う上で、非常に重要な知見を得た。

複数の定量PCR機器を用いて同一試料から得られる混入率について、その同等性を検証した。

シリカペースレジソライプキットを用いたDNA抽出法について、より安価かつ短時間に実施することができるよう、改良を検討した。

D.研究業績

論文

- 1)Watanabe T.; Kasama K.; Wakui C.; Shibuya M.; Matsuki A.; Akiyama H.; Maitani T.(2003) Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y). J. Food Hyg. Soc. Jpn. 44, 281-288.
- 2)Wakui C.; Akiyama H.; Watanabe T.; Fitch M.M.M.; Uchikawa S.; Ki M.;Takahashi, K.; Chiba R.; Fujii A.; Hino A.; Maitani T. (2004) A histochemical method using a substrate of β -gulucuronidase for detection of genetically modified papaya. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 45, 19-24.
- 3)Okunuki H.; Akiyama H.; Teshima R.; Hino A.; Goda Y.; Sawada J.; Toyoda M.; Maitani T. (2003) Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 44, 77-82.
- 4)日野明寛、穠山浩、栗原秀夫 (2003) 「遺伝子組換え農産物の最新検知技術」日本食品科学工学会誌 50, 107-114.
- 5)穠山浩、米谷民雄 (2002) 「遺伝子組換え食品検知法」食品衛生研究 52, 54-65.
- 6)Ogawsawra T.; Arakawa F.; Akiyama H.; Goda Y.; Ozeki Y. (2003) Fragmentation of DNAs of Processed Foods Made from Genetically Modified Soybeans. 日本食品化学学会誌 10, 155-160.
- 7)Akiyama H.; Goda Y.; Aoyagi Y.; Watanabe T.; Wakui C.; Chiba R.; Toyoda M.; Maitani T. (2003) A Comparative Study of Real-time PCR Method and ELISA Method for Detection of Recombinant DNA from Genetically Modified Soybean as Soybean Grain and De-fatted Soybean. Jap J. Food Chem. 10, 73-77.
- 8)穠山浩、渡邊敬浩、笠間菊子、松木容彦、米谷民雄 (2004) 「食品衛生外部精度管理調査研究の概要 (第1報) 遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) および遺伝子組換えジャガイモ(NewLeaf Plus and NewLeaf Y)の検知用試料の作製と調査成績について」食品衛生研究 54(4) 25-35.
- 9)Takahiro Watanabe, Hideo Kuribara, Takashi Mishima, Hiroyuki Kikuchi, Misao Kubo, Takashi Kodama, Satoshi Futo, Kikuko Kasama, Akie Toyota, Masanori Nouno, Ayako Saita, Kunihiko Takahashi, Akihiro Hino, Hiroshi Akiyama, Tamio Maitani (2004) New Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes. Biol. Pharm. Bull. 27(9):1333-1339.
- 10)Takeshi Ogasawara, Fumihiko Arakawa, Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Akihiro Hino, Tamio Maitani, Yukihiko Goda, Yoshihiro Ozeki (2004) Genomic DNA fragmentation of genetically modified corn