

Table 5. Yield and Quality of DNA in Sample Solution Extracted from Papaya Samples with Silica-membrane Type Kit

Laboratory	DNA conc. (ng/ μ L)	Ratio*	
		260/280	260/230
A	3.1 \pm 1.3	1.65 \pm 0.66	0.54 \pm 0.11
B	6.8 \pm 1.3	1.45 \pm 0.15	11.63 \pm 11.39
C	13.5 \pm 4.0	1.17 \pm 0.08	—
D	13.2 \pm 7.1	1.52 \pm 0.41	—
E	9.0 \pm 3.1	1.90 \pm 0.08	—
F	9.4 \pm 3.5	1.28 \pm 0.05	0.70 \pm 0.17
G	16.9 \pm 2.8	1.72 \pm 0.08	1.40 \pm 1.45
H	24.8 \pm 8.9	1.32 \pm 0.03	-3.71 \pm 4.64
I	7.0 \pm 1.9	1.33 \pm 0.13	-1.66 \pm 3.55
J	16.2 \pm 3.0	1.30 \pm 0.02	0.80 \pm 0.08
K	—	—	—
L	11.6 \pm 5.4	1.32 \pm 0.07	2.00 \pm 9.09
M	10.0 \pm 2.4	1.57 \pm 0.08	0.38 \pm 0.06
N	11.0 \pm 3.0	1.67 \pm 0.14	0.52 \pm 0.22
O	33.4 \pm 6.5	1.16 \pm 0.03	13.29 \pm 22.07
P	33.2 \pm 16.2	1.14 \pm 0.04	2.21 \pm 1.10
Q	15.1 \pm 3.0	1.73 \pm 0.18	—
R	22.2 \pm 19.4	1.48 \pm 0.28	0.25 \pm 1.27
Average	15.1 \pm 11.0	1.45 \pm 0.30	2.26 \pm 8.53

—: no data

*: Ratio of UV absorption at 260 nm to that at 280 nm or 230 nm

Table 6. Yield and Quality of DNA in Sample Solution Extracted from Papaya Samples with the CTAB Method

Laboratory	DNA conc. (ng/ μ L)	Ratio*	
		260/280	260/230
S	18.9 \pm 2.5	1.82 \pm 0.10	1.09 \pm 0.35
T	19.1 \pm 2.5	1.73 \pm 0.03	—
U	20.4 \pm 24.5	1.56 \pm 0.33	—
Average	19.4 \pm 13.7	1.70 \pm 0.22	1.09 \pm 0.35

—: no data

*: See the footnote to Table 5.

法として、シリカゲル膜タイプキット法、ならびに CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド) 法が併記されている。定性 PCR 法を用いた試験に参加した全 21 機関中、3 機関が CTAB 法により DNA 抽出を行っていた。両抽出法により得られた DNA 収量ならびに、O.D. 260/280 nm, O.D. 260/230 nm を基準とした精製度の結果を Table 5, 6 に示す。機関 K からは分光光度計の不具合を理由に報告が得られなかった。また、230, 320 nm における O.D. の記載を報告様式中に要求したが、通知ではこれら O.D. の測定義務が課されていないことを理由に、複数機関からの報告が得られなかった。抽出法別に DNA 平均収量、平均精製度を算出した結果、シリカゲル膜タイプキット法では、DNA 平均収量が 15.1 \pm 11.0 ng/ μ L, O.D. 260/280 nm, O.D. 260/230 nm を指標とした平均精製度は、それぞれ 1.45 \pm 0.30, 2.26 \pm 8.53 であった。また、CTAB 法においては、それぞれ、19.4 \pm 13.7 ng/ μ L, 1.70 \pm 0.22, 1.09 \pm 0.35 であった。両抽出法間における DNA 平均収量ならびに精製度に関し、明確な差異は認められなかった。しかし、抽出操作が煩雑であり、実験者の手技的要因が結果に反映されやすいとされる CTAB 法で

けでなく、比較的操作が簡便であるシリカゲル膜タイプキット法においても、DNA 収量、精製度ともに大きなばらつきが観察された。この要因として、検体の凍結乾燥処理、または、粉碎処理が不十分であることによる粉砕物の粒径の不均一性、および組織内に多糖類を多量に含有しているという検体の特性に起因しているものと考えられた。

4. GUS 法

Table 7 に GUS 法による試験結果を機関別に示す。すべての機関において、GM, Non-GM 検体それぞれ 2 検体ずつ、計 4 検体すべてが正しく判定された。また、GM パパイアの胚における GUS 発現率の平均値は、73.7% であり、ほぼ理論値と同等と判断される結果が得られた。また、Non-GM 検体においては、すべての検体で GUS 活性は観察されず、擬陽性は認められなかった。

5. 定性 PCR 法

Table 8 に定性 PCR 法による試験結果を機関別に示す。各機関に送付した GM 検体および Non-GM 検体それぞれ 2 検体ずつ、計 4 検体すべてが正しく判定された。しかし、Non-GM 検体を対象とした試験において、検出用プライマー対を用いた場合に増幅バンドが検出され、確認試

Table 7. Results of Laboratory-performance Study with GUS Assay

Sample	Laboratory	Number of embryos tested*1	Number of embryos that turned blue*1	GUS-expression (%)	Decision
Non-GM papaya	K	12	0	0	-
	L	12	0	0	-
	M	12	0	0	-
	N	12	0	0	-
	O	12	0	0	-
	P	12	0	0	-
	Q	12	0	0	-
	R	12	0	0	-
	S	12	0	0	-
	T	12	0	0	-
	U	12	0	0	-
	V	12	0	0	-
W	12	0	0	-	
	Average	12	0	0	
GM-papaya	K	12	7.5	62.5	+
	L	12	8.0	66.7	+
	M	12	6.0	50.0	+
	N	12	9.5	79.2	+
	O	12	8.0	66.7	+
	P	12	9.5	79.2	+
	Q	12	8.5	70.8	+
	R	12	10.0	83.3	+
	S	12	10.0	83.3	+
	T	12	10.0	83.3	+
	U	12	9.0	75.0	+
	V	12	9.5	79.2	+
W	12	9.5	79.2	+	
	Average	12	8.8	73.7	

+: positive, -: negative

*: Average of two samples

Table 8. Results of Laboratory-performance Study with Qualitative PCR Method

Primers	Non-GM papaya		GM-papaya	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Control papain-5', papain-3'	21/21*	0/21	21/21	0/21
Detection NosC-5', CaMVN-3'	1**/21	20/21	21/21	0/21
Identification CaM 3-5', GUS n-3'	0/1	1/1	21/21	0/21

*: Number positive/Number of sample

** : false-positive

First PCR was performed with the control and detection primer pairs.

When the result was positive, a second PCR was performed with the identification primer pairs.

験を実施したが増幅バンドが検出されず、最終判定を陰性とした例が1機関・1検体のみ認められた。提出された電気泳動の画像解析写真を確認したところ、予定増幅バンド長と同一と判断される位置にバンドが確認された。この原因として、非特異的増幅バンドの検出、または他のGMパパイヤ検体からのコンタミネーションの2点が考えられる。他の機関からは、非特異的増幅バンドが予定バンド長である207 bp付近に観察されたという報告はされていないことから、検体の凍結乾燥、粉碎処理、DNA抽出操作、または、PCR反応液調製時におけるGM検体の混入によるものと推察される。さらに、擬陽性の認められた機関から提出されたアンケート調査を詳細に精査した

ところ、本試験に使用した機器、試薬などの試験環境全般に関しては、他の機関から報告されているものと明確な差異は認められなかった。しかしながら、当該検査機関における試験実施者のGM食品検査の経験年数が1年未満と報告されており、他の機関の試験実施者に比べ比較的短いことが認められた。よって、上述の擬陽性は、実験操作の不慣れによるコンタミネーションが原因と考えられ、精度の高い試験結果を得るためには、実験操作に習熟している担当者が試験を行う必要があると示唆された。

結 論

GMパパイヤを検査対象とし、23の参加機関に共通未

知試料を配布し、外部精度管理試験を実施した。本試験において、送付した検体はすべて生鮮品であることから、輸送時における試料の変質、各参加機関において使用する機器、試薬の差異など、外部精度管理試験を行ううえで、いくつかの懸念点が考えられた。しかしながら、各機関から報告された分析結果を集計し詳細に解析したところ、送付試料のすべてが予想された結果と一致した。また、一部予想しない結果が得られた事例についても、他機関から報告された詳細な試験結果と比較すること、および同時に実施した検査法の全般にわたるアンケート調査結果から、その要因を推定することが可能であった。

文 献

- 1) 厚生省告示第232号(2000)“食品、添加物等の規格基準の一部改正”平成12年5月1日。
- 2) 厚生省告示第233号(2000)“組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き”平成12年5月1日。
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正”平成13年3月15日、食発第79号(2001)。
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について”平成13年3月27日、食発第110号(2001)。
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成13年5月25日、食安発第158号(2001)。
- 6) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成14年4月30日、食安発第0430001号(2002)。
- 7) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成15年11月13日、食安発第1113001号(2003)。
- 8) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成16年6月28日、食安発第0628001号(2004)。
- 9) Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Shibuya, M., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (New-Leaf Plus and NewLeaf Y). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 281-288 (2003).
- 10) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T., A histochemical method using a substrate of β -glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 19-24 (2004).

Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for Simultaneous Detection of Eight Events of Genetically Modified Maize

MARI ONISHI,[†] TAKESHI MATSUOKA,[‡] TAKASHI KODAMA,^{‡,§} KOICHI KASHIWABA,^{||}
SATOSHI FUTO,[†] HIROSHI AKIYAMA,[‡] TAMIO MAITANI,[‡] SATOSHI FURUI,[§]
TAICHI OGUCHI,^{*,§} AND AKIHIRO HINO[§]

Research and Development Division, Fasmac Co., Ltd., 5-1-3 Midorigaoka, Atsugi,
Kanagawa 243-0041, Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services, 2-1 Shintoshin,
Chuo-ku, Saitama, Saitama 330-9731, National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-8642, Okinawa Subtropical Station, Japan International Research Center for Agricultural
Sciences, 1091-1 Maezato-Kawarabaru, Ishigaki, Okinawa 907-0002, and National Institute of Health
Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

In this study, we developed a novel multiplex polymerase chain reaction (PCR) method for simultaneous detection of up to eight events of genetically modified (GM) maize within a single reaction. The eight detection primer pairs designed to be construct specific for eight respective GM events (i.e., Bt11, Event176, GA21, MON810, MON863, NK603, T25, and TC1507) and a primer pair for an endogenous reference gene, *ssIIb*, were included in the nonaplex(9plex) PCR system, and its amplified products could be distinguished by agarose gel and capillary electrophoreses based on their different lengths. The optimal condition enabled us to reliably amplify two fragments corresponding to a construct specific sequence and a taxon specific *ssIIb* in each of the eight events of GM maize and all of nine fragments in a simulated GM mixture containing as little as 0.25% (w/w) each of eight events of GM maize. These results indicate that this multiplex PCR method could be an effective qualitative detection method for screening GM maize.

KEYWORDS: Multiplex PCR; genetically modified (GM); maize; Bt11; Event176; GA21; MON810; MON863; NK603; T25; TC1507; *ssIIb*

INTRODUCTION

Biotechnology has been used in modern farming and is advantageous to the related industries, since the initial commercialization of the genetically modified (GM) tomato in the United States in 1994. In fact, the global area of GM crops increased nearly 50-fold between 1996 and 2004 (from 1.7 million to 81.0 million hectares) (1) and is expected to continue to rise. GM crops have been authorized for food and/or feed by many countries based on their own criteria for safety assessment. However, consumers have been demanding appropriate information and labeling for foods derived from GM crops. Thus, labeling systems have been introduced for GM foods in the European Union, Korea, Japan, Australia, and other countries, and each of these systems is distinct. For example, the threshold levels for the unintentional presence of GM materials in non-

GM crops have been defined as 0.9% in the European Union (2), 3% in Korea (3), and 5% in Japan (4).

For the monitoring of labeling systems, it has been necessary to develop methods for detecting genetically modified organisms (GMOs) in foods. Two approaches are available as follows: detecting the protein produced by the introduced trait gene through the detection of its specific antibody, such as by enzyme-linked immunosorbent assay (reviewed in 5, 6), and detecting a specific DNA sequence used for gene modification by the polymerase chain reaction (PCR) (reviewed in 6–9). For detection of GM maize in foods and food materials, PCR-based detection methods that are able to detect even small amounts of transgenes in raw materials and processed foods have been routinely used (10–19).

On the other hand, the cost and duration of analyses could constitute one of the major bottlenecks for providing consumers with cost effective labeling and detection of the conventional or non-GM food supply chains. Thus, there is a need to develop time and cost effective detection methods to preserve the freedom of choice of consumers. We have been tackling the research and development of multiplex PCR methods as a solution. Multiplex PCR is a useful method that employs several

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-29-838-8079. Fax: +81-29-838-7996. E-mail: tloguchi@nri.affrc.go.jp.

[†] Fasmac Co., Ltd.

[‡] Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services.

[§] National Food Research Institute.

^{||} Japan International Research Center for Agricultural Sciences.

[‡] National Institute of Health Sciences.

primer pairs in the same amplification reaction for a sample DNA and can detect multiple target DNA sequences by simultaneous amplifications in one tube. Because the number of GM crops is continuously increasing, multiplex PCR would be one useful method for screening GMO content in raw materials and/or processed foods. Several methods using multiplex PCR for the detection of GM maize and/or soy have already been described (20–22). We also reported a multiplex PCR system for the simultaneous detection of five events of GM maize, i.e., Bt11, Event176, GA21, MON810, and T25, that were authorized for food and feed in Japan and the United States before the year 2000 (10, 23). After publication of the report, another three events of GM maize (MON863, NK603, and TC1507) were authorized in Japan. In this study, we designed construct specific primers for these three GM maize events using recombinant DNA (r-DNA) information in the public domain. Additionally, we redesigned the primer pair for T25 involved in the previous report (23), because the target sequence amplified by the primer pair is contained not only in T25 maize but also in TC1507 maize. Then, we developed a method for simultaneously detecting all eight authorized GM maize events in the same tube by multiplex PCR.

MATERIALS AND METHODS

Maize (*Zea mays*) and Other Cereal Materials. Dry seeds of eight events of GM maize, i.e., one progeny each of Bt11 and Event176 developed by Syngenta Seeds AG (Basel, Switzerland), a progeny of TC1507 developed by Dow Agrosocieties LLC (Indianapolis, IN), one progeny each of MON810, MON863, GA21, and NK603 developed by Monsanto Co. (St. Louis, MO), and a progeny of T25 developed by Bayer CropScience AG (Monheim am Rhein, Germany), were kindly provided by their developers. Dry seeds of QC9651 maize (Quality Traders, Inc., Huntley, IL) were also provided by the developer and used as a non-GM control. We used several other cereal materials as nontarget controls, such as soy, rice, wheat, and barley. Dry seeds of Roundup Ready (RR) soy (Monsanto Co.) were directly imported from the United States. Dry soybeans harvested in Ohio in 1998 were also directly imported and used as non-GM soy. Seeds of the rice (*Oryza sativa*) variety Kinuhikari, the wheat (*Triticum aestivum*) variety Haruyutaka, and the barley (*Hordeum vulgare*) variety Harrington were obtained in Japan.

Preparation of Test Samples and DNA Extraction. Dry seeds were ground with a P-14 speed rotor mill (Fritsch GmbH, Ibar-Oberstein, Germany). The ground materials were freeze-dried for 24 h in a FDU-540 freeze drier (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) and stored at -20°C until use. The seven levels of simulated GM mixture samples containing 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, and 5% (w/w) of each of eight events of GM maize in non-GM maize used for experiments were made from the ground materials. DNA extractions were performed using the DNeasy Plant Maxi kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) as described in our previous reports (18). The DNA concentration of solutions was determined by measuring UV absorbance at 260 nm, and the quality was evaluated by the absorbance ratios at 260/280 and 260/230 nm; in the majority of maize varieties studied, the absorption ratio at 260/230 nm was >1.7 and that at 260/280 was between 1.7 and 2.0. These DNA samples were used for the subsequent experiment.

Oligonucleotide Primers. To design primers, we chose the construct specific regions from the artificial junction contained in r-DNAs and found the most suitable oligonucleotide sequences in these regions using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The oligonucleotides were checked using a public database (i.e., DDBJ), and it was confirmed that they did not match unintended DNA. The primer pairs developed herein for use in the sequence analyses of transgenes and multiplex PCR are listed in Tables 1 and 2, respectively. These primers were synthesized by Fasmac Co., Ltd. (Kanagawa, Japan) and purified by high-performance liquid chromatography. Each oligonucleotide was diluted to the appropriate concentration to conduct multiplex PCR with the appropriate volume of sterilized water.

DNA Sequencing. The structural information of r-DNA integrated in GM maize was available in safety assessment documents published by the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) and the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) of Japan. In this study, we analyzed DNA sequence involved in artificial junctions between DNA segments (e.g., the promoter and structural genes) and verified the r-DNA structures (data not shown). The regions sequenced in this study are indicated in Figure 1. These regions were amplified under the following conditions: The reaction volume of 25 μL contained 25 ng of genomic DNA, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ of each of the primers listed in Table 1, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , and 0.625 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). Reactions were buffered by the addition of the PCR buffer II. Amplification was performed in a thermal cycler according to the following PCR step-cycle program: preincubation at 94°C for 10 min, 40 cycles consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min. The amplified products were directly sequenced by Fasmac Co., Ltd.

Simplex PCR Conditions. The reaction volume of 25 μL contained 25 ng of genomic DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 0.2 $\mu\text{mol/L}$ of the 5'- and 3'-primers, and 1.25 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The reactions were buffered with the PCR buffer II (Applied Biosystems) and amplified in a thermal cycler, the Silver 96 well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) in max mode, according to the following step-cycle program: preincubation at 95°C for 10 min; 10 cycles consisting of denaturation at 95°C for 0.5 min, annealing at 63°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; 27 cycles consisting of denaturation at 95°C for 0.5 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min.

Multiplex PCR Conditions. Two different multiplex PCR reaction mixes were used in this study. For the tetraplex (4-plex) PCR that could detect four events of GM maize, i.e., MON836, NK603, T25, and TC1507, the reaction volume of 25 μL contained 25 ng of genomic DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 1.25 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ each of the M810 1–5', NK603 1–3', T25 2–5', T25 2–3', M863 1–5', M863 1–3', TC1507 1–5', and TC1507 1–3' primers. For the nonplex (9-plex) PCR that could detect eight events of GM maize and a maize endogenous reference gene (*ssIIb*) in one tube, the reaction volume of 25 μL contained 25 ng of genomic DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 1.25 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase, and 15 primers at the following concentrations: 0.2 $\mu\text{mol/L}$ for M810 1–5', NK603 1–3', M863 1–5', M863 1–3', Bt11 1–5', and cryIA 1–3'; 0.1 $\mu\text{mol/L}$ for T25 2–5', T25 2–3', GA21 1–5', GA21 1–3', TC1507 1–5', and TC1507 1–3'; 0.05 $\mu\text{mol/L}$ for Event176 1–5'; and 0.045 $\mu\text{mol/L}$ for SSIIb 1–5' and SSIIb 1–3'. On both of the multiplex PCRs, the reactions were amplified in a Silver 96 well GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) in max mode, according to the following step-cycle program: preincubation at 95°C for 10 min; 10 cycles consisting of denaturation at 95°C for 0.5 min, annealing at 65°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; 27 cycles consisting of denaturation at 95°C for 0.5 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; followed by a final extension at 72°C for 7 min.

Analysis of PCR Products. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and/or capillary electrophoresis. The agarose gel electrophoresis was performed in a 3% (w/v) LO3 agarose (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) gel with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A 5 μL aliquot of each PCR product was electrophoresed at a constant voltage (100 V) for 30 min in $1 \times$ TAE buffer 40 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L acetic acid, and 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). After the electrophoresis was finished, the gel was scanned by a Molecular Imager FX system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). The capillary electrophoresis analysis was performed using an SV1210 microchip electrophoresis analytical instrument with an IC-4100 short DNA fragment analysis reagents kit (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan). One microliter aliquots of 10-fold dilutions of PCR products were electrophoresed with the internal control fragments (10 and 500 bp) in a water soluble cellulose derivative at a

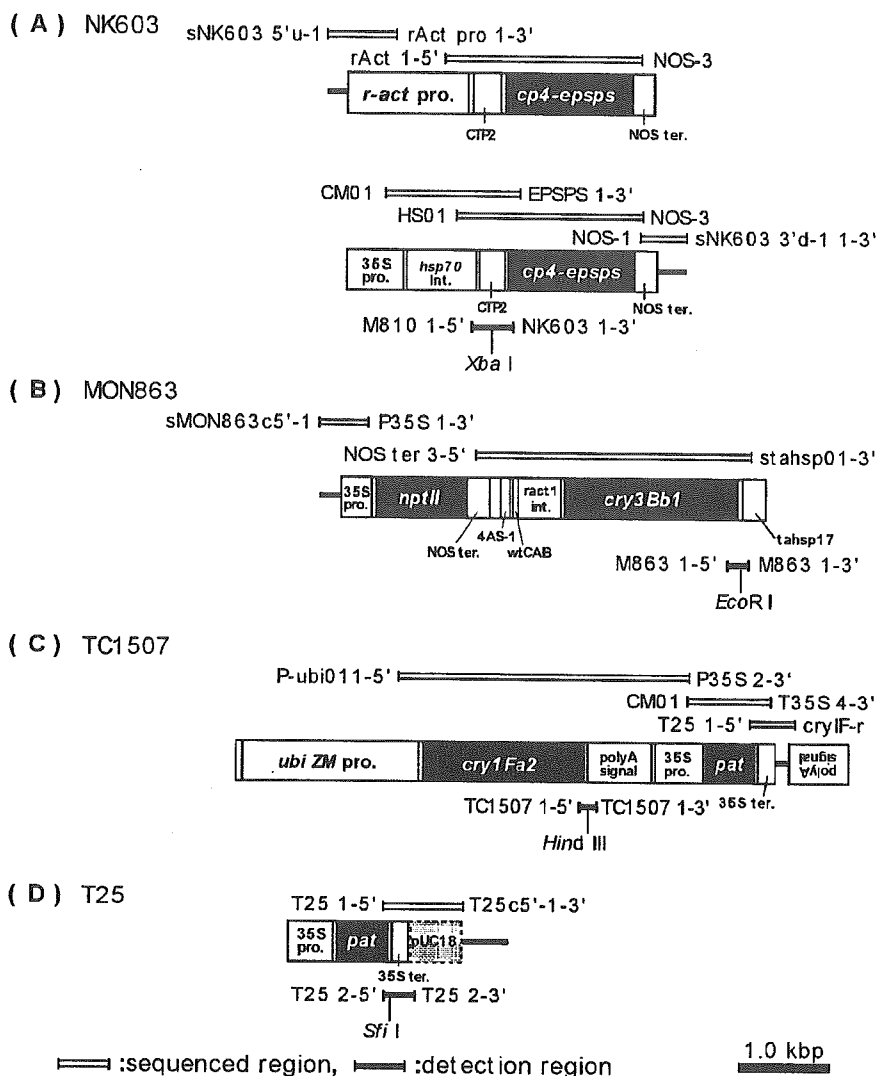


Figure 1. Schematic diagrams of the designed primers in relation to the r-DNAs. The structures of the r-DNAs transformed into NK603, MON863, TC1507, and T25 are shown as boxes in A–D, respectively. The structural trait genes are shown in filled boxes, and the other elements, including the promoters and terminators, are shown in open boxes. The gray boxes outlined with a dashed line indicate the 610 bp region of the pUC18 vector segment contained in T25 r-DNA. The broad lines attached to the boxes indicate the sequenced border sequences of DNA fragments introduced to each GM event. The amplified regions for sequencing are indicated as double lines with the primers used for the amplification shown at the end. The detection regions of the multiplex PCR method are indicated as broad lines with the primers used for the amplification shown at the end. The restriction enzymes that were used in the restriction analyses are indicated on their digestion sites.

constant voltage (350 V) for 4.5 min and analyzed by the software included in the system.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA Sequencing and Primer Design. To design primer pairs suitable for the multiplex PCR, we first examined structures of the r-DNA integrated in three target events of GM maize (i.e., the three newly authorized events: NK603, MON863, and TC1507). Structural information about the r-DNAs of GM maize events authorized in Japan was taken from public domain sources as described in the Materials and Methods section. We were also able to obtain sequence information on each of the DNA segments introduced to GM maize events from the DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Then, we analyzed the DNA sequence involved in the artificial junctions between DNA segments (e.g., the promoter and structural gene) and verified the r-DNA structures. The 10 amplified DNA segments used

for the sequence analysis in this report are shown in **Figure 1A–C**, and the primers are shown in **Table 1**. The sequencing results showed that the r-DNA structures agreed with the information from the public domain, and the sequences of DNA segments involved in the sequenced regions matched the information from DDBJ. The sequencing results are not provided due to a nondisclosure agreement with developers.

On the basis of the sequencing results, we chose the construct specific regions from the artificial junction(s) contained in r-DNAs and found the most suitable oligonucleotide sequences in these regions using a software package (**Table 2**). The oligonucleotides were checked using the public database (i.e., DDBJ), and it was confirmed that they did not match unintended DNA. To ensure the detection specificities, one primer from each pair was designed to anneal to a trait gene of its target GM maize, and the other was designed to anneal to another element that places an artificial junction(s) and adjoins the trait

Table 1. List of Sequencing Primers

targeted GM	name	sequence	specificity	amplicon (bp)	ref
NK603	sNK603 5'-u-1	5'-GGAGTCAAGAGGGGAGGAGG-3'	NK603 plant genome/sense	742	a
	rAct pro 1-3'	5'-GGGCTTGCTATGGATCGTG-3'	r-act pro./antisense	11	11
	rAct 1-5'	5'-ATCTTTGGCCTTGGTAGTTG-3'	r-act pro./sense	2163	23
	NOS-3	5'-TTATCCTAGTTTGGCGGCTA-3'	NOS ter./antisense	30	30
	CM01	5'-CTCTAGAAATGCCATCATTGCGATA-3'	35S pro./sense	1465	10
	EPSPS 1-3'	5'-ATCCTGGCGCCCATGGCCTGCATG-3'	cp-4 epsps/antisense	31	31
	HS01	5'-AGTTTCTTTTTTGTGCTCTCT-3'	hsp 70 int./sense	1943	10
	NOS-3	5'-TTATCCTAGTTTGGCGGCTA-3'	NOS ter./antisense	30	30
	NOS-1	5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3'	NOS ter./sense	466	11
	sNK603 3'-d-1	5'-AGAGTGGAAGTGTGTGCGGTG-3'	NK603 plant genome/antisense	a	a
T25	T25 1-5'	5'-GCCAGTTAGGCCAGTTACCAA-3'	pat/sense	933	23
	T25c5'-1-3'	5'-CTGGCGCCGCTCGACTC-3'	T25 plant genome/antisense	b	b
MON863	NOS ter 3-5'	5'-GTCTTCCGATGATTATCATATAATTTCTG-3'	NOS ter./sense	3062	11
	atahsp01-3'	5'-TGCACTCAAATCAGAACAATTTATT-3'	tahsp17/antisense	X13431	X13431
	sMON863c5'-1-5'	5'-CCAAGAGCGCTTATGTCATATGG-3'	MON863 plant genome/sense	504	a
TC1507	P35S 1-3'	5'-CCTCTCCAATGAAATGAACTTCCT-3'	35S pro./antisense	23	23
	P-ubi011-5'	5'-CTGCCTTCATACGCTATTTATTTC-3'	ubi pro./sense	3193	S94464, U29159,
	P35S 2-3'	5'-CCTCTCCAATGAAATGAACTTCCT-3'	35S pro./antisense	11	US6054574, 32, 33
	CM01	5'-CACTACAATGCCATCATTGCGATA-3'	35S pro./sense	961	10
	T35S 4-3'	5'-TTTTAGTACTGGATTTGGTTTAGGAATTAG-3'	35S ter./antisense	11	11
T25 1-5'	5'-GCCAGTTAGGCCAGTTACCAA-3'	pat/sense	458	23	
Cry1F-r	5'-CGAATAGAAAATACTGCCTGCAA-3'	3'-polyA/antisense	c	c	

^a Design of these primers was based on the information provided from Monsanto with a nondisclosure agreement. ^b Design of this primer was based on the information provided from Bayer CropScience with a nondisclosure agreement. ^c Design of this primer was based on the information provided from Dow AgroScience with a nondisclosure agreement.

Table 2. List of Primers for the Multiplex PCRs

targeted GM	name	sequence	specificity	amplicon (bp)	restriction enzyme (digestion products) ^a	ref
NK603	M810 1-5'	5'-GAGTTTCCTTTTTGTTGCTCTC 3'	hsp70 int./sense	444	XbaI	23
	NK603 1-3'	5'-GCTGCTTGACCCGTGAAG-3'	cp-4 epsps/antisense	(174 bp/270 bp)		
Event176	E176 1-5'	5'-GTAGCAGACACCCTCTCCACA-3'	PEPC pro./sense	343	BstEII	23
	cryIA 1-3'	5'-TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTC-3'	cryIA(b)/antisense	(91 bp/252 bp)		23
T25	T25 2-5'	5'-GGCATTGATGTTGGTTTTGGCAAAG-3'	pat/sense	311	SfiI	
	T25 2-3'	5'-AATTCGAGCTCGGTACCCT-3'	pUC18/antisense	(59 bp/252 bp)		
GA21	GA21 1-5'	5'-ACGGTGGAAGAGTCAATGTATG-3'	OTP/sense	270	SfiI	23
	GA21 1-3'	5'-TCTCCTTGATGGGCTGCA-3'	m-epsps/antisense	(114 bp/156 bp)		23
MON863	M863 1-5'	5'-GATGACCTGACCTACCAGA-3'	cry3Bb1/sense	234	EcoRI	
	M863 1-3'	5'-GCACACACATCAACCAAATT-3'	tahsp17/antisense	(171 bp/63 bp)		
MON810	M810 1-5'	5'-GAGTTTCCTTTTTGTTGCTCTC-3'	hsp70 int./sense	199	BsaAI	23
	cryIA 1-3'	5'-TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTC-3'	cryIA(b)/antisense	(83 bp/116 bp)		23
ssIIb	SSIIb 1-5'	5'-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3'	ssIIb/sense	151		12
	SSIIb 1-3'	5'-TCGATTTCTCTCTTGGTGACAGG-3'	ssIIb/antisense	12		12
TC1507	TC1507 1-5'	5'-TTGACAGGTTGAGTTGATCCAG-3'	cryIFa2/sense	131	HindIII	
	TC1507 1-3'	5'-CCAAGAAGCTCATGTTAGTCGAA-3'	3'-polyA/antisense	(65 bp/66 bp)		
Bt11	Bt11 1-5'	5'-CCATTTTTCAGCTAGGAAGTTC-3'	adh1-1S IVS6/sense	110	XbaI	23
	cryIA 1-3'	5'-TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTC-3'	cryIA(b)/antisense	(72 bp/38 bp)		23

^a The lengths of PCR products after restriction digestions shown in Figure 4B.

gene. Each primer pair was also designed to distinguish the length of the amplified product from the length of other amplified products and from the four events of GM maize utilized in the previous report (23), i.e., MON810, Event176, Bt11, and GA21. The differences in PCR product lengths are shown in Table 2. For detection of NK603, we designed a new 3'-primer, NK603 1-3', on the *cp4-epsps* gene. The MON810 1-5' primer, which had been previously designed on the intron sequence of the *Arabidopsis thaliana hsp70* gene for the detection of MON810 (23), was used as a 5'-primer, as shown in Figure 1A and Table 2. For detection of MON863, 5'- and 3'-primers were designed on the *cry3Bb1* gene and the terminator of the *Triticum aestivum hsp17* gene, respectively (Figure 1B and Table 2). For the detection of TC1507, 5'- and

3'-primers were designed on the *cry3Fa2* gene and a polyadenylation signal sequence from *Agrobacterium tumefaciens ORF25*, respectively (Figure 1C and Table 2).

In addition, we needed to design a new T25 construct specific primer pair that does not cross-react with TC1507, because our previously reported target sequence for T25 construct specific detection (23) was also found in the construct of TC1507, as shown in Figure 1C,D. It was also reported that the r-DNA introduced to T25 included two DNA fragments matching with the pUC18 vector in T25 r-DNA (19). We therefore focused on the analysis of DNA sequences in the 3'-flanking regions of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S terminator, as shown in Figure 1D, to detect the construct specific sequence of T25. As a result of the analyses of the downstream regions of *pat*

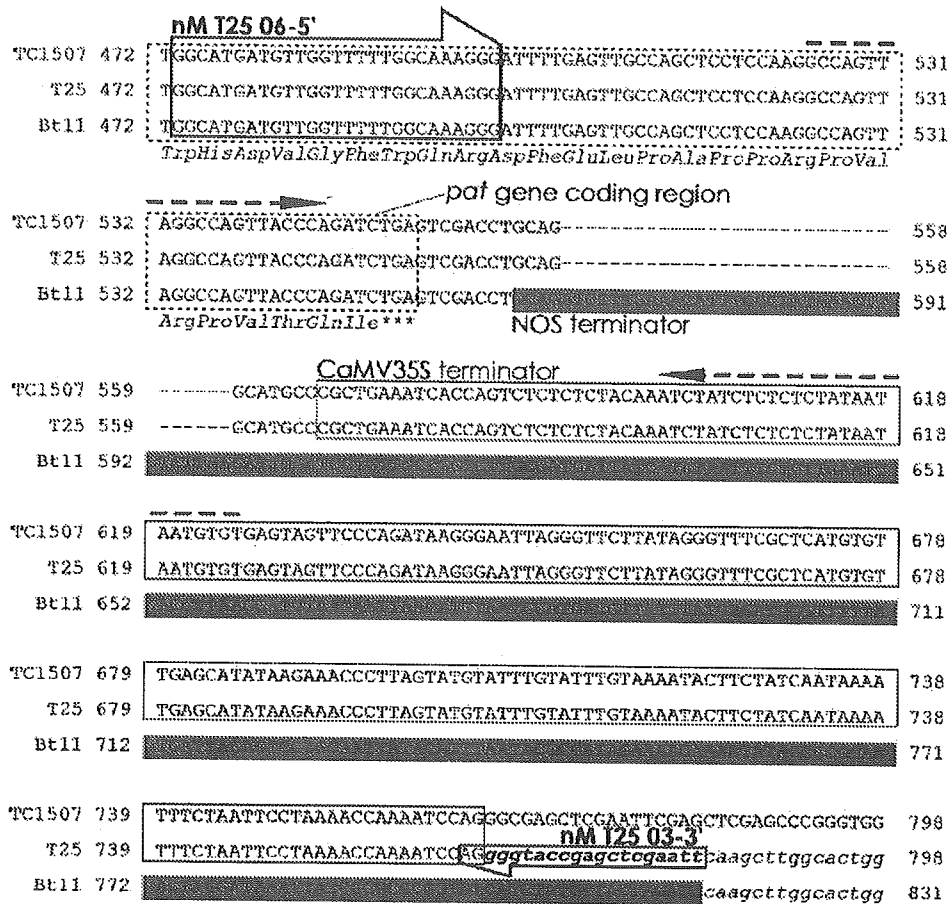


Figure 2. r-DNA sequence comparison of T25, TC1507, and Bt11. All of these shared the same *pat* gene (indicated by dashed boxes). In the region downstream of the *pat* gene, TC1507 and T25 have a CaMV35S terminator (open boxes), and Bt11 has a NOS terminator (gray boxes). The italicized lower case letters indicate the pUC18 vector segments contained in T25 and Bt11, and the 16 bp specific to T25 is shown in bold italics. The new detection primers designed in this study are indicated by boxed arrows. The dashed arrows on the DNA sequences indicate the detection primers previously reported (15). The numbers at the end of each line show the positions from the initiation codon of the *pat* gene.

genes in T25, TC1507, and Bt11, we found a unique sequence of 16 bp at the junction region between the CaMV 35S terminator and the pUC18 vector in T25 (Figure 2). A new 3'-primer including the 16 bp sequence (T25 2-3') and a new 5'-primer (T25 2-5') on the *pat* gene were designed for the detection of T25 (Figure 2 and Table 2).

Because the amplification products for NK603, T25, MON863, and TC1507 have only one digestion site each, *Xba*I, *Sfi*I, *Eco*RI, and *Hind*III, respectively (Figure 1), it was possible to confirm that each amplification product definitely corresponded to its specific target by means of restricted enzyme digestion (Table 2). The restriction enzymes used to confirm the amplification products of the previous multiplex PCR method have already been described (23); however, we thought that performing the restriction analyses as an additional confirmation could improve the reliability of this method.

The specificities of the designed primer pairs were individually assessed by simplex PCR tests. The DNAs extracted from the seeds of each of eight events of GM maize and from the other cereal crops were used as the template genomic DNAs. As shown in Figure 3, all simplex PCR systems specifically amplified products of the expected lengths from the DNA extracted from each target GM maize sample. In particular, the new T25 primer pair could specifically detect T25 DNA and no amplification products from TC1507 (Figure 3B). In contrast,

each of these primer pairs amplified no product from DNAs extracted not only from other events of GM maize and non-GM maize but also from other crops, i.e., soy, rice, wheat, and barley. On the other hand, we also performed simplex PCR tests using the four primer pairs to detect Bt11, Event176, GA21, and MON810, which were used in the previous multiplex PCR method (23) to reconfirm the specificities of previous PCR systems. The results showed that these primer pairs amplified no products from DNAs extracted from NK603, T25, MON863, and TC1507 (data not shown). Therefore, we concluded that all eight of these primer pairs were specific to their respective target events in maize samples. The specificity for other GM crop events, such as cotton, sugar beet, and rapeseed, should be tested in the future, although the major raw materials for foods are soy and corn.

Tetraplex PCR Method for Detection of Newly Authorized GM Maize. We examined the specificity of these primer pairs under the multiplex PCR conditions. Tetraplex PCR for detection of four events of GM maize, i.e., NK603, MON863, TC1507, and T25, was performed using a reaction mixture including four primer pairs at a concentration of 0.2 μmol/L each. The other experimental conditions were the same as described in the previous report (23). The DNAs extracted from eight events of pure GM maize, non-GM maize, soy, rice, wheat, and barley were used as template DNAs. In addition, the DNAs

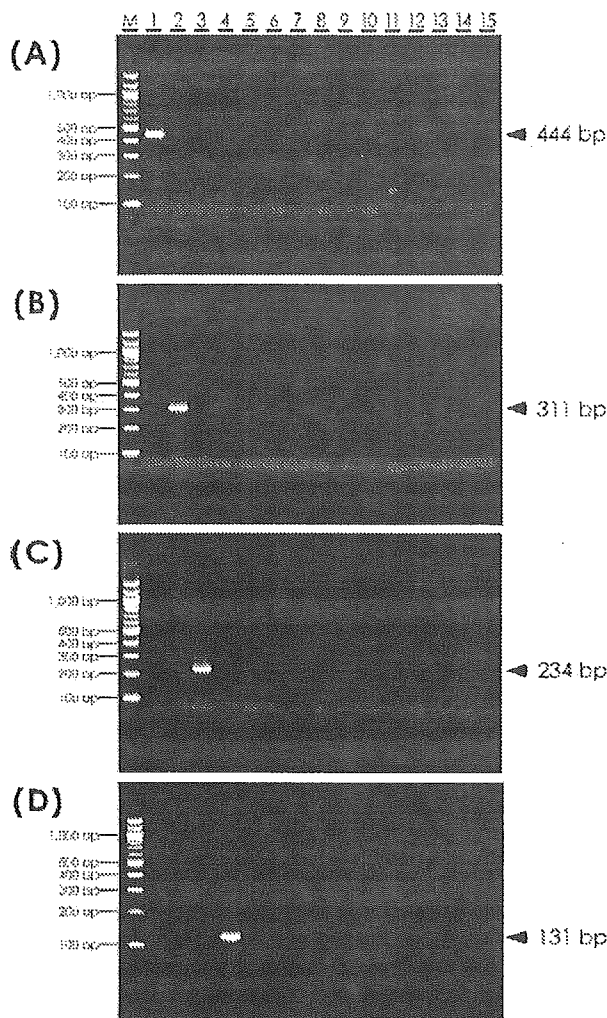


Figure 3. Specificities of detection primer pairs designed for the multiplex PCR. Simplex PCR products amplified with the NK603 primer pair (A), T25 primer pair (B), MON863 primer pair (C), and TC1507 primer pair (D) were electrophoresed on 3% agarose gel. Lanes 1–9, amplification of maize DNAs extracted from the seeds of each representative variety of maize of NK603, T25, MON863, TC1507, non-GM variety, Event176, GA21, MON810, and Bt11 maize, respectively; lanes 10–14, amplification of DNAs from non-GM soy, RR soy, rice, wheat, and barley, respectively; lane 15, negative control (no DNA); and M, 100 bp ladder size standard.

extracted from the simulated GM mixture that included equal weights of each of eight events of GM maize [equivalent 1% (w/w) of each of eight events of GM maize] in non-GM maize were used as template DNAs in these specificity tests. As shown in Figure 4A, tetraplex PCR amplified only a fragment that corresponded to the expected DNA length in each of the four target events and clearly amplified all four of the PCR products in the simulated GM mixture. Furthermore, the restriction analyses of these amplified products clearly showed that the products corresponded to the target sequences of NK603, T25, MON863, and TC1507 (Figure 4B). In contrast, no amplification was observed with the DNA extracted from the nontarget GM maize, non-GM maize, soy, rice, wheat, and barley. These results indicated that these four primer pairs were compatible in the multiplex PCR system.

To evaluate the sensitivity of this tetraplex PCR method, we prepared seven levels of simulated GM mixture samples

containing 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, and 5% (w/w) of each of eight events of grained GM maize in grained non-GM maize. We made 2–4 independent mixtures for each concentration, and the DNA was extracted from all samples in duplicate and was used to analyze in duplicate ($n = 8–16$). All of the four target specific amplified products were reliably detected with DNAs extracted from the simulated GM mixture containing over 0.1% of each GM event (data not shown). These results show that this tetraplex PCR system could distinguish each of four events of GM maize newly designed from other events of GM maize, soy, rice, wheat, and barley. We have already reported a hexaplex (6-plex) PCR system that could detect and distinguish five events of GM maize (i.e., Bt11, Event 176, GA21, MON810, and T25) and an endogenous reference gene (*zein*) (23). In this study, we confirmed that the removal of a primer pair for the detection of T25 from the hexaplex PCR system had no effect on the detection specificities of the other four events and an endogenous reference gene (data not shown). We therefore conclude that it is possible to detect and distinguish these eight events of GM maize by using either of these two multiplex PCR reactions.

Evaluation of the Nonplex PCR Method for Detecting Eight Events of GM Maize. As described above, the four primer pairs designed in this study showed high detection specificities under the multiplex PCR conditions. Because the amplification products from these two multiplex systems were designed to have mutually different lengths, we could apply these primer pairs to multiplex PCR. In addition, we also changed the control DNA sequence for a taxon specific gene to a *starch synthase IIb* (*ssIIb*) gene from *zein*, which we previously used, because the *zein* gene belongs to a multigene family and shows polymorphism in the maize variety (24). The *ssIIb* is a single copy gene in the maize genome (25). The taxon specific sequence of the *ssIIb* gene has already been applied in our quantitative PCR method (12, 13), which was adopted as a standard (the official method) in Japan and Korea (26–29). As the endogenous control primers for the new nonplex PCR, we used the primers SSIIB 1–5' and SSIIB 1–3', which amplify the 150 bp fragment (12). Moreover, the copy numbers of taxon specific sequences (*ssIIb*) per genome have also been assessed for 20 representative varieties of maize by the comparison of Ct values in our quantitative PCR system (data not shown). Thus, we attempted to develop a nonplex PCR system to simultaneously detect all eight events of GM maize and the *ssIIb* gene by multiplex PCR in the same tube.

In attempting to develop the nonplex PCR, we first performed reactions under the same conditions as for the tetraplex PCR, including the concentration of primers (0.2 $\mu\text{M/L}$ each), but we were not able to simultaneously observe all nine of the amplified bands from the simulated GM mixture containing 1% each of eight GM maize events. We therefore attempted to determine the optimal conditions for the nonplex PCR, e.g., the concentrations of each primer, thermal cycle program, and concentration of MgCl_2 . The optimal concentrations of eight GM events and the taxon specific primer pairs containing the primer mixture were examined using DNA extracted from the simulated GM mixture containing 1% of each GM event and were modulated to obtain PCR products having electrophoretic bands with intensities as nearly equivalent as possible. The thermal cycling program was optimized for the Silver 96 well GeneAmp 9700. We examined several cycling programs with different annealing temperatures (i.e., ranging from 60 to 65 $^\circ\text{C}$) and different numbers of cycles. A two-step annealing–extension process was used, in which the first 10

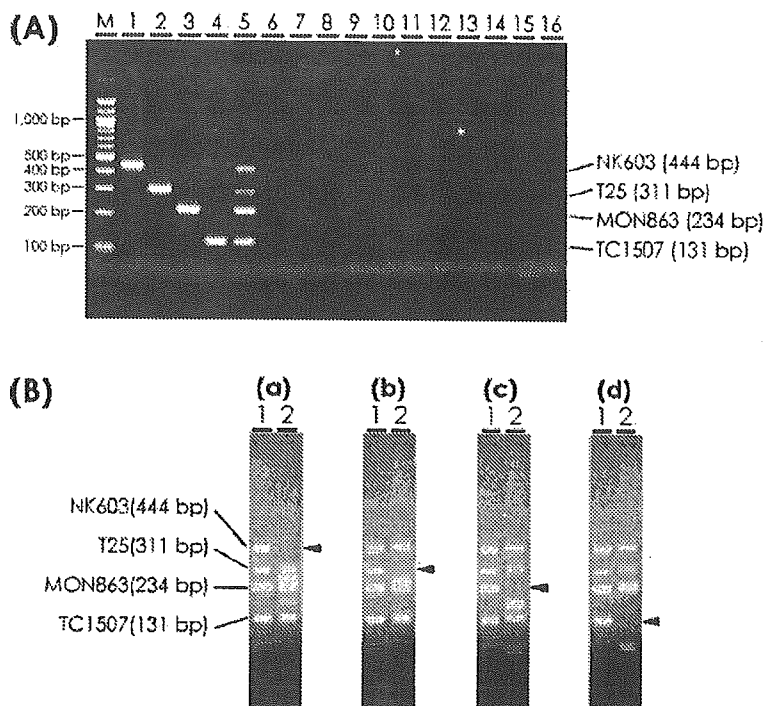


Figure 4. (A) Specificities of the multiplex PCR for detection of four events of GM maize: NK603, T25, MON863, and TC1507. The specificities were investigated by multiplex PCR conditions including the four primer pairs of NK603, T25, MON863, and TC1507 for the template DNAs extracted from the seeds of each of the GM events and non-GM maize and other cereal materials. Lanes 1–10, amplification of maize DNAs from NK603, T25, MON863, TC1507, non-GM maize, Event176, GA21, MON810, and Bt11, respectively; lanes 11–15, non-GM soy, RR soy, rice, wheat, and barley, respectively; lane 16, negative control (no DNA); and M, 100 bp ladder size standard. PCR products were electrophoresed on 3% agarose gel. (B) Restriction analyses of the amplified products of the multiplex PCR. The products amplified from the simulated GM mixture containing 1% of each of eight events by the multiplex PCR for the detection of four events of GM maize were digested with *Xba*I (a), *Sfi*I (b), *Eco*RI (c), and *Hind*III (d). The electrophoregrams of nondigested products and digested products are shown in lanes 1 and 2, respectively, and digested bands are indicated by arrowheads. The lengths of digestions were roughly correspondent to the expected lengths described in Table 2.

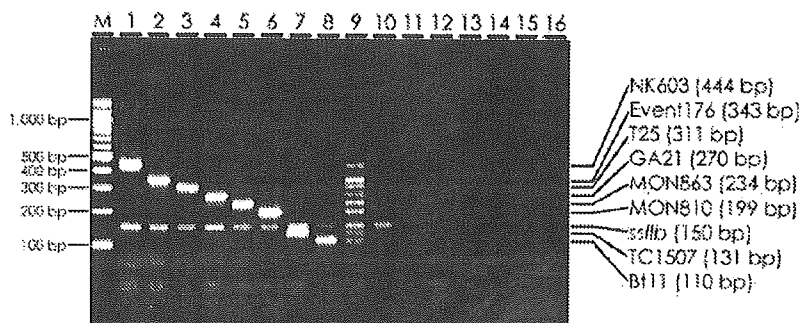


Figure 5. Specificities of the one tube multiplex PCR for eight events of GM maize. Lanes 1–8, amplification of DNAs extracted from the seeds of each event of GM maize, NK603, T25, MON863, TC1507, Event176, GA21, MON810, and Bt11, respectively; lane 9, the simulated GM mixture containing 1% of each event of eight GM maize; lane 10, non-GM maize; lanes 11–15, non-GM soy, RR soy, rice, wheat, and barley, respectively; lane 16, negative control (no DNA); and M, 100 bp ladder size standard. PCR products were electrophoresed on 3% agarose gel.

cycles contained an annealing step with a higher temperature than the subsequent cycles in order to reduce nonspecific primer annealing, and the following 27 cycles were performed to amplify specific products effectively. The other experimental conditions, including the concentration of $MgCl_2$, were the same as described above. Although we examined the use of a higher concentration of $MgCl_2$ in the reaction solution, we found that higher $MgCl_2$ enhanced the amplification of some targets but increased the number of nonspecific amplifications from other crops.

Figure 5 shows a typical result of the multiplex PCR performed under the optimized conditions. The multiplex PCR

amplified two fragments corresponding to a construct specific sequence and a taxon specific *ssIIb* in each of the eight events of GM maize and amplified only an *ssIIb* fragment in the non-GM maize (Figure 5). Because it was expected that amplifications of *ssIIb* with low concentrations of primers (0.045 mmol/L each) were as sensitive as the GM specific amplifications included in the multiplex PCR to the absence of PCR inhibitors in sample solutions, the amplification of *ssIIb* bands could be used as an internal control to distinguish true negative results from PCR inhibition or failure when the samples included maize genomic DNA. This multiplex PCR causes no amplified products from soy, rice, wheat, and barley. These results

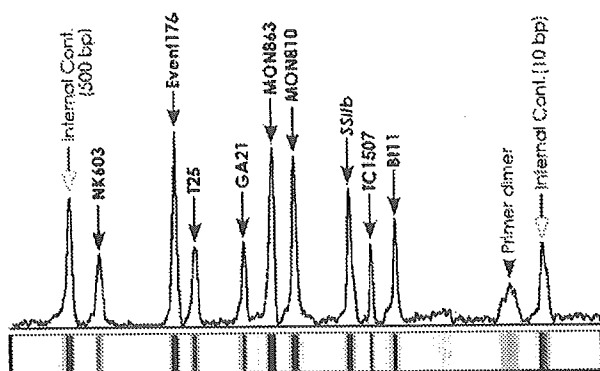


Figure 6. Capillary electrophoresis analysis of the one tube multiplex PCR products. A product amplified from the simulated GM mixture containing 1% of each of eight events was analyzed. The peaks of the amplifications specific to GM maize and the taxon marker are indicated by dark arrows. The lengths of the peaks were estimated by the comparisons of mobility with the internal controls contained in the reagents kit (indicated by the white arrows), and the sizes of the specific peaks corresponded with the expected length. The profile shown under the chromatogram is the simulated gel image generated from the results of the capillary electrophoresis analysis by the software included in the SV1210 microchip system.

indicated that this method is sufficient to distinguish the eight events of GM maize. Furthermore, from the simulated GM mixture containing 1% of each GM event, this multiplex PCR could simultaneously amplify nine different lengths of fragments corresponding to the taxon specific *ssIIb* marker and the eight events of GM maize, respectively, as shown in lane 9 of Figure 5, although the intensities of the bands derived from the nine amplified products were not equivalent.

We analyzed the amplified products by electrophoresis on 3% agarose gels and could distinguish all nine products from the one-tube multiplex PCR. Agarose gel electrophoresis is suitable for routine analyses, because it can be performed simply and cheaply. However, we also examined the capillary electrophoresis analysis using an SV1210 microchip electrophoresis analytical system, which electrophoreses PCR products in a capillary filled with a water soluble cellulose derivative. Figure 6 shows a typical result of the capillary electrophoresis analysis of the amplified products from DNA extracted from the simulated GM mixture containing 1% of each of eight events of GM maize. The capillary electrophoresis could separate fragments more clearly and more rapidly than the agarose gel electrophoresis. The high separation ability of the capillary electrophoresis will enable separation of more amplified products as the number of GM events that the multiplex PCR method can detect continues to grow.

Sensitivity of the Nonplex PCR Method. The sensitivity of the multiplex PCR system was evaluated by applying simulated GM mixtures described above to agarose gel electrophoresis. We performed a one-tube multiplex PCR with DNAs extracted from the simulated GM mixtures and were able to reliably observe all of the nine amplified bands simultaneously from that the stimulated GM mixtures containing more than 0.25% of each of eight events of GM maize (Figure 7). These amplifications, however, could detect the DNAs extracted from the simulated GM mixtures that contained either 0.1 or 0.05% of each of the GM events, but there were few instances in which all of the bands were simultaneously detected, e.g., four out of ten trials for the stimulated GM mixtures containing 0.1% of each of the GM events and one out of eight trials for the

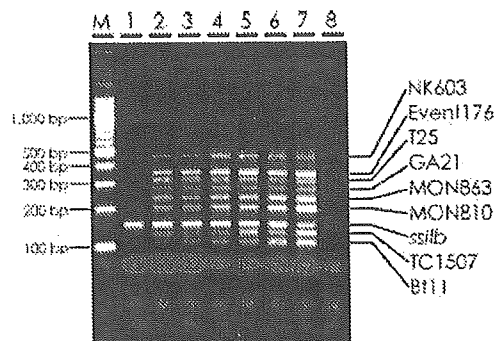


Figure 7. Sensitivity analyses of the one tube multiplex PCR. Amplified products from the simulated GM mixtures containing either 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, or 5% (w/w) of each of the eight events of GM maize are shown in lanes 2–7, respectively. Lane 1, non-GM maize; lane 8, negative control (no DNA); and M, 100 bp ladder size standard. PCR products were electrophoresed on 3% agarose gel.

stimulated GM mixtures containing 0.5% of each of the GM events. Therefore, we concluded that this multiplex PCR method has sufficient sensitivity to detect all eight events of GM maize simultaneously from the samples made up of the stimulated GM mixtures containing 0.25% of each of the GM events. The sensitivity of multiplex PCR, however, might be affected when the one GM event is more concentrated than the others, because the amplifications from a more concentrated GM event might inhibit the amplification of another less abundant target. These results indicated that the multiplex PCR system has sufficient performance as a method for screening GM maize. As a next step, we plan to conduct interlaboratory collaborative trials to determine the practical limits of detection (LOD) of this method, as well as the applicability of this method to processed food samples.

In this study, we proposed a novel qualitative multiplex PCR method to simultaneously detect eight GM events in maize that were currently being grown for commercial purposes. This method was able to specifically detect all eight events with high sensitivity. These results indicated that this multiplex PCR method is an effective qualitative method to screen for the presence of GM maize in non-GM maize materials. Furthermore, this method could be useful as a monitoring method for hybrid stack progenies between two different events of GM maize, because the acreages of these varieties are quickly increasing in the United States. Plans are underway to confirm the reliability of the one-tube multiplex PCR method through interlaboratory collaborative studies.

ABBREVIATIONS USED

bp, base pair(s); CaMV, cauliflower mosaic virus; GM, genetically modified; GMO, genetically modified organism; LOD, limit of detection; PCR, polymerase chain reaction; r-DNA, recombinant deoxyribonucleic acid; RR, Roundup Ready.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Bayer CropScience, Dow AgroSciences LLC, Monsanto Co., and Syngenta Seeds AG for their provision of the GM maize seeds.

LITERATURE CITED

- (1) James, C. Review—Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. *ISAAA Briefs* 2004, 32.

- (2) Regulation (EC) No. 1829/2003. *Off. J. Eur. Union* **2003**, L268, 1–23.
- (3) *Notification No. 2000-31*; Ministry of Agriculture and Forestry of Korea: Seoul, Korea, 2000.
- (4) Hino, A. Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: The Japanese experience. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 126–128.
- (5) Brette, G. M.; Chambers, S. J.; Huang, L.; Morgan, M. R. A. Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control* **1999**, *10*, 401–406.
- (6) Ahmed, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 215–23.
- (7) Gachet, E.; Martin, G. G.; Vigneau, F.; Meyer, G. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *9*, 380–388.
- (8) Holst-Jensen, A.; Rønning, S. B.; Lovseth, A.; Bardal, K. G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 985–993.
- (9) García-Cañas, V.; Cifuentes, A.; González, R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 425–436.
- (10) Matsuoka, T.; Kawashima, Y.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **2000**, *41*, 137–143.
- (11) Matsuoka, T.; Kuribara, H.; Takubo, K.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2100–2109.
- (12) Kuribara, H.; Shindo, Y.; Matsuoka, T.; Takubo, K.; Futo, S.; Aoki, N.; Hirao, T.; Akiyama, H.; Goda, Y.; Toyoda, M.; Hino, A. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 1077–1089.
- (13) Shindo, Y.; Kuribara, H.; Matsuoka, T.; Futo, S.; Sawada, C.; Shono, J.; Akiyama, H.; Goda, Y.; Toyoda, M.; Hino, A. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 1119–1126.
- (14) Wolf, C.; Scherzinger, M.; Wurz, A.; Pauli, U.; Hübner, P.; Lüthy, J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: Testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *210*, 367–372.
- (15) Vollenhofer, S.; Burg, K.; Schmidt, J.; Kroath, H. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5038–5043.
- (16) Hübner, P.; Waiblinger, H. U.; Pietsch, K.; Brodmann, P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1855–1864.
- (17) Brodmann, P. D.; Ilg, E. C.; Berthoud, H.; Herrmann, A. Realtime quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 646–653.
- (18) Permingeat, H. R.; Reggiardo, M. I.; Vallejos, R. H. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and realtime PCR. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4431–4436.
- (19) Collonnier, C.; Schattner, A.; Berthier, G.; Boyer, F.; Coue-Philippe, G.; Dirolez, A.; Duplan, M. N.; Fernandez, S.; Kebdani, N.; Kobilinsky, A.; Romaniuk, M.; de Beuckeleer, M.; de Loose, M.; Windels, P.; Bertheau, Y. Characterization and event specific-detection by quantitative real-time PCR of T25 maize insert. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 536–546.
- (20) James, D.; Schmidt, A.-M.; Wall, E.; Green, M.; Masri, S. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5829–5834.
- (21) Rudi, K.; Rud, I.; Holck, A. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e62.
- (22) Germini, A.; Zanetti, A.; Salati, C.; Rossi, S.; Forré, C.; Schmid, S.; Marchelli, R. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3275–3280.
- (23) Matsuoka, T.; Kuribara, H.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **2001**, *42*, 24–32.
- (24) Kirihaara, J. A.; Petri, J. B.; Messing, J. Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. *Gene* **1988**, *71*, 359–370.
- (25) Harn, C.; Knight, M.; Ramakrishnan, A.; Guan, H.; Keeling, P. L.; Wasserman, B. P. Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **1998**, *37*, 639–649.
- (26) *Japan Agricultural Standards Testing and Analysis Handbook Series*; Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services: Saitama, Japan, 2002.
- (27) *Notification No. 628001*; Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Tokyo, Japan, 2004.
- (28) *Guideline of Detection Methods of Genetically Modified Foods*; Korean Food and Drug Administration: Seoul, Korea, 2005.
- (29) *Testing Manual for Genetically Modified Agricultural Products*; National Agricultural Quality Management Services of Korea: Seoul, Korea, 2002.
- (30) Pietsch, K.; Waiblinger, H. U.; Brodmann, P.; Wurz, A. Screeningverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1997**, *93*, 35–38.
- (31) Matsuoka, T.; Kawashima, Y.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Sebata, T.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **1999**, *40*, 149–157.
- (32) Christensen, A. H.; Sharrock, R. A.; Quail, P. H. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18*, 675–689.
- (33) Liu, L.; Maillet, D. S.; Frappier, J. R.; Walden, D. B.; Atkinson, B. G. Characterization, chromosomal mapping, and expression of different polyubiquitin genes in tissues from control and heat-shocked maize seedlings. *Biochem. Cell. Biol.* **1995**, *73*, 19–30.

Received for review June 29, 2005. Revised manuscript received October 6, 2005. Accepted October 7, 2005. Parts of this study were supported by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan in conjunction with the Research Project, "Assurance of Safe Use of Genetically Modified Organisms" and by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

JF0515476

未承認遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)の検知技術について

渡 邊 敬 浩*

Polymerase Chain Reaction Technology for Detection of Unapproved Genetically Modified Maize Line (Bt10 Line)

Takahiro WATANABE

(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

1. はじめに

2005年3月22日に公開された、オンライン版 Nature 誌の News¹⁾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(GM)トウモロコシ(Bt10 系統)が、2001年から2004年までの4年間にわた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。報道によれば、150 km²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一の構成をもつ一連の DNA 配列(発現カセット)を用いて組換えられた GM トウモロコシ系統であり、よって、Bt10 ならびに 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が生じている(Advisory Committee on Release to the Environment: <http://www.defra.gov.uk/environment/acre/>)。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(GM トウモロコシ CBH351 系統)などの GM 作物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(ゼロトレランス)。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。

GM 作物の検知法としては、これまでも、その特異性および感度の高さから polymerase chain reaction (PCR) 法を応用したさまざまな検知技術が開発され、公定法として定められてきた。また、一概に PCR 法としてとらえてしまいがちであるが、個々の PCR 法はそれが標的とする DNA 配列の差異により特異性がさまざまであり、用途も異なる。本稿においては、Bt10 系統を対象とした PCR 法

の開発に当たり考慮すべき点に併せ、GM 作物を対象とする PCR 法について、その特異性を中心にして概説する。

2. Bt10 ならびに Bt11 系統の特性と PCR 法の特異性

図1に、GM 作物の開発に当たり導入される発現カセットおよび近傍領域の概略を示し、さらに各種 DNA 配列を標的とする PCR 法の特異性についてまとめた。

DNA 組換え技術を用いて目的遺伝子が発現させるためには、遺伝子の発現に必須であり、一般的にシスエレメントと総称される DNA 配列を目的遺伝子の上流および下流域に連結し、一連の発現カセットとして導入することが必要となる。カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター(35S_{pro})や、Nos ターミネーター(NOS_{ter})は植物の組換え DNA 技術において歴史的にも長く用いられてきた代表的なシスエレメントであり、多くの GM 作物の開発にも使用されてきている。

Bt10 ならびに Bt11 系統については、各系統に2つの発現カセットが導入されているが、いずれも完全に同一の構成(コンストラクト)を持ち、発現カセット内の DNA 配列によって2つの系統を区別することはできない。また、同一の発現カセットが導入されていることから明らかなように、発現タンパク質についても同一であるため、タンパク質の違いによっても両系統を区別することはできない。

図1に示したとおり、GM 作物の検知を目的として開発される PCR 法の特異性について見ると、シスエレメントを標的とするもの(スクリーニング PCR 法)、目的遺

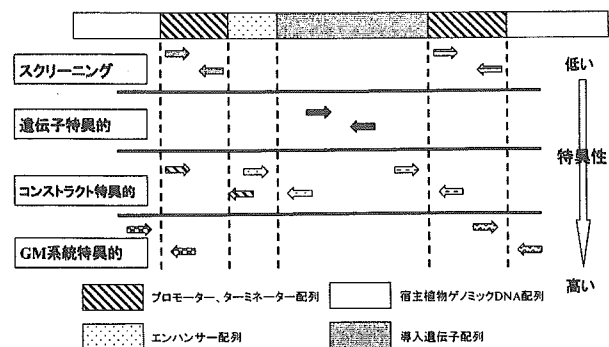


図1. 各種 PCR 法の特異性

* 国立医薬品食品衛生研究所食品部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

伝子を標的とするもの（遺伝子特異的 PCR 法）、シスエレメントと標的遺伝子の境界領域を標的とするもの（コンストラクト特異的 PCR 法）、発現カセットと宿主植物のゲノミック DNA 配列との境界領域を標的とするもの（GM 作物系統特異的 PCR 法）の 4 種に大別することが可能である。

3. スクリーニング PCR 法

スクリーニング PCR 法は、先述のとおり、GM 作物の開発に広く使用されるシスエレメントを標的配列としており、また、当該シスエレメントを抽出した生物が自然界にも広く分布していることから、特異性が最も低い方法と考えることができる。しかしながら、広範な GM 作物を一度に検知可能であるため、汎用性に優れており、スクリーニング用途としては最適の方法である。日本の公定分析法^{2),3)}においても、安全性審査を終了した GM トウモロコシ 5 系統（Mon810, Bt11, T25, Event176, GA21 各系統）を対象とした定量分析法において、35S_{pro} を標的配列とした定量 PCR 法がスクリーニング法として規定されている（厳密には、35S_{pro} を持たない GA21 系統については別途 GA21 系統特異的 PCR 法によって試験し、合算値を求めることが規定されている）。

その用途と実際の GM 作物の流通実態、カリフラワーモザイクウイルスなどのシスエレメント供与生物の混入頻度などを勘案した場合には大きな問題とならないと考えられるが、PCR 法の特異性について十分理解した上で、得られる結果を取り扱うべきと考える。また、スクリーニング検査法として考えた場合には、その対象範囲の設定いかんによって、シスエレメントを標的とした PCR 法以外の方法がスクリーニング用途に用いられる場合がある（後述）。

4. 遺伝子特異的 PCR 法

遺伝子特異的 PCR 法は、GM 作物に導入された目的遺伝子を標的とする方法である。これまでに開発された GM 作物については、付与された形質の共通性が高いため、シスエレメントを標的とする方法ほどではないが、本方法の特異性も高いとはいえない。

トウモロコシを例に挙げれば、除草剤耐性遺伝子としては EPSPS もしくは PAT 遺伝子が、害虫抵抗性遺伝子としては *CryIAb*, *CryIF* あるいは *Cry3Bb* 遺伝子が高い頻度で導入されており、その結果として、同一の目的遺伝子を有する系統が複数存在する。GM 作物中でのタンパク質の発現量を向上させることを目的として DNA 配列に改変が加えられているため、それぞれの遺伝子の供与生物が本来持つ遺伝子とは区別することが可能な場合が多い。しかし、前述のとおり同一の目的遺伝子が導入された複数系統を区別することはできない。再びトウモロコシを例に挙げれば、定量分析法の示されている 5 系統の GM トウモロコシのうち、Mon810, Event176, Bt11 各系統には

CryIAb 遺伝子が共通して導入されており、遺伝子特異的 PCR 法によってこれらを区別することは難しいと考えられる。

また、逆に導入遺伝子の共通性の高さに着目し、スクリーニング PCR 法を開発することも可能である。GM ジャガイモとしては NewLeaf, NewLeaf Plus, NewLeaf Y と呼称される 3 種、全 8 系統が挙げられるが、シスエレメントに関しては共通性が低い一方で、すべての系統に *Cry3A* 遺伝子（害虫抵抗性遺伝子）が導入されている。このため、*Cry3A* 遺伝子を標的とした遺伝子特異的 PCR 法により、GM ジャガイモ全 8 系統を網羅的に検知可能なスクリーニング検査法が開発されている^{4),5)}。

5. コンストラクト特異的 PCR 法

組換え DNA 技術の一般においてコンストラクトとは、発現カセットの構築に用いられたシスエレメントならびに目的遺伝子の種類および、連結の順番、つまりはその構成を指す。Bt10 ならびに Bt11 系統を例に挙げれば、これら 2 系統に導入された発現カセットは 35S_{pro}·*CryIAb*·NOS_{ter}·35S_{pro}·PAT·NOS_{ter} というコンストラクトを持つ。

通常、異なる系統として新たな GM 作物が開発される場合、仮に導入される目的遺伝子が同一であっても、その発現特性を変化させることを目的に、コンストラクトに組み入れられるシスエレメントなどに改変が加えられる。このため、シスエレメントと目的遺伝子の種類および、その連結の順番に特異性を見だし、境界領域を標的配列とすることで、同一の目的遺伝子が導入された系統であっても区別可能となる場合が多い。さらに、ここに挙げるコンストラクトは、各 DNA 配列の供与生物を含む自然界に存在するいかなる生物とも共通性を持たないと考えられることから、その点においても高い特異性を有していると考えられる。

しかしながら、先述のとおり、Bt10 と Bt11 系統のように、同一の発現カセットを用いて組み換えられた複数系統を区別することはできない。また、TC1507 系統は、平成 15 年に安全性審査を終了した比較的新しい GM トウモロコシ系統であるが、この系統には先に安全性審査を終了している T25 系統と一部共通する発現カセットが導入されている（PAT 遺伝子を含む発現カセットのコンストラクトが同一）。先に開発された T25 系統を対象とした検知法は、前述の共通する発現カセットのコンストラクトに特異的となるよう開発されたものであったため⁶⁾、T25 系統と TC1507 系統を区別することができず、対応が必要となった（後述）。

このように、開発される GM 作物系統の歴史の変遷いかんによっては、同一のコンストラクトを持つ発現カセットが導入された異なる系統が開発される可能性を否定できず、特異性の点のみに限って言えば、コンストラクト特異的 PCR 法もまた、最善の検知法とは言いがたい。

6. GM 作物系統特異的 PCR 法

これまでに、GM 作物を対象とした PCR 法を 4 種に大別し、そのうちの 3 種について概説した。スクリーニング、遺伝子特異的ならびに、コンストラクト特異的 PCR 法のいずれもが発現カセット内部の DNA 配列を標的配列としており、それらの間においても特異性が異なることについては上述のとおりである。また、いずれの PCR 法についても、特異性の点からすれば、非特異的な結果を生じる可能性が残る点についても指摘した。

これらの検知法に対し、GM 作物系統特異的 PCR 法は、発現カセットと宿主植物のゲノミック DNA との境界領域（系統特異的 DNA 領域）を標的配列とする方法である。上述の T25 系統と TC1507 系統の問題に関しても、T25 系統特異的 PCR 法の開発を進め、両者を区別可能な検査体制の構築を目指しているところである。また、Bt 10 と Bt11 系統についても、両者を区別可能とする PCR 法は、GM 作物系統特異的 PCR 法のみであり、当該 PCR 法を組み入れた検査法が先般、通知されたところである⁷⁾ (平成 15 年 5 月 17 日付け、食安発第 0517001 号)。系統特異的 DNA 領域が高い特異性を有する検知技術を開発する上で最適である理由について、当該 DNA 領域の情報を得るための方法と併せて、以下、概説する。

7. GM 系統特異的 DNA 領域

植物の組換え DNA 技術における発現カセットの導入方法としては、*Agrobacterium tumefaciens* を介する生物的方法（アグロバクテリウム法）、あるいは発現カセットを含む DNA を付着させた金粒子を用いる物理的方法（ボンバートメント法）が一般的である⁸⁾。いずれの方法を用いた場合においても、発現カセットが導入される宿主植物のゲノム上での位置はランダムに決定され、さらに、宿主植物のゲノムサイズを考えた場合、ゲノム上の同一位置に発現カセットが導入される確率は非常に低いと考えられる。そのため、仮に同一の発現カセットが導入された場合であっても、系統特異的 DNA 領域は各 GM 作物系統に固有の領域となる。

現在では、安全性審査に諮られる際に上記系統特異的 DNA 領域の情報について提出が促されているところであるが、既知の発現カセット内部の DNA 配列情報から、実験的にも当該 DNA 領域の情報を得ることが可能である。

図 2 および図 3 に示した Thermal asymmetric interlaced (TAIL)PCR 法^{9), 10)} および Inverse PCR^{11), 12)} 法は、既知 DNA 配列に近接する未知 DNA 配列の情報を得るために用いられる代表的な方法である。TAIL PCR 法においては、特異的プライマー (specific primer; SP) と任意プライマー (arbitrary primer; AP) を用い、温度およびサイクル条件を変化させた PCR を何段階にも組み合わせて行うことにより、最終的に未知 DNA 配列を含む特異的 PCR 産物を得ることを可能にしている。また、Inverse PCR 法は、既知 DNA 配列と未知 DNA 配列を含む DNA

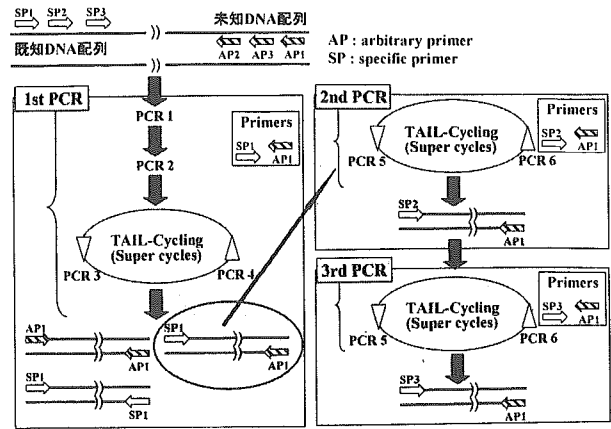


図 2. TAIL PCR 法の概要

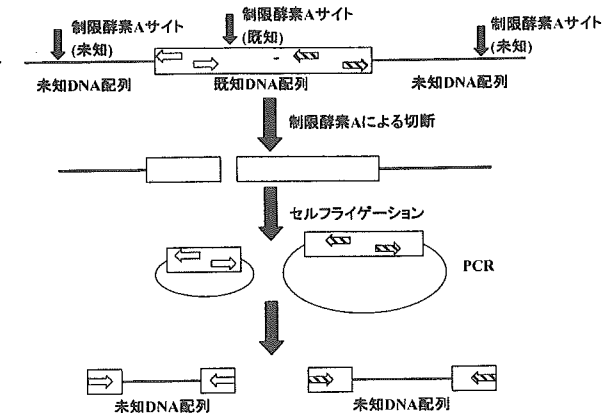


図 3. Inverse PCR 法の概要

断片を制限酵素処理により調製した後、環化させ、既知 DNA 配列の情報に基づくプライマー対を用いて、当該環化 DNA を鋳型とした PCR 増幅を行うことで、未知 DNA 配列の情報を得るという方法である。

GM 作物においては、発現カセットの上流末端あるいは下流末端に位置する部分にはシスエレメントが配置されるのが常であり、これらの情報に合わせて上記実験手法を用いることで、系統特異的 DNA 領域の情報を得ることが可能である。現在のところ、いずれの方法も確実性の点で劣るため、直接的に検知技術に応用することは難しいと考えられるが、検知技術の開発に当たって重要な情報を得るためには有用な方法である。

8. Bt10 系統検査法

平成 17 年 5 月 17 日、食安発第 0517001 号の別添として Bt10 系統検査法が通知された。本検査法は Bt10 検出用プライマー対、Bt10 確認用プライマー対および、トウモロコシ陽性対照用プライマー対をそれぞれ用いる 3 種の定性 PCR 法から構成されている。

Bt10 検出用プライマー対は、本稿で解説したとおり、最も高い特異性を有する GM 系統特異的 DNA 領域 (Bt 10 系統特異的 DNA 領域) を、Bt10 確認用プライマー対は、GM 系統特異的 DNA 領域に次いで高い特異性を有す

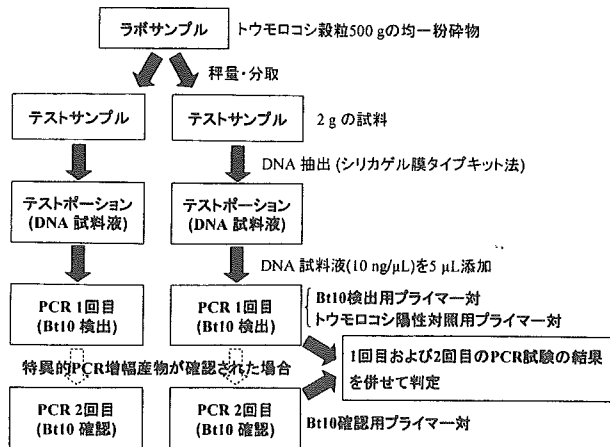


図4. Bt10 検査法の概要

るコンストラクト特異的 DNA 配列をそれぞれ標的としている。また、陽性対照用プライマー対を用いた定性 PCR 法は、試験に供される DNA 試料液の妥当性を確認 (PCR の鑄型として質的に十分な DNA が試験に供されているかの評価) することを目的に、トウモロコシに普遍的に内在する遺伝子 (*Zein* 遺伝子) を標的としている。

検査法の流れとしては、1 検体当たり 2 併行で DNA 抽出を行い、それぞれの DNA 試料液に対して、まず Bt10 検出用プライマー対ならびに、陽性対照用プライマー対を用いた試験を行い、その結果が陽性であった場合には、同 DNA 試料液を対象に Bt10 確認用プライマー対を用いた試験を行うことが指示されている (図 4)。上述のとおり、Bt10 検査法に組み入れられている Bt10 検出ならびに、確認用プライマー対を用いた 2 種の PCR 法は、それぞれ異なる特異性を有している。特異性に関連し、特に Bt10 確認用プライマー対を用いた PCR 法に関しては、コンストラクト特異的 DNA 配列を標的とするため、検体に Bt11 系統が混入していた場合においても、Bt10 系統の混入と同様の結果を与えることに留意しなければならない。本来ならば、検出用、確認用プライマー対ともに Bt10 系統特異的 DNA 領域を標的とする PCR 法とし、それらを組み合わせるべきである。今後、そのように検査法が改訂されていくことが期待される。また、上述のとおり検査体系としていることから、通知中にも記載されているが、検査の流れを遵守し、結果の判定は、Bt10 検出および確認用プライマー対のそれぞれを用いて得られる結果を必ず併せて行わなければならない。さらに、本検査法は、トウモロコシ穀粒を対象としており、その適用範囲についても留意すべきである。検査法の詳細および、結果の判定については通知⁷⁾をご覧ください。

なお、これら検査法に関する検知技術については、国立医薬品食品衛生研究所におけるインハウスバリデーションならびに、6 機関が参加したインターラボラトリースタディによって検証されている。検証試験の結果、Bt10 検出用プライマー対を用いた試験において、非特異的な PCR 増幅産物 (エクストラバンド) が観察される場合が

あるものの、標的とする DNA 配列由来の PCR 増幅産物は、Bt10 系統に特異的に得られ、かつエクストラバンドとは明確に区別可能であったことから、高い特異性が確認された。また、検知下限については、DNA 重量比として 0.05%、トウモロコシ試料重量比として 0.1% 程度であることが示唆されている。

9. おわりに

Bt10 ならびに Bt11 系統の問題を端緒に、PCR 法を用いた検知技術について、その特異性を中心に概説した。

安全上の問題ということではないが、GM トウモロコシに関しては、複数の GM トウモロコシ系統の交配により作出されるスタック品種に対する取り組みが、国際的にも大きな関心事となっている。また、サイズなど、すでに GM 系統が存在する作物種、さらには、これまでは GM 系統の存在しなかった新たな作物種における開発の情報も得られており、GM 作物は、系統および作物種の両面において今後幅広い展開を見せることが予想されている。また、本稿で取り上げた Bt10 系統の問題が注目されたのと同時期に、中国産の Bt ライスの問題が発生した。当該 Bt ライスに関しては安全性審査に諮られていないことはもとより、正確な情報が皆無に等しい状態にあり、乏しい情報の確認作業と検知技術の開発に追われている。このように、GM 作物をめぐる状況は日々変化しつつ、さらに複雑化の様相を呈しているが、開発者側からの迅速かつ正確な情報の提供に加え、継続的に優れた検知技術の開発を進め、検査体制の拡充を図ることが、食の安全・安心を確保するためには肝要であると思われる。なお、本稿で概説した PCR 法の特異性を含む GM 作物検知技術および、それらを用いた検査方法の全般については、詳細にまとめられた総説^{13), 14)}が発表されており、関心のある方はご一読いただきたい。

参考文献

- 1) Nature 434, 423 (2005).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)”平成 16 年 6 月 28 日、食安発第 0628001 号 (2004).
- 3) 独立行政法人農林水産消費技術センター、JAS 分析試験ハンドブック“遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル” (2001) http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual00.htm.
- 4) Watanabe, T., Kuribara, H., Mishima, T., Kikuchi, H., Kubo, M., Kodama, T., Futo, S., Kasama, K., Toyota, A., Nouno, M., Saita, A., Takahashi, K., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Biol. Pharm. Bull., 43, 301-305 (2004).
- 5) Jaccaud, E., Hohne, M., Meyer, R.: J. Agric. Food Chem., 51, 550-557 (2003).
- 6) Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirano, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A.: J. AOAC Int., 85, 1,077-1,089 (2002).

- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について” (一部改正) 平成 17 年 5 月 17 日, 食安発第 0517001 号 (2005).
- 8) 小関良宏: 「植物における遺伝子組換え技術」遺伝, **55**, 29-34 (2001).
- 9) Liu, Y.-G., Whittier, R. F.: *Genomics*, **25**, 674-681 (1995).
- 10) Teraushi, R., Kahl, G.: *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 554-560 (2000).
- 11) Ochman, H., Gerber, A. S., Hartl, D. L.: *Genetics*, **120**, 621-625 (1988).
- 12) Rønning, B. S., Vaitilingom, M., Berdal, G. K. Holst-Jensen, A.: *Eur. Food Res. Technol.*, **216**, 347-354 (2003).
- 13) Holst-Jensen, A., Rønning, B. S., Lovseth, A., Berdal, G. K.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 985-993 (2003).
- 14) Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D., Song, P., *J. AOAC Int.*, **88**, 136-155 (2005).

筆者の PROFILE

渡邊敬浩 (Takahiro WATANABE)

国立医薬品食品衛生研究所 食品部 研究員

筑波大学生物科学研究科修了, 理学博士

(専門分野) 植物生理学, 植物分子生物学 (および, それに基づく検知技術の開発)

(主な著書) 「食品衛生検査指針 (理化学編)」 (分担執筆) (社) 日本食品衛生協会 (2005)

新規統合型アレルゲンデータベース Allergen Database for Food Safety (ADFS) の構築

中村亮介・手島玲子[#]・高木加代子・澤田純一

Development of Allergen Database for Food Safety (ADFS): an integrated database to search allergens and predict allergenicity

Ryosuke Nakamura, Reiko Teshima[#], Kayoko Takagi and Jun-ichi Sawada

Allergy has been one of the most common chronic health problems in recent years, and the introduction of recombinant proteins into foods and other products has raised public concern about the induction of allergy. Prediction of food allergenicity is very important but still unsatisfactory. By using an enormous amount of data produced by genomic, functional, and structural studies, bioinformatics can provide useful insights into allergenicity.

We have developed a web server database system which is comprised of allergenic proteins for food safety and homology search tools, "Allergen Database for Food Safety (ADFS)"¹⁾. Since ADFS includes the sequences of known allergens and B-cell epitopes, a potential allergenicity of a novel protein in food should be detected by homology search.

The database contains allergens classified into 8 categories (pollen, mite, animal, fungus, insect, food, latex, and others), together with the public database accession numbers of their genes, and their epitope and 3D-structure information. Users can easily search allergens with keywords and amino acid sequences through the graphical interfaces.

1) URL : <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>

Key Words: allergen, database, food safety, allergenicity prediction, epitope

(Received May 31, 2005)

1. はじめに

今日の生物学において、世界中の研究者が容易にアクセスできる大規模データベースと洗練された解析ツールは必須なものとなっている。遺伝子やタンパク質の一次配列に関するこの種のデータベースについては、日米欧において満足のいく機能を持つものが複数構築されている。しかし、アレルゲンに関しては、小規模なデータベースは数種あるものの²⁾、その分類学的情報や一次配列等、様々な情報を集め解析する有用なデータベースは、未だ確立されていない。そこで本研究では、新開発食品のアレルゲン性を予測する目的でアレルゲンに関する既存の各種データベースや一次文献の情報を集積し、アレルゲン名・カテゴリ（花粉・ダニ・動物・カビ・昆虫・食物・ラテックス・その他）・キーワード（動物種・一般名等）およびアミノ酸配列等により検索可能な新規統合型アレルゲンデータベース（Allergen Database for

Food Safety; ADFS) を構築した¹⁾。さらに、新規産生タンパク質と既知アレルゲンとの交差反応を考える上で非常に重要となるB細胞エピトープ（抗原決定基）情報および立体構造情報（PDBエントリ）をここに付加した。特に、エピトープ情報に関しては独自に新たな文献検索を行ない、データ整備に努めた。また、このデータベースは、FAO/WHOが提唱するタンパク質のアレルゲン性予測インターフェイスを有しており、アレルゲン性予測ツールとしても利用することができる。

2. 方法

データは原則としてすべて2004年3月の時点で収集・解析した。なお、エピトープ情報については、2005年3月現在のデータを入力した。アレルゲンの一次配列データは、List of Allergens in Swiss-Prot³⁾、Allergen Nomenclature⁴⁾、The Biotechnology Information for Food Safety Database⁵⁾、SDAP-Structural Database of Allergenic Proteins⁶⁾より収集し、IDが重複するものを除いた。IDの優先順位は、SwissProt, Pir, TrEMBL, GenBank/GenPeptの順とした。登録されている配列デー

[#]To whom correspondence should be addressed: Reiko Teshima; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.243; Fax: 03-3707-6950; E-mail: rteshima@nihs.go.jp

タがcDNAの場合、TrEMBLにより対応するアミノ酸配列を取得した。

各アレルゲンのアノテーション情報(動物種・一般名・註釈等)はSDAPから収集し、同サイトが提供する「Source」属性を、8種のカテゴリ(花粉・ダニ・動物・カビ・昆虫・食物・ラテックス・その他)に再編成した。また、下記に示す11のキーワードによりEntrez PubMed内を検索し、エピトープ情報を含む文献を抽出し、精読した後SDAPのエピトープ情報に追加した。

IgE-Binding, Epitope, Identification, Immunoglobulin E, Epitope Mapping, Sequence, Analysis, Peptide, Recognition, IgE-epitopes, Linear

システムの構成としては、OSとしてSolaris 9を、サーバーエンジンとしてTomcat 5.0.28を、WebサーバーとしてApache 2.0.53を、データベースエンジンとしてMySQL 4.0を、SRSシステムとしてSRS 7.1.3にUniProtデータベースを導入したものを用いた。アミノ酸配列に基づくアレルゲンタンパク質の検索(Protein Search)にはprotein-protein BLAST (blatp 2.2.10)を、エピトープ配列内の検索(Epitope Search)にはBLAST Search for short, nearly exact matchesを用いた。FAO/WHOに提唱されたタンパク質のアレルゲン性予測法⁷⁾としては、Hilemanらの方法⁸⁾を一部改変したものを用いた。すなわち、FASTAアラインメントプログラム(Ver. 33t08d4)によりクエリ(ユーザにより問われている)タンパク質の全長を既知アレルゲンと比較し、得られたアラインメント中のオーバーラップアミノ酸長(およびその一致率)と連続一致アミノ酸長をそれぞれ異なる閾値で判定するというものである。

3. 結果

3.1 アレルゲン検索

重複のないアレルゲンの一次配列データとして730種を選出し、データ精査の後、ウェブブラウザで検索できるデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)として公開した¹⁾。Fig.1aはその検索画面である。様々な検索手法を視覚的にレイアウトし、初見ユーザにも戸惑うことなく操作できるよう配慮した。個々のアレルゲンに関する詳細な情報は、別ウインドウに表示される。Fig.1bに、Bos d 6(ウシ血清アルブミン)の例を示した。詳細データ表示画面からは、UniProt, GenBank, PDB, Entrez PubMedへのリンクが適宜貼っており、必要に応じて外部のデータベースを参照することを可能にした。

我々が行った今回の文献調査では、エピトープ情報に関する32報の論文が見つかり、32種のアレルゲン(Ana o 1.0101, Ana o 1.0102, Ana o 2, Asp f 1, Asp f 3, Ber e 1, Bla g 7, Blo t 10, Blo t 11, Bos d 6, Bos d 8,

Cry j 2, Fag e 1, G2a, Gal d 1, Gal d 2, Hel a 2, Hev b 6.02, Jug r 1, Jun a 1, Tri a 19, Par j 1, Par j 2, Pen a 1, Pen ch 13, Pen ch 18, Pen n 18, Phl p 13, Phl p 5.0102, Pru av 1, Pru p 3, およびSes i 2)に対し、計201種のエピトープ情報を追加することができた。これらの情報をSDAPによる既知エピトープ情報に加えることにより、エピトープが一つ以上明らかになった登録アレルゲン(立体エピトープを含む)の数は43種になった。また、立体構造が分かっているアレルゲンは157種存在した。これらエピトープおよび立体構造が分かっているアレルゲンの情報は、ADFSのKeyword Searchより知ることができるようにした。

ユーザは、興味あるアミノ酸配列と相同性のあるアレルゲンをBLASTアルゴリズムにより高速に検索することが可能となり(Protein Search)、E-value(閾値として利用する期待値)やMatrix(アミノ酸置換スコアの行列)などのオプションはユーザが任意に設定できるようにした。また、特にエピトープ配列に限っての検索は、Epitope Searchにより行なうこととした。Epitope SearchではE-valueおよびMatrixの初期値を短いアミノ酸配列に最適化してあり、4残基からなるエピトープも検索することができるようになった。この機能を用いると、エピトープ既知のアレルゲンの場合、そのエピトープ配列をADFS内のエピトープ配列または全配列、あるいはUniProt内の全配列に対して検索し、交差反応性の疑いがあるタンパク質を検索することが可能となった。たとえば、大豆のアレルゲンG2aのエピトープである、²¹⁹SGFAPEFLKEAFGVN²³³をEpitope Searchにかけると、G2a自身の他に、ピーナッツのアレルゲンAra h 3が検索結果として出力される。これらはいずれもグリシンというタンパク質で、実際両者の間には交差反応性があることが報告されている⁹⁾。

3.2 アレルゲン性予測

タンパク質のアレルゲン性予測は、現在FAO/WHOの方法(2001年)に準じたものが可能である。2001年FAO/WHO法⁷⁾とは、1)シグナル配列を除いたクエリタンパク質をN末端側から80残基(またはそれ以上)のアミノ酸ウインドウで順に区切ってゆき、FASTAアラインメントプログラムにより既知アレルゲンとの比較を行ない、35%以上のアミノ酸が一致する場合や、あるいは2)クエリタンパク質の6~8残基の連続するアミノ酸が既知アレルゲンと完全一致する場合にアレルゲン性が疑われる、とするものである。しかし、上記方法はウインドウ単位に細分化されたクエリ配列を大量に処理する必要があり、計算速度の遅延を招く。そこでADFSにおいては、FAO/WHO法の改変法を用いることにした⁸⁾。すなわち、まずクエリ配列の全長をFASTAアラインメ

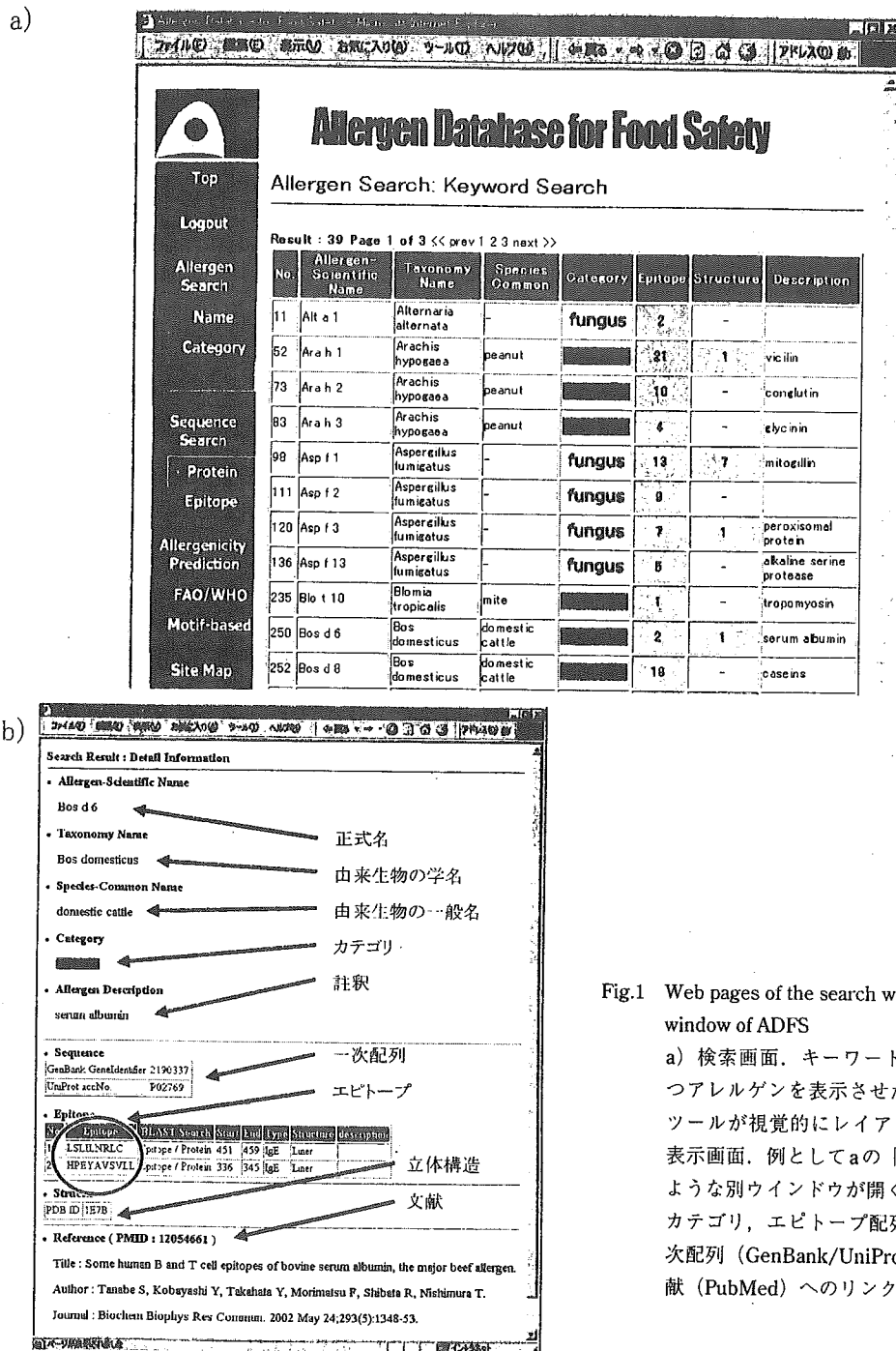


Fig.1 Web pages of the search window and the detailed information window of ADFS

a) 検索画面. キーワード検索によりエピトープ情報を持つアレルゲンを表示させた例. 左側には様々な検索・解析ツールが視覚的にレイアウトされている. b) 詳細データ表示画面. 例としてaの「Bos d 6」をクリックするとこのような別ウィンドウが開く. アレルゲンの動物種や一般名, カテゴリ, エピトープ配列などが表示されるとともに, 一次配列 (GenBank/UniProt), 立体構造 (PDB/HSSP), 文献 (PubMed) へのリンクが示される.

ントにより既知アレルゲンとの相同性比較を行ない, 1) 両者においてオーバーラップしているとみなされたアミノ酸長が80残基以上に達し, かつその35%以上のアミノ酸が一致する場合, あるいは2)連続して完全一致した最大アミノ酸長が6~8残基以上に達した場合に「陽性」と判定される. いずれの手法においても, 1)はタンパク質の比較的大きな構造の類似性を調べるもので, 2)は局所的な一致をみるものである. ユーザはこれらのパラメータおよびE-valueを任意に変更し, クエリタンパク質のアレルゲン性を予測するとともに, 類似する既知

アレルゲンに関する情報を容易に得ることが可能になった.

以上のADFSの機能をまとめると, Fig.2のようになる.

4. 考察

大規模な公的データベースであるSwissProt, Pir, GenPept/GenBankにはそれぞれ593種, 348種, 668種の互いに重複するアレルゲンが登録されていたが, ADFSはこれらを統合し, 730種のエン트리としてまとめた. これは, アミノ酸配列比較に基づくアレルゲン性