

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、スキャナを用いてコンピュータに画像を取り込んだ。得られた画像はImage Master Platinum (Amersham Pharmacia Biotech)により画像解析を行った。

C. 研究結果

遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴのプロテオーム解析

遺伝子組換えアマゴと1齢および2齢の非遺伝子組換えアマゴそれぞれ4個体を1つのグループとし、3つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

非遺伝子組換えアマゴのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図(図1、上段左)をリファレンスとして解析したところ、遺伝子組換えアマゴのグループと、非遺伝子組換えアマゴのグループ間で、89.5%のスポットが共通して検出され、残りの10.5%に相当するスポットが遺伝子組換えアマゴのグループのみで検出された(図2)。

D. 考察

遺伝子組換えアマゴは、サケの成長ホルモンを導入することにより、発達ステージが非遺伝子組換えアマゴとは大きく異なっているため、発達ステージが1齢や2齢といった限られたアマゴとの比較だけでは、中間的な発達ステージに特異的なタンパク質を見落としてしまう可能性がある。よって、本研究では、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の間で10.5%のタンパク質の差を検出したが、これらが遺伝子を組換えることにより、新たな遺伝子発現を誘発して生じた差であるとは結論づけることはできない。より詳細なプロファイリングをする必要があると考えらる。

E. 結論

遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴのプロテオームによるプロファイルの比較検討を行ったが、遺伝子組換えアマゴにおいて遺伝子を組換えることにより新たな遺伝子発現が起こっていることを明確に示す結果は得られなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

佐々木和生、梅津博紀、山川隆、太田大策、小関良宏「プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用 3. 組換えダイズと非組換えダイズのプロファイルの比較」日本食品化学学会第12回学術大会、名古屋、2006年6月。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

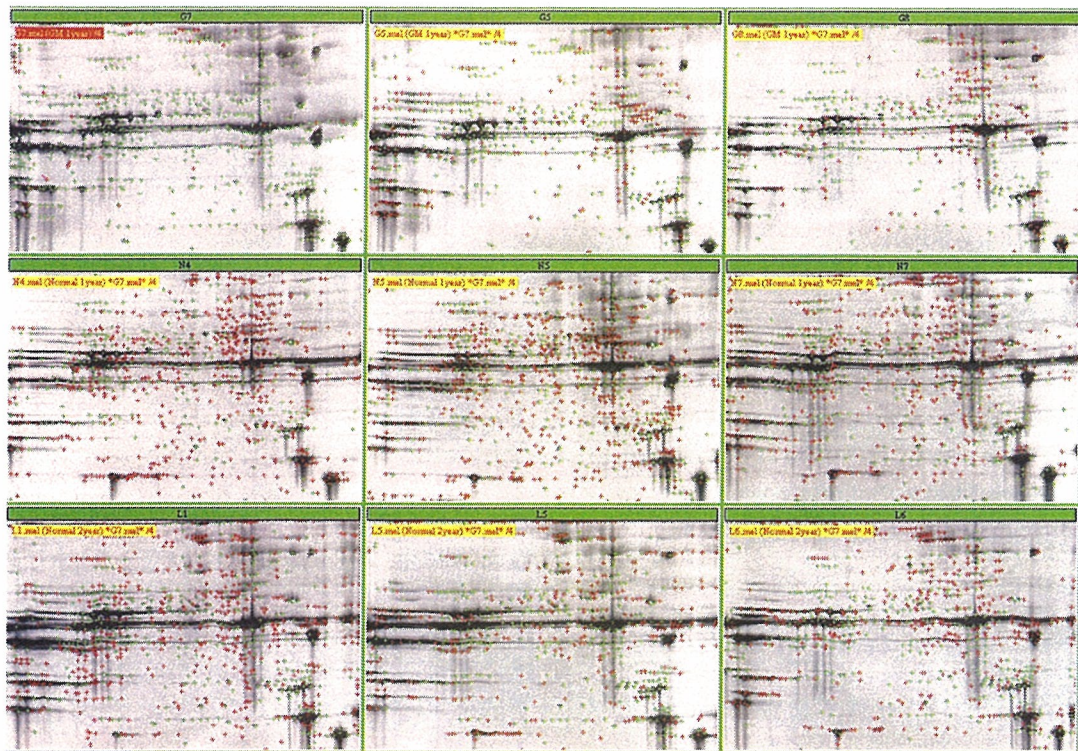


図1 遺伝子組換えアマゴをリファレンスとした解析
 緑は、リファレンスと共通して検出されているスポット。
 赤は、リファレンスと共通していないスポット。
 上段が組換えアマゴ、中段が1歳の非組換えアマゴ、下段が2歳の非組換えアマゴ

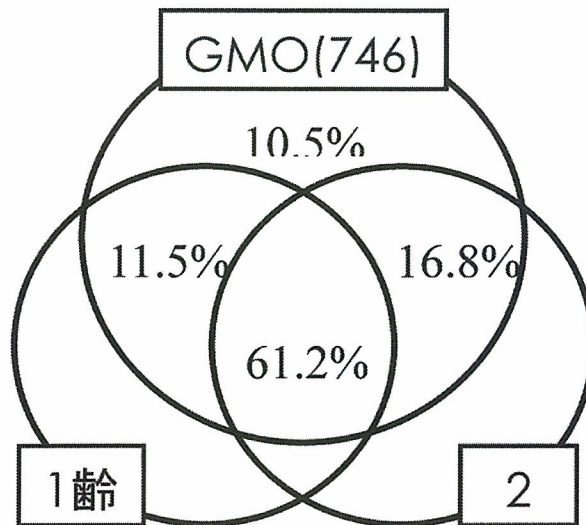


図2 組換えアマゴと共通するスポットの割合
 組換え体のグループ内でリファレンスと共通するスポット 746 個に対し、
 89.5%のスポットが非組換え体でも共通して検出された。

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書（平成 18 年度）

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究
遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究(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

アマゴ遺伝子組換えによって栄養素の増減、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、遺伝子組換えアマゴと非組換えアマゴの組織中非タンパク性成分(代謝成分)の総和(メタボローム)を解析し、その組成と成分含量を比較・検討する研究(メタボロミクス)が必須である。メタボロミクス研究においては、様々な質量分析実験の組み合わせによって代謝成分の分析が行われる。本研究では、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置(FT-ICRMS)を使用した高分解能マススペクトル測定によって代謝成分の分析を行った。FT-ICRMS 法では、試料抽出物に含まれる成分を未精製のまま一斉分析することが出来るため、遺伝子組換えアマゴ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 18 年度は、FT-ICRMS を用いたメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法による FT-ICRMS 分析、マススペクトルデータ(質量数と各ピーク強度)の高速処理と多変量解析の実験系を整備し、遺伝子組換えアマゴ(1 年齢)と非組換えアマゴ(1 年齢、2 年齢)のメタボロームを ESI 陰イオンモードおよび陽イオンモードで比較した。組換え・非組換えによるメタボロームの差は見られなかったが、遺伝子組換えアマゴ(1 年齢)と非組換えアマゴ(2 年齢)のメタボロームには類似性が認められた。すなわち、アマゴ遺伝子組換えによって成長が促進され、遺伝子組換え 1 年齢アマゴ肉は非組換え 2 年齢アマゴの肉に類似した成分構成となっていると推察された。

協力研究者

太田大策(大阪府立大学・大学院 生命環境科学研究科)

A. 研究目的

遺伝子組換え技術によって様々な生物に有用形質を導入することが可能である。このような遺伝子組換え体を食品として利用する

際の安全性に関して社会的な注目があり、実質的同等性の確認を目的とした多岐に渡る分析が行われてきている。まず導入遺伝子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が無い事とともに、遺伝子組換え体と非組換え体の間で遺伝子発現の様相(トランスクリプトーム)やタンパク質の種類・量に変化(プロテオーム)が生じていないか、さらに遺伝子組み換え操作によ

て非タンパク性成分(代謝成分 =メタボローム)の種類や量に差異が生じることがあるかどうかについても検討が加えられるべきである。そこで、遺伝子組み換えアマゴと非遺伝子組み換えアマゴに含まれる代謝成分(メタボローム)を分析・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>

遺伝子組換えアマゴ(1年齢、5検体)と非組換えアマゴ(1年齢 5検体、2年齢 5検体)の背肉部分を供試した。

<方法>

アマゴ背肉に含まれる化合物の一斉分析

アマゴ背肉を液体窒素により凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。2 ml のメタノールを加え、さらに磨砕した後、フィルター(Advantec, DISMIC-13JP, pore size; 0.2 μm)濾過して粗抽出液とした。この粗抽出液を蒸発乾固した後、溶媒(50%(v/v) アセトニトリル / 水)に溶解した。分析に際し、陽イオン測定時には 0.1% (v/v) ギ酸を含む 50%(v/v)アセトニトリルで 10 倍希釈、陰イオン測定時には 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、陽イオン測定時には 1 μM 、陰イオン測定時には 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に示す。

Needle Voltage; 3000 V, Capillary DC; 75 or -75 V (Positive mode or Negative mode), Skimmer Voltage; 15 or -15 V, Shutter Voltage; -50 or 50 V, ADC Rate; 4 MHz, Number of Sample; 512 or 1024 k (Pos or Neg). Accumulation Time at Hexapole; 5000 or 8000 msec (Pos or Neg). Flow rate; 0.5 or 0.35 ml/min (Pos or Neg).

この分析条件で、各抽出液から 30 回の分析マススペクトルを取得した。それぞれのマススペクトルから約 300 のイオンピークを観測した。観測したすべてのイオンピーク(30 回分析 x 300 個のイオンピーク)は添加した質量補正用の内部標準物質の質量理論値を用いて自動補正した。得られた精密質量データと存在比データは、多変量解析によって代謝産物の成分の種類と含量の傾向としてクラスター化して比較した。本研究においては FT-ICRMS 分析で得られた分子イオン観測データに対する主成分分析のため、独自に開発した FT-ICR MS メタボロミクス計算アルゴリズムを使用した。

C. 結果・考察

アマゴのメタボロームの一斉解析

アマゴに含まれる成分のメタノール抽出物を FT-ICRMS で分析した。FT-ICRMS 分析は、陽イオンモードと陰イオンモードにて行った。取得したスペクトルデータにおいて、イオンピークの m/z 値は質量、ピーク強度は

存在比を示す。すなわち、それぞれのスペクトルデータから m/z 値とその強度を定量化し、それぞれの検体のメタボローム(代謝産物の種類と存在量)の比較が可能である。

図1と図2に、組換え体アマゴ背肉成分と非組換え体アマゴ背肉成分のメタボロームを主成分分析によって解析した際のそれぞれの結果を示す。陽イオンモード分析(第一主成分の寄与率 41.5%と第二主成分の寄与率 15.1%)では(図1)、組換え体と非組換え体では明確なメタボローム差はなかったが、魚齢によるメタボローム差が認められた。すなわち組換え体1年齢と非組換え体2年齢のメタボロームはほとんど区別できなかったが、非組換え体1年齢は独立したメタボロームクラスターを形成する傾向にあった。一方、陰イオンモード分析(第一主成分の寄与率 39.3%と第二主成分の寄与率 21.2%)では(図2)、組換え体と非組換え体の間でのメタボローム変動は認められなかった。また、陽イオンモード分析で認められた魚齢に依存したメタボローム形成は認められなかった。

まとめ

組換え体アマゴ背肉(1年齢)および非組換え体アマゴ背肉(1年齢, 2年齢)を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。その際の主成分分析の結果は、組換え体アマゴ背肉と非組換え体アマゴ背肉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、今回供試したアマゴ背肉メタボロームは、組換え・非組換えの違い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いと考えられる。図1の結果は、生育

量に依存した肉質変化を反映しているものと推察された。すなわち生育速度の速い組換え体1年齢は非組換え体2年齢と類似のメタボロームを形成している可能性が示唆された。

これまでに構築したFT-ICRMSを基礎とした実験系において、組換え体と非組換え体の代謝成分の一斉分析と主成分分析によるマクロなレベルでのメタボローム比較が可能であった。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、そのデータから分子式の推定も可能であり、メタボロームクラスターを形成に寄与する代謝成分同定も可能である。

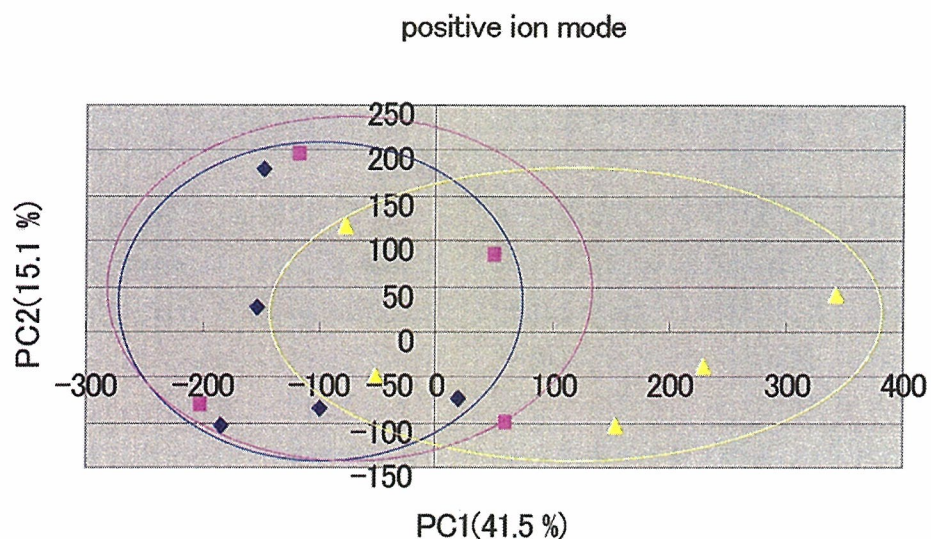


図2 アマゴ背肉成分[組換え体(1年齢)5サンプル, 非組換え体(1年齢、2年齢)5サンプル]をそれぞれ陰イオンモードで一斉解析し30連のスペクトルから再現性を持って出現する300種類のイオンについて多変量解析した結果. 各データポイント(■, 組換え体1年齢; ▲, 非組換え体1年齢; ◆, 非組換え体2年齢)は独立したサンプルに対応する.

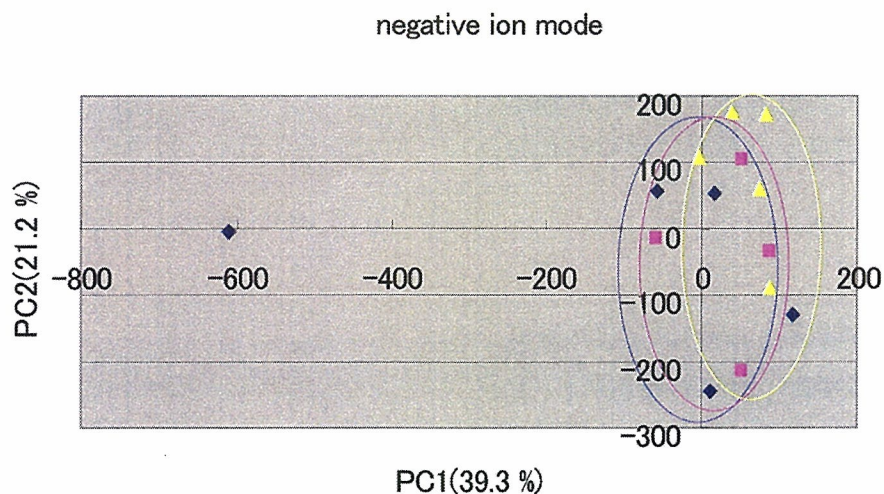


図1 アマゴ背肉成分[組換え体(1年齢)5サンプル, 非組換え体(1年齢、2年齢)5サンプル]をそれぞれ陽イオンモードで一斉解析し30連のスペクトルから再現性を持って出現する300種類のイオンについて多変量解析した結果. 各データポイント(■, 組換え体1年齢; ▲, 非組換え体1年齢; ◆, 非組換え体2年齢)は独立したサンプルに対応する.

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書（平成18年度）

遺伝子組換え体の検知技術の開発に関する調査研究

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

(1) 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LLRice601系統)を対象とした検知技術の開発

安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメ(LLRice601系統)を対象とした検知技術として、コメに特化した簡便なDNA抽出法を開発した。また、開発会社から提供されたreal-time PCRの原理に基づく方法の改良及び、新規の結果判定法の開発により、LLRice601系統を正確に検知することが可能となった。さらに、本技術の妥当性を2分析機関による共同試験によって確認した。

(2) 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメ (Bt rice) の検知技術の検討

EUで中国産安全性未審査遺伝子組換えコメがビーフン等の加工品に流通していた事実が報道された。そこで遺伝子組換えコメが使われているビーフンを購入し、DNA抽出法、DNA解析を行った。その結果、当該ビーフンにはGM Shanyou 63系統であるBtコメが混入されていることが明らかとなった。またその解析結果をもとにPCR法を用いた米粉及び米を含む加工品中のBt63米の定性検知法を開発した。

(3) LightCycler systemを用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の確立

LightCycler systemを用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法について改良を行った。分析試料であるゲノミックDNAに超音波処理および制限酵素処理を組み合わせることでプラスミドDNAとゲノミックDNAのPCR効率を一致させることが可能となった。さらにPCR試薬、PCR温度条件の検討と併せて検討し、繰り返し再現性良く遺伝子組換えトウモロコシ(MON810)を定量可能な分析法を確立した。

(4) 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

GMダイズ1系統(RRS)の定性検知技術について、その妥当性を確認することを目的とした。国内14機関の参加の下、試験所間試験を行い、その結果を集計・解析したところ、RRSの定性分析法の検知下限は0.1%であることが示され、妥当性の検証がなされた。

(5) 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

インターネット上に公開されているデータベースを精査することにより、これまでに開発された遺伝子組換え作物の作物種、付与された形質の種類、作出方法及び、形質発現のために使用されたシスエレメントの種類に関する様々な情報を整理、蓄積した。

(6) トウモロコシ加工食品からのDNA抽出精製法の検討

DNA抽出精製法の効率化を目的とし、現行のトウモロコシ加工食品の試料調製法について比較検討を行った。その結果、乾燥状態のトウモロコシ加工食品については、試料調製法に厚労通知法の乾式法を適用することにより、作業効率の改善が可能となった。また、DNA抽出精製法については、厚労-Gtip法を種々のトウモロコシ加工食品に適用することにより、抽出操作の簡略化および経費削減が可能となった。

協力研究者

稲山浩、渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所）、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）、橘田和美、古井聡（独立行政法人食品総合研究所）、児玉貴志（独立行政法人農林水産省消費技術セ

ンター）、峯岸泰孝（株式会社）、小関良宏、佐々木伸大（東京農工大学）

A.研究目的

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LLRice601系統)を対象とした検知技術の開発

平成 18 年 8 月、アメリカ農務省により、安全性の確認されていない遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) が微量に栽培されかつ流通していた事実が公表された。LLRice と呼ばれる遺伝子組換えコメの系統には、LLRice06、LLRice62 及び LLRice 601 の 3 系統が存在する。これらの系統は、類似の形質転換用ベクターを用いて作出されたと推定され、さらに組換え親の品種もしくは組換えの手法が異なる(このため、正確には各系統は系統として区別されるのではなく、独立した遺伝子組換えコメ品種として識別されるべきと考える)。米国内においては、平成 18 年末に LLRice601 系統の安全性には問題がないとの発表が成されたことにより、前述の 3 系統の全てが承認済みの状態にある。しかし、我が国においては、いずれの系統も安全性審査に諮られておらず、これまでにスターリンク (CBH351 系統) や Bt10 系統等に対してとられたものと同様、少なくとも食品としては国内流通を禁止する施策がとられるものと考えられる。また、上記施策を講じるためには、LLRice 各系統を特異的かつ高感度に検知可能な科学的検証法が必要とされる。本研究においては、安全性審査の状況から勘案し、3 系統を区別することなく検知可能なコンストラクト特異的な検知技術の開発を試みた。流通の事実及び入手試料の制限により、開発された方法の検証作業には、開発者である Bayer 社より提供された LLRice601 系統を含む標準試料を用いた。このため、開発された検知技術に基づき評価された分析法は、LLRice601 系統を対象とした分析法となる。なお、検知技術の開発に当たっては、real-time PCR を応用した定性分析法が Bayer 社から各国政府に対し公開されたため、本方法を骨格とした改良法について検討した。また、改良法の性能を評価する目的で、2 分析機関による共同試験を実施し、得られた結果を解析した。

2. 安全性未審査遺伝子組換えコメ (Bt 系統) の検知技術の検討

中国で開発された遺伝子組換え米 (Bt63 米) は、殺虫活性を示す *Bacillus thuringiensis*

(Bt) 由来 CryI Ac タンパク質の遺伝子を導入した遺伝子組換え米である。日本では Bt63 米に関して食品の安全性未審査であるため、輸入時に米及び米を含む加工品に対しモニタリング検査を行い、国内流通を防ぐ必要がある。本研究では、文献情報と DNA データベース情報に基づいた解析から輸入ピーフンから Bt63 米の混入を同定した。またその解析結果をもとに PCR 法を用いた米粉及び米を含む加工品中の Bt63 米の定性検知法を開発した。なお、本報告においては CryI Ac タンパク質を発現する遺伝子組換えコメを Bt コメと仮称することとする。

3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良

定量 PCR 法は、安全性審査を終了した遺伝子組換え作物 (トウモロコシ 5 系統、ダイズ 1 系統) を対象とする定量分析法として、現行公定法 (最新は食安発第 0629002 号 (一部改正)、平成 18 年 6 月 29 日)⁶⁾ において示されている分析方法である。本定量 PCR 法の適用可能機種としては、ABI PRISM 7700、7900(96 ならびに 384well)、7000、5700、7500 および LightCycler system が指定されているが、平成 15 年度に実施された外部精度管理試験の結果として、LightCycler system を用いることにより真値とは異なる分析結果が得られる場合があり、また結果の安定性にも問題があることが指摘された⁷⁾。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、キャピラリー型専用の反応チューブを用いて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、高次構造が定量結果に影響を与えている可能性が考えられた。本研究においては、遺伝子組換えトウモロコシを対象に LightCycler system を用いて得られる定量結果の安定性向上のために、公定分析法に示されている方法とは異なる DNA 抽出法の適用および定量 PCR 試薬の変更、抽出ゲノムの前処理法について検討した。

4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

組換え DNA 技術を応用した食品 (遺伝子組換え食品) については、平成 13 年 4 月の安全性審査の義務化に伴う食品衛生法施行

規則の改正等により表示の義務化が実施されている。この表示制度の導入に伴い、表示の監視および加工食品企業における原材料の品質管理に必要となる遺伝子組換え食品の検知技術の開発が世界的に進められている。我が国においても、担当機関の参画するグループにおいて遺伝子組換え (GM) ダイズおよびトウモロコシについて、PCRを用いた定量法および定性法が開発が行なわれている。各 GM 系統特異的な定量法については、その妥当性についても検証を行っているが、定性法の妥当性検証は終了していない。本試験研究においては、GM ダイズ 1 系統の定性検知技術について試験所間試験を行い、その妥当性を確認することを目的とする。

5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

組換えDNA技術が、新たな育種手法として確立し、広範に使用されるようになるにつれ、作物管理の不徹底や遺伝子組換えに関する意識の異なりから、各種情報の付帯しない遺伝子組換え作物が流通する可能性が高まると考えられる。そのような状況に備えるため、これまでの検知技術開発には必須とされているDNA配列情報に依ることなく、未知遺伝子組換え作物を検知可能な新規技術の開発が求められている。

組換えDNA技術の根幹を成す原理として、遺伝子の発現調節機構が挙げられる。これは、特定の遺伝子が機能するためには、発現することが必須であり、その発現は、プロモーターやターミネーターを含むシスエレメントによって制御されるというものである。遺伝子組換え作物を開発する目的においては、異種生物の遺伝子を植物体内で高レベルに発現させることが必要であり、特定のプロモーター及びターミネーターがこの目的に叶うシスエレメントとして歴史的にも多用されてきた。このため、これらのシスエレメントを指標とし、それを含む近傍配列の多型性を明らかにすることにより、分析対象とした遺伝子組換え作物が既知あるいは未知であるかを推定することが原理的には可能になると考えられる。そこで、既知の遺伝子組換え作物を開発するに当たり使用されたシスエレメントに関する情報収集に主眼をおき、それを含む各種情

報を整備したデータベースの構築を試みた。

6. トウモロコシ加工食品からのDNA抽出精製法の検討

厚生労働省通知 (平成 18 年 6 月 29 日、食安発第 0629002 号)「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(厚労通知法)には、トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出精製法として、「タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレーク」を対象としたイオン交換タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を用いた方法 (以下、厚労-Gtip 法) が記載されている。また、同通知には、その他のトウモロコシ加工食品を対象とする場合には、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 個別品目編」(JAS ハンドブック法) を準用することとされており、JAS ハンドブック法にも QIAGEN Genomic-tip を用いる DNA 抽出精製法 (以下、JAS-Gtip 法) が記載されている。JAS-Gtip 法と厚労-Gtip 法とでは、サンプル採取量、試液量、抽出時間および遠心分離条件などが異なる。また、試料調製法についても、厚労通知法では試料の乾燥および粉碎処理を行うのに対し、JAS ハンドブック法では試料に加水した後、ホモジナイズ処理を行う。JAS ハンドブック法の加水およびホモジナイズ操作は、乾燥状態で粉碎する操作に比べ煩雑であり、スナック菓子等の特に吸水性の高い試料については、糊化を生じ試料の均一化が困難になる事例もあった。そこで、DNA 抽出精製法の効率化を目的とし、現行のトウモロコシ加工食品の試料調製法および DNA 抽出精製法についての比較検討を行い、より簡便で安価な方法への統一および改良を試みた。

B. 研究方法

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を対象とした検知技術の開発

1) 試料 遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を含む標準試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部を通じて入手した。その他の国産コメ (5 品種 ; ミルキークイーン、ササニシキ、コシヒカリ、あきたこまち、ひとめぼれ) については、インターネットを通じて購入したものをを用いた。また、開発した

検知技術の妥当性を検証する目的で実施した2分析機関による共同試験(peer verification)には、1/1000粒の割合でLLRice 601系統を含む粉碎試料から抽出したDNAを、ミルキークイーン(白米)から抽出したDNAを用いて0、1、50、100倍希釈したDNA試料を用いた。

2)コメを対象としたDNA抽出法の開発及び評価 Bayer社により公開されたコメを対象としたDNA抽出法は、非常に煩雑であり、またその操作に長時間を要するセチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)を使用した方法であった。このため、操作の簡便化と作業時間の短縮を目的に、シリカ膜タイプキット(GM quicker 2;ニッポゾン社製)を使用する方法を新たに開発した。開発された方法は以下の通りである。

均質に粉碎した試料 5 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、予め 65°C に加温しておいた GE1 緩衝液 7 mL、 α -アミラーゼ(高濃度品)40 μ L 及び、RNase A(100mg/mL) 100 μ L を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65°Cの条件で10分間加温した。加温後、Proteinase K (20mg/mL)200 μ L を加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、さらに 65°Cの条件で 5 分間加温した。5,000 \times g 以上、室温の条件で 10 分間遠心した。次いでその上清 730 μ L を 2.0 mL チューブに移し、GE2-K 緩衝液 85 μ L を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後、13,000 \times g 以上、室温の条件で 5 分間遠心した。次いでその上清 400 μ L を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 150 μ L 及びイソプロパノール(100%)150 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和した。混合液 700 μ L を spin column に負荷した後、13,000 \times g 以上、室温の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てた。次いで GW 緩衝液 650 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、室温の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てた。さらに spin column を乾燥させるため、13,000 \times g 以上、室温の条件で 1 分間遠心した。乾燥後の spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 30 μ L を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 \times g 以上、室温の条件で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とした。得られた DNA 試料原液の吸光度を

200 nm から 320 nm の波長域で連続的に測定し、O.D. 230 nm、260 nm、280 nm での吸光値から 260 nm/280 nm 及び 260 nm/230 nm の比を求めることで精製度の確認を行った。また、O.D. 260 nm の吸光値 1 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出した。

開発した DNA 抽出法の評価は、コメの品種及び精米率の影響を検討するために使用した国産米 5 品種のうち、ミルキークイーン(白米)試料を用い、一機関内、同一試験者により、6 点併行の抽出試験を 3 日繰り返すことにより行った。

3)LLRiceコンストラクト特異的DNA配列及びコメ内在性遺伝子を標的とした定量系

LLRice系統を対象とした検知技術は、試験に供するDNAの質が、real-time PCRに適していることを確認する目的で用いられるコメ内在性遺伝子を標的とした定量系及び、LLRice 3系統に共通して存在するコンストラクト特異的DNA配列を標的とした定量系により構成される。コメ内在性遺伝子には phospholipase D をコードする遺伝子が、また、コンストラクト特異的DNA配列としては35S プロモーターと除草剤耐性を付与する目的で導入されたbar遺伝子との境界領域がそれぞれ選定された。本研究においては、前者を標的とする定量系(プライマー対とプローブの組み合わせ)をPLD定量系、後者を標的とする定量系を35S-bar定量系と呼称する。

4) real-time PCR条件

検討の結果、real-time PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製することとし、その組成は以下の通りとした。

Universal PCR Master Mix 12.5 μ L(アプライドバイオシステムズ社製 :ABI 社製)、対象プライマー対溶液 (各プライマー、10 μ mol/L) 1 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌蒸留水 5 μ L、10 ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50 ng)。なお、35S-bar 定量系を使用する場合には、対象プライマー対溶液の添加量を 0.5 μ L、滅菌蒸留水量を 5.5 μ L とした。Real-time PCR の反応条件は以下の通りとした。50°Cの条件で 2 分間保持した後、95°Cで 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サ

イクルとして、45 サイクルの増幅反応をおこなった。なお、検知技術開発及び peer verification 試験には、ABI PRISM 7900HT を定量 PCR 機器として用いた。一方で、ABI PRISM 7500 及び 7700 を定量 PCR 機器として使用した場合に、同様の試験結果が得られるかについて、一試験室内において検証した。

5) multicomponent 解析

Real-time PCR により得られた測定値(Ct 値)が、特異的な PCR 増幅の結果として生じていることを確認するための方法として、プローブに結合した reporter 色素に由来する蛍光値を解析する方法(multicomponent 解析)について検討した。

定量 PCR 機器に付属のソフトウェアにより出力される multicomponent ファイルから、種々の条件で蛍光値を抽出し、その変動率について解析することにより、PCR 増幅に依存した蛍光が生じたことを判定するための閾値を設定した。

2. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの検知技術の検討

1) 試料 Bt 米が使われていると思われるビーフン G 検体は Greenpeace International から提供された。また本研究に用いたビーフン検体 (A,B,C) は厚生労働省を通じ入手し解析した。中国産コメが使われていないビーフン試料は東京都内のスーパーマーケットで購入したものを十分に粉砕した後に用いた。

2) 米粉及びビーフンからの DNA 抽出精製は、ニッポンジーン社製 GM quicker 2 を改良して用いた。Bt63 米の CryIAC 発現カセット内部であると考えられる DNA 配列情報を解析するために、文献情報および DNA データベース情報から数種のプライマー対を設計し、PCR 法により増幅した。増幅産物をシーケンス解析して得られた DNA 配列情報について、BLAST 検索を行い解析した。

3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良

1) 試料

遺伝子組換えトウモロコシ(MON810)試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じて入手した。トウモロコシ擬似混合粉砕試料調整時のマトリクスとして

使用した非遺伝子組換えトウモロコシ試料(米国産トウモロコシ)は、食品総合研究所を通じて入手した。入手した全ての試料は、500 μm のスクリーンを取り付けた高速遠心粉砕器を用いて粉砕した後に用いた。

2) 擬似混合粉砕試料および標準試料

既報^{8),9)}に従い、MON810 試料を重量換算で 0.0、1.0 または 5.0% となるよう混合した擬似混合粉砕試料を調整し、それぞれ MON0、MON1 および MON5 として用いた。また、MON810 混入標準試料としては、European reference materials(ERM)から供給されている 1% および 5% 試料(ERM1 および ERM5)を用いた。

3) DNA 抽出法および前処理法

DNA 抽出法は既報¹⁰⁾に従い行った。さらに DNA 試料原液 2 μg 相当量を探り、滅菌蒸留水を加え全量を 17 μL とし超音波洗浄装置で 100W、5min の超音波処理を行った。これに 10 \times high buffer 2 μL および EcoR I 1 μL (15U)を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1hr の加温を行った。加温処理後、エタノール沈殿による濃縮を行い、最終的に TE バッファーに溶解して 10 ng/ μL に調整したものを DNA 試料溶液とした。

4) 定量 PCR 条件

食安発第 0629002 号に従い、トウモロコシ内在性遺伝子(SS IIb)および MON810 特異的 DNA 配列を標的とする定量系(SS IIb、P35S および MON810 定量系)を用いた。反応液組成は LightCycler[®]480 Probes Master 10 μL 、プライマーとプローブ溶液の混合液 0.8 μL (25 $\mu\text{mol/L}$ プライマーおよび 10 $\mu\text{mol/L}$ プローブ)、これに 10 ng/ μL に調整した DNA 試料溶液を 5 μL (50ng)または標準プラスミド溶液 5 μL を加え、全量を 20 μL とした。PCR 温度条件は既報⁵⁾に従い行った。

5) PCR 効率の測定

標準プラスミド、100%MON810 試料から抽出後、前処理した DNA 試料溶液についてそれぞれの検量線を作製し、検量線の傾きから PCR 効率を求めた。

6) 内標比の測定

内標比の測定試験は、100%MON810 試料から抽出後、前処理した DNA 試料溶液を用いて 2 機関所有の 3 機体による共同試験として実施した。

7) 混入率測定試験

規定した内標比の妥当性を検証するため、擬似混合粉碎試料あるいは混入標準試料から抽出、前処理した DNA を対象に定量 PCR を行い、得られた測定値および規定した内標比を用いて P35S および MON810 混入率を算出した。また、得られる混入率の日差変動についても検討した。いずれの検討も特定の 1 機関で実施した。

4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

1) 擬似混合粉碎試料作製

GM ダイズ(RRS)及びダイズ擬似混合粉碎試料調製用マトリクスとして使用する非 GM ダイズは、高速遠心式粉碎机を用いて粉碎し、RRS 試料を重量換算で 0、0.05、0.1% となるように混合して擬似混合粉碎試料の調製を行なった。

2) DNA 抽出及び定性 PCR 条件

DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN 社製)による DNA 抽出法に改良を加えたものを採用した。PCR はダイズ内在性遺伝子 (Le1) 検知用プライマー対と RRS 検知用プライマー対を用いた 2 検知系にて行なった。PCR 反応液組成及び PCR 条件は、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¹¹⁾」に従った。

3) 試験所間試験

妥当性確認のための試験所間試験は、McClure の報告¹²⁾を参考に、国内 14 機関参加の下、配付プロトコールに従って行なった。本試験所間試験は「画像最適化試験」、「PCR 装置最適化試験」、「プレテスト」および「ブラインド試験」から構成された。「画像最適化試験」は同一の試料 (ladder マーカー) を配布し、全参加機関の電気泳動装置の撮影条件を統一化するものであり、「PCR 装置最適化試験」は調製済み PCR 反応液を配付し、PCR の後、電気泳動を行い、その結果を解析し参加機関の PCR 装置の状態を確認するものである。また、「ブラインド試験」では GM の混入濃度を未明とした試料を 1 機関につき 3 濃度、1 濃度あたり 6 点 (計 18 点) 送付して妥当性を検証した。

4) 結果解析

各参加機関の試験結果を集計後、定性分析法における 4 つの精度指標である感度、特異性、偽陰性率、偽陽性率を算出し、解析

を行なった。

5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

遺伝子組換え作物に関する各種情報をインターネット、学術論文、諸外国の政府資料、DAN配列データベースから収集し、整理、集計した。

6. トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出精製法の検討

1) 試料

コーンスナック菓子 5 種 (ジャンボコーン、ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナック、コーンパフ)、コーンフレーク、冷凍トウモロコシ、トウモロコシ缶詰 2 種 (ホールタイプ、クリームタイプ) およびコーンスープ (乾燥粉末、液体) を用いた。

2) 試料調製

乾式法: 厚労通知法に従い、乾燥試料についてはラボミルサー LM-2 (大阪ケミカル社製) で粉碎した。

湿式法: JAS ハンドブック法に従った。

3) DNA 抽出精製

第 1 法 (厚労-Gtip 法): 厚労通知法、2.2.3.1. 「タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレークからの DNA 抽出精製」に従った。

第 2 法 (Kanagawa-Gtip 法): 第 1 法の試液量を一部変更して DNA 抽出精製を行なった。

第 3 法 (JAS-Gtip 法): 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 基本操作編、3.2 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従った。

第 4 法 (ALG-Gtip 法): 厚生労働省通知 (平成 18 年 6 月 22 日、食安発第 0622003 号) 「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」、2.3.2.2. 「イオン交換樹脂タイプキット法」に従った。

4) DNA 濃度および純度測定、PCR 増幅、電気泳動

厚労通知法に従った。

C. 研究結果

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を対象とした検知技術の開発

1) コメを対象とした DNA 抽出法の開発及び評価

コメを対象とした簡便かつ安定性の高い DNA 抽出法を開発することを目的に、シリカ膜タイプキット(GM quicker 2)を用い、試料量、抽出スケール、抽出条件等について検討した。また、その際には、コメの品種及び精米率の影響を明らかにするため、5品種の国産米について、白米及び玄米のそれぞれを試料に用い、得られた結果を比較した。その結果、Fig.1-1 に示したとおり、本研究において開発された DNA 抽出法を使用することにより、コメの品種に寄らず、安定した量の DNA が抽出可能であることが明らかになった。また、玄米に比べ、白米から抽出される DNA の量が、品種に寄らず多い事が明らかになり、精米率の違いが DNA の収量に影響を与えることが示唆された。白米は、玄米が含む糠層及び胚芽を完全に除去した食品であり、精米の過程において除去される部位には DNA の抽出を阻害する物質が含まれているのではないかと考えられた。さらに、本 DNA 抽出法の併行再現性及び日差変動について評価することを目的に、ミルクークイーン(白米)試料を用い、一機関内、同一試験者により、6点併行の抽出試験を3日繰り返し行った。その結果、全ての試験を通じて得られた DNA 試料原液の濃度の平均値は、77.01 ng/μL、また、そのばらつき(相対標準偏差：R.S.D.)は、10.1%であった(Table 1-1)。これらの結果は、同じシリカ膜タイプキットを用いたトウモロコシやダイズを対象とした DNA 抽出法に比べても、良好な結果であると考えられた。さらに、日差変動について評価することを目的に、一元配置の分散分析を行った結果、得られた F 値は F 境界値(2, 17, 0.05)=3.59 を下回り、DNA 収量の平均値に有意差は認められなかった。

2) real-time PCR 条件の検討

Real-time PCR により蛍光が生じた場合には、Ct 値が得られる。Ct 値とは、特定の蛍光色素由来の蛍光値を reference 色素の蛍光値によって除し、得られた値(ΔRn 値)の経時的変動を、縦軸を ΔRn 値、横軸を PCR のサイクル数として示した Amplification plot curve 上で、目的の ΔRn 値(本解析においては Threshold line として規定)に達したサイクル数を意味する。また、本 Ct 値の値が 1 異なることは、PCR により増幅された

標的 DNA 配列の初期数が 2 倍の大きさと異なっていたことを意味する(Ct 値が小さいほど、標的 DNA 配列の初期数が大きい)。上記の通り、Real-time PCR により得られる Ct 値は、原理的には標的 DNA 配列の初期数に応じて増減するが、検知技術開発の実際において、標的 DNA 配列の初期数を正確に反映した Ct 値が得られるか否かは、1)定量系(プライマー対及びプローブ)の特性、2)反応温度条件、3)プライマー対及びプローブの濃度を含む反応液組成、4)鋳型 DNA の濃度、等の影響を受ける。このため、これらの影響を与える要因について明らかにし、real-time PCR 条件を最適化することが必要になる。しかし、本研究において検討した real-time PCR は、LLRice 各系統の開発者である Bayer 社により各国政府に公開された方法であり、分析結果の整合性を国際間で担保する目的から、定量系や反応温度条件、反応液組成について、大幅な変更を加えることは望ましくないと考えた。また、反応温度条件並びに反応液組成は、これまでに報告された real-time PCR に比べても一般的な内容であり、特に変更する必要性は少ないと考えられた。しかし、公開された方法に指示された鋳型 DNA の質量は、1 反応当たり 200 ng であり、これまでに開発された方法に規定された質量(我が国の遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズの定量分析を目的とした real-time PCR においては 50 ng)に比べ高い値であった。高濃度の DNA 試料液を鋳型 DNA として反応に供した場合、DNA の質にも依るが、検知感度が向上する一方で、PCR 増幅が阻害を受ける等の弊害が生じる。コメ 1 ゲノム当たりの DNA 質量(1C value)は、0.5 pg と報告されており、これはトウモロコシの約 1/5.5、ダイズの 1/2.3 の値である。この点のみに基づき考察すると、同じ質量の DNA が PCR に供された場合、コメの検知感度はトウモロコシの 5.5 倍、ダイズの 2.3 倍になると推定され、供する DNA の質量を規定の 200 ng から減少させた場合にも、検知感度が顕著に減少することはないと考えられた。また、本研究において開発された DNA 抽出法によって抽出・調製される DNA 試料液の質が、real-time PCR に与える影響についても検討した後に、最適な供与 DNA 量を決定すべきと考えた。

これらの理由から、検知感度を損なわずかつ、PCR 増幅を阻害しない鋳型 DNA 濃度について検討した。

国産コメ(ミルキークイーン)の白米並びに玄米から抽出された DNA を反応液に 50、100、及び 200 ng 加え、PLD 定量系を用いた real-time PCR を行った。結果は、PLD 定量系に含まれるプローブに由来する蛍光(VIC 色素由来の蛍光; VIC 蛍光)を、reference 色素に由来する蛍光(ROX 色素由来の蛍光; ROX 蛍光)で除した値(ΔRn 値)として示した(Fig. 1-2)。その結果、同じ質量の DNA を反応に供した場合、PCR の最終サイクルである 45 サイクルの時点(エンドポイント)で得られる ΔRn 値は、玄米に比べ、白米において大きくなるのが明らかになった。また、白米に関しては、DNA の質量に比例した ΔRn 値の上昇が観察されたが、玄米においては DNA の質量が増加するのに伴い、 ΔRn 値が減少した(Fig. 1-2)。エンドポイントで得られる ΔRn 値が、鋳型 DNA の質量に依りて変化する原因を明らかにするため、 ΔRn 値の算出に使用される VIC 及び ROX 蛍光のそれぞれの値について確認した結果、白米においては、VIC 蛍光の値は DNA 質量に依らずほぼ一定であり、これに対して ROX 蛍光の値が DNA 質量に依存して減少していた。また、玄米においては、ROX 蛍光の値は DNA 質量に依らずほぼ一定であるのに対し、VIC 蛍光の値が DNA の質量に反比例して増加していた。これらの結果から、具体的に影響を与える化合物や機序についての詳細は不明であるが、白米由来の DNA 試料液には、ROX 蛍光の減少を促進する物質、また、玄米由来の DNA 試料液には、VIC 蛍光の増加を阻害する物質が含まれている可能性が示唆された。

3) 2 機関による共同試験の実施及び解析

開発した検知技術の妥当性を検証するため、2 分析機関による共同試験(peer verification)を実施した。共同試験に参加した機関には、1/1000 粒の割合で LLRice 601 系統を含む粉碎試料から抽出した DNA を、ミルキークイーン(白米)から抽出した DNA を用いて、0、1、50、100 倍希釈した希釈 DNA 試料(0、0.1、0.002、0.001%試料)を調製し、各濃度当たり 10 点、計 40 試料をランダムに選んだ上で、blind samples として

送付した。その他の試薬として、2 x Universal master mix、プライマー並びにプローブの混合溶液、また、試験手順を詳細に示した実施プロトコールをあわせて送付した。結果は、あらかじめ規定した様式に、得られた Ct 値を含むデータを記入の上、返送することとした。

Table 1-2-1 に示したとおり、2 機関から報告された結果の内、コメ内在性遺伝子を標的とした PLD 定量系により得られた Ct 値は、含まれる LLRice601 系統由来の DNA 量に依らず安定しており、機関 A 及び B における全試料の平均値 \pm S.D. はそれぞれ 20.72 ± 0.04 、 20.81 ± 0.02 であった。また、paired-t 検定を行った結果、機関間に有意差は認められなかった。

LLRice 系統を検知するための定量系である 35S-bar 定量系を用いた結果は、LLRice601 系統由来 DNA の含有率によって陽性率にばらつきが認められた。なお、Table 1-2-1 には、Table 1-2-2 に示した各濃度につき 10 点の試料を試験した結果の内、Ct 値が 40 未満の結果を集計して示した。これは、後述する multicomponent 解析の結果から、Ct 値が得られた場合においても、その値が 40 を上回った場合には、PCR 依存的に蛍光値が得られたことを明確に支持することができないと考えられたためである。集計した結果において、濃度ごとの陽性率は、0.1% 試料については両機関とも 100%、0% 試料については 0% であった。また、0.001% 試料の陽性率は、両機関ともに 50%、0.002% 試料の陽性率は、機関 A において 70%、機関 B において 50% という結果であった。Ct 値についてみると、両機関とも一致した傾向が認められ、0.1% 試料については約 32、0.001 及び 0.002% 試料については濃度による明確な差は認められず、約 37 であった(Table 1-2-1)。なお、0.01% 試料から得られた Ct 値について paired-t 検定を行った結果、統計的にも機関平均値に有意差がないことが確認された。以上の結果は、低含有率の試料から Ct 値が得られるか否かは、real-time PCR に供する DNA 試料液中に増幅の対象となる DNA 配列が含まれているか否かの確率論的な分布(二項分布と考えられる)に従い、含まれていた場合に得られる Ct 値は、一定の大きさになることを示唆す

るものと考えられた。また、検知下限値については、0.1%付近になると考えられた。

さらに、共同試験に使用した一連の試料を対象に、他の real-time PCR 機種(ABI PRISM 7500 及び ABI PRISM 7700)を用いて 1 機関内で試験を実施し、real-time PCR 機種の影響について検討した。その結果、コメ内在性遺伝子に関する結果及び、0.1%試料に関する結果については、陽性率、Ct 値ともに、共同試験の結果に一致すると考えられる結果が得られた。しかし、0.001%及び 0.002%試料については、陽性率に若干の差が認められた(Table 1-3)。詳細に考察するためには、同種の real-time PCR 機器を複数用いた試験が必要であると考えられるが、本研究において得られた結果からは、蛍光の検出の機構や、特定蛍光波長を分離するためのアルゴリズムが異なる real-time PCR 機器を使用した場合は、得られる蛍光値が異なることにより、陽性率が変動する可能性が推測された。

4) multicomponent 解析による陽性結果の判定

先述の通り、Real-time PCR により得られる Ct 値は、特定の蛍光色素由来の蛍光値を reference 色素の蛍光値によって除し、得られた値(ΔRn 値)の経時的変動を、縦軸を ΔRn 値、横軸を PCR のサイクル数として示した Amplification plot curve 上で、目的の ΔRn 値に達したサイクル数である。このため、蛍光色素の物理的分解等、PCR 非依存的に蛍光値が変動した場合においても、Ct 値は得られる。従って、Ct 値が得られるか否かのみを結果判定の基準とした場合、偽陽性判定を下してしまう可能性が考えられた。そこで、PCR 依存的に生じた蛍光値と Ct 値の大きさの相関を明らかにし、PCR 増幅が生じたと判断することが妥当な Ct 値の大きさについて指標を設定することを試みた。本検討において、定量 PCR 機器から出力される multicomponent ファイルに収集された各種の蛍光値データのうち、特定のデータのみを抽出し解析に用いたことから、本解析法を multicomponent 解析と呼ぶ。また、本解析法は、35S-bar 定量系への適用を目的とした。

様々な解析条件を検討した結果、35S-bar 定量系に含まれる reporter 色素(FAM 色素)

の蛍光値について、基底条件を PCR の 10 サイクル目とし、これに対する反応終了サイクル(45 サイクル)との比(45 サイクル目の蛍光値/10 サイクル目の蛍光値 ; FAM 蛍光値比)を求めることが最適であると考えた。本条件に従い、共同試験の結果を解析した結果、機関 A から報告された 0.001%試料の 1 点の結果を除き、Ct 値が得られた試料における FAM 蛍光値比は 1.1 を上回っていた (Table 1-4)。また、機関 A からは 0%試料の 1 点についても Ct 値が得られた事が報告されたが、これに前述の試料をあわせた 2 試料の FAM 蛍光値の変動について、全 PCR サイクルを通して確認した結果、0.1%試料等に認められた PCR のサイクル数に依存した明確な FAM 蛍光値の増加は認められなかった。PCR 増幅が生じない条件において、蛍光色素が物理的に分解せず、また、測定誤差も生じなかった場合、理論的な FAM 蛍光値比は 1.0 となる。しかし、実際には、PCR の昇温と降温の繰り返し過程を通じ、微量の蛍光色素の分解、また測定誤差が生じると考えられる。よって、PCR 増幅を伴わない場合においても、実測値として得られる FAM 蛍光値比は、1.0 の周辺にばらつきをもった値となる。本研究において得られた実測値から考察すれば、FAM 蛍光値比が 1.1 を上回った試料については、概ね PCR 依存的に蛍光値が生じていると判断することが妥当であると考えられた。また逆に、FAM 蛍光値比(1.1)を指標に Ct 値の大きさについてみると、この比が 1.1 を超えた試料から得られる Ct 値は全て 40 未満(機関 A から報告された 0%試料 1 点を除く)であり、一義的には、40 未満の Ct 値が得られた場合、特異的な PCR 増幅が生じた。つまり、陽性であると判断することが妥当であると考えられた。ただし、real-time PCR 機器の管理状態、試薬の劣化やロット不良等があった場合には、PCR 増幅や蛍光値測定不良、より極端な蛍光色素の物理的な分解が生じ、この判断の適用が不適となる場合もあるため、試験環境の管理を十分に行うことが必要である。さらに、解析対象とする定量系が異なった場合、指標とすることのできる蛍光値比は明らかに変動することが予想される。

2. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの

検知技術の検討

ビーフンG検体に混入されているBt米がGM Shanyou 63系統であることが予想されたため、文献情報を基に数種のプライマ-対を設計し、ビーフンG検体から抽出されたDNAを用いてPCR増幅を試みた。

ビーフンG検体より、米由来であるActin I promoter 配列とCryIAcタンパク質のコード領域配列の境界領域の増幅産物が得られ、配列情報を解析したところ、5'側の配列はイネActin promoterとの相同領域であった。また3'側はCryIAcタンパク質のコード領域配列と一致し、その境界領域にマルチクローニングサイトと考えられる配列の存在が示唆された(Fig. 2-1-ab)。またCryIAcタンパク質のコード領域配列とNOS terminator配列の境界領域の増幅産物が得られ、解析の結果、文献情報と一致した。(Fig. 2-2)。

しかしビーフン検体CからCryIAcタンパク質のコード領域配列とNOS terminator配列の境界領域の増幅産物をクローニングし解析したところ、Fig. 2-3に示すように2つの異なった境界領域の増幅産物が得られた。従ってGM Shanyou 63系統とは別の系統の遺伝子組換え米(Bt米)の混入が示唆された。

GM Shanyou 63系統と異なったBt米の系統がKemingdao系統の可能性が考えられたため、文献情報を基に数種のプライマ-対を設計し、ビーフンC検体から抽出されたDNAを用いてPCR増幅を試みた。その結果、ビーフン検体CからMaize ubiquitin promoter 配列とCryIAbタンパク質のコード領域配列の境界領域の増幅産物が得られ、配列情報を解析したところ、5'側の配列はMaize ubiquitin promoterの配列と一致し、3'側はCryIAbタンパク質のコード領域配列と相同領域を示し、その境界領域にマルチクローニングサイトと考えられる配列の存在が示唆された(Fig. 2-4)。またKemingdao系統の挿入配列に含まれているcauliflower mosaic virus 35S promoter (*CaMV*)の配列と選別マーカーであるhygromycin phosphotransferase (*hph*) 遺伝子配列の境界領域の増幅産物が得られた。この結果からビーフン検体Cには、GM Shanyou 63系統とともにKemingdao系統の混入も示唆され

た。さらにビーフン検体AからはGM Shanyou 63系統のみが検査され、ビーフン検体BからはKemingdao系統と思われる系統が検出された。

これらの解析をもとに、CryIAc検知プライマ-対、Bt米検出プライマ-対(CryIAcタンパク質のコード領域配列とNOS terminator配列の境界領域を認識)、Bt米確認プライマ-対(Actin I promoter配列とCryIAcタンパク質のコード領域配列の境界領域を認識)を設計した。またCryIAcタンパク質のコード領域配列とNOS terminator配列の境界領域の差異配列上に、FAMとVICのレポーターをそれぞれ結合したプローブを合成し、real-time PCRを用いたGM Shanyou 63系統とKemingdao系統の同時判別検知法を確立した。

3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良

1)DNA前処理条件の検討およびPCR効率の比較

抽出したDNA溶液を定量PCRに供したところ、真値と異なる定量値が算出された。また、ゲノミックDNAとプラスミドDNAを用いて得られた検量線およびPCR効率の比較を行ったところ、*SS IIb*、*P35S*および*MON810*定量系を用いた場合のPCR効率は、プラスミドDNAでそれぞれ2.020、1.971および2.000、ゲノミックDNAでそれぞれ1.777、1.716および1.802であり、プラスミドDNAとゲノミックDNAを水準として統計的に解析した結果、有意差が認められた(Fig.3-1, Table3-1)。PCR効率が一致していることが、正確なコピー数の計測、ひいては混入率の算出に重要である。トウモロコシ定量PCRにおけるプラスミドDNAとゲノミックDNAの反応挙動の相違はゲノミックDNAの高次構造に起因するものと推察された。そのため、ゲノミックDNAについて、煮沸処理、超音波処理、制限酵素処理、超音波処理と制限酵素処理の組み合わせの各処理を行い、前処理条件を検討した。ゲノミックDNAの前処理として超音波処理と制限酵素処理を組み合わせで行った場合、*SS IIb*、*P35S*および*MON810*定量系を用いた場合のPCR効率はプラスミドDNAでそれぞれ1.934、1.944および1.967、ゲノミックDNAでそれぞれ1.954、1.910および

1.998 でありプラスミド DNA と前処理を施したゲノミック DNA を水準として統計的に解析した結果、有意差は認められなかった(Fig. 3-2, Table 3-2)。ゲノミック DNA に超音波処理と制限酵素処理を組み合わせた前処理を施すことはプラスミド DNA とゲノミック DNA の PCR 反応の同等性の向上に有効であることが明らかとなった。

2) 内標比測定試験

決定した定量 PCR 条件における内標比の測定を行った。P35S および MON810 の内標比の理論値はそれぞれ 0.5 である。共同試験として実施した内標比試験の結果、2 機関所有の 3 機体の LightCycler system を用いて測定された P35S および MON810 の内標比はそれぞれ 0.46 (室間再現性; RSD_R は 9.48%) および 0.50 (室間再現性; RSD_R は 6.39%) であった。

3) 混入率測定試験

共同試験によって測定された P35S 内標比(0.46)および MON810 内標比(0.50)の妥当性を評価するため、既報に基づき調整した擬似混合粉体試料(MON1 ならびに MON5)、および MON810 混入標準試料(ERM1 ならびに ERM5)を対象とした混入率測定試験を実施した。その結果、MON1 を対象とした場合、P35S および MON810 定量系においてそれぞれ 0.98 および 1.05%、MON5 を対象とした場合にはそれぞれ 4.73 および 4.93%、また、ERM1 を対象とした場合にそれぞれ 1.38 および 1.31%、ERM5 を対象とした場合にそれぞれ 5.56 および 5.29%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 P35S 定量系で最大で 9.09%、最小で 4.25%、MON810 定量系で最大で 13.22%、最小で 5.21%であった(Table 3-3, 3-4)。さらに、MON1 ならびに MON5 を用いて抽出間差を含む混入率の日差変動について検討した結果、3 日間を通じ各日に得られた混入率は、P35S 定量系でそれぞれ 0.92~0.98% (RSD_r は 3.57~10.70%) および 4.26~5.11% (RSD_r は 2.94~6.24%)、MON810 定量系でそれぞれ 0.89~1.14% (RSD_r は 1.66~9.60%) および 4.79~5.12% (RSD_r は 3.17~7.25%) 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(Table 3-3, 3-4)。

4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ

定性試験法の妥当性確認

1) 試験所間試験

「画像最適化試験」、「PCR装置最適化試験」および「プレテスト」において問題が生じた参加機関はなかった。「ブラインド試験」において、ダイズ内在性遺伝子を標的とする Le1 検知系を用いた PCR の結果、全ての機関において全試料から期待された増幅長の PCR 産物が得られ、PCR に適した DNA が抽出されることが確認された。次に RRS 検知系を用いた PCR を行い、試料中の RRS の混入の有無について各機関からの回答を得た(Fig. 4-1)。

2) 結果解析

McClure の報告に従い、集計した各機関の判定結果について、Cochran の Q 検定¹³⁾ を実施し外れ値検定を行ったが、他の機関と正解率が有意に異なる機関(棄却機関)は存在しなかった。さらに、定性分析法の 4 つの精度指標(感度、特異性、偽陰性率、偽陽性率)を試料濃度 0.05、0.1% のそれぞれについて算出した。特異性は両試験区共に 100% の値となった。偽陽性率も両試験区共に 0.0% であった。偽陰性率については 0.05% 試験区で 5.6%、0.1% 試験区で 2.3% の値を得た。

5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

遺伝子組換え作物に関する各種情報の収集は、非営利団体によって公開されている遺伝子組換え作物データベース(Agbios; <http://www.agbios.com/main.php>)及び、各国政府から公表されている各種資料に依った。GM 作物システムの個別データは割愛し、集計結果のみを報告する。

これまでに開発され、いずれかの国に対して申請書類が提出されている遺伝子作物の作物種は 17 種、総系統数は 125 系統であった(Table 5-1)。また、新たに付与された形質の大要について分類すると、9 種に分類することが可能であり、その中で最も多くの系統が作出された形質は、害虫抵抗性(全形質の 35.2%)であった(Table 5-2)。さらに遺伝子組換え作物の作出手法についてまとめた結果、これまでに開発された遺伝子組換え

作物のうち、過半数がアグロバクテリウム法により作出された事が明らかとなった (Table 5-3)。

本研究の主たる目的は、遺伝子組換え作物に共通性の高いDNA配列として、プロモーターやターミネーターを含むシスエレメントの情報を収集し、これらのシスエレメントを指標とし、それを含む近傍配列の多型性を明らかにすることにより、分析対象とした遺伝子組換え作物が既知あるいは未知であるかを推定するための技術を開発することである。そこでこれまでに開発された遺伝子組換え作物に導入されたプロモーター及びターミネーターの種類について整理した。その結果、プロモーターとしては半数を超える遺伝子組換え作物においてカリフラワーモザイク由来の35Sプロモーターが使用されていることが明らかになった (Table 5-4-1)。一方、ターミネーターとしてはアグロバクテリウム由来のnosターミネーターとカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sターミネーターが主として使用されており、これら2種のターミネーターをあわせると、全体の過半数を超えた (Table 5-4-2)。ただし、いずれのシスエレメントに関しても、発現効率等を調整する目的から、人為的改変が加えられた複数のDNA配列が報告されており、検知技術開発の標的配列としては一様ではなかった。このため、さらに種々のDNA配列情報を集めるなどしてより共通性の高いDNA配列を見いだすための検討が必要であると考えられた。また、DNA配列情報は、特許として保護され一般には非公開な情報が大多数を占めるため、安全性審査資料等に情報源を求めるなどすることが不可欠であると考えられた。

6. トウモロコシ加工食品からのDNA抽出精製法の検討

一般的にDNA収量が低いジャンボコーン、コーンフレークは、乾式法で粉碎した試料2~4gをサンプルとし、Kanagawa-Gtip法によってDNA抽出精製を行った。その結果、ジャンボコーンについては、JAS-Gtip法に比べ、Kanagawa-Gtip法を用いることによりDNA収量およびトウモロコシ内在性遺伝子 (*Zein*) の検出率が増大した。一方、コーンフレークについては、厚労-Gtip法に

比べ、ALG-Gtip法およびKanagawa-Gtip法を用いることによりDNA収量が増大し、*Zein* 検出率は、Kanagawa-Gtip法により抽出されたDNAを鋳型DNAとした場合に最も高かった。その他のコーンスナック菓子 (ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナックおよびコーンパフ) およびコーンスープ (乾燥粉末) は、厚労-Gtip法 (乾式法、1g採取) が適用可能であった。試料調製時に加水を必要とするトウモロコシ缶詰 (クリームタイプ) および冷凍トウモロコシは、湿式法すなわち試料重量と同量の水を加えてホモジナイズしたサンプル1gを採取し、加水を必要としないコーンスープ (液体) およびトウモロコシ缶詰 (クリームタイプ) は、そのままホモジナイズしたサンプル1gを採取し、厚労-Gtip法によりDNAを抽出精製した。その結果、いずれも定性PCRに使用する鋳型DNAとして十分量かつ良好な純度のDNAが抽出され、*Zein* は全て検出された。

D. 考察

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ (LLRice601系統) を対象とした検知技術の開発

分析法上、第一義的に結果の判定に使用される測定値はCt値であり、前述の通り、Ct値は ΔRn 値に依存している。本研究において行ったエンドポイント解析の結果から、高濃度のDNA試料液がreal-time PCRに供された場合、得られる ΔRn 値と鋳型DNA配列の初期数との相関性が悪く、また、白米と玄米とでは挙動が異なることが明らかとなった。特に白米において観察された様に、reference色素の蛍光が減少し、それが極端であった場合には、Fig. 1-3に示したとおり、PCR非依存的にCt値が得られ、誤判定を下すことになる。エンドポイントでの ΔRn 値と鋳型DNA配列の初期数との相関性が悪いことが直接、鋳型DNA配列の初期数とCt値の相関が悪いことを意味してはいないが、上記の結果を勘案し、異なる精米率のコメを対象により一致した強度の蛍光を安定して得ることにより、誤判定を回避する目的から、検討したreal-time PCRにおける最適DNA量は1反応あたり50ngであると判断した。

2. 安全性未審査遺伝子組換えコメの検知技術の検討

ビーフンは熱加工が加わっているため、ゲノム DNA が分解され、あるいは熱変性した多糖類などの混入物の影響により、検体の種類によっては PCR により増幅して検知することは困難であるが、Bt toxin 遺伝子 (Cry1Ac と Cry1Ab の融合 DNA 塩基配列) の内部領域 (AC-3) を検知し、Actin promoter - Bt toxin 遺伝子の境界領域 (act-AC) か Bt toxin 遺伝子 - NOS terminator の境界領域 (AC-NOS) のどちらかを検出することにより、遺伝子組換え米の混入を特異的に、かつ正確に検知することが可能であることが考えられた。また 3 つの領域を用いて検知することが、頑健性のある検査となるであろうことが示された。

3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良

共同試験によって測定された内標比は妥当であり、ゲノミック DNA に前処理を施すことを含め、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 MON810 の定量分析が可能になるものと考えられた。

4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

本試験所間試験の結果から、特異性、感度、偽陰性率、偽陽性率を算出した。特異性は 100% の結果となり、本分析法は高い特異性を有していることが明らかとなった。ISO¹⁴⁾ では偽陰性率が 5% 以下である濃度レベルのうち、最も低い濃度レベルが、GMO 定性分析法の検知下限とされている。今回の試験では、0.05% 試験区の偽陰性率は 5.6% であったものの、0.1% 試験区では 2.3% であり、検知下限の基準である偽陰性率 5% を超えていないことから、本分析法の検知下限は 0.1% であることが示された。

5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

検知技術開発のために必要となる DNA 配列情報に関しては、特許で保護されていることもあり、今回の試みにおいては十分に収集することができなかった。今後、安全性審査資料を参照するなどして、さらに情報の収集を行うことが必要であると考えら

れた。

6. トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出精製法の検討

乾燥状態のトウモロコシ加工食品については、試料調製法に乾式法を適用することにより、作業効率の改善が可能となった。また、DNA 抽出精製法として、厚労-Gtip 法を種々のトウモロコシ加工食品に適用することにより、抽出操作の簡略化および経費の削減が可能となった。

E. 結論

1. 安全性未審査遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を対象とした検知技術の開発

安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を対象とした検知技術として、コメに特化した簡便な DNA 抽出法が開発された。また、開発者から提供された real-time PCR の原理に基づく方法の改良及び、新規の結果判定法の開発により、LLRice601 系統を正確に検知することが可能となった。さらに、本技術の妥当性が 2 分析機関による共同試験によって確認された。

2. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

遺伝子組換えコメが使われているビーフンには GM Shanyou 63 系統である Bt コメが混入されていることが明らかとなった。またもち米、ビーフン等に GM Shanyou 63 系統とは異なる Bt コメが混入していることが示唆された。この新たに見つけられた Bt コメは Kemingdao 系統と考えられた。

3. LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の改良

LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法について改良を行った。分析試料であるゲノミック DNA に超音波処理および制限酵素処理を組み合わせることで、プラスミド DNA とゲノミック DNA の PCR 効率を一致させることが可能となった。さらに PCR 試薬、PCR 温度条件と併せて検討した結果、繰り返し再現性良く遺伝子組換えトウモロコシ (MON810) を定量可能な分析法が開発された。

4. 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

GM ダイズ1 系統 (RRS) の定性検知技術について、その妥当性を確認することを目的とした。国内 14 機関の参加の下、試験所間試験を行い、その結果を集計・解析したところ、RRS の定性分析法の検知下限は 0.1% であることが示され、妥当性の検証がなされた。

5. 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

インターネット上に公開されているデータベースを精査することにより、これまでに開発された遺伝子組換え作物の作物種、付与された形質の種類、作出方法及び、形質発現のために使用されたシスエレメントの種類に関する様々な情報が整理、蓄積された。しかし、検知技術開発のために必要となる DNA 配列情報に関しては、特許で保護されていることもあり、今回の試みにおいては十分に収集することができなかった。今後、安全性審査資料を参照するなどして、さらに情報の収集を行うことが必要であると考えられた。

6. トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出精製法の検討

以上、乾燥状態のトウモロコシ加工食品については、試料調製法に乾式法を適用することにより、作業効率の改善が可能となった。また、DNA 抽出精製法として、厚労-Gtip 法を種々のトウモロコシ加工食品に適用することにより、抽出操作の簡略化および経費の削減が可能となった。DNA 抽出が困難な食品群 (ジャンボコーンおよびコーンフレーク) には、厚労-Gtip 法の改良法である Kanagawa-Gtip 法を用いることにより、DNA 収量および Zein 検出率を向上させることができた。

F. 参考文献

- 1) Plant Biotechnology 15, 195-203, (1998),
- 2) Nature Biotechnology 18, 1101-1104 (2000),
- 3) Food. Sci. Biotechnol. 15, 625-630 (2006),
- 4) Mol. Gen. Genet. 231, 150-160 (1991),
- 5) Plant Cell 2, 163-171 (1990).
- 6) 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 18 年 6 月 29 日, 食安発第 0629002 号 (2006)
- 7) 渡邊敬浩, 笠間菊子, 菊地博之, 鈴木達也,

時下祥子, 坂田こずえ, 松木容彦, 日野明寛, 穂山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換えトウモロコシ (Mon810 系統) の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験. 食品衛生学雑誌, 47, 15-27 (2006)

8) Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the Japanese official notified methods to detect genetically modified soybeans (Roundup Ready Soybean 40-3-2). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 46, 270-276 (2005)

9) 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 改訂第 2 版” (2002).

10) Toyota, A., Akiyama, H., Sugimura, M., Watanabe, T., Kikuchi, H., Kanamori, H., Hino, A., Esaka, M., Maitani, T., Quantification of genetically modified soybeans using a combination of a capillary-type real-time PCR system and a plasmid reference standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 821-827 (2006)

11) http://www.cfqlcs.go.jp/technical_information/jashandbook/index.htm

12) McClure, F.D.: *J. AOAC Int.*, 1990, 73, 953-960

13) Cochran, W.G.: *Sampling Techniques 3rd Ed.*, Wiley, New York

14) ISO 24276: 2006, International Standardization Organization, Geneva, Switzerland

G. 研究業績

論文

1) Toyota, A., Akiyama, H., Sugimura, M., Watanabe, T., Sakata, K., Shiramasa, Y., Kitta, K., Hino, A., Esaka, M., Maitani, T., Rapid quantification methods for genetically modified maize contents using genomic DNAs pretreated by sonication and restriction endonuclease digestion for a capillary-type real-time PCR system with a plasmid reference standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2965-2973 (2006)

2) Takahiro Watanabe, Shoko Tokishita, Frank Spiegelhalter, Satoshi Furui, Kazumi Kitta, Akihiro Hino, Rieko Matsuda, Hiroshi Akiyama, and Tamio Maitani. Development and Evaluation of Event-specific Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Bt10 Maize *J. Agric. Food Chem.*, 55(4):1274-1279 (2007).