

Qiagen 社のイオン交換体を用いたキット (Qiagen DNA/RNA midi kit) を組み合わせて行った。コメ約 1g を液体窒素中で破砕機 (安井器械) を用いてパウダー状になるまで破砕した後、10ml の抽出バッファー (0.1M Tris-HCl, pH 8.2, 150 mM NaCl, 1% SDS) の入っている試験管に移し入れた。更に平衡化フェノール (pH 8.2) -クロロホルム液 (Phe/Chl) を 10 ml を加えて激しく攪拌した。1,800 x g で 15 分間遠心して上清を新たな試験管に移した。下層に 3 ml の抽出バッファーを加えてよく混合し、1,800 x g で 15 分間遠心してその上清を先の上清と合わせて 10 ml の Phe/Chl を加えてよく混合した。4,000 x g、10 分間遠心した後、上層を新たな試験管に移し、Qiagen DNA/RNA カラムにチャージした。QW バッファー 3 ml、3 回で洗浄した後、QRU バッファーで RNA を溶出した。溶出した RNA 溶液に等容の 2-プロパノールを加えて混合し、20,000 x g 15 分間の遠心で RNA を沈殿させた後風乾した。低分子の RNA を除去するため沈殿した RNA を RLT buffer (RNeasy plus kit, Qiagen 社) に懸濁し、0.5 容のエタノールを加えてよく混合し、RNeasy column にアプライして RNA をカラム担体に吸着させた。RW1 buffer, RPE buffer でカラムを洗浄した後、50 μ l の RNase free 水で RNA を溶出した。

ダイズからの RNA 抽出は RNeasy Plant mini kit (Qiagen 社) を用いて行い、その方法はマニュアルに従った。

コメ DNA マイクロアレイはジーンフロンティア株式会社の DNA マイクロアレイ解析サービス “なんでもアレイ” を利用した。

ダイズの遺伝子発現解析はクラボウ社の “GeneChip® Expression Array 受託解析サービス” を利用した。

C. 結果

コメにおける遺伝子発現について、白米を検体として供することが可能かどうかを検討するた

めに、非遺伝子組換えの玄米と、その玄米を精米機で精米した白米とから RNA 抽出を行い、マイクロアレイ解析を行った。コメはデンプンを多く含み、GTC 法を用いた場合、粘性が高く RNA 抽出が困難であったが、SDS-フェノール法とイオン交換カラムを用いることで効率よくマイクロアレイ解析に十分な純度で精製することができた (図 1)。しかしながら、白米から RNA を抽出した際には低分子の RNA が多く検出されたため、さらにシリカカラムを用いて精製を行うことで、低分子の RNA を除去した。収量はコメ約 1g あたり、total RNA 約 60~120 μ g であった。これらの total RNA をマイクロアレイ解析に供したが、cDNA 合成の際に増幅効率が著しく低いことがわかり、そのままではマイクロアレイ解析に供するのに十分な cDNA を獲得できなかったため、total RNA から mRNA を精製し、マイクロアレイ解析に供した。mRNA の収量は玄米では約 7g の試料から約 4 μ g の mRNA が、白米では 11g の試料から約 3 μ g の mRNA が抽出された。そのうち 1 μ g を純度検定に使用し、玄米は 1 μ g ずつ 3 つに、白米は 2 つに分けてそれぞれをから cDNA を合成し、マイクロアレイ解析に供した。その結果をスキッタープロットしたものを図 3 に示した。その結果、玄米検体間、白米検体間においては遺伝子発現について大きな差は見出されなかったが、玄米-白米間においては、発現している遺伝子が大きく異なることが示唆された (図 3)。

遺伝子組換えコメ HW-5 系統とそのホストである “日本晴れ” の玄米を上記の方法で RNA 抽出を行い、RNA の純度をチップ電気泳動装置で解析した。その結果、独立に抽出を行った前サンプルについて RNA の分解が見られ (図 2)、マイクロアレイ解析に供するのに十分な品質の RNA を得ることができなかった。

組換えダイズ、非組換えダイズ 4 粒ずつを破砕し、3 等分して、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析に供した。ダイズか

らの RNA 抽出には RNeasy kit を用いた。終了は total RNA はダイズ種子およそ 100 mg から約 11 ~ 36 μ g であった。発現する遺伝子をスクエータープロットによって解析した。その結果、発現量が低い遺伝子群については組換え体、非組換え体各個体間で発現量が分散する傾向が見られたが、発現量がある程度以上では各個体間では有意な差は認められず、また、組換え体と非組換え体間を比較しても、特定の遺伝子の発現が有意に変化していることは確認できなかった(図 4)。

D. 考察

コメからの RNA 抽出は SDS-フェノール法とイオン交換体を用いることで迅速にマイクロアレイに供することができる純度の RNA を抽出することが可能となった。この方法は他の穀物や塊根等、デンプンなどを多く含む材料に応用できるものと期待される。白米から抽出した total RNA には低分子の RNA が多量に含まれていたが、これは、胚乳という特殊な組織に由来するものであると考えられた。また、コメ、ダイズともに total RNA から、cDNA, cRNA を合成した際に、その合成量をチップ電気泳動によって確認したところ、通常の組織由来の total RNA を用いた場合の 5~10 分の 1 程度であると見積もられた。今回実験供した材料はコメ (イネ種子) やダイズ種子であり、貯蔵組織であったため、組織が休眠状態にあり代謝が押さえられていたことが原因であると推察された。しかしながら、cRNA 合成の回数を増やすことで、マイクロアレイ解析に供するのに十分な cRNA 量を確保できることがわかり、少なくともダイズであれば、一粒の種子からでもマイクロアレイ解析を行うことが可能であると考えられた。コメについては遺伝子組換え米として分与いただいたものについては、RNA が分解しており、マイクロアレイ解析には供することができなかったことから、今後、遺伝子組換え植物について遺伝子発現等の解析を行う場合、サンプルの収穫時

期、保存方法が重要であることが示唆された。

マイクロアレイによる発現解析の結果、コメにおいては、白米と玄米とで遺伝子の発現プロファイルが大きく異なることが明らかとなった。玄米と白米とでは胚乳、胚芽等、含まれる組織の割合が異なること、また、精米の際に発する熱の影響も考えられた。ダイズでは遺伝子組換え体、非組換え体と 4 個体ずつを検体として遺伝子発現プロファイルを比較したが、個々の遺伝子の発現量は個体差以上の有意な差は認められず、遺伝子組換えによって遺伝子の発現が大きく異なるということは確認されなかった。

E. 研究発表

特になし

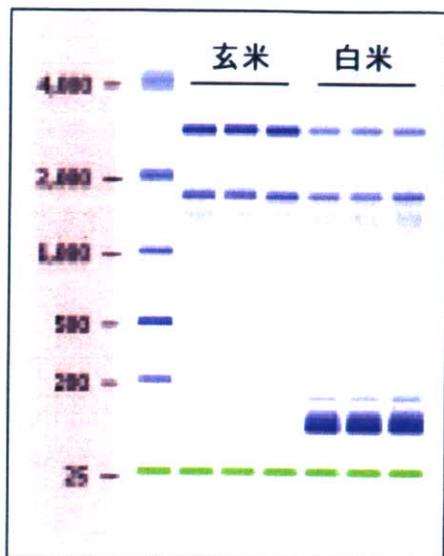


図 1 玄米及び白米から抽出した total RNA のチップ電気泳動解析結果

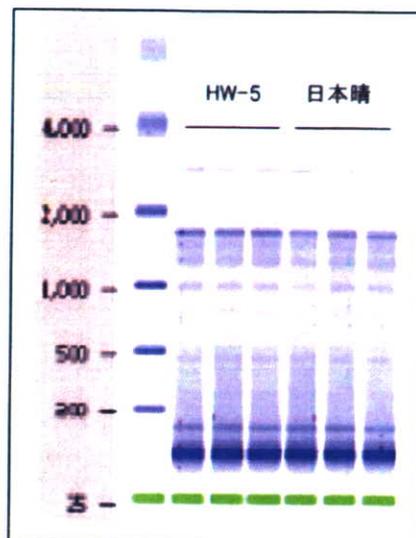


図 2 遺伝子組換え米(HW-5)、非組換え米(日本晴)から抽出した total RNA のチップ電気泳動解析結果

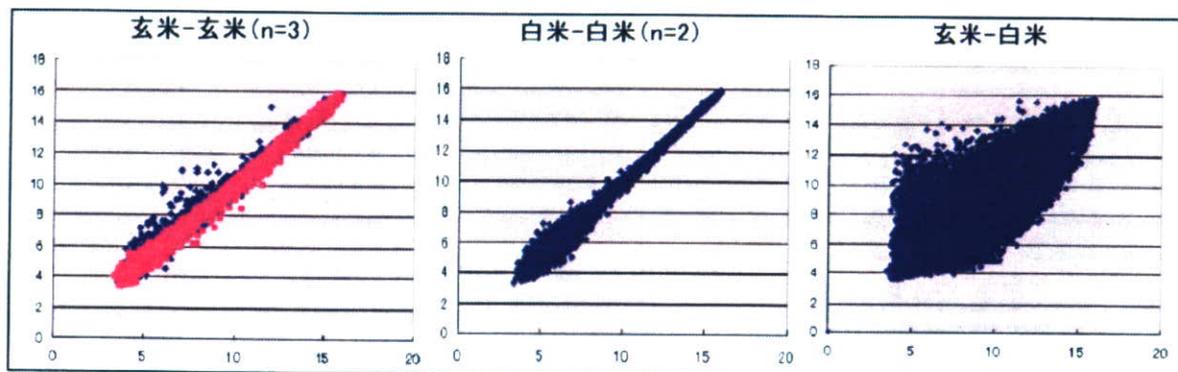


図 3 玄米と白米におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

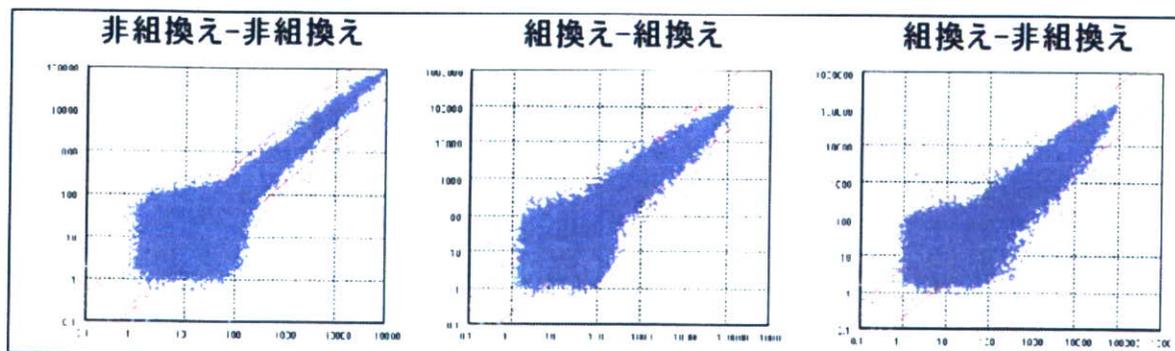


図 4 アラキドン酸合成遺伝子組換えダイズにおけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

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（2）

分担研究者 小関 良宏 東京農工大学工学部 教授

研究要旨：

今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とし、本年度は栄養改変型遺伝子組換え植物として、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を導入した高トリプトファン含有イネおよび糸状菌由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を導入したアラキドン酸蓄積ダイズを用いて、非遺伝子組換え体との発現タンパク質の違いをプロテオーム解析により比較検討した。その結果、栄養改変型遺伝子組換え植物において、個体差以上の発現タンパク質の変化は認められなかった。

協力研究者

佐々木和生（東洋大学生命科学部）

梅津博紀（岐阜聖徳学園大学短期大学部）

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められる一方、国際的な基準作りが進められている。バイオテクノロジーを応用した食品の中でも、特に、除草剤耐性、害虫抵抗性等の第一世代の遺伝子組換え作物の開発、作付けが米国を中心に進み、これら遺伝子組換え食品の国際的な流通が急速に広まっている。また、近年では、組換え微生物を利用した食品や組換え魚などの新たな遺伝子組換え食品や、食品の栄養成分を改変した遺伝子組換え食品の開発が進むとともに、とうもろこし等の作物を組換え、医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。わが国においては、平成 13 年 4 月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、最新の科学的知見に基づく審査を行うとともに、遺伝子組換え食品の表示について義務付けし、輸入時にモニタリング検査等を行っている。

このような状況の中、生産者のメリットを考慮した第一世代バイオテクノロジー応用食品に加え、消費者のメリットも考慮したモダンバイオテクノロジー応用食品についても実用化が現実のものとなりつつある現状に対応するため、本研究においては、今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応

するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とする。本年度は、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を導入した高トリプトファン含有遺伝子組換えイネと、アラキドン酸を生産する糸状菌 *Mortierella alpina* 由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を導入したアラキドン酸蓄積遺伝子組換えダイズの発現タンパク質の変化をプロテオーム解析によりプロファイリングすることを目的とし、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体それぞれのプロファイルを比較検討した。

B. 研究方法

<材料>

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所稲遺伝子技術研究チームより供与された遺伝子組換えイネの種子と比較対照用原種として日本晴の種子、およびサントリー株式会社研究センター田中良和博士より供与された遺伝子組換えダイズと宿主の非組換えダイズを材料として用いた。

<方法>

タンパク質抽出

粉碎した種子に抽出バッファー（8M Urea, 4%(W/V) CHAPS, 40mM Tris-HCl, 1 μ l/100 μ l Protease inhibitor mixture (Amersham Pharmacia Biotech)) を加え、10,000rpm で 10 分間遠心分離して上清を得た。得られた上清は再度 15,000rpm で 20 分間遠心分離して、得られた上清を粗抽出物とした。

電気泳動用サンプル調製

粗抽出物を 2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。精製後得られた沈殿を 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution (Amersham Pharmacia Biotech) に溶解し、限外濾過膜 (Microcon YM-10、Millipore) により低分子性物質を除去した。2-D Quant Kit によりタンパク質量を定量し、30 μ g 相当を電気泳動に供した。

電気泳動

・ 1次元目電気泳動 (IEF)

サンプルおよび 0.5% IPG buffer を含む Destreak Rehydration Solution を用いて Immobiline DryStrip 3-10NL 18cm (Amersham Pharmacia Biotech) を膨潤させ、Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて電気泳動した。500V で1時間、1000V で1時間通電した後、8000V で5時間30分泳動した。

・ 2次元目電気泳動 (SDS-PAGE)

IEF 終了後の Immobiline DryStrip は、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35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

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネのプロテオーム解析

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネそれぞれ3個体について、1次元目の電気泳動 (IEF) を同時に行い、2次元目の電気泳動 (SDS-PAGE) をそれぞれ個別に行い、可能な限り同じ条件で染色し、画像の取り込みを行った。遺伝子組換えイネ3個体と非遺伝子組換えイネ3個体をそれぞれ1つのグループとし、2つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。

非遺伝子組換えイネのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、887個のスポットが非遺伝子組換えイネのグループのいずれかの個体で検出され、749個は複数の個体で共通して検

出された。非遺伝子組換えイネのグループと遺伝子組換えイネのグループで共通して検出されたスポットは、89.9%に相当する797個であった。残りの10.1% (90個) は非遺伝子組換えイネのグループのみで検出された (図1)。また、遺伝子組換えイネのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、823個のスポットが遺伝子組換えイネのグループのいずれかの個体で検出され、672個は複数の個体で共通して検出された。遺伝子組換えイネのグループと非遺伝子組換えイネのグループで共通して検出されたスポットは、94.5%に相当する778個であった。残りの5.5% (45個) は遺伝子組換えイネのグループのみで検出された (図2)。

遺伝子組換えサイズと非遺伝子組換えサイズのプロテオーム解析

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

非遺伝子組換えサイズのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、968個のスポットが非遺伝子組換えサイズのグループのいずれかの個体で検出され、881個は複数の個体で共通して検出された。非遺伝子組換えサイズのグループと遺伝子組換えサイズのグループで共通して検出されたスポットは、94.5%に相当する915個であった。残りの5.5% (53個) は非遺伝子組換えサイズのグループのみで検出された (図3)。また、遺伝子組換えサイズのグループにおいて、最もタンパク質の分離が良かった泳動図をリファレンスとして解析したところ、1000個のスポットが遺伝子組換えサイズのグループのいずれかの個体で検出され、908個は複数の個体で共通して検出された。遺伝子組換えサイズのグループと非遺伝子組換えサイズのグループで共通して検出されたスポットは、93.4%に相当する934個であった。残りの6.6% (66個) は遺伝子組換えサイズのグループのみで検出された (図4)。

D. 考察

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネのプロテオーム解析

遺伝子組換えイネと非遺伝子組換えイネの間で、10%程度のグループ特異的のスポットが検出さ

れたが、このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要がある。しかし、それぞれのグループ内では、10%程度のスポットが同じグループ内で共通に検出されておらず、これらは個体差を反映するスポットであると考えられるため、グループ特異的スポットとして検出されたタンパク質も、個体差を反映している可能性が高いと考えられる。よって、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を組換えることにより、高トリプトファンを含有するイネにおいて発現するタンパク質には、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットのタンパク質を除いて、個体差によって生じる以上の変化は起こっていないことが示唆される。

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズの プロテオーム解析

遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズの間で、5%程度のグループ特異的スポットが検出されたが、このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要がある。しかし、それぞれのグループ内では、10%程度のスポットが同じグループ内で共通に検出されておらず、これらは個体差を反映するスポットであると考えられるため、グループ特異的スポットとして検出されたタンパク質も個体差を反映している可能性が高いと考えられる。よって、糸状菌由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を組換えることにより、アラキドン酸を蓄積するダイズにおいて発現するタンパク質には、糸状菌由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素のタンパク質を除いて、個体差によって生じる以上の変化は起こっていないことが示唆される。

E. 結論

栄養改変型の遺伝子組換え植物について、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、遺伝子組換え植物において、導入遺伝子の発現タンパク質を除いて、個体差以上の発現タンパク質の変化は起こっていないと考えられる。

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、太田大策、名古屋博之、

佐々木伸大、小関良宏「遺伝子組換え体の安全性評価へのポストゲノム手法の応用 1. プロファイリング技術による遺伝子組換え魚の非意図的影響の評価」日本食品化学学会第13回学術大会、東京、2007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

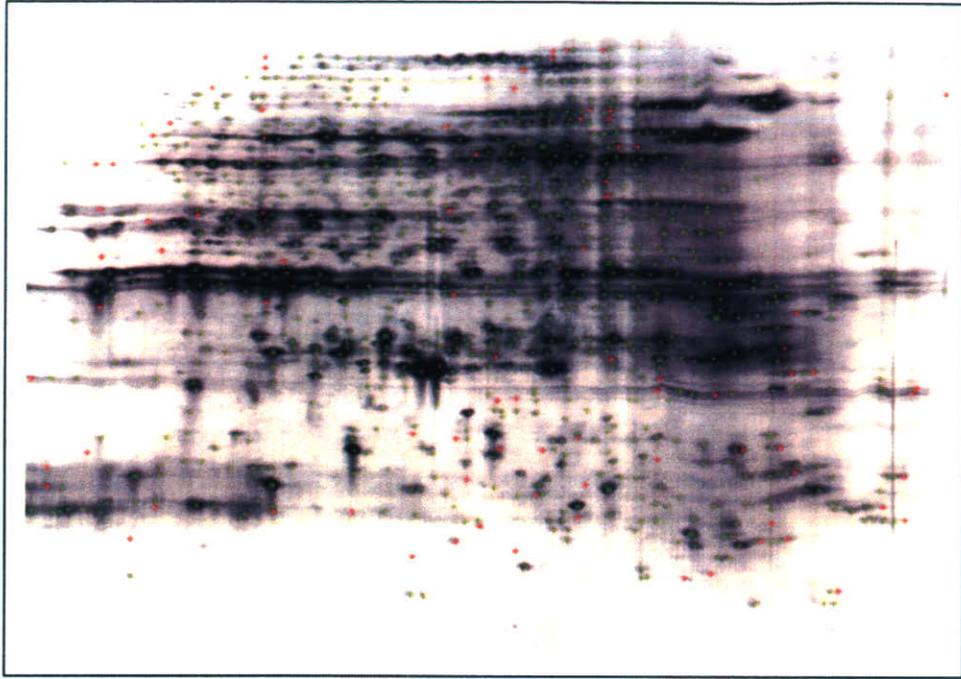


図1 非組換えイネをリファレンスとした解析
緑は、組換えイネと共通しているスポット。赤は、非組換えイネのみで検出されたスポット

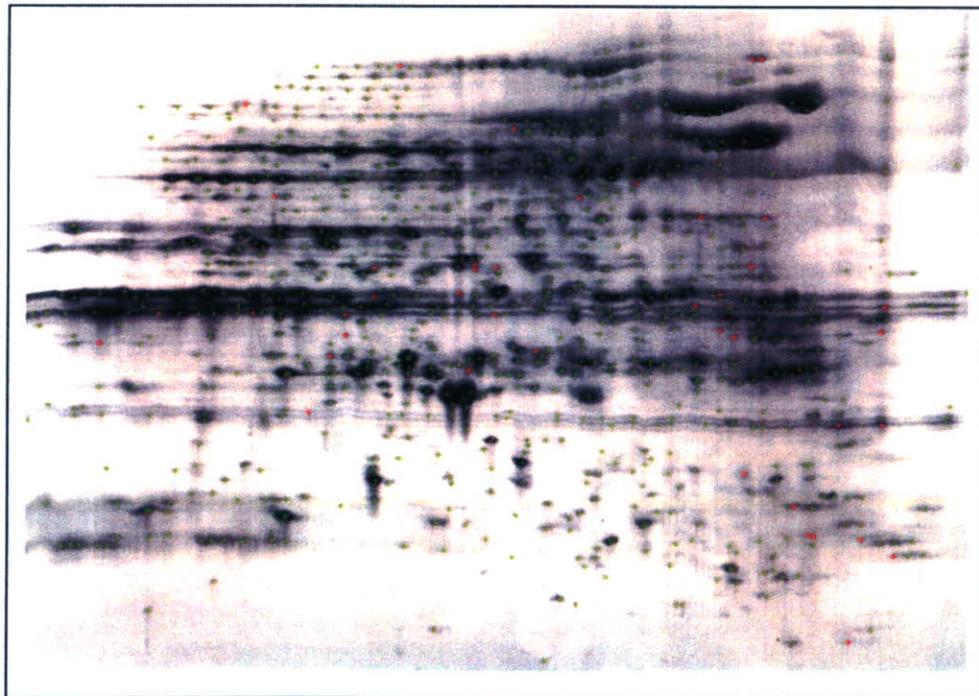


図2 組換えイネをリファレンスとした解析
緑は、非組換えイネと共通しているスポット。赤は、組換えイネのみで検出されたスポット。

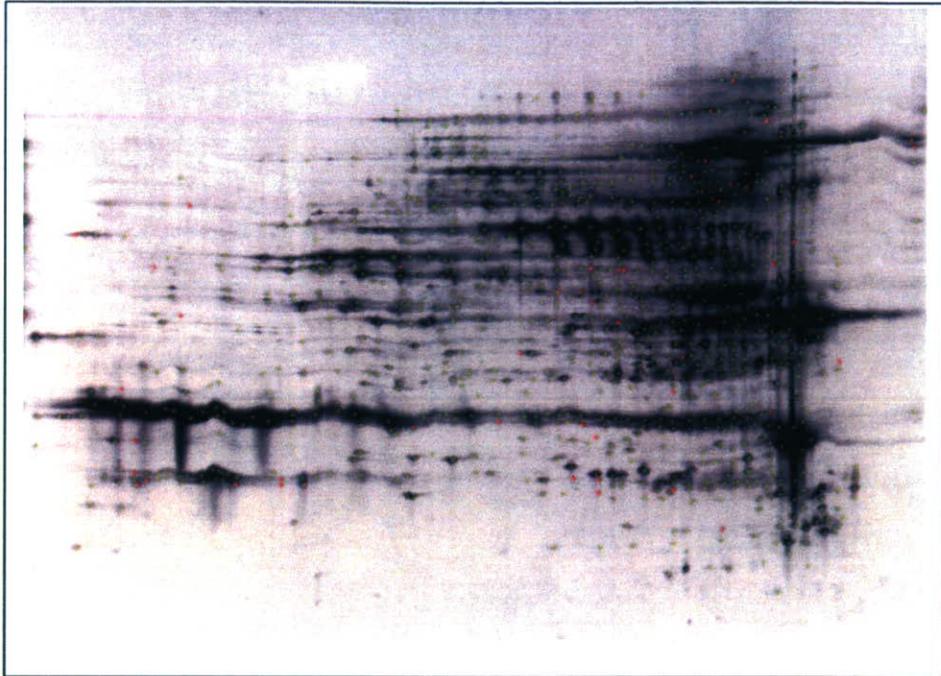


図3 非組換えダイズをリファレンスとした解析
 緑は、組換えダイズと共通しているスポット。赤は、非組換えダイズのみで
 検出されたスポット。

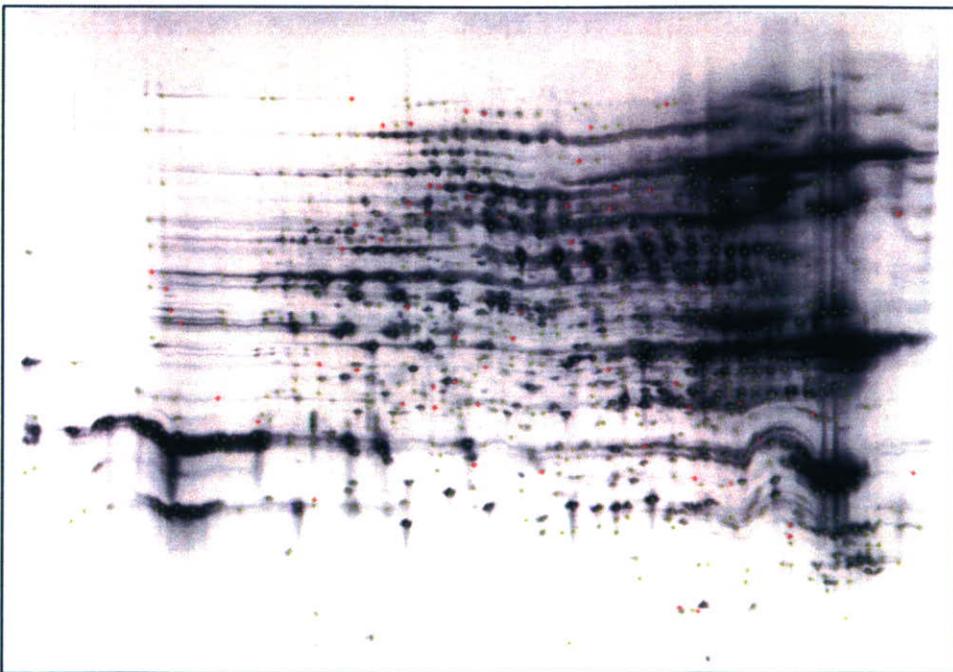


図4 組換えダイズをリファレンスとした解析
 緑は、非組換えダイズと共通しているスポット。赤は、組換えダイ
 ズのみで検出されたスポット。

平成 19 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 19 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（2）

分担研究者 小関 良宏 東京農工大学工学部 教授

研究要旨

遺伝子組換えによってイネ種子（コメ）の栄養素の増減、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の基礎データ取得を目指して、遺伝子組換えイネと非組換えイネ種子組織中の非タンパク性成分（代謝成分）の総和（メタボローム）をメタボロミクスによって比較・検討した。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-ICR/MS）による高分解能マスペクトル測定によって代謝成分の分析を行った。FT-ICR/MS 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、食品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 19 年度は、FT-ICR/MS を用いた玄米成分比較のためのメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法による FT-ICR/MS 分析、マスペクトルデータ（質量数と各ピーク強度）の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。分析には、遺伝子組換えイネ〔トリプトファン（Trp）高含有米、HW-5 系統〕と非組換えイネ（日本晴）を供試し、両サンプルのメタボロームを ESI 陰イオンモードおよび陽イオンモードで比較した。HW-5 と日本晴の玄米の低分子成分組成組成を主成分分析によって解析したところ、明確に異なるメタボロームクラスターが形成され、両者のメタボロームが異なることを示していた。HW-5 のメタボロームデータから、Trp と Trp 付加イオンを除いて主成分分析を行ったところ、HW-5 と日本晴のメタボロームに差異は認められなかった。

以上の結果は、今回の分析条件下では、遺伝子操作によって意図的に増加させた Trp 以外の低分子成分には、HW-5 と日本晴の間には顕著な差は検出できなかったことを示している。以上、FT-ICR/MS 分析とメタボローム解析によって、Trp 高含有米と日本晴の低分子成分組成の迅速な比較が可能であった。今後、個体間の差や産地の差などの情報を加味して比較するための実験計画が必要と思われる。

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）

暖化対策のための重要基盤技術として、今や必須の役割を担っていると言える。このような背景において、遺伝子組み換え技術を使用して作出・生産された食品の安全性に関する科学的実証データの集積は、社会的に重要な課題の一つであり、遺伝子組み換え作物の実質的同等性の確認を目的とした様々な分析が行われてきている。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は当然のこ

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。遺伝子組換え技術を使用した生物機能改変技術は、食料品への応用に留まらず、工業原料の生産や地球温

ととして、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っ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必要がある。本研究では、遺伝子組み換え技術によって作出されたトリプトファン（Trp）高含有米の低分子有機化合物成分組成（メタボローム）を、非組換え体と分析・比較することを目的とした。

B. 研究方法

<試料>

Trp 含量の増大を目的として作出された遺伝子組換えイネ（HW-5 系統）から収穫された玄米と非組換えイネ（日本晴）から収穫された玄米を供試した。

<方法>

玄米に含まれる化合物の一斉分析

玄米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 μ m）濾過して粗抽出液とした。この粗抽出液を蒸発乾固した後、溶媒（50%（v/v）アセトニトリル / 水）に溶解した。分析に際し、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 μ M、陰イオン測定時には 10 μ M の濃度にて添加した。

質量分析実験調製した抽出液は、7 テスラの超伝導磁石を備えた FT-ICR/MS（IonSpec 社製）分析

に供した。サンプルは 100 μ l 容のシリンジ（Hamilton）とシリンジポンプ（Harvard）を用いて、3 μ l/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 回の分析マスペクトルを取得した。それぞれのマスペクトルから約 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（陽イオンモードでは、延べ総数 6495 のイオン、陰イオンモードでは述べ総数 6695 のイオン）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-ICR/MS 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 および D. 考察

玄米のメタボロームの一斉解析

玄米に含まれる成分のメタノール抽出物を FT-ICR/MS で分析した。FT-ICR/MS 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。

本分析実験では、玄米中の Trp 含量が 500 nmol/mg DW 以上であればダイレクトインフュージョン一斉分析で検出可能であった。供試した HW-5 玄米中には 2322 ± 272 nmole/gDW の Trp が蓄積していることがわかった。文献的には HW-5 には約 3000 nmole/gDW の Trp が蓄積していることが報告されている(植物化学調節学会研究発表記録集、40:26)。今回の分析条件では、アントラニル酸など、HW-5 と日本晴の間で含量の差が報告されているシキミ酸経路に関連するメタボライト動態変化は検出されていない。

図 1、2、3、および 4 に、HW-5 玄米と日本晴玄米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。陰イオンモード分析(図 1、第一主成分の寄与率 68.0% と第二主成分の寄与率 15.6%) では、HW-5 玄米と日本晴玄米成分の明確なメタボローム差を示し

E. まとめ

組換え体玄米(HW-5)および非組換え玄米(日本晴)を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。主成分分析の結果は、HW-5 玄米と日本晴玄米のそれぞれを特徴づけるメタボロームの差が認められたが、その差異は HW-5 系統において意図的に改変された Trp 含量の差によるものであった。すなわち、今回の分析条件下では、原因不明の代謝成分変動は検出されなかった。

これまでに構築した FT-ICR/MS 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-ICR/MS 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、今回の分析のように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。今後、個体間の差や産地の差などの情報を加味して比較するための実験計画が必要と思われる。

ているが、図 1 の HW-5 玄米の分析結果から Trp 関連イオンを除いて主成分分析したところ、両サンプルのメタボロームは区別できなかった(図 2、第一主成分 68.1%、第二主成分 12.6%)。陽イオンモードでの分析結果でも同様の結果が得られた。図 3 (第一主成分 53.0%、第二主成分 27.9%) では、HW-5 玄米と日本晴玄米成分の間に明確なメタボローム形成に差が認められるが、図 3 の HW-5 玄米の分析結果から Trp 由来の情報を除いた場合(図 4、第一主成分 76.2%、第二主成分 12.8%)、両サンプル間のメタボローム差は無かった。以上の結果は、HW-5 玄米と日本晴玄米の低分子成分の組成、すなわちメタボロームに差異があること、その差異には HW-5 系統作出において意図的に改変された Trp 含量の差が大きく寄与していることを示している。

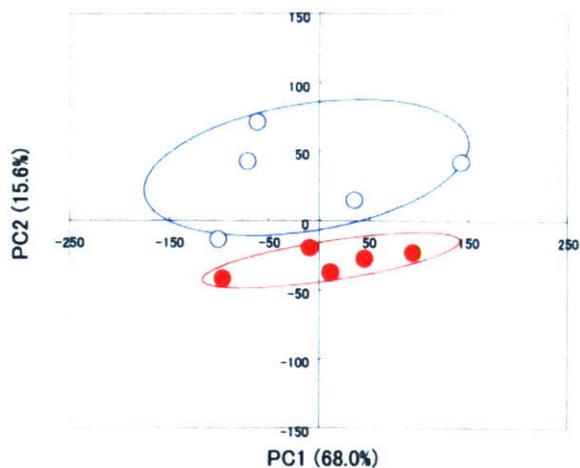


図 1. 組換え体イネ (HW-5) の玄米サンプル, 非組換え体イネ (日本晴) の玄米サンプルをそれぞれ陰イオンモードで一斉解析し 30 連のスペクトルから再現性を持って出現する 300 種類のイオンについて多変量解析した.
HW-5 ; ●, 非組換え体 ; ○.

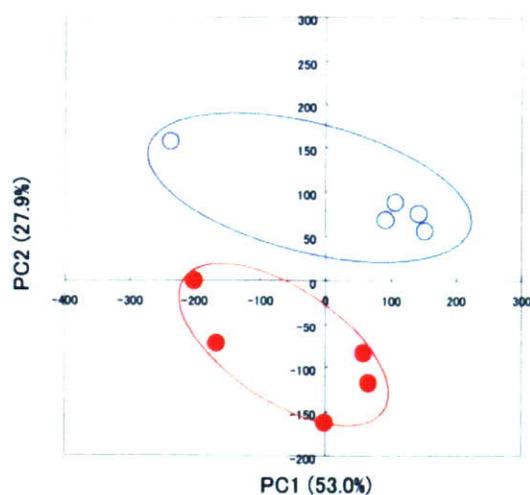


図 3. 組換え体イネ (HW-5) の玄米サンプル, 非組換え体イネ (日本晴) の玄米サンプルをそれぞれ陽イオンモードで一斉解析し 30 連のスペクトルから再現性を持って出現する 300 種類のイオンについて多変量解析した.
HW-5 ; ●, 非組換え体 ; ○.

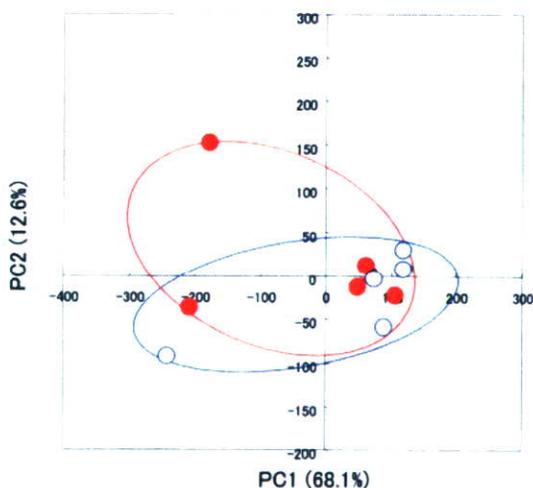


図 2. 図 1 に用いた分析結果において, Trp 高含有 HW-5 玄米のデータから, Trp および Trp 付加体のピークを除いてメタボローム比較を行った.
HW-5 ; ●, 非組換え体 ; ○.

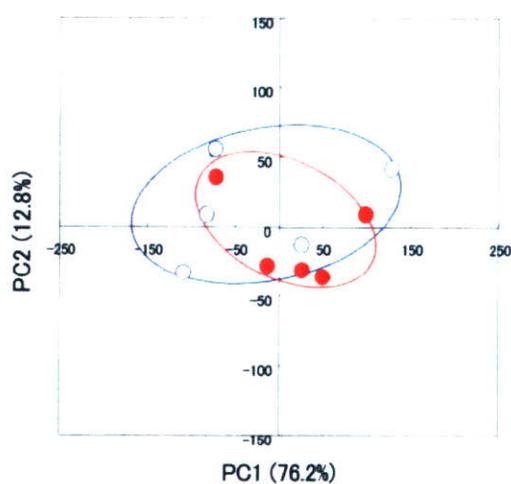


図 4. 図 3 に用いた分析結果において, Trp 高含有 HW-5 玄米のデータから, Trp および Trp 付加体のピークを除いてメタボローム比較を行った. HW-5 ; ●, 非組換え体 ; ○. 図 2. 図 1 に用いた分析結果において, Trp 高含有 HW-5 玄米のデータから, Trp および Trp 付加体のピークを除いてメタボローム比較を行った.
HW-5 ; ●, 非組換え体 ; ○.

平成19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

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 穠山浩 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 室長

研究要旨

1. リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発 従来のPCR法に加え LCR 法を GM 検知技術に新たに導入した点で有意義であり、また、本研究で開発した技術は広範囲の GM 農作物の高感度な定性検出を効率的に実施可能な点で有用である。今後、本研究で分析に供した GM トウモロコシ、GM ダイズ系統以外の GM 植物の検出に関する実証データの取得が望まれる。また、標的となる組換え DNA 領域を新たに反応に追加することで、検出可能な GM 農作物の拡充が期待される。

2. シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイヤからの DNA 抽出精製法の検討 遺伝子組換え (GM) パパイヤ検知のための DNA 抽出精製法として、新たに Promega Wizard DNA Clean-Up Resin System を用いたパパイヤ生試料およびパパイヤ凍結乾燥試料からの DNA 抽出精製法 (WCR 法) を検討した。WCR 法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、WCR 法は、シリカゲル膜タイプキット法および CTAB 法よりも DNA 収量が著しく高く、様々な熟し度合いのパパイヤからも、定性 PCR 用として十分な濃度の DNA 試料原液を得ることが可能となった。

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の改良定量分析法が他の機種においても適用可能であるか、ABI7500 を用いて検証を行ったが、ゲノムの前処理による PCR 効率の顕著な差は認められなかった。

4. 中国産 GM トマト及びピーマンの検知法の確立と調査 トマトおよびピーマンを原料に用いた加工食品からの DNA 抽出を行ったところ、Stool mini kit 法によって、定性 PCR に供するための DNA を確実に得られた。いずれの試料においても内在性遺伝子である CPO は全て検出された。特にトマトを原料に用いた食品にはレトルトのソース類など加工度の高いものが多いことから、Stool mini kit 法は有効な抽出精製法と考えられた。市場で購入したトマトおよびピーマンを原料に用いた加工食品 22 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

5. 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 我々は既に輸入ビーフン検体から GM Shanyou 63 系統と同じ特異的構造を有する Bt コメ (Bt63)、および GM Shanyou 63 系統の特異的構造と異なる Bt コメ (未知 Bt 系統) の混入を明らかにしている。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により、輸入もち米から未知 Bt 系統の混入を同定した。またその未知 Bt 系統混入もち米検体から、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現領域も新たに検出した。さらにこの領域から、新規検知法を開発するために必要な同カセットの未知領域を導き出す Inverse PCR 法と、Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。

6. 三成分同時発光酵素免疫アッセイによる未承認遺伝子組換えパパイヤ検知の検討 イクオリン (Aq)、ビオチン化ルシフェラーゼ (b-Luc) 及び西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の三酵素同時発光検出法を用いた、三成分同時発光酵素免疫アッセイによる GM パパイヤの検知法を確立した。

協力研究者

橘田和美、古井聡、真野潤一、小口太一（食品総合研究所）、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）、笠原正輝、児玉貴志（独立行政法人農林水産省消費技術センター）、吉松嘉代、河野徳昭（独立行政法人医薬基盤研究所）、

小関良宏, 佐々木伸大 (東京農工大学)

A. 研究目的

1.リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発 現在, 遺伝子組換え (GM) 農作物の多様化が進んでいる。これまでにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用した個別のGM農作物系統に対する分析法が数多く開発されてきたが, 標的系統を特定せず広範囲のGM農作物の同時検知を可能にする方法はこれまでにない。こうした分析手法は, 食品表示制度検証, 或いは環境放出のモニタリング検査での利用が期待される。そこで当研究グループでは広範囲のGM農作物を同時に検知可能な分析法の開発を検討した。

2.シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイヤからのDNA抽出精製法の検討 GMパパイヤは, EUおよび日本では輸入および栽培が禁止されている。しかし, ハワイやタイなどではGMパパイヤが栽培されており, non-GMパパイヤへのコンタミネーションが問題となっている¹⁻³⁾。したがって, non-GMパパイヤへのGMパパイヤ混入を効率的に検知する方法が必要である。現行の通知法³⁾におけるGMパパイヤ検知法では, DNA抽出精製法として, CTAB法とシリカゲル膜タイプキット法 (Plant Mini法) が適用されている。しかしながら, CTAB法ではフェノールおよびクロロホルム等の有害試薬を使用する上, DNAはほとんど抽出できないのが現状である。また, Plant Miniについては, 抽出過程で試料がゲル化し抽出操作が困難となる場合があり, 抽出されるDNA試料原液の濃度は, 定性PCRに使用される濃度の目安である10 ng/uL前後と低濃度である。そこで, パパイヤからのDNA抽出精製法として, シリカベースレジソタイプキット法 (WCR法) を用いて, 簡便かつ高濃度のDNA試料原液が得られる方法の開発を試みた。

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 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, 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において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。そのため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を行っている。本研究においては, LightCycler systemを用いた遺伝子組換えトウモロコシの改良定量分析法が他の機種においても適用可能であるかどうかの検証をABI7500により行った。

4.中国産GMトマト及びピーマンの検知法の確立と調査 中国では抗ウイルス性トマト, 抗ウイルス性ピーマン及び抗成熟促進トマトが開発されている。一方, 加工品の中国産トマトは世界最大の流通量であることから, 混入する可能性も考えられた。そこで文献情報より, 抗ウイルス性トマト, 抗ウイルス性ピーマン及び抗成熟促進トマトの検知法を確立し, その方法を用いて国内流通の加工食品の実態調査を行った。

5.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 中国で開発された遺伝子組換えコメ (Bt63 コメ) は, 殺虫活性を示す *Bacillus thuringiensis* (Bt)由来 CryIAc タンパク質の遺伝子を導入した遺伝子組換えコメである。我が国ではBt コメに関して食品の安全性未審査であるため, 輸入時にコメ及びコメを含む加工品に対しモニタリング検査を行い, 国内流通を未然に防ぐ必要がある。本研究では, 文献情報⁴⁻¹⁰⁾とDNAデータベース情報に基づいた解析により未知 Bt 系統を調査し, 安全性未審査遺伝子組換えコメ全般を対象とした検知技術を開発した。またこのような未知系統にも迅速に対応し, 新たな検知法を確立させるための手段として, スクリーニングで明らかになった未知系統組み換え配列の一部から, その近傍領域を解析する方法を検討した。

6.三成分同時発光酵素イムノアッセイによる未承認遺伝子組換えパパイヤ検知の検討 未承認遺伝子組換え (GM) パパイヤのモニタリング検査には, 高感度で迅速なGMパパイヤ特異的遺伝子の検知法が必要と考えられる。厚生労働省通知検査法では, GMパパイヤに特異的である検出用, 確認用プライマー対に加え, パパイヤ内在性の陽性

対照用プライマー対の3種を用いて各々PCR増幅し、その産物を電気泳動法により検知する方法が採用されている。今回我々は、イクオリン (Aq)、ビオチン化ルシフェラーゼ (b-Luc) 及び西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の三酵素同時発光検出法を用いた、三成分同時発光酵素イムノアッセイによるGMパパイヤの検知の簡便化と高感度化について検討した。

B. 研究方法

1. リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発 これまでに実用化されているGM農作物には、発現調節領域や薬剤耐性マーカー遺伝子等の組換えDNA領域が系統間で共通して導入されている。これらの共通した組換えDNA領域を検出することで、広範囲のGM農作物の一斉検知が可能となることが予想される。リガーゼ連鎖反応(LCR)法は、配列特異性の高いDNA増幅法である。さらに近隣に存在する複数の標的DNA領域の多重増幅を行う場合、PCR法に比べ、想定以外の増幅長をもつDNA断片が生じない等利点がある。このためリガーゼ連鎖反応を利用し、GM農作物に共通して導入されている標的配列を一斉に検出する分析手法の開発を試みた。

2. シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイヤからのDNA抽出精製法の検討 non-GMパパイヤの凍結乾燥粉末試料および生ホモジネート試料を用いて、WCR法における試料採取量、抽出時間およびProteinase K添加量の検討を行った。それらにより決定したDNA抽出精製法を用いて、GMパパイヤ粉末からDNAを抽出精製し、内在性遺伝子用プライマー対、検出用プライマー対および確認用プライマー対を用いたPCRにより、予想される大きさのDNA増幅バンドが検出されるか否かについて検討を行った。次に、確立したWCR法によりパパイヤ凍結乾燥粉末試料および生ホモジネート試料から得られたDNA試料原液について、通知法であるCTAB法およびPlant Mini法により得られたDNA試料原液との比較を行った。さらに、パパイヤは青い未熟状態のみで輸入が許可されており、検査試料としては、未熟から完熟まで様々な状態のパパイヤを取り扱う可能性があることから、確立したWCR法について、熟し

度合いがことなるパパイヤにおける適応性を検討した。

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 3-1) 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碎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 (米国产トウモロコシ) 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碎器を用いて粉碎した後に用いた。3-2) DNA抽出法および前処理 DNA抽出法および前処理法は既報に従った。3-3) 定量PCR条件 厚労通知法に従い、トウモロコシ内在性遺伝子 (*SSI1b*) およびMON810 特異的 DNA 配列を標的とする定量系 (*SSI1b*, *P35S* および *MON810* 定量系) を用いた。PCR温度条件は厚労通知法に従い行った。アニーリング温度について、厚労通知法の59℃と55℃で比較を行った。3-4) 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。なお、DNA試料溶液の希釈にはEASY Dilution (for Real Time PCR) (タカラ) を用いた。

4. 中国産GMトマト及びピーマンの検知法の確立と調査 4-1) 試料 市場に流通している食品で、トマトを原材料に使用しているもの (トマトジュース、トマトピューレー、ミートソース等) 9検体と、ピーマンを原材料に使用しているもの (冷凍野菜、レトルト食品具材等) 13検体を用いた。冷凍食品およびレトルトの惣菜については目視でピーマンと確認できたものを採取して試料とした。

4-2) 試料調製 試料はすべて凍結乾燥を行い、粉碎した。液体試料 (トマトジュース等) については、3000rpm、4℃で20分間遠心分離後上清を除去した後、凍結乾燥を行った。4-3) DNA抽出精製 DNeasy Plant Maxi kit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、3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kitによるDNAの抽出Aに準じた。QIAGEN-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。

Stool mini kit 法 : QIAGEN User-Developed Protocol : GMO testing of food samples using the QIAamp[®]DNA Stool Mini Kit and the HotStarTaq[™] Master Mix Kit; for 0.2 g samples に従った. 4-4) DNA濃度および純度測定, PCR増幅, 電気泳動 厚生労働法に従った. 定性PCRはP35S, NOS, CaMcmv1, CaMcmv 2, CaMcmv 3, CMV1, CMV 2, CMV 3および内在性遺伝子CPOの9対のプライマー対について, PCR温度条件は以下の通りとした. 温度条件1: 95℃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℃30秒, 56℃30秒, 72℃30秒を1サイクルとして, 45サイクルの増幅反応後72℃7分間の保持をおこなった. 温度条件2: 温度条件1のアニーリング温度を60℃に変更した.

5.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 5-1) 試料 遺伝子組換えコメ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 (コシヒカリ) については, インターネットを通じて購入したものを用いた. 5-2) コメを対象としたDNA抽出法 米粉からの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. 均質に粉碎した試料500 mgをポリプロピレン製遠沈管 (15mL容) に量り採り, GE 1緩衝液2.1 mL, Proteinase K (20mg/mL) 60 μ L, α -アミラーゼ (高濃度品) 6 μ L及び, RNase A (100mg/mL) 30 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℃の条件で30分間加温した. GE2-K緩衝液255 μ Lを加え, ボルテックスミキサーで十分に混和後, 氷上に10分間静置した. 6000 \times g以上, 4℃の条件で15分間遠心した. 上清を2mL容チューブに移し, 13,000 \times g以上, 4℃の条件で5分間遠心した. 次いでその上清を15mL容チューブに移し, 上清1 mLに対してGB3緩衝液375 μ L及びイソプロパノール (100%) 375 μ Lを添加した後, 10~12回転倒混和した. 混合液を700 μ Lずつspin columnに負荷した後, 13,000 \times g以上, 4℃の条件で30秒間遠心し, 溶出液を捨てた. すべての溶出液を負荷するまでこの操作を繰り返した. 次いでGW緩衝液650 μ Lを負荷し, 13,000 \times g以上, 4℃の条件で1分間遠心し, 溶出液を捨てた. spin columnを新たな1.5mL容チューブに移し, TE緩衝液50 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200nmから320nmの波長域で連続的に測定し, O.D. 230nm, 260nm, 280nmでの吸光値から260nm/280nm及び260nm/230nmの比を求めることで精製度の確認を行った. また, O.D. 260nmの吸光値1を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出した. 5-3) 定性PCR条件 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使用した. 反応液は, PCR緩衝液, 0.16 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L塩化マグネシウム, 0.6 μ mol/L 5'及び3'プライマー並びに0.8 units Taq DNAポリメラーゼを含む液に, 10 ng/ μ Lに調製したDNA試料液5.0 μ L (DNAとして50ng) を氷中で加え, 全量を25 μ Lにした. 次に, その反応試験管をPCR増幅装置にセットした. 装置はABI7900を用いた. 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. 5-4) Inverse PCR条件 (既知配列からの近傍領域解析1) 増幅したい未知領域に隣接する既知領域の制限酵素サイトを調べ, 少なくとも1箇所存在するサイトの制限酵素のうちEco RI, Eco RV, Nco Iを選択した. 次いで既知領域内において, 制限酵素サイトと未知領域の間に互いに逆向きになるようにプライマー対2種 (InvF'1 / InvR'1), (InvF'2 / InvR'2) を設計した. 抽出DNA 1 μ gをそれぞれ20 unitsの制限酵素にて処理後, キアゲン社製QIA purification kitにて最終液量が30 μ Lとなるように精製した. これにNew England Biolabs社製T4 ligase 2000 U, ライゲーション緩衝液, 滅菌水を加え, 最終液量100 μ Lとして, 16℃の条件で一昼夜セルフライゲーションをした. 再度, 最終液量が30 μ LとなるようにDNA精製後, これを鋳型としてInverse PCRを行った. 5-5) Adaptor-Ligation PCR条件 (既知配列からの近傍領域解析2) ベックス製RightWalk kitを用いた. このキットに適用できる制限酵素のうち, λ DNAを用いたコントロール実験を並行して実施するため, これに適当なBamHIを選択した. 次いでnested PCR用として, Forwardプライマーにはアダプター配列特異的 (WP1, WP2), Reverseプライマーには既知配列特異的なもの (SckR1, SckR2) を1回目と2回目用に作成し, その際, 2回目に使用する

プライマー対は、1回目のものよりも内側に設計した。λDNAを用いたコントロール実験においては、既知配列プライマー (λDNA1, λDNA2) を使用した。300 ngのDNAを最終液量10 μLとして10 units BamHIで処理後、1 mM dGTP, 5 units klenow enzyme (3'→5' exo-) を加え、37°Cの条件で30分間反応後、75°Cの条件で20分間静置することで酵素を失活させ、一塩基伸長した。次いでこれに長鎖と短鎖をアニーリングさせ作成したアダプターを付加するため、東洋紡社製Ligation high 10 μLと40 pmolアダプターを加え、16°Cの条件で一昼夜静置した。このDNA溶液を希釈してPCRの鋳型とした。1回目PCRにて得られた増幅産物を、さらに1000倍希釈してnested PCRの鋳型とし、増幅させた。

6.三成分同時発光酵素免疫アッセイによる未承認遺伝子組換えパパイヤ検知の検討 GMパパイヤ遺伝子及び非GMパパイヤ遺伝子に各々特異的なFITC, digoxigenin, biotin, 2,4-dinitrophenol (DNP) 修飾プライマー対の計3種を用いMultiplex PCRを行った。得られた増幅産物を希釈し、抗FITC抗体を固相化したプレートに加え室温で1時間放置した。洗浄後、Aq標識抗digoxigenin Fab抗体、ストレプトアビジン-b-Luc複合体、HRP標識抗DNP抗体溶液を各々添加し室温で1時間反応させた。再洗浄後、最初にカルシウム溶液を加えAqの発光を測定した。次にルシフェリン溶液を加えb-Lucの発光を測定した。最後にルミノール溶液を加えHRPの発光を測定し、同一ウェル内3種の遺伝子の検出を行った。

C. 研究結果

1.リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発 多重PCR及び多重LCRを利用し、7つの組換えDNA領域を同時に検出可能な分析手法を検討した。これに加え、分析法における陽性対照試験として、トウモロコシ、ダイズ内在性遺伝子及び植物共通配列である18SリボソームRNA遺伝子の3つのDNA領域を同時に検出可能な分析手法を検討した。GMトウモロコシ、GMダイズ各種系統種子から抽出したDNAを用いて上記分析手法の反応特異性を確認したところ、各系統に導入されている組換えDNA構造に対応した特異的なDNA増幅が確認された (Fig.

1)。また、各抽出DNAを混合し調製した擬似混入DNA試料を上記分析手法に供したところ、組換えDNA領域の高感度な検出が可能であることが確認された。

2.シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイヤからのDNA抽出精製法の検討 **2-1) WCR法を用いたDNA抽出精製条件の検討** non-GMパパイヤの凍結乾燥粉末試料および生ホモジネート試料を用いて、WCR法における試料採取量、抽出時間およびProteinase K添加量の検討を行った。その結果、試料採取量は、凍結乾燥粉末試料の場合は100 mg、生ホモジネート試料の場合は500 mgが最適であった (Fig. 2)。抽出時間については、15分間でも3時間と同等のDNA試料原液が得られることから、抽出時間は15分とした (Fig. 3)。また、Proteinase Kについては、無添加の場合でも添加の場合と同等のDNA試料原液が得られることから、Proteinase Kは添加しないこととした (Fig. 4)。抽出温度は、通知法に記載された55~60°Cのほぼ中点である58°Cとした。以上のDNA抽出精製条件により、WCR法を確立した。

2-2) GMパパイヤにおけるWCR法の検証 確立したWCR法を用いて、GMパパイヤからDNAを抽出精製した。その結果、抽出されるDNAは110±7 ng/μL、吸光度比260nm/280nmは1.9であり、質および量ともに良好なDNAが得られた (Fig. 5)。また、WCR法を用いて得られた抽出DNAについて、内在性遺伝子用プライマー対、検出用プライマー対および確認用プライマー対を用いたPCRにより得られた増幅バンドは、通知法であるPlant Mini法を用いて得られた抽出DNAにおける増幅バンドと同等であった (Fig. 6)。

2-3) CTAB法およびPlant Mini法との比較

WCRにより得られたDNA試料原液について、通知法であるCTAB法およびPlant Mini法と、DNA濃度、DNA収量および吸光度比260nm/280nmによる純度の比較を行った。その結果、凍結乾燥粉末試料から得られたDNA試料原液の濃度はCTAB法およびPlant Mini法では10 ng/μL以下であったが、WCR法では66 ng/μLであった。また、生ホモジネート試料についても、WCR法では37 ng/μLのDNA試料原液が得られた。凍結乾燥粉末試料から得られたDNA収量については、CTAB法では1.3 μg/g、Plant Mini法では7.7 μg/gであった

が、WCR法では132 µg/gと格段に高収量であった。吸光度比260nm/280nmについては、WCR法はCTAB法およびPlant Mini法とほぼ同等であった (Fig. 5)。

2-4) 熟し度合いが異なるパパイヤでのWCR法の適用性 糖度が7~20%の間で異なる3種のパパイヤの凍結乾燥粉末試料について、WCR法を用いてDNAを抽出精製した。その結果、得られたDNA試料原液の濃度は45~185 ng/µL、吸光度比260nm/280nmは1.7~1.9であり、いずれの試料からも良質ともに良好なDNAが得られることが確認された (Fig. 7)。

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 プラスミドDNA、ゲノミックDNAおよび超音波処理と制限酵素処理を組み合わせる前処理を行ったゲノミックDNAについて、*SSIIb* 定量系のPCR効率はアニーリング温度59°Cの場合、プラスミドDNAで1.902、ゲノミックDNAで1.914、処理済ゲノミックDNAで1.979であり、アニーリング温度55°Cの場合、それぞれ1.924、1.882および1.967であった。*P35S* 定量系のPCR効率はアニーリング温度59°Cの場合、プラスミドDNAで1.897、ゲノミックDNAで1.951、処理済ゲノミックDNAで2.097であり、アニーリング温度55°Cの場合、それぞれ1.972、2.011および1.979であった。*MON810* 定量系のPCR効率はアニーリング温度59°Cの場合、プラスミドDNAで1.918、ゲノミックDNAで2.058および処理済ゲノミックDNAで2.051であり、アニーリング温度55°Cの場合、それぞれ1.978、2.031および1.958であった。

4. 中国産GMトマト及びピーマンの検知法の確立と調査 DNeasy Plant Maxi kitおよびQIAGEN-Gtip法で予備的にDNA抽出精製を行ったところ、いずれの試料においてもDNA収量が低かったため、比較的DNA収量が高いStool mini kit法によるDNA抽出精製を全ての試料について行った。レトルト食品など加工状態によってはDNA収量が10 mg以下と低い試料も見受けられた。抽出DNA濃度が10 ng/µLに満たないものは原液で定性PCRに供したが、いずれの試料においても内在性遺伝子であるCPOは全て検出された。全ての試料からP35S, NOS, CaMcmv1, CaMcmv2, CaMcmv3, CMV1, CMV2およびCMV3のプライマー対で目的

とする塩基長のバンドは増幅されなかった。PCR温度条件1では特にCaMcmv1, CaMcmv3のプライマー対を用いた場合に非特異バンドが多く見受けられたが、温度条件2においては非特異バンドが減少した。

5. 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 5-1)~3)コメに特異的な遺伝子として、コメゲノムに内在するsucrose phosphate synthase (SPS)遺伝子から90 bpの増幅バンド長が得られるプライマー対 (SPS-F / SPS-R) を用いた。我々は既に次にBt 63を検知する目的でプライマー対を設計した。Cry1Ac遺伝子情報を基にBt toxin遺伝子 (Cry1AcとCry1Abの融合DNA塩基配列) 領域を認識するプライマー対 (AC-3F / AC-3R) の設計を行った。またBtコメを特異的に検知するためにActin promoter配列からBt toxin遺伝子の境界領域を認識するプライマー対 (actACS-F / actACS-R) を設計した (Fig. 8-1-a)。またBt 63の特異的検出には、他研究機関においてすでに開発されているBt 63のBt toxin遺伝子からnopaline synthase terminator (NOS-T) の境界領域を検知するプライマー対 (Oscry1Ac-F / OsNOS-R2) を用いた (Fig. 8-1-a)。Bt toxin遺伝子領域を認識するプライマー対である (AC-3F / AC-3R) を用いてビーフン3検体 (擬陽性2検体と陰性1検体) 及び、もち米3検体 (擬陽性2検体と陰性1検体) を用いてPCR増幅をしたところ、もち米擬陽性検体から増幅断片長90 bpのバンドが検出された。(actACS-F / actACS-R) を用いた検討ではビーフン擬陽性検体のみから増幅断片長120 bpのバンドが検出された。次にBt toxin遺伝子からNOS-Tの境界領域を認識するプライマー対 (Oscry1Ac-F / OsNOS-R2) を用いた検討では、ビーフン擬陽性検体ともち米擬陽性検体から、増幅断片長およそ147 bp付近のバンドが検出された。両方の増幅産物をシーケンス解析した結果、ビーフン擬陽性検体からの増幅産物の塩基配列はBt 63の配列と一致したが、もち米から検出された増幅産物の塩基配列はBt 63の配列と一致せず、予想増幅断片長よりも短かった (Fig. 8-2, 8-3)。この結果から、もち米検体から得られたPCR増幅産物はBt 63に使われているベクターとは異なるベクターが挿入された未知Bt系統が混入している可能性が示唆された。もち米に検出された未知Bt系統は論文情報からKemigdao系統とよばれ

ているBtコメの混入が予想された。そこで未知Bt系統におけるBt toxin遺伝子のプロモーター領域を解析するために、Kemigdao系統の構造に使われているmaize ubiquitin promoterとBt toxin遺伝子の境界領域を増幅されるためプライマー対を設計し、PCR増幅を行った (Fig. 8-1-b)。得られた増幅産物をシーケンス解析したところ、増幅産物前半領域[7-451]はmaize ubiquitin promoterと相同性を示し、後半領域[471-836]はCryIAbと相同性を示した。その中央領域[451-471]はマルチクロニングサイトと考えられる領域が明らかになった (Fig. 8-4)。このことからBt toxin遺伝子のプロモーターはmaize ubiquitin promoterであることが示唆された。さらに、Soybean kunitz trypsin inhibitor (SKTI) gene (*skti*), Cowpea trypsin inhibitor gene (CpTI) gene (*cpti*), 及びER retention signal (KDEL)から構成されるSck geneが検出された。Sckについての文献情報によりSck-NOS ターミネーターを検出するプライマー対5種 (sSCK F1/sNOS R1, sSck F2/sNOS R1, sSck F3/sNOS R3, sSck F4/sNOS R4, sSck F5/sNOS R4) を作成した。PCRにて増幅後、アガロース電気泳動を行ったところ、(sSck F2/sNOS R1)にて増幅断片長約650bpのバンドが得られた (Fig. 8-5)。これをシーケンス解析した結果、新たにSck geneと隣接したNOSターミネーターが検出された (Fig. 8-6)。5-4) 上記にて検出されたSck gene配列より設計したプライマー4種 (InvF'1/InvR'1), (InvF'1/InvR'2), (InvF'2/InvR'1), (InvF'2/InvR'2) を用いInverse PCRを実施した。2% TAEアガロースゲル電気泳動の結果、(InvF'1/InvR'1)において増幅断片長およそ270bp, 180bp, 100bpの3つの異なるサイズのバンドを、(InvF'2/InvR'1)にて約850bpのバンドを得た (Fig. 8-7)。いずれも異なる制限酵素で処理したにも関わらず、同様の結果であった。前者は目的サイズより小さいとみなし、後者のみのシーケンス解析を実施した結果、得られた増幅産物はイネゲノムであった。5-5) 本研究では検出されたSck geneの上流を解析することを目的としたため、Sck gene配列からReverseプライマーを設計した。コントロール実験で得られた増幅産物はサイズが大きいため0.8% TAEアガロースを使用し、予想通りの結果が得られた。もち米サンプルをnested PCR後、コントロール実験と同様に0.8% TAEアガロースゲル

にて電気泳動したところ増幅産物長が短かったため、2% TAEを使用した。その結果、増幅断片長およそ700bp, 510bp, 280bpの3つの異なるサイズのバンドを得た (Fig. 8-8)。そのうちサイズの大きな2本のバンドについてシーケンス解析を行ったところ、いずれもイネゲノムであった。

6. 三成分同時発光酵素イムノアッセイによる未承認遺伝子組換えパパイヤ検知の検討 同時発光検出法による各酵素の検出感度は Aq; 2.8×10^{-20} , b-Luc; 6.5×10^{-19} , HRP; 1.9×10^{-17} mol/assay, 同時再現性は各々 7.9%以下であり、全測定が約 10 分で可能であった。本発光法を三成分同時発光酵素イムノアッセイによる GM パパイヤ特異的遺伝子の検出に適用したところ、3 種 PCR 増幅産物の検出が可能であった。

D. 考察

1. リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発 多重PCR及び多重LCRを利用した分析手法により、非常に広範囲のGM農作物を高感度に検出することが可能となった。生物多様性影響評価書等に基づき、各GM農作物系統に導入されている組換えDNAの情報を調査した結果、本研究において使用したGMトウモロコシ、GMダイズの各系統のみならず、カルタヘナ法に基づき国内での流通が認められているGM植物 (2007年11月時点) の内、56系統に対する検出が可能であると予想された。また、同時検出が可能となった7つの組換えDNA領域を持つGM系統であれば、未知のGMについても検出が可能であると予想された。

2. シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイヤからの DNA 抽出精製法の検討 Promega Wizard DNA Clean-Up Resin System は、現行通知法³⁾では大豆およびトウモロコシ穀粒からのDNA抽出精製法として採用されている。それらは、Proteinase Kを添加しDNA抽出を行う方法であるが、パパイヤについては、Proteinase Kの添加はDNA抽出効率に影響を及ぼさなかった。その理由として、パパイヤは大豆およびトウモロコシ穀粒と比べてたんぱく質の含量が低いことから、Proteinase Kの非存在下においても短時間で十分にDNAが抽出されるものと考えられた。また、本法(WCR法)は、パパイヤの凍結乾燥を行わず、生パパイヤから得た抽出DNAでもPCRが可能である。したがって、DNA抽出(約1時間)から

PCR増幅およびアガロースゲル電気泳動までの一連の操作を1日で完了することが可能となり、GMパパイアの検査が著しく迅速化された。

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 LightCycler systemを用いた遺伝子組換えトウモロコシの改良定量分析法をABI7500に適用したところ、前処理を行ったゲノムと未処理のゲノムを用いた場合でのPCR効率には顕著な差は認められなかった。アニーリング温度を59℃から55℃に変更した場合、いずれの検出系においてもプラスミドのPCR効率は理論値である2に近づいた。

4.中国産 GM トマト及びピーマンの検知法の確立と調査 DNA抽出精製法として、Stool mini kit法を様々な加工食品に適用することにより、定性PCRに供するためのDNAを確実に得られた。市場で購入したトマトおよびピーマンを原料に用いた加工食品から組換え遺伝子は検出されなかった。

5.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 1)-3)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 (CryIAc と CryIAb 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) かまたは 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。4)-5)いずれも結果としてイネゲノムが増幅されたが、Sck gene 上流にイネゲノムが挿入されているのか、単に設計したプライマーがイネゲノムを増幅させてしまったのかは現時点では不明である。どちらの方法も制限酵素と既知プライマーに左右されるため、引き続き異なる制限酵素、もち米サンプル、及び新たな既知配列プライマーにて試験を進行中である。Inverse PCR 法は、既知配列より決定した制限酵素サイトが確率的に未知配列にも存在するであろうという仮定の下に行う手法であるのに対し、Adaptor-Ligation PCR (以下 AIPCR) 法は制限酵素処理後ゲノムの端に

アダプターを付加させ、そのアダプターに即したプライマーを用いてDNA断片を増幅させるため、より特異性が高いと考えられる。検知法を開発するうえで、ターゲットの存在を確認することは必要不可欠であり、一部の既知領域から未知領域を導き出すことが可能となれば、今後新たに未知系統植物が確認された際にも大変有用である。しかし現在知られている未知配列の解析法は情報・手法共に種類が少なく、検体によっては適合性に欠ける。今後これらをさらに思索し、より高感度かつ高処理能をもった解析法を検討する。

6.三成分同時発光酵素イムノアッセイによる未承認遺伝子組換えパパイア検知の検討 本発光法を三成分同時発光酵素イムノアッセイによる GM パパイア特異的遺伝子の検出に適用したところ、3種 PCR 増幅産物の検出が可能であった。

E. 結論

1.リガーゼ連鎖反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発 本研究は、従来のPCR法に加えLCR法をGM検知技術に新たに導入した点で有意義であり、また、本研究で開発した技術は広範囲のGM農作物の高感度な定性検出を効率的に実施可能な点で有用である。今後、本研究で分析に供したGMトウモロコシ、GMダイズ系統以外のGM植物の検出に関する実証データの取得が望まれる。また、標的となる組換えDNA領域を新たに反応に追加することで、検出可能なGM農作物の拡充が期待される。

2.シリカベースレジンタイプキット法を用いたパパイアからのDNA抽出精製法の検討 GMパパイア検知のためのDNA抽出精製法として、新たにPromega Wizard DNA Clean-Up Resin Systemを用いたパパイア生試料およびパパイア凍結乾燥試料からのDNA抽出精製法(WCR法)を開発した。WCR法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、WCR法は、シリカゲル膜タイプキット法およびCTAB法よりもDNA収量が著しく高く、様々な熟し度合いのパパイアからも、定性PCR用として十分な濃度のDNA試料原液を得ることが可能となった。

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の改良定量分