

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ととして、遺伝子組換え体と非組換え体の中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、遺伝子組み換えニワトリ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>

遺伝子組換えニワトリ肉と非組換えニワトリ肉（モモ肉、表皮）を供試した。

### <方法>

#### ニワトリ肉に含まれる化合物の一斉分析

試料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。組織5倍容のメタノールを加え、さらに磨砕した後、フィルター（Advantec, DISMIC-13JP, pore size; 0.2  $\mu$ 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<sub>4</sub>OH を含む 50% (v/v) アセトニトリルで 100 倍希釈した。質量補正のため内部標準物質としてリドカイン（MW 234.34）とレゼルピン（MW 608.69）を用いた。これらの内部標準は、陽イオン測定時には 1  $\cdot$  M、陰イオン測定時には 10  $\cdot$  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 (Varian 社製) 分析と LC-Linear-Trap-TOF/MS (Hitachi) に供した。

#### FT-ICR/MS

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).

#### LC-Linear-Trap-TOF/MS

Column; Cadenza CD-C18 (150 x 2 mm, 3  $\mu$ m), Column Temp; 40 $^{\circ}$  C, Flow rate; 0.2 mL/min, Solvent A; H2O/0.1% Formic acid, Solvent B; Acetonitrile/0.1% Formic acid, 0 - 5 min; A:B = 95:5%, 5 - 50 min; A 95 - 5% and B 5 - 95% Linear gradient, Injection volume; 5  $\mu$ L, Spray potential; 4000 or 3500 V (Pos or Neg), Ex potential; 110 V, AP2 potential; 45 V, Accumulation time; 20 msec.

この FT-ICR/MS 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 9887 のイオン、陰イオンモードでは延べ総数 8114 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

### メタボローム一斉解析

ニワトリ肉に含まれる成分のメタノール抽出物を分析した。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、2、3、および 4 に、GM と nonGM のメタボロームを主成分分析によって解析した結果を示す。表皮サンプルの陽イオンモード分析（図 1、第一主成分の寄与率 53.0% と第二主成分の寄与率 26.8%）、陰イオンモード分析（図 2、第一主成分の寄与率 45.0% と第二主成分の寄与率 29.6%）ともに、GM と nonGM 間において明確なメタボローム差が認められた。一方、モモ肉サンプルの陽イオンモード分析（図 3、第一主成分 44.9%、第二主成分 28.5%）、陰イオンモード分析（図 4、第一主成分の寄与率 62.1%、第二主成分の寄与率 24.1%）では、ともに顕著なメタボロームの差異は認められなかった。

表皮サンプルにおいて明確なメタボローム差を与えた代謝物は、FT-ICR/MS の精密質量データから、脂肪酸類（パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸等）であることが示された。これらのサンプルを LC-Linear-Trap-TOF/MS を用いて分析したところ、FT-ICR/MS による分析結果と同様、GM ニワトリ表皮には、nonGM 表皮と比較して脂肪酸類（パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸等）の蓄積量が減少していることが確認された。

### E. まとめ

遺伝子組換えニワトリ肉と非組換えニワトリ肉（モモ肉、表皮）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、GM ニワトリ表皮には、nonGM 表皮と比較して、脂肪酸

類蓄積の減少が顕著であり、その結果として主成分分析においては明確なメタボローム形成の差が検出された。このような脂肪酸類の蓄積の差は、FT-ICR/MS と LC-Linear-Trap-TOF/MS の異なる質量分析における、二種類の測定モードで確認された。本分析に供試した GM ニワトリがどのような組換え体であるかは不明であるが、代謝産物蓄積量に明瞭な差があることが示された。

今回、FT-ICR/MS によるメタボロミクス実験系に加え、LC-Linear-Trap-TOF/MS による分析を加味し、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を実施することが出来た。今後、個体間の差や加齢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。

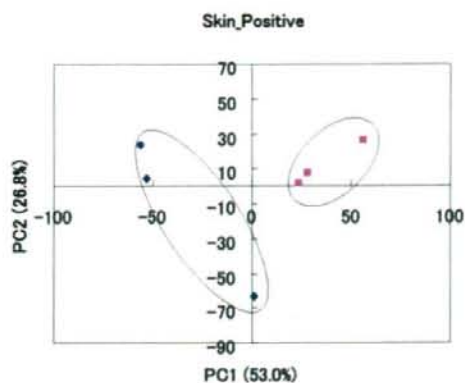


図 1. 組換え体ニワトリ表皮サンプル、非組換え体ニワトリ表皮サンプルをそれぞれ陽イオンモードで一斉解析し 30 連のスペクトルから再現性を持って出現する 300 種類のイオンについて多変量解析した。組換え体；■、非組換え体；◆。

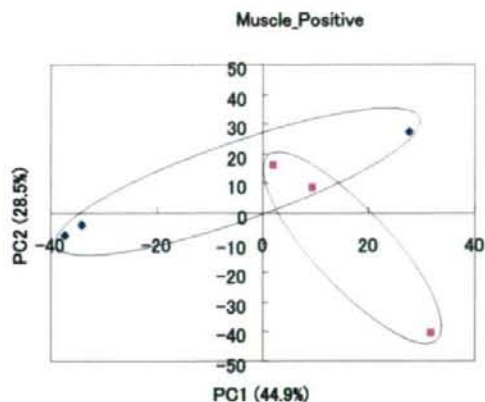


図 3. 組換え体ニワトリモモ肉サンプル、非組換え体ニワトリモモ肉サンプルをそれぞれ陽イオンモードで一斉解析し 30 連のスペクトルから再現性を持って出現する 300 種類のイオンについて多変量解析した。組換え体；■、非組換え体；◆。

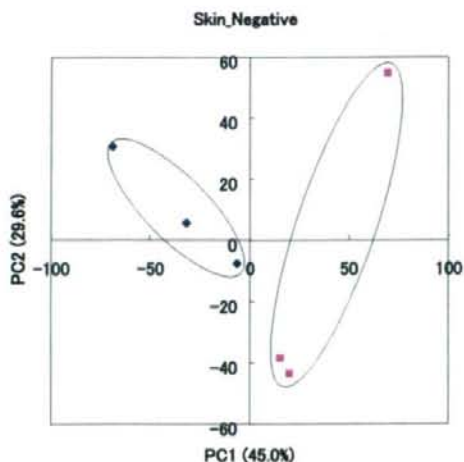


図 2. 組換え体ニワトリ表皮サンプル、非組換え体ニワトリ表皮サンプルをそれぞれ陰イオンモードで一斉解析し 30 連のスペクトルから再現性を持って出現する 300 種類のイオンについて多変量解析した。組換え体；■、非組換え体；◆。

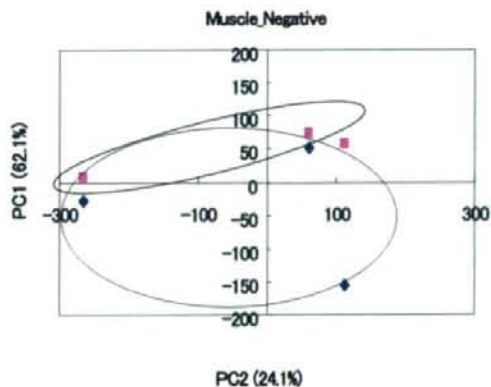


図 4. 組換え体ニワトリモモ肉サンプル、非組換え体ニワトリモモ肉サンプルをそれぞれ陰イオンモードで一斉解析し 30 連のスペクトルから再現性を持って出現する 300 種類のイオンについて多変量解析した。組換え体；■、非組換え体；◆。

## 遺伝子組換え体の検知技術の開発に関する調査研究

研究分担者 穰山 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. リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

リアルタイム PCR アレイ分析の結果として得られる遺伝子組換え (GM) 農作物に共通性が高い組換え DNA セグメント及び承認 GM 系統特異的検出の結果に加え、承認 GM 系統が有する組換え DNA セグメントの情報を総合的に判断することで、未承認 GM 農作物の混入が推定可能であることを見出した。また、リアルタイム PCR アレイの分析結果を入力するだけでこの推定プロセスを簡便に実施可能なソフトウェアを開発した。

**2. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討** 未承認 GM 赤唐辛子のための DNA 抽出精製法として、Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法について検討を行った。Genomic-tip 20/G を用いた方法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、Plant Kit 法よりも DNA 収量が高く、精製度についても良好な DNA 試料原液を得ることができた。次に市販の乾燥トウガラシの実態調査を行った。トウガラシから種子のみを採取して試料とし Genomic-tip 20/G による抽出精製法で、定性 PCR 及びリアルタイム PCR を用いた定性 PCR に供するための高純度及び高収量の DNA が得られた。いずれの試料においても赤トウガラシ内在性遺伝子は検出された。市場で購入した赤トウガラシ 6 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

**3. GM 魚の検出法の確立と調査** マダイの魚類検体について 3 種類のキットを用いて DNA 抽出を試行したところ、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた。白鮭、銀鮭、アトランティックサーモン、紅鮭、トラウトサーモン、マサバの 6 検体を用いて動物 (魚類) 検知用プライマー対を用いて得られた DNA が PCR 法にて検出可能であるか検討した。並行して成長ホルモン付加型の遺伝子組換え魚の構造特異的配列プライマー対を用いて実態調査を行った。

**4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討** 未知 Bt 系統混入もち米検体解析中に、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現領域を新たに検出している。この領域から、新規検知法開発に必要な同カセットの未知領域を導き出すため、Inverse PCR、Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。これと並行して文献情報を収集し、このトリプシンインヒビター近傍領域を予想、プライマーを設計して定性 PCR を実施した。Inverse PCR にて既知領域の上流 135 塩基の検出に成功し、文献情報より設計したプライマーによる定性 PCR にて検出された配列と一致した。

### 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. リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

現在、遺伝子組換え (GM) 農作物の多様化が進

んでいる。また、未承認遺伝子組換え体の混入は未然に防ぐことが求められている。現行の技術では、組換え DNA 情報が確認できる場合を除いて未承認 GM 系統の検出はできない状況にある。そこで本研究では、GM 農作物網羅的検知技術リアルタイム PCR アレイ分析法を利用し、組換え DNA 情報が未確認のものを含まれた未承認 GM 系統の混入を推定する手法の確立を目指す。

#### 2. トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討

未承認の中国産遺伝子組換え赤唐辛子が本国に流通していないかを調査するため、効率的に検知する方法が必要である。現在報告されている赤唐辛子の DNA 抽出精製法としては<sup>1)</sup>、シリカゲル膜

タイプキット法 (DNeasy Plant Kit 法) が使用されている。しかしながら、Plant Kit を用いた方法では DNA の抽出過程で試料にゲル状の沈殿物が発生してしまい抽出操作が困難となる場合がある。そこで、赤唐辛子からの DNA 抽出精製法として、Qiagen 社製 Genomic tip 20/G を用いた DNA 抽出と、High-Sodium Precipitation Solution を用いた DNA 精製により、簡便かつ高濃度の DNA 試料原液が得られる方法の検討を行った。また市販のトウガラシを用いて検知法の確立を検討した。

### 3. GM 魚の検出法の確立と調査

食用の GM 魚の開発がサケ・マス・イシダイ等を中心にカナダ、中国、メキシコ、エジプト、イギリス等世界各国で行われている。近い将来、意図せざる状況で加工食品や生鮮食品として我が国に安全性審査未承認のまま流通する可能性も非常に高い。従って、これら GM 魚が未承認でそこで、GM 魚の検出法に関する研究を行った。

### 4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討

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<sup>4)10)</sup>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、新たな検出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。

## B. 研究方法

### 1. リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

GM トウモロコシ及び GM ダイズの承認系統、プロモーターやターミネーター領域等の組換え DNA セグメント、作物内在性遺伝子等を標的とするリアルタイム PCR アレイ分析法により、幅広い GM 農作物の検出が可能である (図 1)。この分析法の結果を利用し、サンプル中への未承認 GM 系統の混入を推定する手法の開発を検討した。

### 2. 赤唐辛子の DNA 抽出方法・精製及び検出法の検討

シリカゲル膜タイプキット法：厚労通知 2.2.1.3. (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:大豆に適用)を参考に、一部改変して抽出を行った。QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出：厚労通知、3.2.6 を参考に、一部改変して抽出精製を行った。なお、いずれの DNA 抽出精製法についても、1 試料につき 2 回 (n=2) の抽出を行った。

詳しい方法について、以下に示した。

#### 【DNeasy Plant Kit を用いた抽出方法】

ミルサーでトウガラシの種子のみを粉砕。

上記の試料 1g を 50mL 容チューブにとり、65°C API 緩衝液 10mL と RNase A 20 $\mu$ L を加え、ボルテックスミキサーで激しく混合後、65°C で 15 分間加温した。(途中 2~3 回転倒混和) AP2 緩衝液 3250 $\mu$ L を加え再度ボルテックスミキサーで混合し、氷上に 10 分間静置した。6000 $\times$ g、4°C、20 分間遠心。上清を 15mL 容チューブに移し、さらに 12000 $\times$ g、4°C、5 分間遠心。沈殿物を取らないように上清 500 $\mu$ L を QIAshredder spin column に負荷し、10000 $\times$ g 以上、4 分間遠心後、溶出液を 15mL 容チューブに移した。この操作を数回繰り返した。溶出液の 1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液を加えた。混合液 500 $\mu$ L を mini spin column に負荷し、同条件で 1 分間遠心した。この操作を混合液がなくなるまで繰り返した。AW 緩衝液 500 $\mu$ L を負荷し、同条件で 1 分間遠心後、溶出液を捨てた。この操作を 3 回繰り返した。mini spin column を乾燥させるため、10000 $\times$ g 以上で 20 分間遠心した。column を 1.5mL 容チューブに移し、65°C の DW50 $\mu$ L を加え 5 分間静置後、10000 $\times$ g 以上で 1 分間遠心し、DNA を溶出した。再度 DW を加えて同様の操作を行い、得られた溶出液を合わせて DNA 試料原液とした。

#### 【Genomic tip 20/G を用いた抽出精製方法】

ミルサーでトウガラシの種子のみを粉砕。

上記の試料 1g を 50mL 容チューブにとり、G2 緩衝液 7.5mL を加えボルテックスミキサーで混合後、さらに G2 緩衝液 7.5mL と Proteinase K 200 $\mu$ L、RNase A 20 $\mu$ L を加えよく混合した後、50°C で 1 時間加温した。(途中 2~3 回転倒混和) 5000 $\times$ g、4°C、15 分間遠心。上清を 15mL 容チューブに移し、さらに軽く遠心した。1mL の QBT 緩衝液にて平衡化した Genomic tip に上清を 2mL ずつ負荷した。この操作を上清がなくなるまで繰り返した。次いで QC 緩衝液 2mL で 3 回洗浄。tip を新しいチューブに移し、50°C QF 緩衝液 500 $\mu$ L で溶出した。この操作を再度繰り返した。等量のイソプロピルアルコールを加え転倒混和し 5 分間静置後、10000 $\times$ g 以上、4°C、15 分間遠心した。上清を捨てた後、70%エタノール 1mL を加え、同条件で 5 分間遠心した。さらに上清を捨て、残った沈殿を乾燥した後、DW100 $\mu$ L を加え 65°C で 5 分間放置しピペッティン

グにより DNA を溶解させたものを DNA 試料原液とした。

#### 【GM トウガラシの検知法の検討】

- 1) 試料 市場に流通している赤トウガラシ(乾燥品) 6 検体を用いた。
- 2) 試料調製 トウガラシの種子のみを採取し、ミルサー IFM-700G (イワタニ社製) で粉碎した。
- 3) DNA 抽出精製 QIAGEN-Gtip 法: 厚生労働省通知(平成 21 年 1 月 22 日、食安発第 0122001 号)「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」、2.2.3.2.2. 「イオン交換樹脂タイプキット法」に準じた。本検討においては、抽出試料量を 1g とし、アミラーゼ処理は施さなかった。
- 4) DNA 濃度及び純度測定、PCR 増幅、電気泳動 厚生労働省通知法に従った。定性 PCR は、P35S、NOS 及び内在性遺伝子 *ccs* の 3 対のプライマー対について行った。PCR 温度条件は以下の通りとした。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。その反応後、95°C 30 秒、56°C 30 秒、72°C 30 秒を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応後 72°C 7 分間の保持を行った。リアルタイム PCR を用いた定性 PCR<sup>※</sup>は、ABI7500 (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、内在性遺伝子 *ccs* について行った。PCR 温度条件は以下の通りとした。50°C 2 分間の条件で保持した後、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 30 秒、58°C 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。ランモードは 9600emulation モードとした。

#### 3. GM 魚の検出法の確立と調査

- 1) 試料 ティラピア近縁種の魚種について、市場で扱いのあるマダイ及びメダイについて買い上げた。サケ 5 種類とサバ 1 種類を購入し、試料とした。
- 2) 試料調製 購入検体について、皮と骨を除きミルサーにてすり身状にしたものを凍結保存検体とした。
- 3) DNA 抽出精製 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」、2.2.3.2.2. 「イオン交換樹脂タイプキット法」に従った。QIAamp DNA Stool mini kit 法: QIAGEN ser-Developed Protocol: GMO testing of food samples using the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit and the HotStarTaq<sup>™</sup> Master Mix Kit; for 0.2 g samples に従った。DNeasy Blood and Tissue kit: 25mg を試料として、付属のマニュアルに従った。
- 4) DNA 濃度および純度測定、PCR 増幅、電気泳動 厚生労働省通知法に従った。定性 PCR は成長ホルモン

(GH-A, B, C and D) および内在性遺伝子 (*s-actin*) のプライマー対については、昨年度の本報告書に記載されたものを用いた。PCR 温度条件は以下の通りとした。温度条件 1: 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 30 秒、56°C 30 秒、72°C 30 秒を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応後 72°C 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°C に変更した。

#### 4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討

- 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。
- 2) DNA 抽出 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  $\mu$ L、 $\alpha$ -アミラーゼ(高濃度品) 6  $\mu$ L 及び、RNase A (100mg/mL) 30  $\mu$ 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 分間混合した後、65°C の条件で 30 分間加温した。GE2-K 緩衝液 255  $\mu$ 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°C 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°C 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  $\mu$ L 及びイソプロパノール (100%) 375  $\mu$ L を添加した後、10~12 回転倒混和した。混合液を 700  $\mu$ L ずつ spin column に負荷した後、13,000  $\times$ g 以上、4°C 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  $\mu$ L を負荷し、13,000  $\times$ g 以上、4°C 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、DW 50  $\mu$ 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。
- 3) 濃度測定 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、0. 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。
- 4) Inverse PCR (IPCR) 条件 既知領域 *sck* 部分配列 568 bp について制限酵素サイト (5' 末からの適当な距離があるもの) を探索し、5' 側より順に *Dra*I、*Eco*RV、*Alu*I を選択した。上記 3 種の制

限酵素でそれぞれゲノム DNA サンプルを消化し、self-ligation したものを自己閉環ライブラリーとした。IPCR 用のプライマーは既知の配列 (sck 568 bp) について、antisense 方向、sense 方向それぞれ 2 セットを nested-PCR 用に設計した。IPCR 条件は、ExTaq 緩衝液 (TaKaRa)、0.2 mmol/L dNTP、1  $\mu$ mol/L 5' 及び 3' プライマー並びに 2.5 units TaKaRa ExTaq DNA ポリメラーゼを含む液に、ゲノム DNA ライブラリー試料液 2.5  $\mu$ L を氷中で加え、全量を 100  $\mu$ L にした。2<sup>nd</sup>PCR では同条件に精製した 1<sup>st</sup>PCR 産物 1  $\mu$ L を鋳型とした。特異的と見られるバンドが増幅された場合は、AGE 精製後、T-vector にクローニングし、それぞれ 6 または 8 個の独立な大腸菌クローンとして単離した。単離したクローンよりプラスミドを調製 (GFX Micro Plasmid Prep Kit, GE Healthcare) し、シーケンシングに供した。シーケンシングは断片が短い (<約 500 bp) ものについては片側のみのプライマー (シングルパス) で読み、断片が長い (>約 500 bp) ものについては両側のプライマーで読み、両鎖の配列から全長配列を再構成した。

5) Adaptor-Ligation PCR (A1-PCR) 条件 既知領域 sck 部分配列 568 bp について制限酵素サイト (adaptor 付加のため blunt end に切るもの、A1-PCR 用のプライマー 5' 末からの適当な距離があるもの) を探索し、5' 側より順に *Dra*I、*Eco*RV、*A*luI を選択した。上記 3 種の制限酵素でそれぞれゲノム DNA サンプルを消化し、adaptor-ligation したものを adaptor 付加ライブラリーとした。プライマーは adaptor 配列について sense 方向 (AP1, AP2)、そして既知の配列について antisense 方向 2 本を nested-PCR 用に設計した。PCR 条件は IPCR と同様だが、1<sup>st</sup>PCR の鋳型にはゲノム DNA ライブラリー 1  $\mu$ L を、2<sup>nd</sup>PCR には精製した 1<sup>st</sup>PCR 産物 1  $\mu$ L を用いた。AGE 精製以降は IPCR と同様にした。

6) 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  $\mu$ 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/ $\mu$ L に調製した DNA 試料液 5.0  $\mu$ L (DNA として 50ng) を氷中で加え、全量を 25  $\mu$ 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 ABI9700 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。

## C. 研究結果

### 1. リアルタイムPCRアレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

「(未承認 GM 系統) = (全ての GM 系統) - (承認 GM 系統)」と定義される。リアルタイム PCR アレイ分析の結果として得られる GM 農作物に共通性が高い組換え DNA セグメント及び承認 GM 系統特異的検出の結果に加え、承認 GM 系統が有する組換え DNA セグメントの情報を総合的に判断することで、未承認 GM 農作物の混入が推定可能であることを見出した。また、リアルタイム PCR アレイの分析結果を入力するだけでこの推定プロセスを簡便に実施可能なソフトウェアを開発した (図 2)。

### 2. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検出法の検討

赤唐辛子からの DNA 抽出精製法の検討

1) シリカゲル膜タイプキット法 (DNeasy Plant Kit 法) を用いた DNA 抽出精製条件の検討

赤唐辛子の実及び種子を用いて、エタノール沈殿と同時にフェノクロ処理および High-Sodium Precipitation Solution を用いた検討を行った。赤唐辛子の実の部分のみを用いて抽出を行ったところ、粘性のある沈殿物が析出してしまったので種子のみを用いて抽出を行うこととした。精製については、エタノール沈殿及びフェノクロ処理を行ったもので DNA 濃度が上がり吸光度比 260nm/230nm の値が 2.2 であり、質および量ともに良好な DNA が得られた。また、High-Sodium Precipitation Solution については、DNA 濃度および吸光度比 260nm/230nm の値が 1.7 と低下してしまったため、High-Sodium Precipitation Solution は添加しないこととした。

2) Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法との比較

Genomic-tip 20/G を用いた方法により得られた DNA 試料原料について、論文で推奨されている Plant Kit 法と、DNA 濃度、および吸光度比 260nm/230nm による純度の比較を行った。その結果、種子のみから得られた DNA 試料原液の濃度は Plant Kit 法では 213~295ng/ $\mu$ L であったが、Genomic-tip 20/G を用いた方法では 211~428ng/ $\mu$ L であった。吸光度比 260nm/230nm については Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法とほぼ同等であった。DNA の抽出量及び精製度について、表 1 に示した。

市販の中国産トウガラシ検体を Genomic-tip 20/G 法で DNA 抽出を行ったところ、いずれの試料においても十分な DNA 収量が得られ、精製度も良好であった (表 2)。定性 PCR では、全ての試料で内在性遺伝子である *ccs* は検出された。今回検討を行った試料からは P35S 及び NOS 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。本 PCR 温度条件では非特異的バンドも認めら

れなかった。

リアルタイム PCR を用いた定性 PCR では、全ての試料で内在性遺伝子である *ccs* の指数関数的な増幅曲線が得られた。Ct 値は 26~27 (Th. Line; 0.2) の範囲内であった。

### 3. GM 魚の検出法の確立と調査

マダイ 3 検体について 3 種類のキットを用いて DNA 抽出を試行したところ、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた(表 3、表 4)。次に、白鮭、銀鮭、アトランティックサーモン、紅鮭、トラウトサーモン、マサバの 6 検体を魚類検出用プライマー配列 (*s-actin*) を用いた検討において、得られた DNA が PCR 法にて検出可能であるか検討した(表 5)。いずれの試料においても内在性遺伝子である *S-actin1* はアニーリング温度 58°C で全て検出された(図 3)。全ての試料から成長促進型のコンストラクト特異的な領域を認識する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(図 4、図 5)。しかし、成長ホルモン遺伝子を検出プライマー対で PCR を行ったところマサバ以外から約 330-340 bp の増幅産物が得られた(図 6)。現在増幅産物をダイレクトシーケンズで解析中であるが、サケの成長ホルモン遺伝子であると考えられた。

### 4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討

GM もち米を用いた IPCR において、2nd PCR 後 *AluI* ライブラリーを鋳型とした場合に約 400 bp の多量の増幅産物が認められた(図 7)。これに加え、*EcoRV* ライブラリーを鋳型とした場合の約 800 bp の増幅産物(図 1)についてゲル精製し、T-vector にクローニングした。両者について 8 クロウンを単離し、シーケンシング用プラスミドを調製し、*EcoRI*、*PstI* で消化した後、シーケンシングに供するクロウンを選び、塩基配列を解析した。結果、PCR 産物において *sck* 部分配列と一致する部分が認められ、さらに、5' 側上流に新規配列 135bp が認められた。この新規配列を Blast 検索した結果、この領域は  $\Omega$  配列と、既知領域であった Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor (SKTI) の新たな上流領域の一部であることが判明した(図 8)。Al-PCR では、*DraI* で約 400 bp、*EcoRV*-Al では約 200 bp のバンドを主産物とする増幅産物が得られた。これらについてクローニング、シーケンシングを行った結果、すべてイネゲノムを鋳型として増えた、非特異的な増幅産物であることが判明した。文献情報によって、しばしば *sck* 遺伝子の上流に 35S プロモーターと、エンハンサーである  $\Omega$  配列が用いられているとわかり、 $\Omega$  領域か

ら NOS ターミネーター領域までを認識するプライマー対 ( $\Omega$ F1/Tnos R1、 $\Omega$ F2/Tnos R2) と、35S プロモーター遺伝子、又は  $\Omega$  配列から *sck* 領域まで(それぞれ 35S<sub>Septi</sub> F1/R1、 $\Omega$ F3/*cpti*R3) の設計を行った(表 6)。これらプライマー対を用いて定性 PCR を実施し、アガロース電気泳動を行った結果、 $\Omega$ F1/Tnos R1、 $\Omega$ F3/*cpti*R3 においてそれぞれ 676bp、192bp の増幅バンドを得た(図 9)。この増幅産物をシーケンシングしたところ、既知領域から上流の  $\Omega$  配列の存在が明らかになった。この新領域 43bp は、前述の IPCR で明らかになった配列より短い、配列は一致し、IPCR の結果を裏付ける形となった(図 10)。

## D. 考察

### 1. リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

これまでに混入が問題となった CBH351 トウモロコシ、米国産米 LLRICE601、中国産 Bt コメ、DAS59132 トウモロコシ等の未承認 GM 系統はいずれもリアルタイム PCR アレイで検出可能な組換え DNA セグメントを有している。このため、本研究で確立した推定プロセスによって混入を推定可能であると予想された。現時点では、承認 GM 系統特異的検出は全ての承認系統を対象としておらず、未承認系統として誤判定される可能性がある。こうした承認系統及び最近承認された系統のさらなる標的の追加とそれに伴った推定プロセスの改良が今後の課題である。

### 2. 赤唐辛子の DNA 抽出方法・精製の検討

トウガラシから種子のみを採取して QIAGEN-Gtip 法で DNA 抽出を行うことで、高純度及び高収量の DNA が得られた。

定性 PCR 及びリアルタイム PCR を用いた定性 PCR において、内在性遺伝子 *ccs* は本条件で良好に増幅された。

### 3. GM 魚の検出法の確立と調査

DNA 抽出精製法として、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた。市場で購入したサケ 5 種、サバ 1 種を用いて GM 特異的プライマー対を用いて検討したところ、いずれも内在性遺伝子は検出されたが、成長促進型特異的の GM サケは検出されなかった。

### 4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討

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、A daptor-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。

A1-PCRで増幅されたイネゲノムは、一部を除き、すべて、5'側にはアダプター配列、そしてライブラリ作成に使用した制限酵素サイトを有していたが、3'側のsck配列特異的にデザインしたプライマーが5'側10 bp程度の一致でイネゲノムにアニールし、増幅されたものと確認された。すなわち、A1-PCRのシステム的には機能したが、sck配列に対しデザインしたプライマーがイネゲノムにアニールし、比較的小さいゲノム断片が優先的に増幅されたものと考えられる。

## E. 結論

### 1. リアルタイムPCRアレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

本研究で開発した推定法は、未承認 GM 農作物の網羅的モニタリングへの利用が期待される点で有意義である。新規承認系統等への対応を継続的に行ない本法の拡充を図るとともに、運用方法について検討を行なうことにより、未承認系統のわが国における流通を阻止することに資する。

### 2. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討

未承認遺伝子組換え (GM) 赤唐辛子のための DNA 抽出精製法として、Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法について検討を行った。Genomic-tip 20/G を用いた方法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、Plant Kit 法よりも DNA 収量が高く、精製度についても良好な DNA 試料原液を得ることができた。次に市販乾燥トウガラシからの DNA 抽出を行った。トウガラシから種子のみを採取して試料とし QIAGEN- Gtip 法による抽出精製法で、定性 PCR 及びリアルタイム PCR を用いた定性 PCR に供するための高純度及び高収量の DNA が得られた。いずれの試料においても内在性遺伝子である *ccs* は検出された。市場で購入した赤トウガラシ 6 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

### 3. GM 魚の検出法の確立と調査

DNA 抽出精製法として、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた。市場で購入したサケ 5 種、サバ 1 種を用いて GM 特異的プライマー対を用いて検討したところ、いずれも内在性遺伝子は検出されたが、成長促進型特異的の GM サケは検出されなかった。

### 4. 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

未知Bt系統混入もち米検体解析中に、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現領域を新たに検出している。この領域から、新規検知法開発に必要な同カセットの未知領域を導き出すため、Inverse PCR, Adaptor-Ligation PCR法を検討した。これと並行して文献情報を収集し、このトリプシンインヒビター近傍領域を予想、プライマーを設計して定性PCRを実施した。Inverse PCRにて既知領域の上流135塩基の検出に成功し、文献情報より設計したプライマーによる定性PCRにて検出された配列と一致した。

## 参考文献

- 1) Song, Hee-Sung, Jae-Hwan Kim, Dong-Hern Kim, and Hae-Yeong Kim, Qualitative and quantitative analysis of genetically modified pepper. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2007), 17(2), 335-341
- 2) SONG, HEE-SUNG, JAE-HWAN KIM, DONG-HERN KIM, and HAE-YEONG KIM, Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Pepper. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 17(2), 335-341

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) E. Shimizu, H. Kato, Y. Nakagawa, T. Kodama, S. Futo, Y. Minegishi, T. Watanabe, H. Akiyama, R. Teshima, S. Furui, A. Hino, K. Kitta. Development of a screening method for genetically modified soybean by plasmid-based quantitative competitive polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 56(14) 5521-7(2008).
- 2) J. Mano, N. Shigemitsu, S. Futo, H. Akiyama, R. Teshima, A. Hino, S. Furui, K. Kitta. Real-time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying

unapproved genetically modified crops in Japan. *J. Agric. Food Chem.* 57(1) 26-37(2009)

- 3) Naoki Harikai, Shin Ssaito, Midori abe, Kazunari Kondo, Kazumi Kitta, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, and Kenji Kinoshita A Real-Time PCR Method Using Capture Oligo-Immobilized PCR Tubes to Determine the Specific Gene for Soybean and Genetically Modified Soybean in Food Matrices *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 2953-2958 (2008)
- 4) 穂山浩、遺伝子組換え食品の検知法について ぶんせき(2009) in press.

## 2. 学会発表

- 1) 穂山浩、坂田こずえ、中村文美、中島治、近藤一成、古井聡、橘田和美、手島玲子 未承認 DAS59132 系統トウモロコシの定性検査法の多機関バリデーション 第45回全国衛生化学技術協議会年会(2008.11)
- 2) J. Mano; T. Oguchi; H. Akiyama; R. Teshima; A. Hino; S. Furui; K. Kitta Broad-range detection of genetically modified crops with using ligase chain reaction 1st global conference on GMO analysis (June 2008, Italy)
- 3) 井上雪乃、笠間菊子、鈴木達也、大島赴夫、穂山浩、中島治、手島玲子 中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象とした外部精度管理調査における試料作製の検討日本食品衛生学会第96回学術大会(2008.9)
- 4) 穂山浩 遺伝子組換え食品の表示の現状と検査法 第6回食品安全フォーラム(2008.11)
- 5) 遺伝子組換え農作物網羅的検知手法リアルタイムPCRアレイの開発 真野潤一、重光なつき、布藤聡、穂山浩、手島玲子、日野明寛、古井聡、橘田和美 2009年度日本農芸化学会(2009.3)

## 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

図表

1. リアルタイムPCRアレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発



図1 リアルタイムPCRアレイ分析法の概略

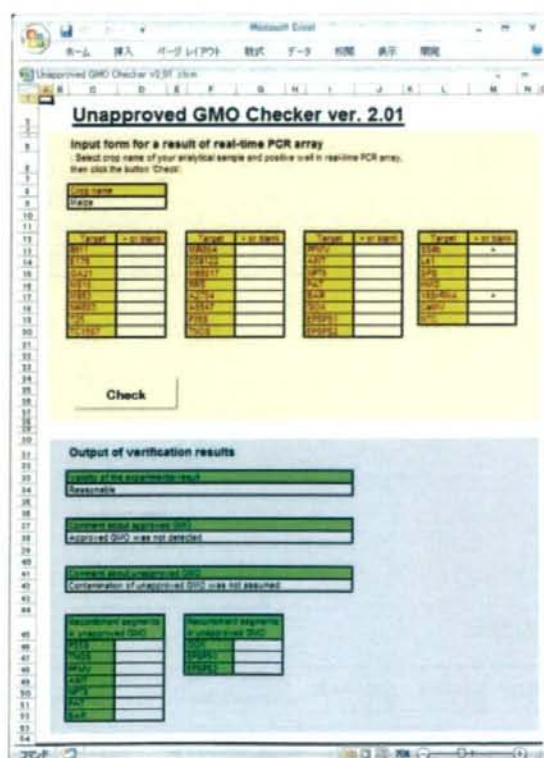


図2 開発した未承認GM系統混入推定プログラム

表 1. 赤唐辛子 DNA の精製度及び抽出量

Sample No.	抽出方法	エタノール沈殿+ フェノクロ処理	High-Sodium Precipitation Solution	Constantration	Ration of	Ration of
				of DNA mesured by O. D. 260nm ( ng/ul ) ave.	Absorbance (260nm/ 280nm) ave.	absorbance (260nm/ 230nm) ave.
1	Plant mini kit (Qiagen)	-	-	176.68	1.785	1.270
2	"	-	-	180.36	1.745	1.160
3	"	-	-	165.18	1.805	1.380
4	"	-	-	175.25	1.795	1.280
1	"	+	-	213.71	1.790	2.200
2	"	+	-	294.90	1.830	2.175
3	"	+	-	212.58	1.795	2.275
4	"	+	-	232.27	1.775	2.250
1	"	+	+	99.57	1.835	1.540
2	"	+	+	106.37	1.845	1.765
3	"	+	+	37.81	1.870	1.530
4	"	+	+	344.59	1.830	1.880
1	Genomic tip	+	-	282.74	1.845	2.440
2	"	+	-	210.74	1.845	2.505
3	"	+	-	428.39	1.825	2.045
4	"	+	-	407.59	1.810	1.950

表 2. 中国産トウガラシの検知

検体No.	DNA抽出 精製法	検体採取 量(g)	抽出DNA容 量(μL)	吸光度比 (260nm/230nm)	吸光度比 (260nm/280nm)	抽出DNA濃 度(ng/μL)	抽出DNA量(μg)
1	中国産 G-tip	1	200	2.617	1.654	301.0	60.2
2	中国産 G-tip	1	200	2.573	1.643	280.5	56.1
3	中国産 G-tip	1	200	2.381	1.701	279.8	56.0
4	中国産 G-tip	1	200	2.401	1.705	314.5	62.9
5	国産 G-tip	1	200	2.497	1.659	287.8	57.6
6	国産 G-tip	1	200	2.399	1.682	353.3	70.7

表 3. QIAamp DNA Stool キットによる抽出 DNA の収量および精製度

タイ検体の抽出法検討の①-QIAamp DNA Stool Mini Kit

Date	2008/02/18	Blank設定後にBlank試料をサンプルとして計測したときの値が異常値で安定しない。一度PCを再起動して直ったようにみえたが若干不安定。			
Time	17:02				
Module:	Nucleic Acid				
Path:	10 mm				
Software:	3.2.1				
Firmware:					
Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
blank bufferAE	3.2	0.064	0.055	1.16	0.69
Stool マダイ	7.74	0.155	0.093	1.66	1.11
Stool メダイ	4.68	0.094	0.041	2.29	0.77
blank bufferAE	-0.92	-0.018	0	-151.95	0.3
start material : 200 mg					
elution buffer volume : 200 uL					

表 4. QIAGEN Genomic-tip 20/G キットによる抽出 DNA の収量および精製度

タイ検体の抽出法検討の②、③-QIAGEN Genomic DNA Kit Genomic-tip 20/G

Date	2008/02/22	通知法は、基本Tissue法より約1時間半作業時間が延びるが、収量・効率的にはこちらの方が良いようだ。			
Time	10:40				
Module:	Nucleic Acid				
Path:	10 mm				
Software:	3.2.1				
Firmware:					
Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
blank DW	0.2	0.004	0.023	0.18	0.37
Gtip tissue マダイ	14.77	0.295	0.169	1.74	0.74
Gtip tissue メダイ	19.27	0.385	0.227	1.69	1.09
Gtip 通知法加工品 マダイ	369.06	7.381	4.004	1.84	2.4
Gtip 通知法加工品 メダイ	491.44	9.829	5.531	1.78	2.44
blank DW	-0.25	-0.005	-0.016	0.31	0.18
start material : ②40 mg, ③1 g					
elution buffer volume : 100 uL(DW)					

表 5. 魚からの DNA 抽出の検討

検討する抽出法 3種	Kit推奨プロトコール					収量・抽出効率
	tissue	first buffer	RNase A	proteinase K	incubation	
QIAGEN Genomic tip 20/G	20 mg	2 mL	4 uL	100 uL	50°C, 2h	△
Genomic tip 20/G	1 g	15 mL	20 uL	100 uL	50°C, 2h	○
DNeasy Blood and Tissue kit	25 mg	180 uL	4 uL	20 uL	56°C, 1-3h	
QIAamp DNA Stool Mini kit	200 mg	2.6 mL	-	25 uL	70°C, 10min	×

※proK: 600mAU/mL以下の濃度で使用する

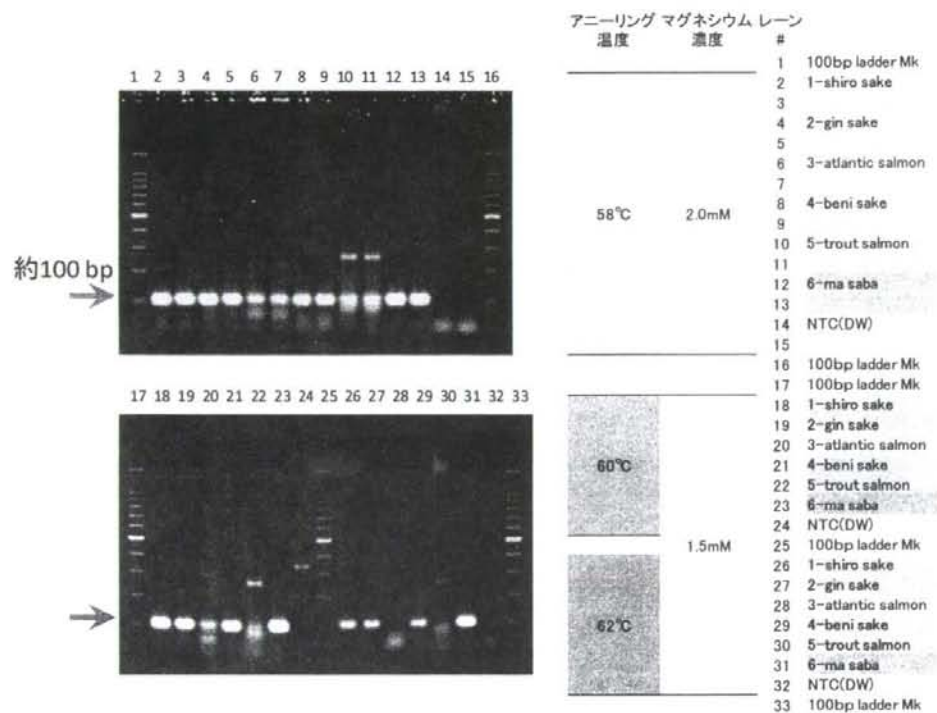


図3 S-actin1を検知するプライマー対を用いた検討

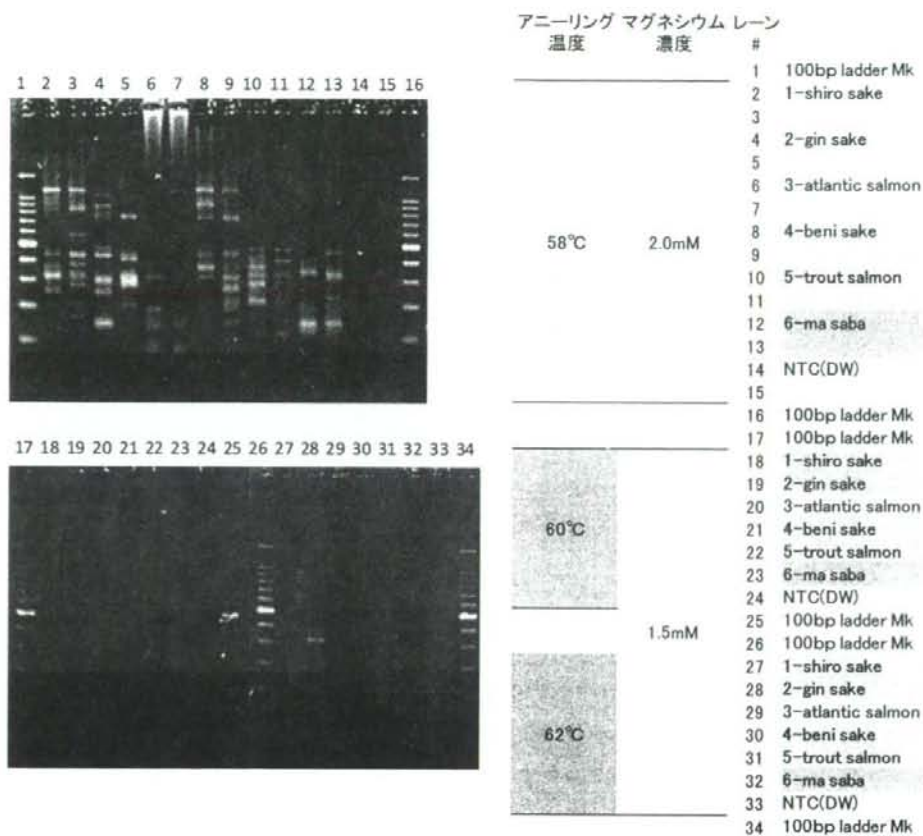


図4 コンストラクト特異的プライマー対① (GH-A/B) を用いた検討

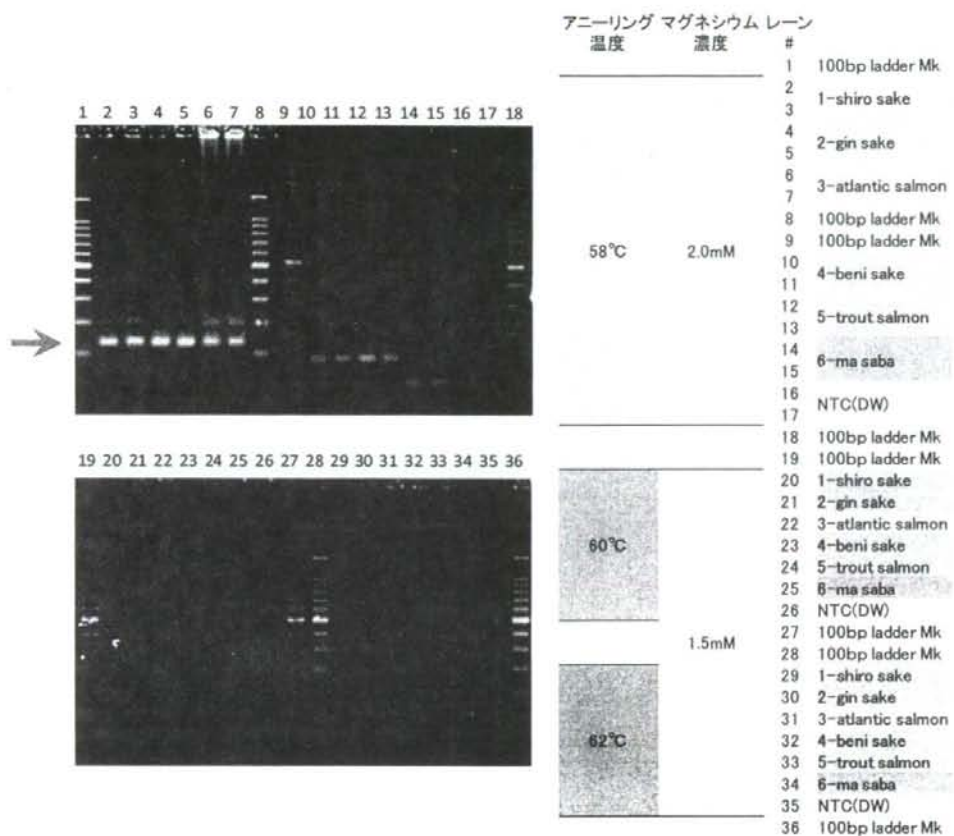


図5 コンストラクト特異的プライマー対 (GH-A/D) を用いた検討



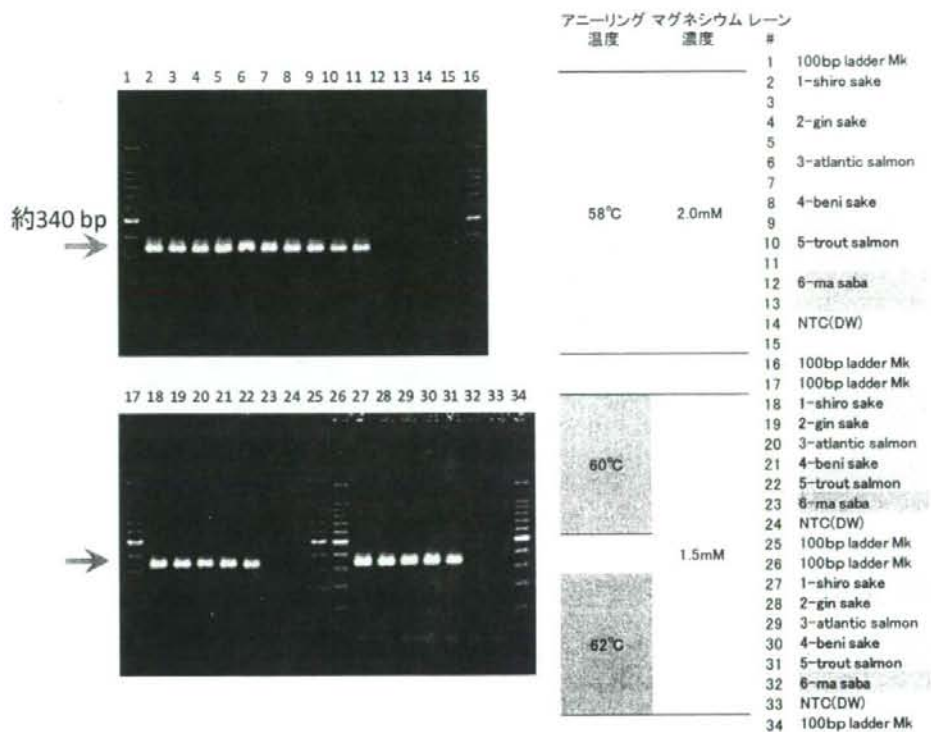


図6 成長ホルモン遺伝子を検知するプライマー対 (GH-C/D) を用いた検討

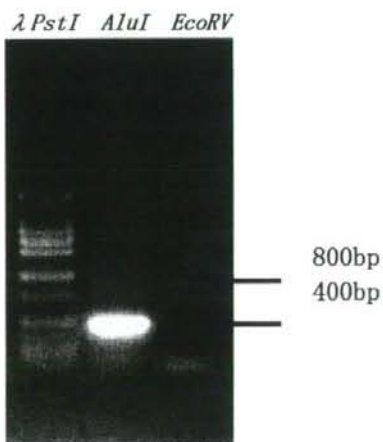


図7 IPCRによる増幅産物

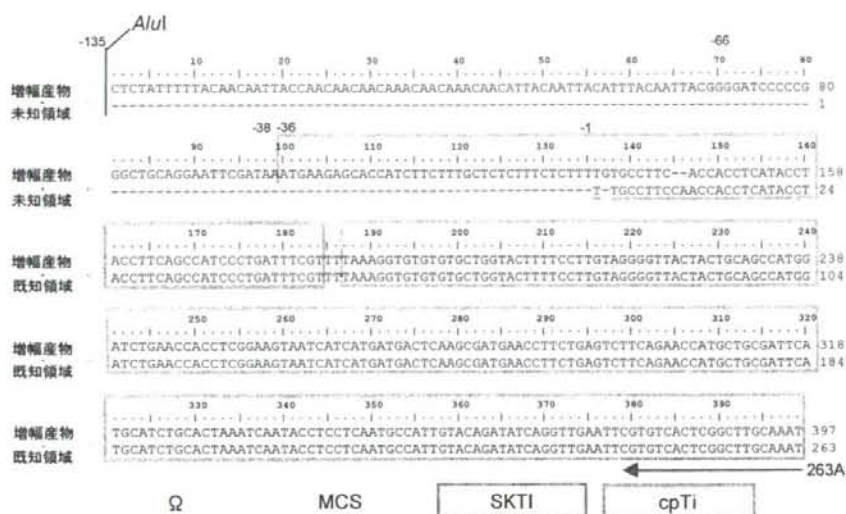


図8 検出されたSKTI近傍領域の配列

Name	Sequence	size (bp)
Ω F1	AAC AAC AAA CAA CAA ACA ACA T	676
Tnos R1	GCG GGA CTC TAA TCA TAA AA	
Ω F2	TTT TTA CAA CAA TTA CCA ACA A	676
Tnos R2	AAT CAT AAA AAC CCA TCT CAT A	
Ω F3	ACA ACA AAC AAC AAA CAA CAT TA	192
cpti R3	ACA AGG AAA AGT ACC AGC ACA	
35SeptiF1	CCA CTG ACG TAA GGG ATG AC	419
35SeptiR1	GAT TTG CAA GCC GAG TGA C	

表6 ScK配列周辺解析用に設計されたプライマー対

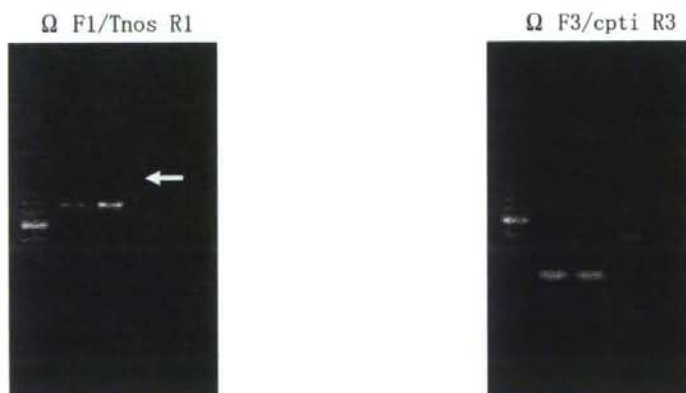


図9 AI-PCR解析による電気泳動図  
いずれもマーカーには100bp DNA Ladderを使用

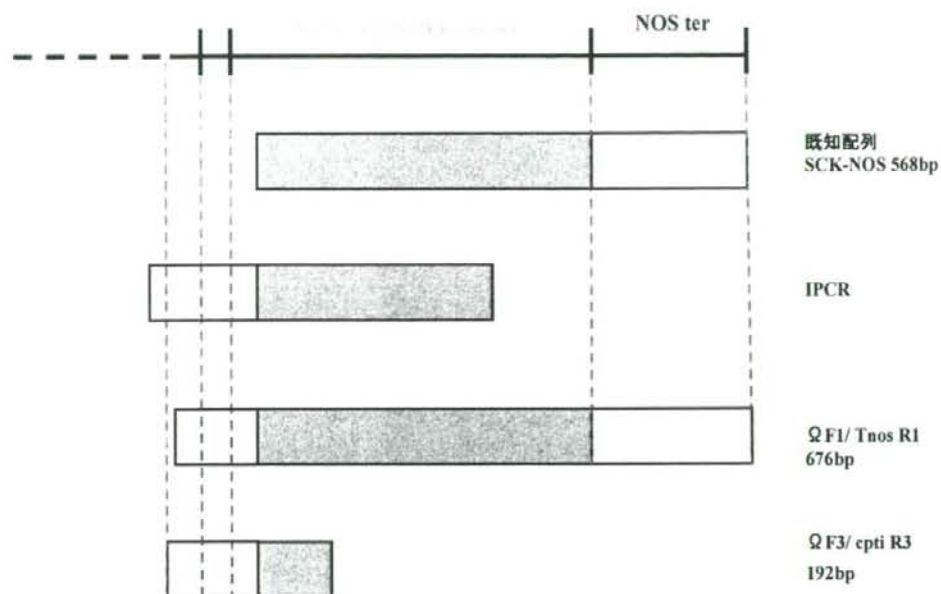


図 10 本研究で明らかになった中国産 GM コメ遺伝子構造

## 遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する調査研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

### 研究要旨

平成20年度は、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アレルギー性評価に関する調査研究として、(1)GFP導入組換えニワトリ筋肉中アレルギーの抗体結合性を指標にしたアレルギー性試験、(2)食物アレルギー動物モデルを用いたGFP導入組換えニワトリのアレルギー性試験、(3)エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルギー性を予測するためのデータ解析手法の検討、(4)アレルギーデータベース(ADFS)の更新を行った。具体的には、(1) GFP導入ニワトリと対象ニワトリの筋肉を用いて、アレルギー蛋白質の量的、質的変動をアレルギー特異的抗体並びに鶏肉アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。主要アレルギーであるchicken serum albumin (69kD)についてポリクローナル抗体との反応性から組換えに伴う量的、質的変動はみられず、鶏肉アレルギー患者血清IgEと反応するタンパク質もGM, non-GM間で大きな差はみられなかった。(2)食物アレルギー動物モデル(BALB/cマウス)を用いた、GFP導入ニワトリのアレルギー性試験では、アレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体産生及びアナフィラキシー症状は組換え、非組換えニワトリどちらの筋肉抽出タンパクを経口投与した場合でも差がみられなかったことから、組換えニワトリのアレルギー性は非組換えニワトリの場合と同等であると予想された。また、本実験系で用いたマウスを用いる経口感作の成立過程において、抑制性T(Treg)細胞が関与している可能性が考えられた。(3)アレルギー予測の解析法では、(i) 既知のアレルギーとの相同性の比較方法 - 既知のアレルギーに特徴的なアレルギーユニーク断片(AUF)のインデックスとタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)を考慮したアレルギーエピトープ予測法の検討を行った。(ii)新規統合型アレルギーデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新作業としては、新たに6種のアレルギーについて線形及びコンフォメーションエピトープ情報を加え、さらに6種の糖自体がエピトープ活性を持つアレルギーについても情報を加えた。また、ADFSのアレルギーデータセットをネブラスカ大学AllergenOnline(AOL)のそれと比較し、ADFSのアレルギーデータをビューアレビューを経たAOLのデータに原則統合することとした。さらに、タンパク質の相同性検索ツールのMotif-based法の有用性に関するバリデーションを行った。

### 協力研究者

澤田純一、中島治、中村亮介、中村里香、  
佐藤里絵（国立医薬品食品衛生研究所）  
美宅成樹、朝川直行（名古屋大学工学部）  
近藤康人（藤田学園大学坂文種報徳会病院）  
金澤由基子、新藤智子（食品薬品安全センター  
秦野研究所）

### A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国でも、ダイ

ズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス(Codex)食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、バイオ食品特別部会(TFFBT)が設置され、バイオ食品について