

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. 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な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の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。

**7. 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。

**8. 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。したがって、non-GM

パパイアへの GM パパイア混入を効率的に検知する方法が必要である。現行の通知法における GM パパイア検知法では、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/ $\mu$ L 前後と低濃度である。そこで、パパイアからの DNA 抽出精製法として、シリカベースレジントタイプキット法(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。

**9. 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。

**10. 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:** 未承認遺伝子組換え(GM)パパイアのモニタリング検査には、高感度で迅速な GM パパイア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 パパイアに特異的である検出用、確認用プライマー対に加え、パパイア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)、ピ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 パパイアの検知の簡便化と高感度化について検討した。

**11. 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 情報が未承認のものを含めた未承認 GM 系統の混入を推定する手法の確立を目指す。

**12. 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、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。

**13. 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 魚の検知法に関する研究を行った。

## 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 系統を含む粉砕試料から抽出した 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;ニッポンゾーン社製)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、 $\alpha$ -アマラーゼ(高濃度品)40  $\mu$ L 及び、RNase A(100mg/mL) 100  $\mu$ 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 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を 2.0 mL チューブに移し、GE2-K 緩衝液 85  $\mu$ 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  $\mu$ L を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 150  $\mu$ L 及びイソプロパノール(100%)150  $\mu$ L を添加した後、10~12 回転倒混和した。混合液 700  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。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/ $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L、対象プローブ溶液(10  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L、滅菌蒸留水 5  $\mu$ L、10 ng/ $\mu$ L DNA 試料液 5.0  $\mu$ 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  $\mu$ L、滅菌蒸留水量を 5.5  $\mu$ 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碎した後用いた。

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を用いた。

2) コメ、米粉及びビーフンからの DNA 抽出精製 ニッポンジーン社製 GM quicker 2 を改良して用いた。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、GE1 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 秒間混合した後、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、TE 緩衝液 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。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/ $\mu$ L DNA として DNA 濃度を算出した。

3) 定性 PCR 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シング解析して得られた DNA 配列情報について、BLAST 検索を行

い解析した。

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L として、16°C 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  $\mu$ 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。

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)を探し、5' 側より順に DraI, EcoRV, AluI 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。2ndPCR では同条件に精製した 1stPCR 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 条件(既知配列からの近傍領域解析 2) ベックス(株)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、 $\lambda$  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回目を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。 $\lambda$  DNA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( $\lambda$  DNA1,  $\lambda$  DNA2)を使用した。300 ngのDNAを最終液量10  $\mu$ Lとして10 units BamHIで処理後、1 mM dGTP, 5 units klenow enzyme(3'  $\rightarrow$ 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  $\mu$ L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。

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、Al-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 DraI, EcoRV, AluI 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、1stPCR の鋳型にはゲノム DNA ライブラリー1  $\mu$ Lを、2ndPCR には精製した1stPCR 産物1  $\mu$ Lを用いた。AGE 精製以降は IPCR と同様にした。

### 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製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  $\mu$ m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を用いた。

2) 擬似混合粉砕試料および標準試料 既報に従い、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製し、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 抽出法は既報に従って行った。さらに DNA 試料原液2  $\mu$ g 相当量を取り、滅菌蒸留水を加え全量を17  $\mu$ L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  $\mu$ L および EcoR I 1  $\mu$ L(15U)を加え、37°C、1時間の加温を行った。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/ $\mu$ L に調製したものを 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<sup>®</sup>480 Probes Master 10  $\mu$ L, プライマーとプローブ溶液の混合液0.8  $\mu$ L(25  $\mu$ mol/L プライマーおよび10  $\mu$ mol/L プローブ), これに10 ng/ $\mu$ L に調製した DNA 試料溶液を5  $\mu$ L(50ng)または標準プラスミド溶液5  $\mu$ Lを加え、全量を20  $\mu$ Lとした。PCR 温度条件は既報に従って行った。

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、擬似混合粉砕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。

8) 定量 PCR 条件の改良 厚労通知法に従い、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。PCR 温度条件は厚労通知法に従って行った。アニーリング温度について、厚労通知法の59°Cと55°Cで比較を行った。

9) 改良条件下での PCR 効率測定 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. 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、高速遠心式粉砕器を用いて粉砕し、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」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)で粉砕した。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。

#### 7. 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。

#### 8. シリカベースレジソ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

non-GM パパイア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 パパイア粉末から 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 法によりパパイア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、パパイア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ア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アにおける適応性を検討した。

### 9. 中国産 GM トマト及びピーマンの検知法の確立と調査

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。

2) 試料調製 試料はすべて凍結乾燥を行い、粉砕した。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。

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) 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。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。

### 10. 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

GM パパイア遺伝子及び非 GM パパイア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。

### 11. 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。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。

### 12. 赤唐辛子の DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討

1) 赤唐辛子の DNA 抽出方法・精製 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℃CAP1 緩衝液 10ml と RNase A 20 µL を加え、ボルテックスミキサーで激しく混合後、65℃で 15 分間加温した。(途中 2~3 回転倒混和) AP2 緩衝液 3250 µL 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×g, 4℃, 20 分間遠心。上清を 15ml 容チューブに移し、さらに 12000×g, 4℃, 5 分間遠心。沈殿物を取らないように上清 500 µL を QIAshredder spin column に負荷し、10000×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 µL 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 µL 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×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 分間放置しビベティングにより DNA を溶解させたものを DNA 試料原液とした。

#### 2) GM 唐辛子の検出法の検討

- 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)で粉砕した。
- 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 文献は、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。

#### 13. 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」、2.3.2.2. 「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。

#### C. 研究結果

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

- 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、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、ミルクキーン(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/ $\mu$ L、また、そのばらつき(相対標準偏差:R. S. D.)は、10.1%であった。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( $\Delta$ Rn 値)の経時的変動を、縦軸を  $\Delta$ Rn 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  $\Delta$ Rn 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倍の大ききで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(ミルクキーン)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( $\Delta$ Rn 値)として示した。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  $\Delta$ Rn 値は、玄米に比べ、白米において大きくなることが明らかになった。また、白米に関しては、DNA の質量に比例した  $\Delta$ Rn 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、 $\Delta$ Rn 値が減少した。エンドポイントで得られる  $\Delta$ Rn 値が、鋳型 DNA の質量に応じて変化する原因を明らかにするため、 $\Delta$ Rn 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、ミルククイーン (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 試料をランダム化した上で、blind samples として送付した。その他の試薬として、2 × 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。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 ± S. D. はそれぞれ  $20.72 \pm 0.04$ ,  $20.81 \pm 0.02$  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。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。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。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 ( $\Delta Rn$  値) の経時的変動を、縦軸を  $\Delta Rn$  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  $\Delta Rn$  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。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て 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、測定の実験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、また測定の実験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 増幅や蛍光値測定の不良、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ー対を設計し、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。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。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、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ー対を設計し、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。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 検知プライマー対、Bt 米検出プライマー対 (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 米確認プライマー対 (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。

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。CryIAc 遺伝子情報を基に Bt toxin 遺伝子 (CryIAc と CryIAb 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。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 (OscryIAc-F / OsNOS-R2) を用いた。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) を用いてピーフン 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) を用いた検討ではピ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 (OscryIAc-F / OsNOS-R2) を用いた検討では、ピ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、ピ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。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。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] はマルチクローニングサイ

トと考えられる領域が明らかになった。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。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。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。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。

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。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。

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。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 クローンを単離し、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ーンを選び、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。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 35Septi F1/R1,  $\Omega$ F3/cptiR3) の設計を行った。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/cptiR3 においてそれぞれ 676bp, 192bp の増幅バンドを得た。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。この新規領域 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。

### 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。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て行った場合、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。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 (室内再現性; RSDr は 9.48%) および 0.50 (室内再現性; RSDr 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 (RSDr) 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。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% (RSDr は 3.57~10.70%) および 4.26~5.11% (RSDr は 2.94~6.24%)、MON810 定量系でそれぞれ 0.89~1.14% (RSDr は 1.66~9.60%) および 4.79~5.12% (RSDr 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。

4) 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て前処理を行ったゲノミック DNA について、SS IIb 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. 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。

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 作物系統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。また、新たに付与された形質の概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。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。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。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。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により共通性の高い DNA 配列を見出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 2~4 g 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。

#### 7. 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。また、各抽出 DNA を混合し調製した疑似混入 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。

#### 8. 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

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。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。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。抽出温度は、通知法に記載された 55~60℃のほぼ中点である 58℃とした。以上の DNA 抽出精製条件により、WCR 法を確立した。

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  $110 \pm 7$  ng/mL、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。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。

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/mL 以下であったが、WCR 法では 66 ng/mL 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/mL 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 mg/g、Plant Mini 法では 7.7 mg/g であったが、WCR 法では 132 mg/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。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/mL、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。

#### 9. 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/mL 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。

#### 10. 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ノバパイヤ検知の検討

同時発光検出法による各酵素の検出感度は Aq ;  $2.8 \times 10^{-20}$ , b-Luc ;  $6.5 \times 10^{-19}$ , HRP ;  $1.9 \times 10^{-17}$  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 ノバ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。

#### 11. 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。

#### 12. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討

【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 と低下してしまつたため、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/μL であったが、Genomic-tip 20/G を用いた方法では 211~428ng/μL 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。

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。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 検討】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。

#### 13. 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。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 検体を魚類検知用プライマー配列 (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。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。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。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。現在増幅産物をダイレクトシークエンスで解析中であるが、おそらくサケの成長ホルモン遺伝子であると考えられた。



## 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  $\Delta Rn$  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  $\Delta Rn$  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、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  $\Delta Rn$  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 50 ng 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 (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 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。

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。

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。

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、そしてライブラリー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。

### 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。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°Cから55°C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. 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定性分析法の検出下限とされている。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、検出下限の基準である偽陰性率5%を超えていないことから、本分析法の検出下限は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

検出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。

#### 7. 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。

#### 8. シリカベースレジソ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

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、パパイアについては、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、パパイア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、パパイアの凍結乾燥を行わず、生パパイアから得た抽出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。

#### 9. 中国産GMトマト及びピーマンの検出法の確立と調査

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。

#### 10. 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出法の検討

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。

#### 11. 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。

#### 12. 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。

### 13. 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 GM サケは検出されなかった。

## 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ピーフンには 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、ピーフン等に 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。

2-2. 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 既に輸入ピーフン検体から GM Shanyou 63 系統と同じ特異的構造を有する Bt コメと、GM Shanyou 63 系統とは異なる特異的構造を有する Bt コメ (未知 Bt 系統) の混入を明らかにしている。本研究でさらに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ブ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。

2-3. 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

を示すトリブ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、このトリブ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。

### 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て施すことにより、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。

### 3-2. 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どうかの検証を ABI7500 を用いて行ったが、ゲノムの前処理による PCR 効率の差は顕著に認められなかった。

### 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 の定性分析法の検出下限は 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。

#### 7. 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 検出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。

#### 8. シリカベースレジスタイブ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。

#### 9. 中国産 GM トマト及びピーマンの検出法の確立と調査

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 抽出をおこなったところ、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。

#### 10. 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

イクオリン、ピオチン化ルシフェラーゼ(及び西洋わさびペルオキシダーゼ)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 パパイアの検出法の確立した。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。

#### 11. 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。

#### 12. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検出法の検討

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 ces 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。

#### 13. 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。

F. 健康危険情報  
なし