

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

超高速・簡便な遺伝子組換え食品の
新規確定検査法の開発

平成 19-20 年度 総合研究報告書

(H19-食品-若手-001)

研究代表者 張替 直輝

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

超高速・簡便な遺伝子組換え食品の新規確定検査法の開発 — 1

研究代表者：張替 直輝（武庫川女子大学薬学部）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 — 36

III. 研究成果の刊行物・印刷物 — 36

I. 総合研究報告書

超高速・簡便な遺伝子組換え食品の新規確定検査法の開発

研究代表者 張替 直輝 武庫川女子大学 薬学部 助手

研究要旨

本研究の目的は、遺伝子組換え食品(GMO)を短時間で簡便に検出できる新規検査法を開発することによって、GMOを使用した食品の正確な情報提供と多くの研究及び検査機関のGMO検査への参加を促進することである。本研究では、(1)分析工程の簡略化、(2)食品中のGMOの重量%算出、(3)加工処理の影響の軽微化、(4)複数遺伝子の同時検出、(5)可視での検出の5項目に着目し、それらの解決法として、内部標準法、ワンポットPCR法、PCR-multiple primer extension (MPEX)法の開発を行った。

内部標準法は、内部標準遺伝子を添加した食品サンプルから抽出したDNAサンプルを定量PCRで分析し、算出された組換え遺伝子と内部標準遺伝子のコピー数の比率からGMO含有量を算出する方法である。今回、遺伝子組換え(GM)大豆を混合した食品サンプルで検討した結果、この方法によって食品中のGMOの重量%を算出することができた。更に、Duplex定量PCRと組み合わせることで、一回の定量PCRで組換え遺伝子と内部標準遺伝子のコピー数を算出することができた。このDuplexの方法は、試薬量や操作の軽減だけでなく、測定精度においても優れていた。

ワンポットPCR法は、対象遺伝子を補足できるオリゴを固定したPCRチューブを使用することで、食品溶解液から対象遺伝子をハイブリダイゼーションで抽出し、そのPCRチューブにPCR試薬を添加することで定量PCRができる方法である。今回、大豆レクチン遺伝子にて、固定オリゴの配列や濃度、ハイブリダイゼーションの時間や温度などの設定条件を明らかにした。その最適化された条件では、1-100%の大豆溶解液から定量的に大豆レクチン遺伝子を検出することができた。更に、組換え遺伝子を補足するオリゴを固定したチューブを作製してGM大豆検出に応用したところ、1-100%のGM大豆溶解液だけでなく、市販の1、2、5%w/w GM大豆標品から組換え遺伝子を定量的に検出することができた。このワンポットPCR法は、食品溶解液から40分以内に定量PCRを行うことができる短時間で簡便な方法であった。

PCR-MPEX法は、DNAサンプルからMultiplex PCRで対象遺伝子を増幅し、そのPCR産物をDNAポリメラーゼの伸長反応にて検出するDNAマイクロアレー法である。今回、トウモロコシと大豆の種特異的遺伝子の配列、各GMOの構造特異的配列(Event176、

Mon810、Bt11、GA21、T25 トウモロコシ、ラウンドアップレディー大豆)に対応したオリゴを固定したプレートを作製した。食品から抽出した DNA からこの 8 種類の遺伝子を Multiplex PCR で増幅し、その PCR 産物をそのプレートで発色反応にて検出した。この方法によって、GM トウモロコシ 5 品目と GM 大豆 1 品目に対して 1%GM 含有サンプルまで判定することができた。

今回、短時間で簡便に GMO を検出できる 3 つの検査法を開発することができた。これらの方法はそれぞれ目的で挙げた 5 項目の幾つかを解決でき、GMO を使用した食品の正確な情報提供を促進するものと思われる。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

田中 温子 武庫川女子大学薬学部 副手

齋藤 晋 住友ベークライト株式会社 研究員

阿部 碧 住友ベークライト株式会社 研究員

A. 研究目的

遺伝子組換え食品(GMO)は、食品の生産を量的及び質的に向上させ、食糧の安定供給に貢献している。その安全性は専門家で構成される食品安全委員会で科学的に検証され、平成 20 年 2 月現在、審査の手続を経た GMO 数は 88 品種に上る。一方、平成 13 年から安全性審査を受けた GMO には表示が義務付けられ、また、安全性未審査のものは流通しないよう監視が行われている。この国民の食の安全を守る重要な制度を支えるためにも、増加の一途を辿る GMO に対して、今まで以上の簡便で高精度な検査法が必要である。

その GMO 検査の公定法には、高い特異性と検出感度を兼ね備えた PCR 法が使用されている。しかし、一般的に PCR 法は、煩雑で時間のかかる DNA 抽出が必要である。また、世界において、食品中の GMO を含む原材料の使用量を表示することが要

求されている中、従来の PCR 法で算出されるのは原材料中の GMO の割合のみである。更に、加工食品では加工処理による DNA の断片化などの問題が残っている¹⁾。一方、複数の遺伝子を同時検出できる DNA マイクロアレイを GMO 検査に応用する試みもされているが^{2,3)}、高価なレーザースキャナが必要であることや操作が煩雑で時間がかかることなどの問題がある。

そこで本研究は、食品中に存在する GMO の新規検査法の開発にあたり、(1) 分析工程の簡略化、(2) 食品中の GMO の重量%算出、(3) 加工処理の影響の軽微化、(4) 複数遺伝子の同時検出、(5) 可視での検出の 5 項目の解決を目指した。そして、それらの解決法として、内部標準法、ワンポット PCR 法、PCR-multiple primer extension (MPEX) 法に着目した。

内部標準法とは、サンプルに添加した内部標準遺伝子で対象遺伝子の抽出効率及び検出効率を補正し、対象食品の重量%を算出できる方法である(Fig. 1)。また、この方

法は、吸光度で DNA の重量及び純度を検討する必要がないため、短時間でサンプルを調整できる利点もある。また、Duplex 定量 PCR と組み合わせることで、更に簡便な方法になると考えられる。

ワンポット PCR 法とは、PCR チューブにオリゴを固定して DNA をハイブリダイゼーションで回収する方法である (Fig. 2)。一つのチューブでサンプル調整から定量 PCR まで行うシングルチューブ法に分類され、非汚染的で簡便な方法になると考えられる。

PCR-MPEX 法は、従来の DNA マイクロアレイにおける長時間のハイブリダイゼーション反応を短時間の DNA ポリメラーゼ伸長反応に置き換えた方法である (Fig. 3)。この方法は容易に発色反応にすることもできるので、複数遺伝子を短時間で可視にて同時検出できると考えられる。

そこで、本研究では、内部標準法と Duplex 定量 PCR を使用した内部標準法、ワンポット PCR 法、PCR-MPEX 法を使用して、食品中に存在する GMO に対する新規検査法を開発した。

B. 研究方法

B-1. 内部標準法

GM 大豆標品 (Fluka) として、0、0.1、0.5、1、5%w/w ラウンドアップレディー大豆粉末を使用した。また、砂糖、小麦粉、コーンフラワー、チョコレート、クッキー、ポップコーンの粉末に 5%w/w GM 大豆粉末を加え、食品総重量あたりの GMO の重

量% (即ち、 $w/w_{\text{total food}} (w/w_{\text{TF}})$) が 0.5% の GM 大豆含有食品サンプルを作成した。

DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) の方法を改変して行った。サンプル 50 mg に AP1 緩衝液 800 μL 、RNase A 8 μL 、EcoR I で直鎖にした 5.4×10^6 copy/ μL ColE1 プラスミド 2.5 μL を添加し、65°C で 30 分間、用時攪拌しながら加温した。加温後、AP2 緩衝液 260 μL を加えて氷上で 5 分間放置した。そのサンプルを QIAshredder Mini スピンカラムに入れて、室温にて 20000 g で 5 分間遠心した。カラムを通過した溶液の上清 200 μL に AP3/E 緩衝液 300 μL を加えて、DNeasy Mini スピンカラムに入れて室温にて 6000 g で 1 分間遠心した。そのカラムに AW 緩衝液 500 μL を加えて室温にて 20000 g で 1 分間遠心した。もう一度 AW 緩衝液 500 μL を加えて室温にて 20000 g で 10 分間遠心した。65°C の Nuclease Free 水 100 μL を加えて 5 分間放置後、室温にて 6000 g で 2 分間遠心した。もう一度、65°C の Nuclease Free 水 100 μL を加えて同様の操作を行った。抽出された 200 μL の DNA 溶液を直接 PCR のサンプルとして使用した。また、溶液の DNA 濃度は、Quant-iT Picogreen dsDNA キット (Invitrogen) で測定した。

定量 PCR 反応液は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μL 、10 μM プロープ溶液 0.5 μL 、25 μM プライマー溶液 各 0.5 μL 、Nuclease Free 水 8.5 μL 、サンプル 2.5 μL で調整した。大豆レクチン遺伝子 (Le1) と組換え遺伝子 (RRS) のプライマーとプロープは、厚生労働省通知法に従った⁸⁾。ColE1 のプライマーは 5'-GGGCTATCTCAITTTTGTAGC

-3'と 5'-ATGCCTGACGCTGATGCTTG-3',
プローブは 5' FAM-TTCTGCTTCCTGGC
GTCTGCGA-TAMRA 3'を使用した。7300
Real-Time PCR System (Applied
Biosystems)を使用して、50°C2分と 95°C
10分のインキュベーション後、95°C30秒
と 59°C60秒の40サイクルで定量PCRを
行った。GM Soybean (RRS) Detection
Plasmid セット (Nippon Gene) 及び
ColE1 プラスミドで検量線を作成し、コピ
ー数を算出した。

B-2. Duplex 定量 PCR を使用した内部標 準法

GM 大豆標品及び 0.5%w/w GM 大豆含
有食品サンプルは、B-1 と同じものを使用
した。更に、DNA 抽出も B-1 と同じ方法を
用いた。

定量 PCR 反応液 25 μ L は、QuantiTect
Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) 12.5
 μ L、0.2 μ M プローブ、0.4 μ M プライマー、
サンプル 2.5 μ L、Nuclease Free 水で調整
した。また、比較に用いた Simplex 定量
PCR の場合も同様に調整した。RRS と
ColE1 のプライマーとプローブは、B-1 の
定量 PCR と同じ配列を使用した。ColE1
に対するプローブは 5'末端を Yakima
Yellow、3'末端を Dark Quencher にした。
7300 Real-Time PCR System を使用して、
50°C2分と 95°C15分のインキュベーシ
ョン後、94°C60秒と 60°C60秒の40サイ
クルで定量 PCR を行った。GM Soybean
(RRS) Detection Plasmid セットは ColE1
に類似したプラスミドで作成されていたの
で、RRS と ColE1 の両方の標品として使用

し、その検量線からコピー数を算出した。

B-3. ワンポット PCR 法

大豆 DNA は大豆粉末から DNeasy Plant
Mini kit で抽出し、Binding 緩衝液 (100
mM tris HCl buffer (pH8.0)、10 mM CaCl₂、
0.4 M NaCl、0.5% SDS) で DNA 4 ng/ μ L
に調整して使用した。食品溶解液の作製に
あたり、食品 50 mg に 400 μ g/mL
Proteinase K、200 μ g/mL RNase A、14
U/ μ L α -amylase を含む Binding 緩衝液
980 μ L を添加して 60°C で 60 分間加温した。
更に 95°C で 5 分間加温後、0.5 M EDTA 20
 μ L を添加して遠心し、その上清を食品溶解
液として使用した。

オリゴ固定チューブの作製には、活性エ
ステル基をもつ S-Bio® PrimeSurface® 処理
PCR チューブ (Sumitomo Bakelite) を使用
した。また、今回使用したオリゴは Table 1
に示したものを使用した。オリゴ固定溶液
で調整した 10 μ M 5'アミノリンカー修飾オ
リゴ溶液を添加して、室温で 90 分間放置し
た。反応停止後、Nuclease Free 水で洗浄
し、乾かしたチューブを使用した。

オリゴ固定チューブに 25 μ L のサンプル
を添加し、95°C で 5 分間熱変性後、50°C で
30 分間ハイブリダイゼーションした。チュ
ーブを洗浄液 (10 mM Tris HCl buffer
(pH8.0)、1 mM EDTA、0.2 M NaCl) 200 μ L
で 3 回洗浄した。洗浄したチューブに、定
量 PCR 試薬 (FastStart Universal Probe
Master (Roche) 12.5 μ L、10 μ M プローブ
溶液 0.5 μ L、25 μ M プライマー溶液 各
0.5 μ L、Nuclease Free 水 11 μ L) 25 μ L を
添加した。プライマーとプローブは、Le1

については Fig. 4 で示した配列を使用し、RRS については報告されている配列を使用した⁹⁾。7300 Real-Time PCR System を使用して、50°C2 分と 95°C10 分のインキュベーション後、95°C30 秒と 59°C60 秒の 40 サイクルで定量 PCR を行った。GM Soybean (RRS) Detection Plasmid セットを使用してコピー数を算出した。

本研究では、固定オリゴの配列特異性、配列の長さ、固定濃度などのチューブ作成条件とハイブリダイゼーションの温度や時間などの反応条件を検討した。そして、至適条件にて、定量性や他の食品マトリックスの影響を検討し、更には GM 大豆検出に応用した。

B-4. PCR-MPEX 法

1、5%w/w の GMO 標品として、Event176、Mon810、Bt11、GA21(GA21 は 1、4.3%w/w を使用)のトウモロコシ粉末とラウンドアップレディー大豆粉末を使用した。各サンプル粉末から DNeasy Plant Mini kit で抽出した DNA を Multiplex PCR に使用した。また、T25 トウモロコシは、非組換えトウモロコシと GM トウモロコシの DNA 比率として、1、5%のサンプルを使用した。

Multiplex PCR 反応液 25 μ L は、QuantiTect Multiplex PCR Master Mix 12.5 μ L、0.05 μ M SSIIB、Event176、Bt11 プライマー、0.1 μ M Le1、RRS、Mon810、T25 プライマー、0.5 μ M GA21 プライマー、DNA サンプル 100 ng、Nuclease Free 水で調整した。各プライマーは Table 2 に示したものを使用した。GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を使用

して、50°C2 分と 95°C15 分のインキュベーション後、94°C60 秒と 61°C60 秒の 35 サイクルで反応した。

プレートに固定したオリゴは Table 2 に示したものを使用した。これらの配列は主に定量 PCR のプローブ配列を利用したものであった。また、トウモロコシのスターチシンターゼ遺伝子(SSIIb)に対しては報告の配列から微調整したものを使用し、その配列の特異性は BLAST 検索で確認した。S-Bio[®] PrimeSurface[®]処理プラスチックプレート(Sumitomo Bakelite)に、オリゴ固定溶液で調整した 10 μ M 5'アミノリンカー修飾オリゴ溶液をスポットして、室温で 3 時間放置した。反応停止後、Nuclease Free 水で洗浄し、乾かしたプレートを使用した。

伸長反応液 50 μ L は、5U TERMIPol DNA polymerase (Solis Biodyne)、1 \times 緩衝液 C、2 mM MgCl₂、50 μ g/mL salmon sperm DNA、0.05% triton-X 100、100 μ M dATP、100 μ M dGTP、100 μ M dCTP、65 μ M dTTP、35 μ M biotin-11-dUTP、PCR 産物 5 μ L、Nuclease Free 水で調整した。95°Cで 5 分間加熱後、72°Cに温めたオリゴ固定プレートに添加し、その溶液の上にカバーを乗せて 72°C3 分間反応した。プレートを洗浄液 1 (0.1% triton X-100 \cdot 50 mM tris buffer (pH 7.5))と洗浄液 2 (50 mM tris buffer (pH 7.5))で洗浄し、あらかじめ作成しておいたアルカリフォスファターゼ結合ビオチン \cdot アビジン複合体溶液 (VectaStain ABC-AP kit、Vector Laboratories)を添加して 37°C20 分間反応した。プレートを洗浄液 1 と洗浄液 2 で洗浄し、NBT/BCIP 溶液(Roche)を添加して、37°C10 分間反応した。プレートを精製水で

洗浄後、乾かして発色したスポットを確認した。

C. 研究の結果・考察

C-1. 内部標準法

C1-1. GM 大豆標品を使用した定量性の検討

各大豆標品 50 mg から抽出した DNA 量の平均は、907-1246 ng であった (Table 3)。Le1 と ColE1 のコピー数の平均は、22010-29043 と 12533-14682 であった (Table 4)。更に、RRS のコピー数は大豆標品の GM 含有量に依存して増加した。今回のサンプル調整法では、各サンプル間で Le1 と ColE1 のコピー数の平均に大きな差がなく、DNA 回収率を一定に安定させることができた。

RRS/Le1 比と RRS/ColE1 比は、それぞれ大豆標品の GM 含有量に依存して増加した (Table 4)。GM 大豆標品では %w/w と %w/w_{tf} の値は同じであるが、RRS/Le1 比の場合は組換え体の非組換え体に対する割合を示す %w/w である。そして、RRS/Le1 比と GM 含有量の間には、 $RRS/Le1 = 0.0078 \times \text{GMO 含有量}(\%w/w) + 0.000045$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.98 であった (Fig. 5)。また、RRS/ColE1 比の場合は組換え体の食品総重量に対する割合を示す %w/w_{tf} である。そして、RRS/ColE1 においても、 $RRS/ColE1 = 0.016 \times \text{GMO 含有量}(\%w/w_{tf}) - 0.000008$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.97 であった。本方法で得られた値には、DNA 抽出から定量 PCR まで

の工程のばらつきが含まれていることを考慮すると、高い相関性であると考えられた。

C1-2. GM 大豆含有食品サンプルを使用した検討

抽出 DNA 量は、小麦サンプルで 862 ng と大きく、一方、砂糖とチョコレートサンプルで 57 ng と 68 ng と低かった (Table 5)。これらの結果から、砂糖や脂質などの DNA を含まない材料を多く含む食品では抽出 DNA 量が低いことが示唆された。一方、RRS、Le1、ColE1 のコピー数の平均は、それぞれ 49-117、1344-3454、6593-12749 であった (Table 6)。このように、各サンプル間において、抽出 DNA 量には大きな差があるが、コピー数には僅かな差しかなかった。更に、RRS/Le1 比と RRS/ColE1 比の平均は、それぞれ 0.0257-0.0394 と 0.0055-0.0100 であった。このように、RRS のコピー数を Le1 及び ColE1 コピー数で補正することで、各サンプル間の差を少なくすることができた。

GM 大豆標品で作成した Fig. 5 の検量線で RRS/Le1 比と RRS/ColE1 比から算出した GMO 含有量は、それぞれ 3.28-5.04%w/w と 0.35-0.63%w/w_{tf} であった (Fig. 6)。このように、RRS/Le1 比では、従来通り大豆中の GM 含有量である 5%w/w に近い値が算出され、そして、RRS/ColE1 比では、食品総重量あたりの GM 含有量である 0.5%w/w_{tf} に近い値が算出することができた。

C-2. Duplex 定量 PCR を使用した内部標準法

プラスミド標品及び ColE1 を添加した GM 大豆 DNA の Duplex PCR 産物を 3% アガロースで電気泳動した結果、RRS と ColE1 のバンドが 121 bp と 95 bp に確認された (data not shown)。また、Simplex 及び Duplex 定量 PCR でプラスミド標品を使用して検量線作成を検証したところ、Simplex と Duplex の定量 PCR の両方で両遺伝子ともに直線式が成り立ち、相関係数 (r) は 0.99 であった。このように、今回の Duplex 定量 PCR が両遺伝子の定量分析に使用できることが示された。

50 mg の大豆標品から抽出した DNA を使用して、GMO 含有量と RRS/ColE1 比の間の直線関係を検討したところ、Simplex 定量 PCR では、 $RRS/ColE1 = 0.020 \times \text{GMO 含有量}(\%w/w_{\text{if}}) \cdot 0.0017$ の直線式が成り立ち、相関係数 (r) は 0.97 であった (Fig. 7)。一方、Duplex 定量 PCR では、 $RRS/ColE1 = 0.021 \times \text{GMO 含有量}(\%w/w_{\text{if}}) \cdot 0.0006$ の直線式が成り立ち、相関係数 (r) は 0.99 であった。このように、Simplex よりも Duplex 定量 PCR の方が、高い相関性が得られることが示された。

0.5%w/w_{if} の GM 大豆含有食品サンプルを Simplex と Duplex 定量 PCR でそれぞれ測定し、GM 大豆標品で作成した Fig. 7 の検量線で GMO 含有量を算出した。Simplex では 0.34-0.77%w/w_{if} であったが、Duplex では 0.34-0.60%w/w_{if} であった (Fig. 8)。このように、食品サンプルにおいても Simplex よりも Duplex 定量 PCR の方が、高い精度が得られることが示された。

C-3. ワンポット PCR 法

C3-1. 固定オリゴの選択

大豆 DNA にて Le1 を対象として、固定オリゴの配列が対象 DNA の捕獲に及ぼす影響を検討した。Le1 の PCR プライマーとプローブの配列、PCR 領域の上流 64 塩基と下流 31 塩基の配列など合計 5 箇所の位置に対して、センスとアンチセンスの両配列で検討した (Fig. 4, Table 1)。その結果、いずれの配列でもセンス及びアンチセンスの片方のみで Le1 のコピー数が大きく、その値は 69 から 110 コピーで各位置の間で大きな差はなかった (Table 7)。従って、対象 DNA の捕獲能は配列の位置への依存度が低いと考えられた。5'側ではセンス鎖、3'側ではアンチセンス鎖で捕獲能が高いことから、一定領域の DNA の立体構造が捕獲能に関与している可能性が考えられた。また、今回使用した大豆 DNA 100 ng を直接定量 PCR で測定した場合のコピー数が 9068 であることから、今回の検討で最も大きい 110 コピーであった Le1n02-3'a チューブの DNA 回収率は 1.2% であった。この Le1n02-3'a チューブを他の基礎検討にも使用した。

固定オリゴの長さの影響を検討するため Le1n02-3'a から 8 塩基減らした 11 塩基の配列と 8 塩基増やした 27 塩基の配列で検討したところ、共に Le1 のコピー数は減少した (Table 8)。このことから、固定オリゴの配列にはハイブリダイゼーションに最適な長さが存在することが示唆された。また、固定オリゴの濃度の影響を検討するため 0.1、1、10 μM の各濃度で Le1n02-3'a を固定したところ、オリゴ濃度に依存して Le1 のコピー数が増加した。このことから、高濃度でオリゴを固定した方が良いことが

示唆された。しかし、100 μM では溶液が白濁することから、チューブへのオリゴ固定には 10 μM の溶液が良いと考えられた。

C3-2. ハイブリダイゼーション条件

大豆 DNA と Le1n02-3'a チューブを使用して、ハイブリダイゼーション条件を検討した。温度条件の検討において、25°C では Le1 のコピー数は少ないが、40°C、50°C と上昇させることでコピー数が増加した (Table 9)。しかし、60°C では 50°C に比べてコピー数が減少した。このことから、ハイブリダイゼーションには至適温度が存在することが示唆された。また、時間条件の検討では、15 分でも Le1 が検出され、時間が長くなるに伴いコピー数の増加が認められた。しかし、Le1 のコピー数の差が 15 分と 120 分で 1.7 倍しかないことから、短時間でも十分に DNA が捕獲できることが示唆された。

C3-3. 食品分析への応用

最適化された条件で、Le1n02-3'a チューブを使用して定量性について検討した。大豆 DNA 10-1000 ng において、Le1 のコピー数は DNA 量に依存して増加した (Table 10)。サンプルの DNA 重量 (ng) と Ct 値には、 $Ct = -3.41 \times \log \text{DNA} + 39.19$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.99 であった。更に、50 mg/mL 大豆溶解液を 100% とした 1-100% の大豆溶解液においても、Le1 のコピー数は濃度に依存して増加した。大豆溶解液の%濃度(C)と Ct 値には、 $Ct = -3.14 \times \log C + 35.19$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.99 であった。これらのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は、精

製 DNA だけでなく、食品溶解液においても定量分析できることが示唆された。

他の食品マトリックスへの適応性を検証するため、小麦とトウモロコシ溶解液に大豆 DNA を混和したサンプルで検討した。小麦溶解液サンプルで Le1 コピー数が一番大きかったが、大豆 DNA のみのサンプルでのコピー数の 1.4 倍の差でしかなかった (Table 11)。このことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は、食品マトリックスを含む食品溶解液にも応用できることが示唆された。

加工食品への適応性を検証するため、110°C で 30 分と 60 分間加熱処理した大豆サンプルで検討した。Le1 のコピー数は、処理 0 分に比べて処理 30 分で 4.5 倍、処理 60 分で 2.2 倍に増加した (Table 12)。これらのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は加熱処理食品から遺伝子を検出することはできるが、定量値が過大評価される可能性があることが示唆された。

C3-4. GM 大豆検出への応用

GM 大豆を捕獲するための RRS-5'short's チューブを作成し、50 mg/mL GM 大豆溶解液を 100% とした 1-100% の GM 大豆溶解液で検討した。GM 大豆濃度に依存して RRS 遺伝子のコピー数は増加した (Table 13)。GM 大豆溶解液の%濃度(C)と Ct 値には、 $Ct = -4.49 \times \log C + 39.53$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.99 であった。更に、市販の 1、2、5% w/w GM 大豆標品の 50 mg/mL 溶解液でも検討したところ、1% で 17 コピー、2% で 30 コピー、5% で 63 コピーと GMO 含有量に依存した検出が可能であった (Table 14)。これ

らのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は、対象遺伝子にあったオリゴを固定することで、GMO の検出にも応用できることが示唆された。

C-4. PCR-MPEX 法

非組換え大豆と非組換えトウモロコシの DNA では、それぞれ種特異的な遺伝子の Le1 と SSIb のスポットのみに発色が認められた (Fig. 9)。従って、これらは、このマイクロアレイにおけるポジティブコントロールになると考えられた。更に、1、5%w/w の GMO 含有量 (GA21 は 1、4.3%w/w、T25 は DNA 比率として 1%と 5%) の GM 大豆および GM トウモロコシ標品から抽出した DNA では、各対応するスポットで発色が認められた。また、5 種類の GM トウモロコシの DNA を各 1%含むサンプルでも、対応する 5 カ所のスポットで発色が認められた (data not shown)。これらのことから、伸長反応を利用した DNA マイクロアレイによって、簡便に短時間で複数の GMO 遺伝子を可視で同時検出できることが示唆された。

D. 結論

現在、我が国の GMO の食品表示制度では、原材料に含まれる GMO の割合が 5%以上の場合に GMO の表示が義務付けられている。組換え遺伝子と種特異的遺伝子のコピー数の比率を使用した従来法は、その原材料に含まれる GMO の割合を算出するのに有用であった⁸⁾。しかし、近年、世界に

おいて食品中の GMO を含む原材料の割合も表示する動きが起きている。食品総重量あたりの GMO の重量%が算出できる今回の内部標準法は、この要求に答えることのできる方法になると思われる。更に、Duplex 定量 PCR を組み合わせた方法は、操作や試薬コストの軽減だけでなく、各遺伝子を単独で定量 PCR する方法と同等以上の精度がある有用な方法であった。今後、この内部標準法に対して加工食品への適応性など更なる改良を加えて行きたいと考えている。

また、今回、迅速で簡便な GMO 検査法として、オリゴ固定 PCR チューブを使用したワンポット PCR 法を開発した。基礎検討の結果、チューブへの固定配列として、PCR 増幅領域付近の 20 塩基程度を選択し、センスとアンチセンスの両方を検討するのが良いと考えられた。ハイブリダイゼーションには至適温度が存在し、その時間は 30 分程度でも十分であった。最適化された条件では、DNA だけでなく食品溶解液のサンプルからも定量的な検出ができた。一方、加熱処理食品からも検出できるが過大評価について注意が必要であった。今後、感度や加工食品への適応性を改善することで、より有用な方法になると考えられる。

複数遺伝子を可視にて同時検出できる PCR-MPEX 法を GMO 検出に応用したところ、5 種類の GM トウモロコシと 1 種類の GM 大豆を GMO 含有量 1%w/w まで検出することができた。従来の DNA マイクロアレイではハイブリダイゼーション工程に 1-18 時間を要したが²⁷⁾、今回の方法ではそれに相当する伸張反応工程の時間は 3 分であった。また、発色反応で容易に検出

することができた。このように、PCR-MPEX 法は簡便で迅速な GMO の可視での同時検出を可能にした。今回、DNA サンプルの増幅には簡便な Multiplex PCR を使用したが、今後、精度の高い増幅方法を使用することで定量性や感度を向上させたいと考えている。

本研究では、GMO の新規検査法の開発にあたり、(1) 分析工程の簡略化、(2) 食品中の GMO の重量%算出、(3) 加工処理の影響の軽微化、(4) 複数遺伝子の同時検出、(5) 可視での検出の 5 項目に着目して検討を行った。内部標準法では(1)と(2)を実現した。ワンポット PCR 法では特に(1)が実現できたが、(3)については期待通りの大きな改善効果を得るに至らなかった。PCR-MPEX 法では、(1)、(4)、(5)を実現した。このように、本研究で開発した 3 つの新規検査法は、それぞれ上記の 5 項目の幾つかを実現することができた。これらの方法は、GMO を使用した食品の正確な情報提供と多くの研究及び検査機関の検査への参加を促進するものと思われる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 参考文献

1) Yoshimura T, Kuribara H, Matsuoka T, Kodama T, Iida M, Watanabe T, Akiyama H, Maitani T, Furui S, Hino A. Applicability of the quantification of

genetically modified organisms to foods processed from maize and soy. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2052-9 (2005).

2) Rudi K, Rud I, Holck A. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res.*, 31(11), e62 (2003).

3) Leimanis S, Hernández M, Fernández S, Boyer F, Burns M, Bruderer S, Glouden T, Harris N, Kaeppli O, Philipp P, Pla M, Puigdomènech P, Vaitilingom M, Bertheau Y, Remacle J. A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Mol. Biol.*, 61(1-2), 123-39 (2006).

4) Morisset D, Dobnik D, Hamels S, Zel J, Gruden K. NAIMA: target amplification strategy allowing quantitative on-chip detection of GMOs. *Nucleic Acids Res.*, 36(18), e118 (2008).

5) Xu J, Zhu S, Miao H, Huang W, Qiu M, Huang Y, Fu X, Li Y. Event-specific detection of seven genetically modified soybean and maizes using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *J. Agric. Food Chem.*, 55(14), 5575-9 (2007).

6) Zhou PP, Zhang JZ, You Y, Wu YN. Detection of genetically modified crops by combination of multiplex PCR and low-density DNA microarray. *Biomed. Environ. Sci.*, 21, 53-62 (2008).

7) Bordoni R, Germini A, Mezzelani A, Marchelli R, De Bellis G. A microarray

platform for parallel detection of five transgenic events in foods: a combined polymerase chain reaction-ligation detection reaction-universal array method. *J. Agric. Food Chem.*, 53(4), 912-8 (2005).

8) Notification No. 110 (2001), Director-General of Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

9) Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirao T, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, 85(5), 1077-89 (2002).

G. 研究発表

(論文発表)

Harikai N, Saito S, Abe M, Kondo K, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Kinoshita K. 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. Biotechnol. Biochem.*, 72(11), 2953-2958 (2008).

Tanaka A, Harikai N, Saito S, Yakabe T, Funaoka S, Yokoyama K, Fujiwara K, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. All-in-one tube method for quantitative gene expression analysis in oligo-dT30

immobilized PCR tube coated with MPC polymer. *Anal. Sci.*, 25(1), 109-114 (2009).

Harikai N, Saito S, Tanaka A, Kinoshita K. Determination of unprocessed genetically modified soybean in foods using simplex and duplex real-time PCR with an internal standard. 投稿中.

Harikai N, Saito S, Tanaka A, Kinoshita K. Gene expression assay in blood and various tissues by a single-tube real-time RT-PCR method using an oligo-dT immobilized PCR tube. 投稿中.

Harikai N, Saito S, Abe M, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Kinoshita K. Optical detection of specific genes for genetically modified soybean and maize using multiplex PCR coupled with primer extension on a plastic plate. 投稿中.

(学会発表)

張替直輝. 標準添加法を使用した遺伝子組み換え食品の新規検出法の開発. 第128年会日本薬学会 横浜 (2008).

張替直輝, 穂山 浩, 近藤一成, 手島玲子, 木下健司. Duplex real-time PCR を使用した内部標準法による遺伝子組換え大豆の検出. 第14回日本食品化学学会学術大会 (2008).

張替直輝, 齋藤 晋, 阿部 碧, 近藤一成, 橘田和美, 穂山 浩, 手島玲子, 木下健司. 大豆及び遺伝子組換え大豆のオリゴ固定

PCR チューブを使用した定量 PCR 法. 第 129 年会日本薬学会 京都 (2009).

山田千尋, 穂山 浩, 中村文美, 中島 治, 張替直輝, 古井 聡, 橘田和美, 川上 浩, 手島玲子. 未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング検知法について. 第 15 回 日本食品化学学会学術大会 (2009). 発表予定.

張替直輝, 齋藤 晋, 阿部 碧, 近藤一成, 橘田和美, 穂山 浩, 手島玲子, 木下健司, 吉田雄三. プラスチック基板上におけるプライマー伸長反応を用いた遺伝子組換え食品の同時可視検出法. 第 15 回 日本食品化学学会学術大会 (2009). 発表予定.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

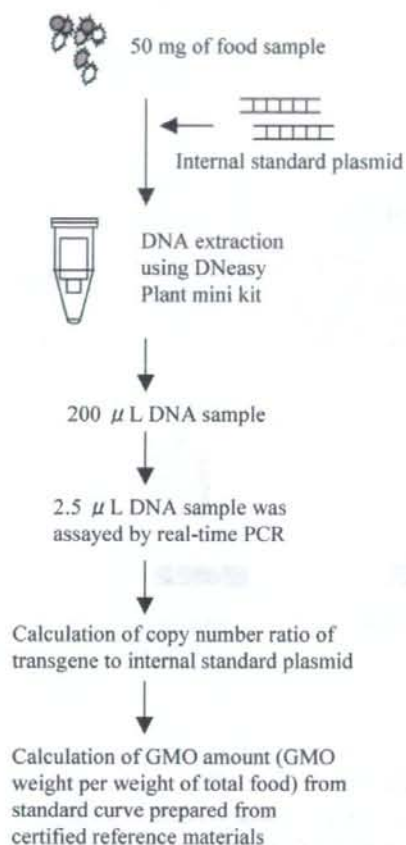


Figure 1. Schematic diagram of a method using an internal standard to determine unprocessed GMO amount (GMO weight per weight of total food (w/w_{TF})) from foods. Food samples were spiked with internal standard plasmid, and DNA was extracted using a silica membrane-type kit with modifications to ensure consistent and efficient DNA extraction. The DNA sample was directly used as the real-time PCR template. Standard curves plotting GMO amount (w/w_{TF}) vs copy number ratio of transgenes to internal standard plasmids were constructed using certified reference materials (CRMs). The standard curve was used to calculate GMO amount (w/w_{TF}) in food samples.

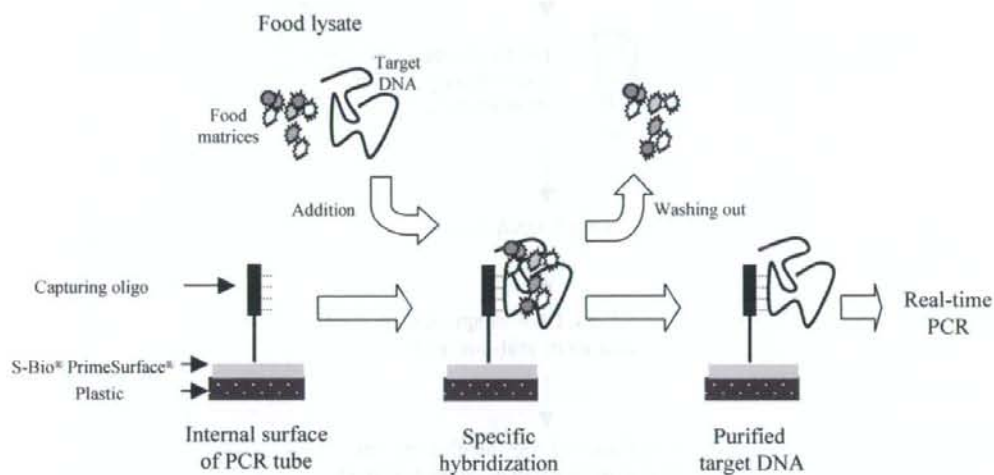


Figure 2. Process for a real-time PCR method using capture oligo-immobilized PCR tube. A capture oligo is immobilized on the S-Bio® PrimeSurface®-treated PCR tube. Target DNA in food lysate hybridizes to the capture oligo on the surface of PCR tube. Food matrices are removed by washing. Purified target DNA in the PCR tube is directly used for real-time PCR.

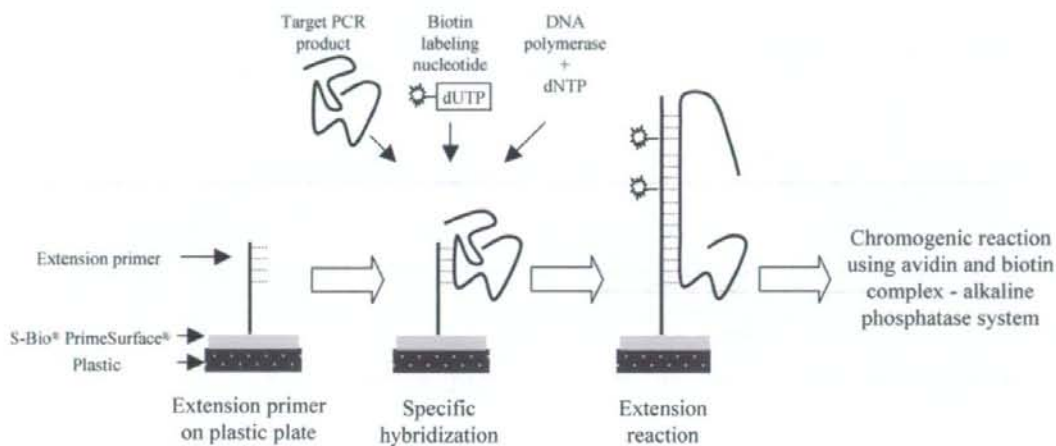


Figure 3. Process for primer extension on a plastic plate. An extension primer is immobilized on the S-Bio® PrimeSurface®-treated plastic plate. Target PCR product amplified by multiplex PCR hybridizes to the primer. Extension and incorporation of biotin-dUTP are carried out by DNA polymerase. The extension reaction is optically detected by an avidin and biotin complex - alkaline phosphatase system.

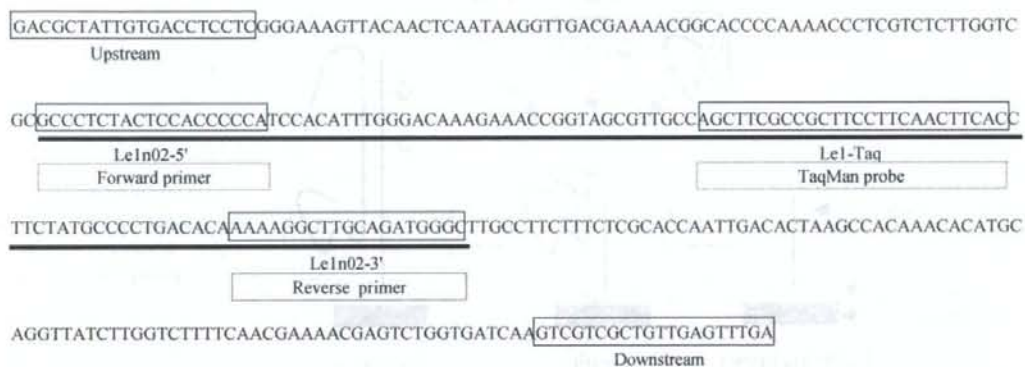


Figure 4. Position of capture oligos, PCR primers, and probe in *Le1*. DNA sequences of capture oligos for *Le1* are indicated by open boxes. We used DNA sequences of Le1n02-5' and Le1n02-3' and Le1-Taq as primers, and TaqMan probe for real-time PCR for *Le1*. Amplified region is shown with a bold line.

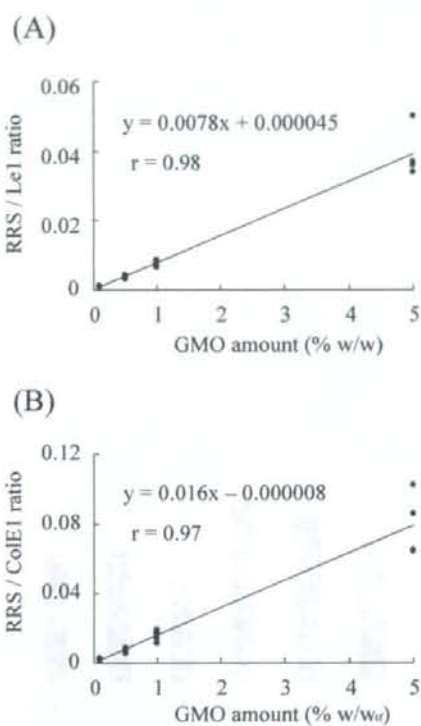


Figure 5. Correlations between GMO amounts (weight per weight (w/w) of GMO in mixtures of GMO and non-GMO or GMO weight per weight of total food (w/w_{TF})) and RRS/LeI ratio (A) or the RRS/CoIE1 (B) ratio. Lines represent least squares regression lines.

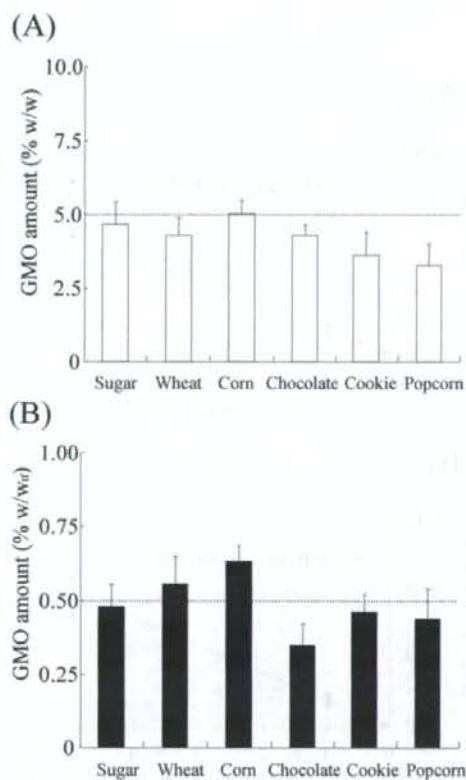


Figure 6. Comparison of GMO amounts (weight per weight (w/w) of GMO in mixtures of GMO and non-GMO or GMO weight per weight of total food (w/w_{TF})) between the calculations based on RRS/Le1 ratio (A) and RRS/ColE1 (B) ratio in food samples spiked with 5% w/w GM soybean powder consisting of GMO and non-GMO (0.5% w/w_{TF} GMO). Horizontal line represents expected GMO amount (w/w or w/w_{TF}) in the samples. Data are means \pm SD ($n = 4$).