

tuberosum, potato) とのマッチングを行い、IgE 結合タンパク質を同定した。表 3 に示した 4 種類のタンパク質が同定され、1 つはデータベースに収載されていないタンパク質であった。ほとんどの血清が反応した 42kDa タンパク質は Patatin precursor と同定された。Patatin はジャガイモの主要アレルゲンとされており、妥当な結果が得られた。また、既知アレルゲン Serine protease inhibitor (Sola t 4) は理論分子量 24kDa のタンパク質であるが、それよりも低分子側のスポットから同定された。21kDa タンパク質は IgE 結合が弱いものの多数の血清と反応しているが、得られた MS/MS からはタンパク質は同定されなかった。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

(実験1) 2回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、Vehicle群0.17、陰性対照としたPEP群0.17に対して、陽性対照としたOVA群は2.00であり、OVA群のスコアは上昇した。NG群とGM群のスコアもVehicle群に対して、若干の上昇を示したが、NG群とGM群のスコア平均は1.17および1.00であり、両群のスコアは同程度であった。本実験ではOVA群をはじめ、いずれの群間にも統計学的な差を認めなかった(図5)。血清中の抗原特異的IgG1抗体をELISAで調べたところ、NGおよびGM群とも5/6例のマウスに抗原特異的IgG1抗体が検出された(図6)。我々が開発したマウスの食物アレルギーモデルを用いて、遺伝子組換えジャガイモおよび非組換えジャガイモの食物アレルギー性を比較した。ジャガイモの抽出液の蛋白質濃度は0.5~1.0 mg/mLであり、抽出された蛋白質は週に4回の経口投与で一定の感作が得られるものの、食物アレルギー性は低かった。惹起によって引き起こされたアナフィラキシー症状の程度に差が認められないこと、抗原特異的IgG1抗体価検出の頻度および抗体価は同レベルであったことから、遺伝子組換えジャガイモおよび非組換えジャガイモの食物アレルギー性は同等であると考えられた。

(実験2) OVA/Sの条件で抗原を投与したマウスから経時的に採取した各リンパ組織中のCD4⁺細胞に占めるCD4⁺Foxp3⁺細胞の割合をSA/OVA/LLの結果とともに図7に示した。パイエル板と脾臓ではTreg細胞の増減に一定の傾向はなかった。腸管膜リンパ節では、投与3から12時間後に、無処置群に対してOVA/S群のTregが減少したことによって、無処置群に対して変化のなかったSA/OVA/LLとOVA/S群の間に有意な差が認められた。昨年までの実験において、食物アレルギーモデルの投与条件であるLLとSAは、感作の早い時期に蛋白質の特異性に依存せずに、免疫組織のリンパ球のポピュレーションを変

化させることによって、食物アレルギーの発症に関与していることが示唆された。このポピュレーションの変化をもたらす原因としてTreg細胞の誘導を調べたところ、食物アレルギーモデルではいずれの組織においてもTreg細胞の割合の増加は観察されなかった。そこで本年は、経口免疫寛容を誘導して食物アレルギーを発症しない投与条件である生理食塩液を媒体としてOVAを経口投与する(OVA/S)群でのTreg細胞の誘導を調べ、食物アレルギー群と比較検討した。その結果、予想に反してMLNにおいて、OVA/S群のTreg細胞は無処置群に対して有意に減少し、変化が認められなかった食物アレルギーモデルとの間に明らかな差異を認めた。また、食物アレルギー誘導時に抗CD3抗体を併用し、in vivoでTreg細胞を誘導した昨年度の実験においても、アナフィラキシー症状は有意に抑制された一方、その後のOVA特異抗体価測定ではSA/OVA/LL群(31698±3)とSA/OVA/LL+a-CD3群(36986±6)との間に差を認めなかった。これらの結果から、Treg細胞がアレルゲン反応性のT細胞を抑制しないことによって、免疫反応をアレルギーの方向へ直接コントロールしている可能性は低く、間接的あるいは代償的にTregを変化させる因子の中に、免疫反応を食物アレルギーへコントロールする何らかの要因があると考えられた。IL-21を産生する濾胞ヘルパーT細胞(T_H細胞)の増減も検討を加えてゆきたい。

(実験3) 2回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、SA/OVA/LL群2.20、FP/OVA/S群1.83、FP/OVA/LL群1.71、NS/OVA/S群2.17およびNS/OVA/LL群2.29であり、いずれの群も同程度のスコア平均を示した(図8)。図9に示したように、LL媒体のOVA群ではほぼ全例、生理食塩液媒体のOVA群では半数例の動物の血清中にOVA特異抗体価が検出された。食物アレルギー発症要因の一つであるSAの作用をサイクロオキシゲナーゼ(COX)阻害に着目して検討した。COXには恒常的にほとんどの細胞に発現しているCOX-1と炎症部位でサイトカインや増殖因子の刺激を受けて誘導されるCOX-2の2つのアイソザイムがある。SAのCOX選択性は低いことから、選択性の高いCOX-1阻害薬FPとCOX-2阻害薬NSを用いて、食物アレルギー発症へ及ぼすCOX阻害の影響を調べた。その結果、LL媒体でのOVA投与においてSA、FPおよびNS併用群はいずれも惹起によってアナフィラキシーを発症し、血清中のOVA特異抗体価が上昇した。COX-2阻害ではMLNのIL-4分泌細胞への分化促進とFoxp3⁺細胞への分化減少を伴ってCOX-2の抑制が経口免疫寛容を抑制するとの報告がある。しかし、食物アレルギーモデルではCOX-1の選択的阻害によっても食物アレルギーを発症し、SAによるCOX-2阻害では実験2で示したよう

に Foxp3+(Treg)細胞への分化減少は認められなかった。FP や NS の併用においても、生理食塩液より LL を媒体として抗原蛋白質を投与した時に抗体価が高くなる傾向が認められたように、食物アレルギー誘導における COX 阻害の作用は、単独あるいはその他の要因との相互影響の可能性を含め、さらに検討を要すると考えられた。

(3) アレルゲン予測の解析法

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討

(a) アレルゲンに特有な断片周辺の配列

アレルゲンタンパク質と非アレルゲンタンパク質については、かなりの数知られているので、そこからアレルゲンに特異的な配列を探索している。そこで3つのことを仮定して、データセットを準備した。(1) アレルゲンと IgE との結合部位は、複数の断片からなっている。(2) 断片のうちの少なくとも一つはアレルゲンに特有の断片である。(3) 結合に関与する断片は、何回も出現する。昨年度は以上のことを満たす断片(3~8残基)をアレルゲンのタンパク質から抽出することで、8696個の断片を得た。

各断片の中心の周り前後10残基のアミノ酸分布を見たところ、ウェーブレット様の分布を示した。中心にピークを持ちその両サイドに浅い谷を持った分布である。この分布を示すアミノ酸は、電荷を持つアミノ酸(D、E、K)と小さなアミノ酸(A、G)である。これに対して、それと反転した分布(中心に谷がありその両サイドに低いピークを示す分布)を示すアミノ酸もあり、芳香族のアミノ酸(F、W、Y、H)とイオウを含むアミノ酸(C、M)およびイミノ酸(P)がそのようなアミノ酸である。昨年度はそれを用いると、各アミノ酸配列に対して、アレルゲンらしさを特徴づけるプロット(AUFプロット)を作成した。

AUFインデックスが高い領域は、アラニンやグリシンなどの高分子に柔軟性を与えるアミノ酸と、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどの電荷を持った非常に親水性の高い残基が中心に分布し、周辺には芳香族のアミノ酸など大きく主鎖の自由度を制限するようなアミノ酸が分布していることを意味している。アレルゲンに特有な断片は、土台の上にふらふらした親水性のセグメントをつけたような形のところとなっている(図10)。

b. AUFピークと立体構造及びエピトープ位置の相関

結合部位がどのような性質を持っているかを、AUFプロット、疎水性プロットを組み合わせで解析してみると、AUFピークでも比較的親水性な部分がエピトープと一致していることが分か

った。AUFピークの位置を二次構造の分布と比較してみると、AUFピークはおおむね二次構造の端に位置していることが分かる。つまり、タンパク質の外側に向いている部位でエピトープに相当する部分がAUFプロットを利用することによって予測できる可能性を示唆した。

c. 断片配列周辺の解析

予測に繋げるには、より詳細な情報が必要となる。そこでデータとして、アレルゲンタンパク質、非アレルゲンタンパク質に特徴的な断片と両方に出現するデータの3種類のデータに分けて、AUFインデックスと同様の解析を行った。その結果、図11に示すようにそれぞれの断片周辺においてウェーブレット様分布を示すアミノ酸に違いが見られた。これらの特徴から3種類のインデックスを新たに定義し、それぞれの断片を特徴付けるためのALGプロット、NEGプロット、BOTHプロットを作成した。今後はAUFプロットにこれら3種類のプロットを加え、立体構造やエピトープ位置との関係をより詳細に解析する予定である。

(ii) アレルゲンデータベース(ADFS)の構築について

今年度の追加作業により、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1285本となった。また、エピトープ情報は11種のアレルゲン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たため(表4)、エピトープ既知のアレルゲンの数は91種となった。昨年同様、エピトープ情報を集積したアレルゲンデータベースとしては、現時点で世界最大の規模である。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析
(i) EGFP組換え・非組換えモデル鶏肉のタンパク質発現差異解析

まず実験過程で生じ得る誤差を確認するため、内部標準タンパク質をCy3およびCy5でそれぞれ標識し、同一ゲル内で泳動した。その際、95%のスポット($p < 0.05$)について発現の変動が無いと判断される2S.D.の値は1.26であった。したがって、本実験系では ± 1.26 倍以上の発現変化が認められた場合、2群間には実験誤差以上の発現差があると判断される。次に、遺伝子組換え(GM)、非組換え(Non-GM)ニワトリ各個体のCy5染色パターンについてDecyderソフトウェアにより1500スポットのマッチングを行い、GM/Non-GM蛍光比の平均値(av. Ratio)が2以上あるいは1/2以下となるものを抽出した。これらのスポットについてStudent's-t検定による有意差検定を行ったところ、3スポットがNon-GMとGM鶏肉における発現差が有意であった($p < 0.05$ 、図12、表5)。

Non-GM ニワトリに比べ、GM ニワトリで最も発現量が変動していたタンパク質 (spot 1071, 15.5 倍) について、CBB 染色しアクリルアミドゲルから相当するスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化したペプチド断片のMS/MS 解析を行った。その結果、spot 1071 は green fluorescence protein (GFP) であると同定された。今回用いた GM ニワトリが EGFP 遺伝子を発現させたものであることから、この結果は妥当であると考えられた。

今回用いた鶏肉サンプルには、発現量に個体差の大きなタンパク質も含まれていたが、2D-DIGE 法を用いることで、発現の個体差を考慮した 2 群間の発現差異解析を行うことができた。

(ii) 遺伝子組換え・非組換えジャガイモのタンパク質発現差異解析

実験過程で生じ得る誤差を確認するため、同一サンプルを Cy3 および Cy5 でそれぞれ標識し、同一ゲル内で泳動した。その際、95%のスポット ($p < 0.05$) について発現の変動が無いと判断される 2S.D.の値は 1.67 であった。したがって、本実験系では ± 1.67 倍以上の発現変化が認められた場合、2 群間には実験誤差以上の発現差があると判断された。

遺伝子組換え (GM: rd29A, 35S)、非組換え (NT) ジャガイモの代表的な Cy 染色像を図 6 に示した。Decyder ソフトウェアにより 700 スポットのマッチングを行い、GM/Non-GM 蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 以上あるいは 1/2 以下となるものを抽出した。NT 群に対するタンパク質発現差を Dunnett 法により検定したところ、rd29A 群では 46 スポットが、35S 群では 16 スポットが NT 群に比べ GM ジャガイモで発現量が変動していた ($p < 0.05$ 、図 13、表 6)。

さらに NT 群に比べ、GM ジャガイモで発現量が変動していたタンパク質スポットについて、アクリルアミドゲルから対応するスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化したペプチド断片の MS/MS 解析を行った。その結果、rd29A 群、35S 群ともに NT 群よりも発現が増加していたタンパク質スポットは、patatin precursor であった(表 6)。NT 群よりも発現が減少していたタンパク質は、lipooxygenase や enolase-like protein が同定された。また、いくつかのスポットはタンパク質量が少ないために同定されなかった。

Patatin はジャガイモの主要タンパク質であり、その発現量は塊茎の大きさや保存期間によっても左右されることが報告されている。今回用いたジャガイモの塊茎は、NT 群に比べて rd29A 群や 35S 群では小さい傾向にあったため、patatin の発現量の変動は必ずしも遺伝子組換えによるも

のであるとは限らない。今後、収穫時期や生育条件の変動による、NT 群での patatin 発現量の変動を調べるのが望ましいと思われる

E. 結論

(1) *AtDREBA* 導入組換えじゃがいもを用いたアレルギー性の検討

Western blotting および 2D-immunoblot 法によるアレルギーノーム解析の結果、遺伝子組換え (rd29A, 35S) ジャガイモは非組換え (NT) ジャガイモに比べて、アレルギーの種類・質・量の顕著な変化はみられなかった。

ジャガイモ中の IgE 結合タンパク質として、Patatin precursor, Serine protease inhibitor 2, Proteinase inhibitor 2 を同定した。

(2) 動物を用いるアレルギー性の検討

BALB/cマウスを用い、溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、組換えじゃがいもびに非組換えじゃがいも塊茎抽出物の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、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に両者で違いはみられなかった。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) ピークと立体構造及びエピトープ位置の相関をより詳細に検討する手法の検討を行った。

(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルギーデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の更新作業を行った。新たに11種のアレルギーのエピトープ情報を追加し、アレルギーデータセットの整備、検索に用いるアレルギーのMotifの更新を行った。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析

2D-DIGE 法を用いて EGFP 組換え鶏肉、DREB 組換えジャガイモのタンパク質発現差異解析を行った。EGFP 組換え鶏肉では EGFP の発現差異を検出することができた。DREB 組換えジャガイモでは、Patatin precursor をはじめ、いくつかの代謝系酵素の発現差異が検出された。

※参考文献

1) http://www.mhlw.go.jp/topics/idenshi/codex/code_x.html

- 2) Stadler, M.B. & Stadler, B.M., *FASEB J.*, 17: 1141-1143 (2003)
- 3) 堀内浩幸, 有澤謙二郎: ニワトリの万能細胞`ES細胞`とその遺伝子組換え, *化学と生物*, 48(4), 237-242 (2010)

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 手島玲子: 遺伝子組換え農作物のアレルゲン性評価, *食品安全ハンドブック*, 丸善, 東京(2010), p574-577
- 2) 手島玲子: 新開発食品の安全性 1. 遺伝子組換え食品とは, *食品中の化学物質と安全性*, 日本食品衛生協会, 東京(2009), p132-137
- 3) Nakamura R., Satoh R, Nakajima Y., Kawasaki N., Yamaguchi T., Sawada J., Nagoya H., Teshima R. Comparative Study of GH-Transgenic and Non-Transgenic Amago Salmon Allergenicity and Proteomic Analysis of Amago Salmon Allergens. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 55, 300-308 (2009)
- 4) Asakawa N, Sakiyama N, Teshima R, Mitaku S. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. *J. Biochem.*, 147, 127-133 (2010)
- 5) Kezuka Y., Itagaki T., Satoh R., Teshima R., Nonaka T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of major buckwheat allergen. *Acta Cryst. F*65, 1267-1270 (2009)
- 6) 中村亮介, 中村里香, 手島玲子: アレルゲンデータベース Allergen Database for Food Safety (ADFS) のデータ改訂とアレルゲン性予測ツールの信頼性評価, *国立医薬品食品衛生研究所報告*第127号, 44-49 (2009)
- 7) Nakamura, R., Uchida, Y., Higuchi, M., Teshima, R.: Development of a novel allergy test using a cultured mast cell line. *ImmunoTox Letter*, 14(2), 2-5 (2009)
- 8) Satoh R., Koyano S., Takagi K., Nakamura R., Teshima R.: Identification of an IgE-binding epitope of a major buckwheat allergen, BWp16, by spot assay and mimotope screening. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153, 133-140 (2010)
- 9) Nakajima O., Koyano S., Akiyama H., Sawada J., Teshima R.: Confirmation of a predicted lack of IgE binding to Cry3Bb1 from genetically modified (GM) crops. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 306-311 (2010)

- 10) Nakamura R, Nakamura R, Nakano M, Arisawa K, Ezaki R, Horiuchi H, Teshima R.: Allergenicity study of EGFP-transgenic chicken meat by serological and 2D-DIGE analysis. *Food Chem Toxicol.* 48, 1302-10. (2010)

11) 手島玲子, 中村亮介: 食品中のアレルゲンの予測, *日本食品衛生学会誌* (submitted)

2.学会発表

- 1) 朝川直行, 崎山則征, 手島玲子, 美宅成樹: タンパク質中のゆらぎの大きな領域を予測するための新規インデックス(AUF インデックス), 第47回生物物理学会年会 (2009.11)
- 2) Teshima R., Nakamura R., Satoh R., Nakamura R.: 2G-PAGE analysis of rice proteins from different cultivars, ILSI-HESI Protein Allergenicity Technical Committee (PATC) workshop: Evaluating Biological Variation in Non-transgenic Crops, (2009.11) Paris
- 3) 手島玲子: 先端技術を用いた作物・食品等の安全性評価と受容性, *BioJapan 2009 -World Business Forum-*「バイオによる食糧問題の革新」(2009.10) 横浜
- 4) 手島玲子: 遺伝子組換え食品の安全性評価の実際, 第53回日本薬学会関東支部大会(2009.10) 埼玉
- 5) 中村亮介, 内田好海, 樋口雅一, 中村里香, 手島玲子: 培養マスト細胞株の活性化に基づく新しい高感度アレルギー試験法の開発, 第82回日本生化学会 (2009.10)
- 6) 手島玲子: 遺伝子組換え植物研究の現状と課題, 日本植物学会第73回大会特別企画「遺伝子組換え食品の安全性評価」シンポジウム (2009.9) 山形
- 7) 手島玲子: 遺伝子組換え食品と安全性について, 千里ライフサイエンス市民公開講座 第56回「食の安全」(2010.2) 大阪
- 8) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 手島玲子: 2次元電気泳動法によるコメ異品種間のタンパク質発現差異解析, 日本薬学会第130年会 (2010.3)
- 9) 手島玲子, 食の安全性を考える, 日本薬学会第130年会市民講演会 (2010.3)
- 10) 佐藤里絵, 児矢野聡, 高木加代子, 中村里香, 手島玲子: ソバ主要アレルゲンBWp16のIgEエピトープの同定, 日本薬学会第130年会 (2010.3)
- 11) 中村亮介, 樋口雅一, 内田好海, 中村里香, 手島玲子: EXiLE法—培養細胞を用いた新規アレルギー試験法の開発—, 日本薬学会第130年会 (2010.3)

12) 中村亮介, 内田好海, 樋口雅一, 手島玲子: 培養細胞を用いた新しいアレルギー検査法の開発, 第16回日本免疫毒性学会学術大会(2009.8)

13) 香取輝美, 新藤智子, 金澤由基子, 大沢基保, 小島幸一, 手島玲子: 食物アレルギー性の *in vitro* 評価系の開発, 第16回日本免疫毒性学会学術大会(2009.8)

14) 中村里香, 中村亮介, 堀内浩幸, 手島玲子: 遺伝子組換え動物食品のアレルギー性評価法の検討, 第16回日本免疫毒性学会学術大会(2009.8)

15) 新藤智子, 香取輝美, 金澤由基子, 大沢基保, 小島幸一, 手島玲子: 経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(7), 第16回日本免疫毒性学会学術大会(2009.8)

16) 手島玲子: アレルギー研究の最前線, 日本食品化学学会第15回総会学術大会(2009.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

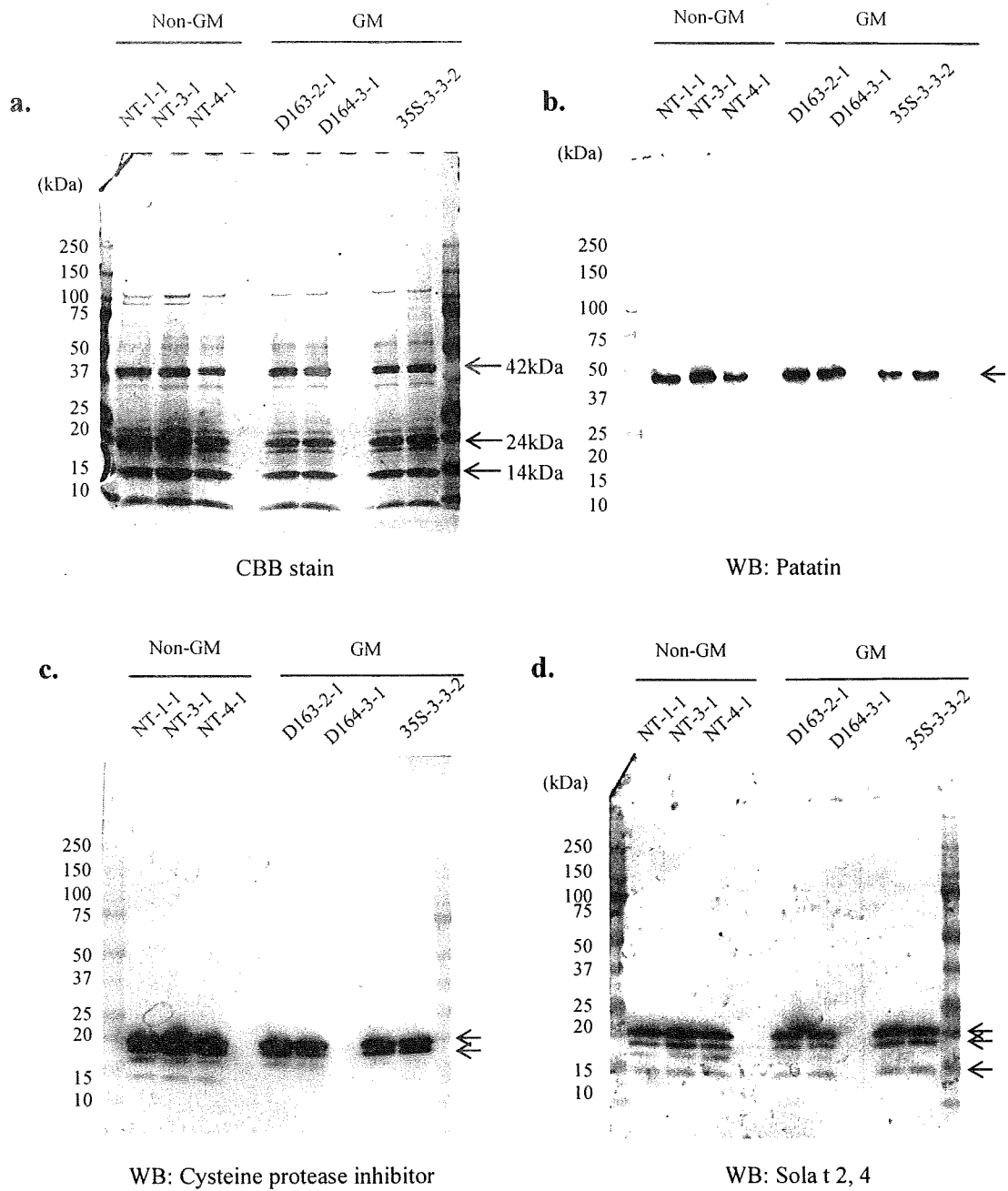


図1 アレルゲン特異的抗体によるnon-GM, GMジャガイモ中のアレルゲン定量

ジャガイモ既知アレルゲンの特異的抗体を作製し、Western blot法によりnon-GM, GMジャガイモ中の各アレルゲン量を定量した。

a. ジャガイモ抽出タンパク質CBB染色パターン

b. WB: Patatin (Sola t 1) 抗体

c. WB: Cysterin protease inhibitor (Sola t 3) 抗体

d. WB: Cathepsin D inhibitor (Sola t 2), Serine protease inhibitor (Sola t 4) 抗体

Allergen Name	Protein Name	Molecular Weight	pI	Peptide sequence
Sola t 1 (Major)	Patatin	42kDa	5.34	CAKLLSDRKKLRANKASH
Sola t 2	Cathepsin D inhibitor	20kDa	7.79	ALGGDVYLGKSPNSDAPC
Sola t 4	Serine protease inhibitor	24kDa	7.5	
Sola t 3	Cysteine protease inhibitor	25kDa	6.41	LVLPEVYDQDGNPLRIGC

表1 既知ジャガイモアレルゲンおよび抗体作製に使用したペプチド配列

Subject No.	specific IgE to potato (UA/ml)	Immuno-CAP class	Specific IgE to major allergens (CAP class)
1	61	5	卵白84.3 (5)、大豆37.6 (4)、セラチン<0.34 (0)、牛乳1.16 (2)
2	16.9	3	トマト10.7(3)、ゴマ12.8 (3)、ダイズ9.17 (3)
3	100	6	卵白>100 (6)、コムギ>100 (6)、エビ69.5 (5)、ホウレンソウ19.4 (4)
4	-	4	OVM 39.1 (4)、ダニ1 (5)、イヌフケ (2)、卵白 (6)、小麦 (5)、ゴマ (4)、リンゴ (3) etc.
5	5.7	3	ダニ1.2 (2)/動物上皮0.4 (1)/ゴマ6.4 (3)/グリーンピース4.8 (3)/ピーナツ5.9 (3)/大豆5.5 (3) etc.
6	8.5	3	ダニ0.5 (1)/ゴマ8.5 (3)/グリーンピース3 (2)/ピーナツ5.9 (3)/大豆4.6 (3)/シロママ4.6 (3) etc.
7	16.4	3	ダニ3.1 (2)/ゴマ16.4 (3)/グリーンピース12.5 (3)/ピーナツ15.6 (3)/大豆14.9 (3)/シロママ16.2 (3) etc.
8	61	5	卵白1.5 (2)/ゴマ11.8 (3)/グリーンピース6.9 (3)/ピーナツ12.2 (3)/大豆10.2 (3)/シロママ11.9 (3)/etc.
9	7.86	3	ヤケヒョウダニ 23.3 (4)、ネコ上皮 3.21 (2)、馬毛 1.01 (2)、犬毛0.86 (2)、大豆 6 (3) etc.
10	8.55	3	大豆 8.69 (3)、ニンジン 9.72 (3)、コメ 11.3 (3)、ミツバチ 11.1 (3)、ラテックス 10.4 (3) etc.
11	16.7	3	ゴマ 20.8 (4)、ピーナツ 22 (4)、大豆 16.4 (3)、ニンジン 18.8 (4)、イチゴ17.6 (4)、etc.
12	3.52	3	ヤケヒョウダニ 2 (2)、ネコ上皮 1.44 (2)、犬毛 1.67 (2)、卵白 0.1 (0)、ゴマ 3.7 (3)、etc.
13	4.54	3	卵白 18.1 (4)、ゴマ 16.9 (3)、ソバ 16.1 (3)、エンドウ 23.1 (4)、ピーナツ 15 (3)、大豆 68.5 (5)、etc.
14	11.8	3	ピーナツ 15.7 (3)、大豆 7.80 (3)、ニンジン 10.9 (3)、コムギ 12.9 (3)、ニンニク 13.6 (3)、トウモロコシ 7.14 (3)、ラテックス 8.14 (3) etc.

表2 評価に使用したジャガイモ特異的IgE陽性血清情報

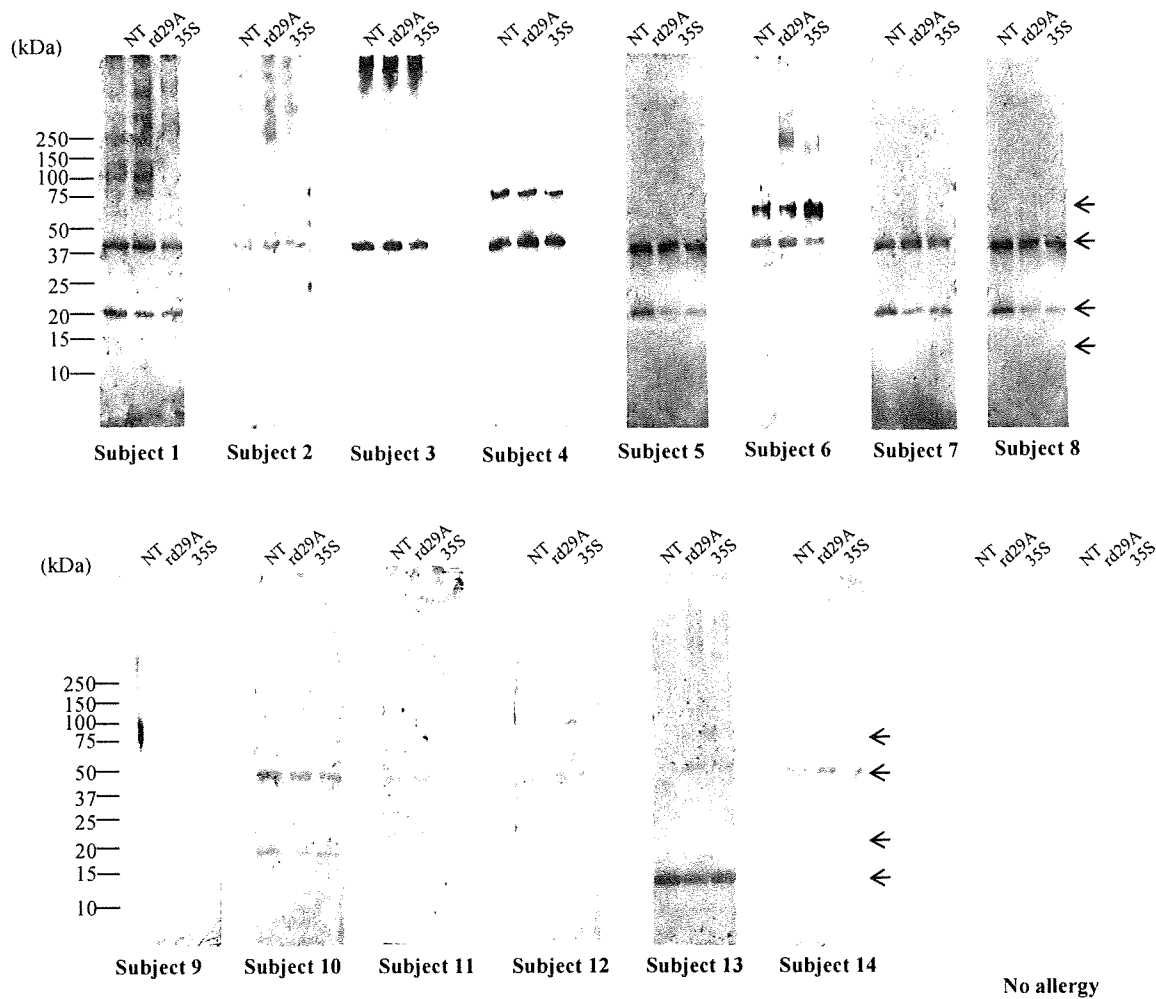


図2 ジャガイモ特異的IgE陽性血清を用いた1D-immunoblotによるnon-GM, GMジャガイモ中のIgE結合タンパク質検出

ジャガイモ特異的IgEをもつ血清を用いて、1D-immunoblotにより遺伝子組換え・非組換えジャガイモタンパク質中のIgE結合タンパク質を検出した。

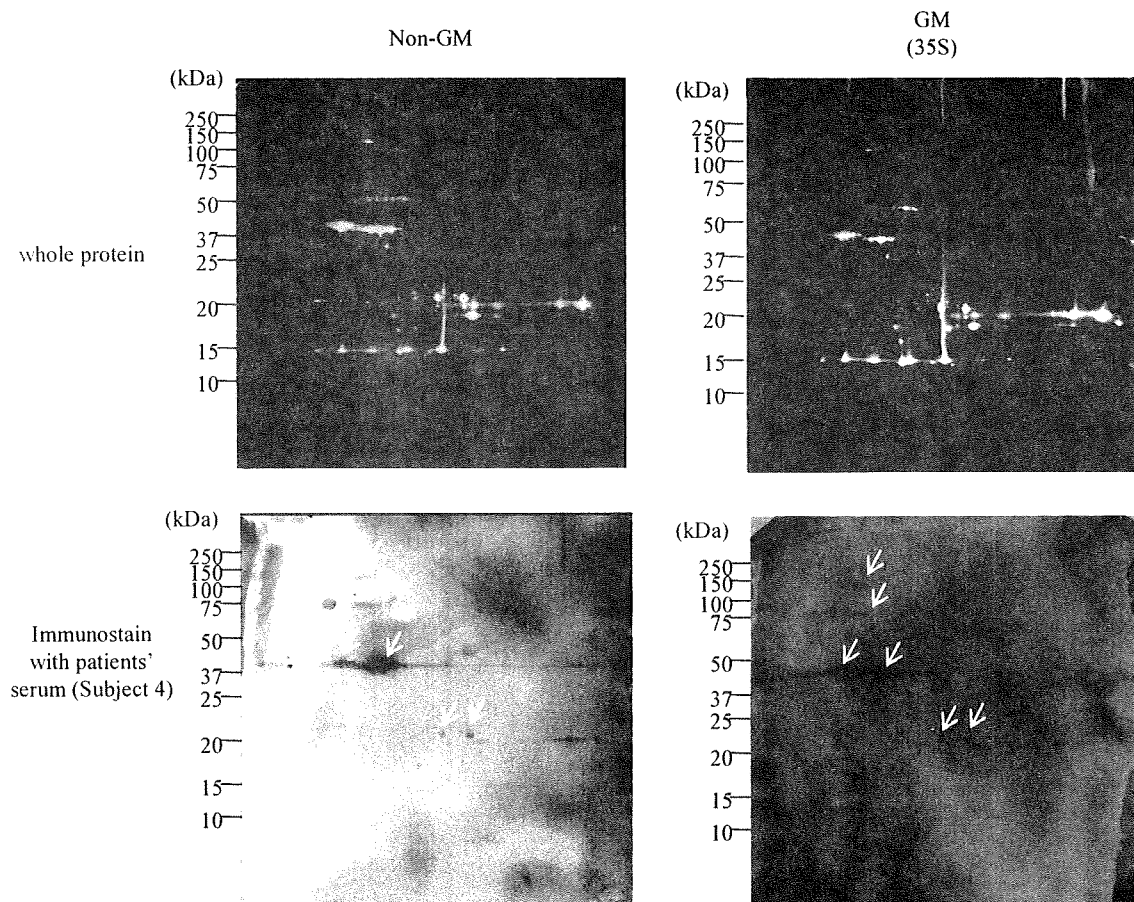


図3 2D-immunoblot によるnon-GM, GMジャガイモ中のアレルゲンの質的変化検討

Subject 4の血清を用いて、2次元電気泳動により分離したジャガイモアレルゲンの質的変化を検討した。
 全ジャガイモ可溶性タンパク質はCy5を用いて染色した (a, b)。続いて血清とインキュベートし、第2抗体にHRP標識抗ヒトIgE抗体を用いて、IgE結合タンパク質をECL plusで検出した (c,d)。

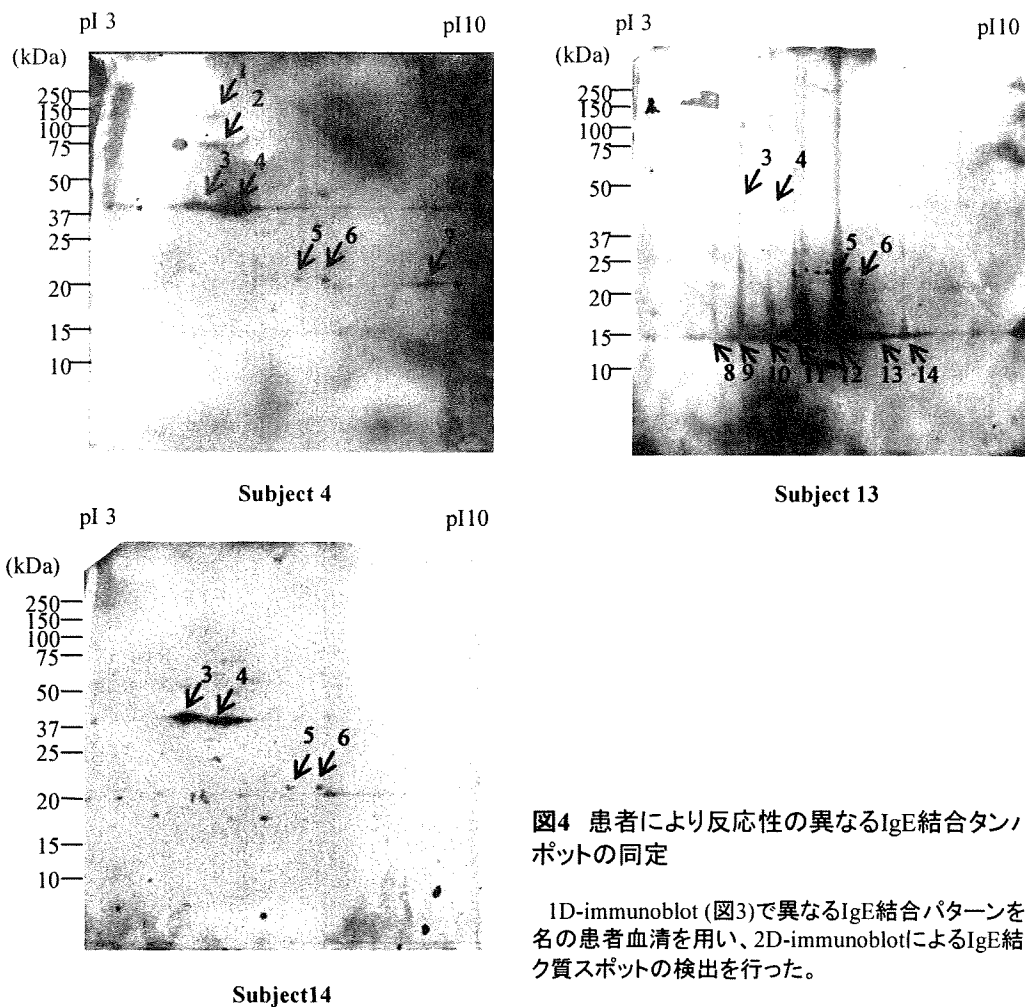


図4 患者により反応性の異なるIgE結合タンパク質スポットの同定

1D-immunoblot (図3)で異なるIgE結合パターンを示した3名の患者血清を用い、2D-immunoblotによるIgE結合タンパク質スポットの検出を行った。

Spot No.	Protein Hits	gi	MW (kDa)/ pI	Mouse score	Sequence coverage	Matched peptides
3	patatin precursor [Solanum tuberosum]	73426683	41.224/ 4.9	580	25%	7
4	patatin precursor [Solanum tuberosum]	73426671	42.559/ 5.49	683	35%	9
5, 6	not matched					
7-13	[Segment 1 of 2] Serine protease inhibitor 2 (PSPI-21) (PSPI-21-5.2)	21362951	16.252/ 4.93	207	42%	4
14	proteinase inhibitor II (Solanum tuberosum)	21522	17.561/ 6.77	134	14%	2

表3 MALDI-TOF MS/MSによるジャガイモアレルギースポット同定結果

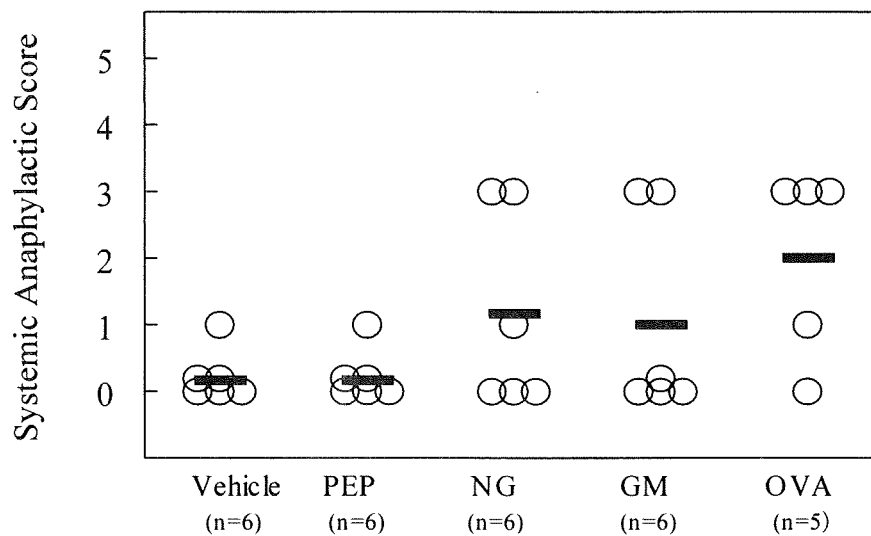


Figure 5 Antigen-induced systemic anaphylactic scores at the 2nd challenge

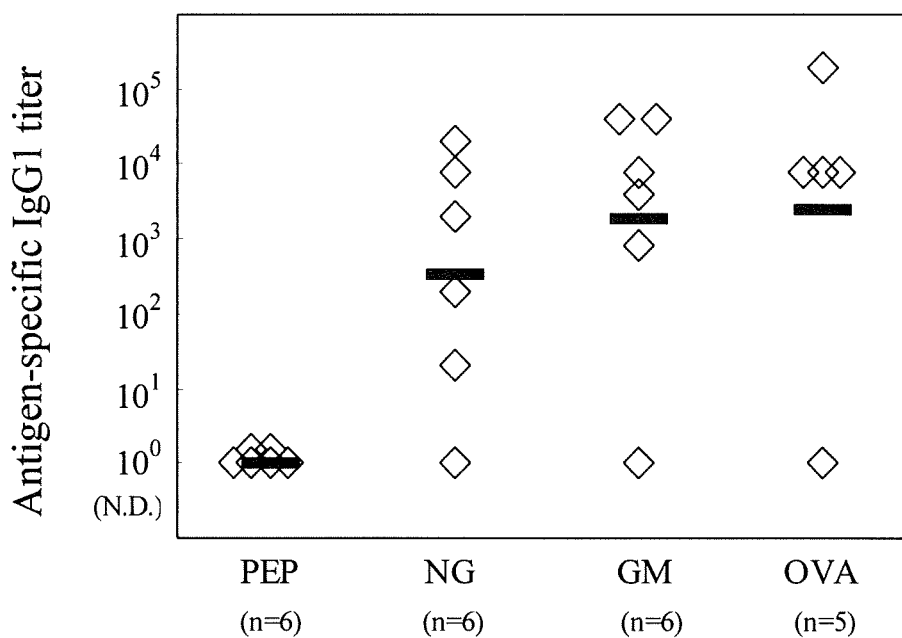


Figure 6 A comparison of the serum level of Antigen-specific IgG1 Antibody

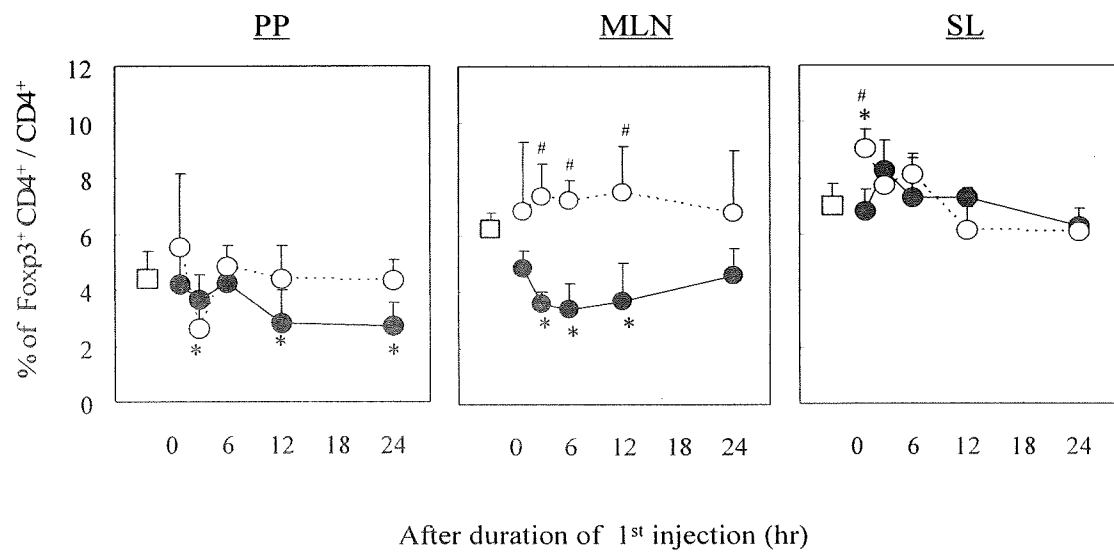


Figure 7 Variation of Treg population after primary allergen stimulation
 □ Naive, ● OVA/S, ○ SA/OVA/LL
 *p<0.05 vs Naive
 #p<0.05 vs SA/OVA/LL

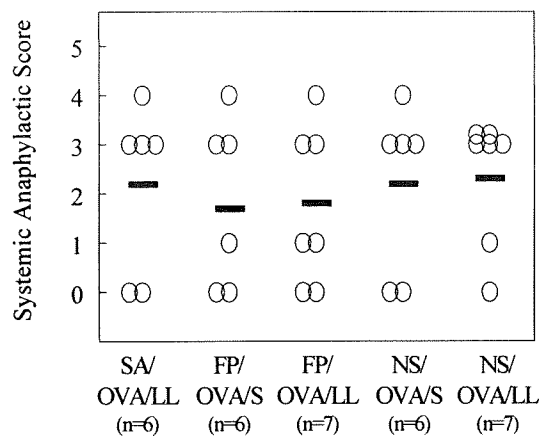


Figure 8 OVA-induced systemic anaphylactic scores at the 2nd challenge

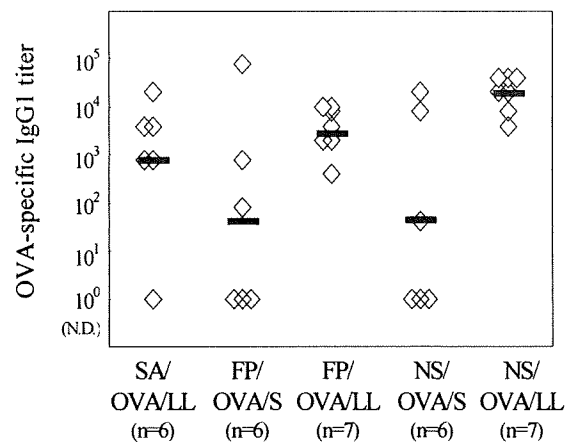


Figure 9 A comparison of the serum level of OVA-specific IgG1 antibody

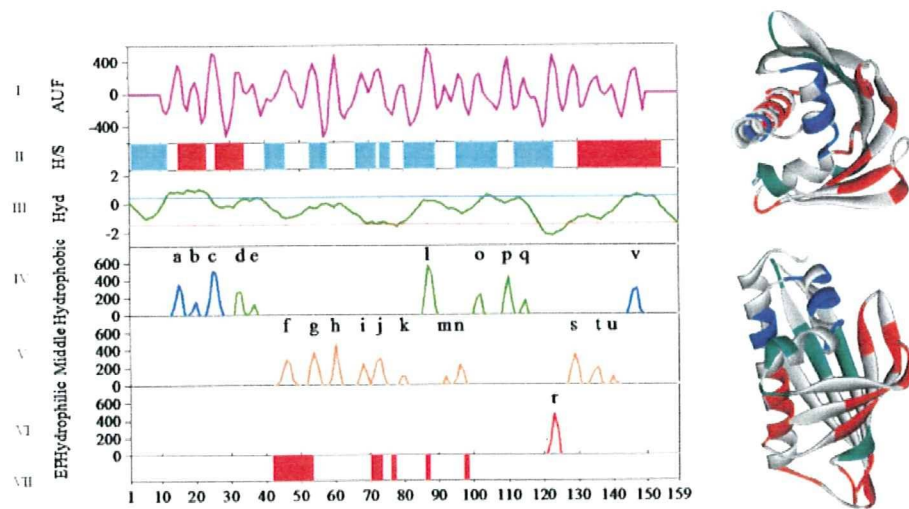


図 10. アレルゲン Bet v1 に関する AUF プロットによる解析。AUF ピークを疎水性によって分類してみると、比較的親水的な AUF ピークがエпитープとよく一致していた。(Asakawa *et al.*, 2010)

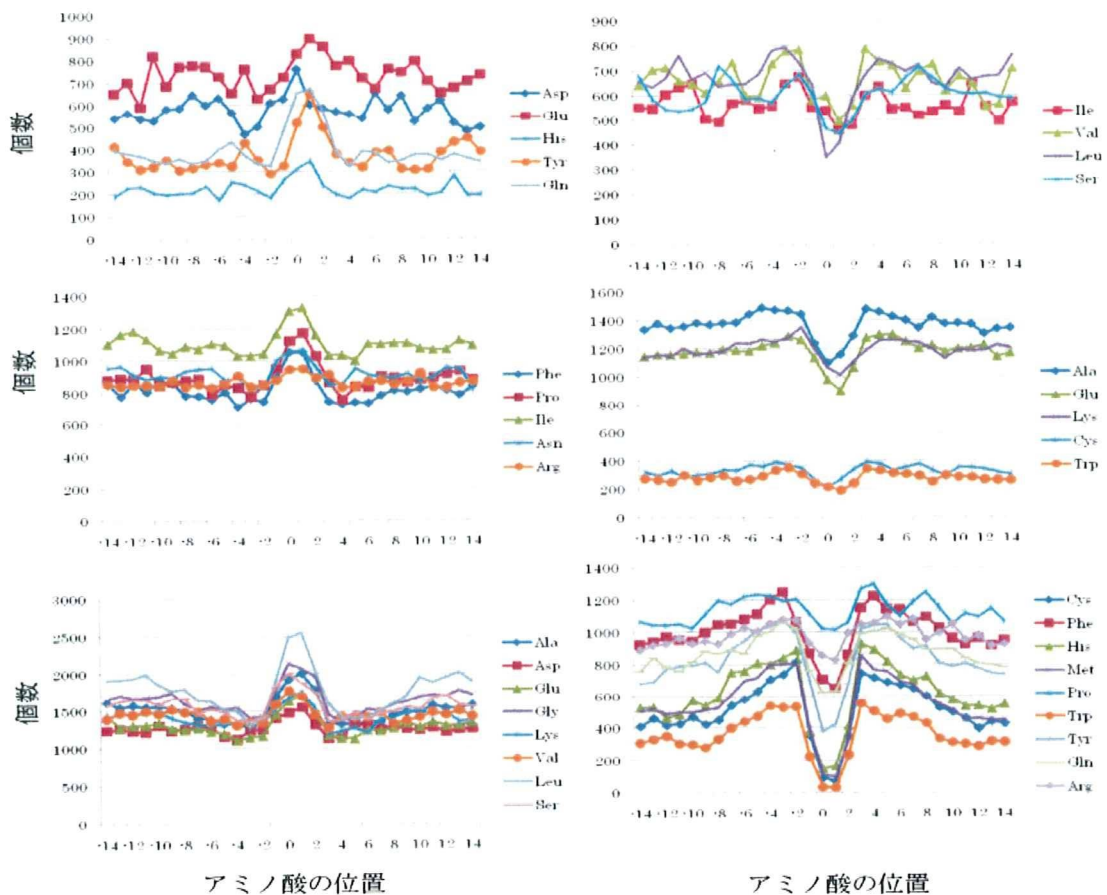


図 11. アレルゲン断片(a), 非アレルゲン断片(b), 両方に見られる断片(c)周辺のアミノ酸分布。それぞれの断片でウェーブレット様の分布を示すアミノ酸の種類が異なる。

表 4 平成 21 年度 ADFS に追加したエピトープ情報

Epitope N	Type	start	end	Sequence	Description	Method	CTYPE	Allergen Name	Reference (PMID)	UniProt acc.No
001	1 IgE	30	49	HTEPDDHHEKPTTGCTHEET		Overlapping peptide, Inhibition ELISA	L	Blo t 12.0101	19226278	Q17282
001	2 IgE	73	92	TEETHSDDLIVHEGGKTYH		Overlapping peptide	L	Blo t 12.0101	19226278	Q17282
001	3 IgE	111	130	IICSKSGSLWYITVMPCSIG		Overlapping peptide, Inhibition ELISA	L	Blo t 12.0101	19226278	Q17282
002	1 IgE					Inhibition of IgE binding with recombinant antibody	C	Hev b 6.02	18930549	gi: 73535415
003	1 IgE				Multiple IgE-binding epitope regions were found to be distributed over the whole molecule	ELISA using protein fragments	C	Bla g 4	19290089	A9XFV8
004	1 IgE				Cross-reactive to human MnSOD	Point-mutated recombinant allergen	C	Mala s 11	18922581	Q873M4
005	1 IgE	244	298	RSNGSGMSDVVKGEYAAE SHLEQVSIKKKGRKFGST ANMSLGGGKSPILD	Cla h 9 is minor allergen with a prevalence of IgE-reactivity of 15.5%	peptide-IgE binding on the membrane	L	Cla h 9	19162325	AY78775
006	1 IgE				epitope sequences exist on defensin (N-term) domain	ELISA	C	Art v 1	19054564	Q84ZX5
007	1 IgE	16	35	LNENLLRFFVAPFVEVFGKE		peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s1)	18774394	P02662
007	2 IgE	28	50	FPEVFGKEKVNELSKDIGEST E	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s1)	18774394	P02662
007	3 IgE	73	92	PNSVEQKHQKEDVPSERYL		peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s1)	18774394	P02662
008	1 IgE	1	20	KNTMEHVSSEESIISQETY	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
008	2 IgE	13	32	SIISQETYKQEKNAINPSK	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
008	3 IgE	67	82	EEVKITVDDKHQKAL	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
008	4 IgE	106	125	LNPWDQVQRNAVPTPLNRE		peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
008	5 IgE	122	141	TLNREQLSTSEENSKFTVDM		peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
008	6 IgE	157	182	EKNRNLFLKISQRYQKALPQ YLKT		peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
008	7 IgE	181	207	KTVYQHQAAMKPWQPKTKVI PYVRYL	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (alpha-s2)	18774394	P02663
009	1 IgE	25	50	RINKKIEKQSEEQQTEDELQ DKIH	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (beta)	18774394	P02666
009	2 IgE	52	74	FAQTQSLVYFPGPINSLPQ NI	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (beta)	18774394	P02666
009	3 IgE	121	140	ESQSLTLTDVENLHPLPLL		peptide array	L	Bos d 8 (beta)	18774394	P02666
009	4 IgE	154	173	TVMFPPQSVLSLSQSKVLPV	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (beta)	18774394	P02666
010	1 IgE	58	77	LQWENDECAQKKIAEATK	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 5	18774394	P02754
010	2 IgE	76	95	TKIPAVFKIDALNENKVLVL		peptide array	L	Bos d 5	18774394	P02754
010	3 IgE	121	140	GLVRTPEVDDEALEKFDKAL		peptide array	L	Bos d 5	18774394	P02754
011	1 IgE	16	35	RFFSDKIAYIPIQUVLSRY		peptide array	L	Bos d 8 (kappa)	18774394	P02668
011	2 IgE	34	53	RYPSYGLNYYQKPVALLINN	associated to the reactive patients' group	peptide array	L	Bos d 8 (kappa)	18774394	P02668

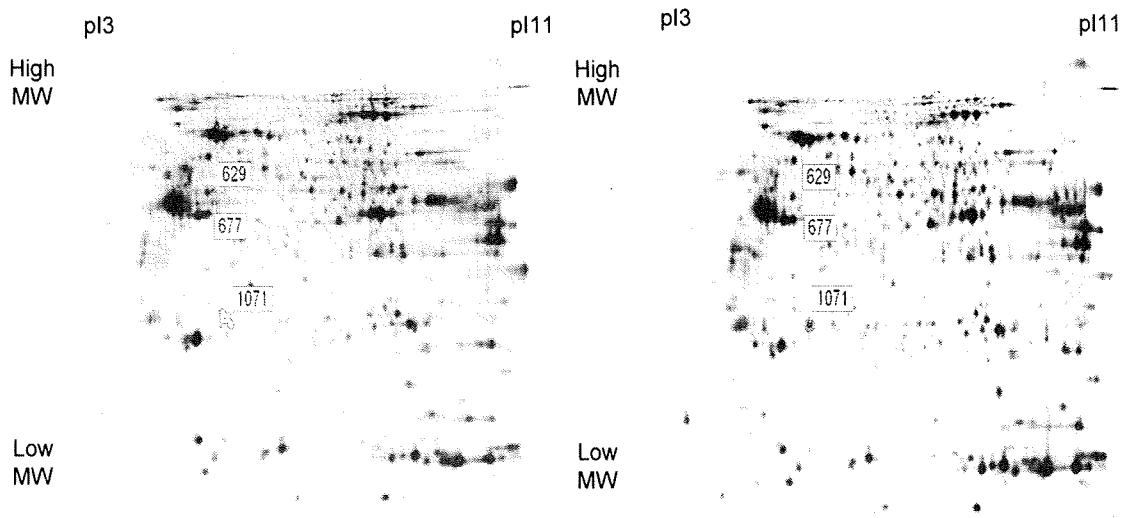


図12 2D-DIGE法によるnon-GM, GM鶏肉中のタンパク質発現差異解析

Non-GMおよびGMジャガイモタンパク質を二次元分離し、各スポットの蛍光強度を内部標準サンプルの蛍光強度で補正し、統計解析に用いた。Non-GMの発現量に比べ、GMの発現量が2倍以上あるいは1/2以下であったスポットについて、Student's t-testにより有意差を検定した。

Spot No.	GM/ Non-GM
1071	15.5
677	1/2.2
629	1/2.7

表5 Non-GM, GM鶏肉間で発現差異のみられたスポット

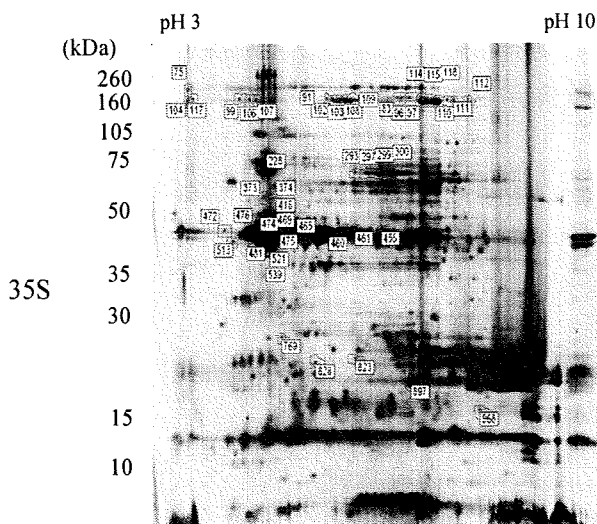
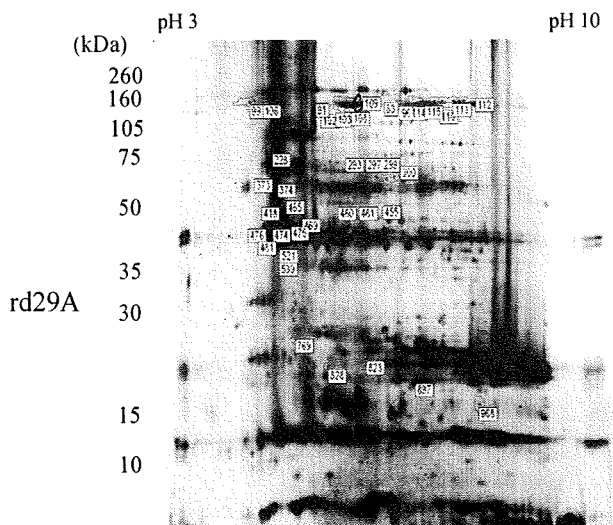
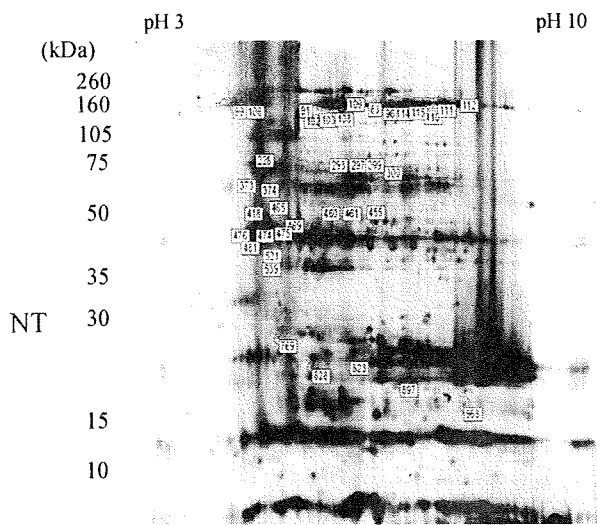


図13 2D-DIGE泳動イメージ

各群のジャガイモタンパク質泳動パターンを示した。Dunnnett解析により、NT群での発現量に対して有意差 ($p < 0.05$) を示したタンパク質スポットにスポット番号を付した。

	Master No.	Appearance	Average Ratio	p-value	Protein hits	gi:	Theoretical MW (kDa)/pI	Mowse score	sequence coverage	matched peptides
Up-regulated	418	63 /69	2.04	6.60E-06	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426683	41.224/ 4.90	431	38%	10
	455	51 /69	2.04	2.90E-07	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426671	42.559/ 5.49	197	12%	5
	465	60 /69	2.19	2.40E-08	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426683	41.224/ 4.90	376	29%	8
	469	63 /69	2.57	2.10E-08	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426671	42.559/ 5.49	161	10%	3
	472	42 /69	2.08	0.00068	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426671	42.559/ 5.49	274	27%	7
	475	69 /69	2.54	5.30E-09	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426683	41.224/ 4.90	493	38%	10
	476	66 /69	2.36	3.70E-08	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426683	41.224/ 4.90	501	38%	10
	513	45 /69	2.23	0.00049	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426683	41.224/ 4.90	440	38%	10
539	48 /69	2.14	1.60E-06	patatin precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	73426683	41.224/ 4.90	461	38%	10	
Down-regulated	102	45 /69	-2.53	2.60E-07	lipoxygenase [<i>Solanum tuberosum</i>]	486619	97.078/ 5.43	129	10%	7
	109	57 /69	-2.55	2.80E-12	lipoxygenase [<i>Solanum tuberosum</i>]	486619	97.078/ 5.45	243	10%	7
	297	63 /69	-4.09	7.70E-15	enolase-like [<i>Solanum tuberosum</i>]	82623425	48.515/ 7.53	140	9%	3
	299	60 /69	-3.48	6.50E-11	aspartic proteinase inhibitor [<i>Solanum tuberosum</i>]	21413	24.124/ 7.51	132	20%	3
	300	54 /69	-2.73	1.20E-08	aspartic proteinase inhibitor [<i>Solanum tuberosum</i>]	21413	24.124/ 7.51	36	12%	2

表6 2D-DIGEで有意差を示したタンパク質スポットの同定結果

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 21 年度）

組換え植物の検知技術の開発に関する研究

研究分担者 穂山 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. GM トマトの検知法開発に関する研究：内在性遺伝子をターゲットとした、プライマーアッセイ法により、最も短い 92bp のプライマーペアは、すべてトマト加工食品でも検出できることが明らかとなった。よって、100bp 以下の遺伝子をターゲットとした PCR を用いた方法で検出可能であることが示唆された。**2. GM 亜麻の検知法の確立に関する検討**：変異型 ALS 遺伝子部位を特異的に検知するリアルタイム PCR を用いた高感度かつ特異的な GM 亜麻検知法を開発した。国内のカナダ産輸入亜麻市販製品を調べた結果、6 検体中 1 検体から CDC Triffid とと思われる増幅が検出され、増幅産物のダイレクトシーケンシングにより、CDC Triffid の挿入配列と一致したことから、CDC Triffid と同定した。**3. GM 魚の検出法の確立と調査**：AquaBounty Technologies 社が販売しようとしている GM 魚に組み込まれる可能性のある OPAFPcsGH プラスミドの北太平洋サーモン成長因子 cDNA の exon-intron junction 配列を標的にして real-time PCR 用のプライマー・プローブを設計した。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、プライマーを設計をして定性 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。**5 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発**：ゲノム DNA のメチル化は、塩基配列の変化を伴わない遺伝情報の生体内制御システムとして機能する。一方、休眠状態にある種子のゲノム情報は一定の環境下では不変的に保たれていることが予想されるが、現在のところその実態に関する情報は皆無である。本研究では、まず発芽前の種籾を取り上げ、プロモーター領域を中心にメチル化パターンの解析を試みる。種子ゲノム DNA のメチル化のような後天的修飾のダイナミズムに関する基礎的な知見を収集し、そのパターンを応用した新規な染色体上の組換え遺伝子を検出する識別検知法を開発する。

研究協力者

橘田和美、古井聡、真野潤一、小口太一

（独立行政法人農研機構 食品総合研究所）

大森清美（神奈川県衛生研究所）

中島安基江（広島県保健環境センター）

笠原正輝、児玉貴志

（独）農林水産省消費技術センター）

吉松嘉代、河野徳昭（（独）医薬基盤研究所）

小関良宏、佐々木伸大（東京農工大学）

名古屋博之（（独）水産総合研究センター）

A. 研究目的

現在、第三世代を含めた遺伝子組換え（GM）食品の多様化が進んでいる。加工品に未承認 GM 食品の混入は未然に防ぐことが求められている。そこ

で本研究では、第三世代を含めた種々を流通阻止を監視するシステムの確立と、それらの検知技術の高度化及び新規検知技術の導入を検討した。

B. 研究方法

1. GM トマトの検知法開発に関する研究

現在報告されている GM トマト調査として、P35S、NOSter、CMV-cp、EFE、を検出するプライマー・プローブを作成しリアルタイム PCR を行った。トマト加工食品の DNA の状態を調べるため、JAS 規格を基に、トマト加工食品 8 種類を都内のスーパーで購入し、DNA 抽出を行った。増幅産物が、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、となるように 6 種類のプライマーペアを作成し、トマト (*Lycopersicon esculentum*) に特異的な内在性遺伝子 (LAT 52 gene (Gen Bank: X15855.1)) をターゲットとしたマルチプライマーアッセイを行った。PCR と電気泳動で DNA の状態を調べた。

2. GM 亜麻の検知法の確立に関する検討

CDC Triffid の種子は、Canadian Food Inspection Agency (CFIA) から提供されたものを用いた。カナダ産輸入亜麻の健康食品試料は日本国内でインターネットを通じて市販されているものを購入して用いた。亜麻穀粒を均質に粉碎した試料 500 mg から入手可能な DNA 精製キットを使用して DNA 抽出精製を行った。GM 亜麻の検出には、EU の Joint Research Center (JRC) で既に公表されている Real-time PCR 法 (JRC 法) を用い、25・L/well 反応液として調整した。陽性確認用プライマー・プローブには、シロイヌナズナの ALS 遺伝子の変異導入部位を標的に設計を行ったものを使用した。反応液の組成は以下の通りである。TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 0.25 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ \cdot L DNA 試料液 2.5 μ L を添加した。使用したプライマー・プローブの配列はそれぞれ以下の通りである。内在性遺伝子 SAD 検出用には、
SAD F: GCTCAACCCAGTCACCACT
SAD R: TGCGAGGAGATCTGGAGGAG
SADP: FAM-TGTTGAGGGAGCGTGTGAGGGA-BHQ1
NOST-Spec 構造配列遺伝子検出用には、
NOST-SpecF: AGCGCGCAAAGTACTAGGATAAA
NOST-SpecR:
ACCTTCCGGCTCGATGTCTA
NOST-SpecP:
FAM-CGCGCGCGGTGTCATCTATG-BHQ1
シロイヌナズナ ALS 遺伝子配列検出用には、
AtALSc870t MGB F:

TGCGTTGTTAGATAGTGTTCCTCTTG

AtALSc870t MGB R:

CGCATCTGTACCAATCATAACGAC

AtALSc870t MGB:

FAM-CAGGACAAGTCTCTC-MGB

を使用した。ホットスタート法で 50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、反応を開始した。その後、95°C 30 秒、60°C 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

3. GM 魚の検出法の確立と調査

①試料 サケ近縁種の魚種について、アマゴ (スズキ目・カワスズメ科)、マダイ、サバ及びメダイ (スズキ目・タイ科) の生魚を買い上げた。サケ (サケ目・サケ科) は、5 種類 (白鮭、銀鮭、紅鮭、アトランティックサーモン、トラウトサーモン) の生魚を購入し、試料とした。国内で購入可能なサケ加工品として、サケフレーク、サケ水煮缶、サケパテー、サケお粥 (フリーズドライ品)、スモークサーモン、サーモンジャーキーを用いて試験試料とした。

②DNA 抽出精製 QIAGEN G-tip 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。

陽性コントロール用プラスミドの構築: Chinook salmon の肝臓を摘出し、0.5 mL Trizol 溶液 (インビトロジェン社 (株)) に採取し、ホモジナイズした。付属説明書通りにトータル RNA の精製を行い、High-Capacity cDNA Archive Kit (ABI 社) を用いて、付属説明書通りに cDNA ライブラリーの作成を行った。次いで、得られた cDNA を鋳型にして、成長ホルモンプライマー対 (GH-C and D) [8] を用いて PCR を行った。

プライマー配列は以下の通りである。

GH-C:

5' -tctgctgatgccagtcttact-3'

GH-D:

5' -acagaagtccagcaggaatat-3'

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。得られた増幅産物は、pGEM-Teasy ベクター (プロメガ社) を用いて TA クローニングを行い、得られたベクターを陽性コントロールプラスミドとした。

③リアルタイム PCR: 陽性確認用プライマー・プローブには、GH-C と GH-D プライマーで増幅した

産物の exon-intron junction 配列を標的に設計を行ったものを使用した。配列は以下の通りである。

Sequence-95F プライマー:

5'-acatctccacctattggctcaga-3'

Sequence-192R プライマー:

5'-agtccagcaggaatatcttggctcag-3'

Sequence-124T プローブ:

5'-FAM-tcaatgactttgacgggtaccctgttg-TAMRA-3'

内在性遺伝子陽性コントロールとして、大西洋サーモン 18S rRNA (GenBank:AJ427629.1) 配列を基にプライマー・プローブを設計した[9]。配列は以下の通りである。

18S F:5'-tgtgccgctagaggtgaaatt-3'

18S R:5'-gcaaattgctttcgctttcg-3'

18S probe:

5'-FAM-ttggaccggcgcaagacgg-TAMRA-3'

リアルタイム PCR の反応液の組成は以下の通りである。TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 0.25 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ \cdot L DNA 試料液 2.5 μ L を添加した。ホットスタート法で 50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、反応を開始した。その後、95°C 30 秒、60°C 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

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

既に Bt 米混入と判定されたモチ米、及び、ビーフン検体を用いて、トリプシンインヒビター発現カセットの解析を行った (Fig. 1.2)。組換えカセット内のプロモーター・ターミネーター・その他の遺伝子のうち一部のみが確認できていたが、それに隣接する近傍の情報が得られなかったため、これに対する解決策として、既知配列から未知配列を導く方法 (未知ゲノムクローニング・Inverse PCR) を用いて未知配列の解析を行った。今回、ゲノミック DNA の既知の配列から、未知の領域をクローニングする方法として、制限酵素処理をした後にアダプターを結合させ、既知配列とアダプターにプライマーを設定して PCR を行う方法を用いた。

① 制限酵素処理

制限酵素 (BamH I, Bgl II, Bcl I, Spe I, Nhe I, Xba I, Avr II) を用いて切断した。DNA は 200-500 ng、10 \times 制限酵素バッファーを 1 μ L、制限酵素は 10U、DW で 10 μ L に調製した。

② 1 塩基伸長

それぞれに、klenow enzyme (3' \rightarrow 5' exo-) 5U を 1 μ L 加え、BamH I, Bgl II, Bcl I 処理したサ

ンプルについては dGTP (1mM) を 1 μ L 加えた。Spe I, Nhe I, Xba I, Avr II については dCTP (1mM) を 1 μ L 用いて切断面を 1 塩基伸長させた。25°C 15 分間で反応後に、75°C 20 分間処理により klenow enzyme を失活させた。

③ アダプターの結合

Ligation high (TOYOBO) を 14 μ L 加え、BamH I, Bgl II, Bcl I 処理したサンプルについては RWA-1 を 2 μ L、Spe I, Nhe I, Xba I, Avr II については RWA-2 を 2 μ L 使用した。16°C で一昼夜反応させた。

④ 1 回目 PCR

ライゲーションを終えた液に 76 μ L の滅菌水を加え、それを 1 回目 PCR 用の鋳型 DNA とした。希釈済み鋳型の DNA を 1 μ L、KOD-Plus- (1U/ μ L) を 1 μ L、10XPCR Buffer を 5 μ L、2mM dNTPs を 5 μ L、25mM MgSO₄ を 2 μ L、WP-1 を 1 μ L、Spl rice no. 2 プライマーを 10pmol、最後に DW で 50 μ L に調製した。PCR 条件は、94°C 2 分で変性させ、94°C 30 秒、65°C 30 秒、68°C 5 分、を 35 サイクル行った。

⑤ 2 回目 PCR

1 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを 2 回目 PCR 用の鋳型 DNA とした。

希釈済み鋳型 DNA を 1 μ L、KOD-Plus- (1U/ μ L) を 1 μ L、10XPCR Buffer を 5 μ L、2mM dNTPs を 5 μ L、25mM MgSO₄ を 2 μ L、WP-2 を 1 μ L、Sp2 rice no. 2 プライマーを 10pmol、最後に DW で 50 μ L になるよう調製した。PCR 条件は、94°C 2 分で変性させ、94°C 30 秒、65°C 30 秒、68°C 5 分、を 30 サイクル行った。

5 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発

試料 種籾 (日本晴) は、(独) 農業生物資源研究所ジーンバンクを通じて入手した。

2) DNA 抽出 コメを対象とした DNA 抽出法 種籾は、水で洗浄した後、各粒を粉砕用チューブに入れ、粉砕器専用ラックに移し、粉砕器にセットした。粉砕器専用ラックを固定するため、カバーを取り付け、両端の固定ネジを締めた後、室温、2,000rpm、15 秒間の条件下で粉砕し、その後、均質に粉砕した試料に、GE 1 緩衝液 2.1 mL、Proteinase K (20 mg/mL) 60 μ L、 α -アミラーゼ (高濃度品) 6 μ L 及び、RNase A (100 mg/mL) 30 μ L を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65°C の条件で 30 分間加温した。良く攪拌した後、サンプルを 2 mL チューブに移し変え、GE2-K 緩衝液 255 μ L を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後、氷上に 10 分間静置した。6000 \times g 以上、4°C の条件で 15 分間遠心した。上清を 2 mL 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 15 mL 容チューブに移し、上清 1 mL に対して GB3 緩衝液 375 μ L 及びイソプロパノール 375