

μL を添加した後、10~12 回転倒混和した。混合液を 700 μL ずつ spin column に負荷した後、13,000 ×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 μL を負荷し、13,000 ×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 1.5 mL 容チューブに移し、DW 50 μL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 ×g 以上、室温の条件で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とした。

3) 濃度測定 得られた DNA 試料原液の吸光度を 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。

4) バイサルファイトシーケンシング

反復配列などで DNA が再会合して非変換シトシンが出現するのを防ぐため精製したゲノム DNA 500 mg をあらかじめ、50 μL 反応液中で 15 U の *EcoRI* 又は *KpnI* の制限酵素と 1 時間 37°C で反応させ断片化させた。制限酵素との反応後、DNA の精製のため、1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム塩、2.5 倍量のエタノールを加えて、よく攪拌し、20,000 ×g、4°C で 10 分間遠心分離した。70% (v/v) エタノールで洗浄、乾燥させ 11.875 μL の水で溶解した後、6 N NaOH 0.6255 μL を加え 37°C 20 分間保温し DNA の一本鎖化を行った。DNA のバイサルファイト処理は BisulFast DNA Modification kit for Methylated DNA Detection (東洋紡績社) を用いて行った。バイサルファイト溶液 (BisulFast) 275 μL を加え (計 300 μL とする)、PCR 用チューブに分注しサーマルサイクラーで 70°C、1 時間保温した。反応溶液全量を 1.5 mL チューブに移し、DNA 精製吸着液 800 μL と磁気ビーズ 30 μL を加え、ボルテックスミキサーで 10 分間攪拌した。チューブを磁気スタンドに立てて 30 秒間静置し、磁気ビーズを集め、上清を除去した。次いで、80% (v/v) エタノール 1 mL を加え 10 秒間攪拌し洗浄した。チューブを磁気スタンドに立てて 30 秒間静置し、磁気ビーズを底に集め、上清を除去し、再度、80% (v/v) エタノール 1 mL を加え攪拌、遠心分離し上清を完全に除き洗浄過程を繰り返した。乾燥させた沈殿物をあらかじめ 70 度に暖めておいた水 30 μL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、2 分間静置し、磁気スタンドに立てて上清を回収した。得られた DNA 溶液に脱スルホン化溶液 30 μL を加え、サーマルサイクラーで 90°C 30 分間保温した。バイサルファイト処理後の DNA サンプルは、すぐに PCR に用いる、もしくは、-20°C で保存したものを使用した。

5) PCR プライマー設計

Kismeth Bisulfite Primer design (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth>) を使用し、バイサルファイト処理後の DNA に相補的なプライマーを設計した¹⁾。

6) PCR とクローニング

PCR 反応は、プライマーダイマーや非特異的な増幅を低減できる TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ社) を使用した。反応液の組成は以下の通りである。5 U/μL Ex Taq 1 μL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μmol/L) 1 μL、2.5 mM dNTP 4 μL、10 X PCR buffer 5 μL を混合し、水で全量 45 μL に調製後、バイサルファイト処理後の DNA 試料液 5 μL を添加した。ホットスタート法で 98°C、2 分間の条件で保持し反応を開始した。その後、98°C 30 秒、55°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を行った。

既報^{2, 3)}と同様に PCR 産物の検出を行った。泳動には 100 mL 当たり 10 μg のエチジウムブロマイドを含む 2% (w/v) アガロースゲルを用いた。PCR 反応液の 7.5 μL を TAE (tris-acetate EDTA) 緩衝液中で 100 V 定電圧で電気泳動を行った。次いで、ゲルイメージ解析装置を使用し、UV (312 nm) 照射下で画像を取り込み、増幅される DNA の検出を行った。又、予想される長さの DNA が増幅された場合はその増幅産物を QIAquick PCR purification kit (株) キアゲン製) により精製し、該当する PCR 産物 5 μL に、7 μL の 2X T4DNA ligase buffer を加え、1 μL の pGEM-T easy ベクター、1 μL の T4DNA ligase を加えて 16°C で 1 時間反応させ TA-cloning ベクターへのライゲーションを行った。その後、DH5a 大腸菌の形質転換を行いクローニングを行った。形質転換した大腸菌を 100 μg/ml カルベニシリン入り LB-agar 寒天培地にまき、一晚 37°C で培養後、各コロニーからプラスミドをアルカリ法で抽出精製した。シーケンシング解析には、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社製) を使用し、ABI PRISM 3700 DNA analyzer (ライフテクノロジーズジャパン株式会社製) を用いてシーケンス解析を行った。

C. 研究結果

1. GM トマトの検知法開発に関する研究

JAS 規格を基準に分類したトマト加工食品の、一般的な加工工程を示した (Fig. 1)。トマトに特異的な内在性遺伝子 (LAT52) の構造と、各々長鎖の異なるプライマーの設計位置、またプライマー配列を示した (Fig. 2, Table. 1)。プライマーアッセイの結果、PCR で増幅後、電気泳動で増幅を確認した

(Fig. 3)。さらに、プライマーペア lat 1: AGA CGA CGA GAA CGA TAT TTG C, lat 2: TTC TTG CCT TTT CAT ATC CAG ACA、とプローブ Lp: 5' -FAM CTC TTT GCA GTC CTC CCT TGG GCT TAMRA -3' を用いてリアルタイム PCR を商品分類ごとに行った (Fig. 4)。

2. GM 亜麻の検知法の確立に関する検討

イオン交換樹脂タイプの QIAGEN Genomic-tip を用いることで非常に精製度の高い DNA の抽出が可能であることが示唆された (Table 2)。得られた DNA のアガロース電気泳動を行った結果、国内で多く販売されている加熱滅菌済みの亜麻加工品を試料とした場合 100~800 bp の DNA が得られていることから、非加熱亜麻製品と同等にリアルタイム PCR を用いた解析が可能な検体であることが示された (Fig. 5)。EU で確立された JRC 法は、構造特異的に NOS ターミネーターとスペクチノマイシン耐性遺伝子の境界領域の DNA 配列を検出する方法であるが、選択マーカーの周辺領域を標的としていることから、CDC Triffid だけでなく他の GMO 構造においても反応する可能性が示唆された。それ故、CDC Triffid の混入を確認する別な検知法開発の必要性が生じた。

本研究では、変異型 ALS 遺伝子の配列を標的に、高感度で特異的な方法を確立した。変異型 ALS を標的とした方法で得られた結果は、JRC 法の結果と合致した (Fig. 6)。JRC 法と本研究で開発した検知法を用いて、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 (NIHS Sample4) から CDC Triffid 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 (Fig. 7)。またトウモロコシ、コメ、ダイズ、ナタネの抽出 DNA では増幅されないことから、特異的な検出法であることが示唆された (Fig. 8)。本検知法は GM 亜麻 DNA 混合溶液を用いた検討で検出限界は 0.001% であった (Fig. 9)。

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 OPAPesGH 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 (Fig. 10)。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、マダイの染色体 DNA を鋳型として real-time PCR を行ったところ、multicomponent 上での対象色素 (FAM) 由来の蛍光強度の指数関数的な変化は見られなかった。一方、Chinook salmon の成長ホルモン cDNA を組み込んだ陽性コントロールプラスミ

ドを鋳型として用いた場合、Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線の変化 (Fig. 11A) 及び Ct 値の動向 (Fig. 11B) を確認することができた。また、増幅産物をアガロース電気泳動により確認したところ、マサバ、マダイ、マダイでは非特異的な増幅産物は見られなかったが、使用したすべてのサーモン科に属する魚の検体からはイントロン挿入された鎖長のバンド 240 bp が検出された。一方、陽性コントロールプラスミドを鋳型に使用したサンプルでは成長促進型のコンストラクト特異的な領域 (99 bp) を特異的に増幅し、いずれも増幅産物のダイレクトシーケンシングの結果、サケの成長ホルモン遺伝子であることが分かった (Fig. 12, 13)。次いで、市場で購入可能なサケ加工品 (6 品目) についても検討を行った結果、内在性遺伝子の 16S には指数関数的な増幅曲線は見られたが、組換え型成長ホルモン遺伝子には見られないことから GM サケではないことが示唆された。 (Fig. 14)。

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

明らかになったトリプシンインヒビター発現コンストラクトの配列に対して、検出するプライマー、プローブを設計し、特異的検知法の確立を行った (Fig. 15)。

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

バイサルファイト処理を行う際、反復配列などで DNA が再会合して非変換シトシンが出現するのを防ぐため種子から精製したゲノム DNA をあらかじめ、制限酵素により断片化した。Fig. 16 に示す第 2 染色体に局在する *Xa21G*CDS 配列の約 1000 bp 上流のプロモーター領域を切断しない *EcoRI* を用いて 37°C で 1 時間酵素処理した後、亜硫酸水素ナトリウムを用いて化学修飾により非メチル化シトシンのみを脱アミノ化してウラシルへと変化させた。バイサルファイトシーケンシング解析の結果、個々の日本晴株の種子の *Xa21G* プロモーター領域 (シーケンス領域 1、ただしプライマー配列を除く、24369754 から 24369855) に存在するすべてのシトシンはチミンに置換された (Fig. 17)。これは、脱メチル化されていることによってシトシンが化学修飾の保護から外れるため、PCR 増幅後脱メチル化シトシンとして「C」は「T」に置換されるためであった。さらに下流の配列 (シーケンス領域 2、ただしプライマー配列を除く、24369881 から 24369969) においても同様に非メチル化されていることが明らかとなった (Fig. 18)。発芽後 2 週間目の芽と根を採取し、同シーケンス領域を解析したところ完全に非メチル化されていることが確認

された(データ示さず)。別品種のササニシキにおいても、非メチル化された同一配列領域が確認された(Fig. 19)。

D. 考察

1. GM トマトの検知法開発に関する研究

今回の実態調査では、国内に流通していると考えられる未承認遺伝子組換えトマトは、検出されなかった。トマト加工食品は、加工工程の違いによりDNAの状態にばらつきが見られたが、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、どの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、検知可能であることが示された。

2. GM 亜麻の検知法の確立に関する検討

EUで開発された現行のJRC法は、コンストラクト特異的にNOSターミネーターとスペクチノマイシン耐性遺伝子の境界領域のDNA配列を検出しようとする方法であることから、CDC Triffidだけでなく他のGMOのコンストラクトにおいても反応する可能性が示唆され、CDC Triffidを同定したか否かについて確認する必要性が生じていた。本研究では、CDC Triffidの種子を陽性コントロールに使用し、CDC Triffidに導入されたスルフォニルウレア除草剤耐性を獲得するシロイヌナズナの変異型ALS遺伝子(c589t)の配列を標的に高感度に検知する特異的な方法を確立した。安全性未審査のCDC Triffidの国内流通回避のためにも、CDC Triffidを確認できる高い信頼性ある検知確認法の確立が望まれた。国内のカナダ産輸入亜麻市販製品を調べた結果、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線の変化及びCt値の動向、ならびにmulticomponent上での対象色素(FAM)由来の蛍光強度の指数関数的な変化が見られ、CDC Triffid特有の遺伝子の存在が確認された。また、アンプリコンのダイレクトシーケンシングによりその特異的な配列の存在も確認されたことから、EU各国と同様に、日本国内でカナダ産安全性未審査GM亜麻CDC Triffidが流通した可能性が示唆された。

3. GM 魚の検出法の確立と調査

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

長促進型特異的のGMサケは検出されなかった。

4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討

既にBt陽性と判定されたコメ(Kemingdao系統混入)の検体に、害虫抵抗性を示すトリプシンインヒビター発現カセット構造が検出された。このことはトリプシンインヒビター発現GMコメ(SCK系統)が混入されているか、あるいはBt系統カセットとトリプシンインヒビター発現カセットが同じベクターにより挿入された可能性が示唆された。Real-time PCR法を用いて、トリプシンインヒビター発現コンストラクトを検知する検知用プライマー・プローブを設計した。

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

Xa2IG 遺伝子は、イネ白葉枯病原細菌 *Xanthomonas oryzae* に抵抗性を与えるタンパク質をコードするものであるが、成熟イネ(Yamada-nishiki品種)においては遺伝子のプロモーター領域の完全なメチル化により発現が抑制されていることが最近明らかとなった⁴⁾。イネの種子の状態では *Xa2IG* 遺伝子上流の24369754から24369855及び24369881から24369969塩基配列間において完全に非メチル化されていることが示唆された。さらに、種子粒間又は発芽後2週間では不変的なメチル化パターンの存在が明らかになったことから、イネの種子のDNAメチル化パターンは非常に保存性の高いものであることが示唆された。このパターンを特異的に検出するようなメチル化・非メチル化特異的プライマーを設計することで、新規な識別検知法に応用できると考えられた。

本研究結果から、種子の成長過程で遺伝子の配列選択的なメチル化が起きている可能性が示唆され、今後、染色体DNAの後天的修飾の解析から得られた知見は、種子バンクに登録されている遺伝子資源の高度利用に繋がると考えられた。

E. 結論

1. GM トマトの検知法開発に関する研究

今回の実態調査では、国内に流通していると考えられる未承認遺伝子組換えトマトは、検出されなかった。トマト加工食品は、加工工程の違いによりDNAの状態にばらつきが見られたが、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、どの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、検知可能であることが示された。

2. GM 亜麻の検知法の確立に関する検討

本研究の結果、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 亜麻検知法を開発するに至った

3. GM 魚の検出法の確立と調査

AquaBounty Technologies 社が開発しようとしている OPAPCsGH プラスミドを使用して作成される GM 魚に組み込まれる構造特異的配列の高感度な検知法を開発することができた。今後、本検知法を用いて市場で販売されているサケ加工品からの実体調査をさらに行う予定である。

4. 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメ (Bt rice) の検知技術の検討

Real-time PCR 法を用いて、トリプシンインヒビター発現コンストラクトを検知する検知用プライマー・プローブを設計し、検出系を確立した。

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

バイサルファイトシーケンシング法により稲種子の染色体メチル化パターンを一粒解析した結果、種子間でメチル化パターンの高い保存性が見られた。DNA のメチル化のようなゲノム DNA の後天的修飾は、種子の状態では不変的な休眠状態にあると考えられた。今後、種子ゲノムのメチル化パターンを利用した遺伝子組換え米を簡易迅速に峻別することのできる手法の開発に繋がる可能性が示唆された。今後、同領域においてさらに発芽後、成熟イネとゲノム配列のメチル化における変化の情報を探る必要がある。得られる知見は、“種子エピゲノミクス”としての新たな地平を切り開き、GM 作物検知法開発分野の発展に繋がるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1) Akiyama H, Nakamura F, Yamada C, Nakamura K, Nakajima O, Kawakami H, Harikai N, Furui S, Kitta K, Teshima R. A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution

melting-curve analysis Biol Pharm Bull. 32, 1824-1829 (2009).

- 2) Hashimoto H, Ito K, Tanaka H, Akiyama H, Teshima R, Makabe Y, Nakanishi K, Miyamoto F. Detection of wheat as an allergenic substance in models of processed foods by a nested PCR methods Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 50, 178-183 (2009).
- 3) Nakamura K, Akiyama H, Yamada C, Satoh R, Makiyama D, Sakata K, Kawakami H, Mano J, Kitta K, Teshima R. Novel method to detect a construct-specific sequence of the acetolactate synthase gene in genetically-modified flax CDC Triffid (FP967). Biol Pharm Bull. 33, 532-534 (2010).
- 4) Mano J, Yanaka Y, Akiyama H, Teshima R, Furui S, Kitta K. Improvement of polymerase chain reaction-based bt11 maize detection method by reduction of non-specific amplification Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 51, 32-36 (2010).
- 5) Shimizu E, Futo S, Masubuchi T, Minegishi Y, Kasahara M, Akiyama H, Teshima R, Hino A, Mano J, Furui S, Kitta K. Selection of suitable polypropylene tubes for DNA testing using real-time PCR Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 51, 43-47 (2010).
- 6) 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).
- 7) Nakajima O, Akiyama H, Teshima R. Real-time polymerase chain reaction method for detecting contamination of beef by material from genetically engineered cattle Biol Pharm Bull. 32, 1313-1316 (2009).
- 8) Harikai N, Saito S, Abe M, Kondo K, 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 Biosci Biotechnol Biochem. 73, 1886-1889 (2009).
- 9) Suzuki Y, Kassai M, Hirose T, Katayama S, Nakamura K, Akiyama H, Teshima R, Nakamura S. Modulation of Immunoresponse in BALB/c Mice by Oral Administration of Fag e 1-Glucomannan Conjugate. J Agric Food Chem. 2009 Oct 1
 - 10) Mano J, Oguchi T, Akiyama H, Teshima R, Hino A, Furui S, Kitta K. Simultaneous detection of recombinant DNA segments introduced into genetically modified crops with multiplex ligase chain reaction coupled with multiplex polymerase chain reaction J Agric Food Chem. 57, 2640-2646 (2009).
 - 11) Oguchi T, Onishi M, Minegishi Y, Kurosawa Y, Kasahara M, Akiyama H, Teshima R, Futo S, Furui S, Hino A, Kitta K. Development of quantitative duplex real-time PCR method for screening analysis of genetically modified maize. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 50, 117-125 (2009).
 - 12) Oguchi T, Onishi M, Chikagawa Y, Kodama T, Suzuki E, Kasahara M, Akiyama H, Teshima R, Futo S, Hino A, Furui S, Kitta K. Investigation of residual DNAs in sugar from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 50, 41-46 (2009).
 - 13) 酒井信夫、安達玲子、中村厚、柴原裕亮、上坂良彦、清木興介、織田浩司、穠山浩、手島玲子 いわゆる健康食品に含まれる甲殻類様たんぱく質の実態調査 日本食品化学会誌 16, 118-122 (2009)
 - 14) 穠山浩、佐々木伸大、大木果林、中村文美、坂田こずえ、中村公亮、大森清美、中島安基江、古井聡、橘田和美、小関良宏、手島玲子 PCR法を用いた米加工品の安全性未審査遺伝子組換え米の検知法日本食品化学会誌 16, 147-151 (2009).
2. 学会発表
- 1) 穠山浩、牧山太樹、中村公亮、佐々木伸大、近藤一成、真野潤一、橘田和美、小関良宏、手島玲子 カナダ産安全性未承認遺伝子組換えナタネの検知法の開発について 第46回全国衛生化学技術協議会年会 (2009.11)
 - 2) Kazumi Kitta, Junichi Mano, Satoshi Furui, Satoshi Futo, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Akihiro Hino, The development of detection methods for the monitoring of GMO in Japan, Fourth International Conference on Co-existence of Genetically Modified Crops (2009.11, Australia)
 - 3) Junichi Mano, Natsuki Shigemitsu, Satoshi Futo, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Akihiro Hino, Satoshi Furui, Kazumi Kitta, Real-time PCR array as a Universal Platform for the GM crop detection and its Application in Identifying Unapproved GM crops in Japan, Fourth International Conference on Co-existence of Genetically Modified Crops (2009.11, Australia)
 - 4) 穠山浩、遺伝子組換え食品の検知法、生物化学的測定研究会 第14回学術集会 (2009.6)
 - 5) 牧山太樹、穠山浩、中村公亮、佐々木伸大、近藤一成、真野潤一、橘田和美、小関良宏、手島玲子 Real-time PCRを用いた *B. rapa* と *B. napus* の識別検知法について 生物化学的測定研究会 第14回学術集会 (2009, 6)
 - 6) 穠山浩、坂田こずえ、中島安基江、小川麻子、山岸亨、布藤聡、小口太一、橘田和美、手島玲子 遺伝子組換えトウモロコシの粒検査法の妥当性確認試験について、日本食品衛生学会第97回学術大会 (2009. 5)
 - 7) 穠山浩 遺伝子組換え食品に関する安全性の確保 日本防菌防黴学会・女性研究者の会 第5回学術講演会 (2009.8)
 - 8) 穠山浩、牧山太樹、佐々木伸大、近藤一成、真野潤一、橘田和美、小関良宏、手島玲子 カナダ産未承認遺伝子組換えナタネの検知法について(第一報)日本食品化学学会第15回学術大会 (2009. 5)
 - 9) 山田千尋、穠山浩、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、日本食品化学学会第 15 回学術大会 (2009. 5).

- 10) 張替直輝, 木下健司, 吉田雄三、齋藤晋、阿部碧、橘田和美、近藤一成、 穉山 浩, 手島玲子、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、日本食品化学学会第 15 回学術大会 (2009. 5).
- 11) 古井聡、増淵友子、日野明寛、真野潤一、橘田和美、清水えり、布藤聡、峯岸恭孝、笠原正輝、穉山浩、手島玲子、ポリプロピレンチューブが PCR 検査に与える影響、日本食品化学学会第 15 回学術大会 (2009. 5).
- 12) 佐々木伸大、佐々木和生、梅津博紀、太田大策、岩城俊雄、堀内浩幸、穉山浩、手島玲子、小関良宏、プロファイリング技術による遺伝子組換えニワトリの非意図的影響の評価、日本食品化学学会第 15 回学術大会 (2009. 5).
- 13) 真野潤一、重光なつき、日野明寛、古井聡、橘田和美、布藤聡、穉山浩、手島玲子、遺伝子組換え農作物の汎用型一斉分析法リアルタイム PCR アレイの開発、日本食品化学学会第 15 回学術大会 (2009. 5).
- 14) 中村公亮、穉山浩、河野徳昭、吉松嘉代、近藤一成、真野潤一、橘田和美、手島玲子、もち米試料中のトリプシンインヒビター遺伝子を導入した中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの解析とその検知技術の開発について (第 1 報)、日本食品衛生学会第 98 回学術大会 (2009. 10)
- 15) 穉山浩、牧山太樹、佐々木伸大、近藤一成、中村公亮、峯岸恭孝、真野潤一、橘田和美、小関良宏、手島玲子 カナダ産未承認遺伝子組換えナタネの検知法について (第二報)、日本食品衛生学会第 98 回学術大会 (2009. 10).
- 16) 中島治、穉山浩、手島玲子、リアルタイム PCR を用いた遺伝子組換えウシに由来する肉の検知について、日本食品衛生学会第 98 回学術大会 (2009. 10).
- 17) 穉山浩 遺伝子組換え食品の検知法の最新の動向 日本分析化学会関東支部懇話会 (2010. 3)

- 18) 真野潤一、谷中有香、池津陽子、大西真理、布藤聡、穉山浩、手島玲子、日野明寛、古井聡、橘田和美、スタック品種の混入に影響を受けない遺伝子組換えトウモロコシ混入率推定手法グループテストングの開発 2010 年度農芸化学会講演
- 19) 河野徳昭、今村智弘、島田浩章、穉山浩、川原信夫、吉松嘉代、自家プロモーター発現系遺伝子組換え植物の検知技術開発 第 27 回日本植物細胞分子生物学会 (2009. 7)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图表

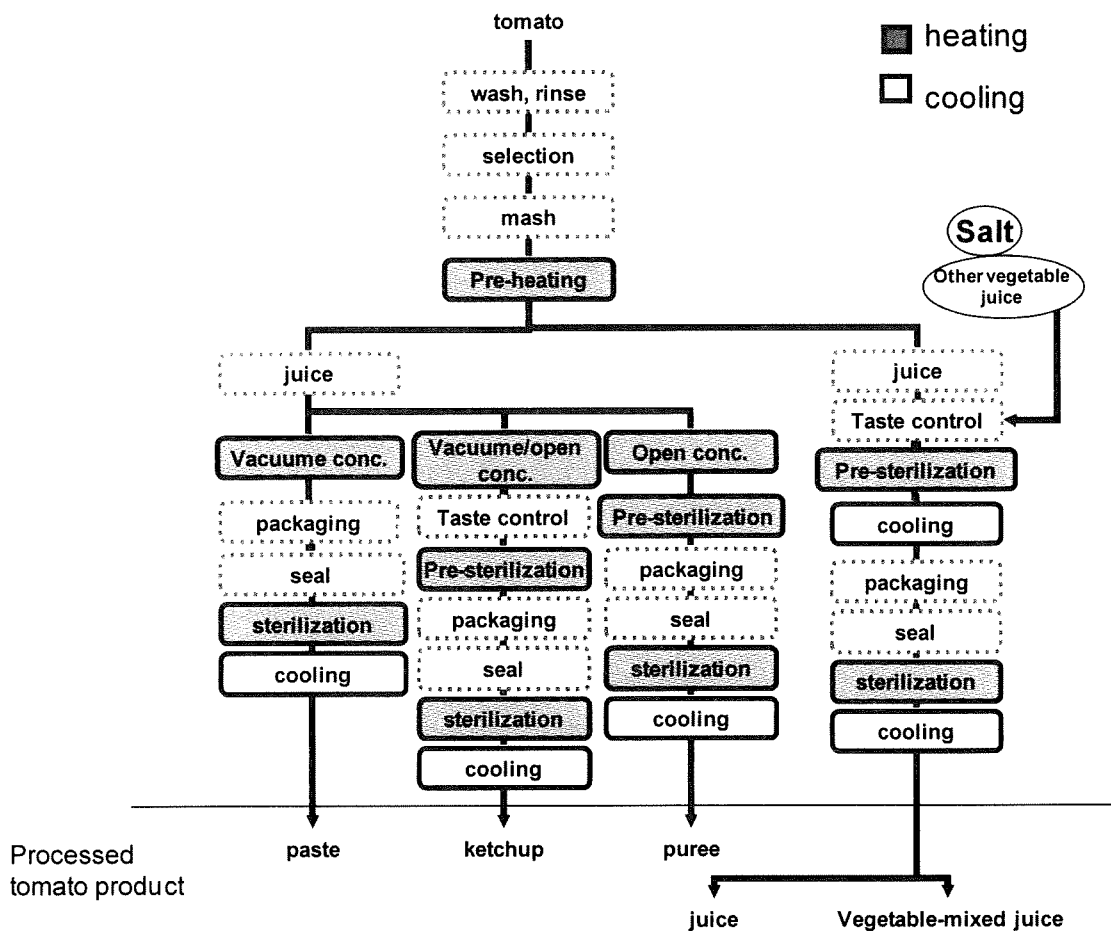


Fig. 1. Outline for the typical tomato industrial processing

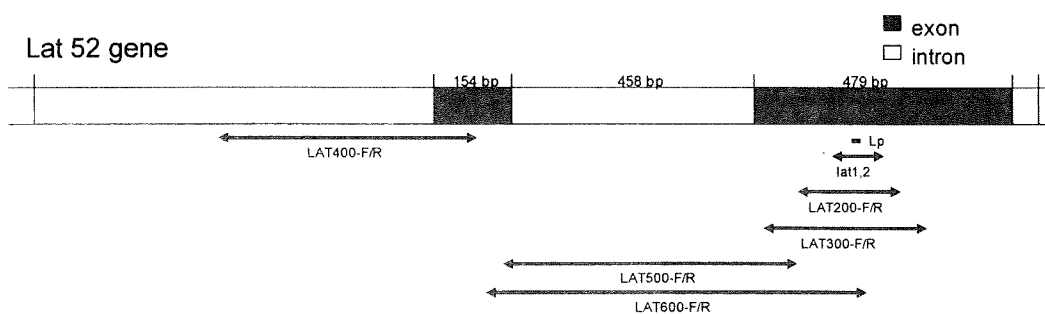


Fig. 2. Target PCR amplification sites on tomato endogeneous gene, Lat52.

Primers designed to amplify in the range of 100 to 600 bp PCR products were indicated by the arrows.

Table 1. PCR primers and probe for detection of Lat52 gene in tomato DNA

name	nucleotide sequence of primer(5'-3')	Targeted gene/design of nucleotides	Amplification size (bp)
lat 1	AGACCACGAGAACGATATTTGC	lat 52/ sense primer	92
lat 2	TTCTTGCCTTTTTCATATCCAGACA	lat 52/ antisense primer	
Lp	CTCTTTGCAGTCCTCCCTTGGGCT	lat 52/ sense probe (5'-FAM, 3'-TAMRA)	
LAT200-F	GGCTGAGACGTTTTTCAGTGG	lat 52/ sense primer	209
LAT200-R	GATTGGCAAATCTCACAGCA	lat 52/ antisense primer	
LAT300-F	ATGCAGGAACATCAGCACAG	lat 52/ sense primer	284
LAT300-R	TCATCAAGAGCTTCTTTGCATC	lat 52/ antisense primer	
LAT400-F	CATCCCAAGTTTTGAGGCTAA	lat 52/ sense primer	416
LAT400-R	ACTTCAGGGCGGCAATGTG	lat 52/ antisense primer	
LAT500-F	CGAAACAAAACCTCAGCGAGA	lat 52/ sense primer	524
LAT500-R	GTGCTGATGTTCCCTGCATTG	lat 52/ antisense primer	
LAT600-F	ATACTTGCCGCGTTCAATTC	lat 52/ sense primer	636
LAT600-R	TCGCAAATATCGTTCCTCGTG	lat 52/ antisense primer	

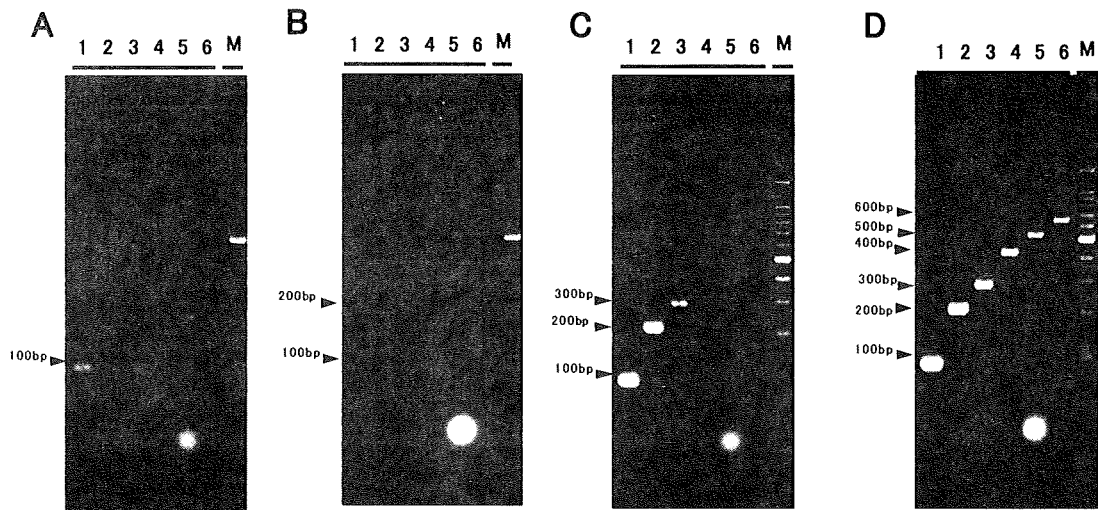


Fig. 3. Ladder PCR amplification of Lat52

A: chili sauce; B: tomato puree; C: tomato paste; D: control (tomato seed);
 Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6: primer set amplify 100, 200, 300, 400, 500 and 600 bp, respectively; M: 100 bp DNA marker consists of 1.5, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 kbp from top to bottom.

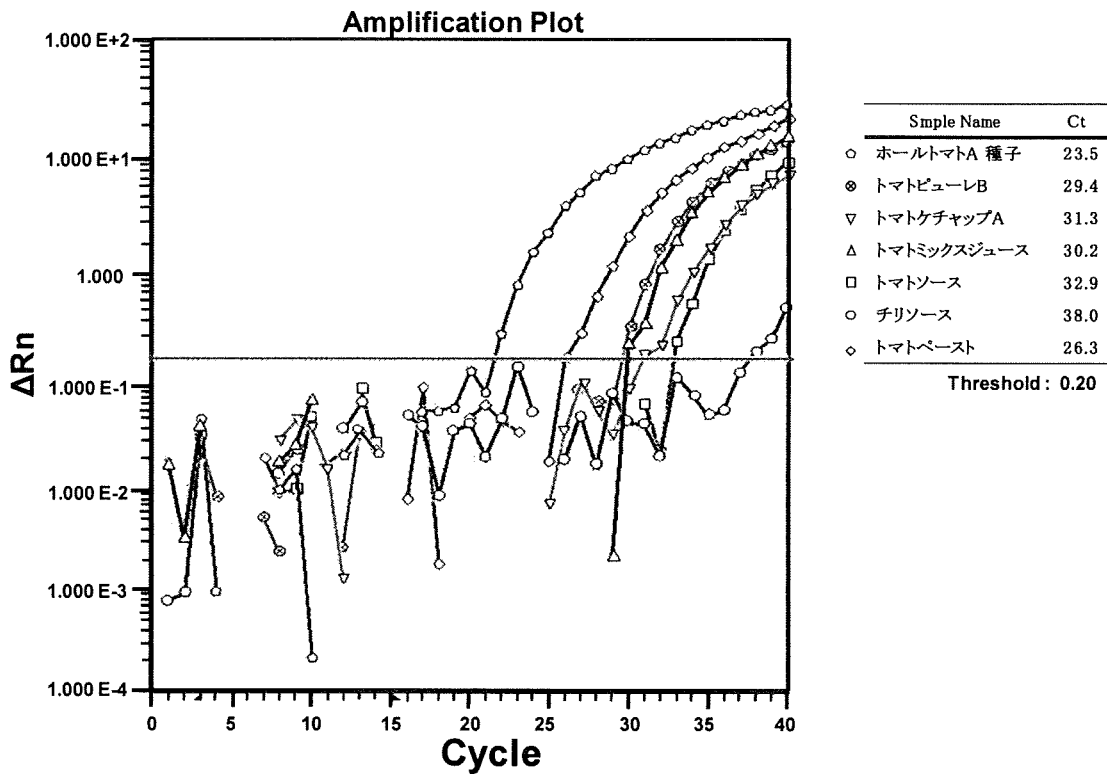


Fig. 4. Amplification plot of real-time PCR for tomato LAT52
 Plot was established using primers Lat1 and Lat2 with the γ -labelled probe, Lp.

Table 2 亜麻穀粒からのDNA抽出の検討

Method	Column Type	Initial sampling (mg)	Final Eluent (μL)	Conc. of purified DNA (ng/μl)	Total DNA (ng)	Absorbance Ratio		Evaluation of the method
						A260nm/A280nm	A260nm/A230nm	
Quicker2 (QIAGEN)	Silica	200	50	102.31	5115.5	1.11	0.36	△ (通常プロトコールでは、5粒以上に多糖類の混入によりカラムのつまりが見られる。)
		200	50	109.3	5465.0	1.09	0.35	
Plant mini kit (QIAGEN)	Silica	100	150	33.56	5034.0	1.64	0.85	×
		100	150	31.14	4671.0	1.61	0.80	
MonoFas kit (GL Sciences)	ion-exchange	500	100	102	10200.0	1.36	0.12	×
		100	100	74.3	7430.0	1.97	0.57	
FAST ID (Genetic ID)	Silica	500	30	310.74	9322.2	1.86	0.62	○ (JRC採用方法)
		500	150	62.51	9376.5	1.89	1.08	
G-tip (QIAGEN)	ion-exchange	500	50	861.11	43055.5	1.92	2.32	◎ (亜麻暫定検査通知法)
		500	50	851.46	42573.0	1.92	2.3	

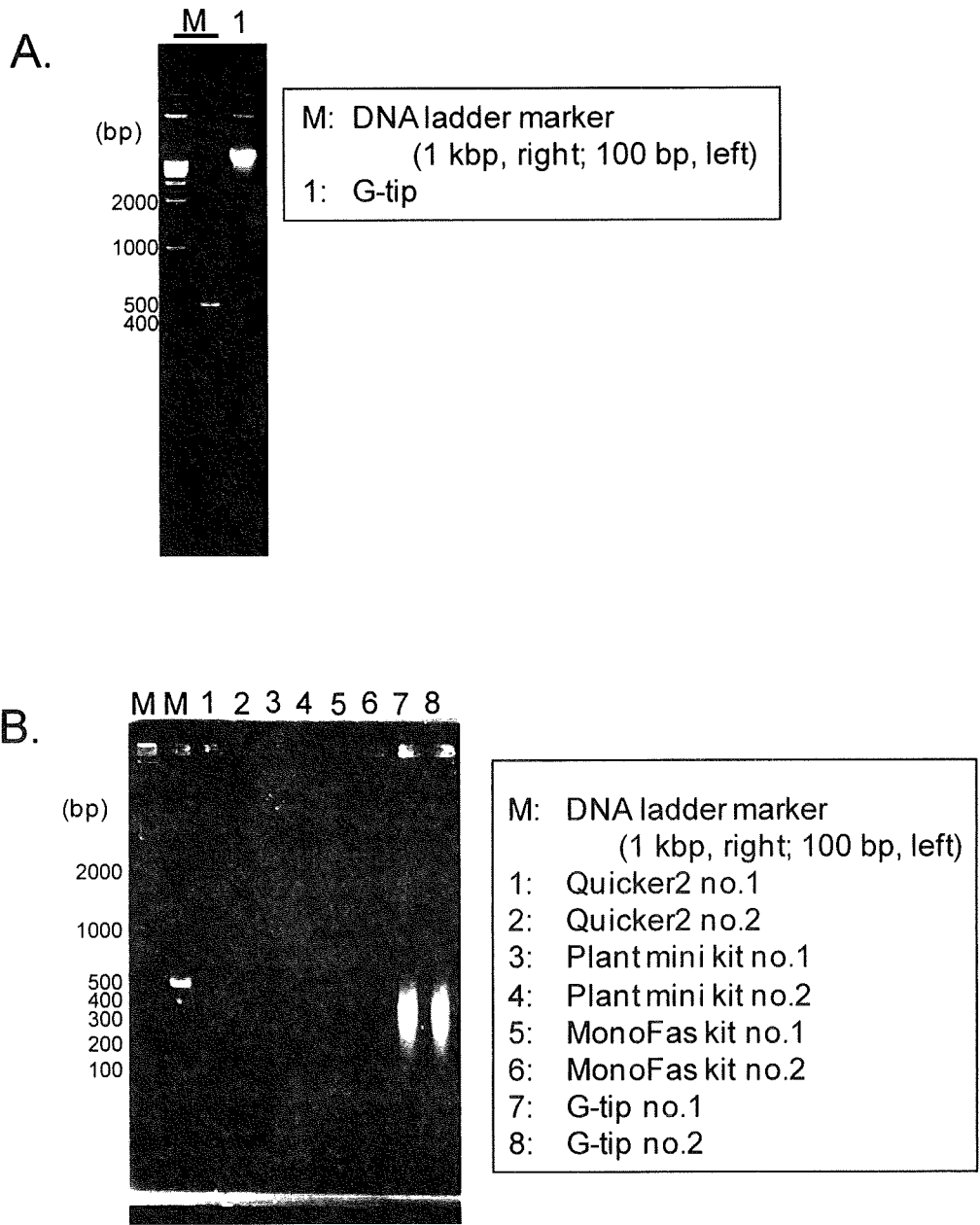


Fig.5 亜麻穀粒(未滅菌(A)、加熱滅菌済(B))から精製したDNAの3% (w/v) アガロース電気泳動図

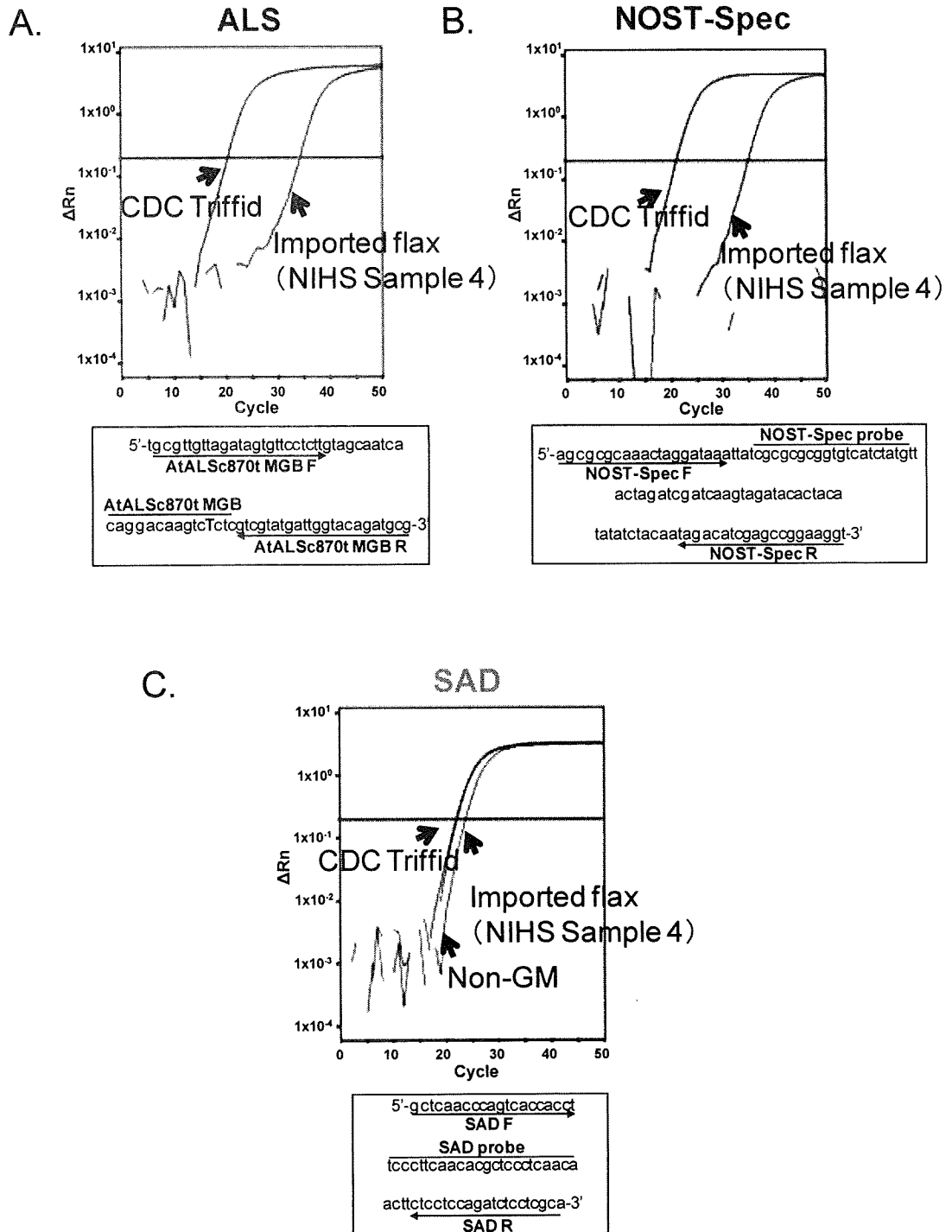


Fig.6 リアルタイムPCRを用いた解析
 ALS(A)、NOST-Spec(B)、内在性遺伝子SAD(C)特異的プライマー・プローブを用いて反応した。アンプリコンのシーケンス結果は各増幅曲線の下に示す。

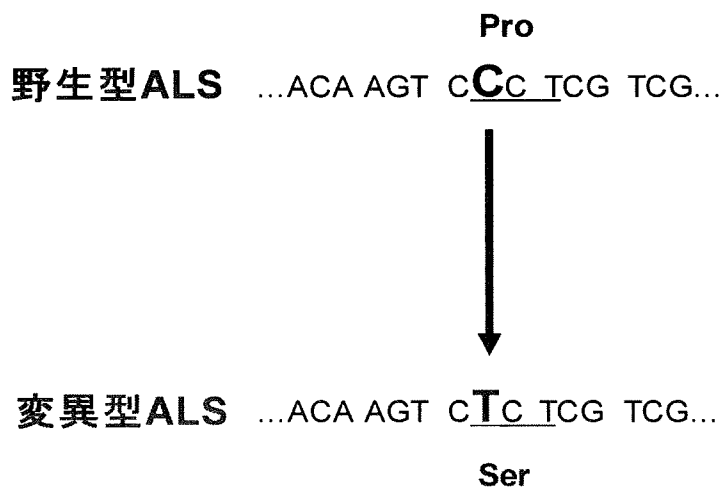
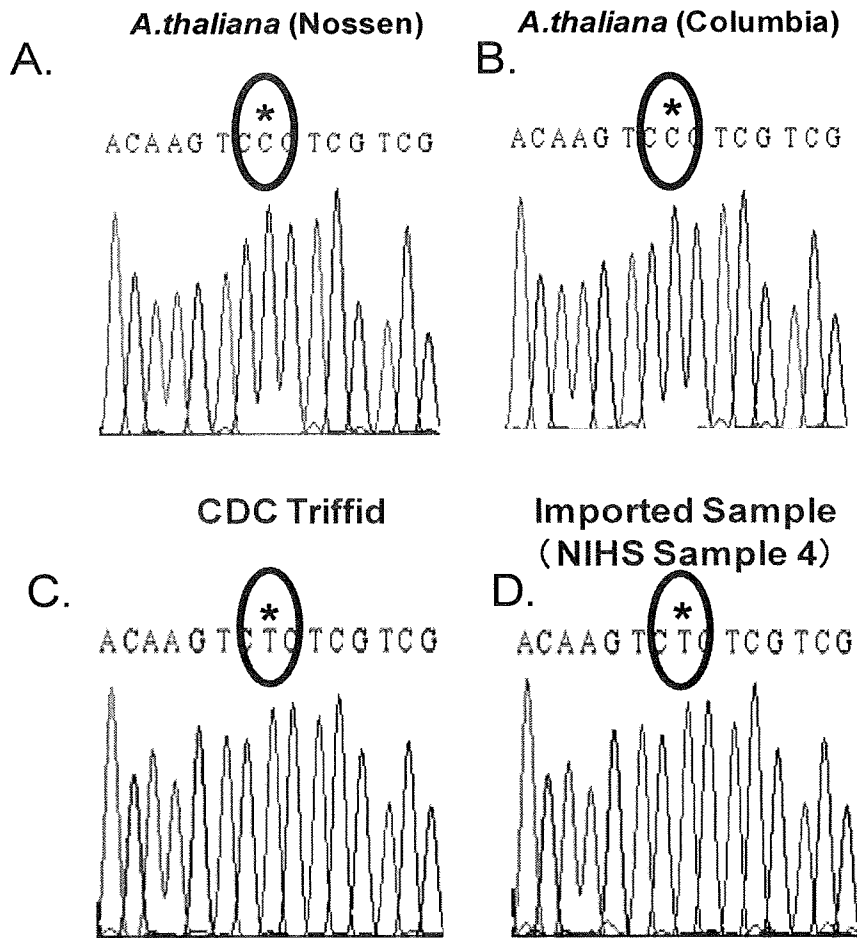


Fig.7 リアルタイムPCR反応のアンプリコン配列の比較
シロイヌナズナNossen株(A)、シロイヌナズナColumbia株(B)、
CDC Triffid (C)、国内で購入した亜麻製品(NIHS Sample4) (D)

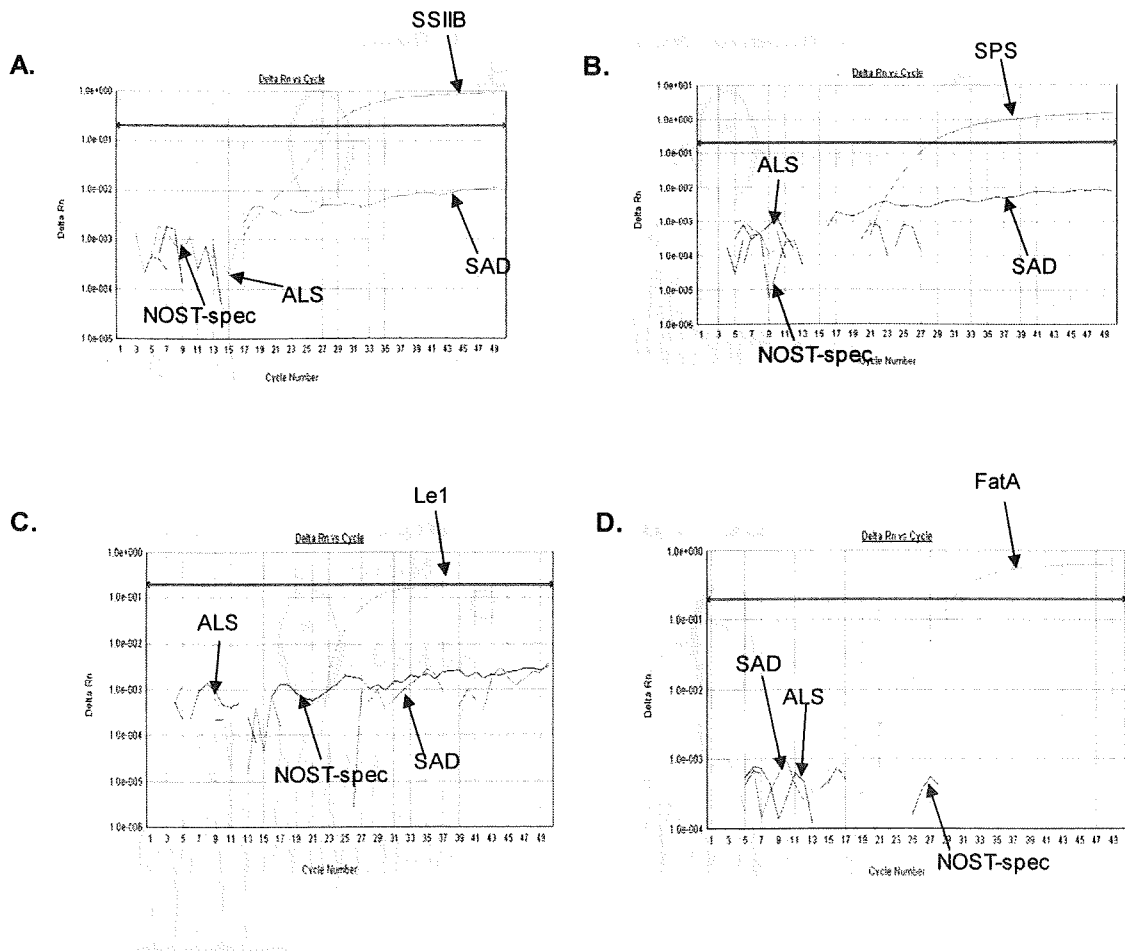


Fig.8 各リアルタイムPCR用プライマー・プローブの特異性解析
 トウモロコシ(A)、コメ(B)、ダイズ(C)、ナタネ(D)から精製したDNA25ng鑄型にして
 各プライマー・プローブで反応させた。内在性遺伝子を検出するプライマー・プローブは、
 それぞれSSIIB, SPS, Le1, FatAを用いた。

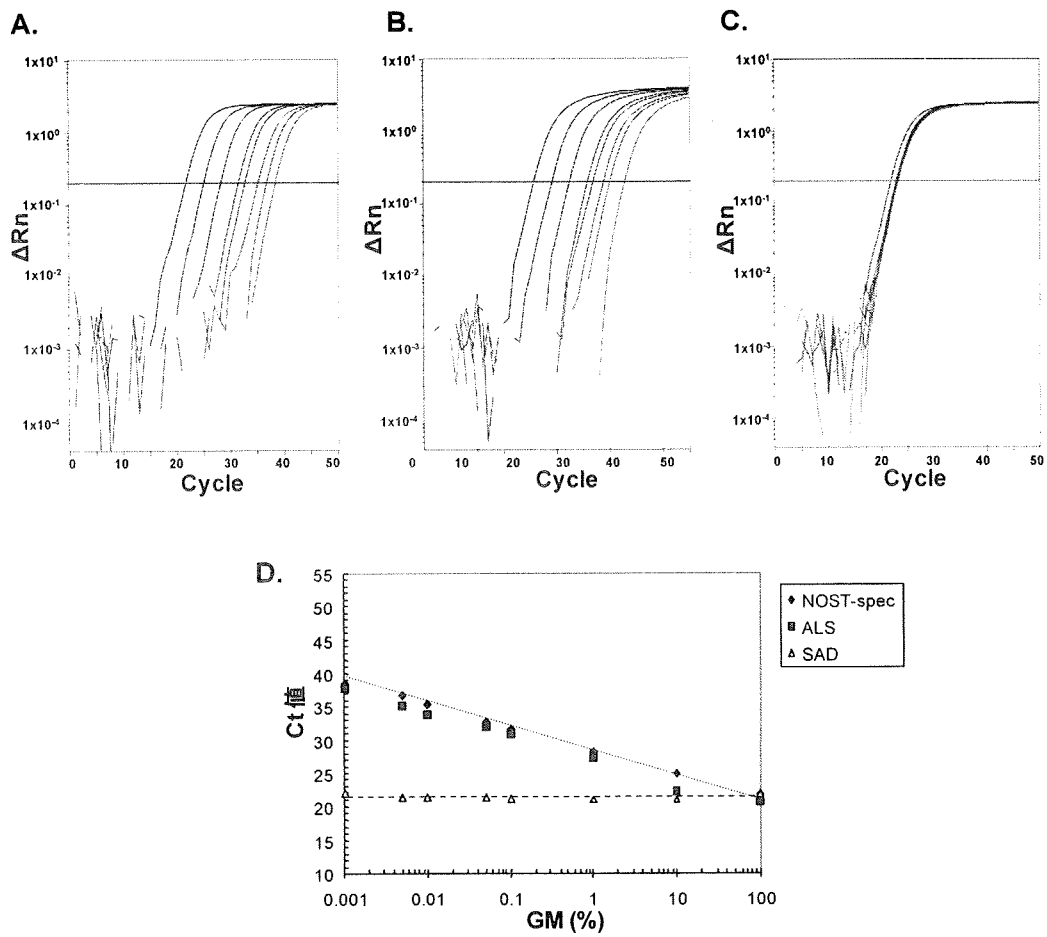


Fig.9 各リアルタイムPCRプライマー・プローブの検出限界
 各プライマー・プローブ (NOST-Spec(A)、ALS (B)、SAD(C))を用いて、CDC-TriffidとnonGM亜麻のDNAを混合調整したDNA25ngを鋳型にしてリアルタイムPCRを行い、得られたCt値を用いてGM亜麻検出限界の解析を行った(D)。

OPAFPcsGH (3.9 kb):

promoter: ocean pout antifreeze promoter
 gene: North Pacific (chinook) salmon GH structural gene

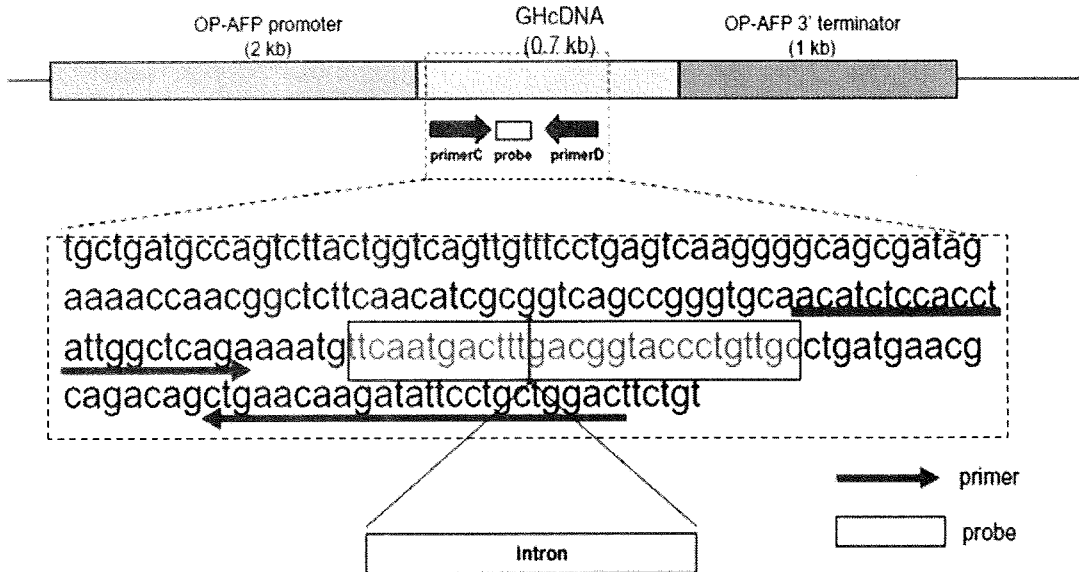


Fig.10. AquaBounty Technologies社が販売しようとしているOPAFPcsGHプラスミドを組換えたGMサケの成長ホルモン遺伝子配列を標的とした特異的検出用プライマー・プローブ

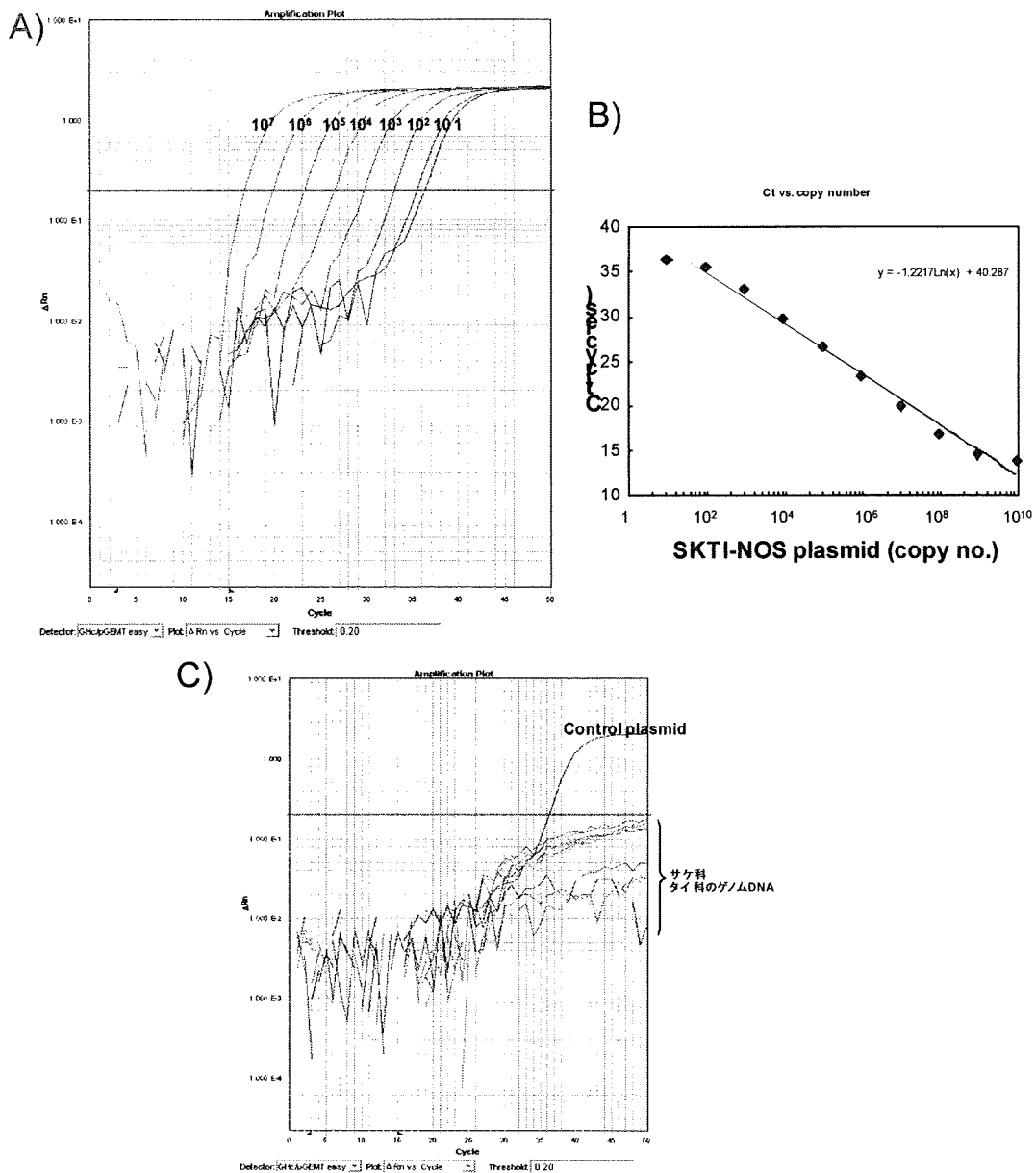


Fig.11. リアルタイムPCRを用いた成長ホルモン遺伝子の検出

A) 成長ホルモン遺伝子を挿入した陽性コントロールプラスミドを鋳型にして、特異的に検出するプライマー・プローブを使用したリアルタイムPCR増幅曲線

B) 陽性コントロールプラスミドのコピー数とそのCt値の関係 C)サケ科・タイ科のゲノムDNAを鋳型にしてリアルタイムPCRを行った。陽性コントロールとして100コピーの陽性コントロールプラスミドを使用した。

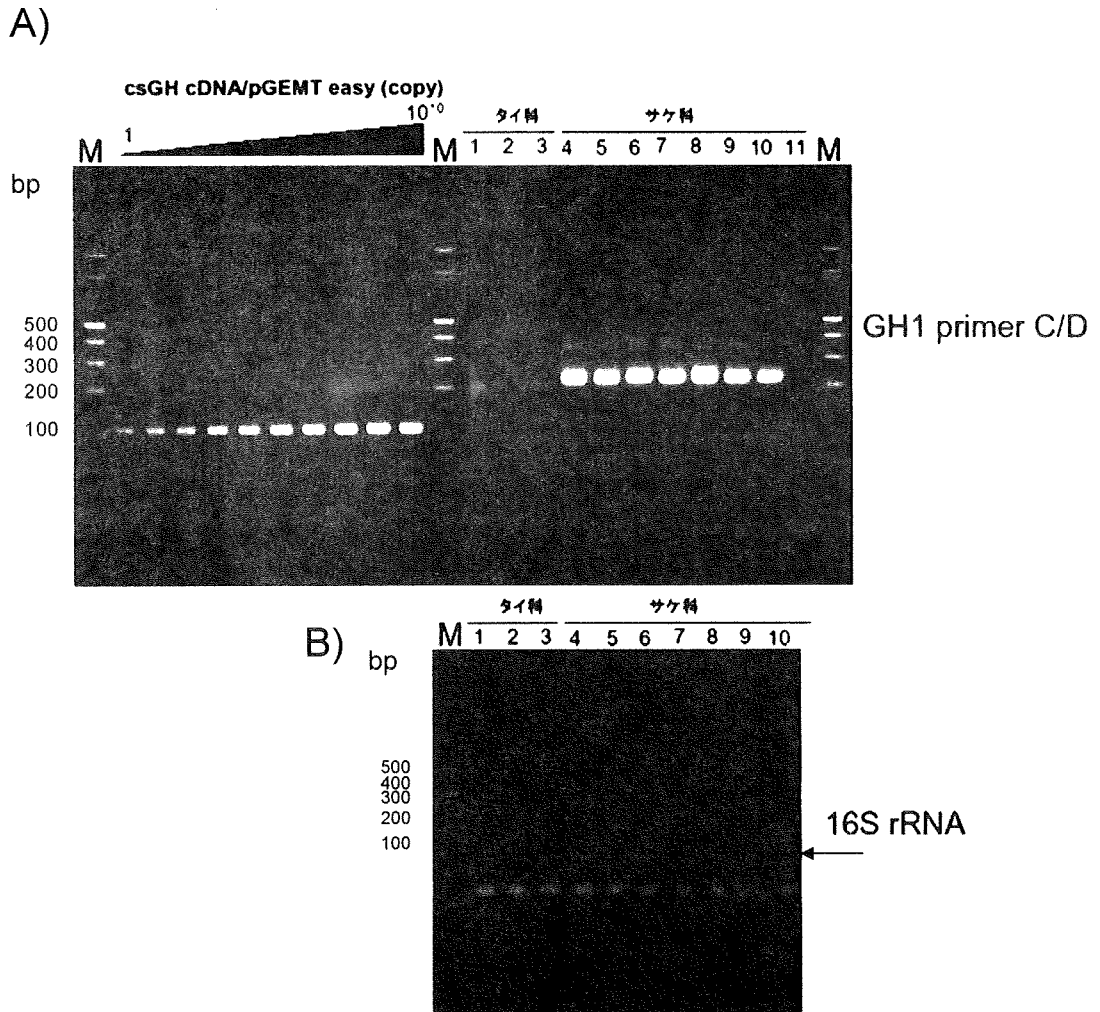


Fig.12. 成長ホルモン導入遺伝子の検出

A)サケ科の成長ホルモン導入遺伝子を特異的に検出するprimerCとDを使用したPCR増幅

B) 内在性遺伝子16S rRNAの鋳型DNA陽性コントロールのPCR増幅

PCRはコントロールプラスミド1-1010コピー数、タイ科・サケ科のゲノムDNA(25 ng)を鋳型にして行った。

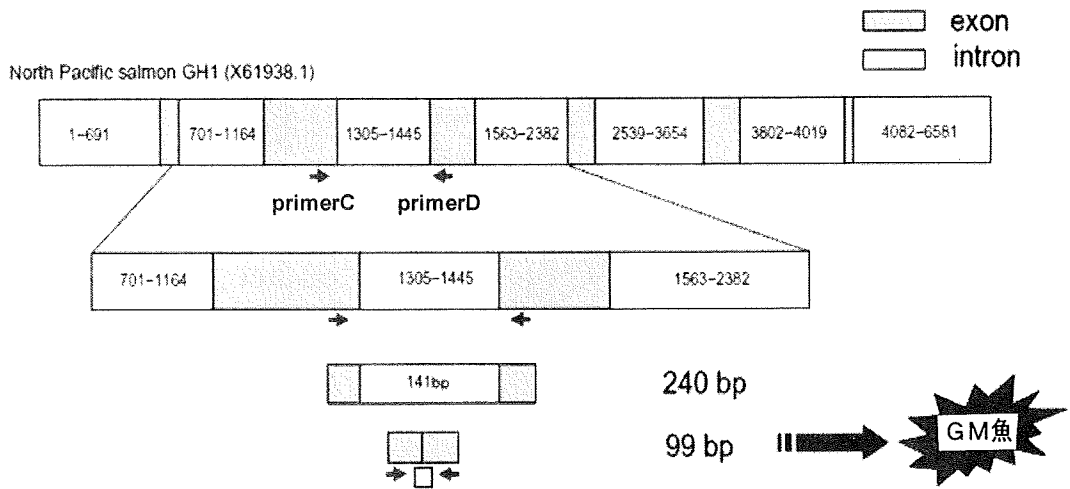
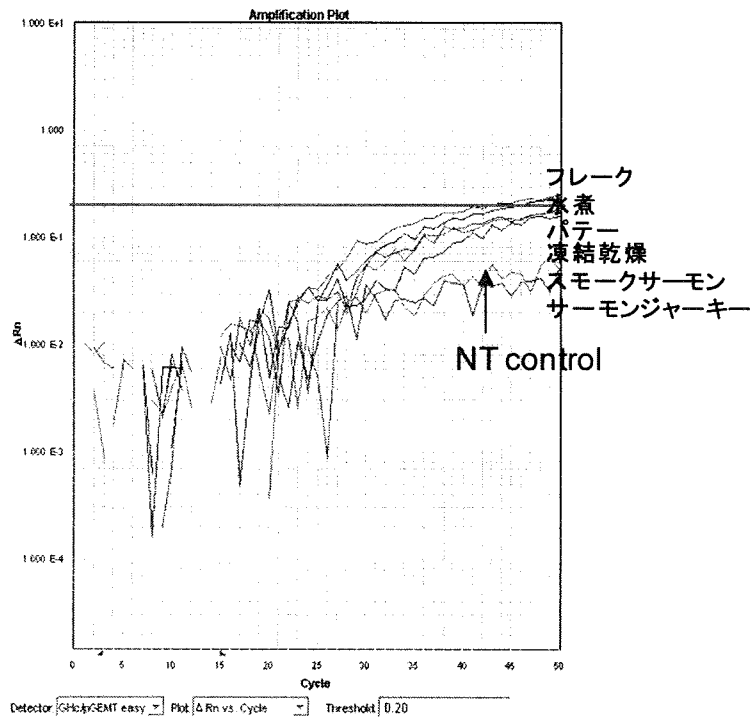


Fig.13. 染色体ゲノムを鋳型に導入遺伝子を検出するprimerCとDを使用したリアルタイムPCR増幅

A)



B)

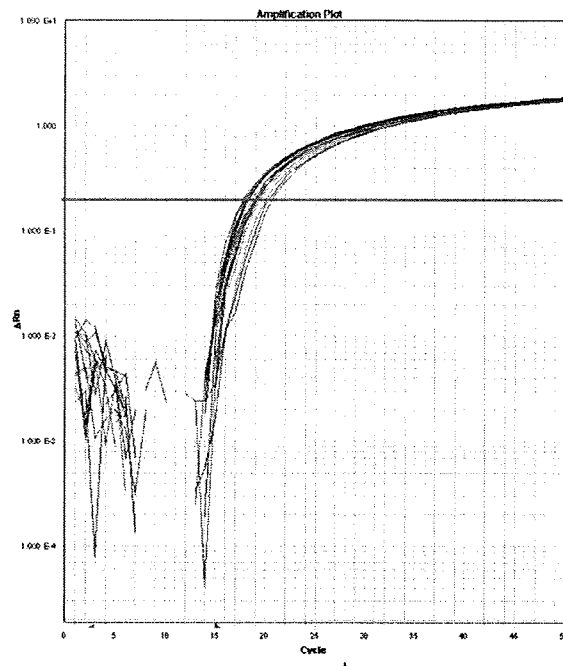


Fig.14. サケ加工品を用いたリアルタイムPCR試験
 A) サケ加工品から得られたDNAを鋳型にした結果
 B) 16S rRNAの陽性コントロール反応の結果