

100 mg/ml RNase(QIAGEN 製) と 1.2 g/mL cellulase(Sigma-Aldrich製)を加え、転倒混合し均質化した後、50°Cで1時間放置した。その間2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。次いで20 mg/mL Proteinase K(Promega製)を加え50°Cで1時間放置した。その間も2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。3,000Xg、低温下(4°C)、20分間遠心し、QBT緩衝液(QIAGEN製) 4 mLを用い平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷した。次いで、100/GをQC緩衝液(QIAGEN製)で7.5 mLずつ3回洗浄した後、あらかじめ50°Cに温めておいたQF緩衝液(QIAGEN製)を負荷しDNAを溶出させた。

溶出液と等量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、遠沈管(1.5 mL 容もしくは2.0 mL 容)に移し、10,000×g以上で、低温下(4°C)15分間遠心した。上清を捨てた。この際、上清を極力除去した。70%(v/v)エタノール1 mLを加え、さらに10,000Xg以上で、低温下(4°C)5分間遠心した。さらに上清を捨て、残った沈殿を、乾燥させた後、予め50°Cに温めた滅菌蒸留水50 µLに溶解し、DNA試料原液とした。

③DNA試料原液中のDNAの純度の確認、並びに、DNA試料液の調製と保存

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈し、200~320 nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度(O.D. 260及びO.D. 280)を記録した。次いでO.D. 260の値1.0を50 ng/µL DNAと換算し、DNA濃度を算出した。またO.D. 260/O.D. 280を計算した。得られたDNA濃度から、DNA試料原液を10 ng/µLに滅菌蒸留水で希釈して調製し、DNA試料液とした。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄した。なお、DNA試料原液の濃度が10 ng/µLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いた。

④安全性未承認GMパパイヤPRSV-YKのゲノムとコンストラクト領域配列の解析

PRSV-YK系統特異的配列の解析には、Transgenic Res. 18, 971-986 (2009)で報告された文献情報に基づいて、以下の定性PCR用プライマーを使用した。

Papa31 (標的配列: RB flanking):
5'-ttgttctaataagttgctac-3'

Papa32 (標的配列: RB flanking):

5'-aatatcaaatggacgtgtagtg-3'

Papa56 (標的配列: Left border):

5'-gttattaagttgtetaagcgtcaa-3'

Papa57 (標的配列: LB flanking):

5'-agacatatatcatcaagaccatagtag-3'

Papa58 (標的配列: Left flanking):

5'-gtcttgcatgattatcat-3'

Papa59 (標的配列: LB flanking):

5'-tggttatcaatatagcaattatgtag-3'

PCR反応液の組成は以下の通りである。GMパパイヤ(PRSV-YK)の陽性反応のあった、パパイヤ苗(P4)とパパイヤ果実(P19)の鋳型DNAを25 ng使用し、KOD-Plus (1U/µL)を1 µL、10XPCR Bufferを5 µL、25 mM MgSO₄を2 µL、プライマー対(各10 pmol)を加え、水で50 µLになるよう調整した。PCR条件は、94°C2分で変性させ、94°C30秒、65°C30秒、68°C5分、を30サイクル行った。PCR反応後、1xTAEバッファー注で0.5 µg/mLエチジウムブロミドを含む3%(w/v)アガロース中で電気泳動を行い、UVイルミネーターを使用してUV照射により増幅産物を確認した。増幅産物のシーケンシング解析は、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit(Life Technologies 製)を用いて行った。

⑤PRSV-YKの系統特異的検出

パパイヤゲノムとTi-plasmid right border配列の境界領域を特異的に検知するプライマー対及びプローブ(16-0-1/17-0-5 1F/1R/1P)の設計は、Primer Express ソフトウェア(Life Technologies製)を使用して行った。各プライマー、プローブの塩基配列は以下の通りである。

台湾産GMパパイヤ16-0-1/17-0-5系統特異的検出用プライマー対、及び、プローブ

16-0-1/17-0-5 1F:

5'-CTTTGGATATCTGCCTATTTTG-3'

16-0-1/17-0-5 1R:

5'-GATCAGATTGTCGTTTCCC-3'

16-0-1/17-0-5 1P:

FAM-TGGATACTATCTCATTCAACTG-TAMRA

パパイヤ陽性対照試験用には、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマー対及びプローブ(Q-Chy-1F2/2R/P)を用いた。配列は以下の通りで

ある。

Q-Chy-1F2:

5' -CCATGCGATCCTCCCA-3'

Q-Chy-2R:

5' -CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA-3'

Q-Chy-P:

FAM-TTCCCTTCAT(BHQ1)CCATTCCCCTCTTGAGA

Q-Chy-Pプローブのクエンチャー(消光物質)は、T-baseのblack-hole quencher 1 (BHQ1)を使用した。プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解した。

⑥リアルタイムPCR反応

リアルタイム PCR 反応は、MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 製)を使用した。PCR 反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下の通りである。TaqMan Master Mix

(Life Technologies 製) 12.5 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L)各 0.4 μ L、対象プローブ溶液(10 μ mol/L) 0.25 μ Lを混合し、DNA 試料液 2.5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ Lに調製した。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものを Non-Template Control (NTC) として DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加したものを同時に調製した。分注操作終了後、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 製)を使用し真上からシールし、完全にウェルを密閉した。この時、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行った。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いた。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 製)を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットした。DNA 試料液あたり 2 ウェル並行して試験を行った。

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は以下のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 15秒間、60 $^{\circ}$ C 1分間を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行った。

⑦リアルタイムPCR結果の解析と判定

Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン (3サイクルから15サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line, 0.2)を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。

2. 中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討

①試験試料

検査対象はコメ及びコメ加工品(コメを主原料とするもので、ビーフン、コメ粉等、未加熱又は加工の程度の低いもの)とした。

②DNA抽出精製

DNA抽出精製は、以下のシリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker 2 変法①及び②)を用いた。検査法の対象検体のうち、コメ及びコメ加工品(未加熱のもの)は変法①を、ビーフン等の加熱加工品については変法②を、それぞれ適用した。1検体から2並行でDNAを抽出し、各抽出DNA試料液を用いてリアルタイムPCRを用いた定性PCR法を実施した。

DNAの抽出精製

1. シリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker 2 変法①)(コメ及びコメ加工品(未加熱のもの)に適用した。)

均質に粉碎した試料500mgをポリプロピレン製遠沈管(2mL容)に量り採り、GE1緩衝液700 μ L、Proteinase K(20mg/mL)20 μ L、 α -Amylase(高濃度品)2 μ L、及び、RNase A(100mg/mL)10 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 $^{\circ}$ Cの条件で15分間加温した。GE2-K緩衝液(NIPPON GENE 製)85 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。13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で5分間遠心した。次いでその上清400 μ Lを1.5mLチューブに移し、GB3緩衝液(NIPPON GENE 製)150 μ L及びイソプロパノール150 μ Lを添加した後、10~12回転倒混和した。混合液700 μ Lをspin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てた。次

いでGW緩衝液(NIPPON GENE製)650 μ Lを負荷し、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で1分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnを新たな1.5mL容チューブに移し、水50 μ Lを加え3分間室温で静置した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C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。

2. シリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker 2 変法②)(ピーフン等の加熱加工品に適用)

均質に細粉碎した試料500 mgをポリプロピレン製遠沈管(15 mL容)に量り採り、GE1緩衝液2.1 mL、Proteinase K(20 mg/mL)60 μ L、 α -Amylase(高濃度品)6 μ L、及び、RNase A(100 mg/mL)30 μ Lを加え、試料塊が無いようにボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65 $^{\circ}$ Cの条件で30分間加温した。GE2-K緩衝液(NIPPON GENE製)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。6,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で15分間遠心した。上清を新しいチューブ(2 mL容)に移し、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で5分間遠心した。次いでその上清を新しいチューブ(15 mL容)に移し、上清1 mLに対してGB3緩衝液(NIPPON GENE製)375 μ L及びイソプロパノール375 μ Lを添加した後、10~12回転倒混和した。混合液を700 μ Lずつspin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てた。すべての混合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(NIPPON GENE製)650 μ Lを負荷し、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で1分間遠心し、溶出液を捨てた。spin columnを新しいチューブ(1.5 mL容)に移し、水50 μ Lを加え3分間室温で静置した後、13,000 \times g以上、4 $^{\circ}$ C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。

DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製と保存

DNA試料原液の適当量を取り、水を用いて適宜希釈し、200~320 nmの範囲で紫外外部吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度(O.D. 260及びO.D. 280)を記録した。次いでO.D. 260の値を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出した。またO.D. 260/O.D. 280を計算する。こ

の比が1.7~2.0になれば、DNAが十分に精製されていることとした。得られたDNA濃度から、DNA試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈してDNA試料液とし、適量ごとにマイクロ試料管に分注し、-20 $^{\circ}$ C以下で冷凍保存した。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄した。なお、DNA試料原液の濃度がPCRで規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試料液として用いた。

③GMコメ検出試験

GMコメ検出においては、63Btコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対及び63Btコメ検出用プローブ、NNBtコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対及びNNBtコメ検出用プローブ、KMD1コメ検出用試験としてKMD1コメ検出用のプライマー対及びKMD1コメ検出用プローブ、CpTIコメ検出用試験としてCpTI検出用プライマー対及びCpTI検出用プローブをそれぞれ使い、リアルタイムPCRの4試験を行い判定した。また、試験にあたっては、コメ陽性対照用試験として*phospholipase D* (PLD) 遺伝子配列を検知するプライマー対及びプローブを用いた。各プライマー及びプローブの塩基配列は以下の通りである。

コメ陽性対照用試験 (PLD)

コメ陽性対照用プライマー対、及び、プローブは以下の通りである。

KVM159 :

5' -TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'

KVM160 :

5' -CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'

TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

害虫抵抗性GMコメ検出用4試験

・63Btコメ検出用試験

Btコメ検出用のプライマー対、及び、プローブは以下の通りである。

T51-SF :

5' -GCAGGAGTGATTATCGACAGTTC-3'

OsNOS-R2 :

5' -AAGACCGCAACAGGATTCA-3'

63Btコメ検出用プローブ (GM63-Taq) :

FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA

・NNBtコメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマー対は 63Bt コメ検出用試験のプライマー対 (T51-SF と OsNOS-R2) と同様である。

NNbt コメ検出用プローブは以下の通りである。

NNbt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq) :

FAM-AATGAGAATTCGGTACCCCGACCTGCA-TAMRA

・KMD1 コメ検出用試験

KMD1 コメ検出用プライマー対、及び、プローブは以下の通りである。

KM2_for:

5' -TCCGCAATGTGTATTAAGTTGTCTAA-3'

KM1_rev:

5' -CCGATATGCCTGCCCATC T-3'

KMD1 コメ検出用プローブ (KM_p) :

FAM-CGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCCG-TAMRA

・CpTI コメ検出用試験

CpTI コメ検出用プライマー対、及び、プローブは以下の通りである。

CpTi-1F :

5' -CGTGTCACTCGGCTTGCA-3'

CpTi-1R :

5' -AACGACACTGCCTGGCATT-3'

CpTI コメ検出用プローブ (CpTi-P) :

FAM-ATCCTGCATGTGTACACG-MGB

各プライマー、プローブは水に溶解した。

④PCR用反応液の調製

1. コメ陽性対照用試験のPCR用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix12.5 μ L、5' 及び 3' プライマー (各 0.75 μ mol/L)、対照プローブ (300 nmol/L) を混合し、水で全量 20 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50 ng) を添加した。分注操作終了後、真上から MicroAmp Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を用いてシールし、完全に well を密閉した。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行った。最後に well の底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いた。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットした。

試験は、各 DNA 試料液あたり 2 well 並行で行うものとし、リアルタイム PCR のブランク反応液として、DNA 試料液を加えず水を代替試料液として加えたもの 1well 分についても同時に調製した。PCR 用反応試薬は 5 well 分 (2 DNA 試料液/1 検体 \times 2 well/ DNA 試料液+1 well/ブランク反応液) を調製した。

2. 害虫抵抗性 GM コメ検出用 3 試験 (63Bt コメ検出用試験、NNbt コメ検出用試験、CpTI コメ検出用試験)

各試験のPCR用反応液は25 μ L/wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix12.5 μ L、各検出用5' 及び3' プライマー (各0.75 μ mol/L)、各検出用プローブ (300 nmol/L) を混合し、水で全量20 μ Lに調製後、10 ng/ μ L DNA試料液5.0 μ L (50 ng) を添加した。分注操作終了後、真上からMicroAmp Optical Adhesive Cover (Life Technologies社) を用いてシールし、完全にwellを密閉した。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行った。最後にwellの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いた。プレートの確認後、MicroAmp Optical Cover Compression Padを茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットした。

各試験は、各DNA試料液あたり2 well並行で行うものとし、リアルタイムPCRのブランク反応液として、DNA試料液を加えず水を代替試料液として加えたもの1well分についても同時に調製した。各PCR用反応試薬は5 well分 (2 DNA試料液/1検体 \times 2 well/ DNA試料液+1 well/ ブランク反応液) を調製した。

⑤プレート情報の設定

新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行った。またプローブ特性に関しては、コメ陽性対照用試験、63Bt コメ検出用試験、NNbt コメ検出用試験又は KMD1 コメ検出用試験の場合には Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように、また CpTI コメ検出用試験の場合で Reporter が「FAM」、Quencher が「None」となるように設定した。なお、コメ陽性対照用、害虫抵抗性 GM コメ検出用試験各

4 試験のいずれとも、Passive Reference を「ROX」と設定した。

6. PCR増幅

装置にプレートセットし、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は以下のとおりである。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。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておいた。その後、95°C 20秒、60°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。Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行った。

⑦ 結果の解析と判定

コメ陽性対照用試験及び害虫抵抗性GMコメ検出用試験4試験の各試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。

まず害虫抵抗性GMコメ検出用試験4試験において目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、害虫抵抗性GMコメの陽性を疑った。次いで、ベースライン (3サイクルから15サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line)を選択した。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析すし。各DNA試料液においてコメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性GMコメ検出用試験3試験のいずれかの試験において、2つのDNA抽出液のうち1 wellでも48未満のCt値が得られた場合に、害虫抵抗性GMコメ陽性と判定した。コメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性GMコメ検出用試験3試験のいずれかの試験で48未満のCt値が得られない場合は、害虫抵抗性GMコメ陰性と判定した。なお上記判定により害虫抵抗性GMコメ陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な降下やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認すした。

また、コメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られないDNA試料については、再度、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法以降の操作を行い、それでも48未満のCt値が得られない場合には、

そのDNA試料液の測定結果を無効とし、48未満のCt値が得られたDNA試料液の結果だけで判定した。2つのDNA試料液ともにコメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られない場合には、改めて3回目の抽出を行い、さらにリアルタイムPCRを用いた定性PCR法以降の操作を実施して、判定を行った。3回目のDNA抽出液を用いた場合でもコメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とした。Amplification plot上でベースライン (3サイクルから15サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるTh. lineを選択した。

3. GMトマトの検知法開発に関する研究

①試料

トマト含有加工食品 (ケチャップ、ソース、チリソース、ピューレー、ジュース、ペースト、缶詰) は、東京都内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。また、生トマトも同様に国産品を東京都内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。

②試薬

DNAの抽出には、QIAGEN製イオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tip 20/G) を用いた。 α -amylase (高濃度品) は、(株)ニッポンジーン製を用いた。Proteinase Kは、QIAGEN製 (20 mg/mL) を用いた。RNaseAは、QIAGEN製 (100 mg/mL) を用いた。アガロースは、タカラバイオ(株)製のL03「TAKARA」(5003)を用いた。アガロースゲルからのDNA抽出精製には、QIAGEN製のQIAquick PCR purification kit、及びTOYOBO製のDNA Fragment Purification Kit「MagExtractor」を用いた。TAE緩衝液は、(株)ニッポンジーン製の遺伝子工学研究用 (x50) を希釈して用いた。DNAマーカーは、タカラバイオ(株)製の100 bpラダー (3407A) を用いた。Loading Buffer (6x) は、タカラバイオ(株)製 (Code No. 9156) を用いた。EtBr Solutionは、(株)ニッポンジーン製 (Code No. 315-90051) を用いた。キャピラリー電気泳動には、QIAecel DNA Screening Kit、QX DNA Size Marker 50-800 bp (50 μ L) (Cat. no. 929556)、およびQX Alignment Marker 15 bp/1 kb (1.5 mL) (Cat. no. 929521) を用いた。定性PCRの調製には、Applied Biosystems製のAmpli Taq Goldを用いた。定量リアルタイムPCRの調製には、Applied Biosystems

製の TaqMan Universal PCR Master Mix を用いた。プライマーはファスマック製のものを用いた。シーケンズ解析の調製には、Life Technologies 製の Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた。実験に使用した水は、日本ミリポア(株)製の Milli-Q Synthesis A10 で精製した超純水を用いた。その他の試薬は全て市販特級品を用いた。

③機器

粉碎機は、Retsch 製ミルサーミル MM200 を用いた。電子天秤は、ザルトリウスメカトロニクス(株)製 BP 210 S を用いた。恒温槽は、タイテック製ドライサーモユニット DTU-1B および WATER BATH SHAKER XY-80 を用いた。冷却遠心機は、Beckman 製 Avanti HP25、及びトミー製 MRX-150 を用いた。卓上遠心機は、フナコシ製 KR-1000 を用いた。タッチミキサーは、大和製 MT-51 を用いた。マイクロチューブミキサーは、KONTES 製 PELLET PESTLE を用いた。遠心エバポレーターは、miVac 製 DNA Concentrator を用いた。電気泳動装置は、コスモバイオ製 Mupid II を用いた。ゲルイメージ解析装置は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだものを用いた。キャピラリー電気泳動の装置には、QIAGEN 製 QIAxcel™ DNA を用いた。分光光度計は、Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop 1000 を用いた。サーマルサイクラーは、Applied Biosystems 製 GeneAmp PCR System 9700 を用いた。リアルタイム PCR は、ABI 製 PRISM 7900HT を用いた。シーケンサーは、ABI 製 PRISM 3700 DNA analyzer を用いた。

④DNA抽出精製

ペースト (5 g)、缶詰 (果実 5 g、種子 0.5 g)、ピューレー (3 g)、ケチャップ、ソース、チリソース、ジュース (15 mL) を用意した。固形物がある場合はミルサーを用いて粉碎した後 DNA の抽出精製を行った。国産生トマトの種子をコントロールとして用いた。Peano が以前報告しているように、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip 20/G) を用い、付属のプロトコルを改変し以下のように DNA の抽出精製を行った。試料をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、試料に、G2 緩衝液 (QIAGEN 製) 7.5 mL と α -amylase 20 μ L を加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、37°C で 1 時間加温した。

さらに G2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K 200 μ L、および RNaseA 20 μ L を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで攪拌し、50°C で 1 時間加温した。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。次いで、5,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離し、得られた上清を 2 mL ずつ 2 mL 容チューブ 5 本 (計 10 mL) に移し、20,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離した。あらかじめ QBT 緩衝液 (QIAGEN 製) 1 mL で平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/G に、各 2 mL 容チューブから上清を 1 mL ずつ採取し負荷した (計 5 mL)。次いで、チップを QC 緩衝液 (QIAGEN 製) で 2 mL ずつ 3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ 50°C に加温した QF 緩衝液 (QIAGEN 製) 500 μ L を負荷し、DNA を溶出した (溶出 1)。チップを新しい遠沈管に移し、さらに QF 緩衝液 (QIAGEN 製) 500 μ L で DNA を溶出した (溶出 2)。次いで、溶出液と等量のイソプロパノールを溶出 1 と溶出 2 にそれぞれ添加し、ゆっくり 10 回転倒混和した後、5 分間室温で静置した。12,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離し、上清を廃棄した後 70%エタノール 500 μ L を添加し、10 回転倒混和した。12,000 x g、4°C で 3 分間遠心分離した後、上清を破棄し、残った沈殿を適度に乾燥させる。溶出 2 の遠沈管にあらかじめ 60°C に加温した水 50 μ L を加えて沈殿物を溶解させ、その溶解液全量を溶出 1 の遠沈管に移し入れ、よく混合し、抽出 DNA 試料液とした。抽出 DNA 試料液は分光光度計 NanoDrop 1000 を用いて、260 nm の UV 吸光度を測定して DNA 濃度を定量化した。

⑤PCR反応

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下の通りである。Ampli^{Taq} Gold PCR Master Mix、0.6 μ M 対象プライマー対溶液を混合し、水で全量 20 μ L に調製後、DNA 試料液 5 μ L (50 ng) を添加した。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製した。

⑥PCR増幅条件

トマトに特異的な内在性遺伝子 (*LA752*) 検出用のプライマーを、Primer Select Lasergene 7 software を用いて設計した。このプライマーを用いた PCR によって鋳型 DNA の増幅を行った。装置

にチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下の通りである。95℃ 10 分間の条件で保持した後、95℃ 30 秒間、58℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った後、72℃ 7 分間の条件で保持した。増幅産物の解析は、PCR 増幅産物をアガロースゲルの電気泳動 (100V 30 分程度) を行い、0.5 μ g/mL の EtBr Solution の入った TAE 緩衝液中で 30 分程度染色し、その後、水で 30 分間洗浄を行った。泳動したゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。

⑦リアルタイムPCR反応

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。Universal 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) 各 0.9 μ M、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 1 μ M を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (25 ng) を添加した。PCR のブランク反応液として、DNA 試料液を加えないものについても同時に調製した。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉した。このとき、しわが寄らないよう注意して、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行った。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておいた。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットした。

⑧リアルタイムPCR反応プレート情報の設定

反応に際して、プレート情報の設定を行った。検体の配置と種類、及びプローブ特性の項目に関して設定を行った。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「NTC」 : Non-Template Control、「UNKN」 : DNA 試料液) の設定を行った。またプローブ特性に関しては、Lp は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定した。また、Passive Reference は「ROX」に設定した。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択した。

⑨リアルタイムPCR増幅条件

装置にチューブをセットし、反応とデータの取

り込みを開始した。反応条件は以下の通りである。50℃ 2 分間の条件で保持した後、95℃ 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、94℃ 30 秒間、60℃ 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行った。

⑩リアルタイムPCRのデータ解析

ベースラインを 3~15 サイクルに設定した。Ct 値をプロットするための ΔRn threshold は指数関数的な増幅の間、0.2~0.5 に設定した。指数関数的な増幅の Ct 値が 43 未満の場合、反応は積極的であるととした。もしも Ct 値を得ることができない場合は、反応は否定的であるととした。Ct 値が 43 未満の反応であっても、マルチコンポーネントでの増幅が確認できない場合、およびそれぞれの ΔRn の目視検査で判断される指数の増幅が確認できなければ、指数関数的な増幅の確認はできないとした。

4. 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発

1) 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) コメを対象とした DNA 抽出法

種籾は、水で洗浄した後、各粒を粉碎用チューブに入れ、粉碎器専用ラックに移し、粉碎器にセットした。粉碎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、2,000 rpm、15 秒間の条件下で粉碎し、その後、均質に粉碎した試料に、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℃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℃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℃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 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和した。混合液を 700 μ L 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°C20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°C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°C30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 ソフト(<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⁾。標的とした*Xa21G*プロモーター領域を増幅させるために使用したプライマー対は以下の通りである。

Xa21G regionI F3;

5' YAAATGAATTTGTGGAAYGAGAATYTTGAAAGGTAAA3'

Xa21G regionI R3;

5' CCRTACTATTCATCTATCCCCCTACTTTTCA3'

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。

7)リアルタイム PCR を用いたメチル化感受性制限酵素による DNA メチル化検出

精製 DNA 50 ng を *EcoRI* を用いて 37°C で 1 時間切断後、1/10 倍量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを混合してエタノール沈殿後、13,000 ×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心した。次いで 70% エタノールで洗浄し 13,000 ×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心し、エタノールを除去した後、水で全量を 50 μL に溶かした。

メチル化感受性制限酵素 (*HpaII* 又は *MspI*) を用いて、*EcoRI* 反応後精製した DNA を 37°C で一晩インキュベーションした。DNA メチル化率検量線は、*EcoRI* 反応後精製した DNA を 1/√3、1/3、1/10、1/30、1/100 倍希釈したサンプル検体を使用して作成した。リアルタイム PCR 反応は、QuantiTectSyBR (キアゲン社製) を使用して行った。反応液の組成は以下の通りである。2X QuantiTectSyBR 10 μL、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μmol/L) 0.2 μL、試料 2.5 μL を混合し、水で全量 20 μL に調製した。50°C、2 分間反応後、ホットスタート法で 95°C、15 分間の条件で保持し反応を開始した。その後、94°C 15 秒、60°C 30 秒、72°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。DNA メチル化率は、PCR 増幅曲線と Threshold Line 0.02 の交点 (Ct 値) を検量線に当てはめることで定量を行った。

8)メチル化感受性制限酵素を用いた MS-PCR 法による特定領域のメチル化レベルの検出

20 Units のメチル化感受性制限酵素 (*MspI*, *HspII*) と非メチル化感受性制限酵素 (*EcoRI*) を用いて DNA 試料 50 ng を 37°C で一晩、制限酵素反応に供した。反応後、10 ng 分を、直接、PCR に使用した。

9)DNA メチル化修飾

DNA 2 μg を 1.6 mM S-adenosylmethionine を加えた 1X NEBuffer2 (5 mM NaCl, 1 mM Tris-HCl(pH7.9), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM

dithiothreitol) と混合し、CpG Methyltransferase (M. SssI) 4 U で 37°C 1 時間反応させた。その後、65°C で 20 分間インキュベーションすることで酵素を失活させた。メチル化後の DNA の精製はエタノール沈殿することにより行った。

C. 研究結果

1. パパイヤ加工製品からのパパイヤ DNA 抽出精製法の検討と安全性未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法の開発

パパイヤを原料とする加工製品は多種多様であることから、まずパパイヤ DNA を抽出精製するための前処理方法について検討を行った (Table 1)。Genomic-tip 100/G を用いて DNA を抽出精製する上で、最も重要であったのが、イソプロパノール沈殿を行う DNA 溶出液の容量を最小限とすることであった。そこで、DNA 溶出における QF 緩衝液の採取条件を検討した。その結果、はじめに QF 緩衝液 1 mL をカラムに負荷した溶出液に DNA は検出されず、次の 2 mL 負荷により溶出した液に約 90% 以上の DNA が含まれることが明らかとなった (Fig. 1.)。したがって、100/G カラムの QF 緩衝液による溶出は、はじめの 1 mL を負荷した溶出液は採取せず、次の 2 mL 負荷による溶出液のみを採取することとした。

次に、DNA を抽出・精製する際に使用する酵素類 (α -Amylase、Cellulase および Proteinase K) の添加が抽出 DNA の収量および質に与える影響について検討した (Fig. 2.)。その結果、Cellulase の添加は、100/G に負荷した抽出液および QC 緩衝液を目詰まり無く滴下させる効果をもち、Proteinase K の添加は、抽出 DNA の量を増大させる効果があることが明らかになった。Cellulase は、セルロースのグリコシド結合を加水分解する酵素であることから、パパイヤの細胞壁を分解し、100/G の目詰まりを防ぐ効果につながったものと考えられた。一方、 α -Amylase の添加については、抽出 DNA 量の増大および質の向上等に顕著な影響は認められず、 α -Amylase 添加の効果は無いと考えられた。

安全性未審査の GM パパイヤ (PRSV-YK) の検査法 (食安監発 0222 号第 3 号、平成 23 年 2 月 2 日) で陽性反応のあった、パパイヤ苗 (P4) とパパイヤ果実 (P19) から精製した DNA を使用して、台湾の研究グループが開発した定性 PCR 法

(Transgenic Res., 18, 971-986, 2009)を用いて解析した。その結果、プライマー対 (Papa31/27, Papa56/57, Papa31/57, Papa32/59) で PCR 増幅が見られた (Fig. 3.)。その結果、両試料は台湾産 GM パパイア 16-0-1/17-0-5 系統であることが判明した。また、同時期に台湾で試験栽培されていたとされる別系統の 18-2-4 系統でないことが示唆された。得られた PCR 産物 (Papa31/27) のシーケンス解析から得られた DNA 塩基配列を BLASTn 解析に供し、16-0-1/17-0-5 系統のゲノムとコンストラクト構造配列の境界配列を明らかにした (Fig. 4.)。Ti プラスミドの Right border 領域とパパイアゲノムとの境界を特異的に検知するリアルタイム PCR 用プライマー・プローブ (プライマー対 16-0-1/17-0-5 1F/1R, 5' FAM 及び 3' TAMRA 標識プローブ 16-0-1/17-0-5 1P, アンプリコンサイズ; 88 bp) を設計した (Fig. 4.)。

2. 中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討

昨年度開発した CpTI 遺伝子が組込まれた GM コメのコンストラクトを検出するプライマー・プローブのデザインを Fig. 5. に示す。CpTI 遺伝子、及び ER retention signal の Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 配列を含むコンストラクト領域を特異的に検出するプライマー・プローブ (CpTI, KDEL) と、その他の GM コメ検出用プライマー・プローブを組み合わせるリアルタイム PCR を用いた GM コメのスクリーニングを行った。Bt トキシン遺伝子を組み込んだ Shanyou63 系統 Bt コメ検出用のプライマー・プローブ (Bt63)、KMD 系統を検出するプライマー・プローブ (NNBt)、KMD 系統には KMD1 と KMD2 が存在するため、KMD1 のみを検出する検出用プライマー・プローブ (KMD1)、及びコメの内在性遺伝子として *phospholipase D* を検出するプライマー・プローブ (KVM) を用いた。各検査用の塩基配列を Table2 に示す。

既に検疫所において Bt 系統擬陽性と判断されたもちコメ粉が混入した試料 4 サンプルを対象にリアルタイム PCR を行った結果を Table3 に示す。リアルタイム PCR の増幅曲線例を Fig. 6. に示す。全サンプルとも内在性遺伝子を標的とした KVM で増幅が確認された。また、CpTI および KDEL ではすべてのサンプルにおいて増幅が確認されたため、トリプシンインヒビター発現コンストラクトを含有していることが示唆された。Bt63 は全てのサンプルにおいて増幅が確認されず、NNBt での増幅が

確認されたことから、これらのコメは Shanyou63 系統を含まない Kemingdao 系統であることが確認された。さらに、KMD1 の増幅が確認されなかったことから、KMD2 の配列を含んでいると考えられた。

3. GM トマトの検知法開発に関する研究

市販のトマト加工品 55 検体に対しリアルタイム PCR を使用して GM トマト混入の実態調査を行ったところ、2 検体が CaMV 35S プロモーター擬陽性と判断された (Table4)。

次に CaMV の 35S プロモーター領域以外のゲノム配列を検出するためのプライマー対、CMV35S genome p-t F : 5' -GTAAGG GATGACGCACAA-3'、CMV35S genome p-t R : 5' -CGAAACCCTATAAGAACCCTAAT-3' を用いて PCR を行った。その結果、擬陽性検体 2 検体中 1 検体から電気泳動写真において増幅を確認した (Fig. 7.)。検出された配列が、ウィルス由来であるかを検出された増幅産物のシーケンス解析を行い BLASTn 検索を行ったところ、データベース上 CaMV 由来のゲノム配列 (GenBank:V00140) に 83% 一致した (Fig. 8.)。

4. 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発

メチルトランスフェラーゼ処理後、Xa21G プロモーター領域を中心にバイサルファイトシーケンシングした結果を Fig. 1 に示す。プライマー対 (Xa21G regionI F3 と Xa21G regionI R3) を用いて解析した結果、両プライマー間の 94 bp に存在するすべての CpG 配列のシトシンがメチル化されていることが確認された (Fig. 9.)。同解析法を用いて、日本晴種子 3 粒をバイサルファイトシーケンシング解析したところ、メチル化可能な 17 箇所のシトシンは、すべて高頻度で非メチル化されていることが示唆された (Fig. 10.)。解析した領域の 13 番目と 14 番目、25 番目と 26 番目、27 番目と 28 番目のシトシンのメチル化状態をメチル化感受性酵素 (*HpaII* 及び *MspI*) で処理した後、プライマー対 (Xa21G regionI F3 と Xa21G regionI R3) を使用して MS-PCR 解析を行った (Fig. 11.)。その結果、非メチル化感受性酵素 *EcoRI* と比較して、*HpaII* と *MspI* で処理した試料を鋳型に PCR 増幅産物を示す 150 bp のバンドが薄いことから、種籾において *Xa21G* プロモーター領域は、脱メチル化されていることが確認された。次に、メチル化感受性酵素とリアルタイム PCR 法を組合わせてメチル化の定量を行った (Fig. 12.)。その結果、*MspI* で

は、0.8%の切れ残りと思われる DNA があり、*HpaII* では DNA のわずか2%がメチル化されていることが示唆された。

D. 考察

1. パパイヤ加工製品からのパパイヤ DNA 抽出精製法の検討と安全性未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法の開発

1990 年代に台湾で開発された GM パパイヤ (PRSV-YK) は、合計 15 系統以上存在することが報告されている。その中で特に台湾国内の病原株 (YK 株) の感染に耐性であった台湾産 GM パパイヤ 16-0-1/17-0-5 系統と 18-2-4 系統が台湾国内で試験栽培されたと報告された。本研究では、16-0-1/17-0-5 系統特異的検知法を作成した。台湾産 GM パパイヤ陽性であった国内産パパイヤ製品を同検知法に供したところ、いずれも 16-0-1/17-0-5 系統陽性であった。このことから、国内に存在する台湾産 GM パパイヤの系統は 16-0-1/17-0-5 であることが示唆された。

2. 中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討

本研究で行ったリアルタイム PCR の結果、害虫抵抗性 KMD 系統の KMD2 に CpTI 及び KDEL の両検知法において増幅が確認されたことから、KMD2 の GM 米にトリプシンインヒビターを発現する GM 米が混入しているか、あるいは KMD2 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または別のベクターにより挿入されている可能性が示唆された。

3. GM トマトの検知法開発に関する研究

実態調査の結果、市販されているトマト加工製品 55 検体中 2 検体がリアルタイム PCR を用いた調査で CaMV 35S プロモーター配列混入の擬陽性と判断された。その 1 検体 (juice cocktail 3) において、CaMV のゲノム配列が検出された。その結果、擬陽性検体 juice cocktail 3 は、CaMV のコンタミネーションの可能性が高いと考えられた。juice cocktail 4 については、CaMV のゲノム配列が検出されなかったため、GM トマトの混入によりリアルタイム PCR の結果で CaMV 35S プロモーターが検出された可能性が考えられた。

4. 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発

Akimoto らの報告 (Ann. Bot., 100, 205-17, 2007) によると山田錦品種では、本報告で解析した

Xa21G プロモーター領域において、発芽後の苗の葉の全シトシン残基の 88.2%がメチル化されていることが報告された。本研究では、日本晴品種の種子について検討を行った。バイサルファイトシークエンシング又は MS-PCR の結果、種子 3 粒に共通して同程度の割合でメチル化されていることが確認された。リアルタイム PCR 法を用いたメチル化定量により、わずか2%のシトシンがメチル化されていることが示唆された。本研究結果から、品種間によるメチル化率の違いは無く、また日本晴種子ゲノム DNA は、発芽後に高メチル化される、あるいは、品種間によってメチル化修飾が異なることが示唆された。

E. 結論

1. パパイヤ加工製品からのパパイヤ DNA 抽出精製法の検討と安全性未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法の開発

過去の輸入実績によると、海外からのパパイヤ輸入は国内総生産量の 20 倍にもおよぶため、今後、PRSV-YK を含む安全性未承認 GM パパイヤの国内への流通を阻止することが求められる。

2. 中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討

4 種類の GM コメ検出用プライマー・プローブ (Bt63、NNBt、KMD1、CpTI) を組み合わせたリアルタイム PCR 解析を行った。この方法を用いることで、中国産安全性未承認の GM コメ混入の実態の詳細を解析することが可能となった。

3. GM トマトの検知法開発に関する研究

リアルタイム PCR を使用すれば、GM トマトに使用される可能性が高い CaMV 35S プロモーターを高感度に検出することが可能であることが明らかとなった。また、本研究により、国内で市販されているトマト加工製品に CaMV のコンタミネーションによる偽陽性判定の結果が得られる可能性が示唆された。今後、リアルタイム PCR を使用して CaMV ゲノム配列の検出と CaMV 35S プロモーターの検出を同時に行い、得られる Ct 値の差を検出することで GM トマトの混入を調査することが可能であると考えられた。

4. 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発

Xa21G プロモーター領域は、品種間によるメチル化率の違い、もしくは、日本晴種子ゲノム DNA は、発芽後数週間で高メチル化される領域である可能

性が示唆された。今後、GMイネ作成に頻用される自家プロモーターの*ActinI*プロモーター領域のメチル化率を追跡し、自家もしくは組換え技術により導入された配列のメチルパターンの違いを解明する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima R. Inter-laboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize *J. AOAC Int.* (2011), in press
- 2) Akiyama, H., Makiyama, D., Nakamura, K., Sasaki, N., Minegishi, Y., Mano, J., Kitta, K., Ozeki, Y., Teshima, R. A novel detection system for the genetically modified canola (*Brassica rapa*) line RT73. *Analytical Chemistry*, 82, 9909-9916 (2010).
- 3) Takabatake, R., Futo, S., Minegishi, Y., Watai, M., Sawada, C., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Hino, A., Kitta, K. Evaluation of quantitative PCR methods for genetically modified maize (MON863, NK603, TC1507 and T25). *Food Science and Technology Research*, 16, 421-430 (2010).
- 4) Nakamura, K., Yamada, C., Akiyama, H., Takabatake, R., Kitagawa, M., Kitta, K., Kawakami, H., Teshima, R.: Evaluation of tomato DNA fragmentation and PCR amplicon size for detection of tomato DNA in processed products. *Jpn J. Food Chem. Safety*, 17, 123-129 (2010).
- 5) Minematsu, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Harikai, N., Nakajima, O., Kitta, K., Teshima, R., Iizuka, T.: Extraction and purification method of rice DNA from rice powder containing Konjak flour. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 247-252 (2010).
- 6) 清水えり、布藤聡、増渕友子、峯岸恭孝、笠原正輝、穂山浩、手島玲子、日野明寛、真野潤一、古井聡、橘田和美、リアルタイムPCRによるDNA検査に好適なポリプロピレンチューブの選択方法、*食品衛生学雑誌*, 51, 43-47 (2010).
- 7) Oguchi, T., Onishi, M., Mano, J., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Furui, S., Kitta, K., Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize, DAS-59122-7, MIR604, MON863 and MON88017, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 92-100 (2010).
- 8) Akiyama, H., Sakata, K., Spiegelhalter, F., Furui, S., Nakashima, A., Kitta, K., Teshima, R., Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 maize, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 65-70 (2010).
- 9) 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, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 32-36 (2010).
- 10) Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Establishment and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean MON89788, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 242-246 (2010).
- 11) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, *JAOC Int.* in press (2010).

- 12) 穂山浩, 未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究, 食品衛生学雑誌, 51, J411-414 (2010).
- 13) 穂山浩, 未承認遺伝子組換え食品の検査法, 食品衛生研究, 60, 15-24 (2010).
- 14) 穂山浩, 橘田和美, 遺伝子組換え食品の検知と表示制度の動向と今後の課題, 食品衛生学雑誌, 51, 383-392 (2010)
2. 学会発表
- 1) Hiroshi Akiyama, The Regulatory Situation in Japan—Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food—, Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies, (2010.5).
- 2) 中村公亮, 穂山浩, 山田千尋, 佐藤里絵, 牧山太樹, 坂田こずえ, 川上浩, 真野潤一, 橘田和美, 手島玲子, カナダ産安全性未審査遺伝子組換え亜麻の検知法について(第一報), 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.5).
- 3) 穂山浩, 未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究, 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.5).
- 4) 高島令王奈, 大西真理, 小岩智宏, 布藤聡, 峯岸恭孝, 穂山浩, 手島玲子, 古井聡, 橘田和美, 遺伝子組換え(GM)ダイズ新系統 MON89788 の系統特異的定量検知法開発および妥当性の確認 日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6).
- 5) 田口大夢, 渡辺聡, 平尾宜司, 酒井信夫, 中村厚, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子, エビおよびカニの識別検出PCR法の特異性について, 日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6).
- 6) 中村厚, 酒井信夫, 川浦知子, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子, 魚肉すり身およびその加工食品に含まれる甲殻類の実態調査, 日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6).
- 7) 山田千尋, 中村公亮, 穂山浩, 高島令王奈, 北川麻美子, 橘田和美, 川上浩, 手島玲子, トマト含有加工食品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に向けて, 日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6).
- 8) 張替直輝, 吉田雄三, 橘田和美, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, プライマー伸長反応を使用した遺伝子組換え大豆の発色定量法, 日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6).
- 9) 伊東篤志, 田口朋之, 和気仁志, 穂山浩, 手島玲子, 佐々木伸大, 山田晃世, 小関良宏, DNAチップを用いた遺伝子組換え食品の遺伝子非増幅検出法の検討, 日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6).
- 10) 穂山浩, 食物アレルギーを誘発する原材料の検知法における最近の進歩について, 日本分析化学会表示・起源研究懇談会第3回講演会 (2010.7)
- 11) 穂山浩, 松岡英樹, 坂田こずえ, 中村里香, 高橋慎吾, 稲熊隆博, 戸塚護, 手島玲子, β -カロテン強化摂取の経口感作阻害と腸管粘膜免疫系への影響, 第17回日本免疫毒性学会学術大会 (2010.9)
- 12) 笠間菊子, 小熊恭代, 鈴木達也, 穂山浩, 大島赴夫, 小島幸一, 特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討, 第100回日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 13) 澤上一美, 杉浦水香, 小見川郁子, 國信康弘, 依田真一, 東條百合子, 小飯塚道典, 田島秀二, 穂山浩, 手島玲子, 齋藤桂吾, 村上明一, 丹野和信, 東隆親, 特定原材料等の新規同時多項目検査法の開発について—えび・かに検出への応用—第100回日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 14) 真野潤一, 谷中有香, 池津陽子, 大西真理, 布藤聡, 穂山浩, 手島玲子, 日野明寛, 高島令王奈, 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評価手法グループテストングの性能確認, 第100回日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 15) 大森清美, 中村公亮, 穂山浩, 濱岡志津子, 牧山太樹, 坂田こずえ, 笠原正輝, 橘田和美, 岸弘子, 藤巻照久, 手島玲子, 加工食品からのパパイヤDNA抽出精製法の検討, 第100回日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 16) 中村公亮, 穂山浩, 大森清美, 濱岡志津子, 牧山太樹, 坂田こずえ, 笠原正輝, 橘田和美, 手島玲子, ハワイ産遺伝子組換えパパイヤ55-1系統の特異的検知法の開発について, 第100回日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)

- 17) Mano, J., Shigemitsu, N., Ikezu, Y., Yanaka, Y., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., i Kitta, K., In-house validation of component reactions on the real-time PCR array for comprehensive GMO analysis, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
- 18) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta, K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
- 19) Ito, K., Yamamoto, T., Doi, H., Shoji, M., Kato, M., Akiyama, H., Adachi, R. Novel ELISA for determine food allergen in processed food, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
- 20) 穂山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橘田和美*1、手島玲子、2009年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第47回 全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 21) 穂山浩、遺伝子組換え食品の検査、知の市場 (食の総合管理特論) (2010.11)
- 22) Hiroshi Akiyama, Japanese Food Allergen Labeling, Seminar on Food Allergen : Opportunities and Challenges for Thai Food Industries (2010.11)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

DDBJ, AB583190 登録

図表

Table 1 パパイヤ加工製品からのパパイヤDNAの抽出と精製

サンプル	調製試料 採取量(g)	QF buffer 1mLずつ溶出 X回目	ラベル	DNA溶出容量		A260	A280	A230	260/280	260/230
				μ L (ng)	ng/uL					
缶詰										
PP-54-1	10.05	1	54-1-1	20 (8.2)	0.41	0.080	-0.001	0.006	-10.93	1.41
		2	54-1-2	20 (528)	26.40	0.528	0.283	0.254	1.87	2.08
		3	54-1-3	20 (138)	6.92	0.138	0.067	0.068	2.06	2.03
		4	54-1-4	20 (-2.6)	-0.13	-0.003	-0.010	0.001	0.26	-5.08
		5	54-1-5	20 (4.8)	0.24	0.005	0.012	0.006	0.39	0.75
PP-54-2	10.06	1	54-2-1	20 (8.4)	0.42	0.008	0.000	0.017	-418.11	0.49
		2	54-2-2	20 (568)	28.38	0.568	0.301	0.271	1.89	2.09
		3	54-2-3	20 (138)	6.9	0.138	0.069	0.088	1.99	1.56
		4	54-2-4	20 (12)	0.62	0.012	-0.009	0.016	-1.35	0.78
		5	54-2-5	20 (5.8)	0.29	0.006	0.006	0.011	0.92	0.53
PP-54-3	10.03	1	54-3-1	20 (43)	2.17	0.043	0.043	0.057	1.12	0.76
		2	54-3-2	20 (489)	24.45	0.489	0.489	0.238	1.84	2.05
		3	54-3-3	20 (137)	6.85	0.137	0.137	0.074	1.87	1.85
		4	54-3-4	20 (29)	1.45	0.029	0.029	0.026	1.31	1.12
		5	54-3-5	20 (9.8)	0.49	0.010	0.010	0.011	0.98	0.87
ドライフルーツ										
PP-9-1	10.00	1	9-1-1	20 (8.0)	0.40	0.008	-0.001	0.019	-5.80	0.42
		2	9-1-2	20 (1647)	82.36	1.647	0.856	0.723	1.92	2.28
		3	9-1-3	20 (584)	29.2	0.584	0.290	0.280	2.01	2.09
		4	9-1-4	20 (110)	5.49	0.110	0.059	0.064	1.87	1.72
		5	9-1-5	20 (25)	1.24	0.025	0.017	0.030	1.44	0.82
PP-9-2	10.03	1	9-2-1	20 (26)	1.31	0.026	0.012	0.031	2.11	0.86
		2	9-2-2	20 (1850)	92.52	1.850	0.949	0.794	1.95	2.33
		3	9-2-3	20 (928)	46.42	0.928	0.499	0.487	1.86	1.90
		4	9-2-4	20 (63)	3.14	0.063	0.023	0.046	2.67	1.37
		5	9-2-5	20 (37)	1.83	0.037	0.018	0.038	2.07	0.96
PP-9-3	10.00	1	9-3-1	20 (39)	1.95	0.039	0.024	0.042	1.65	0.94
		2	9-3-2	20 (1928)	86.38	1.728	0.891	0.754	1.94	2.29
		3	9-3-3	20 (1337)	66.86	1.337	0.686	0.650	1.95	2.06
		4	9-3-4	20 (98)	4.89	0.098	0.032	0.064	3.03	1.52
		5	9-3-5	20 (32)	1.62	0.032	0.010	0.042	3.33	0.77

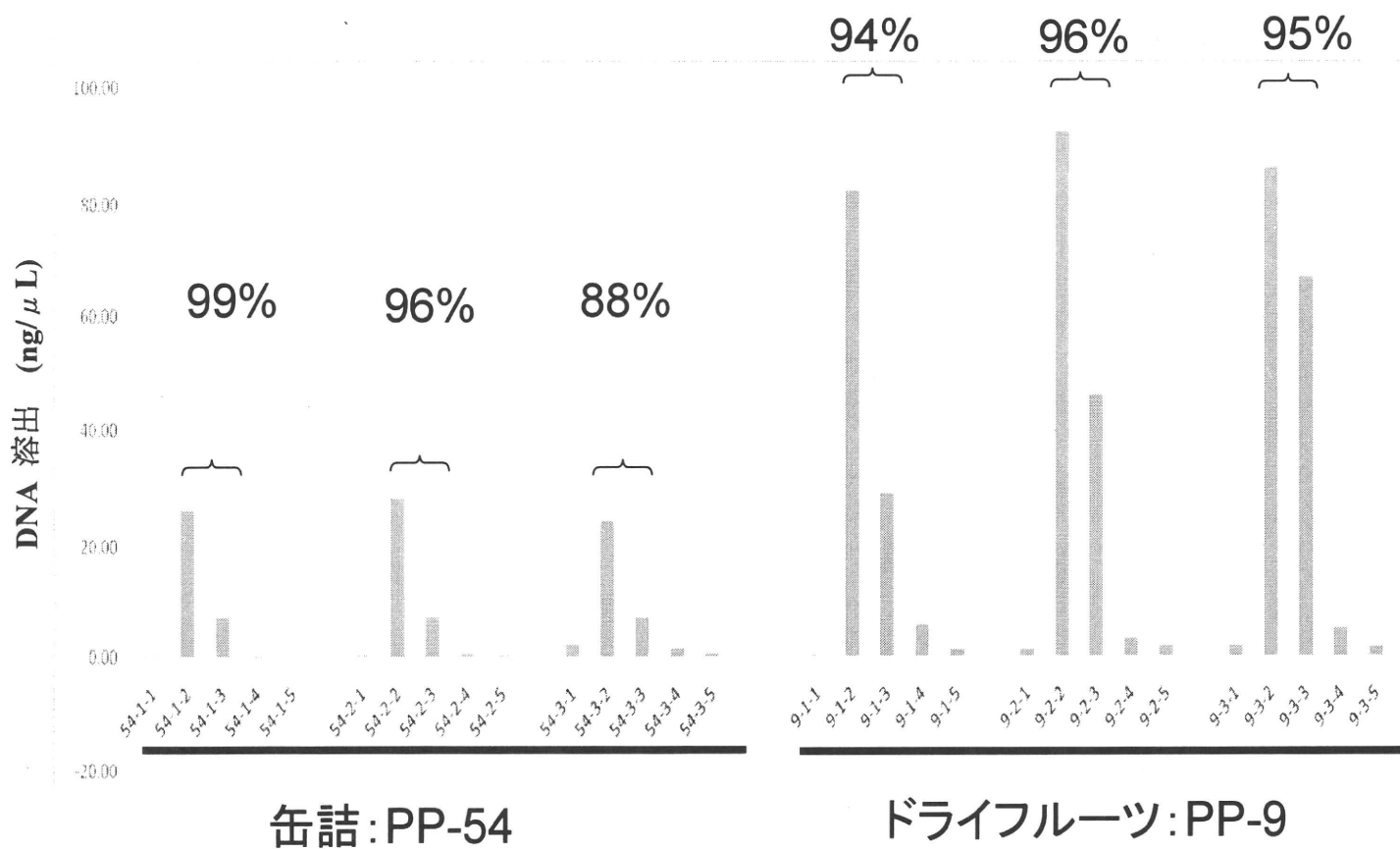


Fig. 1. DNA 溶出量の変化

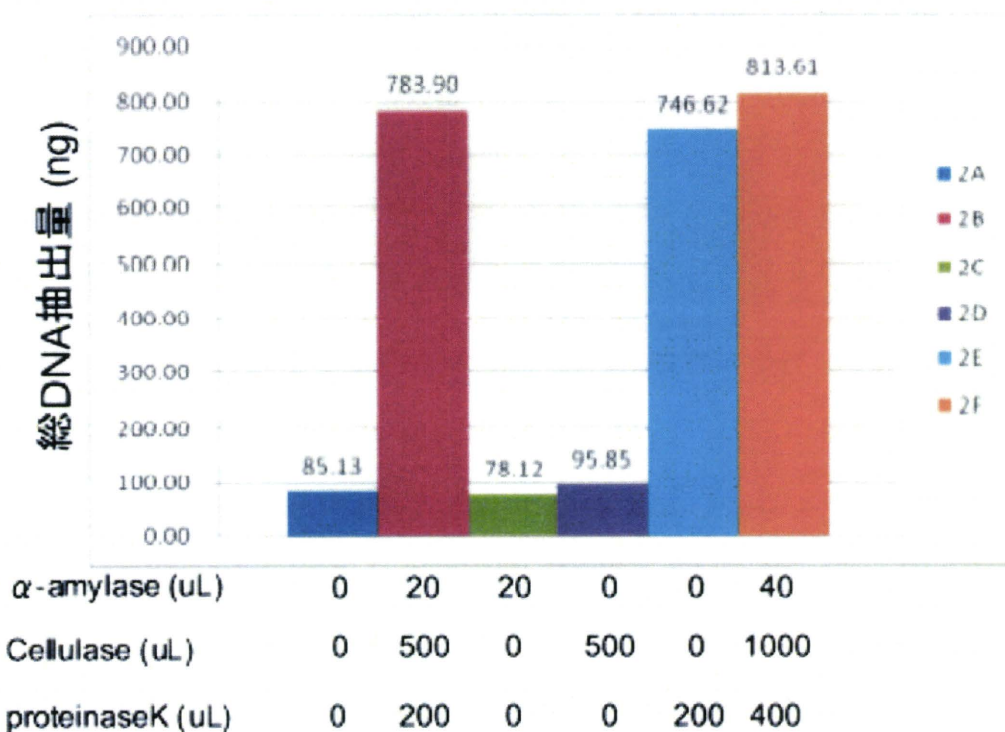


Fig. 2. 酵素処理による総DNA抽出量の変化

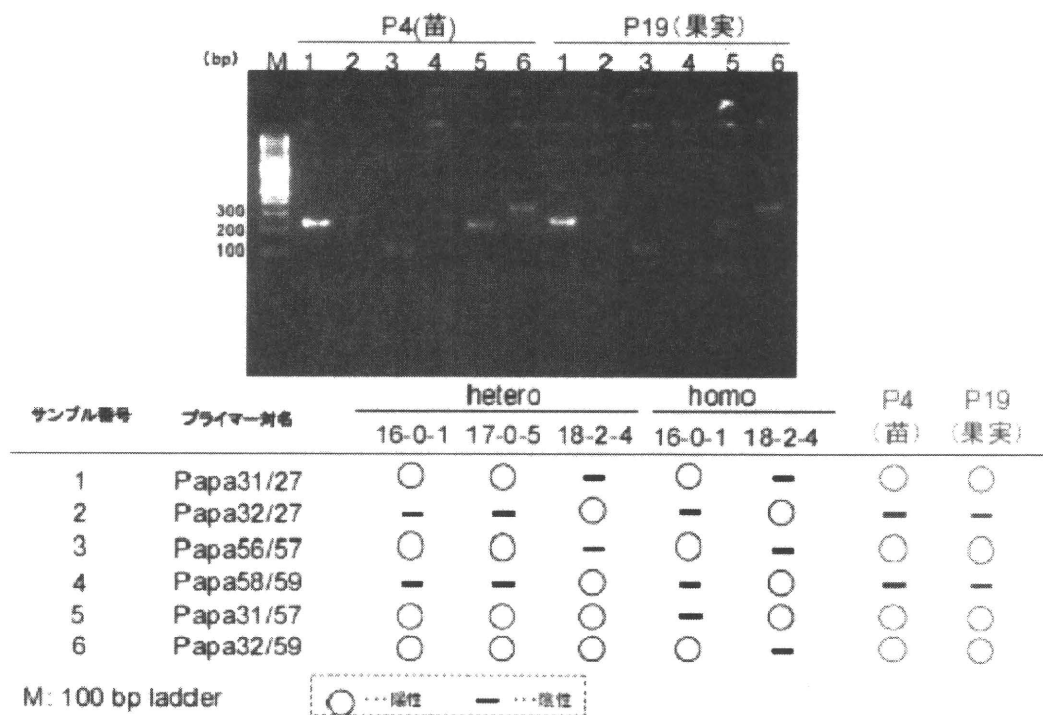
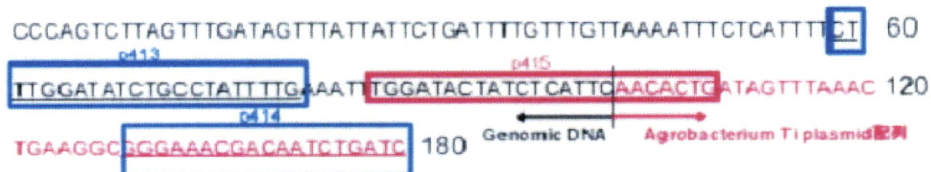


Fig. 3. 台湾産 GM パパイヤ (PRSV-YK) 系統の検証

サンプル:P4
プライマー:Papa31/27 primerset

Right border領域



p415: 16-0-1/17-0-5 1P

p413: 16-0-1/17-0-5 1F Amplicon = 88 bp

p414: 16-0-1/17-0-5 1R

Fig. 4. 台湾産 GM パパイヤ 16-0-1/17-0-1 系統の系統特異的検知法の検討

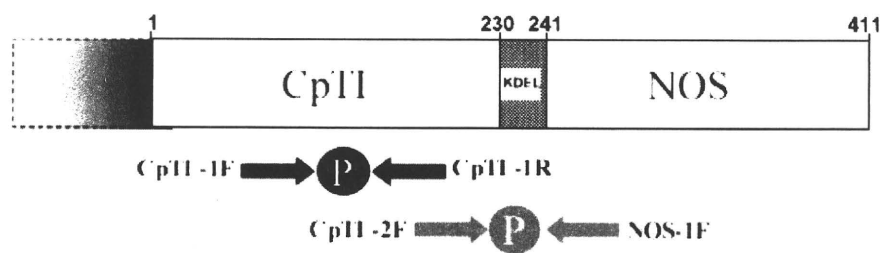


Fig. 5. CpTI 遺伝子が組込まれた GM コメのコンストラクトを検出するプライマー・プローブのデザイン