

また、平成23年度は、B細胞エピトープばかりでなく、免疫系の中でデータが充実しているT細胞エピトープの物理的特徴の抽出を行うために、エピトープのアミノ酸配列を収めた **Immune Epitope Database** よりマラリア原虫のT細胞エピトープを取得し、解析データとした。

(ii) 新規統合型アレルギーデータベース

(Allergen Database for Food Safety; ADFS) の更新について

平成21年度から平成23年度にかけて、前年6月から当年5月の間にNCBI PubMedに掲載された論文のうち、例年通りのキーワード検索によりエピトープ配列決定に関するものを抽出し、ピアレビューを行ってエピトープ情報を報告していると判断された文献に記載されているエピトープ情報をADFSのデータに追加した。で具体的に、3年間で、エピトープ既知のアレルゲン34種の情報を追加した。データベースの更新は、アレルゲン情報の更新、それに伴うMotifの更新と相まって、毎年3月に行った。なお、平成24年3月現在のアレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1552となり、エピトープ既知のアレルゲン数は165種となった。

また、低分子量のアレルゲンに関する情報がまとめられたデータベースというものは2010年3月現在ウェブ上には存在せず、わずかに「AllAllergy」というDr Harris Steinmanらによる低分子・高分子を問わない形式のデータベースがあるのみであった。

(<http://www.allallergy.net/>)。そこで、ADFSにも低分子アレルゲンの検索システムを導入することを意図して、平成22年、23年度に準備を行った。

AllAllergyには2010年10月現在5226種のエントリが登録されているが、その中には、動物名や総称など、低分子アレルゲンデータベースに掲載するにはふさわしくないエントリが多数含まれている。そこで、次の方法によりデータを精査・選別した。

- 1) AllAllergyの全データをHTMLでダウンロードし、Excelファイル形式に変換(5226件)。
- 2) 一般名称や動植物名などのエントリを削除(1906件)。
- 3) AllAllergyのDescription2種(IGE AND IMMUNEおよびNON IMMUNE)がともに「NilまたはUnknown」であるものを削除(1468件)。
- 4) AllAllergyのIGE AND IMMUNE:欄に、アレルギー・免疫系の関与を意図する記述がないエントリを削除(918件)。

なお、上記4)の作業時に、NCBI等の外部データベースから、CID(compound ID)やCAS番号な

どの情報を可能な限り取り入れた。

次に、上記データセットを基に、CTCラボラトリーシステムズ社に委託して、低分子アレルゲンデータベースのシステム開発を行った。URLは以前からのADFSと同一である(<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>)。画面はタンパク質アレルゲンと同様にメインウィンドウと詳細情報を表示するEntry Viewウィンドウとに分かれており、必要に応じNCBI PubChem等の外部サイトへのリンクが更に別ウィンドウで開くようになっている。

検索機能は下記の3種類を用意した。

- 1) Name Search: 低分子アレルゲンをアルファベット順にリストしたもの。
- 2) Keyword Search: 下記の15フィールドおよびそれら全てに対してキーワード検索をかけることができる。AllAllergy, Canonical SMILES, CAS Name, CAS Number, CID, Formula, InChI, InChI Key, Iso SMILES, IUPAC Name, Mol Weight, Name, Open Eye Name, Systemic Name, Traditional Name。
- 3) Structure Search: JChemPaint 3.2.0をエンジンとする構造検索ツールを実装した。これにより、ユーザーはクエリ構造を自分で描画し、部分一致あるいは完全一致により本データベースの化合物を検索することができる。

(3) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間での差を知るための網羅的解析

生物資源研究所より購入した10種(日本種6種 Nipponbare, Koshihikari, Sasanishiki, Akitakomachi, Hitomebore, Hinohikari、インディカ米1種 Kasalath、タイ米1種 Bleiyo、カリフォルニア米1種 Rexark、中国米1種 Cho-ko)の10種のコメの品種を用いて、それぞれ玄米を粉砕し、1N NaClで抽出し、抽出液中のタンパク質濃度をあわせて、2次元電気泳動用のサンプルとした。25ugのタンパク質を2-D Clean-Up Kitで精製後、日本晴は、内部標準品用としてCy2で標識し、一方、測定用として日本晴を含む10種の米をそれぞれCy3またはCy5で標識した。3種の蛍光剤で標識したコメ抽出タンパク質を等量混合し、溶液をImmobiline Drystrip (pH3-10 NL, 長さ13 cm)に付与した。Drystripを膨潤した後、1次元の等電点電気泳動は、20℃で、500 V, 4 hr; 1000 V, 1 hr; 8000 V, 4 hrの順で行い、次いで、stripを平衡化buffer(100mM Tris-HCl [pH8.0], 6M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS) containing 0.5% (w/v) DTTで平衡化後、2次元目は、10-20%のグラジエントゲル(DRC Co Ltd)を用いたSDS-PAGEを行った。2次元電気泳動後、

蛍光強度は、Typhoon 9400 画像解析装置 (GE Healthcare 社)にて、Cy2, Cy3, and Cy5 の蛍光色素をそれぞれ、520nm-bandpass (520BP40), 580nm-bandpass (580BP30), 670nm bandpass (670BP30) を用いて測定した。それぞれの蛍光色素標識で得られたスポットが一致するものか否かは、Decyder software version 6 (GE Healthcare)にて決定した。

また、コメタンパク質の2D-DIGEの他機関との国際バリデーション試験を開始した。参加機関は、国立医薬品食品衛生研究所、(独)農研機構 食品総合研究所の国内2機関、およびUniversity of New York Buffalo, Donald Danforth Plant Science Center, Proteomics Center University of Nevada Renoの国外3機関である。

バリデーションのサンプルには、(独)生物資源研究所より入手した日本晴、コシヒカリ、Bleiyu, Rexarkの4品種を用い、玄米を粉碎して各機関に送付した。各機関でコメタンパク質の抽出からタンパク質発現差異解析までを行い、検出スポット数および日本晴に対して5倍以上の発現差異がみられたスポット、さらにアレルゲンスポットのパターン及び発現差異結果を比較した。

C. 研究結果および考察

(1) 遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲンを含むタンパク質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入

(i) Non-GM及びDREB1A-GMジャガイモ塊茎からのタンパク質の抽出並びにアレルゲン並びにタンパク質の網羅的解析

遺伝子組換え (GM)、非組換え (Non-GM) ジャガイモ塊茎 1g あたり約 6mg のタンパク質が得られた。この抽出タンパク質を SDS-PAGE で分離後、CBB で染色したが、ジャガイモ中のタンパク質は種類が少なく、遺伝子組換え、非組換えジャガイモ間で顕著なパターンの変化はみられなかった。

次いで、各種アレルゲンに対するウサギポリクローナル抗体を用いた Western blot 法によるジャガイモ中に含まれる既知アレルゲンの定量的結果、Non-GM (NT)、GM (rd29A, 35S) ジャガイモ抽出物中のアレルゲン発現量に顕著な差はみられなかった。

ジャガイモ特異的 IgE 陽性血清を用いた IgE 結合タンパク質の1次元 SDS-PAGE 後の Western blot による検出実験からは、Non-GM および GM (rd29A, 35S) 間では患者血清 IgE と結合するタンパク質の分子量に大きな違いは見られないことが判明した。ほとんどのジャガイモアレルギー患者血清中の IgE は、既知アレルゲン Patatin (Sola t 1) と分子量の等しい 42kDa タンパク質との結合が認め

られた。その他、ジャガイモ抽出タンパク質のうち血清中の IgE と結合したタンパク質には、14kDa (Subject 13), 21kDa (Subject 1, 5, 7, 8, 10, 11, 14), 75kDa (Subject 4) の分子量のものがあり、患者による個人差はみられた。Non-GM および GM (35S) ジャガイモ抽出タンパク質の2次元電気泳動後の Western blot による IgE 結合タンパク質の質的変動解析実験においても、Non-GM と GM 間で変動はみられなかった。

発現タンパク質の定量的網羅的解析手法である 2D-DIGE 法による解析からは、以下の結果が得られた。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、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。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、ゲル内トリブ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 (パタチンのうち、酸性の等電点を持つイソタイプ) であった。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ことが望ましいと思われる。

(ii) Non-GM 及び RKN 抵抗性遺伝子導入 GM ジャガイモ塊茎からのタンパク質の抽出並びにタンパク質の網羅的解析

遺伝子組換え (TG; RKN low, RKN high)、非組換え (NT) ジャガイモにつき、2D-DIGE の解析を行った。Decyder ソフトウェアによりスポットのマッチングを行い、再現良く得られた 400 スポットのうち、TG/NT 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、RKN low 群では 35 スポットが、RKN high 群では 31 スポットが NT 群に比べて 2 倍

以上発現量が変動していた。これらのスポットタンパク質の発現量は、RKN low 群と RKN high 群のどちらも同様の発現変動を示した。NT 群に比べて TG 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。発現変動を示した 37 スポット中、16 スポットのタンパク質を同定することができた。NT 群と比較して RKN low 群、RKN high 群ともに発現が増加していたタンパク質スポットからは、cysteine proteinase inhibitor, cold inducible protein, aspartic proteinase inhibitor などが同定された。NT 群よりも発現が減少していたタンパク質からは、multicystatin が同定された。RKN 耐性遺伝子がコードするタンパク質の機能は明らかとなっていないが、本研究での RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモと野生型のジャガイモのタンパク質発現差異解析の結果、RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモで発現が増加していた cysteine proteinase inhibitor や aspartic proteinase inhibitor はそれぞれ Sola t 3、Sola t 2 として知られるジャガイモのアレルゲンであった。これらのアレルゲンタンパク質の発現増加が RKN 耐性遺伝子の導入によるものであるか、自然品種においても生育環境の違いによってみられるものであるかを今後、検討する必要があると考えられる。また、NT 群よりも発現が減少していた multicystatin も cysteine proteinase inhibitor ファミリーの 1 種であり、RKN 耐性遺伝子の機能との関連を解明する手助けとなる可能性があると思われる。

(iii) Non-GM 及び RBP-GM コメタンパク質の抽出並びにタンパク質の網羅的解析

(a) 通常栽培時の NT および RBP コメ間でのタンパク質発現差異解析

Decyder ソフトウェアによりスポットのマッチングを行い、再現良く得られた約 500 スポットのうち、RBP (通常) /NT (通常) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 以上あるいは 1/2 以下となるものを抽出した。その結果、NT 群に比べて 2 倍以上の発現変動がみられたスポットは 2 スポットのみであった。これらのスポットからタンパク質を抽出し、トリプシン消化ペプチドの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、Putative abscisic acid-induced protein (spot A) が同定された。

(b) ストレス栽培による NT コメのタンパク質発現変動

次に、200 mM NaCl の塩ストレス下で 30 h 栽培した NT コメと通常栽培の NT コメ間で、発現が変動しているタンパク質を解析した。

その結果、NT (ストレス) /NT (通常) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 倍以上となったスポットは 91 スポットであった。これらのスポットの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、91 スポット中 50 スポットを同定することができた (表 3)。塩ストレス栽培した NT コメでは、アレルゲンタンパク質 RAG1 (spot J)、RAG2 (spot K)、および IgE 結合タンパク質である 19 kDa globulin precursor (spot L) のタンパク質発現が増大していた。

(c) 塩ストレス栽培による RBP コメのタンパク質発現変動

同様に、塩ストレス下で栽培した RBP コメと通常栽培の RBP コメ間で、発現が変動しているタンパク質を解析した。その結果、RBP (ストレス) /RBP (通常) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 倍以上となったスポットは 7 スポットであった。これらのスポットタンパク質同定結果は、表 4 に示した。NT コメにおいて塩ストレス栽培で発現が変動したスポットの多くは RBP コメでは発現の変動がみられなかった。さらに、塩ストレス栽培 NT コメにおいて発現が大きく変動していた malic enzyme (spot F)、granule-bound starch synthase I (spot G)、putative abscisic acid-induced protein (spot A) の発現量の変動も、塩ストレス RBP コメでは小さかった。アレルゲンタンパク質 RAG1、RAG2、および IgE 結合タンパク質 19 kDa globulin precursor の発現は、RBP コメでは塩ストレスの有無により変動していなかった。

(d) 塩ストレス栽培時の NT および RBP コメ間でのタンパク質発現差異

塩ストレス栽培時の RBP および NT コメ間で、発現差の大きいタンパク質を解析した。その結果、RBP (ストレス) /NT (ストレス) の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 倍以上となったスポットは 36 スポットであった。これらのスポットの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、36 スポット中 20 スポットを同定することができた。塩ストレス栽培時に NT コメで発現が大きく減少していた Heat shock protein 101 (spot C)、Heat shock protein 90 (spot E)、Putative late embryogenesis abundant domain-containing protein (spot F)、Putative seed maturation protein (spot D) の発現と、塩ストレス栽培時に NT コメで発現が大きく増大していた Granule-bound starch synthase I (spot G)、Late embryogenesis abundant protein; expressed (spot H)、Cold shock domain protein (spot L) の発現に有意な差がみられた。

(e) 塩ストレス耐性遺伝子組換えスタックモデルタバコのタンパク質発現差異解析

タバコ葉から抽出したタンパク質を2D-DIGE法により2次元分離した後、Decyderソフトウェアによりスポットのマッチングを行ったところ、およそ700のスポットが再現良く検出された。まず、WTとSeFLA単独組換え株L11のタンパク質発現差異を解析し、L11/WTの蛍光比の平均値 (av. Ratio) が2以上あるいは1/2以下となるものを抽出した。その結果、WT群に比べて2倍以上の発現変動がみられたスポットは4スポットのみであった。次に、WTとRBP単独組換え株R74のタンパク質発現を比較したところ、3スポットにおいて2倍以上の発現差異が検出された。WTと、SeFLAおよびRBP組換えスタック株LR1のタンパク質発現を比較した結果、5スポットにおいて2倍以上の発現差異が検出された。また、WTとスタック株LR2間でタンパク質発現が2倍以上異なるスポットは、9スポットであった。単独組換え株では2倍以下の発現差異であったにもかかわらず、スタック株で2倍以上の発現差異が現れたスポットは6スポットであった。

なお、これらの発現差異を示したスポットに関しては、タンパク質含量が少ないため、現時点では、未同定である。

(2) 動物を用いるアレルギー性の検討

(i) DREB1A-GM 及び non-GM ジャガイモ抽出物の経口感作試験

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。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。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。

(ii) RKN-GM 及 non-GM ジャガイモ抽出物の経口感作試験

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 0.2 および陰性対照とした PEP 群 0.5 に対して、陽性対照とした OVA 群は 2.7 と上昇した。NG 群と GM 群のスコア平均は 1.0 および 0.5 であり、両群のスコアは同程度であった。本実験では Vehicle と OVA 群間にのみ有意差 ($p < 0.05$) を認めた。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、NG 群は 3/6 例、GM 群は 4/6 例のマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出された

(iii) RBP-GM 及び non-GM コメ抽出物の経口感作試験

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 0.5 に対して、陰性対照とした PEP 群は 0.0 と同レベルであった一方、陽性対照とした OVA 群は 2.3 と有意に上昇した。Vehicle 群に対して、通常および塩水栽培した組換えコメ系統 1 の GM1n および GM1s 群のスコアが有意に上昇した。しかし、通常および塩水栽培コメとも非組換えコメに対して組換えコメ群間に有意な差は認められなかった。また、組換えコメ系統 2 は Vehicle 群および非組換えコメ群に対していずれも有意な差は認められなかった。非組換え、組換えコメ系統 1 および組換えコメ系統 2 のいずれにおいても、通常および塩水栽培の間に差は認められなかった。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、通常栽培コメの NGn 群 3/7 例、GM1n 群 2/6 例、GM2n 群 0/6 例、塩水栽培コメの NGs 群 3/6 例、GM1s 群 2/6 例、GM2s 群 2/7 例のマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出された。

マウスの食物アレルギーモデルを用いて、通常および塩水栽培した2系統の遺伝子組換えコメおよび非組換えコメ抽出蛋白質の食物アレルギー性を比較した。それぞれのコメ抽出液を濃縮して1匹あたり蛋白質0.8 mgを週に2回の頻度で経口投与し、それぞれ蛋白質8 mg (2回目) で惹起した。通常および塩水栽培のそれぞれにおいて、非組換えコメに対して組換えコメ系統1および組換えコメ系統2ともアナフィラキシー症状のスコアに有意な差は認められなかった。抗原特異的IgG1抗体価検出の頻度および抗体価も同レベルであったことから、遺伝子組換えコメおよび非組換えコメの食物アレルギー性は同等であると考えられた。また、遺伝子組換えコメ1、遺伝子組換えコメ2および非組換えコメとも通常および塩水栽培間に食物アレルギー性の差は認められなかった。

(3) アレルギー予測の解析法

(i) タンパク質のアレルギー性のバイオインフ

オマティクス手法による予測

平成23年度においては、AUFインデックスを用いるT細胞エピトープの予測の可能性について検討した。

解析用のデータとして、エピトープのアミノ酸配列を収めたImmune Epi tope Databaseよりマラリア原虫のT細胞エピトープを取得した。これはエピトープ部分のデータしかないため、抗原タンパク質のアミノ酸配列全体はNCBIより取得した。また、タンパク質として細胞表面に出ている部分を注目するために、マラリア原虫由来の1本型膜貫通タンパク質をSOSUIMP1で抽出し、その細胞外ドメインのアミノ酸配列を用いた。

これまでの研究でAUFはタンパク質の結合性と関係していることが分かっている。そして、各アミノ酸は、それぞれの強度分布でAUFに寄与している。そこで、ユニバーサル分布とAUFインデックスを用いて、アミノ酸配列だけからAUFプロットを作ると、そのピークは結合部位になりやすさの傾向を示していると思われる。ただ実際のアミノ酸配列でAUFプロットを作ってみると、AUFピークは実際のエピトープ部分以外にもかなり多く存在している。従って、エピトープ配列断片を予測するには、結合部位となっているAUFピークと結合とは関係のないAUFピークとを、別のアルゴリズムでアミノ酸配列から判別しなければならない

ここでは1本型膜タンパク質における細胞外ドメインにおけるエピトープに注目し、細胞外ドメインの中でエピトープの位置関係を調べたところ、配列上膜に近い根元の領域と先端領域にエピトープが多く存在していることが分かった。もちろん同じ領域に、エピトープの存在しないタンパク質も少なくないので、例えば先端領域のアミノ酸配列を切り出し、そこにあるエピトープ中のAUFピークとそれ以外のAUFピークをデータとして抽出し、判別の2群のデータとした。そして、ピーク前後3残基の電荷密度をプロットした。これは正電荷密度と負電荷密度の2次元散布図に対して、頻度をバブルグラフ（頻度が円の大きさを示してある）で示したものである。興味深いことに、エピトープにあるAUFピークでは電荷の密度が低いのにに対して、エピトープ以外の部分でのAUFピークでは電荷密度が高いということが分かった。このことを利用してエピトープ部分の予測を試みたところ、高精度な予測結果が得られた。つまり、1本型膜タンパク質の細胞外ドメインの先端部分にあるエピトープについて、その3分の2は抽出することが可能で、予測されたエピトープの90%が正しい予測であった。以上、アレルゲンのアミノ酸配列に対する分布の解析から得ら

れたAUFインデックスを用いて、T細胞エピトープの予測が可能かどうかを調べてみた。T細胞エピトープは、一旦樹状細胞で消化され、ポリペプチドの形で提示されるもので、表面抗原であるアレルゲンのエピトープとは大きく異なると考えられている。しかし、実際に提示されるポリペプチド部分がアレルゲンのエピトープと同じような分子認識によって選ばれているとすれば、予測が可能かもしれないと考え行ったら、アレルゲンのアミノ酸の解析から得られた情報を用いてT細胞エピトープも予測可能であった。もちろんここでの解析対象は、マラリア原虫という1つの生物種に対して、1本型膜タンパク質の細胞外ドメインだけという限られたものであった。従って、全T細胞エピトープへの一般化は早計かもしれないが、物性的な特徴があつてエピトープ部分選ばれていることは、非常に重要な結果であると思われる。

(ii) アレルゲンデータベース (ADFS) の構築について

平成21-23年度の年1回の追加作業により、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1552本となった。また、エピトープ既知のアレルゲンの数は165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。また、低分子アレルゲンデータベース構築が平成23年度に終了し、これらの機能を実装した新バージョンのADFSは、平成24年3月22日にリリースされた。ユニークユーザ数は4月10日時点で1243名である。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間の差を知るための網羅的解析

コメタンパク質からは、およそ700スポットが再現性よく検出された。統計学的解析を行った結果、日本産6品種間のタンパク質発現差は少なく、日本晴における発現量に対し5倍以上の発現差を示したタンパク質スポット数は、いずれの品種も3以下であった。対して海外産4品種では、インド産のKasalathでは29スポット、タイ産のBleiyioでは23スポットが5倍以上の発現差を示した。アメリカ産のRexarkおよび中国産のCho-koはやや少なかったものの、それぞれ7スポット、9スポットが5倍以上の発現差を示した。日本晴と発現差異が5倍以上のみられたスポットからは、RA14やRA17などのアレルゲンタンパク質も同定された。

また、コメタンパク質の2D-DIGEの他機関との国際間バリデーション試験は、各機関ともデータのばらつきがあるが、データの収集が終わり、解析作業を継続中である。

D. 結論

(1) 遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲンを含むタンパク質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入

シロイヌナズナの乾燥耐性に関する転写因子 AtDREB1A 遺伝子を導入したジャガイモの塊茎、RKN(Root-knot nematodes)抵抗性遺伝子を導入したジャガイモの塊茎、RBP(RNA binding protein)を導入したコメ、塩ストレス耐性を付与する遺伝子 SeFLA および RBP を、それぞれ単独導入したタバコおよびスタック株を用いた葉をモデル植物として用い、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動及び 2D-DIGE によるタンパク質発現の量的、質的変動を調べた。DREB1A 遺伝子導入ジャガイモで、非組換え体に比べ、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。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

食物アレルギー動物モデル BALB/c マウスを用いて DREB1A 遺伝子導入ジャガイモとその非組換え体、RKN 抵抗性遺伝子導入ジャガイモとその非組換え体、RBP 遺伝子導入コメと非組換えコメの感作を行い、それぞれ組換え体と非組換え体のアレルゲン性について比較検討を行った。抗原特異的 IgG1 抗体産生及びアナフィラキシー症状に差がみられなかったことにより、組換えによってアレルギー誘発性が大きく異なる可能性は低いことが示された。

(3) アレルゲン予測の解析法では、

(i) タンパク質のアレルゲン性のバイオインフォマティクス手法による予測 - 既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片 (AUF) ピークを用いて T 細胞エピトープの予測も可能であることが示された。

(ii) アレルゲンデータベース (ADFS) の構築について - 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ゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の更新作業を3年連続で行った。3年間で文献検索により得られたエピトープ既知のアレルゲン34種を新たに ADFS に搭載し、平成24年3月時点で、搭載されているアレルゲン数1583本、エピトープ既知のアレルゲン数は165種となった。また、平成24年3月に低分子アレルゲンの検索画面を ADFS 内に立ち上げた。

(4) 発現タンパク質の 2D-DIGE による品種の差を知るための網羅的解析

2D-DIGE 法を用いて 10 品種の国産、国外のコメ塩抽出タンパク質の発現量の定量的に比較を行い、2D-DIGE が有用な方法であることが示された。また、4 品目のコメを用いる 5 機関での国際

バリデーション試験のデータの収集が終わり、解析を進めている。

E. 参考文献

- 1) http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/codex/code_x.html
- 2) EFSA GMO Panel: Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed., EFSA J. (2010) 8(7):1700, p1-p168

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. F65, 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) Teshima R, Nakamura R, Satoh R, Nakamura R. 2D-DIGE analysis of rice proteins from different cultivars. Regul. Toxicol. Pharmacol. 58 (3 Suppl), S30-5 (2010).
- 12) Nakamura R, Satoh R, Nakamura R, Shimazaki T, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Kikuchi A, Watanabe KN, Teshima R. Immunoproteomic and two-dimensional difference gel electrophoresis analysis of Arabidopsis dehydration response element-binding protein 1A (DREB1A)- transgenic potato. Biol. Pharm. Bull. 33 (8), 1418-25 (2010).
- 13) Asakawa N, Sakiyama N, Teshima R, Mitaku S. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. J. Biochem., 147, 127-133 (2010)
- 14) Satoh R, Nakamura R, Komatsu A, Oshima M, Teshima R. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. Regul. Toxicol. Pharmacol., 59, 437-444 (2011)
- 15) 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, 52, 1-9 (2011)
- 16) 手島玲子 非組換え植物の生物学的変化の評価とOmics技法の活用に関して、イルシー, 104, 4-8 (2011)
- 17) 手島玲子: わが国の食物アレルギー対策と検査法, 月刊フードケミカル, 2011-6, 19 (2011)
- 18) 手島玲子: アレルゲン検査の現状と課題, 日本小児アレルギー学会誌 25(1), 57 (2011)
- 19) 中村里香: プロテオミクス技術を用いたアレルゲン解析法, ぶんせき 2011-6, 350 (2011)
- 20) 手島玲子 経口感作の成立と消化管粘膜免疫機構、アレルギー・免疫 19(1), 40-44 (2012)
- 21) 中村里香、中村亮介、手島玲子 古代米(赤米・黒米)のアレルゲン発現プロテオミクス解析 日本食品化学学会会誌 18(3), 143-149 (2011)
- 22) 佐藤里絵、中村里香、手島玲子 イムノプロテオミクス手法を用いたソバIgE結合タンパク質の網羅的検出 日本食品化学学会会誌 18(2), 103-109 (2011)
- 23) Shindo T., Kanazawa Y., Saito Y., Kojima K., Ohsawa M., Teshima R. Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate. J. Toxicol. Sci. 37, 307-315 (2012)
- 24) Teshima R., Nakamura R., Satoh R. Proteomic and allergenic analyses of rice and potato proteins. Proceedings of the 3rd international symposium on "Frontiers in Agriculture Proteome Research" p124-p129 March(2012)
- 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)
- 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法ー培養細胞を用いた新規アレルギー試験法の開発ー, 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: アレルゲン研究の最前線, 日本食品化学学会第15回総会学術大会(2009.5)

17) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 手島玲子 2D-DIGE法による玄米10品種のプロテオーム解析 日本食品化学学会第16回総会・学術大会 (2010.6)

18) 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Fag e 2のIgEエピトープの同定 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2010.11)

19) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 島崎高嘉, 春日美江, 篠崎(山口)和子, 菊池彰, 渡邊和男, 手島玲子 Immunoproteomic and 2D-DIGE Analysis of Arabidopsis DREB1A-Transgenic Potato 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010.12)

20) 中村里香, 佐藤里絵, 手島玲子 赤米・黒米のアレルゲン発現プロテオミクス解析 日本薬学会第131回年会 (2011.3)

21) 中村亮介, 石渡亜耶乃, 樋口雅一, 中村里香, 川上 浩, 手島玲子 新しいアレルギー試験法 EXiLE法による加熱卵白アレルゲンのIgE応答性の解析 日本薬学会第131年会 (2011.3.)

22) 手島玲子 アレルゲン検査の現状と課題 第47回日本小児アレルギー学会 (2010.12)

23) 手島玲子 Allergenicity of Genetically Modified Foods 2010 FIP-PSWC/ AAPS(2010国際薬学会/米国薬学会合同会議) (2010.11)

24) 中村里香, 中村亮介, 手島玲子 赤米・黒米におけるアレルゲンタンパク質発現量の解析 日本食品化学学会第17回総会・学術大会 (2011.6)

25) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 島崎高嘉, 春日美江, 篠崎(山口)和子, 菊池彰, 渡邊和男, 手島玲子 プロテオミクス手法を用いた Arabidopsis DREB1A-組換えジャガイモのアレルゲン性試験 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

26) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 手島玲子 プロテオミクスを用いたコメアレルゲンタンパク質アイソフォームの解析 第84回日本生化学会大会 (2011.9)

27) Nakamura R., Nakamura R., Teshima R. Proteomic analysis of rice allergens in red rice and black rice.

(Proteomic and allergenomic analyses of rice and potato proteins. 3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research (2011.11)

28) Teshima R. Proteomic and allergenomic analyses of rice and potato proteins. 3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research (2011.11)

29) Satoh R., Nakamura R., Komatsu A., Teshima R. Immunoproteomic analysis of rice allergens between non-transgenic and transgenic plants with high-level tryptophan accumulation. 3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research (2011.11)

30) 中村里香, 中村亮介, 小関良弘, 手島玲子 ストレス耐性遺伝子を導入した遺伝子組換えイネ種子のアレルゲン性評価 第132回日本薬学会年会 (2012.3)

31) 中村里香, 佐藤里絵, 手島玲子 赤米・黒米のアレルゲン発現プロテオミクス解析 日本薬学会第131回年会 (2011.3)

32) 中村亮介, 石渡亜耶乃, 樋口雅一, 中村里香, 川上 浩, 手島玲子 新しいアレルギー試験法 EXiLE法による加熱卵白アレルゲンのIgE応答性の解析 日本薬学会第131年会 (2011.3)

33) 手島玲子, 中村亮介, 食物アレルゲンの消化と抗原性. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2011.11)

34) 佐藤里絵, 中村里香, 手島玲子, ソバ IgE 結合タンパク質の網羅的検出. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(2011.11)

34) Teshima R. Characterization of food allergen, its prediction, and regulation of food containing allergic ingredients in Japan. Joint Congress of APAPARI 2011 & 48th JSPACI (2011.10)

35) 香取輝美, 新藤智子, 大沢基保, 小島幸一, 手島玲子, 食物アレルゲン性の *in vitro* 評価系の開発: (3) *In vitro* 消化処理の適用方法. 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

36) 新藤智子, 香取輝美, 金澤由基子, 小島幸一, 手島玲子, マウスの経口食物アレルギーモデルの発症機序: 腸管における IgA 産生の変化. 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

37) 石渡亜耶乃, 中村亮介, 樋口雅一, 内田好海, 中村里香, 川上 浩, 宇理須厚雄, 手島玲子, 培養細胞を用いた加熱卵白のアレルゲン性の解析, 第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9)

38) Adachi, R., Sakai, S., Nakamura, A., Akiyama, H., Teshima, R., Urisu, A. A novel protein extraction method for ELISA to determine food allergens in processed foods. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011.9)

39)Kimura Y, Katayama S., Teshima R.,
Akiyama H., Nozawa A., Tozawa T., Nakamura
S. Analysis of T cell epitopes of a major
buckwheat allergen, Fag e 2, by using cell-free
protein synthesis system. 第7回無細胞科学松
山国際シンポジウム(2011.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の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
総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

組換え植物の検知技術の開発に関する研究

研究分担者 近藤 一成 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： トマト内在性遺伝子 *LAT 52* を標的としたプライマーアッセイ法により、100 bp 以下の遺伝子を標的に PCR 法を用いれば、トマト加工品に意図せず混入する可能性のある未承認 GM トマトを検知できる検知法を開発可能であることが示唆された。また、国内で消費される主なトマト加工品を中心に GM トマト混入の検査法の確立と実態調査を行った。

2. GM 亜麻の検知法開発に関する研究： 除草剤耐性な変異型 ALS 遺伝子を有する GM 亜麻を高感度かつ特異的に検知する方法を開発した。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 検体から安全性未承認 GM 亜麻 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。

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 サケに組み込まれる可能性のある OPAPCsGH 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。並行してサケ加工品を中心に GM サケ混入に関する実態調査を行った。

4. GM コメの検知法に関する研究： 一部のコメ加工品において、従来のシリカゲル膜を利用したコメ DNA 抽出精製方法では十分な DNA の抽出精製ができず real-time PCR 反応を用いた高感度な検出が困難であった。そこで、より多様な加工品に対応できるコメ DNA 抽出精製方法の開発を行った。また、リアルタイム PCR を使用したコメ内在性遺伝子 PLD について、従来の方法では 100% トウモロコシ試料において弱いながら反応する (Ct40<) ことが確認されたことから、より特異性の高い高感度なコメ内在性標的配列を検出する方法を開発した。

未知 Bt 系統混入もち米検体に、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現コンストラクト配列の混入を検出した。この領域から、新規検知法開発に必要な同コンストラクトの未知領域を明らかにするため、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。次に、トリプシンインヒビター-CpTI 発現カセットを特異的に検知するコンストラクト特異的検知法の確立を行った。中国産 GM コメ混入の実態を明らかにするため、これまでに開発した一連の GM コメ検知法と併せて安全性未承認 GM コメを検出する解析方法の検討を行った。2009 年 11 月に中国で安全性認可が与えられた害虫抵抗性 GM コメ系統である Shanyou63 (63Bt) は、白葉枯病菌に感染しやすいことから白葉枯病原菌 *Xanthomonas oryzae* 耐性 *Xa21* を発現させたスタック品種の開発が報告された。そこで、アフリカの野生イネ由来の遺伝子 *Xa21* のシーケンス解析から得られた情報を基に、リアルタイム PCR を用いた *Xa21* コメの検知法の確立を試みた。アフリカの野生イネ由来遺伝子 *Xa21* を検出する特異的プライマー対を用いて輸入コメ加工品を検査したところ、野生型コメ検体からは検出されないシーケンスを得た。

これまでの結果及び文献等の情報を基に、GM コメの混入検査を含めたコメ加工品の GM コメ混入に関する実態調査を行った。

5. 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遺伝子組換え (GM) パパイヤ検知法の開発: パパイヤ加工製品から精製度の高いパパイヤ DNA の抽出・精製法を確立し、台湾産安全性未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法を開発した。また、GM パパイヤ含有に関するパパイヤ加工品の実態調査を行った。

6. 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。そこで、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た。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の開発を目指した。

また、発芽前の種籾を取り上げ、稲の主要病害である白葉枯病の病原菌 *X. oryzae* に抵抗性誘導活性を有するタンパク質 Xa21G の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、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配列を検出する識別検知法を開発の可能性を探ることを目的とした。

協力研究者

穂山 浩、中村 公亮、小林 友子
(国立医薬品食品衛生研究所)
橋田 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3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3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

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 μL) (Cat. no. 929556)、及び、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 *AmpliTaq 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了。シーケンス解析の調製には、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、及び、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 PRISMTM 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、及び、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。AmpliTaq 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 (*LAT52*) 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°C 10 分間の条件で保持した後、95°C 30 秒間、58°C 30 秒間、72°C 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°C 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 製ケミルミイメーリアライザーに 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°C 2 分間の条件で保持した後、95°C 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°C 30 秒間、60°C 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 Δ Rn 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、及び、それぞれの Δ Rn 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。

⑪トマト加工品の実態調査

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、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、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 (GenBank no. : 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研究

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 μ 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/ μ 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: GCTCAACCCAGTCACCACCT
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 の肝臓を抽出し、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）を用いて PCR 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'-agtccagcaggaatatcttgttcag-3'

Sequence-124T プローブ:

5'-FAM-tcaatgactttgacgggtaccctgttg-TAMRA-3'

内源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 no.: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'-tgtgccgctagagggtgaaatt-3'

18S R:5'-gcaaagctttcgtcttcg-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 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μmol/L）0.25 μL、対象プローブ溶液（10 μmol/L）0.5 μL を混合し、水で全量 22.5 μL に調製後、10 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL 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.GM コメの検知法に関する研究

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。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 (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 (*Bam*HI, *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 × 制限酵素バッファーを 1 μL、制限酵素は 10U、DW で 10ul に調製した。

② 1 塩基伸長

それぞれに、klenow enzyme (3'→5' exo-)5U を 1 μL 加え、*Bam*HI, *Bgl*II, *Bcl*I 処理したサンプルについては dGTP (1 mM) を 1 μL 加えた。*Spe* I, *Nhe* I, *Xba*I, *Avr*II については dCTP (1 mM) を 1ul 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 14ul 加え、*Bam*HI, *Bgl*II, *Bcl*I 処理したサンプルについては RWA-1 を 2ul、*Spe* I, *Nhe* I, *Xba* I, *Avr* II については RWA-2 を 2ul 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 μL 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 μL、KOD-Plus-(1U/ul) を 1 μL、10XPCR Buffer を 5 μL、2 mM dNTPs を 5 μL、25 mM MgSO₄ を 2 μL、WP-1 を 1 μL、*Sp1* rice no.2 プライマーを 10pmol、最後に DW で 50 μL に調製した。PCR 条件は、94°C 2 分に変性させ、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 μL、KOD-Plus-(1U/μL) を 1 μL、10XPCR Buffer を 5 μL、2mM dNTPs を 5 μL、25 mM MgSO₄ を 2 μL、WP-2 を 1 μL、*Sp2* rice no.2 プライマーを 10 pmol、最後に DW で 50 μL になるよう調製した。PCR 条件は、94°C 2 分に変性させ、94°C 30 秒、65°C 30 秒、68°C 5 分、を 30 サイクル行った。

中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討

① 試験料

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。

② DNA 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。

③ 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。))

均質に粉砕した試料 500 mg をポリプロピレン製遠沈管 (2 mL 容) に量り採り、GE1 緩衝液 700 μL、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μL、α-Amylase (高濃度品) 2 μL、及び、RNase A (100 mg/mL) 10 μL 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 15 分間加温した。GE2-K 緩衝液 (NIPPON GENE 製) 85 μL 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 × g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心した。次いでその上清 400 μL を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 (NIPPON GENE 製) 150 μL、及び、イソプロパノール 150 μL を添加した後、10~12 回転倒混和した。混合液 700 μL を 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。次いで GW 緩衝液 (NIPPON GENE 製) 650 μL を負荷し、13,000 × g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 μL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 × g 以上、4°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 (ビーフン等の加熱加工品に適用))

均質に細粉砕した試料 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 μL、α-Amylase (高濃度品) 6 μL、及び、RNase A (100 mg/mL) 30 μL 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℃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 x g 以上、4℃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 x g 以上、4℃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 x g 以上、4℃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 x g 以上、4℃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 x g 以上、4℃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。

④DNA 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 試料原液の適量を取り、水を用いて適宜希釈し、200-320 nm の範囲で紫外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℃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。

⑤GM 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用い、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 :
TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT
KVM160 :
CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC
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 :
GCAGGAGTGATTATCGACAGTTC
OsNOS-R2 :
AAGACCGCAACAGGATTCA
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 :
TCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAA
KM1_rev :
CCGATATGCCTGCCCATCT
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 :
CGTGTCACCTCGGCTTGCA

CpTi-1R :

AACGACACTTGCTGGCATT

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。

⑥PCR 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 Mix 12.5 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用器具を用いて行った。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 Mix 12.5 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用器具を用いて行った。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。

⑦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。

⑧PCR 増幅

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。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。

⑨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 ΔR_n 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。

コメ加工品からのコメDNA抽出精製法の改良

1. 試験試料

コメ加工品としてコメ粉、及び、コメ加工品(ビーフン、フォー用乾麺、ライスペーパー)をインターネットにて購入し入手した。コメ対象試験用として非GMコメ(日本晴、JP No. 9046)を農業生物資源ジーンバンクより入手した。

2. DNA抽出精製

DNA抽出精製は、従来法に従ったシリカゲル膜タイプのNIPPON GENE社製GM quicker 2キットとGenetic ID NA社製FAST ID、及び、イオン交換樹脂タイプのQIAGEN社製Genomic-tipとGLサイエンス社製mono FASを使用した。コメ加工品の検体採取、及び、粉碎については、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成13年3月27日付け食発第110号)に従った。ライスペーパーに関しては、手で3cm角程度に千切り、ミルサーで十分粉碎し試料とした。 β -amylase(高濃度品)はNippon Gene社製(特注品)、RNase AはQIAGEN社製(100 mg/mL, Cat. no. 19101)、

Proteinase KはQIAGEN社製(20 mg/mL, Cat. no. 19133)を用いた。

① シリカゲル膜タイプ GM quicker 2 変法 (Quicker)

均質に細粉碎した試料 500 mgに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を添加し、混和した。65°C、30分間加温した後、GE2-K緩衝液 225 μ Lを添加し混和した。氷上に10分間静置後、6,000 x g以上、4°Cで15分間遠心した上清を新しい 2 mLチューブに移し、13,000 x g以上、4°C、5分間で遠心した。次いでその上清を新しい 1.5 mL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、10~12回転倒混和した。その混合液を700 μ Lずつspin columnに負荷した後、13,000 x g以上、4°C、30秒間で遠心し、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。さらに、GW緩衝液 650 μ Lを負荷し、13,000 x g以上、4°C、1分間で遠心し、溶出液を捨てた。最後に、spin columnを新しいチューブに移し、水 50 μ Lを加え3分間室温で静置した後、13,000 x g以上、4°C、1分間で遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とした。

② イオン交換樹脂タイプ mono FAS 変法 (mono)

均質に細粉碎した試料 0.2 gは、Buffer A 1 mL、 α -amylase 5 μ L、RNase A 20 μ L、Proteinase K 50 μ Lを加え混合し、50°C、30分保温した。次に、Buffer B 150 μ Lを混和し、5,000 x g、4°C、15分間遠心した。得られた上清 700 μ Lに対し、Buffer C 400 μ Lを加え、5-10回転倒混和し、20,000 x g、4°Cで遠心した。得られた上清をmonoFAS columnに負荷し、20,000 x g、4°Cで遠心後、溶出液は捨てた。Buffer D 600 μ Lを負荷し、20,000 x g、4°Cで遠心後、溶出液は捨てた。Buffer E 50 μ Lに溶解し、DNA試料原液とした。

③ イオン交換樹脂タイプ Genomic-tip 変法 (QIA)

・試料 500 mgからのDNA抽出精製

均質に細粉碎した試料 500 mgにG2 緩衝液 7.5 mL、 α -amylase (高濃度品) 6 μ LとRNase A (100 mg/mL) 30 μ Lを加え混合し、37°Cで30分保温した。次に、G2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K (20 mg/mL) 60 μ Lを加え混合し、65°Cで30分保温した。その後、その遠沈管を3,000 x g、4°C、15分間遠心した。その間、あらかじめ50 mL遠沈管上にQIAGEN Genomic-tip 100/GをセットしQBT緩衝液 4 mLを通して平衡化した。遠心終了後、得られた上清を、

平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷した。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/GをQC緩衝液で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1 mLを負荷し、溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/Gを新しい遠沈管上にセットし、再度50°Cに温めておいたQF緩衝液2 mLを負荷し、DNAを溶出した。DNA溶出液にイソプロピルアルコール2 mLを加えよく混合した。マイクロ遠沈管 (1.5 mL容) 1本あたり1 mL程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000×g以上で、4°C、15分間遠心した。上清を捨て、70% (v/v) エタノールを1 mLずつ10,000×g以上で4°C、5分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を風乾させた後、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。

・試料 2 gからのDNA抽出精製

均質に細粉碎した試料2 gは、G2 緩衝液 15 mL、 α -amylase (高濃度品) 12 μ L、RNase A (100 mg/mL) 60 μ Lを加え混合し、37°Cで30分保温した。次に、Proteinase K (20 mg/mL) 60 μ Lを加え混合し、65°Cで30分保温した。以下、上記と同様の操作を行い、DNA試料原液を得た。

④ シリカゲル膜タイプ FAST ID 変法 (ID)

均質に細粉碎した試料 0.2 g は、Genome Lyse Buffer 1 mL、 α -amylase 5 μ L、RNaseA 1 μ L、Proteinase K 10 μ L を加え混合し、65°C、30 分保温した。次に、13,000×g、4°C、5 分間遠心し得られた上清 500 μ L に対し、Bind Buffer 500 μ L を加え、13,000×g、4°C、5 分間遠心した。得られた上清を Binding column に負荷し、10,000×g、4°Cで遠心後、溶出液は捨てた。Wash Buffer 800 μ L を負荷し、13,000×g、4°Cで遠心後、溶出液は捨てた。75%(v/v)エタノールで3回洗浄後、65°C 10 分間、水 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とした。

3. 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を計算し純度を推定した。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。

4. real-time PCRに用いたプライマー対、及び、

プローブ

コメ陽性対照用のプライマー対、及び、プローブは、以下の配列のものを使用した。

プライマー対：

KVM159 : TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT

KVM160 : CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC

プローブ：

TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

5. real-time PCR反応、及び、結果解析と判定

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 Mix 12.5 μ L、プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各0.4 μ L、プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.25 μ Lを混合し、DNA試料液 5 μ L (10 ng/ 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についても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、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 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。測定結果の解析は、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。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。48未満のCt値が得られた場合、陽性と判定した。

コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発

1. 試験試料

コメDNA検出法の特異性確認試験のため、トウモロコシ (スーパーで購入)、オオムギ (在来裸麦、JP: 16719)、カラスムギ (*A. fatua* オーストラリア産、JP: 41387)、ヒヨコマメ (T-87-2、JP: 97097)、テンサイ (はるまさり、JP: 97097)、コムギ (東錦、JP: 20684)、ワタ (伯州綿、JP: 222117)、コメ (日本晴、JP No. 9046)、ダイズ (スーパーで購入)、アマ (スーパーで購入)、ナタネ (*B. rapus*: 東北3号、JP: 28633; 北陸19号、

JP: 28714; NUGGET, JP: 29639; N-404, 46073)、コマツナ (*B. rapa*: 鳴沢菜, JP: 29927; 信夫冬菜, JP: 26902; 新黒水菜, JP: 29932; 仁井田青菜, JP: 29925)、ジャガイモ (男爵、スーパーで購入)、パパイヤ (Sunset、ハワイパパイヤ協会から購入)、パッションフルーツ (スーパーで購入)、パイナップル (スーパーで購入)、パッションフルーツ (スーパーで購入) を使用した。コメ対照用として、コメ (日本晴)、コメ粉、及び、コメ加工品 (ビーフン、ライスペーパー、フォー用乾麺) を使用した。

2. DNA 抽出精製と DNA 試料液の調製

粉碎した試験試料からのDNAの抽出精製は、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット (Genomic-tip) を用いた。O. D. 260の値を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出し25 ngをDNA試料として試験に供した。

3. real-time PCRを用いたプライマー対、及び、プローブ

- ・現コメ陽性対照用 (KVM)

KVM159 : TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT

KVM160 : CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC

TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

- ・新コメ陽性対照用 (PLD)

PLD3959F :

GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT

PLD4038R :

CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA

PLD-P :

FAM-TGAGTATGAACCTGCAGGTCGC-TAMRA

- ・旧コメ陽性対照用 (SPS)

Sps-Taq-1F :

TTGCGCCCTGAACGGATAT

Sps-Taq-1R :

CGGTTGATCTTTTCGGGATG

Sps-P :

FAM-TCCGAGCCGTCCGTGCGTC-TAMRA

4. real-time PCR反応、及び、結果解析と判定

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 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0.4 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 5 μ L (10 ng/ 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についても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、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 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。測定結果の解析は、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。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 Δ Rn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、陽性と判定した。

安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

1. 試験試料

検査対照は、非GMコメ (日本晴)、及び、コメ加工品 (ビーフン、コメ粉、モチ米粉) の32検体を使用した。

2. DNAの抽出精製

コメ加工品の検体採取、及び、粉碎については、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」 (平成13年3月27日付け食発第110号) に従った。 α -amylase (高濃度品)、RNase A (100 mg/mL) はNippon Gene社製 (特注品)、Proteinase KはWAKO社製 (100 mg, Cat. no. 169-21041) 用いた。

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、未加熱コメ加工品に適用))

均質に粉碎し得た試料 500 mgは、GE1緩衝液 700 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ L、 α -Amylase (高濃度品) 2 μ L、及び、RNase A (100 mg/mL) 10 μ Lを添加し、混和した。それを65°C、15分間加温した後、GE2-K緩衝液 85 μ Lを添加し混和した。氷上に10分間静置後、13,000 \times g以上、4°C、5分間で遠心し得た上清 400 μ Lを、1.5 mLチューブに移し、GB3緩衝液 150 μ L、及び、イソプロパノール 150 μ Lを添加し、10~12回転倒混和した。その混合液 700 μ Lをspin columnに負荷