

した後、13,000×g以上、4°C、30秒間で遠心し、溶出液を捨てた。さらに、GW緩衝液 650 µLを負荷し、13,000×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 µLを加え3分間室温で静置した後、13,000×g以上、4°C、1分間で遠心し、その得られた溶出液を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))

均質に細粉碎し得た試料 500 mgは、GE1緩衝液 2.1mL、Proteinase K (20 mg/mL) 60 µL、α-Amylase (高濃度品) 6 µL、及び、RNase A (100 mg/mL) 30 µLを添加し、混和した。それを65°C、30分間加温した後、GE2-K緩衝液 225 µL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、15分間で遠心し得た上清を新しい 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 µL、及び、イソプロパノール 375 µLを添加し、10~12回転倒混和した。その混合液を700 µL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 µL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 µL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。

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/µL 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。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を用いたプライマー対、及び、プローブ

① コメ陽性対照用

KVM159 : TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT
KVM160 : CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC
TM013 : FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

② 害虫抵抗性GMコメ検出用

1) 63Bt コメ検出試験用 (Bt63)

T51-SF : GCAGGAGTGATTATCGACAGTTC
OsNOS-R2 : AAGACCGGCAACAGGATTCA
GM63-Taq :

FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA

2) NNBt コメ検出試験用 (KMD1)

T51-SF : GCAGGAGTGATTATCGACAGTTC
OsNOS-R2 : AAGACCGGCAACAGGATTCA
NGMr-Taq :

FAM-AATGAGAATTCGGTACCCCGACTGCA-TAMRA

3) CpTI コメ検出用 (CpTI)

CpTi-1F : CGTGTCACTCGGCTTGCA
CpTi-1R : AACGACACTTGCCTGGCATT
CpTi-P : FAM-ATCCTGCATGTGTACACG-MGB

③ 除草剤抵抗性GMコメ検出用 (Bar)

RapB-F1 : ACAAGCACGGTCAACTTCC
RapB-R1 : GAGGTCGTCCGTCCACTC
RapB-S1 : FAM-TACCGAGCCGCAGGAACC-TAMRA

④ GMコメコンストラクト検出用

1) CaM配列検知試験用 (35Sp)

35S-F : GCCTCTGCCGACAGTGGT
35S-R : AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC
35S-P : FAM-CAAAGATGGACCCACCCACG-TAMRA

2) nos ターミネーター配列検知試験用 (Nost)

tNOS-F :
GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG
tNOS-R :
CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT
tNOS-P :

VIC-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA

5. 定性PCR用プライマー対

① コメ陽性対照用 (OsSPS)

OsSPS-F : GATCGCTTCGCCATTAGCA
OsSPS-R : AACCGAGCGGATCACTTGC

② 除草剤抵抗性GMコメ検出用 (epsps)

35S-RR : GAAGACGTTCCAACCACGTCTCTT
epsps-R : AACGGACGCATCGCGGTTCC

③ 病害抵抗性GMコメ検出用 (Xa21)

UI : CGATCGGTATAACAGCAAAAC
II : ATAGCAACTGATTGCTTGG

6. real-time PCR反応、及び、結果解析と判定

PCR用反応液は25 µL /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 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各0.4 µL、対象プローブ

ブ溶液 (10 μmol/L) 0.25 μLを混合し、DNA試料液 5 μL (10 ng/μL) を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μL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。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。

7. 定性PCR反応、及び、結果解析と判定

PCR用反応液は25 μL /wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。AmpliAq Gold® 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) 各0.5 μLを混合し、DNA試料液 (10 ng/μL) 5 μLを添加し滅菌蒸留水で全量 25 μLに調製した。除草剤抵抗性遺伝子組換えコメ検出の反応条件は、95°Cで5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 1分、63°C 1分、72°C 2分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行った。また、病害抵抗性遺伝子組換えコメ検出は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始し、その後、95°C 1分、56°C 1分、72°C 2分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応で行った。

PCR産物は3% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 μg/mL含有) で電気泳動後、UV下で検出した。次いで、0sSPSは約110 bpのバンド、epspsは約500bpのバンド、Xa21の感受性品種は約1.3 bpのバンド、抵抗性品種は約1.3 bpと約1.4 bpの2バンドと検出されたPCR産物は、シーケンズ配列を確認し、陽性または陰性を判断した。

安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 系

統の検知法確立

1. 試験試料

国産うるち米 (R1)、及び、もち米 (R2) と GM コメ KMD 陽性検体 (R4)、及び、Bt63 陽性検体 (R3、R5、R6) を使用した。

2. 白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* に耐性を持つアフリカの野生イネ *Oryza longistaminata* 由来遺伝子を有する GM コメ Xa21 検出用プライマー対
U1: 5' -CGATCGGTATAACAGCAAAAC-3'
I1: 5' -ATAGCAACTGATTGCTTGG-3'

3. GM コメ Xa21 コンストラクト検出用プライマー対

PHP-FT1: 5' -TATTTACCCGCAGGACATATC-3'
PHP-FT2: 5' -ATGCAATAGGTCAGGCTCTC-3'
PHP-RT1: 5' -TATAGCAGGGATGACTTGAAAG-3'
PHP-RT2: 5' -ATGGAATCTCTCCTGACAAAC-3'
gusA-F: 5' -GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3'
gusA-R: 5' -TGGATTCCGGCATAGTTAAA-3'
hpt-lacZa-F: 5' -CTTGCGGTCCGAATGGGC-3'
hpt-lacZa-R: 5' -GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG-3'

4. 35Sプロモーター検出用プライマー対、及び、プローブ

35S-F: 5' -GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'
35S-R: 5' -AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'
35S-P: FAM -CAAAGATGGACCCCCACCCACG-TAMRA

5. 定性PCR

① プライマー対 I1/U1 を使用した Xa21 の検出

PCR用反応液は25 μL /wellとして以下のとおり調製した。AmpliAq Gold® 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) 各0.5 μLを混合し、DNA試料液 (10 ng/μL) 5 μLを添加し滅菌蒸留水で全量 25 μLに調製した。また、反応条件は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 1分、56°C 1分、72°C 2分を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行った。その後、72°C 10分伸長反応、4°C保存を行った。

PCR産物は1% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド0.1 μg/mL含有) で電気泳動後、UV照射下で検出した。

② GM コメ Xa21 コンストラクトの検出 1

PCR用反応液は25 μL /wellとして以下のとおり調整した。10×LA Taq buffer 2.5 μL、dNTP 4 μL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μmol/L) 各0.5 μL、LA Taq 0.25 μLを混合し、DNA試料液 (10 ng/μL) 5 μLを添加し滅菌蒸留水で

全量 25 μ L に調製した。forwardプライマー (PHP-FT1、 PHP-FT2) とreverseプライマー (PHP-RT1、 PHP-RT2) の各組合せのPCR反応条件は、95°C で5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30秒、57°C 30秒、72°C 5分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行った。プライマー対 I1/gusA-R、gusA-F/gusA-Rの組合せのPCR反応条件は、95°C で5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、60°C 30秒、72°C 2分を1サイクルとして、30サイクルの増幅反応を行った。プライマー対hpt-lacZa-F/ hpt-lacZa-Rの組合せのPCR反応条件は、95°C で5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 10分を1サイクルとして、30サイクルの増幅反応を行った。それぞれのPCR反応後は、72°C 10分伸長反応、4°C 保存を行った。

PCR産物は1% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 μ g/mL) で電気泳動後、UV照射下で検出した。

③GMコメ*Xa21*コンストラクトの検出2

PCR用反応液は25 μ L /wellとして以下のとおり調整した。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 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。

5. シークエンス解析

PCR増幅産物は、アガロースゲルで電気泳動後、目的のバンド(約 1.3 kb と約 1.4 kb)をそれぞれ切り出し、DNAを精製した。それをpGEM-T easy

に TA クローニングし得たプラスミドを大腸菌に導入した。培養後、精製したプラスミドをシークエンス解析に用いた。解析用のプライマーは、M13F、M13Rを使用し、シークエンス解析を行った。
M13F:5' -TGAAAACGACGGCCAGT-3'
M13R:5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'

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

①試料

生鮮パパイヤ、及び、各種パパイヤ加工製品は国内でインターネット販売されているものを使用した。非 GM パパイヤ Sunset 品種はハワイ・パパイヤ協会から提供されたものを使用した。

②パパイヤ加工製品の DNA 試料抽出前処理、及び、DNA 試料の精製

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)に従って、パパイヤ加工製品は、まず G2 緩衝液 (QIAGEN 製) 中でよく混合粉碎し、試料の調製を行った。DNA 抽出精製は、陰イオン交換膜タイプカラム Genomic-tip 100/G (QIAGEN 製) を用いて以下の改変法に従って行った。

100 mg/ml RNaseA (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 \times 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 μ L 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/ μ L 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/ μ L 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/ μ L 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、Transenic 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):

ttgttctaataaggttgctac

Papa32 (標的配列: RB flanking):

aatatcaaatggacgtgttagtg

Papa56 (標的配列: Left border):

gttattaagttgtctaagcgtcaa

Papa57 (標的配列: LB flanking):

agacatatatcatcaagaccatagtag

Papa58 (標的配列: Left flanking):

gtcttgcgatgattatcat

Papa59 (標的配列: LB flanking):

tggttatcaatatagcaattatgtag

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/ μ L) を 1 μ L、10XPCR Buffer を 5 μ L、25 mM MgSO₄ を 2 μ L、プライマー対 (各 10 pmol) を加え、水で 50 μ L になるよう調整した。PCR 条件は、94°C 2 分で変性させ、94°C 30 秒、65°C 30 秒、68°C 5 分、を 30 サイクル行った。PCR 反応後、1xTAE バッファー注で 0.5 μ g/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。

⑤ PRSV-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:

CTTTGGATATCTGCCTATTTTG

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

GATCAGATTGTCGTTTCCC

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:

CCATGCGATCCTCCCA

Q-Chy-2R:

CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA

Q-Chy-P:

FAM-TTCCCTTCAT (BHQ1) CCATCCCCTCTTGAGA

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°C、2 分間の条件で保持した後、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 15 秒間、60°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 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, 0.2) を選択した。その Th. line から Ct 値を得た。

パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査

①試薬、及び、試料

GM パパイヤ 55-1 系統品種 (SunUp、Rainbow)、及び、非 GM パパイヤ (Sunset) は消費者庁を通じて、ハワイパパイヤ協会から入手したものを使用した。パパイヤ加工製品はインターネットより購入したものを使用した。

DNA 抽出には QIAGEN 社製陰イオン交換系樹脂タイプキット (Genomic tip100/G) を用いた。G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、及び、QF 緩衝液は Genomic tip 100/G に付属しているものを使用した。また、抽出の際に使用した RNase (100 mg/mL)、及び、プロテインキナーゼ K (20 mg/mL) は QIAGEN 社製、 α -Amylase (高濃度品) はニッポンジーン社製、セルラーゼはシグマアルドリッチ社製を使用した。陽性プラスミド作製には Promega 社製 pGEM-T Easy vector system、及び、TOYOBO 社製 Competent high DH5 α を使用した。リアルタイム PCR の調製には Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Life Technologies 社製) を使用した。プライマーはファスマック社製を使用した。実験に使用した水は、すべて日本ミリポア社製 Milli-Q Synthesis A10 で精製した超純水を用いた。

②パパイヤ DNA の抽出精製と調整

生鮮パパイヤ果実の種子・果皮を除いた果肉部分を使用し、滅菌蒸留水で洗浄した後、キムタオルでよく水分を除去、ミルサーで粉碎した。粉碎した試料 10 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、G2 緩衝液 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にした。試料前処理を行った試料は、イオン交換樹脂カラムの QIAGEN 社製 Genomic-Tip100/G を使用し、以下の通り DNA の抽出、及び、精製を行った。RNase A 20 μ L、Cellulase 500 μ L を加えて (果肉含量ゲル状製品のジャム製品に限り、 α -Amylase 20 μ L を加える)、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、Proteinase K 200 μ L 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。その遠沈管を 3000 \times g で 20 分間低温下 (4°C) にて遠心を行い、得られた上清を採取し、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL を用い平衡化した陰イオン交換樹脂カラム (QIAGEN Genomic-tip 100/G) に負荷した。ただし、漂白剤 (亜硫酸塩) が使用されているドライフルーツでは、上清の pH を確認した後、1 mol/L 塩酸で pH6~7 に調製後、再度遠心を行い、得られた上清をカラムに負荷した。次いで、カラムを QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、予め 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し、はじめの溶出液は捨てた。新しい遠沈管に移し、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し、DNA を溶出させた。溶出液を遠沈管 (1.5 mL 容) に分注し、分注し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、15000 \times g で 15 分間低温下 (4°C) 遠心した後、上清を捨てる。70% (v/v) エタノール 1 mL を加え、15000 \times g で 5 分間低温下 (4°C) にて遠心を行う。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 μ L に溶解し、DNA 試料原液とする。抽出した DNA 試料原液は分光光度計 NanoDrop 1000 を用いて、200-350 nm の UV 吸光度を測定して DNA 濃度を測定した。

③陽性プラスミドの作成

パパイヤの果肉より抽出した DNA を鋳型とし、リアルタイム PCR 反応後の反応液を電気泳動で分離し、目的の標的増幅断片を切り出し、精製を行った。その後、pGEM -T Easy vector system (Promega 社製) のプロトコールに従い、標的増幅断片を pGEM-T Easy vector を用いて TA クローニングを行った。DH5 α 大腸菌コンピテントセルを使用し、TA クローニングを行ったプラスミドで大腸菌の形質転換を行った。大腸菌はブルー・ホ

ワイトコロニーセレクションを行うため、IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)、及び、アンピシリンを添加した培地で培養を行った。白コロニーを選別し、プラスミドの抽出、精製を行い、検知法の擬似陽性 DNA 試料として使用した。

④リアルタイム PCR 反応

リアルタイム PCR 機器は Applied Biosystems 社製 7900HT を使用した。

PCR 条件

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。PCR Buffer (Taqman[®] Gene Expression 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、滅菌蒸留水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料 2.5 μ L (25 ng)を添加する。ただし、10 ng/ μ L に達しない場合は、抽出した DNA 試料原液をそのまま 2.5 μ L 使用した。また、PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料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、真上からシールした後、完全にウェルを密閉し、測定を行った。

各種標的遺伝子配列特異的検知法に使用したプライマープローブは以下の通りである。

パパイヤ内在性遺伝子キモパイン遺伝子検出用：

Q-Chy-1F2:

CCATGCGATCCTCCCA

Q-Chy-2R:

CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA

Q-Chy-P:

FAM-TTCCCTTCAT(BHQ1)CCATTCCCCTCTTGAGA

GM パパイヤ PRSV-YK 検出用：

YK-1F: GATCCCCGGGTGGTCAGT

YK-1R: CCGGTATCCACAGCTTCATTTT

YK-P: FAM-AGACGCCATGGAAGG-MGB

GM パパイヤ Huanong No.1 系統検出用：

qHN-F:

GACGAGTACAAGGAGACGCC

qHN-R:

GTTGTCACTGAAGCGGGAAG

qHN-P:

FAM-TGGCTGCTATTGGGCGAATCAACTAC-BH

Q1

GM パパイヤ 55-1 系統検出用：

PRSV-cp F:

CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA

PRSV-cp R:

TCCGCCTCCATCCAGTCTATT

PRSV-cp P

FAM-TCTTCTAGCTTCCCGCAACAAT-TAMRA

CaMV 35S プロモーター検出用：

TM-35S-F: GCCTCTGCCGACAGTGGT

TM-35S-R: AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC

TM-35S-p:

FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-TAMRA

NOS ターミネーター検出用：

180-F: CATGTAATGCATGACGTTATTTATG

180-R: TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT

TM-180:

FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA

PCR 増幅条件

反応条件は 50 $^{\circ}$ C 2 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

リアルタイム PCR 結果の解析と判定

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、 Δ Rn Threshold は指数関数的な増幅の間、0.2~0.5 に設定した。PCR 増幅産物の指数関数的な増幅が確認できる 48 サイクルを反応の陽性・陰性の指標とした。Ct 値が 48 未満の場合、反応は陽性と判定した。Ct 値を得ることができない場合、及び、Ct 値が 48 以上の場合は、反応は陰性と判定した。

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

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) DNA 抽出

コメを対象とした DNA 抽出法 種籾は、水で洗浄した後、各粒を粉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、2,000rpm、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°Cの条件で 30 分間加温した。良く攪拌した後、サンプルを 2 mL チューブに移し変え、GE2-K 緩衝液 255 μ L を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後、氷上に 10 分間静置した。6000 \times g 以上、4°Cの条件で 15 分間遠心した。上清を 2 mL 容チューブに移し、13,000 \times g 以上、4°Cの条件で 5 分間遠心した。次いでその上清を 15 mL 容チューブに移し、上清 1 mL に対して GB3 緩衝液 375 μ L、及び、イソプロパノール 375 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°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 μ L を負荷し、13,000 \times 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 μ L を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 \times 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 μ L 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 \times 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 μ L の水で溶解した後、6 N NaOH 0.6255 μ L 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 μ L を加え (計 300 μ L 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 μ L と磁気ビーズ

30 μ L 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 μ L 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 μ L 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⁾。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;

YAAAATGAATTTGTGGAAYGAGAATYTTGAAAGGTAAA

Xa21G regionI R3;

CCRTACTATTCATCTATCCCCCTACTTTTCA

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/ μ L Ex Taq 1 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 1 μ L、2.5 mM dNTP 4 μ L、10 X PCR buffer 5 μ L を混合し、水で全量 45 μ L に調製後、バイサルファイト処理後の DNA 試料液 5 μ L 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。

PCR 産物の検出のため電気泳動には 100 mL 当たり 10 μ g 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 μ L 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 μ L に、7 μ L の 2X T4DNA ligase buffer を加え、1 μ L の pGEM-T easy ベクター、1 μ L 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 μ g/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 \times 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 \times 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 μ L 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 で一晚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/ $\sqrt{3}$ 、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 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L) 0.2 μ L、試料 2.5 μ L を混合し、水で全量 20 μ L 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 で一晚、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 μ g 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. 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品から得られるトマト DNA の断片化に関して、トマトに特異的な内在性遺伝子 (*LAT52*) の各々増幅断片長鎖の異なるプライマーを構築し解析を行った。その結果、増幅断片長の最も短いプライマーペア lat 1: AGA CCA CGA GAA CGA TAT TTG C、lat 2: TTC TTG CCT TTT CAT ATC CAG ACA において *LAT52* の検出が可能であった。その増幅断片長内に特異的なプローブ Lp: 5' -FAM CTC TTT GCA GTC CTC CCT TGG GCT TAMRA -3' 使用しリアルタイム PCR を用いることで商品分類ごとに GM トマトの検出が可能であった。

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。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' -CGAAACCTATAAGAACCCTAAT-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。検出された配列が、ウイ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。

2. GM 亜麻の検知法開発に関する研究

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。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。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。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。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。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。

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 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。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、及び、Ct 値の動向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。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。

4. GM コメの検知法に関する研究

コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良

Nippon Gene GM quicker2(現法)、QIAGEN Genomic-tip 100、mono FAS、FAST ID の 4 種の DNA 精製キットを使用し比較検討を行った。それぞれの方法から精製した DNA の回収効率、及び、DNA 精製効率を比較した。その結果、これまでにコメ DNA の検出が困難であった加工度の高いタピオカ入りライスペーパー(rp-1)において回収効率は Nippon Gene GM quicker2 は高かったが、非常に塩濃度が高く、精製度では QIAGEN Genomic-tip 100 が優れていた。real-time PCR の結果からも、QIAGEN Genomic-tip 100 で精製した DNA の方は最も Ct 値の低い値と安定した結果が得られた。また、QIAGEN Genomic-tip を使用することによりビーフン、及び、フォーにおいては精製度が向上し米粉については回収効率の上昇が見られたが、Ct 値においては大きな差は見られなかった。mono FAS、FAST ID では、設定サンプル量が少ないため比較は難しいが、real-time PCR の結果より Nippon Gene GM quicker2 と同等の Ct 値が得られているが、同様に、十分に塩の除去できていなかったことが考えられた。これらの結果より、検討した 4 種類の方法の中で QIAGEN Genomic-tip 100 は DNA の抽出精製に最も適していると考えられた。比較的に加工程度の低い米粉からの DNA の抽出精製は、500 mg の試料から回収率が高いシリカゲル膜タイプキット法(Nippon Gene GM quicker2 変法)、及び、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を使用すれば十分可能であると考えられた。

コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発

新コメ陽性対照用(PLD)プライマー・プローブは、トウモロコシ、オオムギ、カラスムギ、ヒヨコマメ、テンサイ、コムギ、ワタ、コメ、ダイズ、アマ、ナタネ、コマツナ、ジャガイモ、パパイヤ、パッションフルーツ、パイナップル、パッションフルーツに交差反応はなく、コメのみを検出した。現コメ陽性対照用(KVM)プライマー・プローブは、トウモロコシと交差反応性があるため、今回作成した PLD プライマー・プローブは、より特異性が高いことが分かった。また、コメ陽性対照用プライマー・プローブの 3 セットを比較したところ、加工度の高いビーフン(rice19)、及び、ライスペーパー(rp-1)において得られた Ct 値に差

が見られた。本研究で開発した PLD 検出用プライマー・プローブ（新 KVM）は、これまでに使用していたもの（現 KVM）又は SPS を標的としたもの（旧 SPS）よりも得られる Ct 値は低いことから、感度の高いプライマー・プローブを開発したことが示唆された。

安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

GM コメ Bt63 系統と KMD 系統が有するコンストラクト配列（63Bt, NNBt）、除草剤グルホシネート耐性遺伝子 *Bar* (*Bar*)、NOS ターミネーター配列 (*tnos*)、及び、35S プロモーター配列 (35S) にそれぞれ特異的なプライマー・プローブを用いてリアルタイム PCR による定性試験を試みた。計 32 検体中に 63Bt は 5 検体、NNBt は 9 検体、*tnos* は 9 検体、35S は 9 検体に検出された。*Bar* 除草剤耐性遺伝子は検出されなかった。35S 陽性検体 9 検体において、除草剤グルホサート耐性遺伝子 *epsps* を検出するプライマー対を用いて定性 PCR により検査した結果、いずれの検体も陰性であった。

安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 系統の検知法確立

GM コメ Xa21 のコンストラクト構造を文献調査から得た情報を基に、その配列に特異的な検出用プライマー対を設計し PCR を行った。GM コメ Bt63 系統陽性であった R3、R5、R6 検体において I1、及び、U1 プライマーを使用して PCR を行った結果、約 1.3 kb と約 1.4 kb の増幅産物が確認された。約 1.4 kb の増幅産物は非 GM コメには検出されなかった。そこで、R5、R6 検体から得られた約 1.3 kb と約 1.4 kb の両 PCR 産物のシーケンス解析を行った。約 1.4 kb の PCR 産物は NCBI データベースに登録されているアフリカの野生イネ由来 *Xa21* の配列と比較し、相同性は R5 が 99.2%、R6 が 99.9% と高かった。また、R5 の内在性 *Xa21* (約 1.3 kb) と外来性 *Xa21* (約 1.4 kb) は部分的に約 20 bp の異なる 2 つの塩基配列を持つほか、全体的に異なる塩基が分散しており、内在性と外来性の塩基配列の相同性は 91.3% と低かった。R6 も R5 と同様に塩基配列の違いがみられ、内在性と外来性の塩基配列の相同性は 91.5% であった。また、他の PCR 用プライマー対を用いて検出を試みたが、R5、R6 検体に予想される PCR 増幅は得られなかった。

本研究で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。

中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討

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。

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。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、及び、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。

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 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。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。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、及び、Proteinase K) の添加が抽出 DNA の収量、及び、質に与える影響について検討した。その結果、Cellulase の添加は、100/G に負荷した抽出液、及び、QC 緩衝液を目詰まり無く滴下させる効果を持ち、

Poteinase 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、及び、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。その結果、両試料は台湾産 GM パパイヤ 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。Ti プラスミドの Right border 領域とパパイヤ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。

パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査

GM パパイヤのコンストラクト構造に共通して使用されている 35S プロモーター、及び、NOS ターミネーターを検出するためのリアルタイム PCR 用プライマー、及び、プローブを用いて、安全性承認済み GM パパイヤ 55-1 系統以外の GM パパイヤのパパイヤ加工品への混入に関する実態調査を行った。その結果、漬物 A,B の 2 製品、茶 A,B の 2 製品、及び、ジャム A の 1 製品に 35S プロモーター、及び、NOS ターミネーターを検出し、その内、安全性未承認の GM パパイヤ 55-1 系統以外の GM パパイヤの混入の可能性が示唆された製品は、漬物 A,B の 2 製品と茶 B の 1 製品であった。35S プロモーター、及び、NOS ターミネーターは他の GM パパイヤのプロモーター、ターミネーターとして使用されていることから、55-1 系統 GM パパイヤ以外の GM パパイヤの検出試験を行った。昨年、我々が開発した台湾産安全性未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統検知法 (Biol. Pharm. Bul., 34,

1648-1651, 2011)、及び、中国の華南農業大学で独自開発された GM パパイヤ系統 Huanong No. 1 系統検知法 (J. Agric. Food Chem., 57, 7205-7212, 2009) を使用して安全性未承認の GM パパイヤの検出を試みた。その結果、GM パパイヤ PRSV-YK の混入を漬物 A,B、茶 A,B、ジャム A に検出した。一方、35S プロモーター、及び、NOS ターミネーター陽性検体に GM パパイヤ Huanong No. 1 系統のコンストラクト構造を有する検体は検出されなかった。

GM パパイヤ PRSV-YK と 55-1 の混入量を概算するため、プラスミドに *Chy* と GM パパイヤ PRSV-YK の増幅断片を導入した陽性プラスミドを構築した。予め既知濃度に調節した陽性プラスミドを用いて、リアルタイム PCR で得られた Ct 値をもとに検量線を作成した。検量線から、混入が確認されている 5 検体のリアルタイム PCR から得られた Ct 値を使用し、コピー数を算出した。GM パパイヤ PRSV-YK のコピー数/*Chy* のコピー数を算出したところ、ジャム製品 A は 0.1527、茶製品 B は 0.1403 となり、他の 3 製品 (0.0003~0.0065) と比較し、GM パパイヤ PRSV-YK の混入率が高いことが示唆された。また、GM パパイヤ 55-1 系統のコピー数/*Chy* のコピー数を算出したところ、茶製品 B はジャム製品 A と比較して混入量が多いことが示唆された。

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

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。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。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。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。

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。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。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。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 (*Hpa*II、及び、*Msp*I) 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。その結果、非メチル化感受性酵素 *Eco*RI と比較して、*Hpa*II と *Msp*I 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。その結果、*Msp*I では、0.8%の切れ残りと思われる DNA があり、*Hpa*II 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. 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 92 bp 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、100 bp 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。

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。

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. GM コメの検知法に関する研究

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 B t 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。

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。

コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良

Genomic-tip100/G を使用した DNA 抽出精製法は比較を行った他の DNA 精製法よりも高感度に検出が可能で DNA 検体を精製することが可能であることが示唆された。また、従来のシリカゲル膜タイプの GM quicker2 を用いてコメ DNA が抽出できなかったタピオカ入りの一部のコメ加熱加工品を含むすべての試料については、イオン交換樹脂ベースの Genomic-tip100/G を用いることによってリアルタイム PCR を用いたコメ DNA の標的遺伝子配列の検出が可能であることが示唆された。

コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発

他の作物と交差反応を示さず従来のコメ内在性検知法よりも高感度に検出できる方法を開発した。

安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

文献等の情報を基に白葉枯病抵抗性 GM コメや除草剤耐性 GM コメの混入検査を含めたコメ加工品の GM コメのモニタリング検査の結果、計 32 検体中に 63Bt は 5 検体、NNBt は 9 検体、tnos は 9 検体、35S は 9 検体に検出された。今後、特定できていない GM コメ検体について詳細に調べる必要があると考えられた。

安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 系統の検知法確立

GM コメ Bt63 陽性検体 (R3, R5, R6) において GM コメ Xa21 コンストラクト構造の一部を PCR により検出を試みたところ非 GM 検体には検出されない約 1.4 kb の増幅産物を得た。シークエンス解析を行った結果、白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* に耐性を持つ野生イネ *Oryza longistaminata* 由来遺伝子 *Xa21* の配列と同一であった。このことから、GM コメ Xa21 の混入もしくは野生イネとの掛け合わせ品種の可能性が示唆された。今後、導入ベクターと *Xa21* の境界領域である配列を解析することで、GM コメ Xa21 を検出可能な高感度で特異的なリアルタイム PCR 用プライマー・プローブの構築を行う予定である。

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 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。

パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査

9 種類のパパイヤ加工品計 38 検体の GM パパイヤ混入に関する実態調査を行ったところ、安全性承認済みの GM パパイヤ 55-1 系統の混入を茶 1 製品とジャム 1 製品に検出し、安全性未承認の GM パパイヤ PRSV-YK を漬物 2 製品、茶 2 製品、ジャム 1 製品に検出した。近年、パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) 病に抵抗性を示す GM パパイヤの開発が世界中で進められており、我が国では食品衛生法により 55-1 系統のみの流通・販売が認められている。しかし、2011 年 2 月に未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) が国内で流通していることが報告され、また、中国国家生物安全委員会が 2006 年 9 月に中国国内で商業栽培を認可した PRSV 由来のレプリカーゼ (*NiB*) を導入した Huanong No. 1 系統に関しては、2008 年時点で、広東省で栽培されたパパイヤ 5100 ヘクタールのうち 9 割弱にあたる 4500 ヘクタールとされている。中国からのパパイヤの生果実、種子、及び、苗の輸入実績は報告されておらず、本研究結果においても、Huanong No. 1 の混入は確認されたかったが、日本国内では未承認 GM パパイヤであるため本研究で行った方法を用いて実態調査を続ける必要があると考えられた。

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

Xa21G 遺伝子は、イネ白葉枯病原因細菌 *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。イネの種子の状態では Xa21G 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。

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。パイサルファイトシーケンシング又は 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. 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 92 bp 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、100 bp 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。

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。

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 OPAFPcsGH 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態調査をさらに行う予定である。

4. GM コメの検知法に関する研究

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。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。

コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良
コメ加工品からコメDNAを精製する方法を開発した。

コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発
高感度かつ特異的にコメDNAを検出できる方法を開発した。

安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

32検体中GMコメと判断した試料は18検体であり、その内訳はKMD1が9検体、Bt63が2検体、Bt63+Xa21 (R) が3検体、35SpもしくはNostが4検体であった。

安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性GMコメ Xa21 系統の検知法確立

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、非 GM コメからは検出されない *Xa21* の増幅産物を確認した。

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 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。

我が国で流通しているパパイヤ加工食品に安全性未承認のPRSV-YK系統の混入が確認された。

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

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調べる必要がある。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。

*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*Actin1*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. 研究発表

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) 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)
- 4) 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)
- 5) 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.*, 57, 9787-9792 (2009)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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、穂山浩、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)
- 10) 穂山浩、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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)

- 14) 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)
- 15) 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. *Anal. Chem.*, 82, 9909-9916 (2010)
- 16) 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 Sci. and Tec. Res.*, 16, 421-430 (2010)
- 17) 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)
- 18) 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. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51, 247-252 (2010)
- 19) 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)
- 20) 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. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51, 92-100 (2010)
- 21) 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. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51, 65-70 (2010)
- 22) 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)
- 23) 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. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51, 242-246 (2010)
- 24) 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. *J AOAC Int.*, 94, 224-231 (2010)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 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.* 94, 1540-1547 (2011)
- 29) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. *Biol. & Pharm. Bull.*, 34(10), 1648-1651 (2011)
- 30) Matemu, A.O., Nakamura, K., Kayahara, H., Murasawa, H., Katayama, S., Nakamura, S. Enhanced Antiviral Activity of Soybean β -Conglycinin-Derived Peptides by Acylation with Saturated Fatty Acids. *J. Food Sci.*, 76(6), 299-304 (2011)
- 31) 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.*, 94(5), 1540-1547 (2011)
- 32) Ohashi-Suzuki, M., Yabu, Y., Ohshima, S., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Kita, K., Ohta, N., Suzuki, T. Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. *J. Vet. Med. Sci.*, 73(5), 615-621 (2011)
- 33) Suzuki, A., Duc, H. P. N., Nakamura, K., Akiyama, H. and Kasahara, Y. Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. *Jpn J. Food Chem. Safety*, 81(1), 18-23 (2011)
2. 学会発表
- 1) 穂山浩、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) Kitta, K., Mano, J., Furui, S., Futo, S., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., 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) Mano, J., Shigemitsu, N., Futo, S., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., Furui, S., Kitta, K., 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) 穂山浩, 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, 穂山浩, 中村公亮, 佐々木伸大, 近藤一成, 真野潤一, 橋田和美, 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) 穂山浩, 坂田こずえ, 中島安基江, 小川麻子, 山岸亨, 布藤聡, 小口太一, 橋田和美, 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) 穂山浩 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) 穂山浩, 牧山太樹, 佐々木伸大, 近藤一成, 真野潤一, 橋田和美, 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, 穂山浩, 中村文美, 中島治, 張替直輝, 古井聡, 橋田和美, 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, 橋田和美, 近藤一成, 穂山浩, 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, 増渕友子, 日野明寛, 真野潤一, 橋田和美, 清水えり, 布藤聡, 峯岸恭孝, 笠原正輝, 穂山浩, 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, 穂山浩, 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, 橋田和美, 布藤聡, 穂山浩, 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, 穂山浩, 河野徳昭, 吉松嘉代, 近藤一成, 真野潤一, 橋田和美, 手島玲子, もち米試料中のトリブ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) 穂山浩, 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, 橋田和美, 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, 穂山浩, 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) 穂山浩 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, 穂山浩, 手島玲子, 日野明寛, 古井聡, 橋田和美, 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の開発 (2010. 3)
- 19) 河野徳昭, 今村智弘, 島田浩章, 穂山浩, 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)
- 20) Akiyama, H., The Regulatory Situation in Japan—Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food—, Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies (2010. 5).
- 21) 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, 橋田和美, 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).
- 22) 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).
- 23) 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, 橋田和美, 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).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) 山田千尋, 中村公亮, 穂山浩, 高島令王奈, 北川麻美子, 橋田和美, 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).
- 27) 張替直輝, 吉田雄三, 橋田和美, 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).
- 28) 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).
- 29) 穠山浩, 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)
 - 30) 穠山浩, 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)
 - 31) 笠間菊子, 小熊恭代, 鈴木達也, 穠山浩, 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)
 - 32) 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, 穠山浩, 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)
 - 33) 真野潤一, 谷中有香, 池津陽子, 大西真理, 布藤聡, 穠山浩, 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)
 - 34) 大森清美, 中村公亮, 穠山浩, 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)
 - 35) 中村公亮, 穠山浩, 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)
 - 36) 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)
 - 37) 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)
 - 38) 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)
 - 39) 穠山浩, 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)
 - 40) 穠山浩, 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)
 - 41) Hiroshi Akiyama, Japanese Food Allergen Labeling, Seminar on Food Allergen: Opportunities and Challenges for Thai Food Industries (2010. 11)
 - 42) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Noguchi, A., Kondo, K., and Teshima, R. Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain in Processed Food. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011. 9.)
 - 43) 高橋勇貴, 中村公亮, 穠山浩, 大森清美, 笠原正輝, 中澤裕之, 橘田和美, 近藤一成, 手島玲子: 遺伝子組換え(GM)パパイヤ55-1系統検知法のパパイヤ含有食品への適用性と検出感度について, 日本薬学会 第132年会 (2012. 3.)
 - 44) 中村公亮, 名古屋博之, 伴真俊, 穠山浩, 坂田こずえ, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子: 加工品中の遺伝子組換えサケのコンストラクト構造を標的とした新規検知法の開発, 日本薬学会 第132年会 (2012. 3.)
 - 45) 中村公亮, 穠山浩, 濱岡志津子, 大森清美, 坂田こずえ, 笠原正輝, 高島令王奈, 橘田和美, 近藤一成, 手島玲子: 加工食品からの未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検出について (第二報), 第48回全国衛生化学技術協議会年会 (2011. 11)
 - 46) 野口秋雄, 穠山浩, 中村公亮, 坂田こずえ, 真野潤一, 高島令王奈, 峯岸恭孝, 布藤聡, 橘田和美, 近藤一成, 手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発 (第一報), 第102回日本食品衛生学会学術講演会, 秋田 (2011. 9)
 - 47) 高橋勇貴, 中村公亮, 穠山浩, 明石良, 橘田和美, 中澤裕之, 近藤一成, 手島玲子: パパイヤ加工品の未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検出に関する調査について, 第102回日本食品衛生学会学術講演会 (2011. 9)
 - 48) 北川麻美子, 山田千尋, 中村公亮, 小林武史, 川上浩, 穠山浩, 手島玲子: 野菜加工品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に関する研究 (第一報), 日本食品化学学会第17回 総会・学術大会 (2011. 5)
 - 49) 穠山浩, 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, 手島玲子: 2009年度産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の混入率と系統分析, 日本食品化学学会第17回 総会・学術大会 (2011. 5)
 - 50) 中村公亮, 穠山浩, 濱岡志津子, 大森清美, 坂田こずえ, 笠原正輝, 高島令王奈, 橘田和美, 手島玲子: 未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検知法開発について (第一報), 日本食品化学学会第17回 総会・学術大会 (2011. 5)
 - 51) 中村公亮, 名古屋博之, 伴真俊, 坂田こずえ, 穠山浩, 手島玲子: リアルタイムPCR法を用いた遺伝子組換え(GM)サケの特異的検知法の開発, 日本薬学会第131年会 (2011. 3)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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
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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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
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
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
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
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 beet (<i>Beta vulgaris</i> L.).	Shokuhin Eiseigaku Zasshi.	50	41-46	2009
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	300-309-	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
五十君 静信	遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン開発の試み	日本臨床腸内微生物学会誌	11	34-40	2009
渡辺 伸也	体細胞クローン家畜に関する欧州の意識調査	日本胚移植学雑誌	31	69	2009
穂山 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
中村 亮介、中村 里香、手島 玲子	アレルギーデータベースAllergen Database for Food Safety (ADFS) のデータ改訂とアレルギー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
Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., and Igimi S.	Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant <i>Lactobacillus casei</i> secreting biologically active murine interleukin-1 beta.	Clinical and Vaccine Immunology.	17	43-48	2010
Kajikawa A., Ichikawa E., and Igimi S.	Development of a Highly Efficient Pro-teins-secreting System in Recombinant <i>Lactobacillus casei</i> .	Journal of Microbiology and Biotechnology.	20	375-382	2010
Kajikawa A. and Igimi S.	Innate and acquired immune responses induced by recombinant <i>Lactobacillus casei</i> displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface.	Vaccine	28	3409-3415	2010
Fukushima, Y., Sato, M., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H.	Construction of an insertion vector for gene targeting of chicken lens-specific gene.	J. Poultry Sci.	47 (2)	144-148	2010
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 (<i>Brassica rapa</i>) line RT73.	Analytical Chemistry	82	9909-9916	2010
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