

201131015A

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

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の
食品への混入危害防止のための検知法開発に関する研究

平成23年度総括・分担研究報告書

(H22-食品-一般-001)

研究代表者 穉山 浩

平成24年5月

目 次

I. 総括研究報告書	
非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止のための 検知法開発に関する研究	----- 1
穐山 浩	
II. 分担研究報告書	
1. 非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究	----- 1 6
穐山 浩	
2. 非食用遺伝子組換え微生物の検知法開発に関する研究	----- 3 1
五十君 静信	
3. 工業原料用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究	----- 4 8
小関 良宏	
4. 医薬品用遺伝子組換え植物の検知法開発に関する研究	----- 5 4
吉松 嘉代	
5. 経口ワクチン用遺伝子組換え動物の検知法開発に関する研究	----- 7 3
中島 治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 9 2

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）

平成 23 年度 総括研究報告書

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止
のための検知法開発に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長
研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
研究分担者 小関 良宏 東京農工大学大学院共生化学研究院 教授
研究分担者 吉松 嘉代 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
筑波研究部 室長
研究分担者 中島治 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 主任研究官

研究要旨：①リアルタイムPCR法を用いてジャガイモ加工製品中に混入する可能性のある未承認非食用GMジャガイモを検知する方法を新たに開発するため、ジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモDNAの断片化の程度を解析した。非食用バイオテクノロジーの開発状況のデータベース検索のWeb公開用ソフトを確立し、一般公開した。②情報収集として、フランスで開催された国際酪農連盟の分析週間に参加し、微生物の検知法に関する会議に出席し情報収集を行った。その後、オーストリアで開催された腸内細菌に関する国際シンポジウムで乳酸菌組換え体に関する研究成果を発表すると共に、遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法の検討では、豚肉中に混入した乳酸菌モデル組換え体を用いて具体的な探知法について検討を進めた。③工業原材料生産用のモデル遺伝子として生分解性プラスチックの原料合成にかかわる遺伝子である $phbA$ 、 $phbB$ 遺伝子の標準プラスミドを構築した。さらにこれを用いて、トウモロコシから抽出したゲノムDNAへスパイク試験を行い、マイクロアレイ法を用いて検出可能であるかについて検討した。その結果、 1×10^8 コピー程度の遺伝子断片が存在した場合に検出することが可能であった。また、DNAマイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知法がトウモロコシ以外の作物に適応可能であるか検討するために、コメから抽出したゲノムDNAを用いてDNAマイクロアレイ解析に供した。その結果、 $10\mu\text{g}$ のゲノムDNAを用いた場合、混入率1%程度までの組換え遺伝子を検知可能であることが示唆された。④GM植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用GM植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を環境浄化目的の植物に関する情報とともに収集した。医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物の調査研究の結果から、近年各国で盛んに研究開発が進められていることが明らかになった医療用ワクチン生産等を目的とした非食用遺伝子組換え植物の検知法開発を目的とし、検知操作において陽性対照となるモデル組換え植物の入手、又は作出を行った。本年度はミラクリタンパク質を生産するモデル組換えトマトの自殖種子を取得するとともに、コレラトキシンBサブユニットを生産するモデル組換えイネの導入コンストラクトコピー数のリアルタイムPCR法による見積もり、ならびに自殖種子の取得を行い、コメ1粒を試料とする遺伝子検知法を確立した。⑤非食用モダンバイオテクノロジー応用魚については基礎研究を目的にゼブラフィッシュを用いた報告が多数あった。また、近年では非食用モダンバイオテクノロジー魚や動物を作成するときにCre / LoxPシステムを利用して抗生物質耐性遺伝子を除去するケースが多くなっている。そこで、LoxP配列のみを手掛かりとして非食用モダンバイオテクノロジー魚や動物に由来する材料を検知する方法を作成することを試みた。研究材料にはLoxP配列をゲノムに組み込んだニワトリのES細胞を使った。まず、ES細胞からのゲノミックDNAの抽出法を検討した。次に、LoxP配列からプライマーを設計してアダプターライゲーション法の条件検討を行った。

研究協力者
中村公亮、手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部）中村香織、川上浩（共立女子大学大学院）江川智哉、榎田和彌（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部）、佐々木伸

大（東京農工大学大学院共生科学技術研究院）河野徳昭、（独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部）

A. 研究目的

近年ではモダンバイオテクノロジー応用技

術食品の開発が進む一方、とうもろこし等の作物を組換え、医療用の医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。さらには食品添加物を生産するための遺伝子組換え (GM) 微生物は既に応用されており、工業原料産生及び環境浄化目的の GM 植物・生物の開発も急速に行われている。このようなモダンバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来の非食用モダンバイオテクノロジー応用植物・生物が誤って食品に混入する可能性が示唆されている。わが国においては、平成 13 年 4 月から GM 食品の安全性審査を義務付け、安全性審査を行うとともに、輸入時にモニタリング検査等を行っている。また GM 生物に関しても、平成 16 年から GM 生物の多様性確保により法律が施行され、GM 生物の使用等を規制している。

このような状況の中、本申請研究においては、非食用モダンバイオテクノロジーを応用した植物・生物について食品への混入に関する安全性確保を実施するため、それらの動向の調査研究を進め、非食用モダンバイオテクノロジー応用植物・生物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な検知法の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

厚生労働省が定めたジャガイモ加工食品の GM 食品表示対象製品に含まれる生鮮、及び、加工食品より、東京都内のスーパーやインターネットで購入した生鮮ジャガイモ 2 品種 (男爵とメークイン)、冷凍ジャガイモ 2 製品、乾燥ジャガイモ、及び、その加工食品 4 製品、ジャガイモデンプン、及び、その加工食品 3 製品、ポテトスナック 4 製品を用いた。

DNA の抽出・精製には、QIAGEN 製イオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tip 100/G) を用いた。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 を用いた。冷却遠心機は、トミー製 MRX-150 を用いた。卓上遠心機は、フナコシ製 KR-1000、05-514-0、KURABO 製 DISKBOY を用いた。96 ウェルプレート遠心機は、METALFUGE 製を用いた。タッチミキサーは、大和製 MT-5 と Scientific Industries 製 VORTEX

GENIE-2 (G-560) を用いた。マグネチックホットスターラーは、三田村理研工業 (株) 製 MRK を用いた。電気泳動装置は、(株) アドバンス製 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。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、ライフテクノロジーズ (株) 製 GeneAmp PCR System 9700 を用いた。リアルタイム PCR は、ライフテクノロジーズ (株) 製 PRISM™ 7900HT を用いた。データベース検索ソフトの開発と公開データベース検索サイト開発のソフトとしては、FileMaker Server II ソフトを用いた。一般公開は、株式会社 エミック のホスティングサービスを利用した。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

① バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、論文、書籍、インターネット、業者カタログなどの文献調査に加え、学会やシンポジウム等へ参加しその分野の研究者と情報交換を用い、微生物の GM に関する情報収集と、ベクターに関するデータベース作りを続けた。本年度は、国内の食品添加物用途や医療用として認可されている微生物組換え体について整理し、一覧表を作成した。

② 海外の研究動向に関する情報収集として、スロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics に参加し、研究成果を発表すると共に、乳酸菌などの GM 微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。

③ GM 微生物の検知技術の検討では、乳酸菌モデル組換え体を用いて、豚肉中に混入させた場合の定量的検知法について検討した。宿主としては、ゲノム DNA にエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*) を組み込んだ *Lactobacillus casei* IGM232 株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ermC*) をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393 株の 2 株を用いた。

標的とした遺伝子は、各組換え体に 1 コピーのみ存在することを確認した (*ldhD*: D-lactate dehydrogenase) と、グラム陽性細菌のマーカーとしてしばしば用いられるエリスロマイシン耐性遺伝子で、同じエリスロマイシン耐性遺伝子でも *L. casei* IGM232 株はゲノム上に組

み込まれているため *ery* を 1 コピー持つ。一方、*L. casei* IGM393 株はプラスミド上に *ermC* が組み込まれており、乳酸菌あたり複数コピーが存在する。これらの遺伝子を標的としてリアルタイム PCR 法による定量的な検知法を検討した。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

phbA, *phbB* 遺伝子の標準プラスミドは、バイナリーベクター pBI121 (Accession No. AF485783) のカリフラワーモザイクウイルス 35S(35S)プロモーターと NOS terminator の間に *Alcaligenes eutrophus* 由来の *phbA* 遺伝子あるいは *phbB* 遺伝子 (Accession No. J04987) の first ATG からストップコドンまでを連結したものを pUC19 プラスミドのマルチクローニングサイトの EcoRI サイトと HindIII サイトの間にそれらのサイトが残らないように挿入するように構築した。

トウモロコシからのゲノム DNA の抽出は昨年度と同じ方法で行った。コメからのゲノム DNA 抽出はシリカメンブレンカラムを用いた精製キットである GM quicker ver.2 (ニッポンジーン社製)を用いて行い、抽出方法はキットのマニュアルに従った。ただし、抽出バッファーをマニュアルに記載の 5 倍量を用いた。GM コメとしてアイSprant 由来の ribosomal binding protein (RBP) 遺伝子を 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に連結するように設計したコンストラクトをコメ品種‘ニッポンバレ’に導入したものをを用いた。

マイクロアレイに用いるターゲット DNA の標識は Cy3 標識の dCTP を用いてランダムプライム法によって行った。ハイブリダイゼーション条件等は昨年度と同様の方法で行った (平成 22 年度報告書)。ただしマイクロアレイ上のプローブの位置は各図に示すように配置した。

マイクロアレイを用いたトウモロコシゲノム DNA への *phb* 遺伝子をスパイクした時の検出感度の検討は、非組換えトウモロコシから抽出したゲノム DNA 30 μ g に、標準プラスミドを鋳型として 35S-*phbA* (*phbB*)-NOS の領域を PCR 法によって増幅した DNA 断片を 1.0×10^8 あるいは 1.0×10^9 コピ

ーとなるようにスパイクしたものをターゲット DNA として調製してマイクロアレイ解析に供した。

コメを用いた組換え遺伝子の検出感度の検討は、遺伝子非組換えニッポンバレから抽出したゲノム DNA と RBP 組換えニッポンバレから抽出したゲノム DNA を GM コメの割合が 0, 1, 5, 10, 50, 100% となる用に混合し、トータルで 10 μ g となる用に調整したものをターゲット DNA として標識を行った後にマイクロアレイ解析に供した。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査

GM 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲と位置づけた。また、近年、牛、豚、鶏等の家畜は、人畜共通の感染症の報告があることから、これらの家畜の健康に影響を与える植物も、薬用 GM 植物の範囲とした。また、環境中 (土壌、地下水など) の汚染物質 (重金属、残留農薬、残留肥料、有害有機化合物など) に耐性を示すあるいは吸収する能力が付与された植物を「環境浄化 GM 植物」の範囲と定めた。2006 年～2011 年に公表された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を文献データベース (Entrez PubMed, Scifinder[®])、インターネット検索 (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査し、得られた情報は、カテゴリー別に整理し分類した。また、2011 年は、国内学会の情報と SciFinder[®]の情報は、別々に集計を行った。

2) 非食用 GM 植物の検知法開発に関する研究

植物試料等：トマト品種 MoneyMaker (非組換え) 株 (MMWT) 'TOMJPF00002' は National BioResource Project (NBRP) より有償で分譲を受けた。ミラクリントパク質 (Mir) 生産トマト (MMMir) は系統 '5B' cv. MoneyMaker は筑波大学大学院生命環境科学研究科遺伝子実験センター江面浩教授より分譲を受けた。遺伝子等：コレラトキシン B サブユニット (ctxB) 遺伝子は国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第一室五十君静信室長より pET100/D-TOPO ベクターに導入された状態で提供を受けた。pET100B-ctxB vector より、制限酵素サイト (5'-end: *Bsp*HI, 3'-end: *Sac*I)、KDEL 配列を付加したプライマーで PCR 増幅し

た。2.3 k グルテリン B-1 プロモーター (GluB1)、シグナルペプチド、GluB1 ターミネーターは農業生物資源研究所 GM 作物開発センター高岩文雄センター長よりアンピシリン耐性ベクター (配列不詳) に導入された状態で提供を受けた。ベクター等: ビスピリバック Na 塩で組換え体の選抜を行う、イネ組換えベクター pSTARA R-5 ベクターはインプラントイノベーションズより購入した。ミラクリントマト (MMMir) の無菌培養系の確立: 野生型株 (MMWT, cv. Moneymaker) の種子とともに、常法に従い滅菌処理を行い、1/2 濃度 Murashige and Skoog (MS)、2% sucrose、0.25% gelrite [1/2MS (2) G] 培地に無菌的に播種した。現在、MS、3% sucrose、0.3% gelrite [MSG (0.3)] 培地で継代培養を行っている。ミラクリントマト (MMMir) の栽培: ジフィーセブン水でふくらむタネまき土ポット (サカタのタネ) に播種後、発芽した実生を 5 寸鉢 (赤玉土: 堆肥: クレハ培養土 = 3:1:1) に移植し閉鎖温室 (温度 25°C、相対湿度 55%、14 時間明-補光照明使用、10 時間暗) で栽培した。開花後に振動により自家受粉させ、果実は落果まで放置し種子を収穫した。イネ形質転換体の作製: CtxB タンパク質発現コンストラクトの構築及び、イネの形質転換 (インプラントイノベーションズ社に委託) については、前年度報告書の通りである (文献 6)。イネ形質転換体の馴化栽培: インプラントイノベーションズより受領したイネ形質転換体候補株 (試験管培養部物 20 本) は、キメラになっている可能性を考慮し、1 本の試験管内のシュートについて、基部で分割できるものは分割し、馴化栽培に供した。シロイヌナズナ栽培用のアラシステムに、JA 粒状くみあい合成培土 3 号 (サンアグロ全農) (N 0.4 g, P 0.8 g, K 0.6 g /kg) を充てんし、これに分割した幼植物体を定植した。土表面と同じ高さまで灌水し、14 時間明 (温度 28°C) / 10 時間暗 (温度 23°C) のグロースチャンバーに設置した。なお、相対湿度は全期間を通じ 60% とした。野生株は日本晴 WT 種子をシャーレ上播種し、播種 3 日後に芽生えをアラシステムに定植した。成長に伴い、それぞれの株をアラシステムのプラスチックチューブで囲い、栽培を続けた。CtxB 系統定植 15 日後、WT 播種 31 日後に、すべての株を 5 寸のポリポット (用土同上)

に移植し、土表面の高さまで水を灌水するよう自動灌水装置をセットした。CtxB 系統移植後 29 日、WT 播種後 61 日後に 10 時間明 (温度 28°C) / 14 時間暗 (温度 23°C) の短日条件へと日長変更を行った。また、同日、くみあい尿素入り窒素加里化成 2 号 NK2 (16-0-16) を鉢ごとに 3 g 追肥した。CtxB 系統定植後 129 日目、WT 播種後 146 日目に収穫し、自然乾燥後、種籾として収穫した。

イネ形質転換体 (候補) における *ctxB* 遺伝子コピー数の解析: イネ形質転換体 (候補) 株における *ctxB* 遺伝子の導入コピー数の解析は realtime-PCR 法により行った。鋳型遺伝子量の基準となる対照遺伝子にはイネゲノム DNA 上にシングルコピーで存在する *DSH1* 遺伝子 (文献 7) のプロモーター (DSH1p) 領域を設定し、DSH1p 領域との存在比の比較により、*ctxB* 遺伝子の存在量 (コピー数) を推定する方法を採った。なお、鋳型となる遺伝子の存在比の計算には $\Delta \Delta Ct$ 法の適用が可能であったため、同法を採用した。

また、realtime-PCR には機器: ABI PRISM 7000 (ABI)、試薬: SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takarabio) をプロトコルに従い使用した。Ct 値の計算は、自動 (auto threshold) または手動 (manual: 0.1) で行った。なお、鋳型としたゲノム DNA はイネ各株の新鮮葉約 100 mg から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い調製した。登熟過程穎果における *ctxB* 遺伝子の発現解析: 導入された *ctxB* 遺伝子のコピー数を確認した代表的な 3 系統について、登熟過程にある未熟種子 (穎果) における *ctxB* 遺伝子の発現の有無について RT-PCR 法により解析を行った。未熟なイネの果実 (穎果) 3 粒を採取し、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用し、total RNA を調製した。TURBO DNA-free Kit (Ambion) を用い DNase 処理を行った後、AccessQuick™ RT-PCR System (Promega) を使用し、RT-PCR を行った。プライマーには、*ctxB*-BspHI-S + *ctxB*-KDEL-SacI-A のセットを使用し、PCR 産物の量、すなわち転写産物の量はアガロース電気泳動のバンドの強度により半定量的に推定した。T₁ 種子 (コメ) 1 粒における遺伝子導入確認: コメ (種籾) 1 粒からのゲノム DNA 調製には GM quicker 2 (ニッポンジーン) を使用し、ゲノム DNA 溶液 30 μ L を

得た。遺伝子導入検知 PCR は下記のプライマーセットを用い、GoTaq Green Master Mix (Promega) を使用し、Master Mix 3 μ L、センス、アンチセンスプライマー各 10 pmol 1 μ L、コメ抽出ゲノム DNA 1 μ L を加え 6 μ L とし、94°C 5 min - (94°C 30 sec - 58°C 30 sec - 72°C 1 min) x 30 cycle - 72°C 10 min - 4°C ∞ のプログラムで iCycler (BioRad) により PCR を行い、全量を電気泳動で解析した。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

1. 文献調査：論文、インターネット、新聞を使って非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタ、その他の生物の開発状況についての情報収集を行った。インターネットを使った調査では PubMed (キーワード：transgenic fish、transgenic chicken、transgenic pig) を利用した。得られた情報の中から検知のために有用と考えられる項目の一覧表を作った。今回の調査では平成 22 年度の調査以後の情報を集めた。

2. LoxP 配列の検知

LoxP 配列やその他の配列をゲノムに組み込んだ GM ニワトリの ES 細胞を広島大学・堀内浩幸氏より提供を受けて、研究材料とした。この細胞のゲノム中には 2 つの LoxP 配列が組み込まれている。ネガティブコントロールには非 GM ニワトリの ES 細胞を使用した。まず、ニワトリ ES 細胞からゲノミック DNA を抽出する方法を比較検討した。3 種類の市販のキットを試した。抽出したゲノミック DNA については以下のプライマーを使用して nested PCR を行い、PCR が可能であることを確認した。これらのプライマーはニワトリ β -アクチン遺伝子の第 3 エクソンの配列から設計した。

次に、アダプターライゲーション法のポジティブコントロールの実験を行った。ニワトリ β -アクチン遺伝子の第 3 エクソン中の配列を増幅させた。試薬は TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit を用いた。ゲノミック DNA を *Pst* I 消化してカセットをライゲーションさせた。特異的プライマーは上記の ch b-actin F1 と ch b-actin F2 を使った。nested PCR を行ない、増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分析した。

その後、LoxP 配列を検知するためのアダプターライゲーション法を試した。LoxP 配列に

基づく特異的プライマーの組み合わせを 3 組設計した。ゲノミック DNA を 8 通りの制限酵素 (*Sau*3A I, *Eco*R I, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I, *Xba* I, *Bam*H I, *Bgl* II) で消化した。対応するカセットをライゲーションさせた。nested PCR ではアニーリング温度を 40~55°C で変えてみた。耐熱酵素は TaKaRa LA Taq と PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を試した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分析し、GM のゲノミック DNA からのみ増幅される DNA 断片を探した。

C. 研究結果

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

国内で安全性審査の手続きを経た GM 食品とその加工食品には GM 表示が義務付けられている。本実験では、国内でインターネットやスーパーなどで購入可能な生鮮 2 品種、ポテトスナック菓子 4 製品、乾燥ジャガイモ 2 製品、冷凍ジャガイモ 2 製品、ジャガイモデンプン 2 製品、及び、以上に掲げるものを主な原料とする 3 製品を検体として用いた。

生鮮ジャガイモ、ジャガイモ加工食品、EH92-527-1 系統の標準品、non-EH92-527-1 系統の標準品より DNA を抽出・精製し、分光光度計を用いて吸光度を測定することで DNA の抽出効率、及び、精製度を推定した。その結果、ジャガイモデンプン 2 製品 (27-①、③)、及び、その加工食品 1 製品 (春雨、27-②) 以外の計 14 検体から分光光度計で測定可能な DNA 量を抽出・精製することが可能であった。ジャガイモデンプンは、その加工工程においてジャガイモからデンプンのみが分離され、またジャガイモデンプンを用いて春雨が加工されるため DNA の抽出効率が他の製品に比べ著しく低く、吸光度を測定することが困難であったと考えられた。製品分類別による抽出効率に一貫性はなく、吸光度を測定することが可能であった 14 検体の内、冷凍食品 1 製品 (25-①) 以外の 13 検体において O.D.260/O.D.280 と O.D.260/O.D.230 の吸光度の比が 1.7~2.3 となり、これらの検体からは DNA が十分に精製されていると評価された。

加工食品中の DNA は、加工工程における高温、圧力、機械力、及び、他の要素によって断片化されることが報告されている。そこで、定性 PCR 法に

より生鮮ジャガイモ、及び、その加工食品から精製された DNA 検体の断片化の程度について評価を行った。定性 PCR 用プライマーは、ジャガイモの内在性遺伝子 (*UGPase* (GenBank accession no.U20345.1)) の配列情報に基づいて、標的増幅産物のプライマー対を増幅産物の間隔が約 100 bp になるよう、増幅断片長の異なるプライマー対 8 種類 (51、101、201、301、401、501、601、701 bp) を設計した。これらのプライマー対を用いて定性 PCR を行い、3% (w/v) アガロースゲルで電気泳動した結果、全てのジャガイモ製品から得られた DNA を鋳型に 51 bp の増幅産物が検出された。増幅産物の最大断片長は、生鮮ジャガイモは 701 bp、冷凍ジャガイモは 601 bp、ジャガイモデンプンは 501 bp、ポテトスナック菓子は 401 bp、乾燥ジャガイモと乳児用食品や春雨などの加工食品は 301bp であった。Scheme1. に GM 表示対象の加工食品のうち代表的な加工工程を示した。冷凍ジャガイモ、ジャガイモデンプン、ポテトスナック菓子、乾燥ジャガイモの順に加熱、乾燥、冷却などの DNA の断片化に影響を与える処理工程が多くなっていることが考えられた。加工度の高い乾燥ジャガイモやジャガイモデンプンを原料とする加工食品 (ポテトスナック菓子や乾燥ジャガイモと乳児用食品や春雨などの加工食品) は、乾燥ジャガイモやジャガイモデンプンをさらに加工したものであるため、検出された増幅産物はより短く検出された。一方で、冷凍ジャガイモのように加工工程において加熱などの処理が少ない分類に入る製品の場合は、より長い増幅断片長まで検出可能であることが示唆された。

以上の結果より、ジャガイモ製品中の標的 DNA 配列は、増幅断片長を 300 bp 以下に設定すれば、全ての GM 表示対象のジャガイモ製品において PCR による検出が可能であることが示唆された。

データベース検索サイト開発のソフトとしては、FileMaker ServerII ソフトを用いて確立した。ホスティングサービスを利用し、国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部のホームページから公開した。

(<http://gmdb.nihs.go.jp/>)

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

海外の情報収集として、フランスで開催された国際酪農連盟の分析週間に参加し、微生物の検知法に関する会議に出席し情報収集を行っ

た。その会議の後、オーストリアで開催された腸内細菌に関する国際シンポジウムで乳酸菌組換え体に関する研究成果を発表すると共に、GM 微生物の検知法に関する情報交換を行った。DNA を標的とした定量 real time PCR 法による GM 微生物の検出法の検討を行った。乳酸菌モデル組換え体を対象として、豚肉に混入した場合の定量 PCR を行い具体的な検知法を検討した。

L. casei IGM232 株および *L. casei* IGM393 株をエリスロマイシンを含む MRS ブロスで増菌後、10 倍階段希釈したものを豚肉に接種した。接種後、10% 乳剤を調製し、Matsuki ら (2004) の方法に従い PCR テンプレート溶液を調製した。定量 PCR には、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子 *ldhD* および *ery* をターゲットとするプライマーと、プラスミド上にある遺伝子 *ermC* をターゲットとするプライマーを用いた。

プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的すると 6×10^3 cfu まで検出することが可能であった。コピー数においては、*ermC* 遺伝子の方が *ldh* 遺伝子より約 40 倍多いことが明らかとなった。

MRS 培地で 24 時間増菌した場合、両菌株接種群とも低レベルの菌の増殖が認められた。*ery* 遺伝子は、非接種においても検知され、自然界に存在した菌がエリスロマイシン耐性遺伝子を保持していた可能性が示唆された。そこで、モデル組換え乳酸菌を接種していない豚肉検体からエリスロマイシン耐性菌を 24 株単離し、*ery* プライマーおよび *ermC* プライマーを用いて PCR で評価した。そのうち 3 株は *ery* 遺伝子を保有しており、2 株は *ermC* 遺伝子を保有していた。*16S rRNA* 遺伝子の塩基配列から、*ery* を保有する 3 株は、*Streptococcus salivarius* と同定され、*ermC* を保有する 2 株は *Staphyrococcus hominis* と同定された。次に、これらの菌がエリスロマイシン耐性遺伝子をどこに保持するのか、サザンブロット解析で検討した。各菌株から抽出したゲノム DNA をブロットしたものに *ery* プローブをハイブリダイズさせた場合、*Streptococcus salivarius* において、スミアなバンドが検出された。また、プラスミド DNA をブロットし、*ermC* プローブをハイブリダイズした場合、*Staphyrococcus hominis* において 1 本のバン

ドが検出された。これらの結果より、*Streptococcus salivarius* は、*ery* 遺伝子をクロモソーム上に保有し、*Staphyrococcus hominis* は、*ermC* 遺伝子をプラスミド上に保有していることが示された。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

C-1 *phbA*, *phbB* 標準プラスミドの構築

これまでにアマやイネ、ジャガイモを用いて PHB を生産させるために PHB 合成にかかわる遺伝子である *phbA*, *phbB*, *phbC* 遺伝子を導入した植物体を作成する試みがなされている (Plant Physiology (2002) 128: 1282-1290; Plant Biotechnology Journal (2005) 3:249-258)。これらの研究では GM 植物の作出で頻用されているベクター pBI121 の 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus* 由来の *phb* 遺伝子を組み込み、これを用いて組換え植物を作出している例が多く報告されている。しかしこれらの GM 植物は研究段階であり、実際に流通している報告は無いため、最もよく使われている 35S プロモーターと NOS ターミネーターの間に *phbA*, *phbB* 遺伝子を組み込んだ配列を大腸菌内でのコピー数が多く取り扱いやすいベクターである pUC19 へ導入することで標準プラスミドの構築を行った。

C-2 マイクロアレイを用いた *phb* 遺伝子の検出

現時点で非食用 GM 植物は日本国内では流通していないため、作成したプラスミドを鋳型として PCR によって増幅した DNA 断片を遺伝子非組換えトウモロコシゲノム DNA へスパイクした場合にマイクロアレイ法によって検出することが可能であるかについて検討を行った。その結果、*phb* 遺伝子をスパイクした場合、していない場合にかかわらず、トウモロコシ内在性の遺伝子である *sucrose synthase IIb (ssIIb)* 遺伝子のプローブのスポット部分では蛍光が観測された。これに対し、*phbA*, *phbB* 遺伝子をそれぞれ 1.0×10^8 あるいは 1.0×10^9 コピーとなるようにトウモロコシゲノム DNA にスパイクした場合には各々の遺伝子に対応するプローブのスポットでは蛍光が観測され、スパイク

していない場合にはそれらのプローブのスポット位置では蛍光が観測されなかった。これらのことから、マイクロアレイ法を用いて *phbA*, *phbB* 遺伝子をそれぞれ特異的に検出することが可能であることが示唆された。

C-3 マイクロアレイを用いたコメからの組換え遺伝子の検出

RBP 遺伝子組換え、非遺伝子組換えコメ可食部 500 mg からゲノム DNA を抽出したところ、それらの収量は数 μg ~ 十数 μg 程度であった。それら得られたゲノム DNA を GM コメ由来のゲノム DNA が相対比で 0, 1, 5, 10, 50, 100% となる様にトータルで 10 μg となる様に混合し、DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、いずれの GM コメゲノム DNA 混入率においてもコメ内在性遺伝子である *sucrose phosphate synthase (SPS)* 遺伝子のプローブのスポット位置において蛍光が観測された。GM コメ由来 DNA の混入率が 100% の場合には、35S プロモーターと NOS ターミネーター遺伝子のプローブのスポット位置において明らかな蛍光が観測され、その混入率が下がるにつれてその蛍光は弱まり、混合率 0% においては観測されなかった。これらの結果から、コメから抽出したゲノム DNA を用いた場合には GM 遺伝子を混入率 1% 程度まで検出することが可能であることが示唆された。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査:

1. 2011 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況: U. S. Department of Agriculture (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) の情報公開サイト Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS

(http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permit_s.html) で、2011 年の薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べた (表 1、2012 年 1 月 3 日公表)。2011 年は 11 社 (大学及び国立・公的機関を含む) か

ら 20 件の申請がなされ、9 社の 15 件が承認されているが、実際に作付けが行われたのは、Ventria Bioscience のイネ(ラクトフェリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミン及び社外秘) 1 件、Metabolix Inc. のアマナズナ (ポリβヒドロキシブチレート:生分解性プラスチック原料) 1 件、University of Washington のハコヤナギ属植物 (ウサギ由来チトクローム P450 導入:環境浄化)導入1件のわずか3件であった。

2. 2006-2010 年月に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等:2006 年~2010 年に公表・出版された論文等 405 件をカテゴリー別に集計した結果、機能的食品: 120 件、経口ワクチン: 65 件、食用医薬: 25 件、ワクチン抗原: 36 件、抗体医薬: 36 件、治療薬: 76 件、診断薬・試薬: 15 件、環境浄化: 40 件であり、機能的食品、経口ワクチン及び治療薬に関するものが多かった。使用された食用作物は、イネ: 51 件、トマト: 28 件、レタス: 22 件、ジャガイモ: 18 件、トウモロコシ: 15 件であった。3. 2011 年に公表・出版された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する論文等: 関連報告 22 件の内訳は、機能的食品: 10 件、経口ワクチン: 2 件、食用医薬: 1 件、治療薬: 4 件、診断薬・試薬: 1 件、環境浄化: 4 件であり、機能的食品に関するものが最も多かった。得られた情報 45 件の内訳は、機能的食品: 17 件、経口ワクチン: 9 件、食用医薬: 1 件、ワクチン抗原: 0 件、抗体医薬: 3 件、治療薬: 8 件、診断薬・試薬: 1 件、環境浄化: 8 件であり、機能的食品、治療薬、経口ワクチンの順に多かった (2 件重複)。

2) 非食用 GM 植物の検知法開発に関する研究 ミラクリントマト(Mir トマト): Mir トマトについては、組換え体種子の譲渡を受け、モデル組換え体として栽培を行い、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物としての継代・維持を開始した。なお、得られた果実は最終的に MMMir 1 個、MMWT 2 個であった。CtxB イネの栽培と T₁ 種子の取得: インプランタイ

ノベーションズ社より受領したイネ形質転換体候補の培養シュート (20 本) はキメラになっている可能性があったため、基底部分割し、各個体を個別に馴化栽培した。そのため、野生型株 10 株を含め、馴化個体数は 75 株に上った。開花までの成長は順調であったが、前回よりも密植栽培であったため、その後の結実、収穫までの期間は、前回の 100 日程度に比較して大幅な遅延が認められ、WT で播種から 146 日を要した。また、後述するが、栽培棚の風通しの良い通路側と、換気の不十分な壁側では、稲穂及びコメの成長に差が認められ、密植の影響が出ていると推察された。導入 *ctxB* 遺伝子コンストラクトコピー数の解析: 組換え体候補代表株における realtime-PCR 法による *ctxB* 遺伝子のコピー数の解析の結果、導入コピー数は 0 から多いものでは 7 コピーと line によりばらつきが認められた。#4-8-1 は 32 コピーと見積もられたが、この株は成長が芳しくなく、抽出ゲノム試料の状態が不良であったと考えられる。コピー数の分布は、1 copy: 7 lines、2 copy: 1 line、3 copy: 7 lines、>5 copy: 3 lines、no insert: 1 line であった。

コピー数が 1 と見積もられた line について、*ctxB* の遺伝子導入を PCR 法によりそれぞれ確認したところ、確かに遺伝子導入が確認された。また、no insert と判断された #2-10-1 については、同株と元の試験管が同じ line #2-10-2, #2-10-3, #2-10-4 について、PCR 法にて *ctxB* の導入を確認したが、#2-10-1 と同様にいずれも *ctxB* 遺伝子は検出されず、no insert であることが判明した。

さらに、コピー数が 1 と見積もられた line の一部について、元試験管が同じ line について同様に *ctxB* 遺伝子の導入コピー数を realtime-PCR 法で求めたところ、いずれの分割株もコピー数は 1 と見積もられた。これは、元の試験管内の培養物がキメラであった可能性が低いことを示すものである。登熟過程類果における *ctxB* 遺伝子の発現解析: 種子 (コメ) 登熟過程における、*ctxB* 遺伝子の発現の有無は、コメにおける *ctxB* タンパク質生産を確認する指標となる。今回、供試した 3 系統の *ctxB* 遺伝子のコピー数は #1-6-1 系統 3 コピー、#1-7-1 系統 1 コピー、#2-4-1 系統 7 コピー

一であったが、*ctxB* 遺伝子の強い発現が確認されたのは#1-6-1 系統、また、弱い発現が確認されたのは#2-4-1 系統であった。#1-7-1 系統では発現は確認されなかった。GM 植物における、導入遺伝子の発現能は、ゲノム上の導入遺伝子の挿入部位や、コピー数、サイレンシングの有無などの条件によって左右される。今回の試料においても同様の事象が発生していると考えられる。CtxB イネにおける稲穂及びコメの生育状況: *CtxB* 遺伝子を導入した系統と、野生型株 (WT) における稲穂の生育状況を比較した。両者において、生育良好な稲穂と不良な稲穂の数を計数したところ、WT の 10 系統の生育良好穂数の平均値は 14.3 であったが、#1-6-1 系統では生育良好穂数は 7 と WT の平均値を下回り、一方、#1-7-1 系統では 22 であり、WT の平均値を上回った。#2-4-1 系統では生育良好な穂は得られなかった。つぎに、稲穂の成長と導入遺伝子のコピー数との相関について解析を行った。コピー数の明らかになった各系統の代表株について、コピー数と稲穂の生育良好穂数の相関を解析した結果、導入コピー数が高くなると、生育良好穂数が減少する傾向 (相関係数 $r=-0.556$) が認められた。また、稲穂の成長にはグロースチャンバーの密植の影響もあると考えられたため、同じ株について、栽培位置 (換気の良い通路側か壁側か) と稲穂の生育良好穂数との相関について検討したところ、通路側の方が稲穂の成長がよい傾向が認められた。

コメ (種籾) の生育状況については、稲穂の生育状況と同様に、栽培位置の影響が大きいとみられ、通路側の方が、コメの成長がよい傾向であることが判明した。

自殖後代 (T_1) 種子における遺伝子導入の確認: *CtxB* 遺伝子が 3 コピー導入されていた#1-6-1 系統と同系列の#1-6-*系統の種子 (コメ) 各 1 粒について *ctxB* 遺伝子の導入を確認したところ、#1-6-2 以外では PCR で陽性となり、導入が確認された。#1-6-2 のみが非検出であったため、#1-6-2 系統の種子、さらに 4 粒について同様に調査したところ、これらはいずれも *ctxB* 陽性であった。これは、 T_1 世代で、*ctxB* 遺伝子が遺伝的に分離したことを示すものである。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する

る研究

(1) 文献調査

非食用 GM 魚の論文は多数報告されており、活発に研究が行われている。魚への遺伝子導入は技術的に容易になってきていることがうかがえる。非食用 GM 魚について 50 報の論文から情報を収集した。表 2 に結果をまとめた。この中で魚の種類はゼブラフィッシュが 41 報と大多数を占めた。これらのゼブラフィッシュを用いた報告では構造遺伝子の機能の研究やプロモーターの性質の研究が多かった。導入される構造遺伝子では GFP と eGFP で 24 報に達し、タンパクレベルでの検出が容易であるためにレポーター遺伝子として多用されているようである。その他、成長ホルモン、ラクトフェリン遺伝子等の機能を持ったタンパク質をコードする遺伝子の導入も盛んに行われている。報告の大多数を占める GM ゼブラフィッシュは研究室での飼育にとどまると推定される。よって、これらの GM ゼブラフィッシュがフードチェーンに混入する可能性は低いと思われる。

非食用 GM ニワトリを作成した研究報告は 7 報であり、該当する論文は少なかった。これらから情報を収集した。導入遺伝子では EGFP が 5 報と多数を占めた。これらの研究は遺伝子導入法や発現の制御についての基礎研究が多かった。遺伝子導入法ではウイルスベクターが 3 報で使用された。近年ではニワトリの幹細胞への遺伝子導入が研究されているが、まだ十分な成果が得られていないようである。また、鶏卵をバイオリクターとして使う場合に卵 1 個当たり 300-500 mg の組換えタンパクを発現させてほしいとの産業界からの要望があるが、まだこの水準には達していないようである。したがって、鶏卵をバイオリクターとして産業的に利用するにはまだ時間がかかりそうである。

非食用 GM ブタについて 24 報の論文から情報を収集した。研究の目標として臓器移植を目指すと思われる論文は 6 報であり、全体の 4 分の 1 であった。平成 22 年度までの調査に比較すると割合が下がった。一方で研究用と思われる論文報告は 13 報と多かった。近年では GM ブタの臓器をヒトに移植することが試されている。しかし、拒絶反応が完全に抑制できないなど問題が残っているようである。したがって、非食用 GM ブタが大量に飼育されて、フードチェーンに混入する可能性はまだ低いと思われる。

(2) LoxP 配列の検知

ニワトリ ES 細胞からのゲノミック DNA の抽出の結果を表1に示した。ニワトリ β -アクチン遺伝子の第 3 エクソン中の配列を増幅させて、いずれの方法で抽出したゲノミック DNA も PCR が可能であることを確認した。市販のキットを利用することを考えると、ゲノミック DNA があまり分解を受けていないこと、収量の点から DNeasy Blood & Tissue Kit、Blood & Cell Culture DNA Mini Kit が適していると思われる。これらの2つのキットを比較すると、操作の所要時間が短いことから DNeasy Blood & Tissue Kit が使いやすいと考えられた。以下の実験ではゲノミック DNA の抽出にこのキットを使った。

アダプターライゲーション法のポジティブコントロールの実験においては、約 530 bp の DNA 断片がスミアの中に明瞭に検出された。この DNA 断片の大きさは予想と一致しており、適切なプライマーを使ったときにアダプターライゲーション法が可能であることを確認した。

LoxP 配列を検知するためのアダプターライゲーション法について種々の条件を変えて試した。GM と非 GM のゲノミック DNA を材料としたときの増幅産物を分析すると、スミアが検出されて同様のパターンになってしまった。非特異的な増幅が多いようであった。現在のところ、GM のゲノミック DNA を使ったときだけに増幅される DNA 断片は得られていない。

D. 考察

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

本研究では、未承認 GM ジャガイモを検出する検知法の開発に向けて、我が国の GM 表示対象にあたる生鮮ジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品中から精製されるジャガイモ DNA の断片化の程度について解析を行った。また、高感度に未承認 GM ジャガイモの標的配列を検出するため、リアルタイムPCR法の適用性について検討を行った。

これまでに、諸外国で食されているようなジャガイモ加工食品（インスタントポテトフレーク、インスタントグリーンスープ、スパニッシュオムレツ、160-195℃で揚げたジャガイモコロッケ）から精製されるジャガイモ DNA の定性 PCR による検出下限は 104 bp であることが報告されている。そこで、我が国の GM 表示対象のジャガイモ加工食品（ポテ

トスナック、乾燥ばれいしょ、冷凍ばれいしょ、ばれいしょでん粉、乾燥ばれいしょを使用した加工品、ばれいしょでん粉を使用した加工品）から精製された DNA を用いて、ジャガイモ内在性遺伝子 (*UGPase*) を標的に増幅断片を 50~700 bp に設定した定性 PCR を行うことで DNA の断片化の程度について検討した。その結果、300 bp 以下までの増幅断片長を検出可能であることが示唆された。また、ジャガイモ内在性遺伝子 *UGPase* を検出するためのリアルタイム PCR 用のプライマー対、及び、プローブ（増幅断片長 88 bp）を用いリアルタイム PCR 試験に供したところ、全試料から増幅を確認した。以上の結果から、我が国の GM 表示対象のジャガイモ加工食品中に含有する DNA は、加工工程における高温、圧力、機械力、及び、他の要素によって 300 bp 以下まで断片化されていることが示唆され、リアルタイム PCR による標的配列を検出することが可能であることが示唆された。ことが示唆された。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

海外における GM 微生物研究は急速に進んでいる一方で、多くの場合は研究段階である。また実用化されている GM 微生物では主に閉鎖系における物質生産に利用されており、生菌が環境中に放出する可能性は低い。GM 微生物に関して、生きている GM 微生物の安全性並びに環境への放出のリスクに関する方向性が決まっていないため、開放系で用いられることを前提とした GM 微生物の実用化は遅れていると思われる。したがって、環境中から GM 微生物が検出されるとすると、実験段階の GM 微生物が漏出した場合や、正規の扱いを受けていない組換え体の可能性が高いと思われる。このような GM 体は、組換えに関する情報が不明であるため、当該組換え体を検知することは容易ではない。そこで、GM のマーカーとして広く用いられている耐性遺伝子に着目して検知することが出来るかの検討を行っている。グラム陽性菌で頻繁に用いられているマーカーであるエリスロマイシン遺伝子を標的として、組換え微生物の定量的検知法に関し検討を進めた。モデル組換え体として乳酸菌を用い、豚肉に接種後定量 PCR を行い評価した。接種直後において1つの GM 細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合を比べてみると、ほぼ同じコピー数まで検知できるこ

とが明らかになった。認められる約2倍の差はPCR効率の差によるものと考えられる。接種菌数とコピー数について検討してみると、 6×10^4 cfu/g 接種し、*ery* 遺伝子を標的とした場合、PCRの反応チューブあたり菌が30個存在したことになり、この時のコピー数は41コピーとなり両者に大きな差は認められず、元の遺伝子数を反映していた。また、プラスミドなどの複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、当然複数コピー存在する場合の検出感度が高く本方法で定量的に検知することが可能であることが示された。しかしながら、豚肉に接種後、MRS培地で24時間増菌した場合、豚肉に存在していた低レベルの菌の増殖が認められ、これらの菌は少なくともエリスロマイシン耐性を示す*ery*遺伝子および*ermC*遺伝子を保有していた。エリスロマイシン耐性遺伝子について調べてみると、本研究で検討した*ery*および*ermC*は、リボソームメチル化に関連する*erm*遺伝子群の一つであり、*ery*は*erm(B)*遺伝子であった。*erm*遺伝子の中で組換え体によく利用されている*ery* (*erm(B)*) 遺伝子と*erm(C)*遺伝子の相同性について調べた結果、相同性は59%と低かった。組換え体検知の一次スクリーニングとして*erm*遺伝子群のユニバーサルプライマーの設計についても検討したが、*erm*遺伝子群のホモロジーレンジはさらに広く、共通領域は見つからなかった。また、組換え体マーカーとして利用される頻度は低い、薬剤排出亢進にかかわる遺伝子として*msr*遺伝子や*mef*遺伝子等も報告されており、スクリーニングには、それぞれのプライマーセットが必要であると考えられる。エリスロマイシン耐性遺伝子は予想以上に多く、近年の報告においても新たな遺伝子が増えられている。それらが組換え体由来であるか判定することは容易ではなく、今後、プロモーターや制限酵素サイトなど、他の領域を組み合わせる必要があると思われる。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

非食用の GM 植物は現在までのところ国内において流通はしていないが、開発自体はなされていることから、これらの組換え遺伝子の検知法を開発しておくことは重要であると考えられる。本研究では一つのモデルケースとして、

生分解性プラスチックの原料である PHB 合成にかかわる遺伝子である *phbA*, *phbB* 遺伝子が、トウモロコシゲノムに混入した場合にマイクロアレイ法を用いて検知可能であるかについて検討を行った。その結果、それらの遺伝子断片がトウモロコシゲノム 30 μ g あたりに 1.0×10^8 コピー存在した場合に検出可能であることが判明した。この検出感度は昨年度までの報告から少なくとも混入率 100%であれば組換え *phb* 遺伝子を検知可能である感度であった。トウモロコシゲノムは約 23 億塩基対であり、食用となる主要な作物の中でもそのサイズが大きい。そのため、トウモロコシゲノムを用いて検出することが可能であれば、他植物への応用が十分可能であると期待される。そこで、日本国における主食であるコメについてマイクロアレイ法による組換え遺伝子の検出が可能であるかについて検討を行った。その結果、コメを用いた場合には組換えコメの混入率が 1%程度であっても十分に検出可能であることが示唆された。これはコメのゲノムサイズは約 4 億塩基対程度であり、トウモロコシゲノムに比較して十分に小さいことからグラム当量の組換え遺伝子のコピー数が高くなったためであると考えられた。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

現在、薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場での作付け状況がインターネットで公開されているのは、米国のみである。2011 年の作付け状況の調査の結果、野外圃場栽培が承認されていても、実際に作付けまで行われたものは非常に少ないことが判明した。2006-2010 年の文献等の調査の結果、食用作物としては、イネ、トマトの使用頻度が高く、検知法開発の優先作物として妥当であることが示された。

ミラクリントマトについては、得られた果実数が WT で 2 個、MMMir で 1 個と芳しくない結果となった。これは施肥量の不足 (Hyponex® 500 倍液、週 1 回) が原因と考えられるため、施肥条件を検討する必要がある。

CtxB イネについては、 T_1 種子を取得するとともに、それらにおける *ctxB* 遺伝子の導入を確認することができた。これらは、 T_1 世代で分離していることが明らかになったため、当世代の育成の際には、播種後のなるべく早い段階で、葉からゲノム DNA を調製するなどし、

PCR 法等により *ctxB* 遺伝子の存否を確認する必要がある。

また、登熟過程における *ctxB* 遺伝子の半定量的な発現量解析から、系統によって *ctxB* 遺伝子がまったく発現せず、*ctxB* タンパク質が蓄積されていないものがあると推定される。*CtxB* タンパク質の高生産・蓄積系統を選抜するため、コメ中の *ctxB* タンパク質の競合的 ELISA 法による定量法を検討している。

グロースチャンバーにおけるイネの栽培では、密植の影響が問題となることがあらためて認識された。グロースチャンバー栽培では、イネ植物体周囲における換気、温度条件に注意しなくてはならない。

なお、本年度は震災に起因する節電対策の影響で、閉鎖温室の使用が制限され、ミラクリントマト及び *ctxB* イネの栽培計画に影響があった。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

(1) 文献調査

非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタについて開発状況を調べた。特に、魚については多くの論文が報告されており、研究の目的で様々な非食用 GM ゼブラフィッシュが作成されていた。C. 研究結果の項目に記した理由から、非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタに由来する材料がフードチェーンに混入する可能性は現在はまだ低いと思われる。しかし、今後も同様な調査を続ける必要がある。

(2) *LoxP* 配列の検知について

ニワトリ ES 細胞からゲノミック DNA を抽出する方法を比較検討した。次に、アダプターライゲーション法を利用して *LoxP* 配列を検知することを試みた。現在のところ GM のゲノミック DNA からだけ増幅される DNA 断片は得られていない。 β -アクチン遺伝子を増幅させるポジティブコントロールの実験が成功していることから、*LoxP* 配列を基にした特異的プライマーが PCR には適していないことが推定される。図 1 に示した *LoxP* の配列は赤字と青字の部分がパリンδροーム構造を取っている。この部分のみで設計したプライマーでは PCR が両方向に走ってしまい、特異性がない。また、赤字と青字にまたがる長い配列のプライマーを設計するとプライマーが分子内で高次構造を取ってしまい、PCR の効率が落ちると

予想される。さらに、*LoxP* 配列が全体的に AT リッチであるために T_m 値が十分に高いプライマーが設計できない。このような事情から *LoxP* 配列に基づいて特異的なプライマーを設計することが困難であると考えられた。本研究で試したプライマーも PCR を行うことが難しかったようである。*LoxP* 配列のみを手掛かりに検知法を作成するためにはさらなる工夫が必要であり、今後の検討課題である。

E. 結論

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

ジャガイモ加工食品から精製した DNA を定性 PCR 法に供したところ、検出可能な増幅断片長は 300 bp 以下であった。この結果から、増幅断片長を 300 bp 以下に設計することで、多くのジャガイモ加工食品において、標的遺伝子を検出できることが示唆された。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

食品（豚肉）に組換え体が混入した場合、挿入遺伝子の情報があれば、ハウスキーピング遺伝子と比較対照することで定量的に検知することが可能であることを示した。組換え体の遺伝子の情報がない場合、エリスロマイシン耐性遺伝子のみをターゲットにすることにより組換え体の可能性を判定することは難しく、それ以外の遺伝子の保持状況を加えて組換え体であるかの判断を行っていく必要がある。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

遺伝子組み換え技術によって植物で生分解性プラスチックの原料の一つである polyhydroxybutylate を生産させるために利用されている遺伝子である *phbA*、*phbB* 遺伝子についてその標準プラスミドを構築した。それを用いてトウモロコシゲノム中の *phbA*、*phbB* 遺伝子を検知可能であるかについて検討したところ、昨年度までと同等の感度で、それぞれの遺伝子を特異的に検出することが可能であることが判明した。また、マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知法を日本国における主食であるコメに応用するために、GM コメから抽出したゲノム DNA と非 GM コメから抽出し

たゲノム DNA を一定の割合で混合し、マイクロアレイ解析に供した。その結果、GM コメ中の組換え遺伝子を混入率 1%程度まで検知することが可能であることが示唆された。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

2006 年～2010 年に公表された薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報調査の結果、食用作物としてはイネ及びトマトの使用頻度が高いことが示された。調査研究結果に基づき、検知対象 GMO のモデルとしてミラクリン生産トマト及びコレラトキシシン B サブユニット生産イネを設定し、これらの研究試料としての供給系の確立ならびに構築を行った。

ミラクリントマトについては、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物の維持を継続して行った。また、コレラトキシシン B サブユニット生産イネ (ctxB イネ) については、イネグルテリンプロモーターで ctxB タンパク質を発現するコンストラクトを導入したイネ形質転換体の馴化栽培をグロースチャンパーで行い、realtime-PCR 法により導入遺伝子コピー数の解析を行うとともに、T₁ 種子 (コメ) を取得した。さらに T₁ 世代のコメにおける ctxB 遺伝子の導入を PCR 法により確認した。以上のように、遺伝子またはタンパク質レベルでの検知実験に利用可能なモデル GM トマト及びモデル GM イネの、研究試料としての供給体制の構築を完了した。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

平成 22 年度の調査以降の非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタの開発状況を調査した。特に魚で多数の報告があった。また、ニワトリ ES 細胞からのゲノミック DNA の抽出法を比較検討した。さらに LoxP 配列のみを手掛かりとして GM 魚や動物に由来する材料を検知するためのモデル実験として、アダプターライゲーション法を試して、その条件検討を行った。

参考文献

1. Sun HJ, Kataoka H, Yano M, Ezura H. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *Plant Biotechnol J.* **5**, 768-777 (2007)
2. Kim YW, Kato K, Hirai T, Hiwasa-Tanase K, Ezura H.

Spatial and developmental profiling of miraculin accumulation in transgenic tomato fruits expressing the miraculin gene constitutively.

J Agric Food Chem. **58**, 282-286. (2010)

3. 「種子特異的プロモーターおよびその利用」高岩 文雄

(独立行政法人農業生物資源研究所) 出願日：平成 20 年 2 月 4 日、公開番号：特開 2008-109946 (P2008-109946A)

4. Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, Kiyono H. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination.

Proc Natl Acad Sci U S A. **104**, 10986-10991 (2007)

5. Wu CY, Suzuki A, Washida H, Takaiwa F.

The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants.

Plant J. **14**, 673-683 (1998)

6. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止のための検知法開発に関する研究」(H22-食品一般-001) 平成 22 年度総括・分担研究報告書, pp.45-57, 平成 23 年 5 月

7. Imamura T, Kusano H, Kajigaya Y, Ichikawa M, Shimada H.

A rice dihydrosphingosine C4 hydroxylase (DSH1) gene, which is abundantly expressed in the stigmas, vascular cells and apical meristem, may be involved in fertility. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1108-1120 (2007)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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. Biological

- & Pharmaceutical Bulletin, 34(10), 1648-1651 (2011).
2. 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 International*, 94(5), 1540-1547 (2011).
 3. 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. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73(5), 615-621 (2011).
 4. Suzuki, A., Duc, H. P. N., Nakamura, K., Akiyama, H. and Kasahara, Y. Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 81, 18-23 (2011).
 5. Masuda Kazuya, Akinobu Kajikawa, and Shizunobu Igimi. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. 30, 37-44 (2011)
 6. Yoshimatsu, K., Kawano, N., Kawahara, N., Akiyama, H., Teshima, R., Nishijima, M.: Current status of application and commercialization of genetically modified plants for human and livestock health and phytoremediation, *YAKUGAKU ZASSHI*, 132, 1-47 (2012).
- 学会発表
1. 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)
 2. 高橋勇貴、中村公亮、穂山浩、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.)
 3. 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、穂山浩、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)
 4. 中村公亮、穂山浩、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)
 5. 野口秋雄、穂山浩、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)
 6. 高橋勇貴、中村公亮、穂山浩、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)
 7. 北川麻美子、山田千尋、中村公亮、小林武史、川上浩、穂山浩、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)
 8. 穂山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、

- 峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橘田和美、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）
9. 中村公亮、穂山浩、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）
 10. 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、坂田こずえ、穂山浩、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）
 11. 高橋勇貴、中村公亮、穂山浩、大森清美、笠原正輝、中澤裕之、橘田和美、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換えパパイヤ(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 回年会（2012.3）
 12. 穂山浩：遺伝子組換え食品と検査法の動向と課題、日本薬学会第 132 回年会（2012.3）
 13. Kazuya Masuda and Shizunobu Igimi.
Establishment of in vitro M cell model and evaluation of M-cell targeted genetically modified bacteria. The 6th International Yakult Symposium. The Gut and Its Role in Health Maintenance. Vienna, Austria (2011.5)
 14. Kazuya Masuda and Shizunobu Igimi.
Establishment of in vitro M cell model and evaluation of genetically modified bacteria as vaccine delivery vehicles targeting M cells. 1st Biotechnology World Congress. Dubai, UAE. (2012.2)
 15. 森田英利、Tulika Prakash、大島健志朗、藤英博、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。乳酸菌とビフィズス菌における線毛遺伝子群の解析。日本ゲノム微生物学会。（2012.3）
 16. 吉松嘉代、河野徳昭、川原信夫、穂山浩、手島玲子、西島正弘：非食用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会（2011. 5）
 17. 吉松嘉代、河野徳昭、川原信夫、穂山浩、手島玲子、西島正弘：薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向第 29 回日本植物細胞分子生物学会（福岡）大会・シンポジウム（2011. 9）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中に混入する可能性のある非食用遺伝子組換え(GM: Genetically Modified)生物を検知する技術としては、食品から抽出精製したDNAを、リアルタイムPCR法を使用し高感度に検出する方法が挙げられる。本研究では、リアルタイムPCR法を用いてジャガイモ加工製品中に混入する可能性のある未承認非食用GMジャガイモを検知する方法を新たに開発するため、ジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモDNAの断片化の程度を解析した。また、GMジャガイモを検出できるDNA増幅断片長の下限値を明らかにするための検討も行った。その結果、ジャガイモ加工食品から精製したDNAを定性PCR法に供したところ、検出可能な増幅断片長は300bp以下であった。この結果から、増幅断片長を300bp以下に設計することで、多くのジャガイモ加工食品において、標的遺伝子を検出できることが示唆された。非食用バイオテクノロジーの開発状況のデータベース検索のWeb公開用ソフトを確立し、一般公開した。

協力研究者

中村公亮、近藤一成(国立医薬品食品衛生研究所)

川上浩、中村香織(共立女子大学大学院)

A. 研究目的

本研究では、リアルタイムPCR法を用いてジャガイモ製品中に混入する可能性のある非食用未承認GMジャガイモを検知する方法を開発するための基礎的な検討として、ジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモDNAの断片化の程度を解析した。また非食用GM体データベースWeb検索用ソフトを開発し、一般公開した。

B. 研究方法

1. 試料・試薬・機器

<試料>

厚生労働省が定めたジャガイモ加工食品のGM食品表示対象製品に含まれる生鮮、及び、加工食品(Fig. 1.)より、東京都内のスーパーやインターネットで購入した生鮮ジャガイモ2品種(男爵とメークイン)、冷凍ジャガイモ2製品、乾燥ジャガイモ、及び、その加工食品4製品、ジャガイモデンプン、及び、その加

工食品3製品、ポテトスナック4製品を用いた。

<試薬>

DNAの抽出・精製には、QIAGEN製イオン交換樹脂タイプキット(Genomic-tip 100/G)を用いた。DNAの抽出・精製時に用いた分解酵素には、(株)ニッポンジーン製 α -amylase(高濃度品)(Cat. No.316-04751)、QIAGEN製20mg/mL Proteinase K(Cat. No.19133)、(株)ニッポンジーン製100mg/mL RNaseA、シグマアルドリッチジャパン(株)製Cellulase(Cat. No.C2730)を用いた。DNA電気泳動解析に使用したアガロースは、タカラバイオ(株)製LO3「TAKARA」(Cat. No.5003)を用い、緩衝液には、ナカライテスク(株)のトリス-酢酸-EDTA緩衝原液(Cat. No.32666)を用いた。サンプルの添加液>Loading Buffer)は、タカラバイオ(株)製(Cat. No.RR001A)を用いた。標準DNAサイズマーカーは、タカラバイオ(株)製100bpラダー(Cat. No.3407A)と20bpラダー(Cat. No.3409A)を用いた。DNAの検出に用いたエチジウムブロマイドは、(株)ニッポンジーン製10mg/mL EtBr Solution(Cat. No.315-90051)を用いた。定性PCRには、ライフテクノロジーズ(株)製Ampli Taq Gold(Cat.

No.00058004340-01)を用いた。リアルタイム PCR には、ライフテクノロジーズ(株)製 TaqMan®Universal PCR Master Mix (Cat. No.58003365-01)を用いた。プライマーは、ファスマック製のものを用いた。実験に使用した水は、日本ミリポア(株)製 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。

<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 を用いた。冷却遠心機は、トミー製 MRX-150 を用いた。卓上遠心機は、フナコシ(株)製 KR-1000、05-514-0、KURABO 製 DISKBOY を用いた。96 ウェルプレート遠心機は、METALFUGE 製を用いた。タッチミキサーは、大和製 MT-5 と Scientific Industries 製 VORTEX GENIE-2 (G-560) を用いた。マグネチックホットスターラーは、三田村理研工業(株)製 MRK を用いた。電気泳動装置は、(株)アドバンス製 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。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、ライフテクノロジーズ(株)製 GeneAmp PCR System 9700 を用いた。リアルタイム PCR は、ライフテクノロジーズ(株)製 PRISM™ 7900HT を用いた。

2. ジャガイモ製品からの DNA の抽出・精製

生鮮ジャガイモの試料には、数個の男爵またはメークインを水でよく洗浄し、皮を剥いた上で芽の付近を中心に 30 g を採取し、ミルサー*1 にかけて粉碎したものを使用した。ジャガイモ加工製品は、各製品毎に前処理を行ったものを試料とした。すなわち、6 個の冷凍ジャガイモ、10 g のポテトスナック、50 g の乾燥ジャガイモ、100 g のジャガイモデンプン加工食品(春雨)をそれぞれミルサーにかけて粉碎したものを試料とした。乾燥ジャガイモ加工食品(ベビーフード)は、可能な限りジャガイモのみを採取しミルサーで粉

砕したものを試料とした。

粉碎した各試料(生鮮ジャガイモ(10 g)、ポテトスナック(10 g)、乾燥ジャガイモ、及び、加工食品(10 g)、冷凍ジャガイモ、及び、加工食品(10 g)、ジャガイモデンプン、及び、加工食品(10 g)、乾燥ジャガイモ(1 g))は、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip 100/G、及び、QIAGEN Genomic-tip 20/G)を用い、付属のプロトコルを改変し以下の通り DNA の抽出・精製を行った。試料は、ポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、G2 緩衝液*2 30 mL、 α -amylase 20 μ L、cellulase 500 μ L と RNaseA 20 μ L を加えた。ただし、EH92-527-1 系統標準品(0.3g)と non-EH92-527-1 系統標準品(0.3 g)には、G2 緩衝液*2 750 μ L、 α -amylase 0.5 μ L、cellulase 12.5 μ L と RNaseA 0.5 μ L を加えた。サンプルがチューブの底に残存しないようボルテックスミキサーで激しく混合し、50°C で 1 時間保温した。保温している間、2~3 回遠沈管反転させて混和した。さらに、Proteinase K 200 μ L (EH92-527-1 系統と non-EH92-527-1 系統の標準品は 5 μ L)を加え、再び 50°C で 1 時間保温した。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、3,000 x g、4°C で 20 分間遠心分離し、得られた上清を、あらかじめ QBT 緩衝液*2 4 mL (EH92-527-1 系統と non-EH92-527-1 系統の標準品は 2 mL)を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G (EH92-527-1 系統と non-EH92-527-1 系統の標準品は QIAGEN Genomic-tip 20/G)に負荷した*3。一回の遠心で上清がうまく採取できない場合は、3,000 x g、4°C で 10 分間遠心分離し、できる限り採取した。次いで、チップを QC 緩衝液*2 で 7.5 mL (EH92-527-1 系統と non-EH92-527-1 系統の標準品は 1.5 mL)ずつ 3 回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、QF 緩衝液*2 2 mL (EH92-527-1 系統と non-EH92-527-1 系統の標準品は 800 μ L)を負荷し、DNA を溶出した。次いで、イソプロパノールを 3 mL (EH92-527-1 系統と non-EH92-527-1 系統の標準品は 1.2 mL)添加してよく混合した。マイクロチューブ(1.5 mL 容)5 本に均等になるように移し、遠沈管を遠心分離機で軽く遠心し残りも均等になるようにマイクロチューブに移し

た。15,000 x g、4°Cで20分間遠心し、上清を廃棄した後、70% (v/v)エタノール 1000 µL を加え、さらに15,000 x g、4°Cで10分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿物を減圧乾燥機にかけて乾燥させた。水 30 µL を一つのマイクロチューブに加えて沈殿物を溶解させ、その溶解液全量を別のマイクロチューブに移し入れ、よく混合し、この作業を繰り返して全てのマイクロチューブから沈殿物を溶解させ、抽出 DNA 原液とした。

*1 ミルサーやスパチュラ、包丁など前処理に用いたものは全てコンタミネーションを防ぐため、市販の DNA ZAP (Ambion 製、Cat. No. AM9890) を用いて DNA 分解処理したものを用いた。使用後はコンタミンに一晚浸けて殺菌をした。実験に使用せず残った試料は、ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) にとり冷凍庫 (-30°C) で保管した。

*2 G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、及び、QF 緩衝液はキットに付属しているものを使用し、足りない場合にはキットの説明書に従って調製した。

*3 沈殿物や上層の膜状の部位を取らないようにした。

3. 精製した DNA の定量、及び、純度の測定

抽出した DNA 原液は、230、260、及び、280 nm の吸光度を測定することで DNA の定量、及び、純度の推定を行った。吸光度の測定は、NanoDrop 社製分光光度計 ND-1000 V3.2 を使用した。吸光度の測定比 260 nm/230 nm から塩類などの夾雑物量を推定し、260 nm/280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。得られた DNA 濃度から、DNA 原液を 10 ng/µL に水で希釈して調製し DNA 試料液とした。なお、DNA 原液の濃度が 10 ng/µL に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いた。

4. サーマルサイクラーを用いた定性 PCR 法

(1) プライマーの設計

ジャガイモの内在性遺伝子 (*UGPase* (GenBank accession no. U20345.1)) 検出用のプライマーは、Primer Express 2.0 を用いて設計した。プライマーの設計方法は、3'-末端が G か C であること、5 つ連続

した塩基配列がなく、GC コンテンツが 50~60% で、 T_m 値が $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内であることを基準とした。また、基準をすべて満たすものがない場合は、2 つ以上の条件を満たすものとし、増幅断片長は 51 bp になるよう設計したものと 101~701 bp までの 100 bp 間隔で 7 箇所設計したものを使用した。

(2) PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製した。組成は以下のとおりである。Ampli *Taq* Gold PCR Master Mix*1 12.5 µL と 0.5 µL 対象プライマー対溶液を混合し、水で全量 23 µL に調製した。先にウェルに DNA 試料液 2 µL を底に付けるように添加し、その後調製液を DNA 試料液と混合させながら添加した。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*2。

*1 Ampli *Taq* Gold PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意した。使用前に軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用した。また、温度を上げると酵素が反応してしまうため、反応開始前の試料を扱う作業は氷上で行った。

*2 DNA 試料液の添加の際、Non Template Control (NTC) には、DNA 試料液の代わりに水をウェルに 5 µL 添加した。

(3) PCR 増幅条件

設計したプライマーを用いて PCR による鋳型 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。反応条件は以下のとおりである。95°C 10 分間の条件で保持した後、95°C 30 秒間、55°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとして、44 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。

(4) 電気泳動、及び、画像解析

定性 PCR 後の解析には、PCR 反応液を 3% (w/v) アガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。タカラバイオ(株)製のアガロースを 3 g 電子天秤で量りとり、蓋付きビーカー (500 mL 容) の中で