

TAE Buffer (1X) 100 mL に電子レンジで加熱しながら溶解させた。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで気泡がなくなるまで攪拌した。光に当てて観察してアガロースが溶けてなくなっていることが確認でき気泡がなくなるまでこの加熱作業を繰り返した。次に臭化エチジウム溶液*1 10 µL を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型にゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの裏やキムワイプなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で45分、冷蔵庫で15分ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。PCR 反応液は PCR 反応後、PCR チューブごと軽く遠心し、Loading Buffer (10x) を 2.5 µL ずつチューブ内のふちに付け、再度 PCR チューブを遠心して混合し試料とした。3% (w/v) アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5 µL、20 bp マーカーを 10 µL、試料 7.5 µL*2 を入れ電気泳動 (100V、20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、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ゲルイメージ解析装置を用いて行った。

*1 臭化エチジウム溶液 (EtBr Solution (10 mg/mL)) 臭化エチジウム 10 mg を精製滅菌水 1 mL で溶解させたものを使用した。発がん性であるため、ゴム手袋をはめて作業を行い、また落下しないようにラップを敷いて取扱いに細心の注意を払った。添加する際はピーカーを斜めにし直接アガロース液に加えた。また、光に弱いため素早く作業を行い、作業後はすぐに光を遮断する付属の袋に入れて冷蔵庫で保存した。

*2 ゲルに入れる前に、ウェル内でピペットを用いて 5 回ほど混合させた。

5. リアルタイム PCR 法の適用性評価 (ABI PRISM™ 7900HT)

(1) リアルタイム PCR 用反応液の調製

リアルタイム PCR 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。Universal Master Mix*1 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、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.25 µL を混合し、水で全量 22.5 µL に調製後、DNA 試料液 2.5 µL を添加した。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないコントロール試料についても同時に調製した*2。分注操作終了後、真上からシール*3 し、完全にウェルを密閉した。このとき、しわが寄らないよう注意し、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、96 ウェルプレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておいた。96 ウェルプレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad*4 を茶色の面が上になるよう、96 ウェルプレートの上面にセットした。

*1 Universal 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。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 3 秒程度混合した後、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、本試薬の使用時や本試薬添加後の調製液を使用する作業は氷上で行った。

*2 DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに水をウェルに 2.5 µL 添加した。

*3 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリケーションは MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ライフテクノロジーズ(株))、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (ライフテクノロジーズ(株)) を使用した。

*4 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (ライフテクノロジーズ(株)) を使用した。

(2) リアルタイム PCR 増幅条件

リアルタイム PCR 装置に 96 ウェル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 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。

(3) リアルタイム PCR のデータ解析

ベースラインは3~15サイクルに設定した。Ct 値をプロットするための ΔRn threshold は指数関数的な増幅の間、0.2~0.5 に設定した。指数関数的な増幅が確認され Ct 値が 48 未満の場合、陽性である判定した。Ct 値が得られない場合は、陰性であると判定した。

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 ServerII 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。

C. 研究結果

ジャガイモ加工食品から精製した DNA の評価

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。Fig1. に GM 表示の対象となる生鮮ジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品を分類別にまとめ、それぞれの定義を示した。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 (Table 1)。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。Fig.2

に各試料の DNA 抽出効率と、DNA 精製度を示す吸光度比をグラフにプロットした。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 (Fig.3)。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 (Fig.4)。Table 2 に 51~701 bp の増幅断片長で得られた増幅産物の結果を示した。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 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/>)

D. 考察

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°C 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。

我が国においてすでに安全性が確認されている GM ジャガイモのうち、ニューリーフ・ジャガイモ (SPBT02-5 系統)、ニューリーフ・ジャガイモ (Bt-6 系統)、ニューリーフ・プラス・ジャガイモ (RBMT21-350 系統)、ニューリーフ・Y・ジャガイモ (SEMT15-15 系統)、ニューリーフ・Y・ジャガイモ (RBMT15-101 系統)、ニューリーフ・Y・ジャガイモ (SEMT15-02 系統) を検出する定性 PCR 法の標的増幅産物は、111 bp または 117 bp に設定され、その検知法は公定法として通知されている。このうち SPBT02-5 系統、RBMT21-350 系統、RBMT15-101 系統、及び、安全性未承認のニューリーフ Russet Burbank (RBBT6 系) を検出する定性 PCR の検知法の検出限界は 0.01% であることが報告されている。一方で、リアルタイム PCR 法を用いれば 70~150 bp の増幅産物をリアルタイムに検出することができ、非食用 GM ジャガイモ EH92-527-1 系統検知法の定性的な検出限界は、約 100 倍の検出感度を得ることができる高感度な方法であることが示唆された。今後、陽性プラスミドを用い詳細な検出限界、及び、定量限界を検討する必要があると考えられた。

データベース検索ソフトを一般公開することにより、非食用遺伝子組換え体の検知法の開発に有効な手段として利用されることが期待される。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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, 1648-1651 (2011).
- 2) 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. *Journal of Food Science*, 76(6), 299-304 (2011).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).

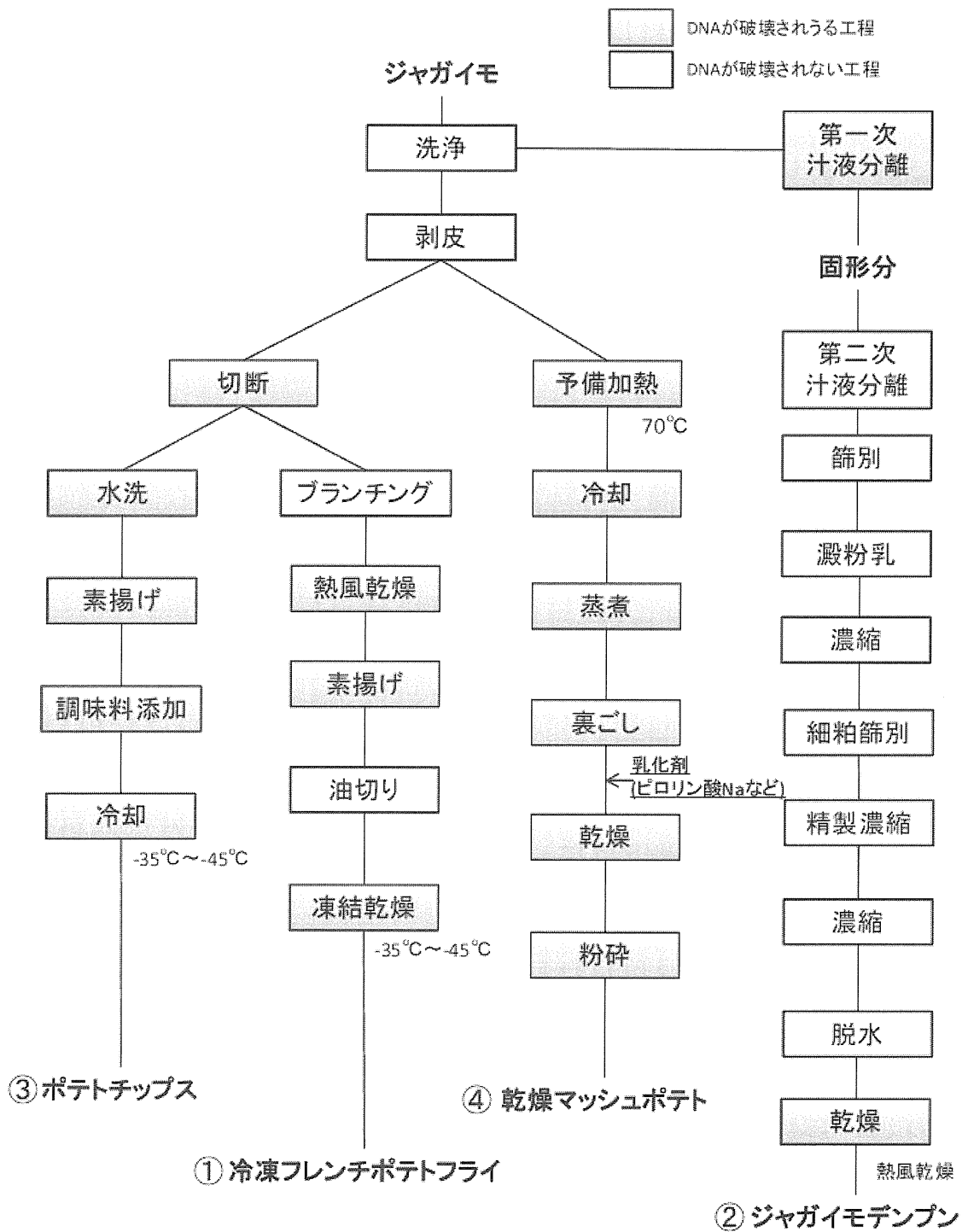
2. 学会発表

- 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、高畠令王奈、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、高畠令王奈、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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



Scheme 1. A flowchart of the typical manufacturing process for processing the potato products

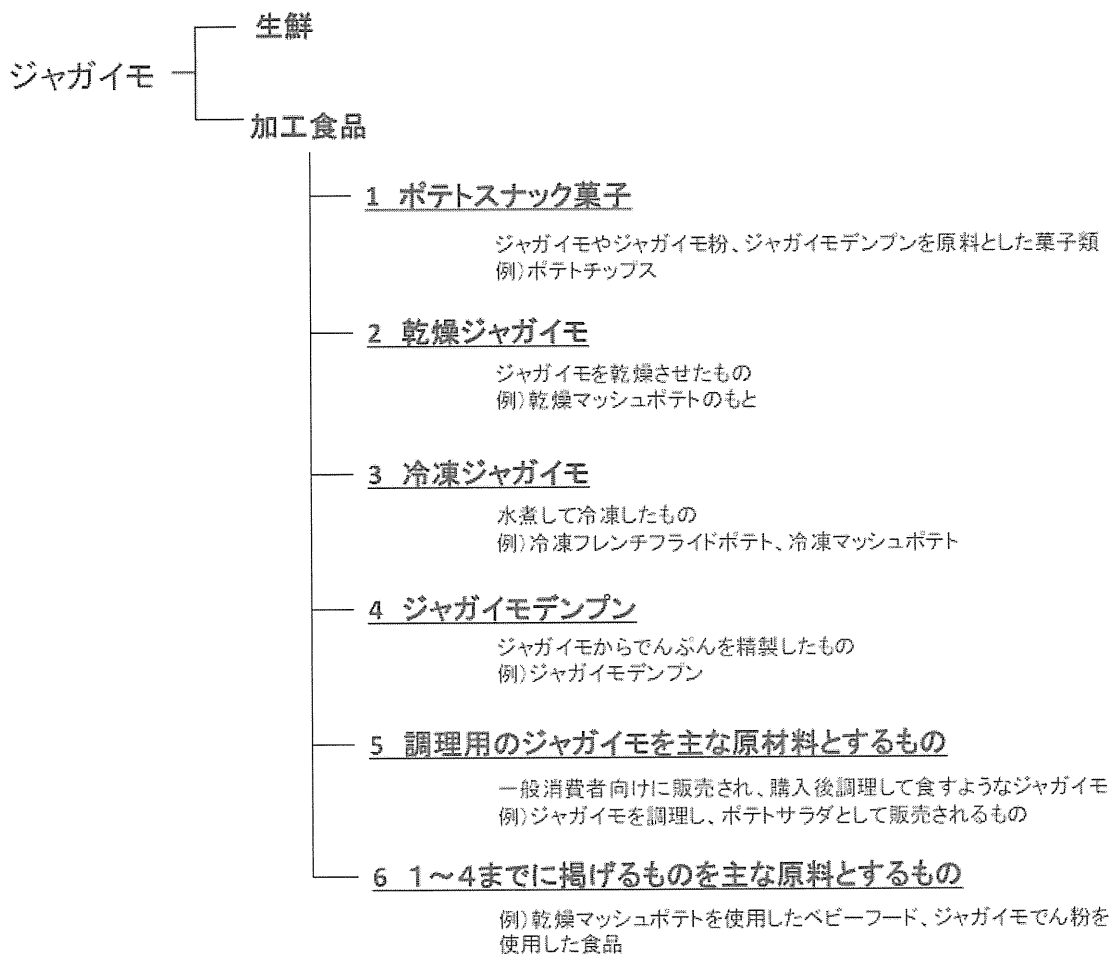


Fig 1. GM表示対象のジャガイモ(生鮮及び加工食品)とその定義

食品衛生法表示関連法令(食品衛生法(昭和22年12月24日法律第233号))および厚生労働省医薬品食品局食品安全部基準審査課 食品表示に関する共通Q&Aより改変

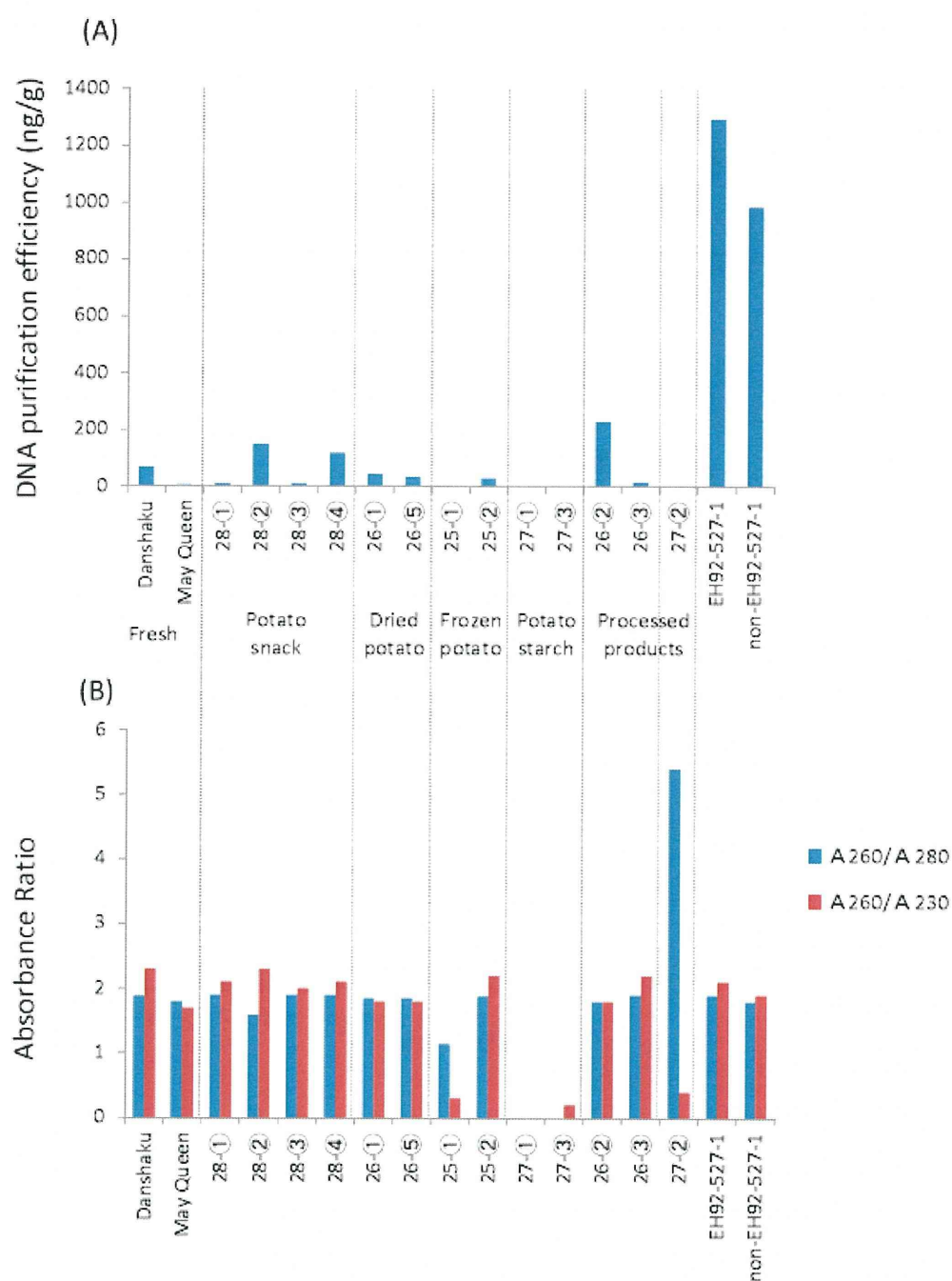


Fig 2. DNA purification from potato products
 (A) DNA purification efficiency (ng/g)
 (B) Absorbance Ratio

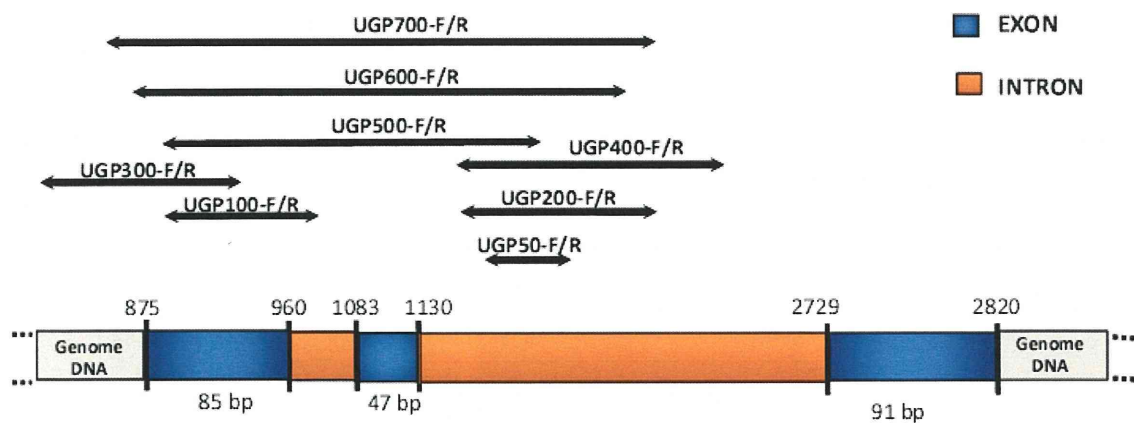


Fig 3. Oligonucleotides design for PCR detection of potato endogenous reference gene, *UGPase* (Gen Bank; U20345.1)

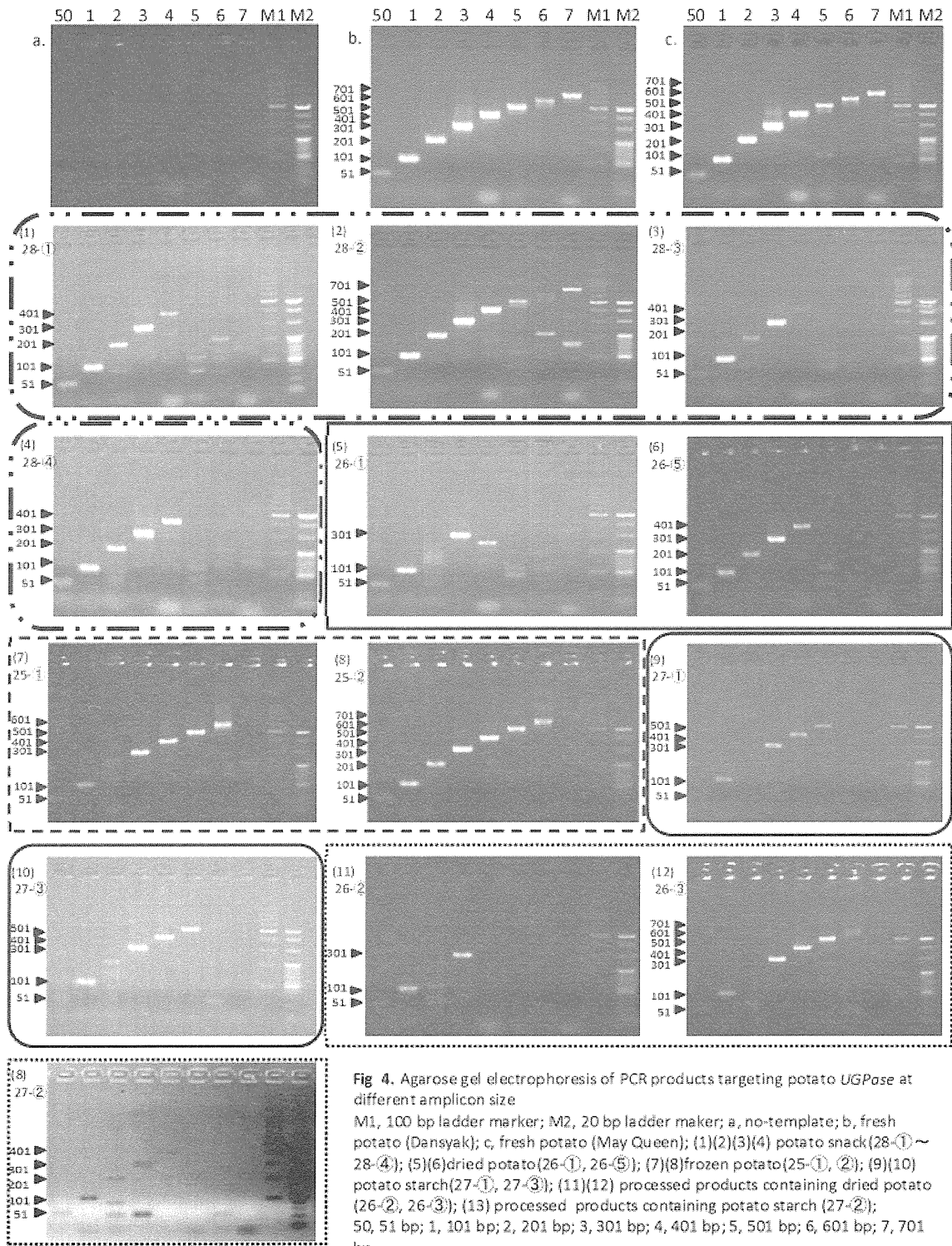


Table 1. DNA purification profile of various potato products

| Products | Sample (g) | Total DNA purified (ng) | Efficiency*(ng/g) | A ₂₆₀ | A ₂₈₀ | A ₂₃₀ | A _{260/A280} | A _{260/A230} | |
|---|------------|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------|
| Fresh potato | Danshak | 10 | 688.1 | 68.8 | 13.7 | 7.2 | 6.0 | 1.9 | 2.3 |
| | May Queen | 10 | 61.0 | 6.1 | 1.4 | 0.8 | 0.8 | 1.8 | 1.7 |
| Potato snack | 28-① | 10 | 85.1 | 8.5 | 1.7 | 0.9 | 0.8 | 1.9 | 2.1 |
| | 28-② | 10 | 1498.3 | 149.8 | 30.0 | 15.2 | 13.3 | 1.8 | 2.3 |
| | 28-③ | 10 | 108.2 | 10.8 | 2.2 | 1.1 | 1.1 | 1.9 | 2.0 |
| | 28-④ | 10 | 1172.9 | 117.3 | 23.5 | 12.4 | 11.2 | 1.9 | 2.1 |
| Dried potato | 26-① | 10 | 442.3 | 44.2 | 8.9 | 4.8 | 4.8 | 1.9 | 1.8 |
| | 26-② | 10 | 2293.6 | 229.4 | 45.9 | 25.5 | 26.1 | 1.8 | 1.8 |
| Frozen potato | 25-① | 10 | 39.3 | 3.9 | 0.8 | 0.7 | 0.3 | 1.1 | 0.3 |
| | 25-② | 10 | 293.6 | 29.4 | 5.9 | 3.1 | 2.7 | 1.9 | 2.2 |
| Potato starch | 27-① | 10 | 0.0 | 0.0 | -0.0 | -0.0 | 0.0 | 0.0 | -0.0 |
| | 27-③ | 10 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | -0.0 | 0.0 | -0.8 | 0.2 |
| Processed products containing dried potato (baby foods) | 26-③ | 10 | 144.2 | 14.4 | 2.9 | 1.5 | 1.3 | 1.9 | 2.2 |
| | 26-⑤ | 1 | 33.3 | 33.3 | 0.7 | 0.4 | 0.9 | 1.9 | 1.8 |
| Processed products containing potato starch (harusame) | 27-② | 10 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.41 | 0.4 |
| EH92-527-1 | 0.3 | 323.9 | 1295 | 6.5 | 3.5 | 3.1 | 1.9 | 2.1 | |
| non-EH92-527-1 | 0.3 | 246.5 | 986 | 4.9 | 2.7 | 2.6 | 1.8 | 1.9 | |

*...Total DNA purified/Sample amount

ND...Not Detected

Table 2. Result of PCR detection targeting potato *UGPase*

| Products | Amplicon(bp) | | | | | | | |
|---|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 51 | 101 | 201 | 301 | 401 | 501 | 601 | 701 |
| Negative control | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fresh potato (Danshak) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fresh Potato (May Queen) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Potato snack | 28-① | + | + | + | + | + | - | - |
| | 28-② | + | + | + | + | + | + | ND |
| | 28-③ | + | + | + | + | + | - | - |
| | 28-④ | + | + | + | + | + | - | - |
| Dried potato | 26-① | + | + | ND | + | - | - | - |
| | 26-⑤ | + | + | + | + | + | - | - |
| Frozen potato | 25-① | + | + | ND | + | + | + | + |
| | 25-② | + | + | + | + | + | + | + |
| Potato starch | 27-① | + | + | ND | + | + | + | - |
| | 27-③ | + | + | ND | + | + | + | - |
| Processed products containing dried potato (baby foods) | 26-② | + | + | ND | + | - | - | - |
| | 26-③ | + | + | ND | + | + | + | + |
| Processed products containing potato starch (harusame) | 27-② | + | + | + | + | - | - | - |

+...Positive -...Negative ND... Not Detected

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」
分担研究報告書(平成23年度)

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

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

研究要旨

食品添加物を生産するための遺伝子組換え微生物やワクチン等医療を目的とする遺伝子組換え微生物は既に実用化されており、さらには工業原料産生及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物の開発も進みつつある。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、非食用モダンバイオテクノロジー応用微生物が誤って食品に混入してくる可能性が危惧されている。そこで、モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。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。

協力研究者

食品衛生管理部 江川 智哉
食品衛生管理部 柘田 和彌

非食用バイオテクノロジー応用微生物の食品への混入を防止するための安全性確保に有用と思われる検知技術の検討を進める。

A.研究目的

食品添加物を生産するための遺伝子組換え微生物やワクチン等医療を目的とする遺伝子組換え微生物は既に実用化されており、さらには工業原料産生及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物の開発も進みつつある。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来はヒトが直接摂取することを想定していない非食用バイオテクノロジー応用微生物が誤って食品に混入してくる可能性が示唆されている。そこで、バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向の調査研究を行う。このような情報を基に、

B.研究方法

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、海外の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、微生物の遺伝子組換えに関わる情報収集を行った。

食品からの遺伝子組換え微生物の検知法については、昨年度に引き続き、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遺伝子組換え微生物の定量的検知法について検討した。宿主としては、クロモゾームにエリスロマイシン耐

性マーカー遺伝子 (*ery*) を組込んだ *L. 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 *ery* を 1 コピー持ち、*L. casei* IGM393 株は複数コピー存在するプラスミド上に *ermC* を持つ。これらの遺伝子を標的として、それぞれの乳酸菌モデル組換え体を豚肉に接種し、リアルタイム PCR 法を用いた検知法について検討した。さらに、市販の豚肉に存在したエリスロマイシン耐性菌を単離・同定し、耐性遺伝子の存在位置をサザンブロッティングで解析した。また、データベースを中心に組換え体に利用されているエリスロマイシン耐性遺伝子に関する情報収集を行った。

C. 研究結果

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、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。

DNA を標的とした定量 real time PCR 法による遺伝子組換え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。

図 1 は接種後ただちに検知した結果を示し、図 2 は接種後 24 時間培養した時の結果を示す。その中で、図 1 および図 2 の 1-a) は *L. casei* IGM232 株のクロモソーム上の *ldhD* 遺伝子を、1-b) はクロモソーム上に組込まれた *ery* 遺伝子を標的とした結果である。図 1 および図 2 の 2-a) は *L. casei* IGM393 株のクロモソーム上の *ldhD* 遺伝子を、2-b) はプラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的とした結果である。表 1、2 は、豚肉への各菌の接種菌数と Ct 値の一覧であり、それに加え、エリスロマイシンを含む MRS プレート上で乳剤を培養し、接種菌のコロニーの形成を確認した結果と Ct 値から算出したコピー数についても示した。表 1 の IGM232 株接種直後では、*ldh* 遺伝子および *ery* 遺伝子ともに菌数として、 6×10^4 cfu、コピー数として 86 および 192 コピーまで検出可能であることが示された。表 2 の IGM393 株接種直後では、クロモソーム上の *ldhD* 遺伝子を標的とした場合、 6×10^4 cfu を検出した。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、スメアなバンドが検出された(図3)。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(図4)。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。

D. 考察

海外における遺伝子組換え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遺伝子組換え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。遺伝子組換え微生物に関して、生きている遺伝子組換え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遺伝子組換え微生物の実用化は遅れていると思われる。したがって、環境中から遺伝子組換え微生物が検出されるとすると、実験段階の遺伝子組換え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。このような遺伝子組換え体は、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、遺伝子組換えのマーカース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ス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つの遺伝子組換え細菌あたり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(表3)、*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(図5)。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、組換え体マーカースとして利用される頻度は低いが、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て検討を行っていく必要があると思われる。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Masuda Kazuya, Akinobu Kajikawa, and Shizunobu Igimi. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel1 cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. 30(2):37-44. (2011)

学会発表

1. 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
2. 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
3. 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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1-1. モデル乳酸菌 IGM232 株の接種後 0 時間におけるリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析

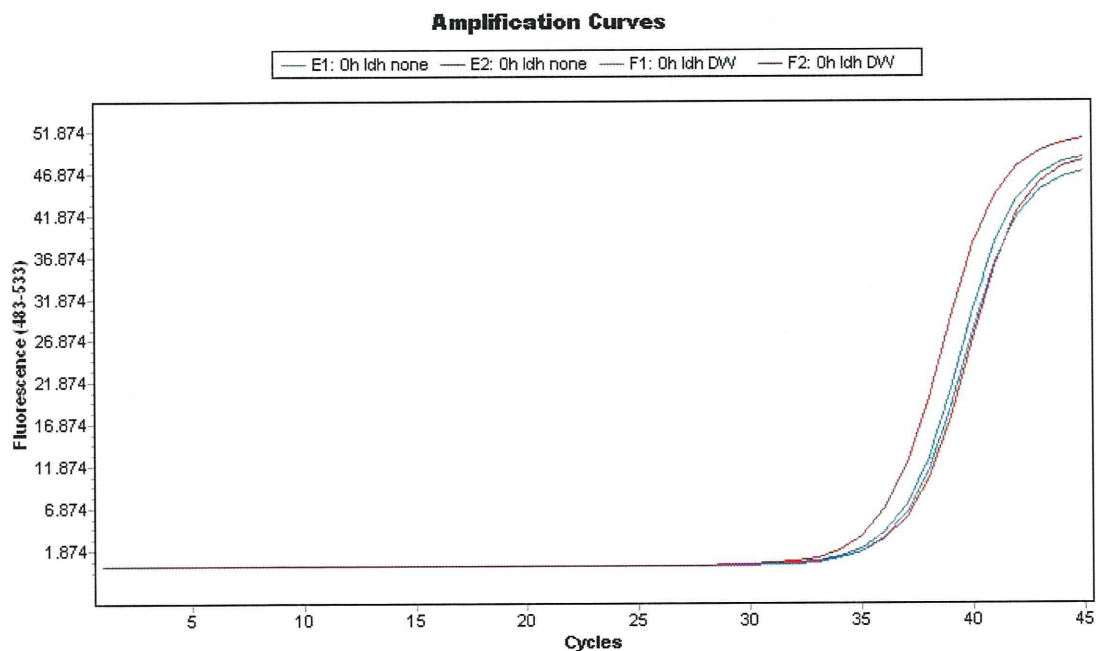
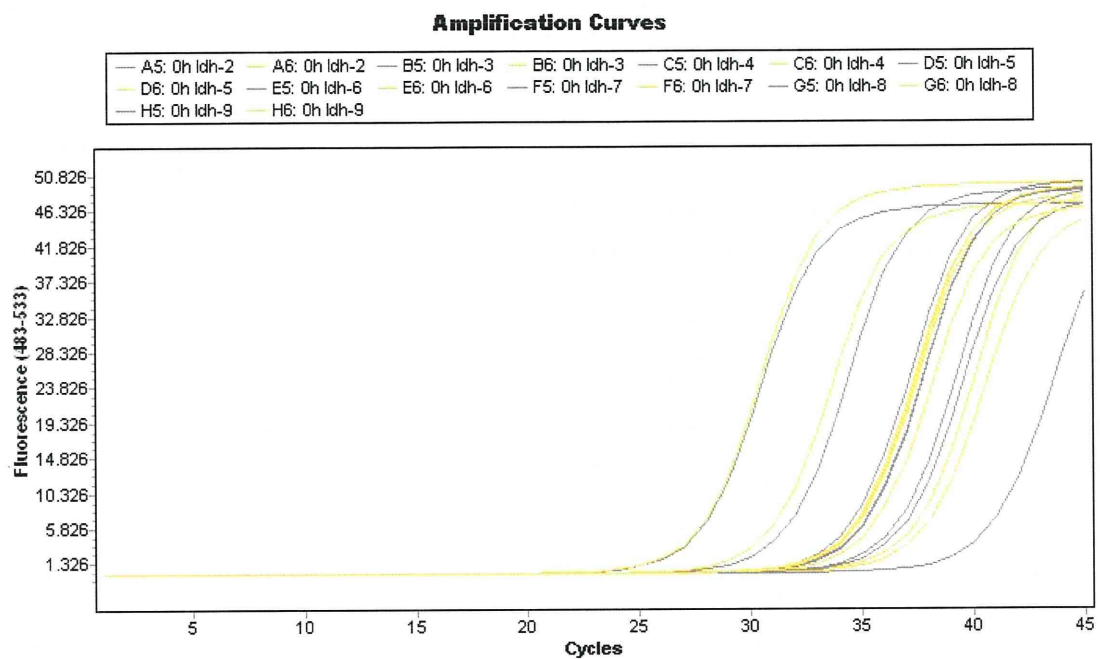


図 1-1. モデル乳酸菌 IGM232 株の接種後 0 時間におけるリアルタイム PCR による検知

b) *ery* 遺伝子を標的として分析

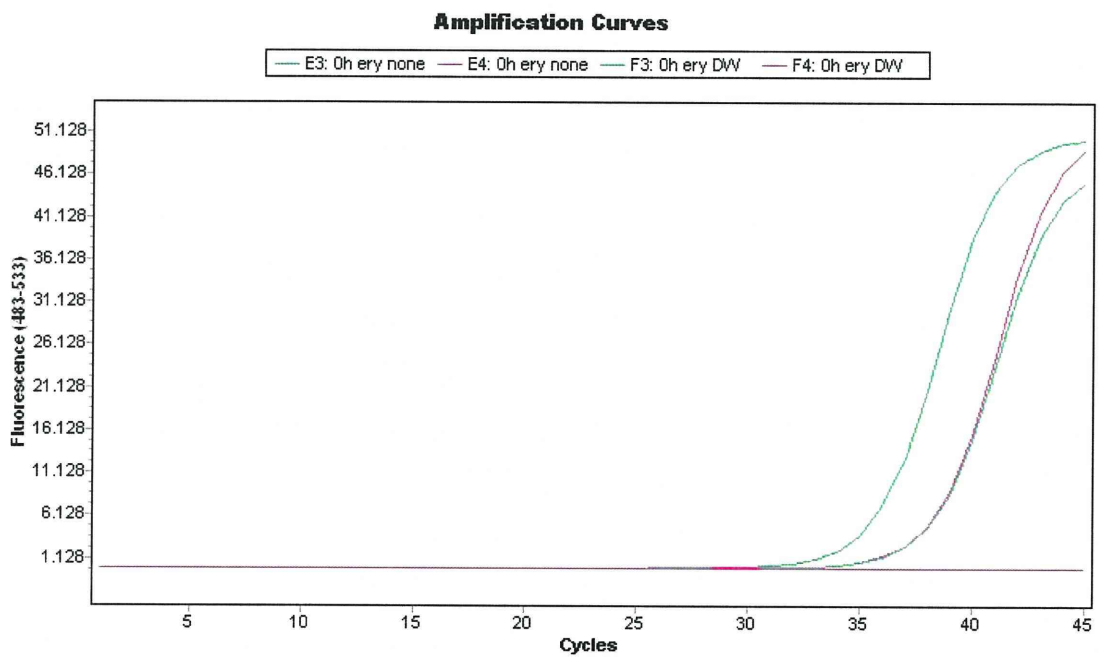
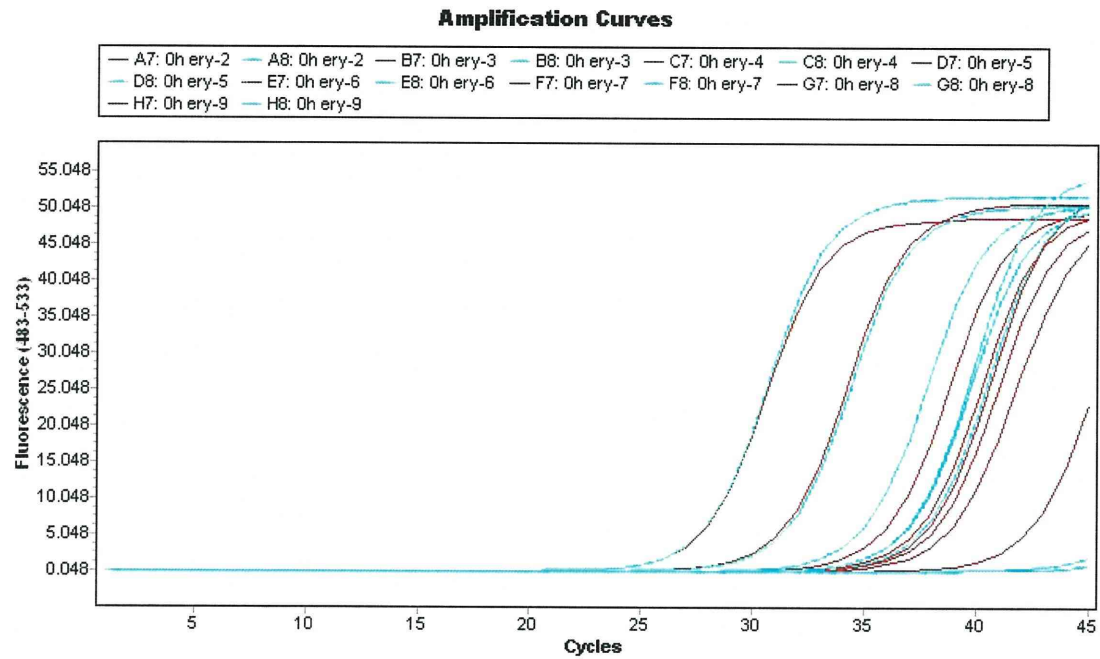


図 1-2. モデル乳酸菌 IGM393 株の接種後 0 時間におけるリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析

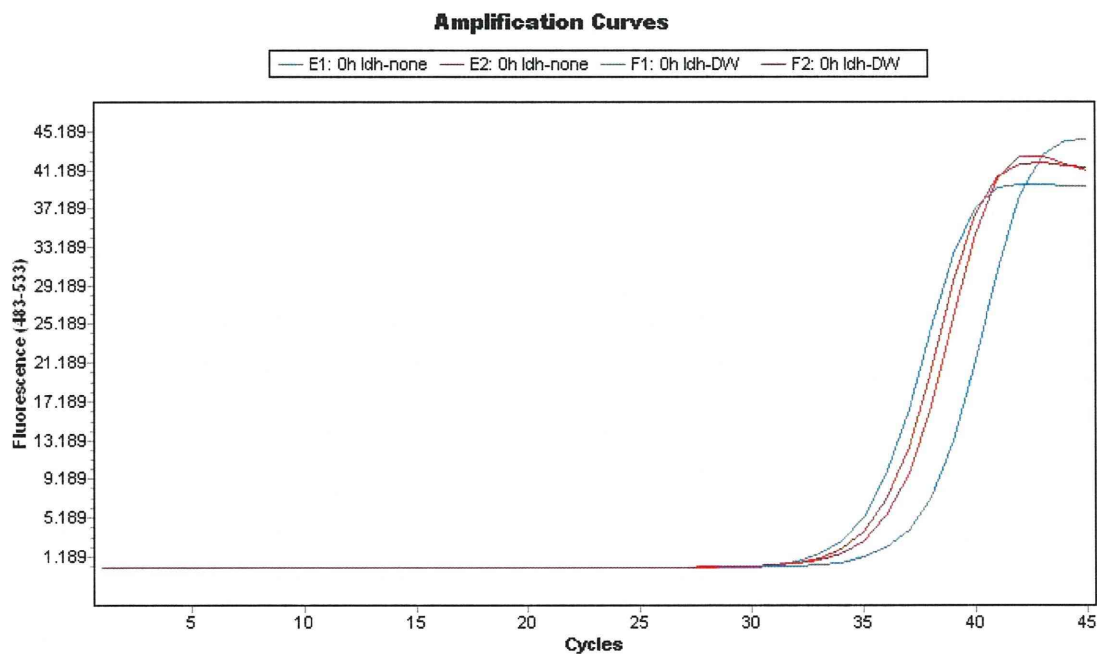
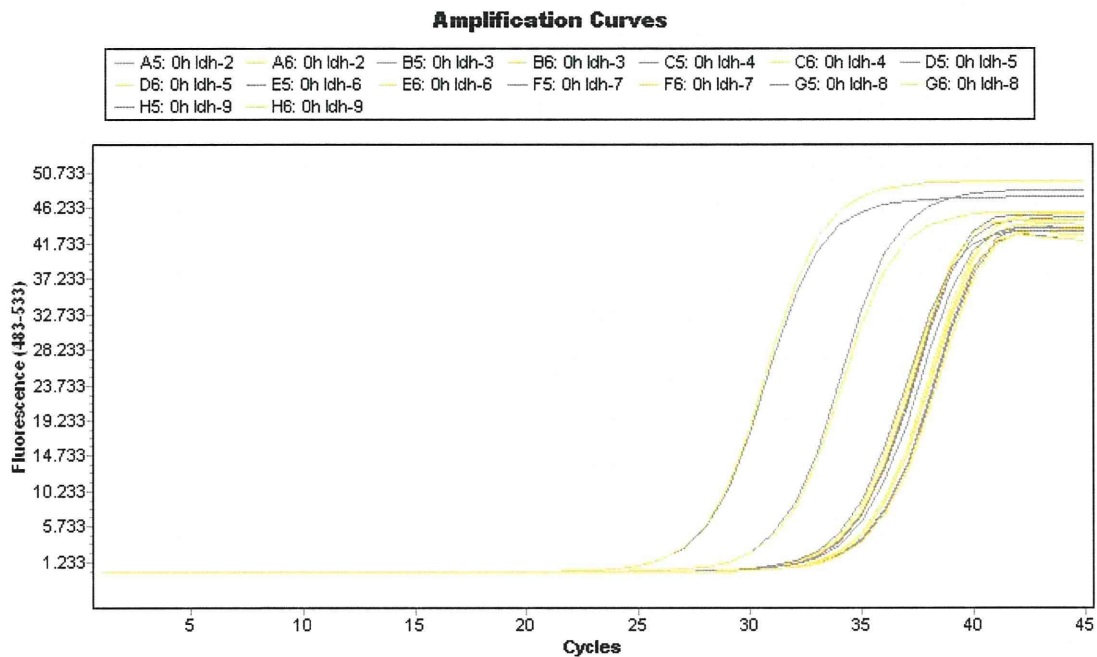


図 1-2. モデル乳酸菌 IGM393 株の接種後 0 時間におけるリアルタイム PCR による検知

b) *ermC* 遺伝子を標的として分析

