

201234001A

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24年度総括・分担研究報告書

研究代表者 穂山 浩

平成25年3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
穠山 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（総括）	-- 20
穠山 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	----- 39
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	----- 46
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	----- 52
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	----- 85
中島 治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 105

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 24 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科学技術研究院 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 を使用し高感度に検出する方法が挙げられる。本年度では、リアルタイム PCR 法を用いてジャガイモ加工食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開発するため、GM 表示対象のジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモ DNA の断片長の検出下限値を解析した。その結果、全ての加工食品において 51～101 bp であった。この結果から、増幅断片長を 51～101 bp 以下に設計することで、標的遺伝子を検出できることが示唆された。開発した未承認非食用 GM ジャガイモ検知法を使用して、市販のジャガイモ加工食品の実態調査を行った結果、GM ジャガイモの混入は認められなかった。昨年度に引き続き、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サイトを立ち上げ、一般公開した。②昨年度の研究で市販の豚肉中にエリスロマイシン耐性遺伝子を持つ菌が認められた。それにより GM 微生物のマーカー遺伝子として広く利用されているエリスロマイシン耐性遺伝子をターゲットにした PCR 法でそれらが組換え体由来であるか判定するのは困難であることが判明した。今回新たに、組換え体作出時に利用されるベクターに含まれるマルチクローニングサイトの領域での検討を行うため、プローブを合成し、コロニーハイブリダイゼーションによる GM 微生物のスクリーニングを試みた。③多種類の組換え遺伝子を多種植物種から一斉に検知するために、DNA マイクロアレイを用いた組換え遺伝子の検知の可能性を探った。イネ、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト、ダイズの内生遺伝子を検出するためのプローブと現時点で頻用されている組換え遺伝子のプローブを固定化した DNA マイクロアレイを作成し、各作物種の内生遺伝子が検出されることを確認した。また、非食用の GM 植物の 1 例として用いた工業用デンプン生産のために作出されたジャガイモであるアムフローラにおいても組換え遺伝子を検知することが可能であった。④2008-2012 年の米国における医薬品用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場栽培認可・作付け状況を調査した結果、2008 年から 2010 年にかけては認可面積、作付け面積ともに減少し、2012 年は作付けが行われていないことが判明した。また、植物で医薬品類の製造を行っているカナダの企業 2 社を調査した結果、いずれもタバコ属植物をホストに、一過的な遺伝子発現によるタンパク質生産システムを利用し、閉鎖型栽培施設（温室）で医薬品類の生産を行っている現状が判明した。SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2012 年に公表・出版された論文等を調査した結果、66 件が得られ、その内訳は、機能的食品：21 件、経口ワクチン：4 件、食用医薬：1 件、ワクチン抗原：4 件、抗体医薬：3 件、治療薬：13 件、診断薬・試薬：3 件、環境浄化：13 件、NBT：5 件（重複 1 件）であった。医薬品及び環境浄化用の GM 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 GM 植物の検知法開発を目的とし、これまでに、検知操作において陽性対照となるモデル GM トマト、及びイネを入手、または作出している。本年度はコレラトキシン B サブユニット（ctxB）を生産するモデル GM イネの T1 世代種子（コメ）を検体とした ctxB タンパク質の検知法について検討した。また、同試料を検体とする ctxB 遺伝子の定量的検知法を確立した。⑤非食用モダンバイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタをまとめて開発国ごとに分類すると、米国（12 報）、中国（11 報）、日本（5 報）であった。また、最近の注目すべき技術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼと transcription activator-like effector nuclease（TALEN）を利用した GM 生物の開発の報告が増えている。非食用モダンバイオテクノロジー応用動物についての検知法の開発として、ヒトエリスロポエチン（hEpo）を生産する GM ニワトリに由来する鶏肉の検知法を作成した。プラスミド中の hEpo cDNA をスタンダードとして利用して、リアルタイム PCR によって鶏肉中から hEpo 遺伝子を検知する

方法を作成した。市場調査として生の鶏肉6品、加工食品中の鶏肉6品をこの検知法で調べた結果、いずれのサンプルからも hEpo 遺伝子は検出されなかった。

研究協力者

中村公亮、近藤一成、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、南竹優美、川上浩（共立女子大学大学院）江川智哉、榊田和彌、（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

GM 食品表示対象のジャガイモ加工食品に含まれる生鮮及び加工食品を参考に、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 10 品種（男爵・メークイン、インカのめざめ、インカのひとみ、北あかり、ノーザンルビー、紅あかり、こがね丸、シャドークイーン、インカルーヂュ）、ポテ

トスナック 4 製品、冷凍ジャガイモ 3 製品、乾燥ジャガイモ 3 製品、ジャガイモデンプン製品 7 製品、調理済みジャガイモ惣菜食品 4 製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品 4 製品を購入した。

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（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 TM 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

平成 23 年度までの検討では、グラム陽性細菌の遺伝子組換えに用いられている抗生物質耐性は、実用的にはエリスロマイシンが多用されていることから、エリスロマイシンをマーカーとして食品（市販の生肉）に混入した乳酸菌モデル組換え体の検出を試みた。検討の結果、食品中にエリスロマイシン耐性の常在菌が存在するため、モデル組換え体の検知法としては新たな工夫が求められた。エリスロマイシン耐性遺伝子とマルチクローニングサイトを標的とし検討した。

エリスロマイシン耐性には非常に多種類の遺伝子が存在することから、遺伝子組み換えに

多用されているエリスロマイシン耐性遺伝子の特異的に確認するため、新たにコロニーハイブリダイゼーション法を検討した。エリスロマイシン耐性マーカーについては、*ermB* 遺伝子、*ermC* 遺伝子のプローブである Probe *ermB*、Probe *ermC* を用いた。マルチクロニングサイトとしては、モデル GM 乳酸菌である *L. casei* IGM393 が保持するプラスミド pLPempty のマルチクロニングサイトの配列を基に Probe MCS を合成した。

合成したプローブを用い、豚肉から常在菌として単離したエリスロマイシン耐性菌 5 株との反応性をコロニーハイブリダイゼーションで検討した。まず、コロニーリフトの調製は定法に従い、エリスロマイシンを含む MRS ブロスで一晩培養した菌液を、エリスロマイシンを含む MRS アガープレートに塗抹し、コロニーを得た。コロニーを含むプレートの表面にメンブレンディスクを乗せコロニーの転写を試みた。しかしながら、この方法では、コロニーがメンブレンにほとんど転写されなかった。転写を助けるために、メンブレンを乗せてさらに数時間培養する方法や、乗せたメンブレンを滅菌綿棒で上から軽くこすする方法についても検討したが、確実にコロニーを転写することは困難で、ハイブリダイゼーションにおいても検出シグナルが弱く、プローブの特異性を確認することはできなかった。そこで、フィルトレーションユニットにセットしたメンブレンに菌を吸引濾過する方法である Peterkin ら (1989) の示した HGMFs (Hydrophobic Grid Membrane Filtration) 法を参考にし、メンブレン上にコロニーを出現させることにした。

アガープレート上にメンブレンディスクを設置し、その上から培養菌液をスパイラルプレーターで均一に塗抹した。37°C で二晩培養したプレートからメンブレンを剥がし、メンブレンを風乾させてコロニーリフトを調製した。メンブレン上にあるコロニーの変性は、0.5M NaOH, 1.5M NaCl で処理し、1.0 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.4 で中和させた。核酸の架橋は、UV クロスリンカーで 250mJ の紫外線を照射した。コロニーのデブリスはプロテナーゼ K 溶液で処理し取り除いた。

ハイブリダイゼーションには、3 種類の DNA プローブ Probe *ermB*、Probe *ermC*、

Probe MCS を使用した。一つのプローブと反応させた後は、プローブを剥離し、新たなプローブと反応させた。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

GM ジャガイモ品種 EH 92 - 527 - 1 (アムフローラ) は SIGMA-ALDRICH より購入したものをを用いた。GM コメは平成 21 年に当研究室で作成されたものをを用いた。GM コメとして平成 21 年度に当研究室でアイスプラント由来の 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 'ニッポンバレー' に導入して作成したものをを用いた。

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。ゲノム DNA の定量は Quant-iT DNA Assay kit, broad range (Invitrogen 社) とて蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL) を用いて行った。

他植物種検出用マイクロアレイに用いたプローブの種類は、ハイブリダイゼーション効率評価用の λ -DNA (1m2, 4) 2 種類、非特異吸着評価用の *gfp* 遺伝子 (*gf1*, 2) 2 種類、コメ *p1d* 遺伝子 (*p11*~6) トウモロコシ *adh* 遺伝子 (*ad1*, 3) と *ssIIb* 遺伝子 (*ss1*, 8)、ダイズ *lectin* 遺伝子 (*le1*~4) ジャガイモ *ugp* 遺伝子 (*ug1*~4)、トマト *apx* 遺伝子 (*ap1*~4)、トマト *lat* 遺伝子 (*la1*~4)、組換え遺伝子検出用として、35S プロモーター配列 (35S2, 6) nos ターミネーター配列 (*ns1*, 6)、*nptII* 遺伝子 (*np2*, 4)、*epsps* 遺伝子 (*ep3*, 4)、*pat* 遺伝子 (*pa1*, 4)、小麦 *hsp* ターミネーター配列 (*ta3*, 4) を用いた。カッコ内は各図のマイクロアレイの配置に記された略号を示している。

マイクロアレイ解析は横河電機社製読み取り装置を用いて行い、プローブの標識等については横河電機社製のマニュアルに従って行った。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

1) 医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTの調査

GM植物のうち、人や家畜など動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を医薬品用GM植物の範囲とし、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。医薬品用及び環境浄化用GM植物に関する情報を文献データベース(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た。また、同様にNBTに関する情報を収集した。

2) 非食用GM植物の検知法開発に関する研究 コレラトキシン B サブユニット(ctxB)生産イネ

CtxBタンパク質発現コンストラクト
コレラトキシン B サブユニット(ctxB)遺伝子は国立衛研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。

2.3k 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遺伝子組換え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。これらを用い、*GluB1*-ctxB-KDEL の発現コンストラクトを構築し、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(インプラントイノベーションズ)に導入した。イネの形質転換はインプラントイノベーションズ社に委託し、イネ形質転換候補株(試験管培養部物 20 本)を薬用植物資源研究センター研究棟グロースチャンバーにて馴化栽培し、種子を得た。

コメからのタンパク質調製法の検討

コメに蓄積されていると考えられる ctxB タンパク質を免疫学的手法で検知・定量するために、はじめに非 GM コメからの総タンパク質調製法、とくにタンパク質抽出バッファーについて検討した。PBS-T(phosphate buffered

saline, pH=7.4, 0.05% Tween20)または TBS-T(Tris-buffered saline, pH7.6, 0.05% Tween20)の2種のバッファーで、コメ(あきたこまち、市販品)粉砕試料約 100 mg または約 250 mg より、抽出時間 5 min. 3 hr. 16 hr. でタンパク質抽出を行い、抽出液についてタンパク質の定量を行い、抽出効率を比較した。競合 ELISA 法による ctxB タンパク質の定量(条件検討)

競合 ELISA 法による ctxB タンパク質の検知、定量システムの構築のための、抗原(ctxB)―一次抗体濃度の最適化について検討した。

競合 ELISA 法による ctxB タンパク質の定量(検量線の作製)

上記の抗原―抗体条件で、標準 ctxB タンパク質を用い、一次抗体と共に加える ctxB (標準物質)の濃度を振って、検量線を作製した。競合抗原は blocking buffer、または、PBS-T で希釈して加えた。

競合 ELISA 法による ctxB タンパク質の定量(コメ抽出タンパク質中の ctxB の定量)

非組み換え株(WT#5), ctxB 遺伝子導入株(#1-6-1)のコメ約 100 mg より PBS-T で 16 hr. 抽出した総タンパク質試料をそれぞれ PBS-T で 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 に希釈して検体とした。一次抗体と共に加える ctxB (標準物質)の濃度を振って、検量線を作製するとともに、未知試料の濃度を測定した。なお、競合抗原は PBS-T で希釈して加えた。

直接 ELISA 法による ctxB タンパク質の検知

競合法での検知が困難であったため、直接 ELISA 法での検知を試みた。本検知法では、コメより調製したタンパク質溶液を well に固相化し、これを直接一次及び二次抗体で検知する。

コメからの総タンパク質の抽出 ―タンパク質抽出バッファーの検討―

Tween を添加した抽出バッファーでは直接 ELISA 法ができないため、Tween を添加しない、PBS(phosphate buffered saline, pH=7.4)または TBS(Tris-buffered saline, pH7.6)の2種のバッファーで、コメ(あきたこまち)粉砕試料約 100 mg または約 250 mg より、抽出時間 5 min., 3 hr., 16 hr. でタンパク質抽出を行い、抽出効率について検討した。

直接 ELISA 法による ctxB タンパク質の検知

PBS 抽出タンパク質試料を用い、直接 ELISA 法での *ctxB* タンパク質の検知を試みた。

供試試料は下記のとおりである。

非組み換え株 2 系統：WT#5, WT#8

ctxB 遺伝子導入株 8 系統：#1-6-1, #1-6-2, #1-6-3, #1-6-4, #1-6-5, #1-7-1, #2-4-3, #2-10-1

各試料約 100 mg より PBS を用い(16 hr.)タンパク質抽出液試料を調製し、これらをコーティングに用いた。なお、*ctxB* 50 ng/ well を陽性対照(PC)、0 ng/ well を陰性対象(NC)とした。

T₁ 種子 (コメ) 1 粒における遺伝子導入確認

各系統 4 粒または 8 粒のコメ (種籾) より、それぞれ独立に GM quicker 2 (ニッポンジーン) を用いゲノム DNA を調製し、ゲノム DNA 溶液 30 μ L を得た。コメからの DNA 調製にあたっては、まずコメ 1 粒を 2 mL 容のアシストチューブに入れ、GE1 buffer を 250 μ L 加え、MS-100 (TOMY 精工) で 3,000 rpm, 60 sec 処理した。10 分間室温で静置したのち MS-100 で 3,000 rpm, 60 sec 処理を 2 度繰り返し、Proteinase K 10 μ L、 α -amylase 2 μ L、RNaseA 5 μ L を加え、以後、キットのプロトコルに従った。

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 $^{\circ}$ C 5 min - (94 $^{\circ}$ C 30 sec - 58 $^{\circ}$ C 30 sec - 72 $^{\circ}$ C 1 min) x 30 cycle - 72 $^{\circ}$ C 10 min - 4 $^{\circ}$ 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。

イネ形質転換体 T₁ 種子 (コメ) における *ctxB* 遺伝子コピー数の解析

イネ形質転換体 T₁ 種子 (コメ) 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。

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 SciFinder (キーワード: transgenic fish, transgenic chicken, transgenic pig) を利用して 2012 年に発表された論文と特許を検索した。この中からタイトルと要旨を読んで将来フードチェーンへの混入につながる懸念のある発表を選んだ。なお、プロモーターの性質の解析、構造遺伝子の機能の解析、病態モデルの作成などの目的で作成された非食用 GM 動物は研究室の閉鎖系の中で飼育されるに留まり、フードチェーンへの混入の懸念はないと判断して本研究の調査対象には含めなかった。また、最近になって注目されている技術や報告なども調査した。

(2) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知

市場調査用の鶏肉サンプル

生の鶏肉 6 品 (ムネ、ササミ、レバー、モモ、手羽元、ひき肉) と鶏肉を含む加工食品 6 品 (唐揚げ、親子丼、焼き鳥レバー、チキンカツ、照り焼き、チキンカレー) を東京の小売店で購入した。

リアルタイム PCR のキャリブレーション用のスタンダード

hEpo cDNA を組み込んだ市販のプラスミドを購入して使用した (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. MHS1010-98053191)。

鶏肉からのゲノミック DNA の抽出

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen) を利用して鶏肉からゲノミック DNA を抽出した。抽出したゲノミック DNA の性質は紫外吸収と 0.8% アガロースゲル電気泳動により調べた。

リアルタイム PCR による hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーション

リアルタイム PCR の反応液は 25 μ L で以下の物を含む: 12.5 μ L ユニバーサル PCR マスターミックス (Life Technologies), 0.4 μ L プライマー対 (各 25 μ M), 0.5 μ L TaqMan プローブ (10 μ M), 2.5 μ L コントロールプラスミド DNA テンプレート。コントロールプラスミド DNA テンプレートは、リアルタイム PCR のキャリブレーション用

のスタンダードの項目に記載したプラスミドを *Nco* I で切断してリニアにした物を 20, 200, 2.0 k, 20 k, 200 k コピー使用した。プライマーの配列は

hEpo F, 5'-AGCCCAGAAGGAAGCCATCT-3'
および hEpo R,
5'-GGAAAGTGTCAGCAGTGATTGTTC-3'である。

プローブの構造は hEpoPro,6-carboxy-fluorescein (FAM)-CCTCCAGATGCGGCCTCAGC-tetramethylrhodamine (TAMRA)である。ΔRn threshold は 0.20 として、5 回測定を行った。

鶏肉サンプルから抽出したゲノミック DNA の存在下でのスタンダードプロットのキャリブレーション

生の鶏肉サンプルの1つから抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/μL となるように PCR 反応液に加えた(1 反応当たり 130 ng)。リアルタイム PCR の測定条件は、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載したものと同じであり、5 回測定を行った。

鶏肉の実態調査

上述の生の鶏肉 6 品と鶏肉を含む加工食品 6 品から抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/μL となるように PCR 反応液に加えた。コントロールプラスミドは添加しなかった。それ以外の条件については、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載の条件と同じである。リアルタイム PCR の測定を行なって鶏肉中の hEpo 遺伝子の存在を調べた。Ct 値が 38 以上は陰性とした。Ct 値が 38 以下で指数関数的増幅が確認できる反応を陽性とした。

上述の生の鶏肉 6 品と鶏肉を含む加工食品 6 品から抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/μL となるように PCR 反応液に加えて、さらにコントロールプラスミドを添加した。リアルタイム PCR の測定条件は、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載したものと同じであり、hEpo 遺伝子が検出されるかを調べた。2 回測定を行った。

リアルタイム PCR の内在性コントロールとしてのニワトリ cytochrome b 遺伝子の検出

鶏肉の実態調査を行うときに、抽出されたゲノミック DNA の品質を評価するために、ニワトリ cytochrome b 遺伝子の検出をリアルタイム PCR によって同時に行った。プライマーは既報の通りとした (Tanabe S., et. al. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 3131-3135 (2007))。プローブは既報の構造のクエンチャーについて FAM に変えた。測定はシングルプレックス PCR として、ΔRn threshold を 0.10 とした。

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

1. ジャガイモ加工食品から精製した DNA の評価

生鮮ジャガイモ 10 品種、ポテトスナック 4 製品、冷凍ジャガイモ 3 製品、乾燥ジャガイモ 3 製品、ジャガイモデンプン製品 7 製品、調理済みジャガイモ惣菜食品 4 製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品 4 製品は、粉碎後、DNA 抽出・精製を行い、検体とした。その検体は、分光光度計を用いて吸光度を測定することにより、DNA 収量及び精製度を算出した。全ての生鮮ジャガイモ・加工食品から DNA を抽出することが可能であった。生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ惣菜食品からの DNA 収量は多かったが、ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品からの DNA 収量は少なかった。抽出した DNA の吸光度を測定した。生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ惣菜食品については、タンパク質の混入指数(A260/A280)と塩などの混入指数(A260/A230)の値は 2 付近であったため、高い精製度であることが示唆された。ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品については、A260/A280 は 1.3~1.4 で、A260/A230 は 0.4~0.7 であることから高い精製度が得られなかった。

2. ジャガイモ加工食品から抽出した DNA の断片長の評価

ジャガイモ加工食品中に含有する DNA の断片長について解析を行った。設計した定性 PCR 用プライマーを用いて、51、101、201、301、401、501、601、701 bp の断片長で増幅可能であるかを評価した。生鮮ジャガイモについては 51~701 bp

まで全ての断片長の増幅産物が得られた。一方、ジャガイモスナック菓子や冷凍ジャガイモは製品によって差はあるものの、全て製品において 401 bp まで増幅産物を得られた。乾燥ジャガイモに関しては 1 つの製品が 701 bp まで得られたものの下限は 301 bp であった。ジャガイモデンプンや調理済みジャガイモ惣菜食品は製品によって差はあるものの下限は 101 bp であった。ジャガイモデンプンを加工した加工食品(春雨)の下限は 51 bp であった。

3. プライマー・プローブ設計

ジャガイモ加工食品より精製される DNA の断片長(51~101 bp)を考慮し、UGPase を標的に、増幅断片長を 67 bp になるようプライマー・プローブ(以下、UGPase と略す。)を設計した。まず、男爵とメークインで標的配列の情報を得るためシーケンス解析を行ったところ品種間で塩基配列に差を検出した。よって、スクリーニングに使用する UGPase の標的配列は、男爵、メークインの他に 8 種類のジャガイモ品種間に相同性の高い UGPase の配列領域を見出し、UGPase 検出用プライマー・プローブを設計した。次いで、Tnos 検出用のプライマー・プローブの設計を行った。アグロバクテリウムゲノム(GenBank no.V00087.1)の Tnos 配列を基に設計した。増幅断片長は 69 bp とした。P35S 検出用のプライマー・プローブは、GM Papaya Rainbow 品種のゲノム配列(GenBank no.FJ467933.1)に含まれる P35S を基に設計を行った。増幅断片長は 65 bp とした。

4. 作成したプラスミドの特異性と感度の評価

UGPase、Tnos、P35S 検出用プライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、それぞれの検出特異性と検出感度について解析を行った。まず特異性について検討した。コメ、トマト、パパイヤ、ナス、ピーマン、ヒヨコマメ、コムギ、アマ、トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、テンサイ、ワタ及びジャガイモの 14 種の作物から精製したゲノム DNA を鋳型にリアルタイム PCR を行った。その結果、コメからはコメ由来のコメ内在性アクチンプロモーター(AINT)が、コムギとアマ、テンサイからは抗生物質耐性遺伝子 neomycin phosphotransferase II (NPT II) が、ダイズからは Tnos が、トウモロコシからはトウモロコシ由来ユビオチンプロモーター(Pubi)と NPT II が検出された。ジャガイモに関しては、UGPase のみ検出され、Tnos や P35S は検出されなかった。

次に、感度について検討を行った。プラスミドを用いて希釈系列を作成し、リアルタイム PCR の鋳型とし、それぞれを検出するプライマー・プローブを用いた検知法の検出感度を解析した。UGPase については 16 回の反復試験、Tnos と P35S については 10 回の反復試験を行った。その結果、全ての試験より UGPase は 2,500 コピーまで、Tnos・P35S は 12.5 コピーまで検出された。Ct 値は、Tnos と P35S に比べて UGPase を高く検出したが、RSD の値はすべて 3.2% 以下と低かった。定量限界をプラスミドの希釈系列の濃度と Ct 値より求めたところ、UGPase は 250 コピー ($R^2=0.996$)、Tnos・P35S は 12.5 コピー (Tnos, $R^2=0.993$; P35S, $R^2=0.998$) であった。

5. 実態調査

開発したリアルタイム PCR 検知法を用いて、市販されているジャガイモ食品への GM ジャガイモの混入に関する実態調査を行った。全ての検体は、2 試験ずつ行い判定した。その結果、15 検体中、27-①(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-1(シチューの素)、T-2(缶スープ)、31-②(春雨)の 5 製品で Tnos が、33-①(冷凍ジャガイモ)、K-3(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-2(缶スープ)、31-①(春雨)の 5 製品で P35S が検出された。得られた Ct 値は 38 以上と高く、いずれも GM ジャガイモではなくバクテリアやウイルスの混入による汚染の可能性が示唆された。

6. データベース検索ソフトの開発と公開

昨年に引き続き、データベース検索サイトは、FileMaker ServerII を用いたホスティングサービスを利用し、インターネットより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。(アドレス: <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

今回調製したコロニーリフトでは、メンブレン上にほとんど重なり合うことなくコロニーを 50 から 150 個出現させることができた。メンブレン上のコロニーの大きさは、プレート 1、4、5 が一番小さく、6、7 が中程度の大きさで、2、3 が一番大きかった。出現したコロニーに対して各プローブを用いてハイブリダイゼーションを試みた。プレート 1、4、5 と *ermB* 遺伝子を保持する *L. casei* IGM232 のコロニーを高感度で 100% 検出した。また、プレート 3 において数個のコロニーを検出した。プレート 2 および *ermC* 遺伝子を保持する *L. casei*

IGM393 は検出しなかった。Probe ermC で検出した結果、プレート 2、3 および *L. casei* IGM393 を検出し、プレート 1、4、5、*L. casei* IGM232 は検出しなかった。*L. casei* IGM393 の検出率は 100%であったが、プレート 2 および 3 の検出率は、両方とも 70%で、検出シグナルは明瞭ではなかった。丸が欠けた形状の検出シグナルから、プローブの検出感度が低いのではなく、プレート 2 および 3 のコロニーは他に比べ大きく、今回の方法では、溶菌、DNA の変性が不十分だったと考えられる。次に Probe MCS で検出した結果、*L. casei* IGM232 と *L. casei* IGM393 を 100%検出し、プレート 1、2、3、4、5 は検出しなかった。Probe MCS は、MCS の配列を保持しないと考えていた *L. casei* IGM232 においても反応した。*L. casei* IGM232 の由来は、その親株にトランスポゾンを用いてクロモソームに *ermB* 遺伝子を挿入したものである。親株は、全ゲノム配列が解読されており、MCS に類似する配列がないことは事前に確認している。実際、Probe MCS を親株に反応させたが検出シグナルは認められなかった（データは示さず）。今回、検出に差は認められたが、3 種類のプローブを用いることにより、エリスロマイシン耐性菌を検出することが可能であった。それらの中で自然界から分離したものは、一つのプローブに反応するものが多いのに対して、モデル GM 乳酸菌である *L. casei* IGM393 は、Probe ermC と Probe MCS の両プローブで検出が可能であり、これら 2 つのプローブを用いることにより、組換え体を検出することが可能であった。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

C-1 多植物種検出用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

トウモロコシ、イネの他に、ジャガイモ、トマト、ダイズの内生遺伝子と、組換え遺伝子として 35S プロモーター、nos ターミネーター、*nptII*、*epsps*、*pat*、小麦 HSP ターミネーターを固定化したアレイを用いて、GM イネをサンプルとして解析を行った。その結果、GM、非 GM の両方においてマイクロアレイ上のコメ内在性遺伝子である *pld* とハイブリダイゼーション効率評価用の λ DNA のプローブ群で蛍光が観測された。更に GM サンプルにおい

てのみ、35S プロモーターと nos ターミネータープローブ群のみで蛍光が検出された。この結果から、コメをサンプルとした場合には、今回作成した DNA マイクロアレイを用いて、組換え遺伝子を検出することが可能であることが判明した。しかし、ジャガイモ内生遺伝子のプローブである *ugp3* においても蛍光が観測された。このことから、イネゲノム内に *ugp3* に似た配列が存在しているものと考えられたため、植物種を判別する際には *ugp3* 以外のプローブを使用することが望ましいと考えられた。

C-2 多植物種検出用マイクロアレイを用いたジャガイモからの組換え遺伝子の検出

GM ジャガイモであるアムフローラから抽出したゲノム DNA マイクロアレイ解析に供した。その結果、アムフローラに導入された遺伝子である *nos*、*nptII* 遺伝子と内在性遺伝子である *ugp* 遺伝子のスポットで蛍光が観測されたのに対し、対照として行った遺伝子を組換えていないジャガイモのゲノム DNA をサンプルした場合には、*ugp* 遺伝子のスポットで蛍光が観測されたが、*nptII* のスポットでは蛍光は検出されなかった。このことから、GM の組換え遺伝子を検出することが可能であることが示された。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

1) 2008-2012 年の米国における医薬品用及び環境浄化用 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、2008-2012 年の医薬品用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を調べた。

2008 年から 2010 年にかけては認可面積、作付け面積ともに減少し、2012 年は承認された作物があるにも関わらず、実際の作付けが行われていないことが判明した。

2) カナダ植物バイオ企業の調査

2012年9月に植物で抗体医薬やワクチンの製造を行っているカナダの企業2社(Plant Form社及びMedicago社)に直接赴き、生産システム、生産物、開発の段階等を調査した。調査した2社は、いずれも医薬品類の生産ホストとしてタバコ属植物(*Nicotiana benthamiana*)を用い、植物ウイルスを感染、または、アグロバクテリウムを用いて組換えウイルス遺伝子を一過的にタバコの葉で発現させて生産するシステムを利用していた。また、本システムで生産されたインフルエンザワクチンは特別なアジュバンドがなくてもワクチン効果が高い(より少量で従来のワクチンと同様の効果が得られる)ことが紹介された。

3) 2012年に国内学会で公表・出版された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する論文等

2012年8月開催の第30回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウムで公表された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する報告があった。関連報告25件の内訳は、機能性食品:7件、経口ワクチン:1件、食用医薬:2件、ワクチン抗原:0件、抗体医薬:1件、治療薬:6件、診断薬・試薬:1件、環境浄化:2件、NBT:5件で機能性食品及び治療薬に関するものが最も多かった。

4) 2012年に国内外で公表・出版された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する論文等(SciFinder®)

SciFinder®(キーワード:transgenic plant)で調査した2012年に公表・出版された医薬品用、環境浄化用GM植物及びNBTに関する論文等があった。合計66件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品:21件、経口ワクチン:4件、食用医薬:1件、ワクチン抗原:4件、抗体医薬:3件、治療薬:13件、診断薬・試薬:3件、環境浄化:13件、NBT:5件(重複1件)であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった。

また、2012年の国別の件数は、中国:32件と中国が全件の半数近くを占め、そのほとんどは中国国内の特許であった。

5) 非食用遺伝子組換え植物の検知法開発に関

する研究

コメからのタンパク質調製法の検討

PBS-T(phosphate buffered saline, pH=7.4, 0.05% Tween20)またはTBS-T(Tris-buffered saline, pH7.6, 0.05% Tween20)の2種のバッファーで、コメ(あきたこまち、市販品)粉碎試料約100mgまたは約250mgより、抽出時間5min、3hr、16hrでタンパク質抽出を行い、それぞれの抽出効率を求めた。その結果、PBS-Tの方がTBS-Tよりも抽出効率がよいこと、また、サンプル量(コメ粉末量)は少量(約100mg)の方が抽出効率がよい一方、抽出時間(静置時間)延長の抽出効率向上に対する効果は少ないことが明らかになった。

競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量

ウェルに固相化するctxBタンパク質量及び、anti-ctxB一次抗体の濃度を振り、最適と考えられる吸光度が得られる固相化ctxBタンパク質量及び、anti-ctxB一次抗体濃度を、固相化抗原(ctxB, コーティング)量50ng/well、一次抗体(mouse anti-ctxB)濃度0.5µg/mLと決定した。

競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量(検量線の作製)

上記のように決定した抗原-抗体濃度で、標準ctxBタンパク質を用い、一次抗体と共に加えるctxB(標準物質)の濃度を振って、検量線を作製した。競合抗原はblocking buffer、または、PBS-Tで希釈して加えた。

その結果、競合抗原はblocking bufferで希釈すると、抗原(固相化)に対する競合抗原の量が等量以上になると吸光度が上昇し、競合抗原(ctxB)量と阻害率(B/B0%)の関係を直線として得ることができなかった。そこで、競合抗原をPBS-Tで希釈して加えたところ、競合抗原が過剰な領域における吸光度の上昇はみられなくなった。以上の結果から、以後PBS-Tで競合抗原を希釈することに決定した。

競合ELISA法によるctxBタンパク質の定量(コメ抽出タンパク質中のctxBの定量)

非組換え体WT#5株とctxB遺伝子の導入を確認済みの組換え体#1-6-1株のコメ粉末のタンパク質抽出液間で顕著な相違は認められず、ctxBタンパク質の検出はできなかった。

直接ELISA法によるctxBタンパク質の検知

陽性対照のctxBを含む、いずれの試料につ

いてもシグナルを得ることができなかった。これは PBS-T 抽出液でコーティングを行ったため、Tween20 の作用でコーティングされなかったものと考えられる。そこで、PBS または TBS を用いたタンパク質抽出効率の検討を行った。

コメからの総タンパク質の抽出 –タンパク質抽出バッファーの検討–

抽出バッファーから Tween を除いたため、総タンパク質の抽出効率は低下したが、ELISA 法による検知には問題ないレベルと考えられた。

直接 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の検知

CtxB 標準品を固相化した well ではシグナルが検出されたが、コメ抽出試料についてはいずれも非組換え体 WT#5 及び#8 由来の試料と同じレベルであり、発現・蓄積した *ctxB* によるシグナルは検出できなかった。

T₁ 世代種子 (コメ) 1 粒またはコメ粉末を検体とする *ctxB* 遺伝子の検知

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 #1-6-3 系統について 8 粒のコメを独立に *ctxB* 遺伝子の検知を行ったところ、全てで陽性であった。同様に #1-7-1 系統では 8 粒中 7 粒が陽性で、#2-4-1 系統では 4 粒中 3 粒、#2-4-3 系統では 4 粒中 4 粒が陽性であった。なお、対照として検知を行った構成遺伝子 *DSH1* のプロモーター領域 *DSH1p* については全検体で増幅産物が認められた。なお、*ctxB* 遺伝子導入体の T₁ 種子において、*ctxB* 遺伝子が検出されない場合があるのは、T₀ 世代の後代としてメンデル則的に分離しているためと考えられる。以上のように *DSH1p* 遺伝子を対照として、導入した *ctxB* 遺伝子の特異的に検知可能な PCR 法を確立した。

同様に各系統のコメ粉末 (すなわち、コメの混合物) より調製したゲノム DNA について PCR を行ったところ、T₀ 世代での解析結果と矛盾なく、WT#5 及び#2-10-1 系統では、*ctxB* 遺伝子は検出されず、他の系統では陽性となった。なお、陽性対照の *DSH1p* 遺伝子は全系統で陽性となった。

T₁ 世代種子 (コメ) 1 粒を検体とする *ctxB* 遺伝子コンストラクトコピー数の解析

今年度は同様の手法により、T₁ 世代種子 (コメ) を検体とする *ctxB* 遺伝子の定量的検知法

について検討した。

増幅曲線について、基準とする *DSH1p* 遺伝子と解析対象である *ctxB* 遺伝子の Ct 値の差 (ΔCt 値) を求め、さらに、基準とする (ここでは #1-7-1-1) との $\cdot Ct$ 値の差 ($\Delta \Delta Ct$ 値) を求め、存在比を求めた。なお、リアルタイム PCR の増幅曲線で、サイクル数が 40 サイクルに近くなると *ctxB* の増幅産物のシグナルが高くなるものがあったが、これは、乳鉢、乳棒を用いた試料調製時の微量のコンタミネーションが原因と考えられる。

上述の $\Delta \Delta Ct$ 法により、非組換え体 (WT#5) を含む T₁ 世代種子 (1 粒由来サンプル) 5 系統、各系統 4 粒におけるリアルタイム PCR 法による *ctxB* 遺伝子のコピー数を解析した結果、導入コピー数は WT#5 及び#2-10-1 系統の 0 から、#2-4-3-2 の 15 コピーまで、同一系統でも種子検体ごとにバリエーションに富むことが明らかになった。一方、T₁ 世代種子 (コメ粉末サンプル) におけるコピー数解析の結果、粉末と鋳型とした場合は、導入コピー数は、各コメ粒のものが平均化され、WT#5 及び#2-10-1 系統では 0 であったが、#1-6-3 系統では 3.1、#1-7-1 系統では 0.9、#2-4-3 系統では 9.6 と求められた。

T₀ 世代において導入遺伝子が認められなかった (0 コピー) WT#5 系統及び、#2-10-1 系統の T₁ 世代種子はすべて、*ctxB* 遺伝子の増幅が認められず、すなわち、0 コピーと判断され、同様にこれら 2 系統については、粉末を試料とした場合も 0 コピーと判断された。T₀ 世代において導入遺伝子のコピー数が 1 と推定された #1-7-1 系統では、T₁ 種子 (1 粒別) では 1 コピーが 3 粒、2 コピーが 1 粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の *ctxB* 遺伝子のコピー数は 0.9 と見積もられた。なお、これらの結果は、いずれもコメ 1 粒検体 #1-7-1-1 に存在する *ctxB* 遺伝子のコピー数を 1 として求めたものであり、homo であるか、または hetero であるかを考慮していないため、厳密には「コピー数」ではなく「*DSH1p* 遺伝子に対する遺伝子存在比」である。この点を勘案すると、#1-7-1 系統では、自殖交配により、T₁ 世代で 2 コピーの検体は homo になっていたものと考えられる。

T₀ 世代において同じ系統 #1-6-1 の導入遺伝

子のコピー数が3と推定された#1-6-3系統では、 T_1 種子(1粒別)では2コピーが1粒、4コピーが2粒、6コピーが1粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の *ctxB* 遺伝子のコピー数は3.1と見積もられた。コメ粒での結果を見ると、#1-6-3では#1-6-3-1では6コピーとすべて homo 化したと考えられ、4コピーの#1-6-3-2及び#1-6-3-3では、一部が homo 化したと考えられる。一方、#1-6-3-4では2コピーとなり、一部脱落が生じたものと考えられる。

T_0 世代において同じ系統#2-4-1の導入遺伝子のコピー数が7と推定された#2-4-3系統では、 T_1 種子(1粒別)では2、6、11、15コピーが各1粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の *ctxB* 遺伝子のコピー数は9.6と見積もられた。この系統では、hetero 化及び homo 化の両者が進んでいると考えられる。

以上のように、コメ1粒またはコメ粉末より調製したゲノムDNA試料について、*DSH1p* 遺伝子の存在比を基準としたリアルタイムPCR法により、*ctxB* 遺伝子の存在比を見積もることができた。

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

SciFinderを利用した文献と特許の検索では非食用バイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタについてそれぞれ5報、3報、28報が該当した。

非食用GM魚の検索結果

該当した5報は観賞用(2報)と環境モニタリング(3報)の2つのカテゴリーに分類できる。観賞用については、導入遺伝子として青色蛍光タンパク遺伝子、FP635蛍光タンパクが使用されてそれぞれ青色、紫色の蛍光を発するゼブラフィッシュの特許が見出された。以前から緑、黄色、赤の蛍光を発するゼブラフィッシュが発表されていたが、新しい色を発する非食用GM魚が登場した。環境モニタリングのカテゴリーではエストロゲン用物質の検出、PCBの検出、内分泌攪乱物質の評価を目的としており、3報のすべてにおいて導入遺伝子としてGFP遺伝子を利用していた。非食用GM魚の全体で報告を開発国別に分類すると、米国(2報)、日

本(1報)、韓国(1報)、香港(1報)となった。

非食用GMニワトリの検索結果

該当した3報のすべてがバイオリアクターのカテゴリーに分類されて、有用な組換えタンパクを生産させることを目的としていた。導入遺伝子は、ニワトリ卵白リゾチームと杉花粉アレルゲンの7つの主要ヒトT細胞エピトープに由来するペプチドの融合遺伝子、ヒト成長ホルモン、ヒトエリスロポエチン、腫瘍壊死因子、一本鎖Fv/Fc断片があった。非食用GMニワトリの開発国はいずれも日本であった。

非食用GMブタの検索結果

該当した28報は臓器移植用(15報)、バイオリアクター(4報)、病原菌耐性付与(7報)、その他(2報)の4つのカテゴリーに分類された。臓器移植用のカテゴリーにおいては改変あるいは導入遺伝子としては

・1,3-galactosyltransferase gene-knockout (GTKO)、CD46が頻繁に登場した。前者はブタに存在する主要な異種抗原の生合成を抑制する作用があり、後者はヒトの補体の攻撃からブタの臓器を防御する作用があり、いずれもこれらのGMブタの臓器をヒトに移植したときに急性拒絶反応が抑制される。

非食用GMブタの全体の報告について開発国別に分類すると、報告数の多い上位3国は中国(11報)、米国(10報)、ドイツ(3報)となった。臓器移植用のカテゴリーでは15報中の9報を米国が占めた。臓器移植用以外のカテゴリーでは13報中の11報を中国が占めた。

最近注目を集めている技術や報告

ゲノムのヌクレオチド配列を編集する技術としてジンクフィンガーヌクレアーゼや transcription activator-like effector nuclease (TALEN) があり、これらの人工ヌクレアーゼを利用した論文が増えている

(Prez-Pinera P., Ousterout D.G., Gersbach C.A. Advances in targeted genome editing. Curr. Opin. Chem. Biol. 16: 268-277(2012))。この技術によってGM生物の作成の効率が大きく向上した。これら人工エンドヌクレアーゼを利用して作成されたGM動物にはカエル、ハエ、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、ブタなどがある。また、最近になってブタの全ゲノムが解読されており、今後GMブタの作成が進展す

るであろうと予想されている (Groenen M. A. M. et. al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature 491, 393-398 (2012))。一方で、動物にヒトの iPS 細胞を移植させてヒトの臓器を作成させる研究が行われている (2012 年 10 月 12 日、「再生医療危うい倫理」東京新聞)。

(2) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知 鶏肉サンプルからのゲノミック DNA の抽出

ゲノミック DNA の収量はサンプルごとに大きく変動した。280 nm の紫外吸収に対する 260 nm の紫外吸収の比、230 nm の紫外吸収に対する 260 nm の紫外吸収の比に基づいて、抽出されたゲノミック DNA はリアルタイム PCR の測定に適していると考えた。

生の鶏肉については、280 nm の紫外吸収と 0.8% アガロースゲル電気泳動に基づき、レバーを用いたときに短くて多くの量のゲノミック DNA が抽出されたことが明らかになった。0.8% アガロースゲル電気泳動に基づき、加工食品中の鶏肉からは生の鶏肉からよりも短いゲノミック DNA が抽出された。チキンカレー中の鶏肉から抽出されたゲノミック DNA は特に短かった。食品加工の過程でゲノミック DNA が分解したことが示された。

リアルタイム PCR のためのプライマーとプローブの設計

GM ニワトリのゲノムに挿入された hEpo cDNA についての詳細な情報は入手できなかった。まず、hEpo cDNA をデータベース中を検索すると 2 つの型が見出された。コドン 143 位に Lys を含む cDNA と含まない cDNA である。2 つの cDNA とともにシグナルペプチドと成熟タンパクをコードする部分から構成されている。hEpo cDNA のヌクレオチド配列に基づいて特異的なプライマーとプローブを設計しようと試みたところ、成熟タンパクをコードする部分から 2 つの組み合わせが得られた。1 つのプライマーは 2 つの型の cDNA の異なる配列を含んでいた。2 つの型の cDNA を同時に検出できるように、このプライマーを含まないプライマーとプローブの組み合わせを本研究では利用した。これらのプライマーとプローブの構造は研究方法の項目に示した。

キャリブレーションプロットの確立

hEpo cDNA を含む市販のプラスミドを購入してスタンダードとして使用した。このとき増幅曲線が得られて、リアルタイム PCR によってプラスミド中の hEpo 遺伝子が検出できることを確認した。

次に、生の鶏肉のサンプルの 1 つから抽出されたゲノミック DNA にコントロールプラスミドをスパイクした。このとき増幅曲線が得られて、生の鶏肉から抽出されたゲノミック DNA の存在下でプラスミド中の hEpo 遺伝子が検出されることを確認した。

6 つの加工食品のサンプル中の鶏肉から抽出したゲノミック DNA にコントロールプラスミドをスパイクしたときに、hEpo 遺伝子は検出されてスタンダードプロットが得られた。

鶏肉の市場調査

本研究で開発した hEpo 遺伝子の検出法の応用性を評価するために、12 品の鶏肉サンプル (生の鶏肉 6 品、加工食品中の鶏肉 6 品) を測定した。hEpo 遺伝子が検出されるかを決定するためにスタンダードプロットを使用した。今回測定したサンプルのいずれから hEpo 遺伝子は検出されなかった。内在性ニワトリ cytochrome b 遺伝子の分析では、すべてのサンプルにおいて同様な増幅曲線と Ct 値が得られた。また、抽出されたゲノミック DNA はブタ、ウシ、ヒツジ、ウマからではなくてニワトリから得られたことが確認された。

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

__ 現在、世界では多くの GM ジャガイモが開発されていることが報じられているが、日本で安全性が承認されているものは、米国産害虫抵抗性の GM ジャガイモのニューリーフのみである。ニューリーフ・ジャガイモ (SPBT02-5 系統、Bt-6 系統、SEMT15-15 系統、SEMT15-02 系統、RBMT15-101 系統、RBMT21-350 系統) を検出するための定性 PCR 法の標的増幅産物は、111 bp 又は 117 bp に設定されており、その検知法は公定法として示されている。加えて、我が国で未承認の GM ジャガイモの中海外で作出実績のある品種は 3 種類程度存在する。そこで、意図しないこれらの GM ジャガイモのジャガイモ加工食品への混入をより高い精度で検査するための、GM ジャガイモ検知法の開発が求められていた。

、GM ジャガイモの混入を検査するための新しい検知法を開発するにあたり、ジャガイモ加工食品から得られる DNA の評価を行った。ジャガイモデンプンとジャガイモデンプンを加工した加工食品から得られる DNA の低い精製度は、DNA の回収量の低さに起因するものと考えられた。ジャガイモデンプンより加工された食品は、サンプルを溶解させるために使用する緩衝液に難溶であるため、他の加工食品のサンプリング量の 6~8 割(6~8 g)に抑えたためと考えられた。また、ジャガイモデンプンは、製造工程において物理的に DNA が分解されるような工程が多く非常に加工度の高い製品である。そのため、ジャガイモデンプンを使用した加工食品より DNA を抽出しにくいと考えられた。その他のジャガイモ加工食品からは、1 g あたりのサンプリング量から 1 µg 以上の DNA を得ることが可能であることが示唆された。DNA の精製度については、その製造工程の複雑化によって低く見積もられることが考えられた。ジャガイモ加工食品から抽出精製される DNA 断片長に関して調査を行った結果、ジャガイモスナック菓子、冷凍ジャガイモや乾燥ジャガイモは製品によって差はあるものの全て 301~401 bp まで増幅産物を得られた。一方で、ジャガイモデンプンやジャガイモデンプンを加工した製品は 51~101 bp まで増幅産物を確認することが可能であった。つまり、製造加工工程における熱、冷却、圧力、粉碎、乾燥及びその他の物理的な加工工程の要素によって 51~101 bp 程度まで断片化されていることが示唆された。上記の考察を踏まえ、プロモーターやターミネーター領域などの組換え DNA セグメント、作物の内在性遺伝子を検知するリアルタイム PCR 法により、GM ジャガイモの検出は可能であることが示唆された。

GM ジャガイモ混入に関する擬陽性判定を防ぐため、GM ジャガイモ検知法は、ジャガイモ内在性遺伝子検知法よりも高感度であることが求められる。本研究では、検出限界(LOD)は、UGPase については 2,500 コピー、Tnos・P35S については 12.5 コピーであることが示唆された。定量下限(LOQ)は、UGPase では 250 コピー、Tnos、P35S では 12.5 コピーであった。Tnos と P35S の検出感度は UGPase よりも高いことから、GM ジャガイモのスクリーニング法に適合していることが示唆された。

市販されているジャガイモ加工食品に意図しな

い GM ジャガイモの混入を検査するため、開発した GM ジャガイモのスクリーニング法を用いて検査を行った。その結果、検査した全てのジャガイモ加工食品に GM ジャガイモは検出されず、Tnos や P35S の検査で高い Ct 値(38 以上)を検出した製品については、食品へのバクテリアやウイルスの汚染によることが考えた。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

スパイラルプレーターを用いて調製したコロニーリフトはメンブレン上に均一コロニーを出現させることが可能でプローブによる検出シグナルの位置関係の特定が簡単にできた。今回確立した方法はメンブレンリフトが上手くいかない場合には、有用な方法であり、他の菌種にも応用できると考えられる。コロニーの変性は菌種によって、NaOH を用いた変性処理の他にリゾチウムや SDS を加える等の条件検討が今後必要であると考えられる。豚肉より単離されたエリスロマイシン耐性菌は一部の菌で Probe ermB、Probe ermC の両方で検出されるコロニーが認められたが、ほとんどが Probe ermB か Probe ermC で検出された。Probe MCS は、*L. casei* IGM393 だけでなく、*L. casei* IGM232 に対して交差性を示した。*L. casei* IGM232 に関しては、ermB 遺伝子を挿入する際に必要となるトランスポザブルエレメントの配列についても確認したが、プローブとの類似配列は認められなかった。そのため、組換え体作出時にマルチクローニングサイトに類似した配列が組換えにより出現した可能性が示唆される。今回の検討結果より、エリスロマイシン遺伝子とマルチクローニングサイトを検出するプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを利用すれば生きた GM 微生物をスクリーニングすることが可能であると考えられる。しかしながら、近年、組換え体を作成するバイオテクノロジー応用技術は進歩しており、マルチクローニングサイトを残さない方法も確立されている。したがって、今回検討した方法でも、すべての GM 微生物を検出するには不十分であり、塩基配列の情報がない状況において GM 微生物を検知するのは容易ではないと考えられる。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

本年度はマイクロアレイ解析をコメやトウ

モロコシ以外の植物種に適応できるかについての検討を行った。植物種については昨年度まで使用してきたイネ、トウモロコシの他に、比較的遺伝子組換えの報告例が多く流通量も多いと思われる、ジャガイモ、トマト、ダイズを検出できるようなDNAマイクロアレイを設計した。それぞれの植物種のゲノム DNA を特異的に検出するためのプローブを各遺伝子について4~6種類ずつ設計し、それらを固定化した DNA アレイを作製した。まず、これまでにサンプルとして使用実績のあったコメから抽出したゲノム DNA を用いて解析を行ったところ、内在性遺伝子と、組換え体においては組換え遺伝子が検出されることが判明した。しかし、同じ遺伝子上に設計したプローブでもその配列によって検出されるシグナルの強度が異なっていた。これは、それぞれの配列のハイブリダイゼーションの効率を反映しているものと考えられた。このアレイを用いて各植物種を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、コメではジャガイモのプローブと、ジャガイモではトマトのプローブとで交叉ハイブリが認められた。コメとジャガイモでは同じ遺伝子上に設計した6種類のプローブのうち1種類とだけで交差が見られたことから、プローブ領域を検討することで、特異性を確保することが可能であることが示唆された。ジャガイモを用いた場合には、2種類のトマト内在性の遺伝子検出用のプローブ8種類中7種類で交叉ハイブリが認められた。これは、ジャガイモとトマトが同属の植物種であることからゲノム配列上によく似た配列を多く含んでいるためであると考えられた。しかし、これらのプローブのうち1種類では交叉シグナルが検出されておらず、このプローブを用いることで、トマトとジャガイモのゲノム DNA を区別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

今回の調査から、薬用・環境浄化用 GM 植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国、カナダにおいては、急速に野外圃場栽培面積が減少し、医薬品類の生産は、一過的遺伝子発現システムを用いた閉鎖系栽培施設での生産に移行していることが判明した。その一方で、野外圃場栽培状況は不明であるが、本分野において中国での開発例が、ますます活発化している

ことが判明した。

PCR 法により遺伝子導入を確認した *ctxB* 遺伝子導入株の T₁ 種子 (コメ) について総タンパク質を調製し、*ctxB* タンパク質の検知を試みたが、間接、直接 ELISA 法いずれにおいても検知することはできなかった。原因として、*ctxB* がタンパク質として生産、蓄積されていない可能性があるが、遺伝子は導入されており、また、*ctxB* イネ#1-6-1 系統及び、#2-4-1 系統についてはその種子の登熟過程において、*ctxB* 遺伝子の発現を確認している。遺伝子発現からタンパク質の生産、蓄積に至る過程になんらかの問題がある可能性は否定できない。

今回、ELISA において、抗 *ctxB* モノクローナル抗体を使用した。ポリクローナル抗体を使用することで、検知できる可能性がある。今後検討したい。(e.g. Anti-beta subunit Cholera Toxin antibody (Rabbit, polyclonal) (ab34992, abcam) を Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody, Peroxidase labeled (074-1506, KPL) と共に使用。)

また、T₁ 種子 (コメ) の1粒を検体とする *ctxB* 遺伝子の検知法については、構成遺伝子である *DSHI* 遺伝子のプロモーター領域 *DSHIp* を対照として使用することにより、安定した検知法として確立することができた。CtxB イネの T₁ 種子取得にあたっては、T₀ 世代の葉より調製したゲノム DNA について、*DSHIp* を対照として、*ctxB* 遺伝子の存在比率を求めることにより、導入遺伝子コンストラクトのコピー数の見積りを行ったが、今回、種子1粒またはコメ粉末を検体として、リアルタイム PCR 法により、導入遺伝子コンストラクトの定量的な検出が可能であることが示された。

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

SciFinder で文献や特許を検索して本研究の対象となった報告は非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタについてそれぞれ5報、3報、28報であった。非食用 GM 魚、ニワトリの報告は少なく、ブタの報告が多かった。

非食用 GM ブタについて開発国を調査すると、臓器移植用のカテゴリーに分類される物 15 報中

の9報を米国が占めた。また、非食用 GM ブタの臓器移植以外のカテゴリーに分類される物 13 報中の 11 報を中国が占めた。このように非食用 GM ブタについてはカテゴリーによって開発国の偏りが明瞭である。つまり中国は非食用 GM ブタを開発しているが臓器移植用の物は開発していない。非食用 GM ブタについては臓器移植用に開発されるものが多い。しかし、臓器移植は現在研究中であり、それを目的とした非食用 GM ブタが大量に飼育される段階には達していないようである。したがって、フードチェーンへの混入の懸念は少ないと思われる。

非食用 GM 魚については、魚の種類はゼブラフィッシュとメダカが使われており、これらは通常は食用としない種類である。したがって、これらの非食用 GM 魚がフードチェーンに混入する懸念は少ないと思われる。

次に、非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタの全体の報告 36 報を開発国ごとに分類すると、米国(12 報)、中国(11 報)、日本(5 報)の上位3国で78%を占めており、非食用 GM 動物の開発の盛んな国が明確に示された。これらに続く国としてはドイツ(3 報)、韓国(3 報)であった。

最近注目される技術や報告を以下に3つ述べる。その1つ目は、人工エンドヌクレアーゼがある。ジンクフィンガーヌクレアーゼや transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を利用したゲノム編集の報告が近年急上昇している。この技術を使うと遺伝子の継ぎ目がなくなり、抗生物質による選抜が不要になるなど、古い方法を利用していたときよりもはるかに洗練されたゲノムの操作が可能になる。今後、これらの技術を利用して作成された GM 動物に由来する材料がフードチェーンに混入したことが疑われるときに、それらを検知することがきわめて困難になってしまうことが予想される。

最近注目される技術や報告の2つ目は、ブタの全ゲノムが解読されたことが挙げられる。これによってブタを利用した研究やバイオテクノロジー技術の全般が大きく進展することが予想される。その中の1つとして、非食用 GM ブタの作成が容易になり促進されることが考えられる。

最近注目される技術や報告の3つ目は、動物にヒトの iPS 細胞を移植して動物中でヒトの臓器を作らせる研究が始まっている。この研究自体は非食用 GM 動物の開発の研究の範疇には入らない。

しかし、この新しい研究は臓器移植用の非食用 GM 動物の開発の研究と目的が類似しており、臓器移植用の非食用 GM ブタの開発に置き換わる研究になる可能性がある。臓器移植用の非食用 GM ブタの開発が影響を受けて、その開発が鈍る可能性が考えられる。

(2) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知

本研究においては、hEpo 遺伝子を含む GM 鶏肉がフードチェーンに混入したことが疑われるときに鶏肉を調べる方法として、ニワトリゲノム中から hEpo 遺伝子を検出するためのリアルタイム PCR を使った方法を作成した。ポジティブコントロールとして hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する肉を入手することやそれに特異的な配列を得ることが困難であったので hEpo cDNA を含むプラスミドをスタンダードとして使用した。本研究ではコントロールプラスミドをニワトリゲノミック DNA にスパイクしてそれが検出されることを示した。同様な手法が食品中の GM 材料の分析に使われており、本研究の手法も妥当であると考えられる。

ニワトリエリスロポエチンまたは類似の遺伝子をデータベースで検索したところ該当する遺伝子が見出されなかった。そこで実験的にリアルタイム PCR によってニワトリゲノムを調べた。ニワトリゲノムからは hEpo 遺伝子は検出されなかった。この結果と、鶏肉から抽出したゲノミック DNA にコントロールプラスミドをスパイクすると hEpo 遺伝子が検出されること、内在性ニワトリ cytochrome b 遺伝子が鶏肉から抽出されたゲノミック DNA から検出されることを合わせて考えると、本研究で使用したプライマーとプローブによって検出される配列はニワトリゲノム中には存在せず、今回の市場調査で調べたサンプルは非 GM ニワトリに由来することが示された。

コントロールプラスミドを生鶏肉サンプルの1つから抽出したゲノミック DNA にスパイクしたところ、hEpo 遺伝子を検出することができた。この結果は、この検出法によって hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する肉を検知できることを強く示唆する。この検出法を 12 品のサンプルの測定に適用したところ、いずれのサンプルからも hEpo 遺伝子は検出されなかった。ゲノミック DNA を 0.8%アガロースゲル電気泳動によって分析したところ、生のレバーと加工食品中の鶏肉から抽出したゲノミック DNA は短くなっていた。しかし、内在性ニワトリ cytochrome b 遺伝子についての Ct 値が

すべてのサンプルから同様に得られていたので、今回調べたすべてのゲノミック DNA は本方法で測定可能であると考えた。さらに、コントロールプラスミドを 6 品の加工食品中の鶏肉から抽出されたゲノミック DNA にスパイクしたところ、hEpo 遺伝子が検出された。この結果は、ニワトリゲノミック DNA の存在下でリアルタイム PCR によって hEpo 遺伝子が検出できることを示している。これらの結果は、もし hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する肉を本検出法で測定したならば、検出できるであろうことを意味する。したがって、今回調べたサンプルはいずれも hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する鶏肉ではないと判断した。

Animal Genome Size Databaseによると (<http://www.genomesize.com>)、ニワトリの C-値は 1.25 であり、ニワトリのハプロイドの細胞 1 つに含まれるゲノムが 1.25 pg であることを意味する。本研究では 1 反応当たり鶏肉の各サンプルから抽出されたゲノミック DNA を 130 ng 使っている。このゲノミック DNA の量は 52000 個の細胞に含まれる量に相当する。GM ニワトリを作成したときに hEpo 遺伝子 1 コピーがニワトリゲノムに挿入されたとして、また GM ニワトリに由来する肉の混入比が 100% であると仮定すると、1 反応当たり仮の GM サンプル中には 52000 コピーの hEpo 遺伝子が存在することになる。スタンダードプロットに基づいて考えると、この仮の GM サンプルを測定したときには安定して hEpo 遺伝子が検出できると思われる。

加工食品 6 品に由来する鶏肉はいずれも本検出法で調べることができた。その理由はリアルタイム PCR による測定では短い DNA 配列を標的として利用するため、ゲノミック DNA 調製液中の混入物がリアルタイム PCR の反応を阻害しなかったためと考えられる。しかし、複雑な加工を施された食品に本検出法を適用するにはさらなる研究が必要である。例えば、真空パックや缶詰中の鶏肉からゲノミック DNA を抽出する方法として適した方法を見出して本検出法の適用性を試すことが求められる。近年、多くの種類の GM ニワトリが開発されている。それらの中から本研究の題材として hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリを選び、GM 鶏肉を検知する方法を作成した。本研究と同じ方法論が他の種類の GM ニワトリに由来する鶏肉の検知にも応用できると考えられる。

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

本研究では、特異的、且つ高感度な GM ジャガイモをスクリーニングする検出技術を開発することができた。我が国の GM 表示対象であるジャガイモ加工食品 6 種(ポテトスナック、冷凍ジャガイモ、乾燥ジャガイモ、ジャガイモデンプン、調理済みジャガイモ惣菜食品、ジャガイモデンプンを加工した食品)から抽出・精製された DNA は、50～100 bp 程度まで断片化されていることが示唆され、リアルタイム PCR を用いて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。GM ジャガイモに汎用される Tnos(過去データによると AV43-6-G7 系統には Tnos は含まれないとされているが、今回新たな調べにより全ての GM ジャガイモに Tnos が含まれるとされた)及び P35S を特異的に検出するリアルタイム PCR 法を用い GM ジャガイモの混入を検査することが可能であることが示唆された。開発した方法を用いてジャガイモ加工食品の GM ジャガイモ混入に関する実態調査を行った結果、GM ジャガイモの混入は認められなかった。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

GM 微生物をスクリーニングするためのコロニーハイブリダイゼーション法を確立した。確立した方法で組換え体を検知することが可能か検討し、2 つのプロンプを用いた方法によりモデル GM 乳酸菌を食品から検知できることが可能であった。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

より多くの植物種からの組換え遺伝子の検知に適応するために、新たに DNA マイクロアレイを設計・作製した。このアレイを用いて非食用の GM ジャガイモであるアムフロラの組換え遺伝子の検出を試みたところ、組換え遺伝子の特異的に検出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

これまで薬用・環境浄化用 GM 植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国、カナダにおいては、急速に野外圃場栽培面積が減少し、医薬品類の生産は、一過的遺伝子発現システムを用いた閉鎖系栽培施設での生産に移

行していることが判明した。国内では、機能性食品及び治療薬に関する件数が多く、国内外では機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多いことが判明した。また、国内外での件数の半数近くは中国のものであった。

文献等の調査研究の結果に基づき、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構築を進めるとともに、GM 検知法の開発を進めている。本年度は、これらのうち、*ctxB* イネの T₁ 種子（コメ）を検体とする、免疫学的手法による *ctxB* タンパク質の検知法について検討するとともに、リアルタイム PCR を用いた、*ctxB* 遺伝子の定量的検知法について検討した。その結果、構成遺伝子である *DSH1p* 遺伝子の存在比率を基準として外来の *ctxB* 遺伝子のコピー数を求めることが可能な定量的検知法の確立に成功した。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するとともに、組換え体検知法の基盤技術の整備を完了した。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

非食用 GM 動物の産業的利用は現在のところ国から承認が出ていない。しかし、近年、非食用 GM 動物を開発するための技術は大きく進歩している。非食用 GM 動物についての今後の研究の進展を予測することは難しいが、注意深く調査し状況を把握しておく必要がある。また、非食用 GM 動物を開発するための新しい技術にも対応できる検知法を作成することが望まれる。

非食用 GM 動物の検知法として、GM ニワトリのゲノム中に挿入された *hEpo* 遺伝子を迅速に検知する方法をリアルタイム PCR を利用して開発した。この方法によって *hEpo* 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する鶏肉の市場への混入を監視できる。本研究は食品の安心や安全に寄与できるものとする。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 論文発表

- 1) Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2013, in press.
- 2) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2013, in press.
- 3) Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 2013, in press.
- 4) Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136(2), 895-901, 2013
- 5) Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19(3), 215-222 (2012)
- 6) Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize

- Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 53(4), 157-165 (2012)
- 7) Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research*, 94, 89-97, (2012)
 - 8) Mano J., Harada, M., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Noritake, H., Iizuka, T., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K. Single-laboratory validation of comprehensive GMO detection method using real-time PCR array, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516 (2012)
 - 9) 梶川揚申、五十君静信。乳酸菌組換えワクチン。書籍：新しい乳酸菌の機能と応用。in press シーエムシー出版
 - 10) Ito A., Taguchi, T, Mogi, T, Wake, H, Tanaami T, Akiyama, H, Teshima, R, Sasaki, N, Yamada, A, Ozeki, Y. Comparison of signal enhancement techniques using DNA microarrays for screening GM crops. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19: 141- 148 (2012)
 - 11) 中島治、穂山浩、手島玲子 非食用遺伝子組換え動物の最近の開発状況についての調査 国立医薬品食品衛生研究所報告 第130号 50-57 (2012)
 - 12) Nakajima O., Nakamura K., Kondo K., Akiyama H., and Teshima R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biol. Pharm. Bull.* (2013) 投稿中
2. 学会発表
- 1) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Apple procyanidins inhibit development of collagen-induced arthritis via down-regulation of Th17 response. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.2)
 - 2) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting genetically modified Bt rice lines harboring CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct in rice product. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
 - 3) Morimoto, K., Katayama, S., Fukumoto, T., Nakamura, K., Nakamura, S. Amyloidogenicities of artificially synthesized human stefins A and B. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
 - 4) Nakamura, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R. Applicability of Qualitative and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Genetically Modified Papaya Line 55-1 to Papaya Products. 126th AOAC Annual Meeting & Exposition, Las Vegas, USA, (2012.10)
 - 5) 中村公亮、穂山浩、松岡英樹、中島翔平、神田智正、近藤一成、手島玲子：リンゴブロシアニジン(ACT)の経口摂取によるコラーゲン誘導性関節炎の発症遅延効果, 日本薬学会 第133年会、横浜、(2013. 3)
 - 6) 中島治、中村公亮、近藤一成、穂山浩、手島玲子：ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について, 日本薬学会 第133年会、横浜、(2013. 3)
 - 7) 近藤一成、小櫃冴未、小林友子、中村公亮、坂田こずえ、野口秋雄、手島玲子：PCR-RFLP法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法, 日本薬学会 第133年会、横浜、(2013. 3)
 - 8) 中村公亮、穂山浩、野口秋雄、小林友子、坂田こずえ、近藤一成、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：パパイヤ加工品の遺伝子組換えパパイヤ含有に関する総合的評価法、第49回全国