

RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA を得た。この cDNA プールを用いた PCR を行い、RA14-17 の cDNA の一部の配列を増幅した。増幅した断片は塩基配列を調べ、目的のものであることを確認した後、得られた増幅断片を pENTR/D-TOPO cloning vector に挿入し、Entry vector とした。この Entry vector と RNAi ベクターである pANDA との間で LR 反応を行った。なお、pANDA は奈良先端科学技術大の島本研究室より分与していただいた。

形質転換体の種子における RA14-17 低減の検定

形質転換体の種子に含まれる RA14-17 をウエスタン分析により分析した。それぞれの形質転換体より得られた種子のうち、6 粒を無作為に選択し、これを半分に分割して胚芽を含む部分と含まない部分に分けた。次に、このうちの胚芽を含まない部分 (胚乳) をすりつぶして、これから粗タンパク質を抽出した。それぞれを SDS-PAGE で分離し、これについて抗 RA14-17 抗体を用いたウエスタン分析を行った。ウエスタン分析に用いた抗体には、大腸菌系発現系を用いて調製した組換え体タンパク質をウサギに免疫して得られた抗ウサギ血清 (抗 RA14-17 抗体) を用いた。

低アレルゲンの形質を示した種子について、対応する残りの半分 (胚芽を含む部分) を、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシンを含む培地に播種し発芽させた。これらの薬剤耐性を有する形質転換体の後代個体として選抜し、これらの植物体は発芽後の芽生えをポットに移植し、これを組換え体温室で栽培した。これらの植物は夏期に自然光のもとで 28°C の温室で栽培した。

ホモ接合体系統の形質転換体の選抜

それぞれの系統から得られた種子より無作為に選んだ 12 粒を用いて同様の方法で粗タンパク質を抽出し、玄米に含まれるアレルゲンタンパク質の量を調べた。

(3) 低アレルゲン米のタンパク質発現差異解析

遺伝子組換え米には (2) の方法で作製した、

米アレルゲン RA14-17 をノックダウンした米 (RA-KD) を用いた。また、対照に非組換えの日本晴 (NT) を用いた。米粉 10 mg に溶解バッファー (30 mM Tris, 8 M urea, 4% CHAPS) 3 mL を加えてタンパク質を抽出し、10,000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿を取り除いた。抽出のレプリケートは 3 回とした。研究(1)と同様に 2D-DIGE を行い、RA-KD と NT 間で 2 倍以上の発現差異を示すスポットを抽出した。発現差異が認められたタンパク質の同定には、コメタンパク質 (100 μg) を 2 次元分離した後、アクリルアミドゲルを CBB 染色し、相当するスポットを切り出した。切り出したゲルは脱色した後、50%アセトニトリル・25 mM 重炭酸アンモニウム溶液で脱水し、乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin Gold-Mass Spec Grade, 0.01 % Protease max [Promega 社]) を加え、37°C で 2 時間ゲル内消化を行った。消化ペプチドを

α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA, Sigma-Aldrich 社) と混合し、4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて、トリプシン消化ペプチドの MS スペクトルおよび MS/MS フラグメントイオン質量を取得した。タンパク質同定のサーチエンジンには Mascot MS/MS ion search (Matrix Science 社) を用い、NCBI Inr タンパク質データベース (*Oryza sativa*) 内での相同性検索を行った

(4) アレルゲン予測の解析法

2011 年 6 月から 2012 年 5 月の間に NCBI PubMed に収載された論文のうち、キーワード検索によりエピトープ配列決定に関するものを抽出し、ピアレビューを行ってエピトープ情報を報告していると判断された文献に記載されているエピトープ情報を ADFS のデータに追加した。

(5) 動物モデルを用いるアスタキサンチンレタスのアレルギー性の解析

7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (E)、非組換えレタス (NG)、アスタキサンチン遺伝子導入レタス (GM)、陰性対照としてペ

プシン (PEP) および陽性対照として卵白アルブミン (OVA) 投与群を 5-6 匹/群で設定した。非組換えあるいはアスタキサン遺伝子導入レタス 1 g に対して 1 mL のリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を加えて乳鉢で粉碎した。ホモジネートを 4°C 下、10000 g で 30 分間遠心分離した上清を限外ろ過膜 (分子量 3000) で濃縮して抽出液を得た。それぞれのレタス抽出液に、等量のリノール酸/大豆レシチン混合液 4:1 (LL) を加えて乳化し、NG 群あるいは GM 群に用いた。E、PEP および OVA 群の媒体は、PBS と LL の乳化液とした。いずれの群も 2 回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に各蛋白質 8 mg/0.4 mL LL/匹の割合で経口投与して惹起 (1 回目) した。さらに、2 週間後、卵黄レシチンを用いた LL を媒体として 8 mg/0.4 mL/匹の割合で経口投与して惹起 (2 回目) した。惹起後 30 分間に観察されるアナフィラキシー症状の強さにスコアをつけ、1 匹のマウスが示した症状の最大スコアをその個体のスコアとした。各投与群間の差は Mann-Whitney の方法で検定した。また、2 回目の経口惹起の 6 日後に採血し、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で測定し、感作の成立を確認した。

(倫理面への配慮)

動物への投与実験においては、動物の苦痛を最小限に留めるよう務め、動物飼育・管理に当たっては食品薬品安全センター秦野研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

(1) アスタキサンチン発現レタスのタンパク質発現差異解析

予備検討として、市販されているレタスの外側の葉と内側の葉からタンパク質を抽出し、蛍光標識して 2 次元電気泳動に供した。Fig. 1 に示すように、外側の葉と内側の葉ではタンパク質の組成が大きく異なっていることが明らかとなった。

NT レタスと TF レタスの発現差異解析では、内側の葉と外側の葉を混合したサンプルを供した。1 次元電気泳動パターンを比較したところ、明らかに発現量が異なっているタンパク質のバンドは観察されなかった (Fig. 2)。2D-DIGE 解析の結果、再現性良く得られた (>50%) 450 スポットのうち、非組換えと組換え間で 2 倍以上の発現差を示すスポットはなかった。

アレルゲン LTP (11.5 kDa, pI 9.04) は粗抽出物の 2 次元マップより同定することができず、これはタンパク質含量が少ないためと考えられた。そこで、京都女子大学 成田博士の方法に従い、CM による LTP の精製を試みた。その結果、作製したウサギ抗 LTP 抗体を用いた Western blot にて、レタス葉重量に対して 0.00025% の LTP を精製できたことが確認された (Fig. 3)。遺伝子組換えレタスは十分な重量が確保できなかったため、Western blot に供するだけの LTP の精製はできなかった。今後、追加として石川県立大学より供与されたアスタキサンチン発現 GM レタスを用いて、LTP タンパク質に関して更なる解析を行う予定である。

(2) 低アレルゲン (主要アレルゲン RA14-17 ノックダウン) イネの作出

14-17 kDa アレルゲンタンパク質 (RA14-17) を抑制するための RNAi の標的配列の選択と RNAi の構築

イネの RA14-17 をコードする遺伝子は、ゲノム中に 4 コピー (RA14, RA16, RA17, RAG5) 存在した。またこの遺伝子に由来すると思われる他種類の cDNA がデータベースに登録されていた。これらの塩基配列を比較したところ、これらは非常に相同性が高いことがわかったため、共通性の高い領域の配列を利用して RNAi を作製することにした (Fig. 4)。Entry vector と RNAi ベクターである pANDA との間で LR 反応を行ったところ、RA14-17 遺伝子に対する RNAi プラスミド pANDA-RACO を得た (Fig. 5)

RA14-17 遺伝子に対する RNAi を導入した形質転換体の作出

pANDA-RACO を用いてアグロバクテリウム法によりイネ（日本晴）を形質転換し、15 系統の形質転換体を得た。得られた形質転換体の緑葉から RNA を抽出し、これを用いて半定量 RT-PCR を行って、導入した RA14-17 遺伝子に対する RNAi が発現しているかどうかを調べた。その結果、これらの形質転換体での RNAi の発現を検出した。また、得られた形質転換体を栽培し、非形質転換体（日本晴）の形態と比較した。その結果、形質転換体植物は、非形質転換体植物と同様の生育過程を示し、栄養成長期での草丈、草高、草色、分けつ数などの形態には差異は観察されなかった。また、形質転換体は非形質転換体と同様の形態の穂が生じ、出穂期も非形質転換体と有意な差は認められなかった。

形質転換体の種子におけるアレルゲンタンパク質低減の検定

上記の形質転換体は、いずれの植物体からも十分量の種子が得られた。モミの形態には非形質転換体との間で顕著な差は認められなかった（Fig. 6A）。しかしながら、玄米の多くに芯白の表現型が現れた（Fig. 6B）。

得られた形質転換体 15 株のうち 10 株で、種子に含まれる RA14-17 がウエスタン分析で検出できない程度に減少したのが見つかった。形質転換体（系統 1）の場合、調べた 6 粒の種子のうちの 4 粒で RA14-17 が検出されない程度にまで減少していた（Fig. 6C）。一方、残りの 2 粒は野生型と同様のアレルゲンタンパク質の産生が認められた。この検定により、これらの 10 株を低アレルゲン系統として選択した。

ホモ接合体系統の形質転換体の選抜

導入した RNAi は優性に働くため、後代植物の中からホモ接合体を選抜する必要がある。そこで、それぞれの形質転換体の後代（T2）を栽培して得られた種子（T3）について、上記と同じ検定を行い、低アレルゲンの形質が遺伝しているかどうか

を調べた。この検定により、12 粒のすべてにおいて低アレルゲンタンパク質の形質を示した系統が現れた。これを上記と同様の方法で発芽させ、温室において次世代の植物を栽培した。

上記の検定により選抜された T3 植物を栽培し、これらから得られた種子（T4）についても同様の検定を行った。この検定により、全ての種子で十分な低アレルゲンタンパク質の形質を示したものを選抜した。これをホモ接合体系統とした。これにより最終的に 3 系統の RA14-17 低アレルゲンイネ系統が確立された。

(3) 低アレルゲン米のタンパク質発現差異解析

RA-KD 米、および NT 米の代表的な Cy 染色パターンを Fig. 7 に示した。発現量が同程度であるスポットは黄色に、RA-KD 米での発現が多いスポットは赤色に、反対に NT 米での発現が多いスポットは緑色に表されている。Decyder ソフトウェアによりスポットのマッチングを行い、再現良く得られた約 1000 スポットのうち、RA-KD/NT の蛍光比の平均値 (av. Ratio) が 2 以上あるいは 1/2 以下となるものを抽出した。その結果、NT 群に比べて 2 倍以上の発現変動がみられたスポットは 20 スポットであった（Fig. 8）。これらのスポットからタンパク質を抽出し、トリプシン消化ペプチドの MALDI-TOF MS/MS 相同性検索を行ったところ、Table 1 に示すようにタンパク質が同定された。NT よりも発現の少ないタンパク質には、14-17kDa アレルゲンタンパク質に属する Allergenic protein や RAG2 といった主要アレルゲンが同定された。NT と比較して発現が増大していたタンパク質には、Glutelin 等が含まれていた。

(4) アレルゲン予測の解析法

キーワード検索とピアレビューにより、本年度新たに追加したエピトープ情報は、17 報の論文から 33 種のアレルゲンについて、総エピトープ数 191 の情報を追加した（Table 2）。本年度のアレルゲンおよびエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1407 となった。エピトープ既知のアレルゲ

ン数は 132 種となった。

(5) 動物モデルを用いるアスタキサンチンレタスのアレルギー性の解析

2 回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、E 群 0.4 に対して、陰性対照とした PEP 群は 0.0 と同レベルであった一方、陽性対照とした OVA 群は 2.2 と上昇した。NG 群と GM 群のスコアも E 群に対して、若干の上昇を示したが、NG 群と GM 群のスコア平均は 1.0 および 1.2 であり、両群のスコアは同程度であった。本実験では OVA 群をはじめ、いずれの群間にも統計学的な差を認めなかった (Fig. 9)。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、NG 群の 1/5 例以外、抗原特異的 IgG1 抗体は検出されなかった (Fig. 10)。

D. 考察

(1) アスタキサンチン発現レタスのタンパク質発現差異解析

レタスは外側の葉と内側の葉でタンパク質組成が大きく異なることから、遺伝子組換えレタスの安全性評価にはサンプリングに注意する必要があると考えられた。また、アレルギー LTP はレタス中の含量が少なく、粗タンパク質抽出後、CM による精製が必要であると考えられた。

2D-DIGE 解析の結果より、アスタキサンチン発現レタスでは非組換えレタスに比べ、タンパク質レベルでの大きな発現変動は無いと考えられた。

(2) 低アレルギー (主要アレルギー RA14-17 ノックダウン) イネの作出

T1 系統のアレルギーウェスタンブロット解析結果から、導入した遺伝子が優性に機能していること、また、これがメンデルの法則に従って遺伝していることが示唆された。T3 種子の検定により、12 粒のすべてにおいて低アレルギータンパク質の形質を示した系統が現れたことから、これは遺伝的にホモ接合体であると推定された。

(3) 低アレルギー米のタンパク質発現差異解析

2D-DIGE 解析により、日本晴と比較して減少が明らかとなった Allergenic protein, RAG2 はノックダウンのターゲットタンパク質であり、意図した影響であると言える。一方、Glutelin の増加は非意図的なものであり、プロテオミクスによる網羅的解析の有用性が示された。非意図的に増加した Glutelin は毒性およびアレルギー性が知られているものではなく、安全性に影響を与えるものではないと考えられた。

(4) 動物モデルを用いるアスタキサンチンレタスのアレルギー性の解析

本モデルを用いて、アスタキサンチン遺伝子導入レタスの食物アレルギー性を非組換えレタスと比較評価した。アスタキサンチン遺伝子導入レタスは 1 g あたり 2.4~3.0 mg、非組換えレタスは 1 g あたり 1.1~1.4 mg の蛋白質がそれぞれ抽出された。非組換えレタスよりやや抽出される蛋白質量は多かったものの、非組換えレタスあるいはアスタキサンチン遺伝子導入レタスの抽出蛋白質で感作されたマウスのアナフィラキシー症状のスコアに有意な差は認められなかった。抗原特異的 IgG1 抗体価は両群ともほとんど検出されなかったことから、アスタキサンチン遺伝子導入レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。

E. 結論

(1) アスタキサンチン発現レタスのタンパク質発現差異解析

2D-DIGE 法を用いた発現差異解析の結果、アスタキサンチン発現レタス中のタンパク質はすべて、非組換え対照との発現差が 2 倍以内であった。レタスアレルギー LTP の定量には可溶性タンパク質を抽出後、さらに CM による精製が必要であると考えられた。

(2) 低アレルギー (主要アレルギー RA14-17 ノックダウン) イネの作出

3 系統の 14-17 kDa 低アレルギーイネホモ接合体系統を確立した。

(3) 低アレルゲン米のタンパク質発現差異解析

2D-DIGE 法を用いた発現差異解析の結果、ターゲットタンパク質である Allergenic protein および RAG2 の発現減少および、非ターゲットの Glutelin の発現増加が明らかとなった。

(4) 動物モデルを用いるアスタキサンチンレタスのアレルギー性の解析

新規に開発される食品の安全性確保において、食物アレルゲン性を評価することは重要課題である。マウスの食物アレルギーモデルを用いて、アスタキサンチン遺伝子導入レタスの食物アレルゲン性を評価したところ、アスタキサンチン遺伝子導入レタスの食物アレルギー性は非組換えレタスと同様に低いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 中村里香, 中村亮介, 小関良弘, 手島玲子: 塩ストレス耐性遺伝子組換えイネ種子のアレルゲンおよびプロテオーム解析 第18回日本食品化学学会総会・学術大会 (2012. 6)

2) Reiko Teshima, Rika Nakamura, Kazumi Kitta, Rie Satoh, Gang-hua Lang, Kathleen Schegg, Ken Blumenthal, Leslie Hicks, David Rouquié, Rod A. Herman, Corinne Herouet-Guicheney, Greg Ladics, Scott McClain, Lars K. Poulsen, Laura Privalle, Jason M. Ward, Nancy Doerrer and Jean-Baptiste Rasclé: "Inter-laboratory optimization of two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) of rice seed allergens in non-transgenic rice varieties" European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2012 (2012. 6)

3) 中村里香, 中村亮介, 小関良弘, 手島玲子: ストレス耐性遺伝子を導入した遺伝子組換えイネ種子のアレルゲン性評価 第132回日本薬学会年会 (2012. 3)

4) 手島玲子: コメ品種間のアレルゲン発現変動のアレルゲノーム解析 日本プロテオーム学会 (2012.7)

2. 論文発表

1) Shindo T, Kanazawa Y, Saito Y, Kojima K, Ohsawa M, Teshima R. Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate. *J Toxicol Sci.*, 37(2), 307-315, 2012

2) Nakamura R., Teshima R.: Proteomics-based allergen analysis in plants. *J. Proteomics* 2003 (in press)

3) Nakamura R., Teshima R.: Immunoproteomic analysis of food allergens. *Plant Proteomics- Methods and Protocols, Second Edition* (in press)

4) 佐藤里絵, 中村里香, 手島玲子: ソバに含まれる IgE 結合タンパク質の解析, *FFI Journal* 218(1), 36-42 (2013)

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

Table 1 RA-KD米で2倍以上の発現変動がみられたスポットのMALDI-TOF MS/MS相同性検索結果

	Master No.	Av. Ratio	Appearance	T-test	Protein Hits	
RA-KD > 日本晴	340	5.69	24/27	5.40E-13	N.A.	
	336	3.6	27/27	1.50E-10	Glutelin	
	343	2.66	27/27	5.90E-11	Glutelin	
	344	2.38	24/27	8.60E-08	Glutelin	
	790	2.26	27/27	4.00E-15	Os05g0468800	
	348	2.07	24/27	1.70E-08	Glutelin	
	967	2.05	27/27	4.40E-16	N.A.	
	304	2.03	24/27	1.60E-09	Glycogen (starch) synthase	
	345	2.03	18/27	1.80E-06	Glutelin	
	1424	2.02	27/27	8.10E-09	N.A.	
	416	2.01	27/27	1.40E-09	N.A.	
	日本晴 > RA-KD	1201	-2.01	21/27	2.00E-07	Os07g0214300 (RAG2)
		1232	-2.18	27/27	0.00013	N.A.
1205		-2.65	27/27	3.00E-09	Os07g0214300 (RAG2)	
1186		-3.23	21/27	1.20E-06	Os07g0214300 (RAG2)	
1202		-3.28	27/27	4.50E-12	Allergenic protein	
1193		-3.61	24/27	2.30E-09	Allergenic protein	
1190		-4.02	21/27	2.80E-10	Os07g0214300 (RAG2)	
1184		-7.08	24/27	6.10E-12	Os07g0214300 (RAG2)	
1185		-8.49	24/27	5.40E-12	Os07g0214300 (RAG2)	

*N.A., not assigned

Table 2 つづき

21	Tri a ? (alpha gliadin)	1	10 VRVVPVQLQP	Pepsan	Linear	PMD 21771117	P04725
	Tri a ? (alpha gliadin)	19	28 QEQVPLVQQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	27	36 QQQFPQGGQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	55	64 YLQLQPPFPQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	118	127 QLLQQLQQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	165	174 LQIPEQSQSQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	192	201 QEQKQQLQQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	224	233 SFQQPQQQYP	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (alpha gliadin)	265	274 LALQTLPAMC	Pepsan	Linear		
Tri a ? (alpha gliadin)	277	286 YIPPHCSTTI	Pepsan	Linear			
22	Tri a ? (omega-2 gliadin)	5	14 NPSNKELQSP	Pepsan	Linear	PMD 21771117	Q9FUW7
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	13	22 SPQQSFSYQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	43	52 SQQPFPTPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	47	56 FPTPQQQFPE	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	51	60 QQQFPEQSQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	71	80 IQPQQPFPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	99	108 PQQPFPQTQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	107	116 QQSFPLQPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	135	144 QQSEQIPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	143	152 QQLQPPFLQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	151	160 LQPQQPFPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	161	170 PQQPFPQPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	169	178 QQPPIPVPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	199	208 PELQQPIPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	207	216 QQPQQPFPQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (omega-2 gliadin)	215	224 LQPQQPFPQQ	Pepsan	Linear		
	23	Tri a 19 (omega-5 gliadin)	18	27 FPQQQFFPQQ	Pepsan		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		26	35 QPQQFFPQQI	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		30	39 FPQQQIPQQH	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		42	51 PQQPQQFFPQQ	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		46	55 QQFPQQQQL	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		56	64 QQQQIPQQQI	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		75	84 QPQQLPQQQF	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		100	109 PQQQFPQQQF	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		120	129 PQQQFPQQQ	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		148	157 QQFPQQQFPQ	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		152	161 QQQQFPQQQS	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		156	165 FPQQQSPQQQ	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		166	175 QFPQQQFPQQ	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		170	179 QQFPQQQLP	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		174	183 QQQQLPQQQF	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		184	193 PQQQIPQQQI	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		186	195 PQQIPQQQI	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		198	207 PQQQFPQQQF	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		208	217 PQQQFPQQQ	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)		230	239 HQQQLPQQQF	Pepsan	Linear		
Tri a 19 (omega-5 gliadin)	268	277 RPQQSPEQQQ	Pepsan	Linear			
Tri a 19 (omega-5 gliadin)	274	283 EQQQFPQQQF	Pepsan	Linear			
Tri a 19 (omega-5 gliadin)	310	319 PYQQYPQQQP	Pepsan	Linear			
24	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	37	46 HQQQPIQQQP	Pepsan	Linear	PMD 21771117	Q9ZNY0
	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	39	48 QQPIQQPQQP	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	47	56 QQFPQQPQCS	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	211	220 PFVHPSILQQ	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	231	240 QCSPVAMPQS	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	263	272 LPQIPQQRSY	Pepsan	Linear		
	Tri a ? (LMW-glutenin subunit)	269	278 QSRYEAIRAI	Pepsan	Linear		
25	Tri a 14 (LTP1)	24	33 GQCCDGVKNL	Pepsan	Linear	PMD 21771117	P24296
	Tri a 14 (LTP1)	37	46 QARSQSDRQS	Pepsan	Linear		
	Tri a 14 (LTP1)	81	90 ISLNIDCSR	Pepsan	Linear		
26	Ric c 1	167	181 QEQQLRQCQEYIK	Dot-blot	Linear	PMD 18262682	P01089
	Ric c 1	215	229 EGLRQAIEQQSQGQ	Dot-blot	Linear		
27	Ric c 3	36	50 ESKGEREGSSSQCR	Dot-blot	Linear	PMD 18262682	P01089
	Ric c 3	51	70 QEVQRKDLSSCERYLRQSSS	Dot-blot	Linear		
	Ric c 3	106	125 DECQCEAIKYAEDQIQGGQ	Dot-blot	Linear		
	Ric c 3	126	140 LHGEESERVAQRAGE	Dot-blot	Linear		
28	Ric c 1	167	180 QEQQLRQCQEYIK ¹⁴	Dot-blot	Linear	PMD 21738671	P01089
	Ric c 1	215	229 EGLRQAIEQQSQGQ ¹⁴	Dot-blot	Linear		
29	Ric c 3	36	50 ESKGEREGSSSQCR ¹⁴	Dot-blot	Linear	PMD 21738671	P01089
	Ric c 3	51	65 QEVQRKDLSSCERYL ¹⁴	Dot-blot	Linear		
	Ric c 3	106	120 DECQCEAIKYAEDQ ¹⁴	Dot-blot	Linear		
	Ric c 3	126	140 LHGEESERVAQRAGE ¹⁴	Dot-blot	Linear		

Table 2 つづき

30	Car i 4 (4.0101)	28	39 GRQHKHFGQCQL	Dot-blot	Linear	PMID 21718052 EU113051
	Car i 4	88	99 PHYSNAPQLVYI	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	118	129 EESQRQSQQQQR ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	121	132 QRQSQQQRRREF ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	124	135 SQQGQRREFQQD	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	127	138 GQRREFQQDRHQ	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	130	141 REFQDRHQKIR	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	133	144 QQDRHQKIRHFR	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	202	213 QGQQEYEQHRRQ	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	205	216 QEYEQHRRQQQH	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	208	219 EQHRRQQQHQQR ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	232	243 NNVFSGFDAEFL	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	235	246 FSGFDAEFLADA	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	238	249 FDAEFLADAFNV ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	304	315 ERRQSRGGRRDD	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	382	393 LNAHSVYALRG	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	385	396 HSVYALRGRAE	Dot-blot	Linear	
Car i 4	421	432 PQNFAVVKRARD	Dot-blot	Linear		
Car i 4	424	435 FAVVKRARDEGF	Dot-blot	Linear		
31	Car i 4	28	39 GRQHKHFGQCQL	Dot-blot	Linear	PMID 21718052 EU113052
	Car i 4	88	99 PHYSNAPQLVYI	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	118	129 EESQRQSQQQQR ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	121	132 QRQSQQQRRREF ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	124	135 SQQGQRREFQQD	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	127	138 GQRREFQQDRHQ	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	130	141 REFQDRHQKIR	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	133	144 QQDRHQKIRHFR	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	202	213 QGQQEYEQHRRQ	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	205	216 QEYEQHRRQQQH	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	208	219 EQHRRQQQHQQR ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	232	243 NNVFSGFDAEFL	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	235	246 FSGFDAEFLADA	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	238	249 FDAEFLADAFNV ⁵	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	304	315 ERRQSRGGRRDD	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	382	393 LNAHSVYALRG	Dot-blot	Linear	
	Car i 4	385	396 HSVYALRGRAE	Dot-blot	Linear	
32	Cur l ? (alcohol dehydrogenase)	1	9 MSNIPQEQW	ELISA	Linear	PMID 21647452 ABC88428
	Cur l ? (alcohol dehydrogenase)	14	34 EKTGGPVEYKKIPVQKPGPDE	ELISA	Linear	
	Cur l ? (alcohol dehydrogenase)	51	68 AVNGDWPLPTKPLVGGH	ELISA	Linear	
	Cur l ? (alcohol dehydrogenase)	164	184 LKESGVKPGQFAAMGAGGGL	ELISA	Linear	
33	Der p 1	141	155 TESAYLAYRNQSLDL	SPOTs	Linear	PMID 21764690 P08176
	Der p 1	183	197 HNGVVQESYRYVAR ⁶	SPOTs	Linear	
	Der p 1	190	204 SYRYVAREQSCRRP	SPOTs	Linear	
	Der p 1	204	218 PNAQRFGISNYCQY ⁶	SPOTs	Linear	
	Der p 1	211	225 ISNYCQYPPNVNKI	SPOTs	Linear	
	Der p 1	218	232 YPPNVNKIREALAQT	SPOTs	Linear	
	Der p 1	246	260 DAFRHYDGRITQRD	SPOTs	Linear	
	Der p 1	267	281 YHAVNVGYSNAQGV	SPOTs	Linear	
	Der p 1	274	288 GYSNAQGVYVWVRN	SPOTs	Linear	
	Der p 1	281	295 VDYWVRNSWDTNWG	SPOTs	Linear	
	Der p 1	288	302 NSWDTNWGDNGYGYF ⁶	SPOTs	Linear	
	Der p 1	295	309 GDNGYGYFAANIDLM	SPOTs	Linear	

¹ Major epitope² Amino acids shown in red are essential for IgE binding³ Asp176 is critical for IgE binding⁴ IgE binding was blocked with an addition of glutamic acid⁵ Strongly reacted⁶ Strong IgE-binding epitope

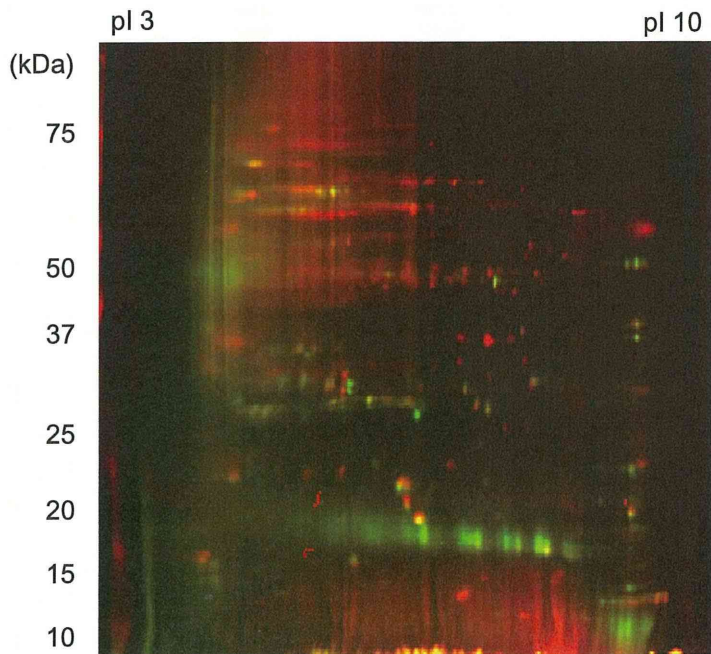


Fig. 1 市販レタス葉 (外側。内側) のタンパク質2次元パターン

10-20% acrylamide gel (D.R.C)
25 µg protein/ sample
Green: 外側葉 Red: 内側葉

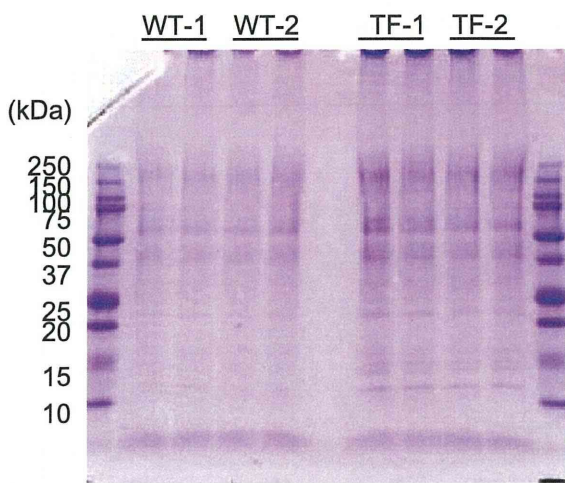


Fig. 2 NTレタスとTFレタスの電気泳動パターンの比較

10-20% acrylamide gel (D.R.C)
5 µg protein/ sample

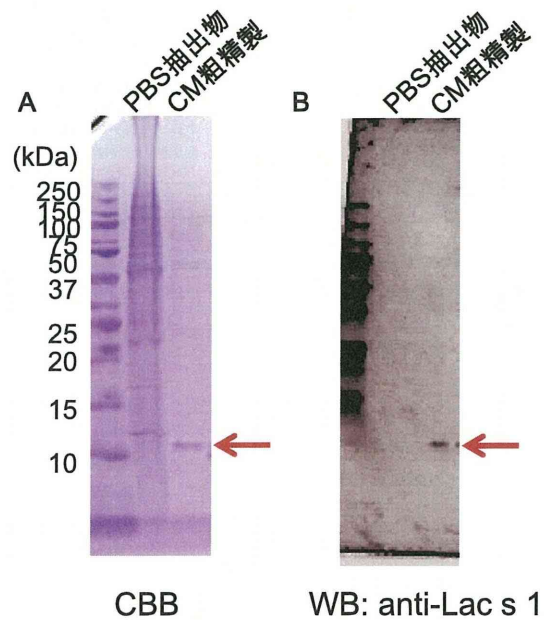


Fig. 3 LTP (Lac s 1)抗体を用いたウェスタンプロット

10-20% acrylamide gel (D.R.C)
5 µg protein/ sample
矢印はLTPの分子量を示す。

A. CBB染色像、B. WB: anti-Lac s 1

RA14.gnu	1	ATGGCTTCCAACAAGGTAGTGTCTCTGGCGTTGCTCCTATCATTCGTCTCCGTGCTCGGC	60
RA5.gnu	1	ATGGCTTCCAACAAGGTAGTGTCTCTACTGTTGCTTCTCCCGTCTCCGTGCTCGCG	60
RA16.gnu	1	ATGGCTTCCAACAAGGTAGTGTATCTCGGCGTTGCTCTCTCGTCTCTCTCCGTGCTCGCA	60
RA17.gnu	1	ATGGCTTCCAACAAGGTAGTGTCTCTCGGTATGCTCCTCTCGTCTCTCTCCGTGCTCGCG	60
AK107215.gnu	1	ATGGCTTTCATCAAGGTAGTGTCTCTCGGTGTTGCTCCCGGTAGTTGTCTCCATGCTCGTG	60
RA14.gnu	61	GCGACGA---CGCGCATGGCGGA---CCACCACAAGACAGGTGGTGTACAGCCTCGGC	114
RA5.gnu	61	GCGACGS---CGACCATGGCGGAGTACCACCACAAGACAGGTGGTCTACACCGCGGC	116
RA16.gnu	61	GCAACGA---CGACCAATGGCGGA---CCACCACAAGAACAGGTGGTCTACACTCCCGGC	114
RA17.gnu	61	GCGGCGATGGCGACCATGGCGGA---CCACCACAAGT-----TACAGCCCCGGT	108
AK107215.gnu	61	GCAACGA---CGACCAATGGCGGA-----TCACCGTGGCCAGGTGGTTATATACCCCGGG	111
RA14.gnu	115	GAGCGTGTGTCAGCCAGGAATGGGCTACCCGATGTACTCGGTGCCACCTGCGGGGCGTG	174
RA5.gnu	117	CCGTT--CTCAGCCAGGAATGGGCTACCCGATGTACTCGTCCCGCCTGCGGGGCGTTG	174
RA16.gnu	115	CAGGTATGTGTCAGCCAGGAATCGGCTACCCGACGTACTCGGTGGCGCATGCGGGGCGTTG	174
RA17.gnu	109	GAGCAATGTGCGCCAGGAATAAGCTATCCGACATACTACTCCCGGCFATGTCGAACATG	168
AK107215.gnu	112	CAGGTATGCGCTGCGGACGGGCTACCCGATGTACTCGGTGCCACCTGCGGGGCGCTG	171
RA14.gnu	175	GTGAAGCGCCAGTGCCTGGGACCCCGCAGCCCGGCGCGTGGACGAGCAACTCGCGCAG	234
RA5.gnu	175	GTGAAGCGCCAGTGCCTGTGG-----GAGCGCGCGCGCCGCGGAGAGTCCCGCGGA	225
RA16.gnu	175	GTGAAGCGCCAGTGCCTGCC-----CCCGGCAAGTGGACGAGCAAGTCCGGGCA	225
RA17.gnu	169	GTGAGCGCGCAATGCGTGG---CCGTGGCGCAGGCGCGGACGAGCAAGTCTGGCAA	225
AK107215.gnu	172	GCAAGCGCCAGTGCCTCGG---CGGTGCGGTG-----GACGAGCAACTCCGGCA	219
RA14.gnu	235	GACTGTGTCGGCGAGCTCGCCCGGGTCGACGACAGCTGGTGCAGGTGCTCGGCGCTCAAC	294
RA5.gnu	226	GACTGTGTCGGCGAGCTCGCCCGCGTTCGACGACAGCTGGTGCAGGTGCGAGGCAATCAGC	285
RA16.gnu	226	GCTGTGTCGGCGAGCTCGCCCGGCGATCGACAGCAGCTGGTGCAGGTGCGATGGGCTCAAC	285
RA17.gnu	226	GACTGTGTCGGCGAGCTCGCCCGCGTTCGACGACGGCTGGTGCAGGTGCGGGGCGCTCGAT	285
AK107215.gnu	220	GACTGTGTCGGCGAGCTCGCCCGCAATCGACGACAGCTCTGTAGGTGCGCCGCGCTGAGC	279
RA14.gnu	295	CACATGCTTGGAGGCATCTACAGGGAGCTCGGCGCCACCGATGTTGGGCACCCCATGGCC	354
RA5.gnu	286	CACATGCTGGGAGGCATCTACAGGGAGCTCGGCGCCCCGATGTCGGGCACCCCATGTTCC	345
RA16.gnu	286	CACATGCTGAGGATCATCTACAGGGAGGAGCGCGCGCGGACGCTGGGCACCCCATGGCC	345
RA17.gnu	286	CACATGCTGTCAAGCATCTACAGGGAGCTCGGCGCCACCGAGGCCGGGCACCCCATGGCC	345
AK107215.gnu	280	CACATGTTGTTGGAATGTACAAGGAGCTCGGTGCACCCGCTAAAAGGCAACCCATGGAC	339
RA14.gnu	355	GAGGTGTTCCCGGGCTGCCGGAGAGGGGACTTGGAGCGCGGGCGGGGAGCCTCCCGGGC	414
RA5.gnu	346	GAGGTGTTCCCGGGCTGCCGGAGAGGGGACTTGGAGCGCGGGCGGGGAGCCTCCCGGGC	405
RA16.gnu	346	GAGGTGTTCCCGGGCTGCCGGAGAGGGGACTCAGAGCGCGGGCGGGGAGCCTCCCGGGC	405
RA17.gnu	346	GAGGTGTTCCCGGGCTGCCGGAGAGGGGACTTGGAGCGCGGGCGGGGAGCCTCCCGGGC	405
AK107215.gnu	340	GAGGTGTTCCCTGGCTGCCGGAGAGGCGACATGAAAGCGTTGGCGGGGAGCCTCCCGGGC	399
RA14.gnu	415	TTCTGCAACGTGGACATCCCCAATGGGACAGGTGGTGTCTGCTACTGGCTAGGTTATCCT	474
RA5.gnu	406	TTCTGCAACGTGGACATCCCCAACTGGCGGAGGTGGTGTCTGCTACTGGCTGGCGAGATCT	465
RA16.gnu	406	TTCTGCAACGTGGACATCCCCAATGGCGTAGGCGGTGTCTGCTACTGGCTACCGGGAAC	465
RA17.gnu	406	TTCTGCAACGTGGACATCCCCAATGGCCCTGGTGGTGTCTGCTACTGGCTGGGTATCCT	465
AK107215.gnu	400	TTTGTGCAATGTAGACATCCCCATGGCATTGGTGGTGTCTGCTACTGGCTGAGTTATCCT	459
RA14.gnu	475	AGGACCCCGAGAACTGGTCACTAG-----	498
RA5.gnu	466	GGCTACTAG-----	474
RA16.gnu	466	GGCTACTAG-----	474
RA17.gnu	466	AGGACCCCAAGAACCAGTCACTAGGCTACTATAG	499
AK107215.gnu	460	ATGAAACCCCGGACTGGCCACTAA-----	483

RNAiに
用いた
配列

Fig. 4 14-16 kDaアレルゲンタンパク質遺伝子の塩基配列

赤線で囲んだ5つの遺伝子配列に共通する配列をRNAiに用いた。

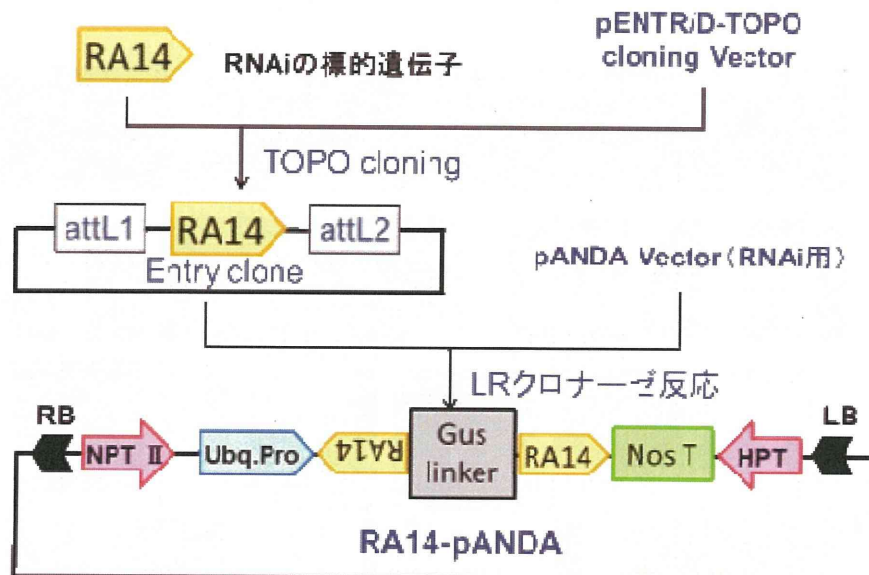


Fig. 5 RA14-17アレルゲンタンパク質に対するRNAi遺伝子

PCRで増幅した標的領域をEntry vectorに導入した。これをpANDA vectorに導入して、14 kDaアレルゲンタンパク質遺伝子に対するRNAi遺伝子“RA14-pANDA”を構築した。

RA 14: Rice allergen 14 kDa
 attL 1 & attL 2: LR clonase recombination sites
 Ubq. pro: Ubiquitin promoter
 Gus linker: Fus gene (AJ298139)の875-1823 bpの領域断片
 Nos T: Nos terminator,
 HPT: Hygromycin resistance gene
 NPT II: Neomycin resistance gene
 RB: Right border, LB: Left border



Fig.6 14-17アレルゲンタンパク質に対するRNAi系統

RA14-pANDA: 14-17 kDaアレルゲンタンパク質を減少させた形質転換体
 A. 形質転換体の植物体の形態
 B. 形質転換体の種子の形態
 C. RA-pANDAとWTの電気泳動像と抗RA14 kDa抗体を用いたWestern blot

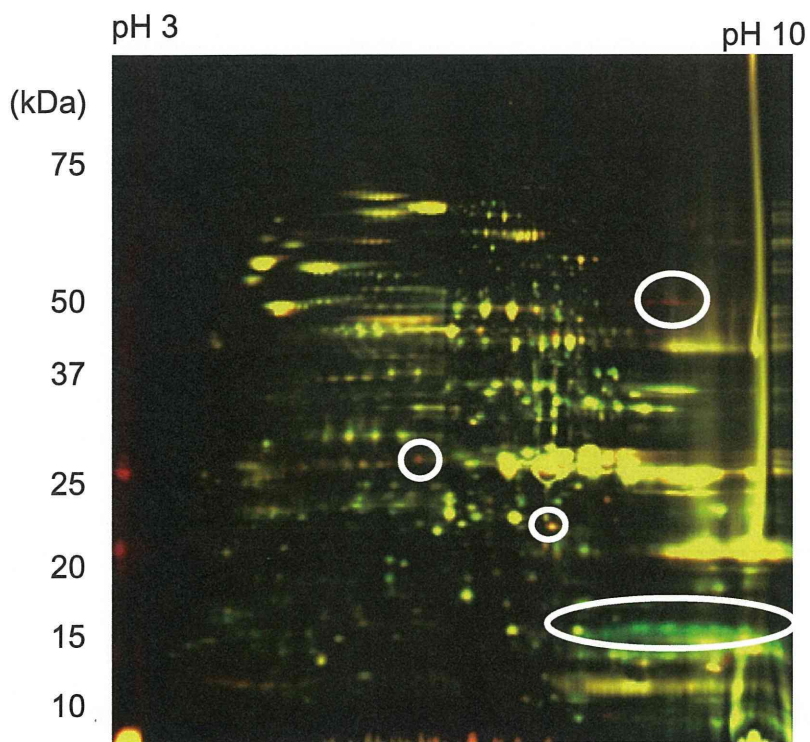


Fig. 7 日本晴とRA-KD米のタンパク質2次元パターン

10-20% acrylamide gel (D.R.C)
 25 µg protein/ sample
 Green: 日本晴 Red: RA-KD米

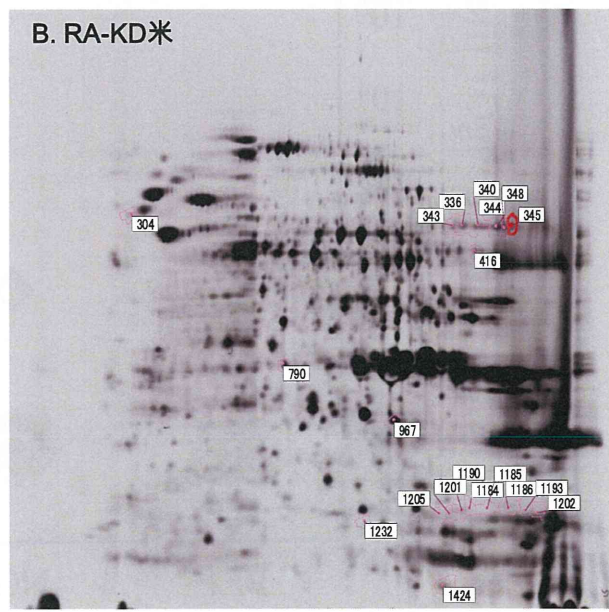
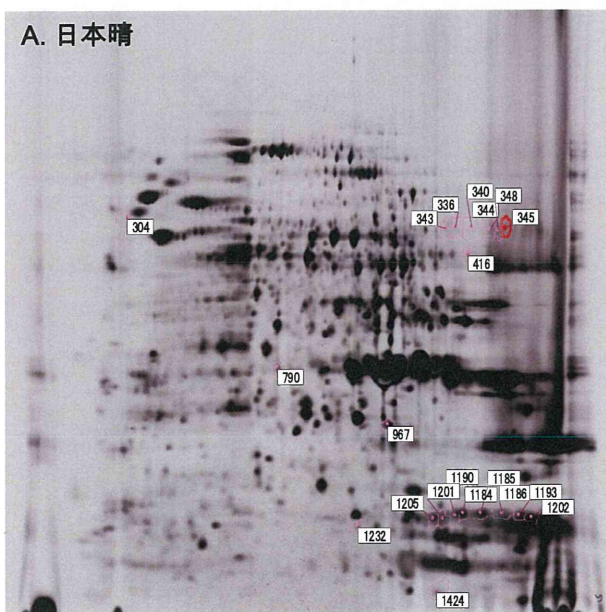


Fig. 8 RA-KD米の2D-DIGE解析結果

赤丸で示したスポットは、日本晴と比較して2倍以上の発現差異がみられたスポットを示す。スポットの番号はTable 1と対応している。

A. 日本晴、B. RA-KD米

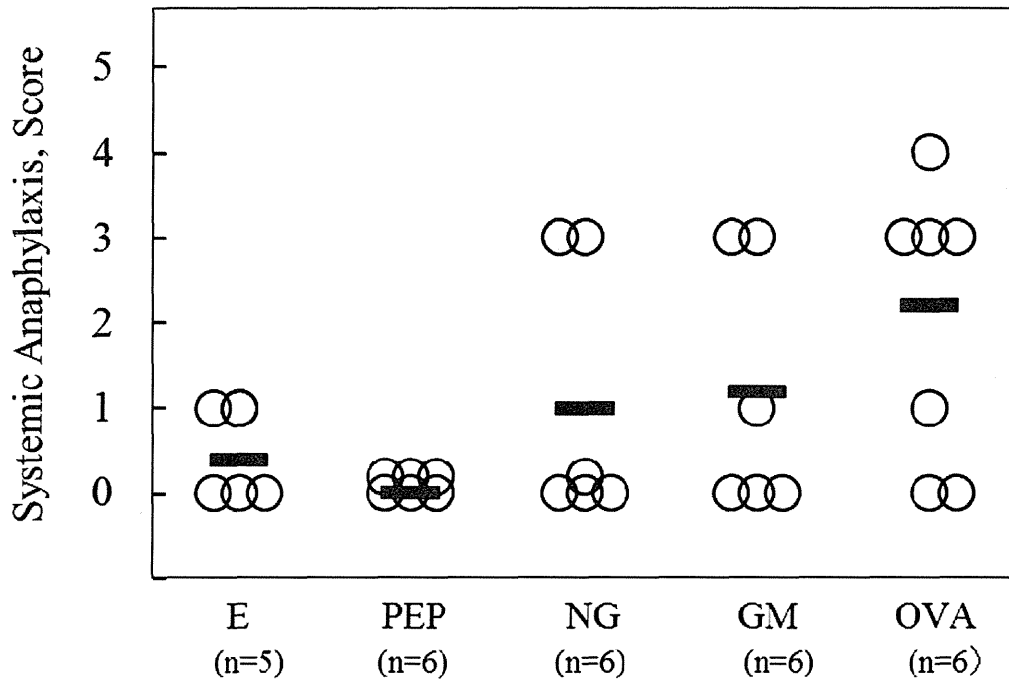


Fig.9 Antigen-induced systemic anaphylactic scores at the 2nd challenge

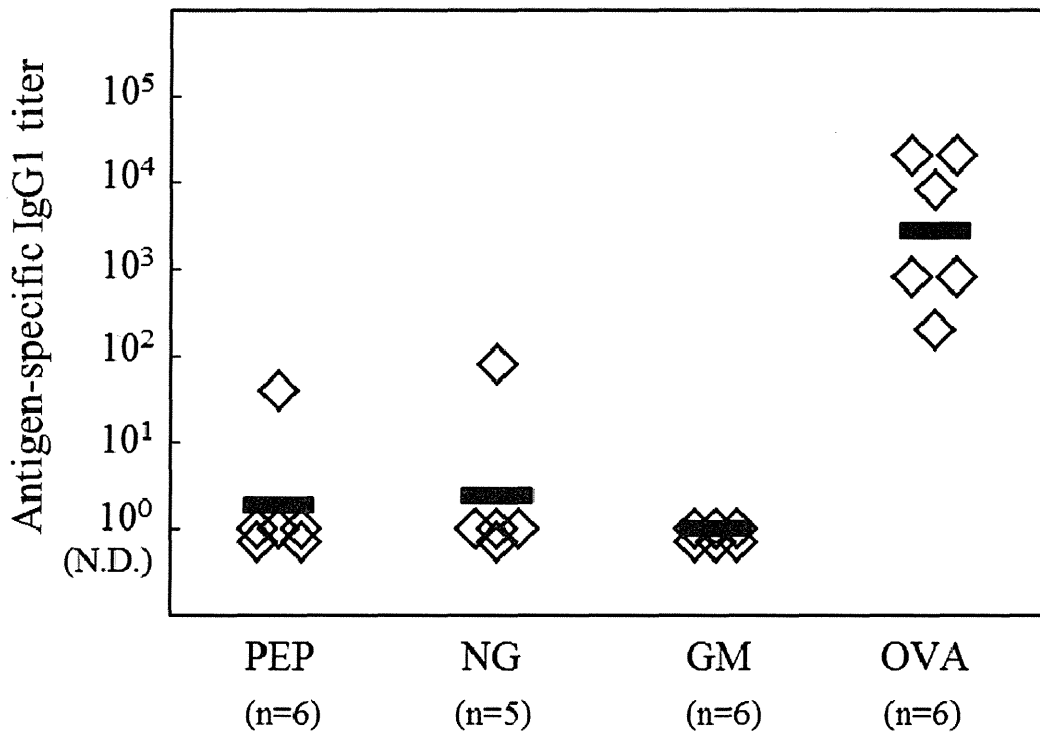


Fig.10 A comparison of the serum level of Antigen-specific IgG1 Antibody

組換え生物の検知技術の開発

研究分担者 近藤 一成 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨:

1. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発 近年、インドやバングラディッシュで害虫抵抗性を獲得させた商業栽培用の遺伝子組換え(GM)ヒヨコマメが開発されている。我が国では、GMヒヨコマメは安全性未承認であるため、今後、GMヒヨコマメの食品への混入に関し監視が必要となる。そこで、ヒヨコマメの陽性対照試験としてヒヨコマメに特異的な内在性遺伝子の検知法が必要であるため、本研究では、ヒヨコマメに特異的に染色体上に1コピーのみ存在する遺伝子のクローニングを試みた。**2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討** 定性リアルタイムPCRを用いたGMコメの食品への混入に関する検査は、様々な原材料から構成された加工度の高いコメ加工食品を対象としている。そのため、検査系が正しく機能していることを評価するための陽性対照コントロールには、高い検出感度が得られかつ特異性に優れたコメの内在性遺伝子配列を見出す必要がある。そこで、本研究では、4種のコメ内在性遺伝子配列を標的に構築した定性リアルタイムPCR用プライマー・プローブセットを用い、コメ内在性遺伝子の検出感度、特異性及び増幅効率について比較検討した。**3. リアルタイムPCRを用いたGM作物スクリーニング検査法の開発** 現在、作物の形質転換時に導入されたベクターの構造配列またはゲノムとの境界領域配列を検出する規定のPCR法を用いてGM作物の食品への混入に関する検査が実施されている。しかし、世界では様々なGM作物の開発が進められており、未承認GM作物の食品への意図しない混入を網羅的に検出可能な方法が必要とされている。未知のGM作物の混入を効率的に検知するためには、試験対象とするGM作物を特定せず一度に幅広く検知するスクリーニング技術が必要となる。本研究では、食品に混入したGM作物のスクリーニング法の開発を行った。**4. バスマティ米へのGMコメ混入に関する実態調査** 欧州食品・飼料緊急警告システム(RASFF)は、2012年にパキスタンやインドから欧州連合(EU)へ輸出されたバスマティ米にカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(P35S)及びノパリンシンターゼターミネーター(tNos)を有する形質転換用ベクターの構造配列が導入された害虫抵抗性GMコメの混入を確認し報告した。そこで、リアルタイムPCRを使用し我が国に輸入されたパキスタン及びインド産バスマティ米のGMコメ混入スクリーニング検査を行った。

協力研究者

中村 公亮 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部

A. 研究目的

現在、第3世代を含めた遺伝子組換え(GM)食品の多様化が進んでおり、導入される遺伝子、それを制御するプロモーターやターミネーターもさまざまである。食品の安全性確保のために、多様なGM作物の食品への混入防止のための検査法開発が不可欠である。そこで本研究では、第3世代を含めたGM食品の流通阻止を監視するシステムの確立と、それらの検知技術の高度化及び新規検知技術の導入を検討した。

B. 研究方法

1. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

1. 試料

非GMヒヨコマメは独立行政法人 農業生物資源研究所から購入した品種T-87-2(配布番号: JP97097, インド産, 種皮: 黄白)を用いた。遺伝子配列の特異性試験には、マメ科植物5種(ササゲ, スタイロ, エンドウ, インゲン, ラッカセイ), その他作物18種(ダイズ, トウモロコシ, イネ, オオムギ, カラスムギ, コムギ, ナタネ, コマツナ, テンサイ, アマ, ジャガイモ, トマト, ナス, ピーマン, ワタ, パパイア, ピーチ, パッションフルーツ)のゲノムDNAを供した。

2. PCR用プライマー対

ヒヨコマメ由来9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (CaNCED)の遺伝子配列の解析には以下のプライマー対を使用した。

・CaNCED中心部分配列

DP1,5'A: (sense)

5'-GCCGGTCACCACTTCTTCGACG-3'

DP2,5': (anti-sense)

5'-CACTCTTCAAACCTCTCGTCGCATTC-3'

・CaNCED 5'側部分配列

CP-F1: (sense)

5'-CTTCAAACACATGGATCAACACCA-3'

CP-F2: (sense)

5'-ACAACAACAACCTTAATCCCCAC-3'

CP-R1: (antisense)

5'-AGCGGCAAGAGTAACTAACGG-3'

・CaNCED 3'側部分配列

CP-F3: (sense)

5'-CTTGTATGACACCTGCAGATTCC-3'

CP-R2: (antisense)

5'-GAAAGTTCCATGGAACCCATAAGG-3'

CP-R3: (antisense)

5'-ACTGTGCTGAAACATAAGTTTAC-3'

・CaNCED ORF配列

CaND-F: (sense)

5'-CTCCACTCCCCTCAACTTTCC-3'

CaND-R: (antisense)

5'-GACATATCTGCAACCATCCCTC-3'

3. PCR

PCR反応液は、25 μ L/wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。2 \times PCR buffer 12.5 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs (2 mM) 5 μ L, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50 μ mol/L) 各0.25 μ Lを混合し, DNA試料液 (10 ng/ μ L) 5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ Lに調製した。反応条件は, 95 $^{\circ}$ Cで5分間加温し, その後, 95 $^{\circ}$ C 30秒, 55 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして, 40サイクルの増幅反応を行った。その後, 72 $^{\circ}$ C 5分保温した。

4. ゲノムウォーキング解析

Straight Walk[®] Kit (BEX CO., LTD) を用いてCaNCEDのゲノムウォーキング解析を行った。まず, CaNCEDの既知塩基配列に認識配列を含まない制限酵素Spe I とXba I を使用し, ヒヨコマメの

ゲノムDNAを分解した。Spe I 処理の場合, DNA 300 ng, 10 \times NE buffer 1 μ L, 100 \times BSA 0.1 μ L, Spe I (New England Biolabs) 1 μ Lを混合し, MiliQ水で10 μ Lに調整した。Xba I 処理の場合, 10 \times M buffer 1 μ L, 0.1% (w/v) BSA 1 μ L, Xba I (Takara) 1 μ Lを混合し, MilliQ水で10 μ Lに調整した。それらを37 $^{\circ}$ C, 1時間保温した。制限酵素処理後, 反応液10 μ Lに, Klenow enzyme (5U) 1 μ L, dCTP (1 mM) 1 μ Lを加え, 25 $^{\circ}$ C, 15分反応後, 次いで75 $^{\circ}$ C, 20分処理し, 一塩基伸長反応を行った。次に, 反応液12 μ Lに対し, アダプターRWA-2プライマー(10 μ M) 2 μ L, Ligation high(TOYOBO) 1 μ Lを加え, 16 $^{\circ}$ C, 16時間アダプター結合反応を行った。次いで, CaNCED未知領域を増幅するため, nested PCR反応を行った。PCR反応液は50 μ L/wellに調製した。その組成は以下の通りである。1回目のPCR反応液は, 2 \times PCR buffer 25 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs(2 mM) 5 μ L, 既知配列用外側プライマー (SW2又はSW3, 50 μ mol/L) 0.2 μ L, アダプター配列用プライマー

(WP-1:5'-CGCAGGCTGGCAGTCTCTTTAG-3') 溶液 (50 μ mol/L) 1 μ Lを混合し, 鋳型DNA溶液 (10 ng/ μ L) 1 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量 50 μ Lに調製した。2回目のPCR反応液は, 2 \times PCR buffer 25 μ L, KOD FX (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs(2 mM) 5 μ L, 既知配列用内側プライマー (SW1またはSW2, 50 μ mol/L) 0.2 μ L, アダプター配列用プライマー (WP-2:5'-ATGCGGCCGCTCTCTTTAGGGTTAC ACGATTGCTT-3') 溶液 (50 μ mol/L) 1 μ Lを混合し, 1回目の反応液を10倍希釈した鋳型DNA溶液 (10 ng/ μ L) 1 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量 50 μ Lに調製した。反応条件は, 94 $^{\circ}$ Cで2分間加温し, その後, 94 $^{\circ}$ C 30秒, 65 $^{\circ}$ C 30秒, 68 $^{\circ}$ C 5分を1サイクルとして, 30サイクルの増幅反応を行った。

CaNCED既知配列用プライマーは, 以下の配列のものを使用した。

SW1 : 5'-GGAGTGTTGTTTGGAGTGAGCATG-3'

SW2 :

5'-TGGGTTTTGTTTCGGAAGGTGGTGG-3'

SW3 : 5'-TGTTTCCACGAAGTCTAGGGCGG-3'

5. シークエンス解析

PCR産物は1%(w/v)アガロースゲル (エチジウムブロミド0.1 μ g/mL含有) で電気泳動後, UV照射下で検出した。目的のDNA増幅断片はゲルから切り出し, 精製後, ㈱ファスマックにダイレクト

シークエンス解析を依頼した。得られたシークエンスデータは、GENETYX Ver. 10.0.3を用いて解析を行った。

6. サザンブロット法による遺伝子コピー数の解析

ヒヨコマメからの DNA 精製は、Nucleon PhytoPure (GE Healthcare Life Sciences) を使用した。購入した種子は発芽後、約 1 か月生育させ、幼苗の茎葉を 0.5 g 採取し、液体窒素で凍結させ、乳鉢で粉碎した。粉碎した試料は 15 mL 遠心チューブに入れ、ReagentI 2.4 mL, RNaseA 4 μ L と混合した後、37°C, 30 分間保温した。ReagentII 0.8 mL を加え転倒混和した後、65°C, 10 分間処理し、氷上で 20 分間静置した。次に、冷クロロホルム 2 mL, PhytoPure resin 200 μ L を加え、室温で 10 分間振盪後、2000 \times g, 10 min 遠心した。得られた上清は新しい 15 mL チューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加えて転倒混和し、4000 \times g, 5 分間遠心した。上清は取り除き、得られた沈殿に冷 70% (v/v)エタノール 10 mL を加え 4000 \times g, 5 分間遠心した。上清は取り除き、沈殿を乾燥させた後、水 300 μ L に溶解した。次いで、2000 \times g, 5 分間遠心し、得られた上清は 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の冷 100% (v/v)エタノールを加え、-80°C で 10 分間冷やした後、15,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心した。再び水 300 μ L に溶解し、これを DNA として試験に使用した。得られた DNA は以下の通り *Xba*I で消化した。DNA 10 ng に対し、10 \times NEB buffer 4 20 μ L, 100 \times BSA 2 μ L, *Xba*I (100U/ μ L) 1 μ L, 全量 200 μ L となるよう水を加えた。37°C で一晩処理後、10 U を加え、37°C, 1 時間追加処理し完全消化させた。これらの DNA 溶液は、水 200 μ L を加え、全量を 400 μ L とした後、等量のフェノール/キノリノール溶液を加え、転倒混和し、15,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心した。得られた上清は新しいチューブに移し、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、-80°C で 10 分間冷やした後、5,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心した。上清を捨て、得られた沈殿に冷 70% (v/v)エタノール 1 mL を加え、15,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿を乾燥後、水 10 μ L に溶解し、ゲル電気泳動のサンプルとした。

CaNCED 遺伝子の開始コドン付近 790 bp をサザンブロット検出用プローブとした。検出用プロー

ブの作成は以下の通り行った。ターゲットを増幅させるプライマーセットは、

CaND-F: (sense)

5'-CTCCACTCCCCTCAACTTTCC-3' と

CP-R1: (antisense)

5'-AGCGGCAAGAGTAACTAACGG-3'

を使用した。PCR 反応液は、DNA (10 ng/ μ L) 5 μ L, 各プライマー溶液 (50 μ M) 0.5 μ L, dNTP 5 μ L, 2 \times KOD FX PCR buffer 25 μ L, KOD FX 0.5 μ L, 水 13.5 μ L とした。PCR 反応条件は、まず 95°C で 5 分保温した後、95°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分を 40 サイクル、最後に 72°C 5 分、ついで 4°C で保温した。PCR で得られた産物は、2% (w/v) 低融解アガロースゲルにて電気泳動し、790 bp 付近の断片を含む部分を切り出した。切り出したゲルは、1.5 mL チューブにいれ、buffer QG 300 μ L を加え 55°C, 5 分間保温し、ゲルを融解させた。その溶液にイソプロパノール 100 μ L を加え混合し、チューブにセットしたシリカゲルメンブレンに 12000 rpm, 1 分間遠心負荷した。次に buffer QG 500 μ L, buffer PE 750 μ L を順に 12000 rpm, 1 分間、遠心負荷し、メンブレンを洗浄した。最後に、12000 rpm, 1 分間遠心しメンブレンを乾燥させ、水 50 μ L で DNA を溶出し、プローブ溶液とした。さらに AlkPhos Direct Labeling and Detection system (GE Healthcare Life Sciences) を用いて、プローブの標識を行った。プローブ溶液 (10 ng/ μ L) 10 μ L は 96°C, 5 分間の変性処理後、氷中で急冷した。このサンプルに Reaction buffer 10 μ L を加え混合し、Labeling reagent 2 μ L を加えた。さらに、あらかじめ Cross-linker solution 2 μ L に水 8 μ L を加え希釈しておいた溶液を混合し、37°C, 30 分間保温した。これを氷上で冷やし、サザンブロットに使用する検出用 AP 標識プローブとした。

ゲル電気泳動は以下の通り行った。0.8% (w/v) アガロースゲルを用いて制限酵素処理したヒヨコマメの DNA 溶液及び 1 kb サイズマーカー各 10 μ L, 陽性コントロールとしてプローブ溶液 (10 ng/ μ L) 0.1 μ L を 10 \times ローディングダイと混合し、低電圧 (50V) で泳動した。ローディングダイがゲルの 7 割まで移動したら泳動を終了し、ゲルを EtBr 溶液 (エチジウムブロミド 10 μ g を含む TAE バッファー 100 mL) 中で 30 分間振盪染色した。UV 照射下で泳動バンドの確認をした後、変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で 30 分間振盪、次いで中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH7.2), 10 mM

EDTA)で30分間振盪し、DNAの変性処理を行った。このゲルは1×SSPEトランスファーバッファーを使用して、Hybond-N⁺に毛細管現象を利用し20時間トランスファーさせ、その後80°C、2時間ベーキングを行いDNAをメンブレンに固定化した。ハイブリバックにメンブレンと75°Cに温めておいたハイブリバッファー(0.25 M NaCl)15 mLを入れシールし、75°C、30分間振盪し、プレハイブリを行った。次に、AP標識プローブ24 μL(DNA 75 ng)をハイブリバッファーによく混合し、75°C、3時間振盪した。このメンブレンは、あらかじめ75°Cに温めておいた一次洗浄バッファーで75°C、20分間振盪した。一次洗浄はこれを4回繰り返した。二次洗浄は、二次洗浄バッファーで室温、10分間の振盪を2回繰り返した。最後にCDP-starを添加し、LAS4000mini(GE Healthcare Life Sciences)にて化学発光を検出した。

2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討

1. 試料

コメ陽性対照には、日本晴から精製したDNAを使用した。特異性試験には、13種の作物(トウモロコシ、オオムギ、カラスムギ、コムギ、ダイズ、ヒヨコマメ、ナタネ、コマツナ、テンサイ、アマ、ジャガイモ、ワタ、パンプキン)から精製したDNAを供した。

2. DNA精製

DNA抽出・精製には、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出・精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を使用した改変法を用いた。

ジャガイモ及びパンプキンは可食部をミルサーで均質に細粉碎し、10 gをDNA抽出用試料とした。G2緩衝液30 mL, Cellulase 500 μL, α-amylase(高濃度品)20 μLとRNase A(100 mg/mL)20 μLを加え混合し、50°Cで1時間保温した。次に、Proteinase K(20 mg/mL)200 μLを加え混合し、50°Cで1時間保温した。その他の作物は種子を均質に細粉碎し、0.5 gをDNA抽出用試料とした。G2緩衝液10 mL, Cellulase 167 μL, α-amylase(高濃度品)6.7 μLとRNase A(100 mg/mL)6.7 μLを加え混合し、50°Cで1時間保温した。次に、Proteinase K(20 mg/mL)67 μLを加え混合し、50°Cで1時間保温した。

酵素処理後、その遠沈管を3,000×g、4°C、15分間遠心した。その間、あらかじめ50 mL遠沈管上にQIAGEN Genomic-tip 100/GをセットしQBT緩衝

液3 mLを通して平衡化した。遠心終了後、得られた上清を、平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷した。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/GをQC緩衝液で7.5 mLずつ3回洗浄した後、あらかじめ50°Cに温めておいたQF緩衝液1 mLを負荷し、溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/Gを新しい遠沈管上にセットし、再度50°Cに温めておいたQF緩衝液2 mLを負荷し、DNAを溶出した。DNA溶出液にイソプロピルアルコール2 mLを加えよく混合した。マイクロ遠沈管(1.5 mL容)1本当たり1 mL程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000×g以上で、4°C、15分間遠心した。上清を捨て、70%(v/v)エタノールを1 mLずつ加え10,000×g以上で4°C、5分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を風乾させた後、予め50°Cに温めた滅菌蒸留水50 μLに溶解し、DNA試料原液とした。

3. コメ内在性遺伝子を標的とした定性リアルタイムPCR用プライマー・プローブ

本研究で使用した3種のコメ内在性遺伝子を検出するためのオリゴの塩基配列は以下の通りである。

・ *Phospholipase D* (GenBank accession no.

AB001919)を検出するコメ陽性対照プライマー・

プローブ(PLD)

<PLD1 (バイエル社で開発)>

KVM159 : 5'-TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'

KVM160 : 5'-CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'

TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

<PLD2 (本研究で開発)>

PLD3959F :

5'-GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT-3'

PLD4038R :

5'-CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA-3'

PLD-P : FAM-TGAGTATGAACCTGCAGGTCCG-TAMRA

・ *Sucrose phosphate synthase* (GenBank accession no.

U33175)を検出するコメ陽性対照プライマー・

プローブ(SPS)

<SPS (*J. Agric. Food Chem.* 58, 11543-11547, 2010)

>

Sps-Taq-1F : 5'-TTGCGCCCTGAACGGATAT-3'

Sps-Taq-1R : 5'-CGGTTGATCTTTTCGGGATG-3'

Sps-P : FAM-TCCGAGCCGTCCGTGCGTC-TAMRA

・ Rice Starch branching enzyme 4 (GenBank accession no. EF055878)を検出するコメ陽性対照プライマー・プローブ(RBE4)

<RBE4 (*Eur. Food Res. Technol.*, 234, 981-993, 2012) >

Rbe4rt-F:

5'-GTTTTAGTTGGGTGAAAGCGGTT-3'

Rbe4rt-R:

5'-CCTGTTAGTTCTTCCAATGCCCTTA-3'

Rbe4rt-P:

FAM-TCTGGTTGGGAATAGATACT-MGB

4. リアルタイムPCR反応及び結果解析

PCR用反応液は25 μ L/wellとして組成は以下のとおり調製した。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L, 対象プライマー対溶液(各プライマー, 50 μ mol/L)各0.4 μ L, 対象プローブ溶液(10 μ mol/L) 0.25 μ Lを混合し, DNA試料液 5 μ L(10 ng/ μ L)を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ Lとした。PCRのブランク反応液として, DNA試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし, 軽く遠心後, MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ, 装置にセットした。その後, 反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は, 95°Cで10分間加温し, ホットスタート法で反応を開始した。その後, 95°C 20秒, 60°C 1分を1サイクルとして, 50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は, Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認, 及び, multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度(FAM)の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には, ベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で, 安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line(Th. Line 0.2)を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。

5. 特異性確認試験

日本晴及びコメ以外の13種の作物から精製したDNA溶液を10 ng/ μ Lに調整し, 4種のコメ陽性対照プライマー及びプローブを用いてリアルタイムPCR反応を行った。増幅曲線とCt値の確認を行うとともに, Agilent2100 バイオアナライザを用いて, PCR産物のサイズを確認した。

泳動に用いたDNAは, リアルタイムPCR後に得られた反応液を1/10に希釈し, それをバイオアナライザの解析に供した。試薬及びDNA用ラボチップはAgilent DNA1000キットを用いた。分析サンプルの準備は以下の方法で行った。キットに含まれているGel(赤)に室温に戻したDye(青)15 μ Lを加えボルテックスでよく混合し, 2240 \times g, 10分間, 室温でスピンフィルターを用いて遠心濾過しGel-Dye Mixを作成した。そのGel-Dye Mix 9 μ LをDNAチップの「G(白抜き)」ウェルに入れ, チップ調整スタンドにセットし, プランジャーを押し, クリップにひっかけたまま60秒放置した。次に, クリップのストッパーをはずし5秒後にゆっくりプランジャーを元の位置に戻した。チップにゲルが充填されたことを確認し, 残りの「G」ウェル3か所にGel-Dye Mix 各9 μ Lずつ入れた。その後, マーカー(緑)5 μ Lをラダウェルとサンプルウェルにそれぞれ加えた。さらにラダー(黄)1 μ Lをラダウェルに入れ, 調整したDNA溶液1 μ Lをサンプルウェルに入れ, 専用ミキサーで目盛2400/min, 1分間攪拌した。また, MilliQ 350 μ Lをいれた電極クリーナーチップで電極を洗浄し, 分析を開始した。分析の終了後, ゲルイメージとエレクトロフェログラムのデータから, PCR増幅産物のサイズや増幅量を概算した。

6. 増幅効率算出

5段階希釈したコメDNA(5×10^{-3} , 5×10^{-2} , 5×10^{-1} , 5×10^0 , 5×10^1 ng)を鋳型にリアルタイムPCR試験より得られたCt値から検量線を作成し, そこから得られた検量線の傾き(slope)から増幅効率 $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$ を算出した。

3. リアルタイムPCRを用いたGM作物スクリーニング検査法の開発

1. 試料

GM作物のスクリーニング対象作物として, 13種の作物(コメ, トマト, ピーマン, ナス, トウモロコシ, コムギ, ダイズ, ヒヨコマメ, ナタネ, テンサイ, アマ, ワタ, パンパイヤ)から精製したDNAを試験に供した。加工食品の実態調査用としてトマト加工食品9種, ピーマン加工食品3種, ヒヨコマメ加工食品4種, ナス加工食品3種を都内のスーパーやインターネットより購入した。

2. DNA試料の調製

DNAの抽出・精製は、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製カラム(QIAGEN Genomic-tip)を使用し、以下の方法により行った。

トマトペーストは3g、パプリカパウダーは5gを使用した。ヒヨコマメ加工食品の乾燥粉末サンプルは0.4g、その他のヒヨコマメ加工食品はミルサーで粉砕し5gを使用した。ヒヨコマメ以外の生鮮や加工食品はミルサーで粉砕し10gを使用した。揚げナスに関しては、等量の水と混合しミルサーで粉砕した試料を10g使用した。カレーに含まれるヒヨコマメ及びナスは目視で選別し、水洗いしたサンプルを粉砕し試料とした。

試料は、G2緩衝液30mL、Cellulase 500 μ L、 α -amylase(高濃度品)20 μ LとRNase A(100 mg/mL)20 μ Lを加え混合し、50°Cで1時間保温した。次に、Proteinase K(20 mg/mL)200 μ Lを加え混合し、50°Cで1時間保温した。その後、その遠沈管を3,000 \times g、4°C、15分間遠心した。その間、あらかじめ50 mL遠沈管上にQIAGEN Genomic-tip 100/GをセットしQBT緩衝液3 mLを通して平衡化した。遠心終了後、得られた上清を、平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷した。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/GをQC緩衝液で7.5 mLずつ3回洗浄した後、あらかじめ50°Cに温めておいたQF緩衝液1 mLを負荷し、溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/Gを新しい遠沈管上にセットし、再度50°Cに温めておいたQF緩衝液2 mLを負荷し、DNAを溶出した。DNA溶出液にイソプロピルアルコール2 mLを加えよく混合した。マイクロ遠沈管(1.5 mL容)1本当たり1 mL程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000 \times g以上で、4°C、15分間遠心した。上清は捨て、70%(v/v)エタノールを1 mLずつ10,000 \times g以上で4°C、5分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を風乾させた後、予め50°Cに温めた滅菌蒸留水50 μ Lに溶解し、DNA試料原液とした。

3. 定性リアルタイムPCR検出用プライマー及びプローブ

各作物の内在性遺伝子検出用(トマト, LAT; パパイヤ, CHY; コメ, PLD; トウモロコシ, SSIb; ダイズ, Le1; ナタネ, FatA, アマ, SAD)及びGM作物検出用(汎用プロモーター3種類: AINT, PUBi, PNOS, P35S, 汎用ターミネーター2種類: T35S, tNos, 抗生物質選択マーカー遺伝子2種

類: HPT, NPTII, 除草剤耐性遺伝子5種類: PAT, BAR, GOX, EPSPS1, EPSPS2)プライマー・プローブは表2に示した。

4. リアルタイムPCR及び結果の解析

PCR用反応液は、25 μ L/wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L, 対象プライマー対溶液(各プライマー, 50 μ mol/L)各0.4 μ L, 対象プローブ溶液(10 μ mol/L)0.25 μ Lを混合し、DNA試料液5 μ L(10 ng/ μ L)を添加し滅菌蒸留水で全量25 μ Lに調製した。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、50°Cで2分間、次いで95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15秒、60°C 1分を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度(FAM)の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン(3サイクルから15サイクル)の Δ Rnのノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line(Th. Line 0.2)を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。

4. バスマティ米へのGMコメ混入に関する実態調査

1. 試料

非GMコメは日本晴品種を使用し、検査対象のバスマティ米は、インターネットを通じて市販されているパキスタン産及びインド産の計9種を購入し、GMコメ混入スクリーニング検査に供した。

2. DNA精製

DNAの抽出・精製は、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出・精製カラム(QIAGEN Genomic-tip)を使用して行った。均質に細粉砕し得た試料500 mgは、G2緩衝液15 mL、 α -amylase(高濃度品)12 μ LとRNase A(100 mg/mL)30 μ Lを加え混合し、