

37°Cで30分保温した。次に、Proteinase K (20 mg/mL) 60 µLを加え混合し、65°Cで30分保温した。その後、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 4 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本あたり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.リアルタイムPCR用プライマー及びプローブ

P35S, tNos を検出するリアルタイム PCR 用 プライマー及びプローブは、表 2 に示したものを 使用した。害虫抵抗性 GM コメの検出には、厚生労働省より通知された GM コメ検査法 (食安発 1116 (平成 24 年 11 月 16 日)) の GM コメ (63Bt, NNBt, 及び CpTI コメ) を検出するリアルタイム PCR 用 プライマー対及びプローブを使用した。

#### トリプシンインヒビター導入 GM コメ (CpTI コメ) 検知法 :

CpTI-2F:

5'- TGC AAG TCC AGG GAT GAA GAT-3'

NOS-1R:

5'- ACC GGC AAC AGG ATT CAA TC-3'

KDEL-P:

FAM-ATG AGA AAG ATG AAC TCT AG-MGB

#### Cry1Ac/Ab 導入 GM コメ (63Bt, NNBt コメ) 検知法 :

63Bt, NNBt コメ検出用のプライマー対

T52-SF : 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC AGA TTC-3'

OsNOS-R2 : 5'- AAG ACC GGC AAC AGG ATT

CA-3'

63Bt コメ検出用プローブ

GM63-Taq :  
FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATT  
TCCC-TAMRA

NNBt コメ検出用プローブ

NGMr-Taq :  
FAM-AATGAGAATTCGGTACCCCGACCTGCA-  
TAMRA

#### コメ陽性対照用 phospholipase D (PLD2)検知法 :

PLD3959F :

5'-GCT TAG GGA ACA GGG AAG TAA AGT  
T-3'

PLD4038R :

5'-CTT AGC ATA GTC TGT GCC ATC CA-3'

PLD-P :

FAM-TGA GTA TGA ACC TGC AGG TCG  
C-TAMRA

### 4. リアルタイムPCR反応及び結果解析

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

## C. 結果

### 1. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

マメ科のNCED遺伝子（ササゲ, GenBank accession no. AB030293, *VuNCED*; スタイロザンデス, GenBank accession no. DQ062150, *SgNCED*; エンドウ, GenBank accession no. AJ574819, *PsNCED*; インゲン, GenBank accession no. AB030293, *CkNCED*; ラッカセイ, GenBank accession no. AJ574819, *AhNCED*; カラガナ, GenBank accession no. GQ395772, *CkNCED*)の相同配列領域を基にPCR用プライマー対(DP1,5'A/DP2,5')を設計した。PCRより、約850 bpの増幅産物を得た(図1A)。シークエンス解析から得られた配列とマメ科由来のNCED配列より系統樹を作成したところ、CaNCEDはエンドウ由来のものに最も近縁であることが示唆された(図2)。エンドウ由来のNCED配列を基にCaNCED遺伝子の5'側を増幅させるプライマー対(CP-F1 or CP-F2/CP-R1)を設計し、PCRを行ったところ約560 bpと約480 bpの増幅断産物を得た(図1B)。CaNCED遺伝子の3'側も同様にプライマー対(CP-R2 or CP-R3/CP-F3)を設計し、PCRを行ったところ約880 bpと約400 bpの増幅産物を得た(図1B)。ゲノムウォーキング法より既知配列からCaNCED配列の末端配列を解析した。その結果、全長1863 bpのヒヨコマメ由来NECD1(CaNCED)のORF配列(GenBank no. AB771415)を得た。

CaNCEDのサザンブロッティング解析の結果、検出用プローブに使用した塩基配列内で消化されない*Xba*Iで処理したDNAには、約5.5 kbに1本のバンドを検出した(図3)。

### 2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討

$5 \times 10^{-3}$  ngのコメDNAを鋳型にリアルタイムPCRを行ったところ、全てのプライマー・プローブセット(表1)においてそれぞれ目的のPCR増幅断片長(PLD1: 68 bp, PLD2: 80 bp, SPS: 81 bp, RBE4: 106 bp)を検出した(図5)。PLD1はトウモロコシにおいて交差反応が見られたが、PLD2, SPS及びRBE4はコメのみを検出し、他の作物との交差反応性は見られず高い特異性を示した(図6)。5段階希釈した日本晴コメDNA( $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^0$ ,  $5 \times 10^1$  ng)を鋳型にリアルタイムPCRを行った。PCR増幅効率(E)は、PLD1(E=0.89), PLD2(E=0.98), SPS(E=1.00), RBE4(E=0.91)であ

った。Threshold Line 0.2のCt値でPCR増幅効率(E)を比較するとPLD2とSPSはほぼ一致しPLD1とRBE4はそれに比べ劣った(図7)。また、PCR増幅曲線の形状において、SPSはその他のプライマー・プローブセットに比べ増幅曲線の立ち上がりが悪く、DNA濃度によってエンドポイント値に差が生じた(図8)。

### 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

リアルタイムPCRを用いて作物の形質転換に汎用される遺伝子配列の検出を試みた。13種の非GM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, パンパヤ)を試験対象にした結果、アマ, コムギ, テンサイ, トウモロコシの4種にNPTIIが検出された(表3)。検出されたNPTIIはCt値が高いため、試料へのシクテリアの混入による可能性が高いことが示唆された。コメのAINT, トウモロコシのPubiは内在性遺伝子のため陽性(コメのAINTの検出Ct値: 23.57, 23.66; トウモロコシのPubiの検出Ct値: 26.54, 26.73)であった。NPTII以外は、すべての作物で検出は確認されなかった。

### 4. バスマティ米へのGMコメ混入に関する実態調査

計9種類のバスマティ精米製品(パキスタン産5種類SC-1, SC-2, SC-6, SC-8, SC-9, インド産4種類SC-3, SC-4, SC-5, SC-7)からDNAを抽出・精製を行った結果、SC-3, SC-4, SC-7, SC-8, SC-9の5製品から精製したDNA試料の吸光度比は、A260/A280 1.8以上, A260/A280 1.2以上が得られ良好なDNA精製度であった(表4)。SC-1, SC-2, SC-5, SC-6の4製品から精製したDNA試料は、A260/A280 1.6以上, A260/A280 0.7~1.0程度が得られ精製度はやや劣ったが、リアルタイムPCRを用いて50 ngを鋳型にPLDの検出を行ったところ、いずれのDNA試料においてもCt値22~24(threshold値0.2)が得られ標的遺伝子の高感度な検出が可能であることが示唆された(表5)。GMコメ混入に関する実態調査を行った結果、どの検体からもGMコメ陽性の結果は得られなかった。

## D. 考察

### 1. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

植物の乾燥ストレス耐性に機能するとされるNCEDは、ササゲ, スタイロ, エンドウ, インゲン,

ラッカセイなどのマメ科植物や、コメ、トマト、ジャガイモ、アボカド、ブドウ、トウモロコシ、アラビドプシスなどの多くの植物に発現していることが報告されている。データベースより既知のNCED塩基配列を比較すると、属及び種間において相同性が低いことから、ヒヨコマメに特異性の高い遺伝子となる可能性が示唆された。本研究では、GMヒヨコマメ検査のリファレンスに使用するヒヨコマメ内在性遺伝子検知用プライマー・プローブを設計することを目的に、ヒヨコマメのNCED遺伝子(CaNCED)のクローニングを行い、ORFの塩基配列を明らかにした。サザンブロット法により、CaNCED遺伝子はゲノム上に1コピーのみ存在することが確認された。また、シーケンズ解析の結果、CaNCEDの5'末側のORFは、各種マメ科のものと比較し非相同的であった(図4)。以上のことから、CaNCEDの非相同領域を標的に定性及び定量用のヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を確立可能であると示唆された。

## 2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討

コメ内在性遺伝子を検出する4種のリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットを比較した結果、本研究で開発したPLD2はコメのみに特異性を示し、日本晴DNAを鋳型に高い検出感度と増幅効率を示した。また、PLD遺伝子はコメ染色体上に17種のアイソフォームの存在を確認しているが、BLAST検索においてPLD2の標的配列に相同性を示す他の配列は確認されなかった。以上のことから、定性リアルタイムPCRを用いたGMコメ検査法におけるコメ内在性遺伝子の検知には、PLD2がPCR検出感度、特異性及び増幅効率ともに優れていることが示唆された。

## 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

リアルタイムPCRを用いることで、食品に混入したGM作物に由来する特異的配列を検出することが可能であった。NPIIIは、試料中のシロイヌナズナ由来の混入を検出してしまふ恐れが考えられることから、GM作物の混入を高感度に検出する際には、得られるCt値の値から判断する必要が示唆された。また、検査にはナス、ピーマン、ヒヨコマメ、ワタ、コムギ、テンサイの内在性遺伝子の特異的に検出するリアルタイムPCR法の開発が求められた。今後、リアルタイムPCRを使用した高感度GM作物混入に関するスクリーニングで陽

性と判定された試料に関しては、次世代シーケンシングを利用した方法、Inverse-PCR法、Genome-walking法などで導入遺伝子配列の同定を行い(図9)、新規検知法を開発していく予定である。

## 4. バスマティ米へのGMコメ混入に関する実態調査

厚生労働省より通知されたGMコメ検査法(食安発1116(平成24年11月16日))に従って、バスマティ米製品のGMコメ混入に関する検査を行ったところ、試験を行った9製品において陽性と判定された製品はなかった。また、P35S及びtNOSを検出するGMコメスクリーニング結果においても陰性であったことから、EUの検査で陽性であった害虫抵抗性GMコメの混入はないことが示唆された。

## E. 結論

### 1. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

ヒヨコマメ由来9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase(CaNCED)のORFの塩基配列を明らかにした。CaNCEDはヒヨコマメゲノム上に1コピーのみ存在していた。今後、ヒヨコマメに特異的な内在性遺伝子検知法を確立する予定である。

### 2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討

コメ内在性遺伝子PLDに特異的で増幅効率に優れているリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットPLD2を開発した。

### 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

リアルタイムPCRを用いたGM作物の食品への混入を網羅的に検出するスクリーニング法を確立した。

### 4. バスマティ米へのGMコメ混入に関する実態調査

平成24年度に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バスマティ米に害虫抵抗性GMコメの混入は検出されなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 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*, 32, 728-735, 2013
- 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

### 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, 穠山浩, 松岡英樹, 中島翔平, 神田智正, 近藤一成, 手島玲子: リンゴプロシアニジン(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, 穠山浩, 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, 穠山浩, 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回全国衛生化学技術協議会年会, 香川, (2012.11)
- 9) 野口秋雄, 中村公亮, 坂田こずえ, 小林友子, 大森清美, 笠原正輝, 高島令王奈, 橘田和美, 穠山浩, 近藤一成, 手島玲子: 遺伝子組換えパパイヤ55-1系統特異的検知法の妥当性評価, 第49回全国衛生化学技術協議会年会, 香川, (2012.11)
- 10) 近藤一成, 坂田こずえ, 小櫃冴未, 中村公亮, 野口秋雄, 手島玲子: フロクマリン類の *in vitro* 光毒性について, 第49回全国衛生化学技術協議会年会, 香川, (2012.11)
- 11) 野口秋雄, 穠山浩, 中村公亮, 坂田こずえ, 真野潤一, 高島令王奈, 峯岸恭孝, 布藤聡, 橘田和美, 近藤一成, 手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発 (第二報), 第104回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)
- 12) 小林友子, 中村公亮, 近藤一成, 野口秋雄, 小櫃冴未, 峯岸恭孝, 真野潤一, 高島令王奈, 橘田和美, 手島玲子: 遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討, 第104回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)
- 13) 中村公亮, 南竹優美, 近藤一成, 野口秋雄, 小櫃冴未, 真野潤一, 高島令王奈, 橘田和美, 穠山浩, 川上浩, 手島玲子: 遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモDNAの断片長について, 第104回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)
- 14) 真野潤一, 高島かおり, 峯岸恭孝, 二宮健二, 布藤聡, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穠山浩, 手島玲子, 高島令王奈, 橘田和美: 遺伝子組換えトウモロコシグループテストリング法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立, 第104回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)
- 15) 西辻泰之, 菊池洋介, 真野潤一, 福留真一, 遠藤繁, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穠山浩, 手島玲子, 高島令王奈, 橘田和美: プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイムPCRアレイ法への適用, 第104回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)
- 16) 中村公亮, 穠山浩, 河野徳昭, 吉松嘉代, 野口秋雄, 近藤一成, 真野潤一, 橘田和美, 手島玲子: 日欧で検出された安全性未審査遺伝子組換えコメ(Kefeng系統)混入に関する検知技術の開発について (第2報), 日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会, 函館, (2012.6)
- 17) 高島令王奈, 則武寛通, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穠山浩, 手島玲子, 真野潤一, 橘田和美: 加工品を含む複数のスイートコーン試料からのDNA抽出法の検討, 日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会, 函館, (2012.6)

#### H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

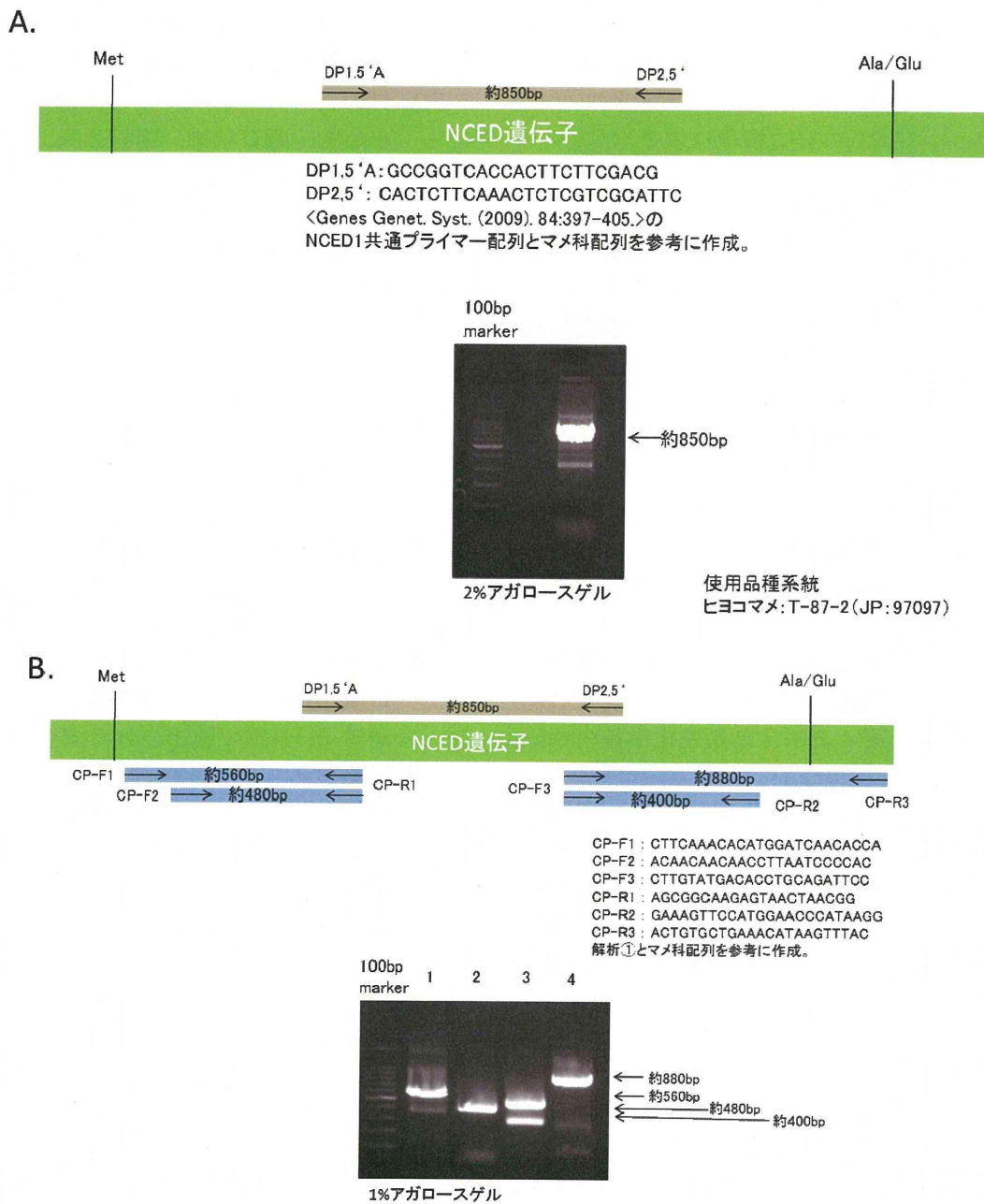


図1 ヒヨコマメ由来 NCED 部分配列の増幅  
 マメ科の NCED 遺伝子 (ササゲ (GenBank accession no. AB030293), スタイロザンデス (GenBank accession no. DQ062150), エンドウ (GenBank accession no. AJ574819), インゲン (GenBank accession no. AB030293), ラッカセイ (GenBank accession no. AJ574819)) を基に設計したプライマー対 (DP1,5'A/DP2,5') を使用し,PCR より増幅させたヒヨコマメ由来 NCED 部分配列  
 マメ科に相同性の (A) 高い及び (B) 低い NCED 遺伝子領域を解析

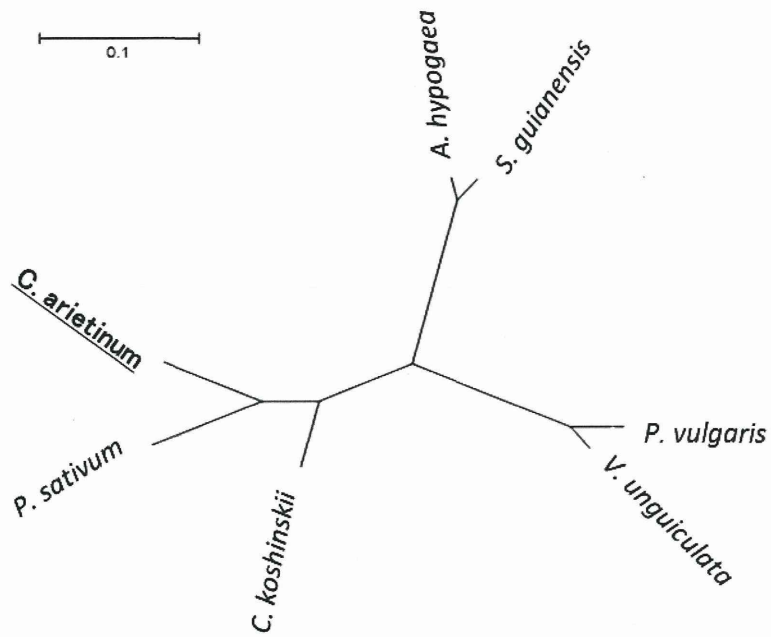
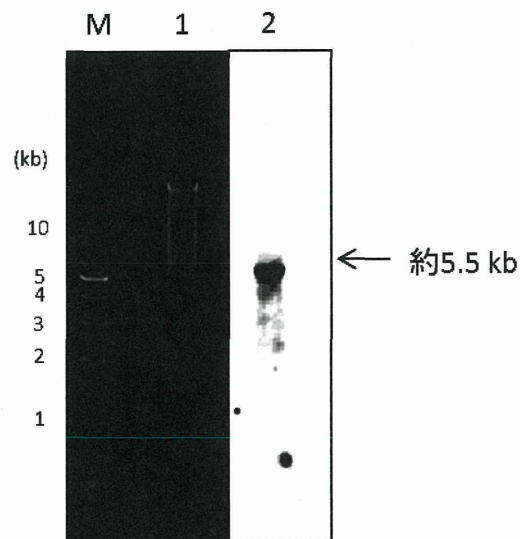


図2 マメ科 NCED 系統樹

*Vigna unguiculata* (ササゲ), *Arachis hypogaea* (ラッカセイ), *Stylosanthes guianensis* (スタイロ), *Phaseolus vulgaris* (インゲン), *Caragana koshinskii* (カラガナ), *Pisum sativum* (エンドウ), *Cicer arietinum* (ヒヨコマメ)



M: 1 kbマーカー  
 1: アガロースゲル電気泳動  
 2: サザンブローディング

図3 ヒヨコマメ由来 NCED1 コピー数の解析

ヒヨコマメ (品種名: T-87-2) 由来 DNA10 ng を *Xba* I で完全消化した後、膜に転写後、790 bp の NCED 検出用プローブで検出を行った。

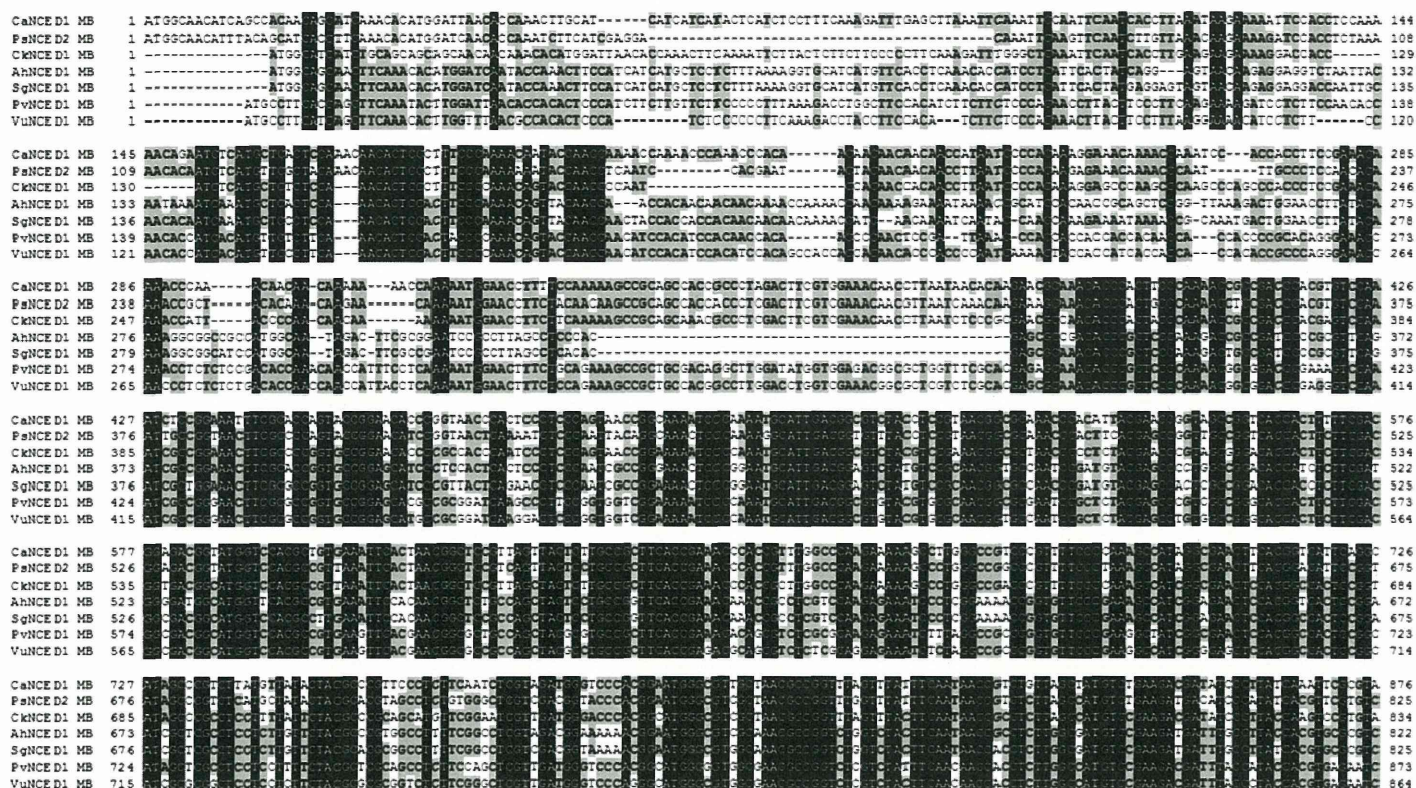


図4 各種マメ科由来NCED ORF領域(5'末側)の相同性

ClustalWを用いてマメ科のNCED遺伝子(ササゲ(GenBank accession no. AB030293, *VuNCED*), スタイロザンデス(GenBank accession no. DQ062150, *SgNCED*), エンドウ(GenBank accession no. AJ574819, *PsNCED*), インゲン(GenBank accession no. AB030293, *PvNCED*), ラッカセイ(GenBank accession no. AJ574819, *AhNCED*), カラガナ(GenBank accession no. GQ395772, *CkNCED*)及びヒヨコマメ *CaNCED* のアライメントを行った。

表1 コメ内在性遺伝子検出法の検討に使用したオリゴ一覧

標的配列名	プライマー・プローブ名	塩基配列(5'-3')	増幅断片長(bp)	参考文献	
PLD1	forward	KVM159	TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT	68	BayerCropScience Method, 2006
	reverse	KVM160	CTGATCCGACTAGCAGGAGGTCC		
	probe	TM013	FAM-TGTTGTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA		
PLD2	forward	PLD3959F	GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT	80	Eur. Food Res. Technol., 232:485-496, 2011. 食安監発0528第2号平成24年5月28日
	reverse	PLD4038R	CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA		
	probe	PLD-P	FAM-TGAGTATGAACCTGCAGGTGGC-TAMRA		
SPS	forward	Sps-taq-1F	TTGCCCCCTGAACGGATAT	81	J. Agric. Food Chem. 58, 11543-11547, 2010
	reverse	Sps-taq-1R	CGGTTGATCTTTTCGGGATG		
	probe	Sps-P	FAM-TCCGAGCCGTCCGTCGGTC-TAMRA		
RBE4	forward	Rbe4rt-F	GTTTTAGTTGGGTGAAAGCGGTT	106	Eur. Food Res. Technol., 234 : 981-993, 2012
	reverse	Rbe4rt-R	CCTGTTAGTCTTCCAATGCCCTTA		
	probe	Rbe4rt-P	FAM-TCTGGTTGGGAATAGATACT-MGB		



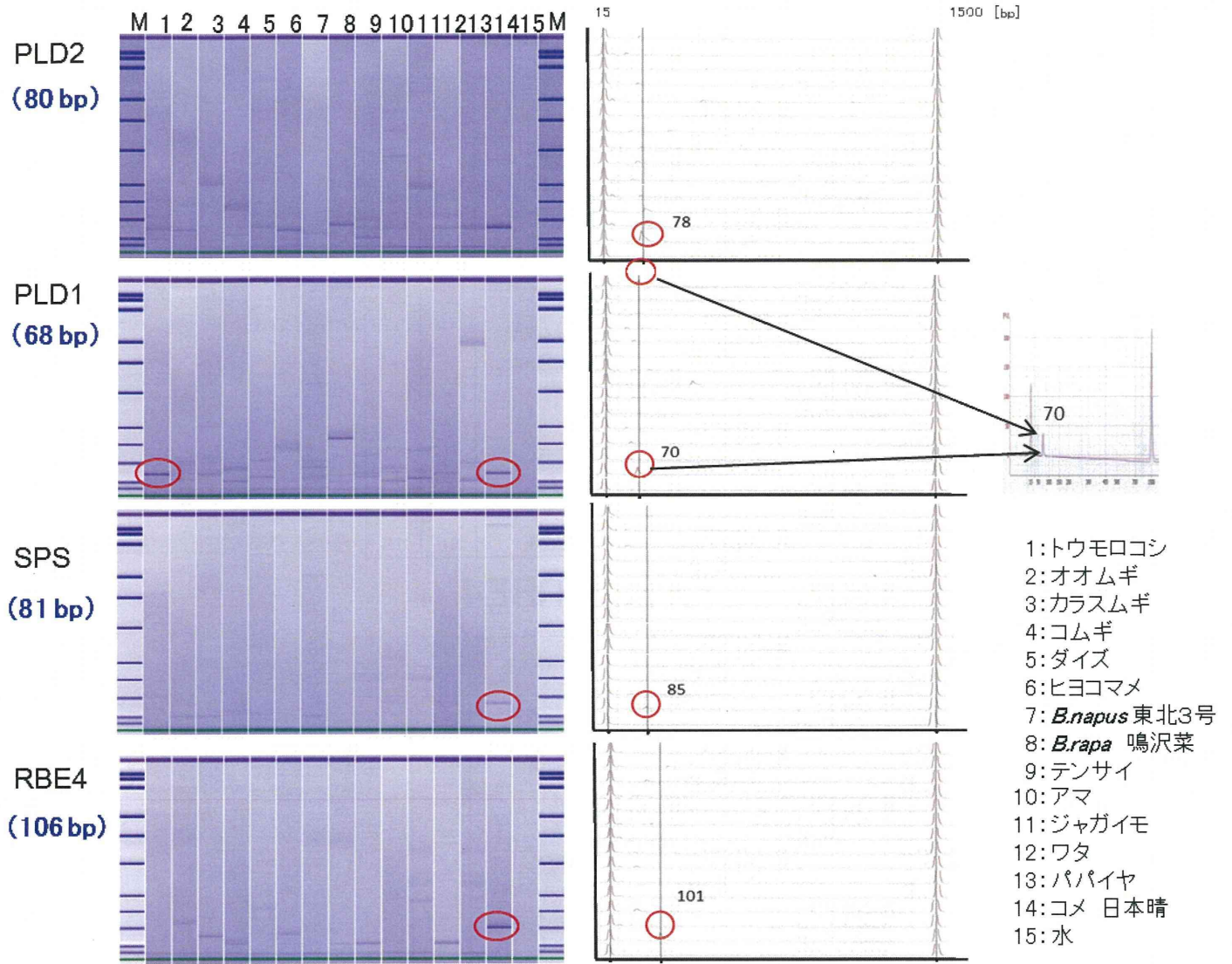
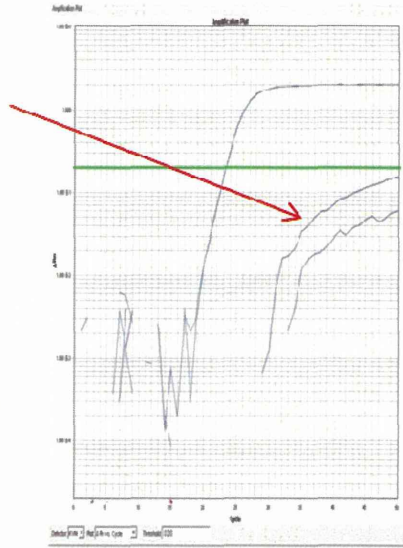


図5 14種作物を対象としたPCR増幅産物の特異性検出

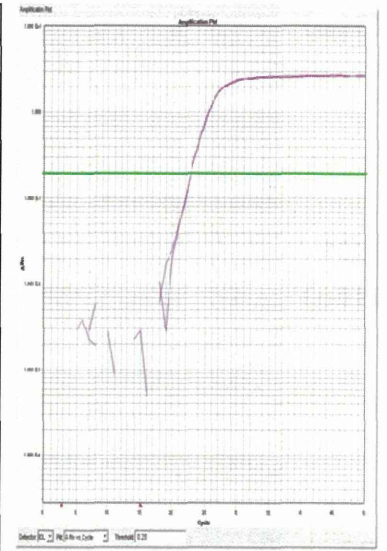
## PLD1

対照作物	Ct値 (Th. 0.2)	
	1	2
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	-	-
Brassica (東北3号)	-	-
Brassica (横浜菜)	-	-
テンサイ	-	-
アマ	-	-
ジャガイモ	-	-
ワタ	-	-
パパイヤ	-	-
コメ(日本産)	23.27	23.51



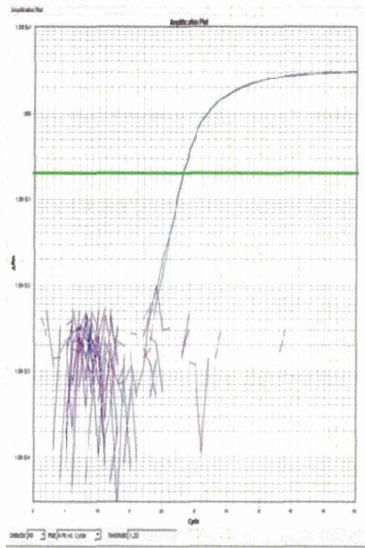
## PLD2

対照作物	Ct値 (Th. 0.2)	
	1	2
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	-	-
Brassica (東北3号)	-	-
Brassica (横浜菜)	-	-
テンサイ	-	-
アマ	-	-
ジャガイモ	-	-
ワタ	-	-
パパイヤ	-	-
コメ(日本産)	22.87	22.88



## SPS

対照作物	Ct値 (Th. 0.2)	
	1	2
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	-	-
Brassica (東北3号)	-	-
Brassica (横浜菜)	-	-
テンサイ	-	-
アマ	-	-
ジャガイモ	-	-
ワタ	-	-
パパイヤ	-	-
コメ(日本産)	23.01	23.06



## RBE4

対照作物	Ct値 (Th. 0.2)	
	1	2
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	-	-
Brassica (東北3号)	-	-
Brassica (横浜菜)	-	-
テンサイ	-	-
アマ	-	-
ジャガイモ	-	-
ワタ	-	-
パパイヤ	-	-
コメ(日本産)	22.35	22.36

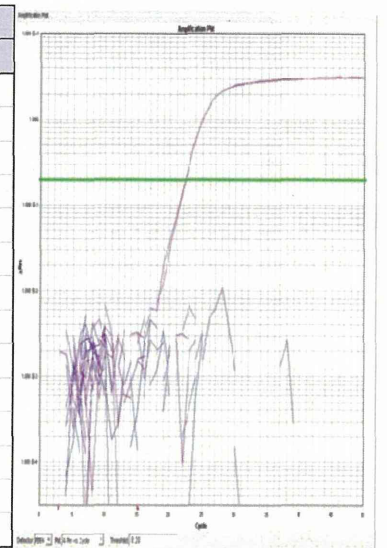


図6 4種類のコメ内在性遺伝子検知法のリアルタイムPCR増幅曲線

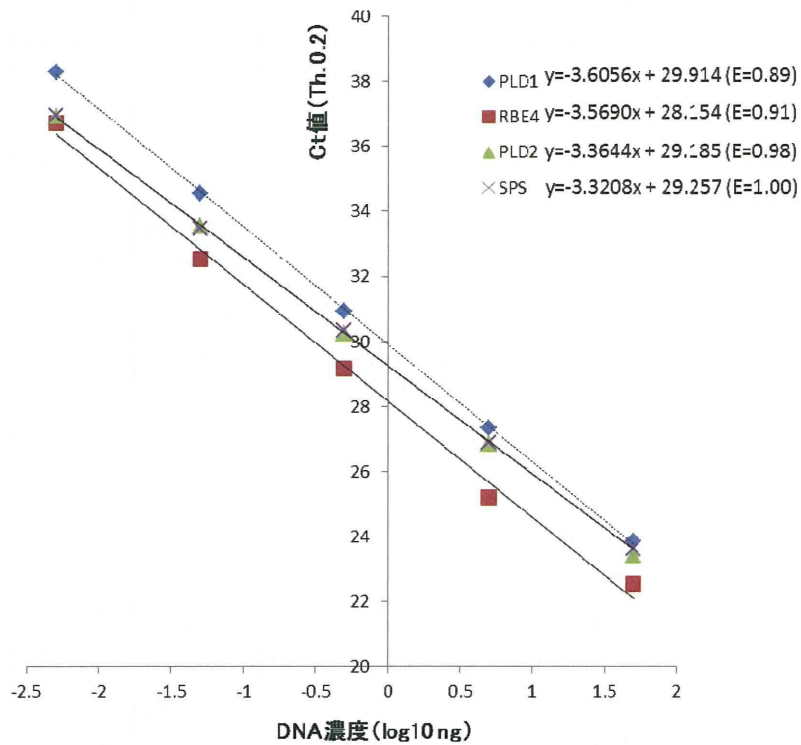


図7 コメ内在性遺伝子検知法のPCR増幅効率(E)の比較  
 $PCR \text{ 増幅効率 } (E) = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$   
 (横軸: 初期鋳型濃度、縦軸: Ct値)

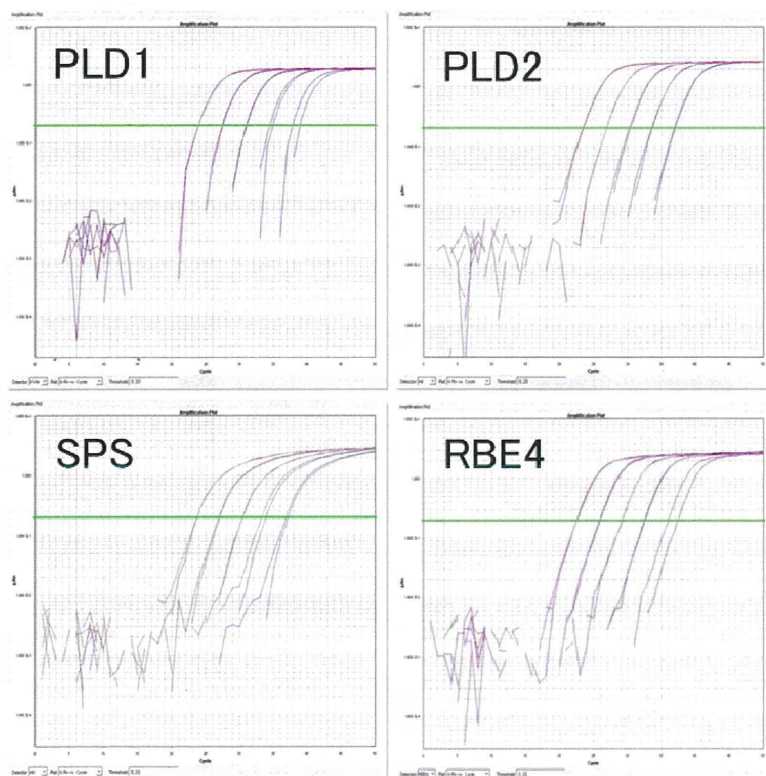


図8 5段階希釈したコメDNA ( $5 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-2}$ 、 $5 \times 10^{-1}$ 、 $5 \times 10^0$ 、 $5 \times 10^1$  ng) を鋳型にリアルタイムPCRを行った結果

表2 定性リアルタイムPCR 検出用プライマー及びプローブ 一覧

検査法名	標的作物	primer/probe名	primer/probe配列(5'-3')	増幅断片長 (bp)
LAT	トマト陽性	LAT100-F LAT100-R Lp (FAM/TAMRA)	AGACCACGAGAACGATATTTGG TTCTTGGCTTTTGCATATCCAGACA CTCTTTGCAGTCTCCCTGGGCT	92
CHY	ババイヤ陽性	Q-Chy-1F2 Q-Chy-2R Q-Chy-P (FAM/BHQ1)	CCATGCGATCCTCC CATCGTAGCCATTGTAACTAGCTAA TTCCCTTCAT(BHQ1)CCATCCCACTCTT GAGA	73
FLD	コム陽性	PLD8959F PLD4038R PLD-P (FAM/TAMRA)	CCTTAGGGAACAGGAAGTAAAGTT CTTAGCATAGTCTGTGGCATCCA GAGTATGAACTGCAGGTCCG	80
SS II b	トウモロコシ陽性	SS II b 3-5' SS II b 3-3' SS II b 3-Taq (FAM/TAMRA)	CCAACTCTTTGACATCTGCTCC GATCAGCTTTGGGTCCGA AGCAAAGTCAGAGGGCTGOAATGCA	114
Le1	ダイズ陽性	Le1-n02-5' Le1-n02-3' Le1-n02-Taq (FAM/TAMRA)	GCCCTCTACTCCACCCCA CCCATCTGCAAGGCTTTTT AGCTTGGCCGCTTCTTCAACTTCAC	118
FatA	ナタネ陽性	FatA Primer1 FatA Primer2 FatA Probe (FAM/TAMRA)	GGTCTCTCAGCAAGTGGGTGA TCGTCCCGAACTTCATCTGTAA ATGAACCAAGACACAAGGCGGCTTCA	76
SAD	アマ陽性	SAD F SAD R SAD probe (FAM/BHQ)	GCTCAACCCAGTCACCACCT TGGAGGAGATCTGGAGGAG TGTGAGGGAGCGTGTGAAGGGA	68

検査法名	標的配列	primer/probe名	primer/probe配列(5'-3')	増幅断片長 (bp)
T35S	CaMV35S ターミネーター	T35SM-F T35SM-R T35S (FAM/TAMRA)	CCCTTAGTATGATTTGTATTTGAAAACTCTC GGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTAG TATCAATAAAATTTCTAATTC	89
PNOS	Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase遺伝子	Pnos-F Pnos-R Pnos-F (FAM/TAMRA)	ACCATTAATGGCGTTCAAA GATTGAGAGTGAATATGAGACTCTAATTG CTGAOCTTCCATAAAATCCCTCCG	131
HPT	ハイグロマイシン 抵抗性遺伝子	hpt_8-L hpt_8-R hpt_8-P (FAM/TAMRA)	CTATTTCTTTGCCCTCGACGA GGACCGATGGCTGTGTAGAAG CGCCGATAGTGGAAACCCGACCCG	77
thos	Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase遺伝子	NOS ter 2-5' NOS ter 2-3' NOS-Taq (FAM/TAMRA)	GTCTTGGATGATTATCATATAATTTCTG CGCTATATTTTGTCTTCTATGCGGT AGATGGT TTTTATGATAGAGTCCCGCAA	151
P35S	CaMV35S プロモーター	P35S 1-5' P35S 1-3' P35S-Taq (FAM/TAMRA)	ATTGATGTGATATCTCACTGAOCT CCTCTCCAAATGAAATGAATTCCT CCCACTATCTCTCGCAAGCCCTTGGT	101
PAT	ホスフィトリシン・アセチル基転移酵素遺伝子 (除草剤グルホシネート耐性遺伝子)	PAT 1-5' PAT 1-3' PAT-1-Taq (FAM/TAMRA)	AAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT ATGCCATGTGACACCGTAAACAGTACT TGCTTADGCTGGGCCCTGGAAG	161
NPT II	カナマイシン 抵抗性遺伝子	npt1-5' npt1-3' NPT-1-Taq (FAM/TAMRA)	GACAGGTGGTCTTGACAAAAAG GAACAAGATGGATTGCACGC CCCTGOGGTGACAGCCGGA	155
BAR	ピアラホス耐性遺伝子 (除草剤グルホシネート耐性遺伝子でもある)	bar 2-5' bar 2-3' BAR-1-Taq (FAM/TAMRA)	ACTGGGCTCCACGGTCTACA AAACCCACGTCATGCCAGTTC CATGCTGGGGGGGGGCTTCAAGDCCG	186
GOX	グリホサートオキシドレダクターゼ遺伝子 (除草剤グリホサート耐性遺伝子)	gox 2-5' gox 2-3' GOX-1-Taq (FAM/TAMRA)	TGCCAGGAACTTGACTAGGG CGAATCAACCAAGGCATGATG TCCAAAGTGGCTTCTTGAOCCAAATGG	103
EPSPS1	グリホサート耐性EPSPシンターゼ (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) CP4-EPSPS遺伝子	epsps 1-5' epsps 3-3' EPSPS-1-Taq (FAM/TAMRA)	GCTCGTGTGGAAAAACCT TTCTGATCGGAGAGTTGATCTCTC TGGACGATGCCACGATGATCGC	118
EPSPS2	グリホサート耐性EPSPシンターゼ (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) CP4-EPSPS遺伝子 (除草剤グリホサート耐性遺伝子)	EPSPS2 1-5' EPSPS2 1-3' EPSPS2-1-Taq (FAM/TAMRA)	GTCTCGT TCTGAAAAACCTGT TTAGTGTGGAGAGTTGATCTCTAG TGATCGCTACTAGCTTCCAGAGTTCATGG	118
AINT	ACT1 プロモーター	AINT 2-5' AINT 2-3' AINT-2-Taq (FAM/TAMRA)	TGCTGAGGCTTAGATGTGTGAGA CTGCATTTGTCACAAATCATGAA TTTGTGGGTAGAAATTTGAATCCCTCAGG	112
Pubi	ユビキチンプロモーター	pubi-5' pubi-3' pubi-Taq (FAM/TAMRA)	TGGAACCTGTATGTGTGTGCATACATC CATCAACATGTAACCTATCCTAGATCGA TCATAGTTACGAGTTTAAAGTGGATGGAA	89

表3 13種類の作物に対するリアルタイムPCR\*を用いたスクリーニング検査法の適用結果

probe	うるち米		トマト		タイス		ナス		ナタネ		パパイヤ		ピーマン		ヒヨコマメ		ワタ	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
陽性	23.15	22.96	22.62	22.57	26.41	26.55	/		22.78	22.67	22.38	22.47	/		/		/	
F35S	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
FNOS	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
AINT	23.57	23.66	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
Pubi	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
T35S	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
TNOS	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
PAT	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
BAR	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
GOX	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
EPSPS1	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
EPSPS2	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
NPT II	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	
HPT	-	-	-	-	-	-	/		-	-	-	-	/		/		/	

probe	アマ		コムギ		テンサイ		トウモロコシ	
	1	2	1	2	1	2	1	2
陽性	21.47	21.45	/		/		26.49	26.67
F35S	-	-	/		/		-	-
FNOS	-	-	/		/		-	-
AINT	-	-	/		/		-	-
Pubi	-	-	/		/		26.54	26.73
T35S	-	-	/		/		-	-
TNOS	-	-	/		/		-	-
PAT	-	-	/		/		-	-
BAR	-	-	/		/		-	-
GOX	-	-	/		/		-	-
EPSPS1	-	-	/		/		-	-
EPSPS2	-	-	/		/		-	-
NPT II	-	40.29	-	40.32	39.28	38.56	43.46	41.91
HPT	-	-	/		/		-	-

\*斜線は開発を行っている検知法を示す。

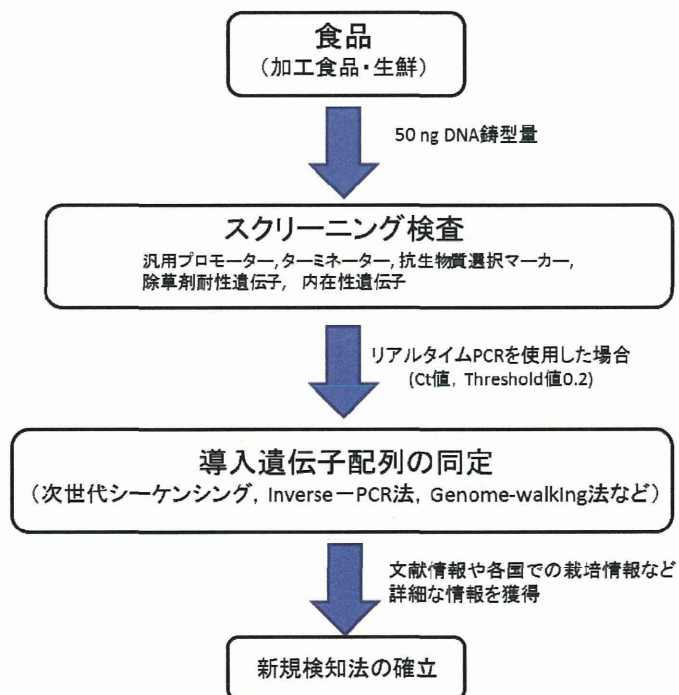


図9 食品に混入したGM作物の検査法開発のフロー

表4 バスマティ米製品のGMコメ混入に関する実態調査

サンプル NO.	名称	原産国	原材料名	試料重 g	溶液 ul	濃度 ng/ul	total収量 ng	回収効率 ng/g	A260	A280	260/280	260/230
SC-1	インディカ米(バスマティ)	パキスタン	精米	2	100	104.64	10464.0	5232.0	2.093	1.315	1.59	0.72
SC-2	バスマティーライス	パキスタン	精米	2	100	31.97	3197.0	1598.5	0.639	0.383	1.67	0.82
SC-3	Lal Gilla バスマティ米	インド産	精米	0.5	50	76.06	3803.0	7606.0	1.521	0.807	1.89	2.11
SC-4	バスマティーライス	インド産	精米	2	50	421.64	21082.0	10541.0	8.433	4.776	1.77	1.51
SC-5	バスマティーライス	インド産	精米	0.5	50	120.29	6014.5	12029.0	2.406	1.555	1.55	0.73
SC-6	バスマティーライス	パキスタン産	精米	2	50	128.93	6446.5	3223.3	2.579	1.496	1.72	1.04
SC-7	バスマティーライス	インド産	精米	0.5	50	529.06	26453.0	52906.0	10.581	5.947	1.78	1.63
SC-8	バスマティーライス	パキスタン産	精米	0.5	50	73.29	3664.5	7329	1.466	0.835	1.76	1.25
SC-9	バスマティーライス	パキスタン産	精米	0.5	50	141	7050	14100	2.82	1.593	1.77	1.48

表5 GMコメスクリーニング法を使用したバスマティコメ製品のGMコメ混入検査結果\*

サンプル	PLD	63Bt	NNBt	CpTI	P35S	tNos
SC-1	23.23	-	-	-	-	-
	23.09	-	-	-	-	-
SC-2	22.91	-	-	-	-	-
	22.99	-	-	-	-	-
SC-3	21.78	-	-	-	-	-
	21.75	-	-	-	-	-
SC-4	24.19	-	-	-	-	-
	24.40	-	-	-	-	-
SC-5	23.98	-	-	-	-	-
	23.78	-	-	-	-	-
SC-6	23.16	-	-	-	-	-
	22.94	-	-	-	-	-
SC-7	21.99	-	-	-	-	-
	21.98	-	-	-	-	-
SC-8	22.29	-	-	-	-	-
	22.23	-	-	-	-	-
SC-9	22.19	-	-	-	-	-
	22.14	-	-	-	-	-
日本晴	22.73	-	-	-	-	-
	22.79	-	-	-	-	-

\*数値はリアルタイムPCRを使用した検査結果(Ct値)を示す。

H24研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
神奈川芳之、赤羽学、今村 知明	第1編 食品衛生管理と食の安全 第6章 フードディフェンスという概念	美研クリエイティブセンター編集	微生物コントロールによる食品衛生管理ー食品の安全・危機管理から予測微生物の活用までー	株式会社エヌ・ティー・エス	東京	2013	91-108
梶川揚申、五十君静信	乳酸菌組換えワクチン		新しい乳酸菌の機能と応用	シーエムシー出版	東京		in Press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Sugiyama M, Takenaga F, Kitani Y, Yamamoto G, Okamoto H, Masaoka T, Araki K, Nagoya H, Mori T.	Homozygous and heterozygous GH transgenesis alters fatty acid composition and content in the liver of Amago salmon ( <i>Oncorhynchus masou ishikawae</i> )	Biology Open	1(10)	1035-1042	2012
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	215-222	2012
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	157-165	2012
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
正岡 哲治・岡本 裕之・名 古屋 博之・荒木・藤原・小 林	遺伝子組換え生物の検査に向けたサケ科 魚類発眼卵からのDNA抽出法の開発	DNA鑑定	4	19-28	2012
Toshio Iwaki, Lining Guo, John A. Ryals, Syuhei Yasuda, Takayoshi Shimazaki, Akira Kikuchi, Kazuo N. Watanabe, Mie Kasuga, Kazuko Yamaguchi- Shinozaki, Takumi Ogawa, Daisaku Ohta	Metabolic Profiling of Transgenic Potato Tubers Expressing Arabidopsis Dehydration Response Element-Binding Protein 1A (DREB1A)	Journal of Agricultural and Food Chemistry	61	893- 900	2013
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	32	728- 735	2013
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	895- 901	2013
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
Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S.	Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in <i>Pichia pastoris</i> using codon optimization.	Biotechnology and Applied Biochemistry,			in press
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			in press
Nakamura R., Teshima R.	Proteomics-based allergen analysis in plants.	J. Proteomics			in press
Nakamura R., Teshima R.	Immunoproteomic analysis of food allergens.	Plant Proteomics- Methods and Protocols Second Edition			in press



