

H., et al., J. Agric. Food Chem., 55, 5942-5947 (2007), Nakamura, K., et al., Food Chem., 141, 2618-2624 (2013))と同様のものを使用した。デジタル PCR 解析には、BioRad 社製 QX100 Droplet Digital PCR システム (QX Droplet Generator, iCycler, QX100 Droplet Reader) を使用した。

2) 亜硫酸塩漂白剤処理による GM 作物検査法への影響---漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知

試料は、市販ドライフルーツ (パパイヤとトマト) を用いた。亜硫酸塩処理されたドライパパイヤ 9 製品とドライトマト 4 製品、亜硫酸塩未処理のドライパパイヤ 1 製品とドライトマト 2 製品を陽性対照試験に供試した。試料からの DNA 抽出と精製法は、GM パパイヤ検査法 (食安監発 0709 第 2 号 (平成 25 年 7 月 9 日)) および GM トマト検査法 (中村ら、日本食品化学学会誌 17 巻 2 号 123-129 (2010)) を用いた。陽性対照試験では、パパイヤ内在性遺伝子 (CHY) およびトマト内在性遺伝子 (LAT) を検出した。大量 DNA 抽出法として、使用した試料と試薬を現行法の 5 倍量とし、ドライパパイヤ 25 g から genomic-tip 500/G カラムで DNA を精製した。直接抽出法として、組織溶解液中で破碎したドライパパイヤは遠心後、得られた上清を 2 倍の滅菌水で希釈した。それを DNA 鋳型として DirectAce qPCR mix を用いてリアルタイム PCR を行った。さらに、亜硫酸塩添加試験として、破碎した生鮮パパイヤ 1 g は、buffer G2 6 ml と 1 M 亜硫酸ナトリウム 2 ml を添加した後、酵素処理した。得られた DNA 粗抽出液は、HCl で pH 調整後、通知検査法に従い genomic-tip 20/G カラムで DNA を精製した。

3) リアルタイム PCR を使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

(1) 試料

非遺伝子組換えのヒヨコマメは、(独) 農業生物資源研究所から購入した T-87-2 品種 (JP No. 97097) を用いた。他のマメ科植物は、ササゲ (Juuroku sasage 品種、JP No. 31615)、スタイロザンテス (Pauciflora 品種、JP No. 80020)、エンドウ (Denkou Kinuzaya 品種、JP No. 31448)、インゲンマメ (Toppu Kuoppu 品種、JP No. 31351)、ラッカセイ (Chiba shouryuu 品種、JP No. 27301) を使用した。またマメ科以外の植物として、オオムギ (Zairai hadaka mugi 品種、JP No. 16719)、カラスムギ (*A. fatua* [Australia san])

品種、JP No. 41387)、コムギ (Azuma nishiki 品種、JP No. 20684)、ナタネ (Tohoku 3 品種、JP No. 26150)、コマツナ (Narusawana 品種、JP No. 26902)、テンサイ (Harumasari 品種、JP No. 25562)、ワタ (Hakushuu wata 品種、JP No. 222117)、及びダイズ、トウモロコシ、イネ、アマ、ジャガイモ、トマト、ナス、ピーマン、パパイヤ、ピーチ、パッションフルーツを用いた。

(2) ヒヨコマメ内在性遺伝子検知用プライマーおよびプローブ

昨年度、明らかにした CaNCED 配列 (GenBank no. AB771415) を基にリアルタイム PCR 用プライマー対及びプローブを以下の通り設計した。設計した配列は、BLASTn 検索により特異性をデータベース上で確認を行った。

NCEDr-F1 : ATCAGCCACAACAGCATCAAAC
NCEDr-R1 :
TTTAAGCTCAAATCTTTGAAAGGAG
NCEDr-P1 :
FAM-CCAAACTTGCATCATCATACTC-TA
MRA

(3) ヒヨコマメ陽性対照用プラスミドの作成
ヒヨコマメ内在性遺伝子検知用プライマーおよびプローブの標的とする塩基配列を含んだ 330 bp の DNA 断片を増幅するため、以下のプライマー対を使用し PCR を行った。

CaND-F: 5'-CTCCACTCCCCTCAACTTTCC-3'
SW1 :
5'-GGAGTGTGTTTGGAGTGAGCATG-3'

PCR 反応条件は以下の通りとした。AmpliTaq Gold 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、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。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、30 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。

PCR 産物は 2% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 μ g/mL) で電気泳動後、UV 照射下で検出し、目的の増幅長の DNA 断片をゲルから切り出し精製した。得られた DNA は pGEM-T easy に TA クローニングプラスミドは大腸菌の形質転換に使用した。大腸菌を培養後、精製したプラスミドは M13F と M13R プライマーを使用し、シークエンス解析を行った。

M13F: 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'
M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

プラスミドへ導入した配列は、シーケンスを確認した後、ヒヨコマメ陽性対照用プラスミド (pGEM-CaNCED) とした。

(4) リアルタイムPCR反応および結果解析

PCR用反応液は、25 μ L/wellとして調製した。反応液の組成は以下の通りとした。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 2.5 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 2分、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 ΔR_n 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) 検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ)

pGEM-CaNCED は分子量を計算し、CaNCEDのコピー数を算出した。real-time PCR 用反応液 25 μ L 中 CaNCED がそれぞれ 2.5×10^5 、 2.5×10^4 、 2.5×10^3 、 2.5×10^2 、 2.5×10^1 、 1.25×10^1 、 2.5×10^0 の7段階に希釈し、各濃度をそれぞれ 21 回反復試験を行った。得られた Ct 値からコピー数を算出し、平均値からグラフを作成し、検出限界および定量限界を確認した。

4) 未承認 GM 作物 (ヒヨコマメ、バスマティ米) の食品への混入に関する実態調査

GM ヒヨコマメ：近年、害虫抵抗性を獲得させた商業栽培用の GM ヒヨコマメがインドやバングラディッシュなどで開発されていると報じられた (Figure 3)。そこで国内で購入可能なインドやバングラディッシュ産ヒヨコマメ食品の GM ヒヨコ

マメ混入に関する実態調査を行った。実態調査の方法には、本研究で開発したヒヨコマメ内在性遺伝子検出法を利用した。

GM バスマティ米：2011 年に欧州食品・飼料緊急警告システム (RASFF) において、インド及びバングラディッシュ産のバスマティ産のコメに Cry2A 発現ベクターを導入した未承認 GM バスマティ米の混入を確認したと報じた。Cry2A は、鱗翅目の昆虫および双翅目の昆虫の両方に対する毒性を含む広い有効範囲を有する害虫抵抗性獲得を目的として導入されており、我が国では Cry2A を発現する承認済 GM コメは皆無である。そこで、この情報を基に国内で購入可能なインド及びバングラディッシュ産のバスマティ米の GM コメ混入に関する実態調査を行った。

C. 結果

1) コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定

リアルタイムPCRを用いて試料中に混入した GM コメの検査を行った結果、害虫抵抗性 GM コメ Kefeng6 と Shanyou63 の2系統の微量混入が確認された (Table 1, 2)。モチ米粉 A~D の4検体に害虫抵抗性獲得を目的にトリプシンインヒビターを発現するよう開発された GM コメ Kefeng6 系統、ビーフン1検体に害虫抵抗性獲得を目的に Cry1Ab/Ac を発現するよう開発された GM コメ Shanyou63 系統の混入が検出された。系統特異的及び構造特異的検出法の検出感度を比較した結果、いずれの GM コメ系統の混入に関しても系統特異的検出法を使用した場合、2併行で DNA を抽出したサンプルを使用し2反復試験のいずれの結果においても、検出率50%以下で標的配列の増幅が確認された (Table 1, 2)。一方、構造特異的検出法では、2併行以上 DNA 抽出サンプルを使用し2反復試験のすべてにおいて、指数関数的な増幅が確認された。

デジタルPCRを利用し、個々の検出法の標的とする配列のコピー数を測定した結果、Kefeng6 系統の混入した試料は、供試した 60 ng DNA 中に構造特異的配列を 24 コピー、系統特異的配列をリアルタイムPCR法の検出限界以下の2コピー含有していることが示唆された (Figure 1)。

2) 亜硫酸塩漂白剤処理による GM 作物検査法への影響---漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検出

亜硫酸塩処理されたドライパパイヤの陽性対照試験では9製品中1製品が陽性、ドライトマトは4

製品すべて陰性と判定された (Table 3)。一方、亜硫酸塩処理されていないドライパイヤ1製品およびドライトマト3製品において、それぞれの内在性遺伝子の検知は可能であった。漂白剤処理されたドライパイヤ (DP-2) より、大量DNA抽出法において、5倍量の試料からDNA抽出を試みた。その結果、抽出されたDNA収量は改善せず、内在性遺伝子の検出はできなかった (データ示さず)。また、DirectAce qPCR mixを用いた直接抽出法による内在性遺伝子の検知に関しては、PCR反応性は現行法と比べて劣っていた (Table 4)。一方、生鮮パイヤを用いた亜硫酸塩添加試験において、粗抽出液は添加前の弱酸性 (pH6) から、添加後に弱アルカリ性 (pH8) を示した。その結果、無添加と比べDNA収量が85%に低下した。亜硫酸塩添加後の粗抽出液をpH6に調整した場合、無添加の粗抽出液と同等のDNA収量が得られた (データ示さず)。

3) リアルタイムPCRを使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

ラッカセイ (*Arachis hypogaea*)、インゲン (*Phaseolus vulgaris* L.)、エンドウ (*Pisum sativum* L.)、スタイロ (*Stylosanthes guianensis*) 及びムレスズメ (*Caragana koshinskii*) のNCED ORF領域でシークエンスを比較したところ、NCED遺伝子の5'側配列に各植物に特異的な配列が見られた。そこで、ヒヨコマメのNCED遺伝子の5'側配列を基に、配列を検出するリアルタイムPCR用ヒヨコマメ陽性対照プライマーおよびプローブ

(NCEDr-F1/NCEDr-R1/NCEDr-P1)を設計した。まず、プライマープローブの特異性を調べるため、マメ科植物5種類 (サンプル番号3~7) 及びその他作物18種 (サンプル番号8~25) を対象にリアルタイムPCRを行なった (Table 5)。すべての作物において2並行試験のリアルタイムPCRで陽性反応は見られず、高い特異性が示された。また、検出限界 (Table 6) および定量限界 (Figure 2) は250コピーであった。

4) 未承認GM作物 (ヒヨコマメ、バスマティ米) の食品への混入に関する実態調査 GMヒヨコマメ

国内で購入可能であった、ヒヨコマメ含有食品 (乾燥種子、粉末、レトルトパウチ、スナック菓子、お茶、ペースト、レトルト、発酵食品) 計24製品、及び、インド及びパキスタン産バスマティ

米含有食品に関して、GM作物混入に関する実態調査を行った。それぞれの製品から精製したDNAを検体として使用した。まず、近年開発されたGMヒヨコマメの開発に関する情報に基づいて、いずれのGMヒヨコマメの目的遺伝子の発現に使用されているカリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーター (P35S) 及び汎用性の高いノパリンシンターゼ遺伝子由来ターミネーター (TNOS) を検出するリアルタイムPCRを使用し検査を行った (Table 7)。その結果、24検体中11検体においてP35Sが、6検体においてTNOSが検出された。いずれのPCR増幅においても、Ct値 (threshold値0.2) が38~40であった。P35Sの検出が陽性であった検体cp-3を含め4検体を使用し、リアルタイムPCRでGM作物に汎用されるトランスジェニック配列を検出する方法を使用し検査を行った結果、トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター (Pubi) 及びカナマイシン耐性遺伝子 (NPTII) で標的配列の増幅が検出されたが、他の配列は検出されなかった (Table 8)。リアルタイムPCRで増幅が検出された反応は高いCt値であることから、ウイルスや土壌細菌由来のDNAの混入が示唆された。これらの結果から、すべてのヒヨコマメ含有食品でGMヒヨコマメ陰性であると判断された。

GMバスマティ米：国内で購入可能であったバスマティ米含有食品16検体 (シリアル3種類、ミックス粉1種類、冷凍ピラフ2種類、スナック1種類、フレーク3種類、ミックス粉3種類、レトルトピラフ1種類、精米2種類) を購入し、GMバスマティ米の混入に関する実態調査を行った。それぞれの検体から2併行抽出したDNAをサンプルとして、まず、国内外で検出が確認されているGMコメの検知法を用いたスクリーニング検査を行った。その結果、内在性遺伝子PLDの検出のみ陽性であることが確認された (Table 9)。これまでに未確認のGMバスマティ米の混入を検査するため、トランスジェニック遺伝子に汎用される配列を検出するスクリーニング検査を行った (Table 10)。その結果、標的配列の増幅された反応のCt値 (threshold値0.2) はいずれも37以上で高く、土壌細菌やウイルスの混入であることが示唆された。これらの結果から、すべてのバスマティ米含有食品でGMバスマティ米陰性であると判断された。

D. 考察

1) コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定

これまでに開発された GM コメの多くは、パー

ティクル・ガン法やアグロバクテリウム法により遺伝子導入されている。そのため、Kefeng6 系統と Shanyou63 系統のいずれの系統においても構造特異的検知法の標的とする配列は、ゲノム上に複数コピー存在するものと考えられた。一方で、系統特異的検知法の標的とする配列は、ゲノム上に1コピーのみ存在する。デジタル PCR 解析より、GM コメの構造特異的配列は系統特異的配列に比べ試料中に10倍以上混入していることが確認された。以上のことから、コメ加工食品中に微量混入したGMコメをより高感度に検出するためには、系統特異的な配列よりも構造特異的な配列を検出するリアルタイム PCR 検知法の方が有効であることが示唆された。

2) 亜硫酸塩漂白剤処理によるGM作物検査法への影響---漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知

亜硫酸塩処理されたドライパパイヤおよびドライトマトにおいて、リアルタイムPCRを用いた内在性遺伝子の検出は、ドライパパイヤ1製品を除き検査不能であった。また、直接抽出法によるPCR反応や大量DNA抽出法によるDNA収量に改善が見られないことから、試料中のDNAは分解し、残存量も極めて低いと考えられ、pH調整によるDNA抽出効率の改善は困難であると考えられた。以上の結果から、亜硫酸塩処理されたドライフルーツの多くは、加工度が非常に高く、DNA検出を指標とした検査では検出不能となることが判明した。

3) リアルタイムPCRを使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

乾燥ストレス耐性に働くNCED遺伝子はササゲにおいてゲノムDNA上に1コピーのみ存在していることが明らかとなり、ラッカセイ (*Arachis hypogaea*)、インゲン (*Phaseolus vulgaris* L.)、エンドウ (*Pisum sativum* L.)、スタイロ (*Stylosanthes guianensis*) 及びムレスズメ (*Caragana koshinskii*) のマメ科植物のゲノムにもNCED遺伝子の存在が確認された。さらに、マメ科植物だけでなく、コメ、トマト、ジャガイモ、アボカド、ブドウ、トウモロコシ、アラビドプシス等でもNCED遺伝子の存在が報告されている。マメ科内で塩基配列を比較すると多様な配列が認められることから、属および種での特異性の高い内在性遺伝子である可能性があった。ヒヨコマメのGM検査に使用可能な、内在性遺伝子の検知用のプライマープローブを設

計することを目的に、新しくヒヨコマメのNCED遺伝子 (CaNCED) の塩基配列を明らかにした。設計したCaNCED検知用のプライマープローブは特異性および検出限界 (250コピー) に優れているものであった。今後、構築したヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を使用して、GMヒヨコマメの国内の食品への混入状況を継続的に調査していく予定である。

4) 未承認GM作物 (ヒヨコマメ、バスマティ米) の食品への混入に関する実態調査

トランスジェニックベクターに使用される可能性の高いプロモーター4種類 (P35S、PNOS、AINT、Pubi)、ターミネーター2種類 (T35S、TNOS)、薬剤選択マーカー遺伝子 (NPTII、HPT) を特異的に検出するリアルタイム PCR 検知法によりスクリーニングを行った。その結果、いずれの製品においてもGMヒヨコマメ及びGMコメの混入を確認できなかった。土壌細菌やウイルスの混入によって、リアルタイムPCRで増幅が確認されるものがあったが、いずれの検体においてもCt値として非常に高くDNAの微量混入が疑われた。

E. 結論

1) コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定

GM作物の食品への混入を検知するリアルタイムPCRを用いた方法の検出感度は、GM作物由来の標的配列コピー数に大きく影響されることが示唆された。

2) 亜硫酸塩漂白剤処理によるGM作物検査法への影響---漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知

亜硫酸塩処理されたドライフルーツの多くは、加工度が非常に高く、DNA検出を指標とした検査では検出不能となることが示唆された。

3) リアルタイムPCRを使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

ヒヨコマメゲノム上に1コピーのみ存在しているCaNCEDのORFの塩基配列を明らかにし、その塩基配列を基にヒヨコマメに特異的なヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を確立した。

4) 未承認GM作物 (ヒヨコマメ、バスマティ米) の食品への混入に関する実態調査

ヒヨコマメとバスマティ米含有食品のGM作物含有に関する実態調査を行った結果、いずれもGM作物の混入は陰性であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表：

1. Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1-5, 2014.
2. Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20, 161-169, 2013.
3. Nakamura, K., Sakagami, H., Asanuma-Date, K., Nagasawa, N., Nakahara, Y., Akiyama, H., Ogawa, H. Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary diLacNAc structures. *Carbohydrate Research*, 382, 77-85, 2013.
4. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct. *Food Chemistry*, 141, 2618-2624, 2013.
5. 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*, 60, 283-288, 2013
6. 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
7. Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hygiene and Safety Science*, 54, 309-315, 2013.
8. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1454-1459, 2013.
9. 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*, 96, 1054-1058, 2013.
10. 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.
11. 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
12. 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 Hygiene and Safety Science*, 53, 157-165, 2012
13. 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
14. Mano, J., Harada, M., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Noritake, H., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Iizuka, T. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516, 2012

学会発表：

1. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013年11月。
2. Ogawa, H., Kano, F., Otsuki, T., Hoshino, H., Nakamura, K., Mori, H., Sakagami, H. Characterization of the anti-HIV-1 mechanism of

- a pseudoproteoglycan produced by conjugating unsulfated dextran with poly-L-lysine. the 22nd International Symposium on Glycoconjugates, Dalian, China, 2013 年 6 月.
3. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. Pharma-nutrition 2013, Singapore, 2013 年 4 月.
 4. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について（コメの場合）、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
 5. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
 6. 野口秋雄、穂山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
 7. 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：ダイレクトリアルタイム PCR による食品分析の可能性検証、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 8. 野口秋雄、坂田こずえ 真野潤一、中村公亮、高島令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上（西巻）知子：2010 年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 9. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上（西巻）知子：漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 10. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高島令王奈、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上（西巻）知子：熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 11. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、最上（西巻）知子、手島玲子、長澤栄史、近藤一成：ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 12. 近藤一成、中村公亮 野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ、手島玲子、最上（西巻）知子：毒きのこのドラフトゲノムシーケンス、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 13. 坂田こずえ、小櫃冴未、中村公亮、小林友子、野口秋雄、福田のぞみ、最上（西巻）知子、手島玲子、近藤一成：クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法（第 2 報）：加熱、消化処理サンプルへの適用、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 14. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹：シリカモノリススペースによる複雑系穀物マトリックスから DNA の抽出・精製、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
 15. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山口 友紀絵、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏：DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月
 16. 中村公亮、穂山浩、小林友子、野口秋雄、高島令王奈、橘田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子：加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するための PCR プライマー設計について、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月
 17. 中村公亮、穂山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橘田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子：コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月
 18. 真野潤一、原田美央子、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、則武寛通、飯塚太由、中村公亮、穂山浩、手島玲子、高島令王奈、古井聡、橘田和美：遺伝子組換え農産物網羅的検知法の

単一試験室による妥当性確認、2013年度
AOAC International 日本セッション年次大会、
東京、2013年6月。

19. 真野潤一、中村公亮、近藤一成、手島玲子、
高嶋令王奈、橘田和美：デジタルPCRを利用
した遺伝子組換え農産物の高精度定量、日本
食品衛生学会第105回大会、東京、2013年5
月。

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

Table 1. リアルタイムPCRを使用したコメ加工食品(モチ米粉)のGMコメ検出結果

輸入 コメ加工 製品	試験 番号	コメ内在性 遺伝子検知法 SPS		検出 回数	系統特異的			検出 回数	構造特異的			
					Kefeng6				KDEL	検出 回数		
					QK6	Y6	Kef6					
モチ米粉A	1	23.37	23.32	4/4	-	-	-	-	41.69	42.49	4/4	
	2	24.08	23.32		40.15	39.18	-	-	-	38.80		41.33
モチ米粉B	1	25.37	25.14	4/4	-	-	-	-	39.91	39.53	39.23	4/4
	2	25.30	25.11		-	-	-	41.66	-	-	39.13	
モチ米粉C	1	23.81	23.79	4/4	-	-	-	-	-	40.28	40.55	4/4
	2	24.10	23.61		-	-	-	-	-	-	39.77	
モチ米粉D	1	22.63	22.61	4/4	-	-	-	-	-	39.77	39.80	4/4
	2	22.70	22.53		38.88	40.00	-	-	-	-	41.01	
日本晴	1	23.81	24.37	4/4	-	-	-	-	-	-	-	0/4
	2	23.73	23.77		-	-	-	-	-	-	-	

Table 2. リアルタイムPCRを使用したコメ加工食品(ビーフン)のGMコメ検出結果

輸入 コメ加工製品	コメ内在性検知法 (SPS)	検出回数	系統特異的		構造特異的	
			系統特異的検知法 (TT51-1)	検出回数	構造特異的検知法 (Bt63)	検出回数
ビーフン検体A	22.96 / 22.75	6/6	- / -	2/6	39.75 / 37.55	6/6
	23.44 / 23.37		- / 38.76		39.59 / 38.26	
	23.39 / 23.33		38.53 / -		37.69 / 39.24	
陽性種子 (Shanyou63系統)	22.95 / 22.85	6/6	24.62 / 24.70	6/6	23.91 / 23.95	6/6
	23.23 / 22.85		24.94 / 24.79		23.88 / 23.93	
	23.58 / 23.48		24.52 / 24.43		23.79 / 23.72	

Table 3. 漂白剤処理されたパパイヤ及びトマト加工食品の内在性遺伝子検知の結果

NO.	漂白剤	DNA濃度 ng/ μ l	吸光度比		陽性対照 Ct値		Realttime PCR 反応性*
			260/280	260/230			
DP-1	+	0.48	0.42	0.28	-	-	-
DP-2	+	1.71	1.28	0.56	-	42.38	-
DP-3	+	1.37	1.11	0.48	-	39.68	-
DP-4	+	1.21	1.76	0.31	42.54	-	-
DP-5	+	1.68	1.21	0.48	43.81	48.07	-
DP-6	+	0.20	-0.27	0.12	-	-	-
DP-7	+	0.24	-1.56	0.15	40.35	-	-
DP-8	+	21.08	1.68	0.64	45.13	48.65	-
DP-9	+	1.55	4.64	0.65	33.45	33.72	+
DP-10	-	194.21	1.83	2.32	23.09	23.16	+
DT-1	+	0.83	0.87	0.26	-	-	-
DT-2	-	360.97	1.31	0.46	29.57	29.60	+
DT-3	+	-0.47	-3.59	-1.91	-	-	-
DT-4	+	0.37	-1.06	0.35	-	-	-
DT-5	-	4164.67	1.82	2.15	27.28	27.12	+
DT-6	+	2.39	1.52	0.59	-	-	-
DT-7	-	26.39	1.72	1.35	28.21	28.12	+

*+, Ct値43未満が得られた陽性検体；-, Ct値43未満が得られなかった陰性検体

Table 4. 現行法と直接抽出法のリアルタイムPCR反応性*

NO.	漂白剤	パパイヤ陽性(CHY) Ct値			
		現行法	直接抽出法		
DP-1	+	-	-	-	-
DP-2	+	-	42.38	-	-
DP-3	+	-	39.68	-	-
DP-4	+	42.54	-	-	-
DP-5	+	43.81	48.07	48.45	-
DP-6	+	-	-	-	39.49
DP-7	+	40.35	-	-	-
DP-8	+	45.13	48.65	-	-
DP-9	+	33.45	33.72	39.37	37.97
DP-10	-	23.09	23.16	28.11	28.33

*リアルタイムPCRは2併行試験で行い、Ct値はThreshold値0.2の場合を示す。

Table 5. ヒヨコマメ由来NCED配列を標的とするリアルタイムPCR検知法の特異性

No. Plant	Ct value	
	1	2
1 NTC	-	-
2 <i>Cicer arietinum</i>	24.04	24.33
3 <i>Vigna unguiculata</i>	-	-
4 <i>Stylosanthes guianensis</i>	-	-
5 <i>Pisum sativum</i> L.	-	-
6 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	-	-
7 <i>Arachis hypogaea</i>	-	-
8 <i>Glycine max</i>	-	-
9 <i>Zea mays</i>	-	-
10 <i>Oryza sativa</i>	-	-
11 <i>Hordeum vulgare</i>	-	-
12 <i>Avena fatua</i>	-	-
13 <i>Triticum aestivum</i>	-	-
14 <i>Brassica napus</i>	-	-
15 <i>Brassica rapa</i>	-	-
16 <i>Beta vulgaris</i> L. ssp. <i>vulgaris</i>	-	-
17 <i>Linum usitatissimum</i> L.	-	-
18 <i>Solanum tuberosum</i> L.	-	-
19 <i>Solanum lycopersicum</i>	-	-
20 <i>Solanum melongena</i>	-	-
21 <i>Capsicum annuum</i> L. var. 'grossum'	-	-
22 <i>Gossypium hirsutum</i>	-	-
23 <i>Carica papaya</i>	-	-
24 <i>Amygdalus persica</i> L.	-	-
25 <i>Passiflora edulis</i> Sims	-	-

Table 6. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の検出限界試験の結果

copy number	signal rate (positive signals)	mean Ct value	SD	RSD (%)
250000	21/21	27.01	0.2	0.6
25000	21/21	30.77	0.2	0.7
2500	21/21	34.42	0.8	2.3
250	21/21	37.20	0.6	1.5
25	13/21	40.28	1.0	2.5
12.5	7/21	40.67	0.8	2.0
2.5	0/21	-	-	-

Table 7. ヒヨコマメ含有加工食品のGM
ヒヨコマメ混入に関する実態調査結果

sample		NDED	P35S	TNOS
		1	27.15	-
cp-1	2	27.00	-	-
	1	23.40	-	-
cp-2	2	23.48	-	-
	1	30.68	40.71	-
cp-3	2	30.71	40.92	-
	1	26.91	-	-
cp-4	2	26.96	-	-
	1	27.01	-	42.20
cp-5	2	27.66	-	-
	1	27.04	-	-
cp-7	2	27.09	-	-
	1	32.67	-	-
cp-6	2	32.03	-	-
	1	27.44	40.71	-
cp-8	2	27.26	-	-
	1	30.36	-	41.37
cp-9	2	30.37	-	-
	1	28.47	-	-
cp-10	2	28.55	-	-
	1	24.44	38.21	-
cp-11	2	24.41	40.94	39.82
	1	26.28	-	-
cp-12	2	26.27	40.57	-
	1	27.91	-	-
cp-13	2	27.91	-	-
	1	31.73	40.39	-
cp-14	2	31.66	-	-
	1	25.13	-	-
cp-15	2	24.93	-	-
	1	24.41	-	-
cp-16	2	24.32	40.62	41.21
	1	31.45	39.67	-
cp-17	2	31.45	-	-
	1	-	38.71	39.05
cp-18	2	-	41.65	42.90
	1	28.85	-	-
cp-19	2	-	-	-
	1	24.78	-	-
cp-20	2	27.72	-	-
	1	24.60	40.21	-
cp-21	2	24.63	40.99	44.65
	1	24.13	-	-
cp-22	2	24.11	-	-
	1	28.61	-	-
cp-23	2	28.82	39.74	-
	1	33.93	38.73	-
cp-24	2	34.40	-	-

Table 8. GMヒヨコマメ混入に関するリアルタイムPCRスクリーニング調査結果

probe	Ct値								国産ヒヨコマメ	
	cp-1		cp-2		cp-3		cp-4		1	2
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
P35S	-	-	-	-	38.90	-	-	-	-	-
PNOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AINT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pubi	-	-	38.03	37.07	-	-	-	-	-	-
T35S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GOX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPSPS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPSPS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NPT II	-	38.14	-	39.63	36.37	36.07	31.64	31.87	-	-
HPT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

乾燥マメ 粉末 カレー ペースト

Table 9. 国内外で検出が確認されているGMコメの検知法を用いたスクリーニング検査結果一覧

サンプル	PLD	63Bt	NNBt	KDEL	P35S-cry2A	cry2A-T35S
H25-39	28.45	-	-	-	-	-
GMQ	28.45	-	-	-	-	-
H25-40	29.27	-	-	-	-	-
G-tip	29.35	-	-	-	-	-
H25-41	31.04	-	-	-	-	-
G-tip	30.90	-	-	-	-	-
H25-42	33.07	-	-	-	-	-
GMQ	32.85	-	-	-	-	-
H25-43	22.76	-	-	-	-	-
GMQ	22.66	-	-	-	-	-
H25-44	23.10	-	-	-	-	-
G-tip	23.04	-	-	-	-	-
H25-45	23.49	-	-	-	-	-
G-tip	23.49	-	-	-	-	-
H25-46	22.74	-	-	-	-	-
G-tip	22.71	-	-	-	-	-
H25-47	22.33	-	-	-	-	-
GMQ	22.32	-	-	-	-	-
H25-48	22.34	-	-	-	-	-
GMQ	22.40	-	-	-	-	-
H25-49	26.71	-	-	-	-	-
GMQ	26.73	-	-	-	-	-
H25-50	28.77	-	-	-	-	-
GMQ	28.86	-	-	-	-	-
H25-51	26.97	-	-	-	-	-
GMQ	27.01	-	-	-	-	-
H25-52	37.74	-	-	-	-	-
G-tip	38.74	-	-	-	-	-
H25-53	21.90	-	-	-	-	-
GMQ	21.85	-	-	-	-	-
H25-54	21.80	-	-	-	-	-
GMQ	21.79	-	-	-	-	-
日本晴	24.69	-	-	-	-	-
GMQ	24.66	-	-	-	-	-

Table 10. トランスジェニック遺伝子に汎用される配列を検出するスクリーニング検査結果一覧

サンプル	PLD	P35S	NOST	HPT	NPT II
H25-39	28.35	-	-	-	-
GMQ	28.40	-	-	-	-
H25-40	29.25	-	-	-	-
G-tip	29.29	-	-	-	-
H25-41	31.46	-	-	-	-
G-tip	31.46	-	-	-	-
H25-42	32.45	-	-	-	39.58
GMQ	32.31	-	-	-	40.32
H25-43	22.50	40.85	-	-	37.63
GMQ	22.48	-	-	-	37.61
H25-44	23.07	-	-	-	-
G-tip	23.18	-	-	-	-
H25-45	23.37	40.36	41.06	-	-
G-tip	23.37	-	-	-	-
H25-46	22.71	-	-	40.06	-
G-tip	22.78	-	-	-	-
H25-47	22.34	-	-	-	39.24
GMQ	22.37	-	-	-	38.92
H25-48	22.38	-	-	-	41.44
GMQ	22.38	-	-	-	39.99
H25-49	26.66	-	-	-	-
GMQ	26.68	-	-	-	40.98
H25-50	28.74	-	-	-	41.84
GMQ	28.87	-	-	-	-
H25-51	26.96	40.14	-	-	38.97
GMQ	26.88	-	-	-	37.71
H25-52	42.92	-	-	-	38.15
G-tip	37.87	-	-	-	37.97
H25-53	21.83	-	-	-	39.97
GMQ	21.90	-	-	-	41.28
H25-54	21.62	39.35	-	-	33.61
GMQ	21.62	38.18	-	-	33.27

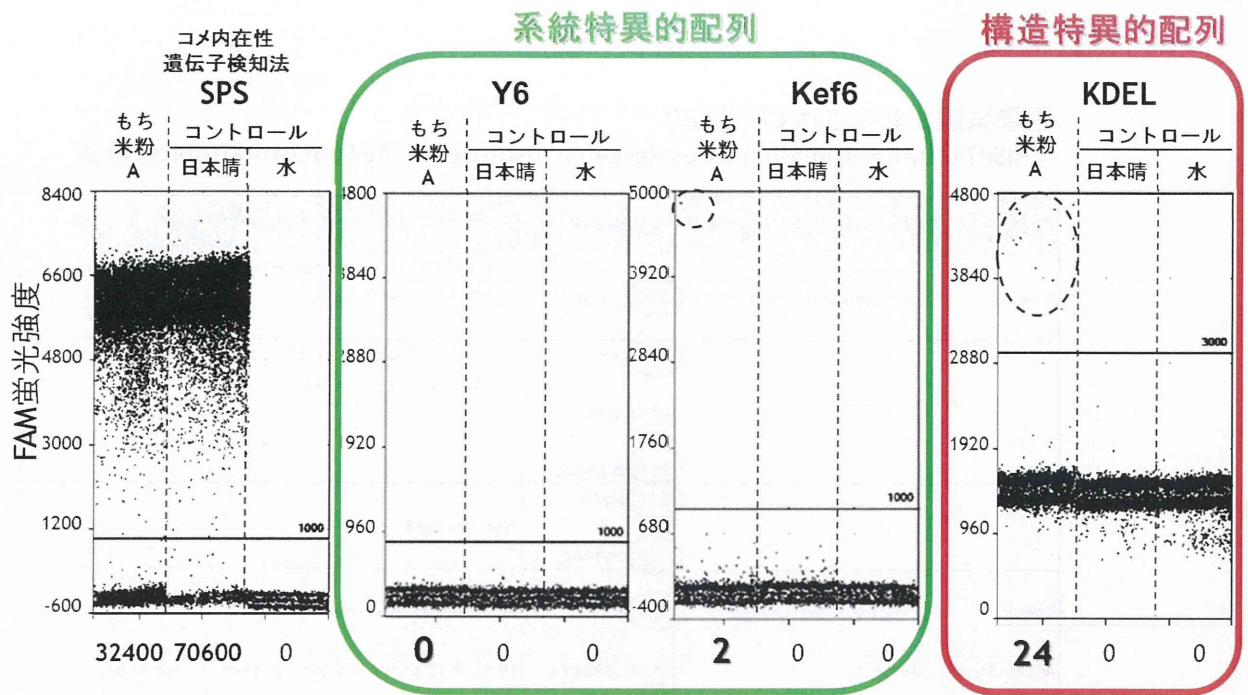


Figure 1. デジタルPCRを使用したコメ加工食品中の標的配列コピー数の測定
BioRad社製QX100 Droplet Digital PCR システム (QX Droplet Generator、iCycler、QX100 Droplet Reader)を使用し、内在性遺伝子検知法(SPS)、系統特異的検知法(Y6、Kef6)と構造特異的検知法(KDEL)の標的配列コピー数を検出した。反応液中の鋳型DNAは60 ng使用した。

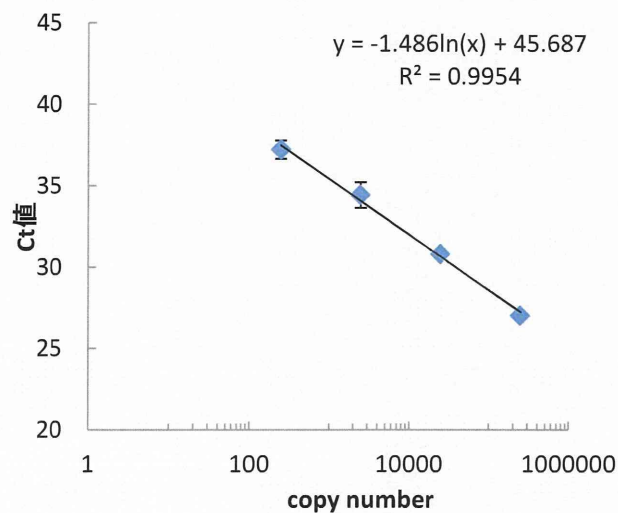


Figure 2. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の定量限界試験の結果

圃場試験が報告されているもの

ICRISAT (The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) 報告

Constraint		Genes	Status
Insect	Helicoverpa armigera	35S::cry1Ab	11 of 25 T3 plants tested in contained field (2005) >50 new events available
		35S::cry1Ac Ubi::cry1Ac	11 of 22 T3 plants tested in contained field (2005) >250 new events available
		35S::cry1Acleg	
		35S::cry2Aa	Work initiated
		35S::cry1Abc	
Fungi	Ascochyta blight Botrytis gray mould	35S::RChit	35 T2 seeds available
Abiotic Stress	Drought	rd29A::DREB1A	10 of 18 T3 plants in dry-down tests in greenhouse
		35S::5CSF129A	10/19 of 51 T3 plants in dry-down tests in greenhouse

<http://www.icrisat.org/bt-ge-chickpea.htm>

Figure 3. インドやバングラディッシュ等で開発され圃場試験栽培が報告されているGMヒヨコマメ一覧
抗害虫や抗カビ感染性及び乾燥耐性ヒヨコマメの開発が進められている。いずれのGMヒヨコマメに
おいてもカリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーターが目的遺伝子の発現に使用されている。

承認組換え生物の検知技術の開発

研究分担者 野口 秋雄 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:

我が国に輸入される安全性承認済みの遺伝子組換え(GM)作物の種類は増加の一途を辿っている。なかでもトウモロコシは品種数が多く、表示の妥当性を検証するために多くの検査法が開発されているが、現在消費者庁から通知されている検査法は新開発 GM 品種には対応しておらず、また実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。そこで本研究では、これらの問題を解決する新たな GM トウモロコシ検査法を開発を行う。本年度は、新開発 GM 品種を検出でき、かつ実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法を開発を行った。新開発 GM 品種を検出するために、GM 品種に広く存在している組換え遺伝子 P35S および tNOS を検出対象とした。また、実験操作の簡便化のために、表示義務の閾値である GM 混入率 5% の判定には multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子(SSIIb)と組換え遺伝子(P35S および tNOS)の Cq 値あるいは Ct 値の差を用いた。プラスミドや genomic DNA を用いた実験から、本スクリーニング検査法は十分な定量性と検出感度を有していることが示され、ABI PRISM™ 7900HT では ΔC_t 閾値を 4.7、LightCycler® 96 では ΔC_q 閾値を 6.0 と決定した。本スクリーニング検査法は、新開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、実験操作の労力を減らすことで、スクリーニング検査の精度を向上させることができると期待される。

A. 研究目的

近年、多種多様な遺伝子組換え(GM)作物が開発され、我が国に輸入される安全性承認済みの GM 作物の種類は増加の一途を辿っている。我が国においては、安全性承認済みの GM ダイズおよびトウモロコシは重量割合で 5%を超えた場合、その旨の表示が義務づけられており、表示の妥当性を検証するための定量法が消費者庁より通知されている。特にトウモロコシは品種数が多く、多くの検査法を必要とする。GM トウモロコシの検査は、(1)スクリーニング検査、(2)系統特異的定量法による検査、(3)粒単位検査の手順で行うことになっている。しかし、現行の(1)および(2)では新規に開発された数種類の GM 品種を検出することができず、また実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。スクリーニングによる新開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、実験操作の労力を減らすことは、検査の精度を向上させるために必要不可欠である。そこで本研究では、新開発 GM 品種を検出できるシステムを導入し、実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法を開発を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

非組換え(non-GM)トウモロコシならびに GM トウモロコシ MON810, GA21, NK603, MON863, MON89034 および MON88017 の種子は MONSANT 社, Bt11, Event176, MIR162, MIR604 および 3272 の種子は Syngenta Seed 社, TC1507 および DAS59122 の種子は PIONEER 社から入手した。

B-2. DNA 抽出

トウモロコシ種子の粉碎には Mixer Mill MM200 (Retsch)を用いた。トウモロコシ粉末試料からの DNA 抽出精製は、シリカ膜タイプカラムの DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN)を用い、以下の手順で行った。粉末試料 1 g に 100 mg/mL RNase 10 μ L および Buffer AP1 5 mL を添加し、よく攪拌した後、65°C で 1 時間保温した(15分ごとに攪拌した)。次いで試料に Proteinase K (QIAGEN) 200 μ L を加え、よく攪拌した後、65°C で 1 時間保温した(15分ごとに攪拌した)。保温後、Buffer AP2 1.8 mL を添加し、よく攪拌した後、氷水中に 15 分間静置した。スイング式遠心分離器にて遠心分離し(2,300 \times g, 室温, 15分間)、上清を 4.2 mL 採取し、QIAshredder Maxi spin column に負荷した。

スイング式遠心分離器にかけ (2,300×g, 室温, 5 分間), 素通り液 3.4 mL を回収した. この溶液に Buffer AP3/E 5.1 mL を添加し, よく攪拌した後, DNeasy Maxi spin column に負荷した. スイング式遠心分離器にかけ (2,300×g, 室温, 5 分間), 素通り液を廃棄した. カラムに Buffer AW 12 mL を加え, スイング式遠心分離器にかけた (2,300×g, 室温, 15 分間). カラムを新しいチューブに移し, あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌水 1 mL を加え, 室温で 5 分間静置した. スイング式遠心分離器にかけ (2,300×g, 室温, 10 分間), 溶出液を回収した. 等量のイソプロパノールを添加し, 上下にゆっくり 10 回転倒混和後, 室温で 5 分間静置した. 遠心分離を行い (12,000×g, 4°C, 15 分間), 沈殿物を 70% (v/v) エタノール 500 μL でリンスし, 遠心分離した (12,000×g, 4°C, 3 分間). 上清を丁寧に廃棄し, 沈殿を風乾後, 蒸留水 100 μL に溶解させた. タッピングにて攪拌後, 4°C で一晩静置し, DNA 試料原液とした.

DNA 試料原液の 260 nm の吸光度の値 1 を 50 ng/μL として DNA 濃度を算出した. 得られた DNA 濃度から, DNA 試料原液をリアルタイム定量 PCR 試験に必要な 20 ng/μL に滅菌蒸留水で希釈して DNA 試料液とし, 使用するまで -30°C で冷凍保存した.

B-3. コントロールプラスミドの作製

スクリーニング試験に用いるリアルタイム PCR を評価するために, 内在性遺伝子 *starch synthase IIb* (*SSIIB*), 組換え遺伝子 cauliflower mosaic virus 35S promoter (P35S) および *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase terminator (tNOS) の部分配列を組み込んだコントロールプラスミドを作製した. PCR にて各部分配列を増幅し, pUC19 の HincII サイトに組み込んだ (pUC-SSIIB, pUC-P35S および pUC-tNOS) (図 1). 増幅した配列に PCR エラーが無いことを確認したのち, 各プラスミドを NdeI で処理し, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてアガロースゲルから抽出・精製した. さらに, エタノール沈殿を行い, 乾燥後の沈殿を Tris/ethylenediaminetetraacetic acid (TE) 溶液に溶解した. 各プラスミドのコピー数は, 後述する singleplex リアルタイム PCR にて定量し, TE 溶液にて希釈試料を調製した.

B-4. リアルタイム PCR

スクリーニング試験は *SSIIB*, P35S および tNOS を検出するプライマー・プローブを用い (表 1), multiplex リアルタイム PCR にて実施した. 機種は ABI PRISM™ 7900HT (Life Technologie) およ

び LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を使用した. PCR 用反応液の組成は以下の通りである. FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science) 5 μL, SSIIB3-5'/SSIIB3-3' (各 0.08 μM), P35S1-5'/P35S1-3' (各 0.25 μM), NOS ter 3-5'/NOS ter 2-3' (各 0.3 μM), SSIIB-TaqV (0.08 μM), P35S-Taq (0.1 μM), NOS-Taq (0.12 μM) を混合し, DNA 試料液またはブランク試料液 (蒸留水) 1 μL を添加し, 滅菌水で全量 10 μL に調製した. 反応条件は以下の通りである. 50°C で 2 分間保温した後, 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, 30 秒, 59°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして, 45 サイクルの増幅反応を行った. 定量試験では, singleplex リアルタイム PCR を行った. PCR 用反応液の組成は以下の通りである. FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science) 5 μL, 対象プライマー対溶液 (各 0.5 μM), 対象プローブ溶液 (0.2 μM, *SSIIB* に対しては SSIIB-Taq を使用した) を混合し, DNA 試料液, 標準プラスミド DNA 溶液 [GM トウモロコシプラスミドセット -ColE1/TE- ((株)ニッポンジーン); 20, 125, 1,500, 20,000, 250,000 copies/2.5 μL] またはブランク試料液 (蒸留水) 1 μL を添加し, 滅菌水で全量 10 μL に調製した. 反応条件は以下の通りである. 50°C で 2 分間保温した後, 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, 30 秒, 59°C, 1 分を 1 サイクルとして, 45 サイクルの増幅反応を行った. PCR 反応は, 各 DNA 試料液あたり 3 ウェル併行して行い, 平均値を求めた.

B-5. 測定結果の解析

ABI PRISM™ 7900HT においては, ベースラインは 3 サイクルから 15 サイクルで設定し, 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 として 0.2 に設定した. 得られた *SSIIB* と P35S および tNOS の Ct 値 (ABI PRISM™ 7900HT) あるいは Cq 値 (LightCycler® 96) の差 (ΔCq 値あるいは ΔCt 値) で評価した.

B-6. スクリーニング検査法の評価

定量性の評価は, コントロールプラスミド (pUC-SSIIB: 50~10,000 copies/μL, pUC-P35S, tNOS: 15~750 copies/μL*, *7,500 copies/μL pUC-SSIIB にて希釈) および各種 GM 品種から抽出した genomic DNA を non-GM 品種の genomic DNA で希釈した試料 (genomic DNA 希釈試料; 混入率 0.15~10%) を用いて行った. 検出限界の算出は, コントロールプラスミド (pUC-SSIIB: 1.25~10

copies/ μ L, pUC-P35S, tNOS: 1.25~10 copies/ μ L*, *7,500 copies/ μ L pUC-SSIIb にて希釈) および genomic DNA 希釈試料 (混入率 0.025~0.15%) を用いて行った. pUC-SSIIb に対する評価は C_t 値あるいは C_q 値にて行い, その他は ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値にて行った.

C. 研究結果

C-1. tNOS プライマー・プローブの検討

新開発 GM 品種の検出のために, GM 品種に広く存在している P35S と tNOS を検出する反応系を用いることにした. tNOS を検出するプライマー・プローブは既に開発されているが, 増幅鎖長が 151 bp と他のもの (SSIIb: 114 bp, P35S: 101 bp) に比べて長い. そこで増幅鎖長を揃えるために, 以前から使われている NOS ter 2-5' の代わりとして新たに NOS ter 3-5' (108 bp) を設計した (表 1). 両者を比較した結果, PCR 効率 (E) に関して NOS ter 3-5' ($E = 96.1\%$) を使用した場合のほうが, NOS ter 2-5' ($E = 94.5\%$) を使用した場合に比べ高かった. そのため, 本研究では tNOS の検出には NOS ter 3-5' を使用することにした.

C-2. プライマー・プローブ濃度の検討

我が国の標準定量法を参照し, 通常の singleplex リアルタイム PCR で使用するプライマー・プローブ濃度で ABI PRISM™ 7900HT にて multiplex リアルタイム PCR を行ったところ, P35S を 1 コピー有する MON810 では混入率 1%, tNOS を 1 コピー有する MIR162 では混入率 10% までしか検出できなかった (図 2). そこで, プライマー・プローブ濃度を検討した結果, “B. 研究方法 / B-4. リアルタイム PCR” に記述した条件において両者とも混入率 0.1% においても検出可能であった (図 2). 以降のスクリーニング検査法では, この条件のプライマー・プローブ濃度にて行うことにした.

C-3. スクリーニング検査法の評価

本研究のスクリーニング検査法では ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値にて GM 混入率 5% 以下であるかを判定する. そのため, ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値の定量性を評価する必要がある. コントロールプラスミドを用いた検討から, 両機種ともに C_t 値あるいは C_q 値において pUC-SSIIb では 50~10,000 copies/ μ L, ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値において pUC-P35S, tNOS では 15~750 copies/ μ L の範囲で高い直線性 ($R^2 = 0.9921\sim 0.9992$) と PCR 効率 ($E = 92.3\sim 100.3\%$) が得られた (表 2). また, genomic DNA 希釈試料を用いた検討から, 両機種ともに ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値において 0.15~10% の範囲で高い直線性 ($R^2 = 0.9912\sim 0.9998$) と PCR 効率 (E

= 92.7~103.2%) が得られた (表 3). 一方, コントロールプラスミドを用いた検討から, 両機種ともに検出限界は C_t 値あるいは C_q 値において pUC-SSIIb では 2.5 copies/ μ L, ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値に対し pUC-P35S, tNOS では 5 copies/ μ L であった (表 4). また, genomic DNA 希釈試料を用いた検討から, 検出限界は ABI PRISM™ 7900HT では ΔC_t 値において 0.10~0.15%, LightCycler® 96 では ΔC_q 値においてすべて 0.10% であった (表 5).

C-4. ΔC_t 閾値および ΔC_q 閾値の決定

本スクリーニング検査法にて GM 混入率 5% 以下であるかを判定するために, ΔC_t 閾値および ΔC_q 閾値を決定する必要がある. 本研究では主要 GM 系統において混入率 5% の genomic DNA 希釈試料を調製し, これらの ΔC_t および ΔC_q から閾値の決定を行った. その結果, ABI PRISM™ 7900HT では ΔC_t 閾値 = 4.7, LightCycler® 96 では ΔC_q 閾値 = 6.0 と決定した (図 3).

D. 考察

安全性承認済み GM トウモロコシにおいて, 現行のスクリーニング検査法および系統特異的定量法による検査法には二つの問題点がある. 問題点の一つとして, 新規に開発された数種類の GM 品種を検出できないため, それらの品種を見逃してしまうことがあげられる. 特に系統特異的定量法による検査法においては, 現在主流になっている GM 品種の多くを検出できないため, 定量検査法としては致命的である. 二つ目の問題点としては, GM 混入率を定量するために検量線の作成ならびに複数の検出対象に対するリアルタイム PCR が必要であるため, 実験操作に大きな労力を要することがあげられる. これらの問題点を解決するために, 本スクリーニング検査法では, GM 品種に広く存在している P35S と tNOS を検出対象とし, multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子 SSIIb と組換え遺伝子 P35S および tNOS の C_t 値あるいは C_q 値の差 (ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値) で GM 混入率 5% 以下であるかを判定することにした. プライマー・プローブ濃度について我が国の標準定量法を参照し, multiplex リアルタイム PCR を行ったところ, 検出感度が著しく低かった. これは, GM 混入率が低い試料においては P35S や tNOS に比べ SSIIb が大量に存在するため, DNA polymerase が後者の増幅反応に占有されてしまったためであると考えられる. そこで, SSIIb を検出するプライマー・プローブ濃度を低く設定することで, 高感度な検出系を構築することができた.

ΔCt 値あるいは ΔCq 値で評価する際、それぞれの検出対象の PCR 効率に大きな差がある場合には定量性が得られない。P35S および tNOS に対する ΔCt 値あるいは ΔCq 値を GM 混入率 5%前後の範囲で評価した結果、高い直線性と PCR 効率が得られたことから、本スクリーニング検査法で算出される ΔCt 値あるいは ΔCq 値は十分な定量性を有することが示された。また、コントロールプラスミドを用いた場合の検出限界は 2.5~5 copies/ μ L, genomic DNA を用いた場合の検出限界は 0.10~0.15%であったことから、本スクリーニング検査法は十分な検出感度を有することが示された。

GM 混入率 5%以下であるかを判定するための ΔCt 閾値および ΔCq 閾値は、混入率 5%の主要 GM 系統の genomic DNA 希釈試料を用いて、ABI PRISM™ 7900HT では 4.7, LightCycler® 96 では 6.0 と決定した。今後は、これらの値が妥当であるかを擬似試料を用いて検証する必要がある。

E. 結論

本研究では、新規開発 GM 品種を検出でき、multiplex リアルタイム PCR を用いることで GM 混入率 5%以下であるかを簡便に判定する新規スクリーニング検査法を開発した。コントロールプラスミドあるいは genomic DNA 希釈試料を用いた実験から、本スクリーニング検査法は GM 混入率 5%前後で十分な定量性を有し、また十分な検出感度を有することが示された。本スクリーニング検査法は、新規開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、実験の労力を減らすことで、スクリーニング検査の精度を向上させることができると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R. and Mogami, T. (2013) Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus Strains in Thailand. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1-5
- (2) Nakamura, K., Akiyama, H., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A.,

Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Jpn. J. Food Chem. Safety* **20**, 161-169

- (3) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct. *Food Chemistry* **141**, 2618-2624
- (4) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *J. AOAC Int.* **96**, 1054-1058.
- (5) Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., and Kitta, K. (2013) Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hyg. Saf. Sci.* **54**, 309-315.

2. 学会発表

- (1) 菅野陽平, 坂田こずえ, 野口秋雄, 中村公亮, 小林友子, 福田のぞみ, 佐藤正幸, 最上知子, 手島玲子, 長澤栄史, 近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (2) 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 坂田こずえ, 小林友子, 福田のぞみ, 手島玲子, 最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月

- (3) 中村公亮, 小林友子, 真野潤一, 野口秋雄, 橘田和美, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (4) 真野潤一, 西辻泰之, 菊池洋介, 福留真一, 遠藤繁, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子, 高畠令王奈, 橘田和美: リアルタイムPCRを用いた食品加工度評価手法の開発, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (5) 中村公亮, 小林友子, 野口秋雄, 大森清美, 高畠令王奈, 橘田和美, 穠山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (6) 野口秋雄, 坂田こずえ, 真野潤一, 中村公亮, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 橘田和美, 穠山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 2010 年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013 年 11 月
- (7) Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J.: Novel Monitoring Scheme for Authorized GM Maize, GMCC-13, Lisbon, 2013.11
- (8) 近藤一成, 坂田こずえ, 赤星千絵, 黒飛希美, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメ場合), 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013 年 11 月
- (9) 中村公亮, 近藤一成, 小林友子, 野口秋雄, 坂田こずえ, 大森清美, 笠原正輝, 高畠令王奈, 橘田和美, 手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知法の試験室間共同試験による妥当性確認, 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013 年 11 月
- (10) 野口秋雄, 穠山浩, 中村公亮, 坂田こずえ, 真野潤一, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 布藤聡, 橘田和美, 近藤一成, 手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発, 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013 年 11 月
- (11) 中村公亮, 穠山浩, 小林友子, 野口秋雄, 高畠令王奈, 橘田和美, 橋本博之, 川上浩, 近藤一成, 手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するためのPCRプライマー設計について, 日本食品化学学会 第 19 回総会・学術大会, 名古屋, 2013 年 8 月
- (12) 中村公亮, 穠山浩, 河野徳昭, 小林友子, 吉松嘉代, 真野潤一, 橘田和美, 大森清美, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定, 日本食品化学学会 第 19 回総会・学術大会, 名古屋, 2013 年 8 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし