

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:

第3世代を含めた遺伝子組換え(GM)作物の多様化が進んでいる。安全性未審査の遺伝子組換え作物(以下、未承認GM作物と略す)の加工食品への混入は未然に防ぐことが求められている。そこで本研究では、第3世代を含めたGM作物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。すなわち、以下に列挙する項目に関する検知技術開発を行った。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 食品衛生法により未承認GMコメの国内への流通・販売は禁止されている。しかし、これまでに海外から輸出されたビーフンやコメ粉などのコメ加工食品から害虫抵抗性の未承認GMコメの混入を認めている。いずれの加工食品についてもGMコメの混入はきわめて微量であったため、次の課題としてより高感度なGMコメ混入に関する検査法の確立が求められた。本研究では、コメ加工食品に混入したGMコメ由来のDNA標的配列のコピー数をデジタルPCRにて測定し、GMコメの混入を正しく判定できるDNA標的配列を評価した。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 市販されるパパイヤ加工食品は、7種類の製品に細分類され、定性リアルタイムPCRを用いたGMパパイヤの混入に関する検査が行われている。しかし、漂白剤(亜硫酸塩)処理されたドライフルーツの陽性対照試験は不検出となることが報告されている。そこで本研究では、亜硫酸塩処理されたドライフルーツにおける陽性対照試験での不検出の実態を精査したので報告する。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 昨年度、ヒヨコマメに特異的で染色体上に1コピーのみ存在する9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (CaNCED, GenBank no.AB771415) 遺伝子のクローニングに成功した。本研究では、明らかとなったCaNCED配列を基に、リアルタイムPCR法を用いた新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を開発した。4) 未承認GM作物(ヒヨコマメ、パスマティ米)の食品への混入に関する実態調査 国内で購入可能なヒヨコマメとパスマティ米食品のGM作物含有に関する実態調査を行った。

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
小林 友子 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部

B. 研究方法

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

試験に供したコメ加工食品(ビーフン及びコメ粉)試料は、厚生労働省医薬品食品局食品安全部を通じて入手した。試料からのDNAの抽出と精製は、陰イオン交換樹脂タイプDNA抽出カラム(Qiagen社製 Genomic-tip 100/G)の改変法を用いた。リアルタイムPCR増幅装置には、ABI PRISM 7900HTを用いた。GMコメのトランスジェニックベクター構造配列の検知法(構造特異的検知法)及びコメゲノムとトランスジェニックベクターとの境界配列の検知法(系統特異的検知法)に使用したプライマー対及びプローブは、既報(Akiyama,

A. 研究目的

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様々である。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。

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出

試料は、市販ドライフルーツ (パパイアとトマト) を用いた。亜硫酸塩処理されたドライパイア 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イア 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 パパイア検査法 (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、パイア内在性遺伝子 (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、ドライパイア 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イアは遠心後、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、破碎した生鮮パイア 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出法の開発

(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 Kuropu 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、パパイア、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出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-CCAAACTTGCATCATCATCATACTC-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出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 で 5 分間加温し、その後、95 30 秒、55 30 秒、72 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 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'-TGTA AACGACGGCCAGT-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 2分、95 で10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95 15秒、60 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知法を利用した。

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知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知法を使用した場合、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、構造特異的検知法では、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、個々の検知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ア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、ウイルスや土壤細菌由来の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、土壤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
 6. 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
 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、高畠令王奈、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
 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
 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：シリカモノリスベ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、穠山 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、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
 17. 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
 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、穠山浩、手島玲子、高畠令王奈、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 日本セクション年次大会、
東京、2013 年 6 月.

19. 真野潤一、中村公亮、近藤一成、手島玲子、
高畠令王奈、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						構造特異的			
					Kefeng6						検出 回数	KDEL		検出 回数
					QK6	Y6	Kef6		検出 回数	KDEL				
モチ米粉A	1	23.37	23.32	4/4	-	-	-	-		-	-	-	41.69	42.49
	2	24.08	23.32		40.15	39.18	-	-	-	38.80	2/4	41.33	37.90	
モチ米粉B	1	25.37	25.14	4/4	-	-	-	-	-	39.91	1/4	39.53	39.23	4/4
	2	25.30	25.11		-	-	-	41.66	-	-		39.13	39.39	
モチ米粉C	1	23.81	23.79	4/4	-	-	-	-	-	-	0/4	40.28	40.55	4/4
	2	24.10	23.61		-	-	-	-	-	-		39.77	40.29	
モチ米粉D	1	22.63	22.61	4/4	-	-	-	-	-	-	2/4	39.77	39.80	4/4
	2	22.70	22.53		38.88	40.00	-	-	-	-		41.01	41.02	
日本晴	1	23.81	24.37	4/4	-	-	-	-	-	-	0/4	-	-	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(ピーファン)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
ピーファン検体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		Realtime 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
cp-1	1	27.15	-	-
	2	27.00	-	-
cp-2	1	23.40	-	-
	2	23.48	-	-
cp-3	1	30.68	40.71	-
	2	30.71	40.92	-
cp-4	1	26.91	-	-
	2	26.96	-	-
cp-5	1	27.01	-	42.20
	2	27.66	-	-
cp-7	1	27.04	-	-
	2	27.09	-	-
cp-6	1	32.67	-	-
	2	32.03	-	-
cp-8	1	27.44	40.71	-
	2	27.26	-	-
cp-9	1	30.36	-	41.37
	2	30.37	-	-
cp-10	1	28.47	-	-
	2	28.55	-	-
cp-11	1	24.44	38.21	-
	2	24.41	40.94	39.82
cp-12	1	26.28	-	-
	2	26.27	40.57	-
cp-13	1	27.91	-	-
	2	27.91	-	-
cp-14	1	31.73	40.39	-
	2	31.66	-	-
cp-15	1	25.13	-	-
	2	24.93	-	-
cp-16	1	24.41	-	-
	2	24.32	40.62	41.21
cp-17	1	31.45	39.67	-
	2	31.45	-	-
cp-18	1	-	38.71	39.05
	2	-	41.65	42.90
cp-19	1	28.85	-	-
	2	-	-	-
cp-20	1	24.78	-	-
	2	27.72	-	-
cp-21	1	24.60	40.21	-
	2	24.63	40.99	44.65
cp-22	1	24.13	-	-
	2	24.11	-	-
cp-23	1	28.61	-	-
	2	28.82	39.74	-
cp-24	1	33.93	38.73	-
	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
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

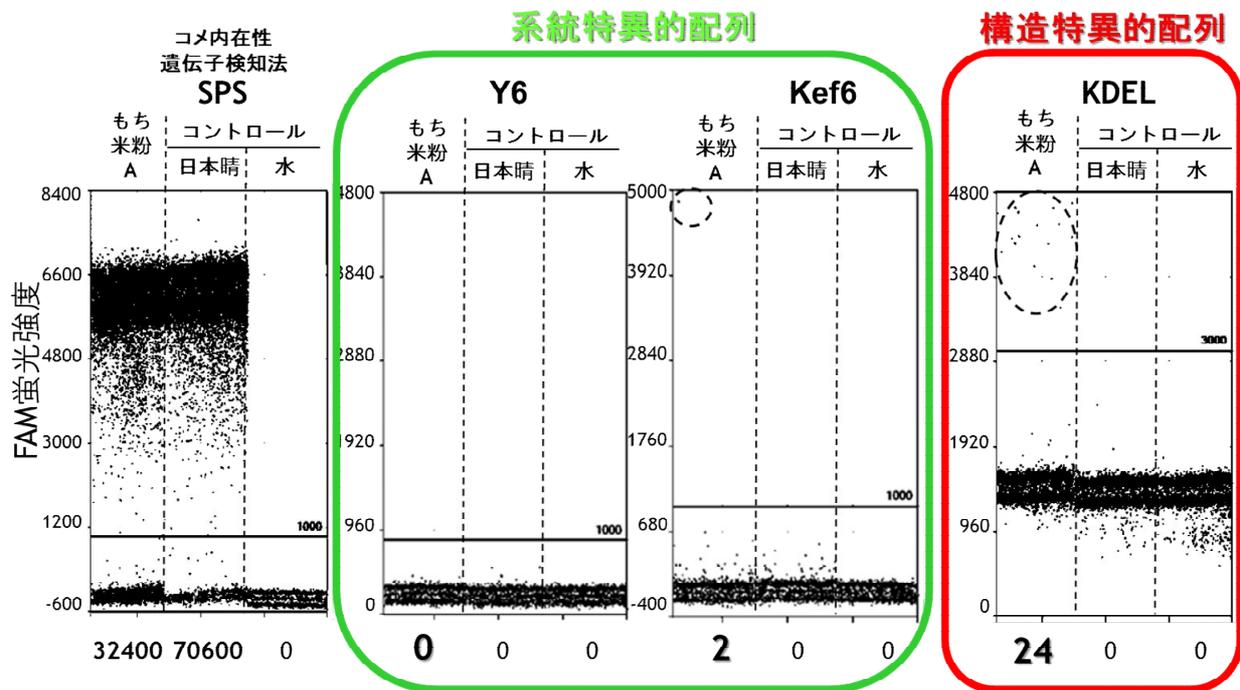


Figure 1. デジタルPCRを使用したコメ加工食品中の標的配列コピー数の測定
 BioRad社製QX100 Droplet Digital PCR システム (QX Droplet Generator, iCycler, QX100 Droplet Reader) を使用し、内在性遺伝子検知法 (SPS)、系統特異的検知法 (Y6, Kef6) と構造特異的検知法 (KDEL) の標的配列コピー数を検出した。反応液中の鋳型DNAは60 ng使用した。

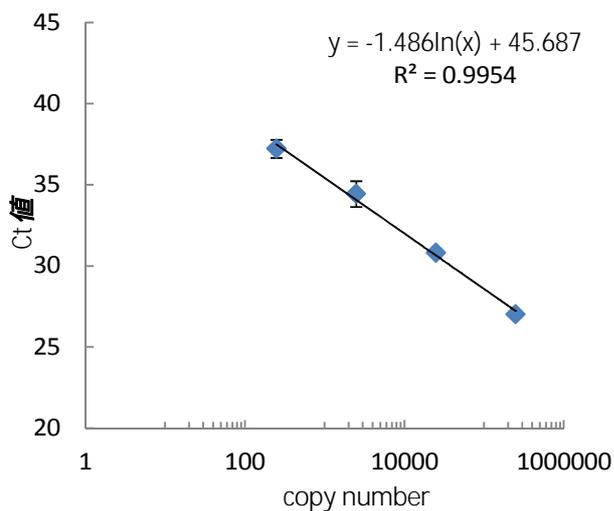


Figure 2. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の定量限界試験の結果

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	11 of 22 T3 plants tested in contained field (2005) >250 new events available
		Ubi::cry1Ac	
		35S::cry1Acleg	
		35S::cry2Aa	Work initiated
		35S::cry1Abc	
		35S::RChit	
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::PSCSF129A	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。