

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書

**次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発**

研究分担者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：次世代バイオ技術は、ゲノム上のあらゆる場所を標的に遺伝子の挿入や欠失などの遺伝子組換え（GM）を可能とする一方で、このような遺伝子操作によるゲノムへの影響に関する知見は十分に得られていない。そこで本研究では、次世代バイオ技術を用いてゲノム上の特定の場所を DNA 二本鎖切断（DSB）または様々な配列の遺伝子を導入することによる、ゲノムへの影響及びゲノム改変部位の検出の可能性に関する解析を行った。次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検出法の確立：近年、GM 技術が身近なものとなり、次世代バイオ技術のみならず従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いて主に新興国で開発され規制外に流通した安全性未承認 GM 作物の食品への混入が社会問題となっている。そこで、多種多様な安全性未承認 GM 作物の検出法の確立を目的に、2011 年に国内のパパイヤ加工食品より検出された安全性未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統の混入した食品をモデルとして次世代シーケンサーで解読した情報を基に GM 配列を解読する手法の開発を行った。

**A. 研究目的**

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

次世代バイオ技術は、ゲノム上のあらゆる場所に変異導入や目的遺伝子の導入などの遺伝子操作を可能とする一方で、技術の安全性を念頭に遺伝子操作による生物への影響については解析が行われていない。そこで本研究では、TALEN を利用してゲノムの特定箇所に二本鎖切断（DSB）及び non-homologous end joining（NHEJ）による DSB 修復、また様々な配列及び配列長の遺伝子をゲノムの標的配列へ特異的に導入（homologous recombination [HR]）することによる、エピゲノムやゲノム構造変化並

びにその変化がもたらす近傍遺伝子の発現への影響について解析を行った。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検出法の確立：

近年、遺伝子組換え（GM）技術が身近なものとなり、次世代バイオ技術のみならず従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いて主に新興国で開発され規制外に流通した安全性未承認 GM 作物の食品への混入が社会問題となっている。そのような GM 作物の混入をより迅速・精確に解析し、かつ詳細な情報を得ることが求められている。そこで、2011 年に国内のパパイヤ加工食品より検出された未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統をモデルとして GM 配列を次世代シーケンサーより

解読する新規な未承認 GM 解析法の確立を試みた。

## B. 研究方法

### 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

#### 1) 培養細胞

ニワトリ細胞は、(独)医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入したニワトリ B リンパ細胞株 DT40 (細胞番号:JCRB9130) 及びニワトリ肝細胞 LMH (細胞番号:JCRB0237) を用いた。DT40 細胞は、RPMI 1640 medium、0.05 mM 2-mercaptoethanol、10% (v/v) fetal bovine serum、5% (v/v) chicken serum を含有する培養液で 40℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養を行った。LMH 細胞は、Waymouth's MB752/1 medium、10% (v/v) fetal bovine serum を含有する培養液で 37℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養を行った。

#### 2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローン化

TAL effector nuclease (TALEN) を用いて培養細胞への GM 操作を行った。TALEN の標的配列は、ニワトリ 14 番染色体のグロビン遺伝子クラスターの非コード DNA 領域 (120,080,385 ~ 12,080,440) とした。TALEN の DNA 結合ドメイン標的配列は、上流側には、5'-TCTTTCATGTTCCACCTAC-3'、下流側には 5'-TAGTGATTTCCAAACACAC-3' のそれぞれ 18 bp とし、それぞれの配列を認識する TALEN 発現ベクターを細胞へ導入した。TALEN による DSB 導入後の遺伝子挿入配列は SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する AcGFP (*Aequorea coerulescens*

green fluorescent protein) 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pAcGFP1-N1 プラスミド (Clontech, CA, USA) とした。Targeting ベクターには、導入配列の 5' 及び 3' 側にニワトリゲノムの相同組換え配列 (800 bp) を組み込んだ。DT40 株はエレクトロポレーション法 (Poring pulse 1 回: 電圧 175 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 10%、Transfer pulse +極 5 回-極 5 回計 10 回: 電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40%)、LMH 株はリポフェクタミン法によりプラスミドを細胞へ導入した。標的配列への GM 操作の確認は、Cel1 アッセイ法、制限酵素 (HpyAV) 消化試験法、及び PCR 法により行った。

導入した細胞は、G418 を 2 mg/ml 加え、薬剤耐性細胞を選択的に培養し、また GFP を発現する細胞を視覚的に選択することでクローン細胞を得た。また、細胞のクローンは、DT40 細胞は 96 穴プレートを使用した限外希釈、LMH 細胞はシングルコロニーをトリプシン-EDTA 処理し細胞を剥離する方法により行った。

#### 3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

遺伝子導入の標的配列から両側 100 kb 近傍に存在する遺伝子の発現測定には、RT-リアルタイム PCR 法を用いた。80%コンフルエントに培養した細胞を (5 ~ 10 × 10<sup>7</sup> 個) を回収し、全細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製した。DNA は RNase-free DNase I (Qiagen) を用いて完全に消化させた。500 ng の精製 RNA を逆転写酵素 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) と oligo dT20 のプライマーを使用して 20 µl の反応液中で逆転写反応を行い cDNA を作成した。2 µl の

cDNA を鋳型に、exon-intron 間でスプライシング標的的境界領域に設定したプライマー対による QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) を用いたリアルタイム PCR 法により遺伝子発現の定量を行った。PCR 反応液は、20  $\mu$ L /well として調製した。組成は以下のとおりである。2 $\times$ QuantiTect SYBR® Green PCR master mix 10  $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50  $\mu$ mol/L) 各 0.2  $\mu$ L を混合し、cDNA 試料液 0.5  $\mu$ L を添加し滅菌蒸留水で全量 20  $\mu$ L に調製した。反応条件は、50 で 2 分間、95 で 10 分間加温し、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。

#### 4) Chromosome conformation capture (3C) 解析

10 mL 培養液に懸濁させた  $1 \times 10^7$  細胞を 2% (v/v)ホルムアミドでタンパク質-DNA の架橋固定を行い、0.125 M グリシンを添加することにより反応を停止させた。その後、PBS で細胞を洗浄し、細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl [pH8.0], 10 mM NaCl, 0.2% NP-40, proteinase inhibitors cocktail [Nacalai, Kyoto, Japan]) を加え細胞を溶解させた。1 $\times$ 制限酵素緩衝液中に 0.3% (w/v) SDS を加え 37 1 時間インキュベーションさせタンパク質を変性した後、1.8% (v/v) Triton X-100 を加えさらに 37 1 時間反応させた。次に、400 U *Bgl*II/400 U *Bam*HI 又は 400 U *Mbo*I を加え、DNA を 37 16 時間消化させた後、65 20 分間加熱し、制限酵素を不活化させた。反応液は、7 mL 1 $\times$ T4DNA ligase buffer と 1% (v/v) TritonX-100 に調製し、37 1 時間インキュベーション後、4000 U T4DNA ligase を加え、16 で 4 時間反応させた。反応後、proteinaseK 及び RNase でタンパク質及び RNA をそれぞれ分

解後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿より DNA の回収・精製を行った。ゲノムの構造解析には、TaqMan Chemistry 法を使用したリアルタイム PCR より定量を行った。

#### 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立 :

モデル食品には、安全性未承認 GM パパイヤ PSRV-YK 系統の混入したパパイヤ茶から精製した DNA を使用した。DNA は illumina 解析用サンプル識別インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動より 400 ~ 500 bp の断片を切り出し精製を行い、アダプター-PCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina Hiseq (Illumina, CA, USA) を使用しシーケンシング解析を行った。

### C. 研究結果

#### 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究 :

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響を解析するため、ニワトリ染色体 14 番 (GenBank accession no. UCD001) の配列上に存在するグロビン遺伝子クラスターの  $\pi$  グロビン遺伝子と  $\alpha$  グロビン遺伝子の間に存在する非コード DNA 領域 (nt no. 12080385 ~ 12080439) を標的に DSB するよう TALEN を設計した (Fig.1)。DSB への HR は、ニワトリゲノムの DSB 標的配列から両側に約 800 bp の配列を利用して、targetting ベクターの設計を行った (Fig.1B)。Fig.2 は、細胞中で発現させる TALEN F/R のアミノ酸配列を示す。DNA 結合ドメインは、18 の反復ドメインからなるものを設計し、それぞれのドメインは特定の 1 塩基への結合性を示すよう設計した。LMH 細胞株

へ TALEN F/R 発現ベクター (各 10  $\mu$ g) をエレクトロポレーション法より導入し、DT40 細胞株へ TALEN F/R 発現ベクター (各 1.6  $\mu$ g) をリポフェクタミン法より導入し、Cell アッセイで DSB を確認した (Fig.3A)。NHEJ させた DT40 細胞株は、限外希釈によりクローン化させた細胞より精製した DNA を HpyAV 制限酵素処理しクローンタイプを判別した。その結果、クローン 1-2 番と 5-4 番はヘテロ、6-5 番はホモであった (Fig.3B)。HR により作成した DT40 細胞株は限外希釈法によりクローン化し、PCR 法により、クローン 1~3 番を得た (Fig.3C)。DSB 標的配列周辺 (70 kb) のゲノム構造を解析するため、3C 解析を行った (Fig.4,5)。その結果、CpGislet 配列 (配列番号 45000) は、 $\alpha$ D グロビン遺伝子配列 (配列番号 50200) に結合しており、 $\alpha$ D グロビン遺伝子配列は  $\alpha$ A グロビン遺伝子配列 (配列番号 54000) と結合していることが示唆された。また、 $\alpha$ D グロビン遺伝子配列は、その上流に位置する MRE 及び -9DHS 遺伝子配列 (配列番号 26233 と 37000) と結合していることが示された。さらに、DT40 細胞株と LMH 細胞株の同ゲノム領域の 3 次元構造は極めて類似しているものであることが示唆された。

DSB の 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子 (TFIIC, Loc425933, RHBDF1, MPG, ggPRX,  $\pi$ ,  $\alpha$ D,  $\alpha$ , TMEM8, P15, Axin1) の発現量の差を、RT-リアルタイム PCR 法により定量した結果、 $\alpha$ A を 1 とした場合、DSB 挿入した両端に存在する  $\pi$ ,  $\alpha$ D、及び MPG の遺伝子発現にて 10 ~ 100 倍上昇したことを確認した。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立 :

PSRV-YK 系統の混入したパパイヤ茶から精

製した DNA (226 ng/ $\mu$ l,  $A_{260nm}/A_{280nm} = 1.82$ ,  $A_{260nm}/A_{230nm} = 2.12$ ) は、平均 DNA 鎖長 5149 bp に分解されていることが示唆された (Fig.7A,B)。精製した DNA は、ソニケーション (Duty cycle 10%, Intensity 5.0 Bursts per second 200, Duration 40 sec Mode, Frequency sweeping Power 23 W, Temperature 5.5~6 ) illumina 解析用サンプル識別インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動より 400~500 bp の断片を切り出し精製を行った (Fig.7C)。アダプター-PCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina HiSeq (Illumina, CA, USA) を使用しシーケンシング解析を行った。その結果、シーケンス解析用インプットデータとして 37.174 Mean quality score で、4,005 Mb、38,747,994 (アダプタートリミング後、% of 30 bases: 95.64%) リード数を得た。ゲノム配列遺伝子バンク Plaza にて提供されている全パパイヤゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) を使用し、得られたリードのマッピングを行った結果、マップされたリード数は、全リード数の 47.5% 18,406,191 であった。PRSV-YK 系統の既知部分配列 120 bp にヒットするリードは一本も得られなかった。Local Blast で、パパイヤ内在性キモパイン遺伝子 (GenBank no.: AY803756) の contig 番号 (contig\_27841) を得た (Fig.8)。

#### D. 考察

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究 :

ニワトリ 14 番染色体の  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター (100 kb) に存在する 11 種類の遺伝子 (TFIIC, loc425933, RHBDF1, MPG1, CGTHBA,  $\pi$ ,  $\alpha$ D,  $\alpha$ A, TMEM6/8, P15, Axin1) の発現を確認



したところ、DT40 株と LMH 株で異なる発現パターンを示す遺伝子は  $\alpha D$  のみであった。3C 解析法により  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスターのゲノム構造の解析を行ったところ、 $\alpha D$  遺伝子の周辺配列において両細胞間で異なるゲノム構造様式を有していることが示唆された。また、 $\alpha D$  遺伝子のプロモーターは上流 1 kb に存在する CpG アイランドに非常に強固に結合していることが明らかとなった。そこで、 $\alpha D$  遺伝子のプロモーターの TATA box と  $\alpha D$  遺伝子上流に存在する  $\pi$  グロビン遺伝子の polyA tail の間の配列を DSB する TALEN の設計を行い、ゲノム構造に及ぼす影響について解析を行った。Cell アッセイ並びに制限酵素消化試験により調製した TALEN の特異性を確認し、標的配列ヘターゲティングベクターを導入することに成功した。現在、 $\alpha$  グロビン遺伝子クラスターの遺伝子発現の違いを野生型及び GM 型で調べ、また細胞に導入する配列の長さによるゲノム構造並びに表現型への影響について解析を行っている。

#### 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立：

加工食品中の断片化されたゲノムを illumina HiSeq を用いてゲノム配列を解析することに成功した。また、得られた次世代シーケンサーのデータは、公開されているパパイヤゲノム配列をリファレンスとしてマッピング解析を可能とした。しかし、パパイヤ加工食品中の GM パパイヤの含有量が少なく、GM パパイヤ由来の配列をアセンブルできなかった。また、パパイヤゲノム配列とマッピングされなかった配列の多くが BLASTn 検索よりバクテリア由来のものであることが示唆された。今後、次世代

シーケンサーで解析可能な GM パパイヤの食品中の濃度を調べる予定である。

#### **E. 結論**

##### 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

ニワトリ染色体 14 番 (GenBank accession no. UCD001) の  $\pi$  グロビン遺伝子と  $\alpha$  グロビン遺伝子の間に存在する非コード DNA 領域 (nt no. 12080385 ~ 12080439) を標的に設計した TALEN を使用し、DSB の NHEJ と HR を確認した。NHEJ したクローン株については、ヘテロ株 2 種類とホモ株 1 種類を得た。HR したクローン株については、4.7 kb のインサート配列を挿入した TG 株 3 種類を得た。遺伝子クラスター内の 100 kb 間に存在する内在性遺伝子の発現量を比較したところ、DSB を挟む形でインサートないの遺伝子発現カセットと同じ方向の  $\pi$  遺伝子と  $\alpha D$  グロビン遺伝子で 10 ~ 100 倍の発現量の上昇が見られた。また、今後、ゲノム構造変化を解析するに当たり、野生株の細胞を使用し、グロビン遺伝子クラスター周辺の 3C 解析を行った。その結果、DT40 細胞株及び LMH 細胞株において CpGislet と  $\alpha D$  遺伝子間には、5.2kb と 3.8kb のループを形成していることが明らかとなった。

##### 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立：

ゲノム解析済みの DNA 配列データをリファレンスとして、加工食品中に存在する断片化された DNA のアセンブリを行った。モデル実験には安全性未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統の混入したパパイヤ加工食品 (パパイヤ茶) を使用した。その結果、次世代シーケンスで解

読可能なインプットデータとして 37.174 Mean quality score で、4,005 Mb、38,747,994 (アダプタートリミング後、% of 30 bases: 95.64%) リード数を得た。今後は、導入された全配列を迅速かつ精確に解読する方法を構築する予定である。

## F. 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、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、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

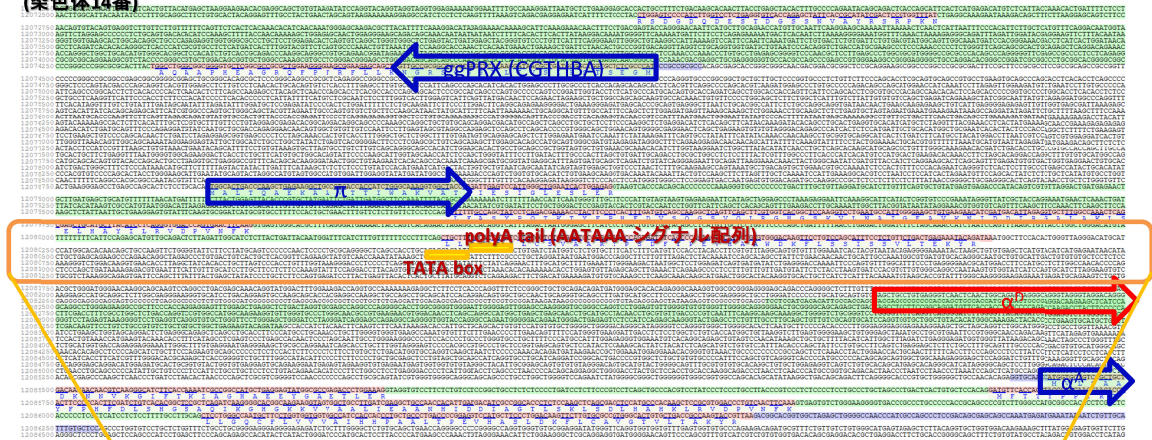
公亮、穂山 浩、手島玲子、高畠令王奈、古井 聡、橘田和美：遺伝子組換え農産物網羅的検知法の単一試験室による妥当性確認、2013 年度 AOAC International 日本セッション年次大会、東京、2013 年 6 月。

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。

## **G. 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

A. ニワトリゲノム配列  
(染色体14番)



B.



- TALEN標的配列
- 標的配列から<400 bp
- 標的配列から<800 bp

C.

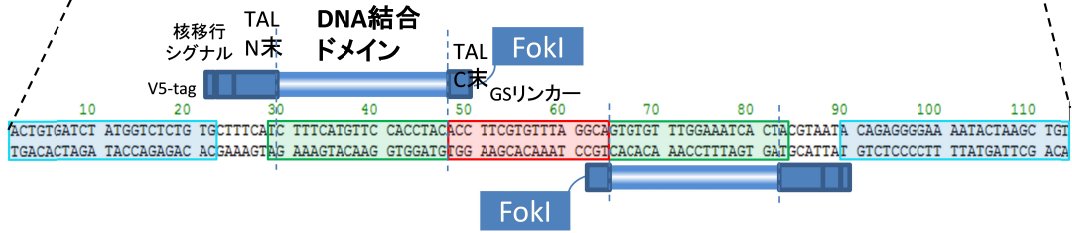


Fig.1 TALEN を使用した標的配列 DNA2 本鎖切断

(A)ニワトリ染色体 14 番(GenBank accession no. UC001, nt no. 12080385 ~ 12080439)を標的に DSB するように設計した。(B)TALEN 標的部より両端<400bp 及び>800bp の配列を示す。(C)TALEN の DNA 結合ドメインと FokI 切断部位を示す。

**V5-tag**  
MGKPIPPLLGLDST

**核移行シグナル**  
GGMAPKKKRKVDGG

**TAL N末**  
VDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSTVAQHHHEALVGHGFTTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLT  
VAGELRGPPLQLDTGQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLN

### TAL-FokI Fw

DNA 結合ドメイン 18.5 repeats ※0 番目の T は N 末ドメインで結合

LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1st Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	2nd Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	3rd Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	4th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	5th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	6th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	7th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	8th Repeat ; NN → G
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	9th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	10th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	11th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	12th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	13th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	14th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	15th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	16th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	17th Repeat ; NI → A
LTPQVVAIASHDGGRPALE	18th Repeat ; HD → C

### TAL-FokI Rv

DNA 結合ドメイン 18.5 repeats ※0 番目の T は N 末ドメインで結合

LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1st Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	2nd Repeat ; NN → G
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	3rd Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	4th Repeat ; NN → G
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	5th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	6th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	7th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	8th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	9th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	10th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	11th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	12th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	13th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	14th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	15th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	16th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	17th Repeat ; NI → A
LTPQVVAIASHDGGRPALE	18th Repeat ; HD → C

**TAL C末**  
SIVAQLSRPDPALAALNTDHLVALACLGGRRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVA

**Gly-Serリンカー**  
GS

**FokI**  
QLVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRY  
VEENQTRNKHINPNEWKVPYSSVTEFKFLVSGHFKNYKAQLTRLNHNITCNGAVLSVEELIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF\*

Fig.2 TALEN アミノ酸配列

設計した TALEN のアミノ酸配列を機能ドメインに分けて示した。N 末→C 末 : V5-tag、核移行シグナル、TAL N 末、DNA 結合ドメイン(TAL-FokI Fw と TAL-FokI Rv)、TALC 末、Gly-Ser リンカー、FokI



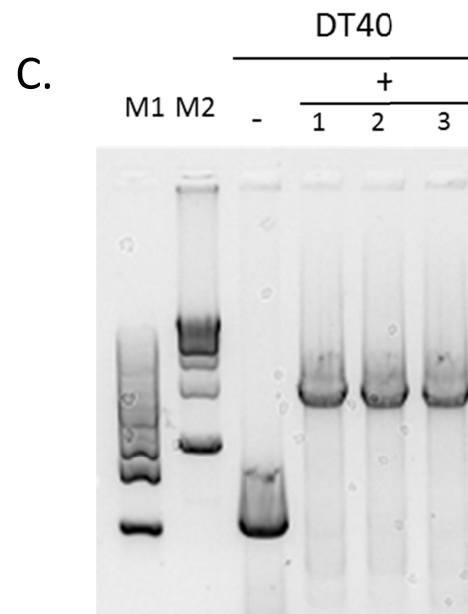
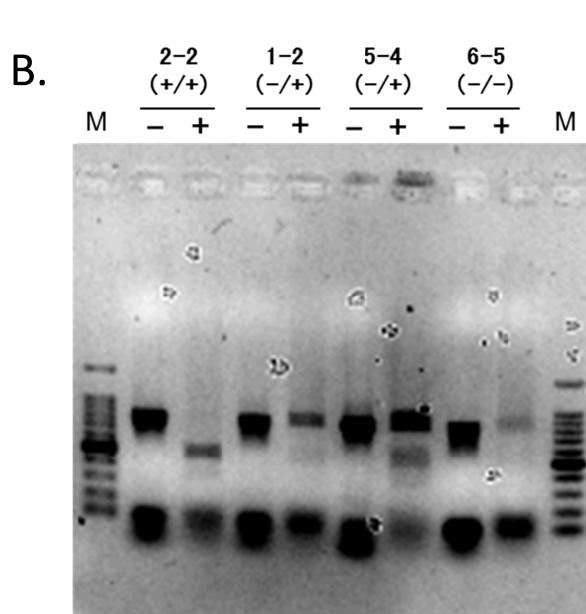
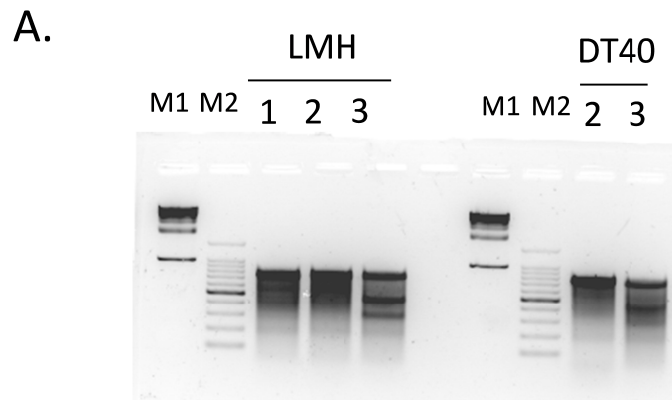


Fig.3 TALEN を使用したゲノム配列ノックアウト、ノックイン細胞株の作成

ニワトリ LMH 細胞及び DT40 細胞を使用し、設計した TALEN の標的配列の切断を Cel1 アッセイより確認した。レーン 1, ブランク細胞 (OptiM 培地のみ、ベクター無); レーン 2, pmaxGFP ベクターを導入した細胞; レーン 3, TALEN/R を導入した細胞; レーン M1, 1 kb DNA ladder marker; レーン M2, 100 b DNA ladder marker

制限酵素 (HpyAV) アッセイ法によるノックアウトクローン株の確認 クローン 2-2 (野生株), クローン 1-2 (ヘテロ株), クローン 5-4 (ヘテロ株), クローン 6-5 (ホモ株) レーン M: 100 b DNA ladder marker +, HpyAV 処理後; -, HpyAV 処理前

C. PCR によるノックインクローン株の確認 レーン 1~3, クローン株 1~3; レーン -, 野生株細胞; レーン M1, 100 b DNA ladder marker; レーン M2, 1 kb DNA ladder marker



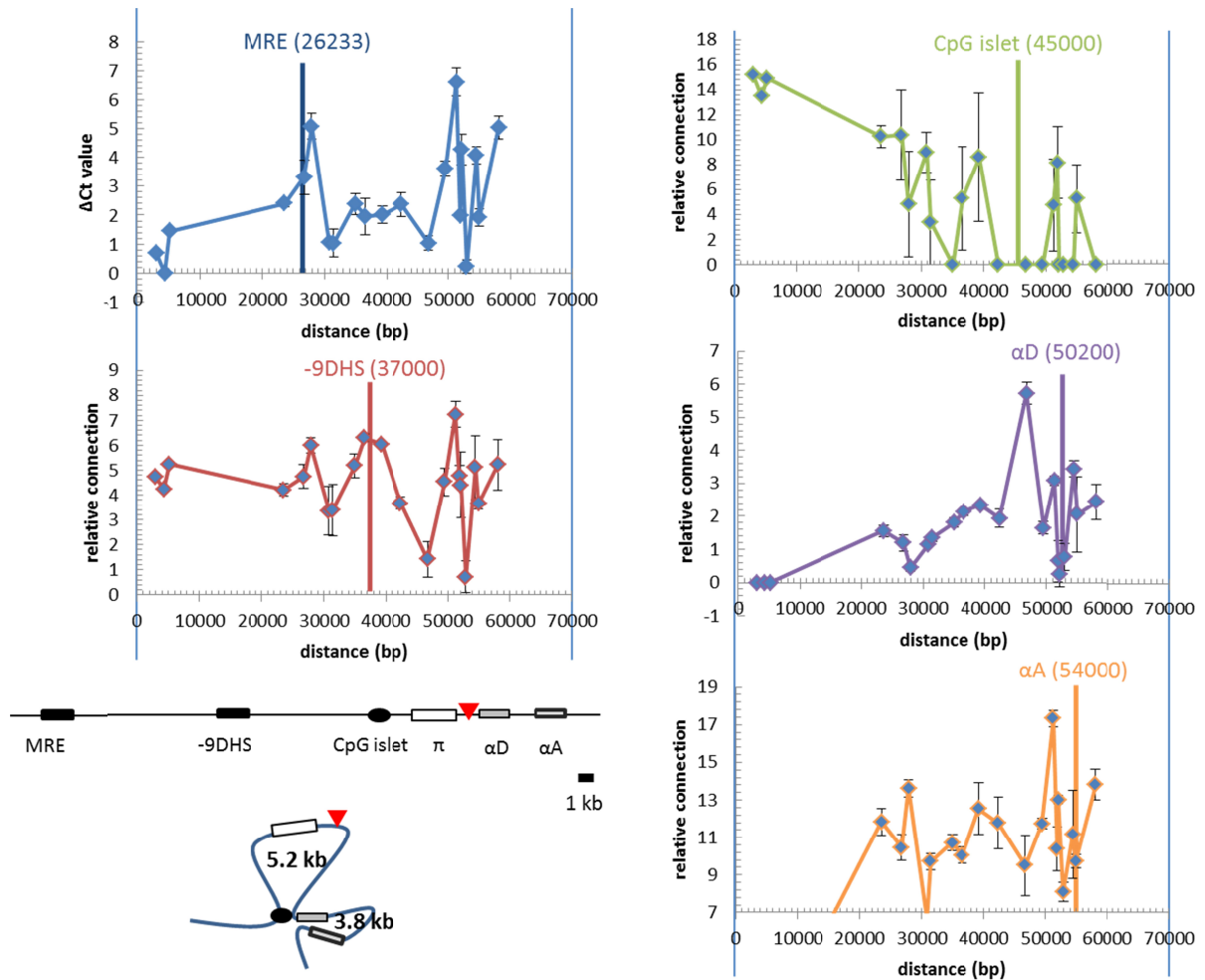


Fig.4 3C analysis (DT40 細胞株)

ゲノムを *Bgl*II, *Bam*HI 処理し、3C 解析に供した。染色体構造パターン解析 (70 kb 範囲) を示す。

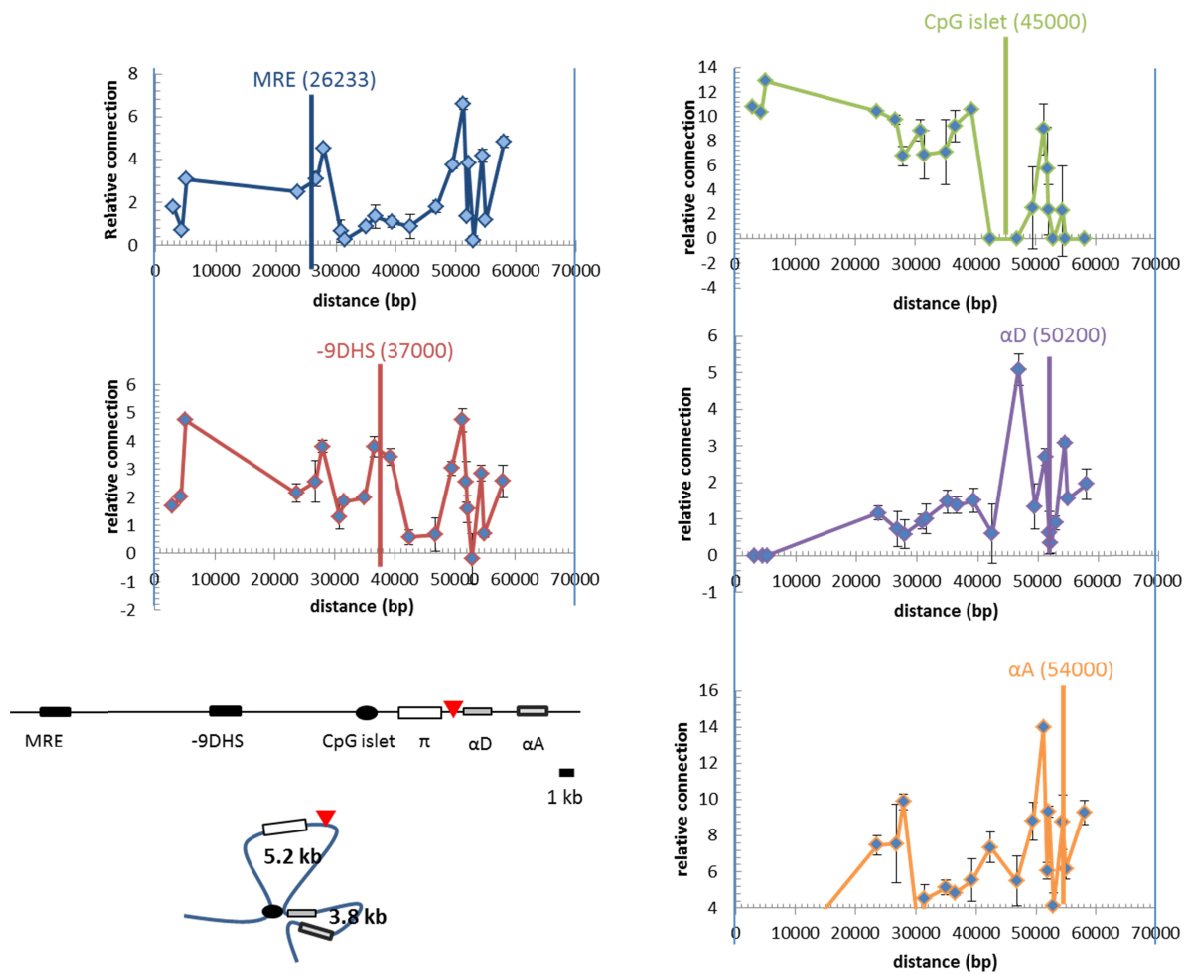


Fig.5 3C analysis (LMH 細胞株)

ゲノムを *Bgl*III, *Bam*HI 処理し、3C 解析に供した。染色体構造パターン解析 (70 kb 範囲) を示す。

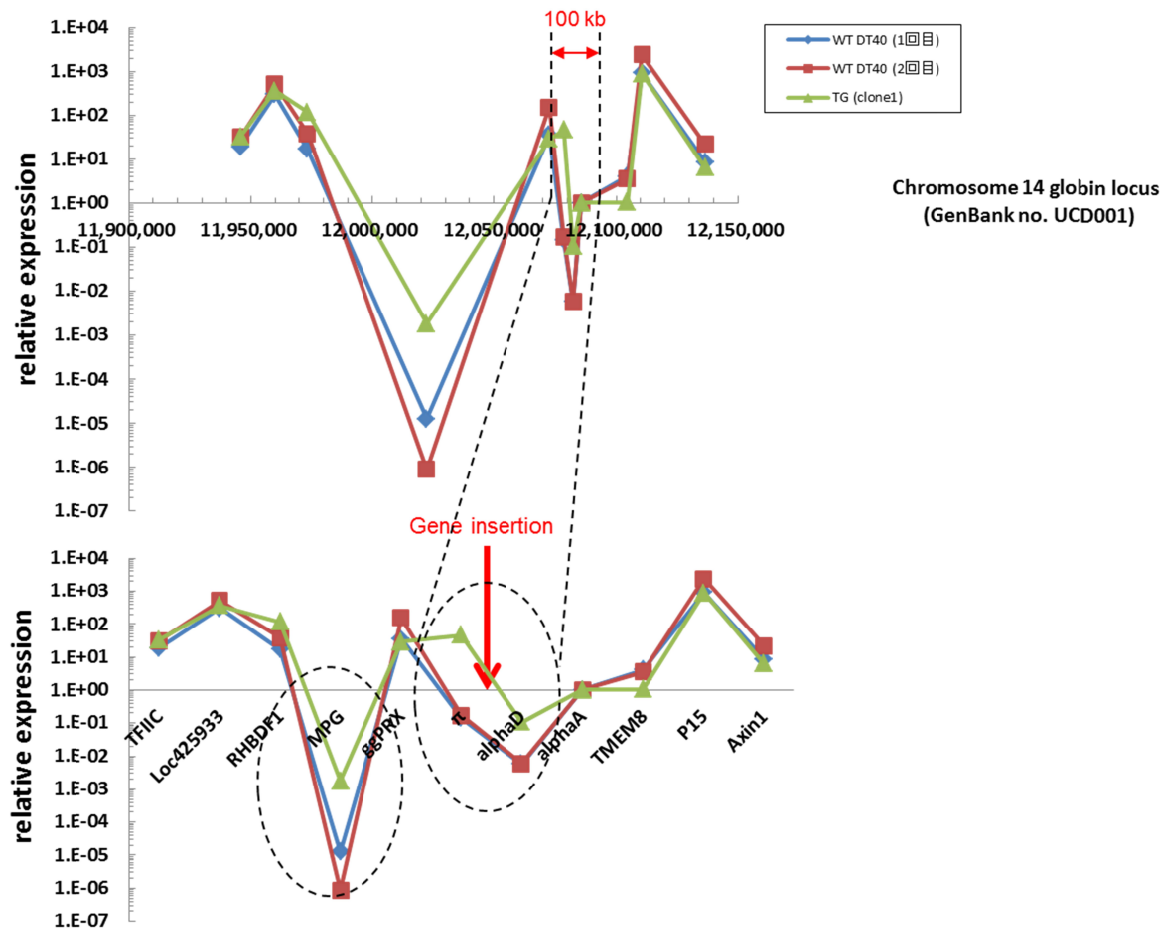
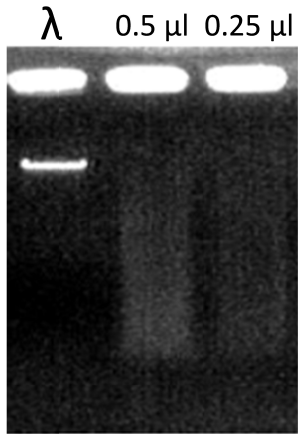


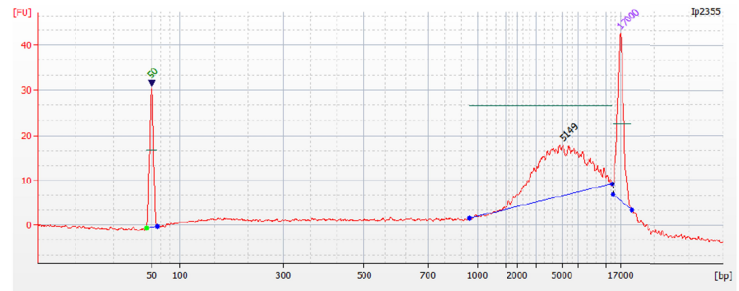
Fig.6 周辺配列の遺伝子発現量の比較

TALENにより作成したTG株の100 kb内に存在する内在性遺伝子の発現パターンをRT-PCR法より解析した。

A.



B.



C.

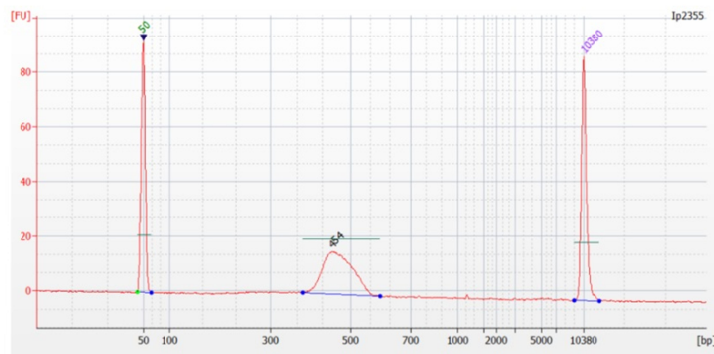


Fig.7 パパイヤ加工食品の次世代シーケンシング解析試料調整

A.パパイヤ加工食品（パパイヤ茶）から精製したゲノム DNA アガロース（1% [w/v]）電気泳動図を示す。

B.バイオアナライザーにより解析したゲノム DNA の分解度（平均 DNA 鎖長 5149 bp）

C.アダプター結合させた IlluminaHiseq シーケンシングに供したパパイヤゲノム断片（400～500 bp）

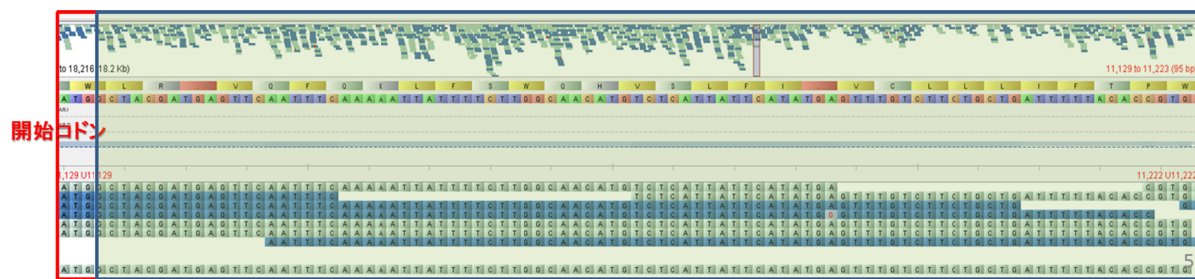


Fig.8 illuminaHiSeq で得られた配列のマッピング解析一例  
 Plaza にて提供されているパパイアゲノム配列 ( Rainbow ゲノム配列[Nature, 452, 991-996, 2008] ) をリファレンスとして、パパイア内在性遺伝子 ( GenBank accession no. AY803756 ) をマッピングした例を示す。