

比較解析を行った。

次いで、発現量の変動のみられたタンパク質の同定を行うために質量分析(MS)解析を行った。質量分析用には、タンパク質を2D-DIGEの時と同様の条件で二次元電気泳動を行い、Ruby染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析(2D-DIGE)のゲルイメージをDecyder BVAソフトを用いてマッチングして、2D-DIGEの解析結果に基づいて6スポット(表1から3 spot (No. 2266, 2212, 822), 表2から1 spot (No. 1355), 表3から2 spot (No. 856, 1233))を指定し、スポットピッカー(GEヘルスケア社)を用いてゲルプラグをピックアップした。ピックアップしたゲルプラグを50%メタノール溶液で洗浄した後に、100 μ lの100 mM炭酸水素アンモニウム及び還元処理液1.5 mgのDTTを1 mlの100 mM炭酸水素アンモニウムに溶解)10 μ Lを添加して57°Cで30分間静置した。さらに、アルキル化処理液10 mgのヨードアセトアミドを1 mlの100 mM炭酸水素アンモニウムに溶解)10 μ Lを添加して室温で30分間静置した。還元アルキル化処理後の試料に対してトリプシン消化液2 μ Lを加えた後に、50 mM炭酸水素アンモニウム10 μ L加えた。チューブを30°Cに設定したドライバス上で一晩培養して消化した。消化後の液を含むチューブを遠心乾燥機に入れて乾燥した。乾燥後にLC-MS/MS測定用の溶媒(1%蟻酸)20 μ Lを加えた。チューブをVortexした後にMS解析用Total recovery tube(ウォーターズ社)に移した。

回収したペプチド溶液は、nanoLC-MS/MS分析は、LC部分にUltiMate® 3000 HPLC(ダイオネクス社)、質量分析装置にQ-Exactive Plus(サーモサイエンティフィック社)を用いXcalibur(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)でLC及びMSを制御して測定を実施した。データベース検索はMascot(マトリックスサイエンス社)を使用しSwiss-Prot及びNCBI Inrの最新版に対して、Lactobacillus(Taxonomy ID: 1578)を指定もしくは、指定せずに検索を行った。

(3)マウスの経口感作、経口惹起によるアレルギー発症のメカニズム解析

(実験1)経口以外の感作モデルとして、安達らの方法²⁾に従った経口感作モデルを用いた。8週齢の雌性BALB/cマウスに、リン酸緩衝生理食塩液(P)あるいは0.5%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を含むPBSに溶解した卵白アルブミン(OVA)0.5 mgを1週間に3日間の閉塞貼付を4回繰り返して感作した(OVA/PおよびOVA/SDS-P群)。最終感作の翌日、OVA 1 mgを腹腔内投与して惹起し、アナフィラキシー症状を観察した。また、最終感作の前日に血液を採取し、血清中のOVA特異抗体をELISAで測定して感作の成立を確認した。

一方、経口感作の本モデルは、7週齢の雌性BALB/cマウスをSAの併用下、生理食塩液とLLの乳化液媒体あるいは生理食塩液に溶解したOVA 1 mgを1週間に2回の頻度で経口投与して3週間感作した(OVA/E+SAおよびOVA/S)。最終感作の4日後、OVA 1 mgを経口投与して惹起し、アナフィラキシー症状を観察した。また、惹起の前日に血液を採取し、OVA特異抗体を測定した。

(実験2)ドナーマウスにSA併用下、乳化液媒体あるいは生理食塩液を用いてそれぞれOVA 1mgを経口投与した(OVA/E+SAおよびOVA/S)。OVAの経口投与後2~3時間後に両群4匹のマウスから腸管膜リンパ節を取り出し、物理的な破砕によって細胞液を調製した。各細胞液からCD4ネガティブセレクションキット(インビトロジェン)を用いてCD4⁺細胞を精製した。2~3匹のレシピエントマウスに1匹あたり 1.8×10^6 個のCD4⁺細胞を3日間隔で2回、静脈内投与し、18日後に血液を採取してOVA特異IgEおよびIgG1抗体を測定、19日後にOVA 1 mgを経口投与して惹起し、アナフィラキシー症状を観察した。

(4) アレルゲン予測の解析法

2013年6月から2014年5月の間にNCBI PubMedに収載された論文のうち、キーワード検索によりエピトープ配列決定に関するものを抽出し、ピアレビューを行ってエピトープ情報を報告していると判断された文献に記載されているエピトープ情報をADFSのデータに追加した。

C. 研究結果

(1)サルモネラ鞭毛抗原導入組換え乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

試料 No. 1 と No. 2 及び試料 No. 3 と No. 4 の

重ね合わせ 2D-DIGE ゲルイメージを図 1 及び図 4 に示した。Decyder DIA ソフトを使用して自動検出されたタンパク質のスポット数は、菌体からは約 3700、培養上清からは約 2700 であった。Decyder BVA ソフトを使用して統計解析を実施した結果、試料 No. 1 と No. 2 の比較及び試料 No. 3 と No. 4 の比較で 1.5 倍以上の増減が確認されたスポットのデータを表 1～表 4 に示した。また、有意差が検出されたスポットのゲルイメージ上の位置を図 2 及び図 5 に示した。

表 1 に示すように、GM 菌体タンパク質で、non-GM 菌体タンパク質に対して 1.5 倍以上の増加が検出されたスポットは 6 個で、表 2 に示すように、1.5 倍以下の減少が見られたスポット数は 7 個と変動のみられたタンパク数は少数であった。培養上清中タンパク質についても表 3 に示す GM 上清の方が non-GM 上清よりも発現の高いスポットは、11 個で、表 4 に示すように、GM で発現の減少したスポットは 4 個と変動のみられたタンパク質は少数であった。

発現に変動のみられたタンパク質のうち、方法の項目で述べた 6 spot を選択し、MS 解析を行った。取得した MS/MS データを NCBIInr 及び Swiss-Prot データベース内で検索し、ヒットしたタンパク質名を二次元電気泳動ゲルイメージ上に示した(図 3 及び図 6)。Spot No. 2212 及び 2266 は、hypothetical protein であり、NCBIInr データベースには機能情報等が登録されていなかったため、BLAST-P サーチを実施してホモロジーの高いタンパク質の中に機能情報のあるタンパク質がないかを検索した。ほぼ 100% 配列が一致するタンパク質として Cell Wall Hydrolase (細胞壁分解酵素) があることが判明した。なお、spot No. 822 は、乳酸菌のピルビン酸脱水素酵素とサルモネラフラジェリンがほぼ同様のペプチド断片のヒットがみられたため、図 3 中には併記した。また、spot No. 1355 は、乳酸菌のホスホグルコムターゼと同定された。培養上清タンパク質の中で同定した spot No. 856 及び 1233 は、それぞれフラジェリンとホスホグルコムターゼ、及びフラジェリンと乳酸菌の分子シャペロン GroEL と同定されたため、図 6 にそれぞれの spot に併記して記した。

(2) マウスの経口感作、経口惹起によるアレルギー発症のメカニズム解析

(実験 1) 経口感作モデルの惹起においては、引っ掻き行動や立毛といった皮膚に局限した症状に加え、活動の低下や反応性の低下といった全身性の症状および OVA/SDS-P 群の 1 例には重篤な全身性症状であるチアノーゼが観察された(表 1)。経口感作モデルでは、やや OVA/SDS-P の方が強いものの、OVA/P においてもアナフィラキシー症状が観察された。OVA/P および OVA/SDS-P 群に検出された抗 OVA IgE および抗 OVA IgG1 抗体レベルは同レベルであった(図 1)。

経口感作モデルの惹起においては、下痢といった消化管に局限した症状が特徴的に観察され、皮膚や全身性の症状の発症は少なかったが、OVA/E+SA の 1 例にはチアノーゼが観察された(表 2)。経口感作モデルでは、OVA/E+SA にはアナフィラキシー症状が観察されたが、OVA/S 群にはアナフィラキシー症状は誘発されなかった。OVA/S および OVA/E+SA 群に検出された抗 OVA IgE および抗 OVA IgG1 抗体は個体差が大きく、全体として同レベルであった(図 2)。

(実験 2) OVA/E+SA の条件で OVA を経口投与したドナーマウスの腸間膜リンパ節 CD4⁺細胞を移入したレシピエントマウスの血清中抗 OVA IgG1 抗体の産生量は、OVA/S の場合より有意に上昇した。一方、抗 OVA IgE 抗体は検出されず、レシピエントマウスへの OVA 経口惹起によるアナフィラキシー症状も観察されなかった。

(3) アレルゲン予測の解析法

キーワード検索とピアレビューにより、本年度は、7 報の論文から 7 種のアレルゲンについて、総数 14 のエピトープ情報を新たに追加した(Table 7)。また、ADFS とリンクするタンパク質情報リソースのデータ更新に伴い、IUIS Allergen Nomenclature 登録名及び UniProt 番号を修正した。本年度のアレルゲン及びエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1,698→1,777、エピトープ既知のアレルゲン数は 137→141、構造既知のアレルゲン数は 117→128、糖鎖付加アレルゲン数は 118→129 となった。

D. 考察

(1) サルモネラ鞭毛抗原導入組換え乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で non-GM と比べ増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。この事実は、以前この乳酸菌モデル組換え体を培養細胞で評価したところ、GM は non-GM に比べ細胞からの TNF 誘導活性が低下しており、その理由として細胞壁のプロテアーゼに対する抵抗性が低下しているという知見との関連が示唆された。GM では、異種由来のタンパク質であるサルモネラの鞭毛抗原の発現により、その対応として細胞壁の融解酵素を誘導しているものと思われた。

(2) マウスの経口感作、経口惹起によるアレルギー発症のメカニズム解析

経皮感作モデルと経口感作の本モデルでは誘発されるアナフィラキシー症状の特徴が異なった。惹起経路の違いによる抗原分布の影響が大きいと考えられるが、経皮感作モデルでは腹腔内投与した抗原が全身性以外に反応する部位は皮膚であるのに対して、本モデルでは消化管であった。本モデルでは、これまでの実験においても、感作したマウスを静脈内投与より経口投与によって惹起した方が強いアナフィラキシー症状を示したように消化管への影響が特徴であると考えられた。

下痢やチアノーゼなど中程度から強度の症状が観察されているのも関わらず、同一の方法で測定した抗 OVA IgG1 抗体のレベルは、経皮感作モデル (OVA/P および OVA/SDS-P 群) に比べて本モデル (OVA/E+SA 群) は低かった。また、バラつきはあるものの、アナフィラキシー症状を誘発しなかった OVA/S 群と大きな差はなかった。血液中の特異抗体量が少なかったことから、本モデル (OVA/E+SA 群) では、免疫反応の場が一部の組織に集中している可能性があると考えられた。

本モデルの投与条件 (OVA/E+SA) で OVA を経口投与したドナーマウスの腸間膜リンパ節 CD4⁺細胞は、抗原を投与していないレシピエントマウ

スに抗 OVA IgG1 抗体を産生させたことから、腸間膜リンパ節の CD4⁺細胞群に特異抗体の産生情報が存在したと考えられた。本モデルの発症機序に腸間膜リンパ節の CD4⁺細胞群が関与していることが示唆された。

E. 結論

(1) サルモネラ鞭毛抗原導入組換え乳酸菌を用いたタンパク質網羅的比較解析

2D-DIGE による、a) GM、b) non-GM の比較では、フラジェリン細胞表層発現させた菌体由来タンパク質 a) に対して b) が、1.5 倍以上減少したスポットが 6 スポット、同増加したスポットは 6 スポットであった。培養上清では、同減少が 11 スポット、同増加が 4 スポットであった。GM で増加した菌体抽出タンパク質の中から 3 スポット、non-GM で増加した 1 スポットについて、また培養上清タンパク質からは GM で増加したスポット 2 つを選び、MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。挿入遺伝子産物であるフラジェリン以外で、GM で増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。

(2) マウスの経口感作、経口惹起によるアレルギー発症のメカニズム解析

新規に開発される食品の安全性確保において、重要な食物アレルギー性の評価に際しては、食物アレルギー自体の発症機序についての知見を得ることもまた重要となる。我々が開発したマウスの食物アレルギーモデルは消化管への影響が特徴的なアレルギー反応を示した。また、本モデルの発症機序に腸間膜リンパ節の CD4⁺細胞群が関与していることが示唆された。

(参考文献)

- 1) Kajikawa A., Satoh E., Leer R.J., Yamamoto S., Igimi S. Intra-gastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine* 25, 3599, 2007
- 2) Adachi R., Nakamura R., Sakai S., Fukutomi Y., Teshima R.: Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten., *Allergy*, 67(11), 1392-1399 (2012)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 手島玲子: 遺伝子組換えコメのアレルギー性並びにプロテオーム解析の一例. ILSI Japan バイオテクノロジー研究部会勉強会(2015.10)

2) Teshima R, Nakamura R., Adachi R., Shindo T., Yamada A., Ohsawa A., Ozeki Y. Differential analysis of protein expression in RNA binding protein-transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress and allergenicity test of the rice extracts. 54rd Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2015. 3)

2. 論文発表

1) Nakamura R., Teshima R.: Immunoproteomic analysis of food allergens. *Methods Mol Biol.* 2014;1072:725-735.

2) Kurokawa S, Kuroda M, Mejima M, Nakamura R, Takahashi Y, Sagara H, Takeyama N, Satoh S, Kiyono H, Teshima R, Masumura T, Yuki Y.

RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds.

Plant Cell Rep. 2014;33(1):75-87.

3) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Hachisuka A, Yamada A, Ozeki Y, Teshima R.: Differential analysis of protein expression in RNA-binding-protein transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress.

J Proteome Res. 2014;13(2):489-95.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

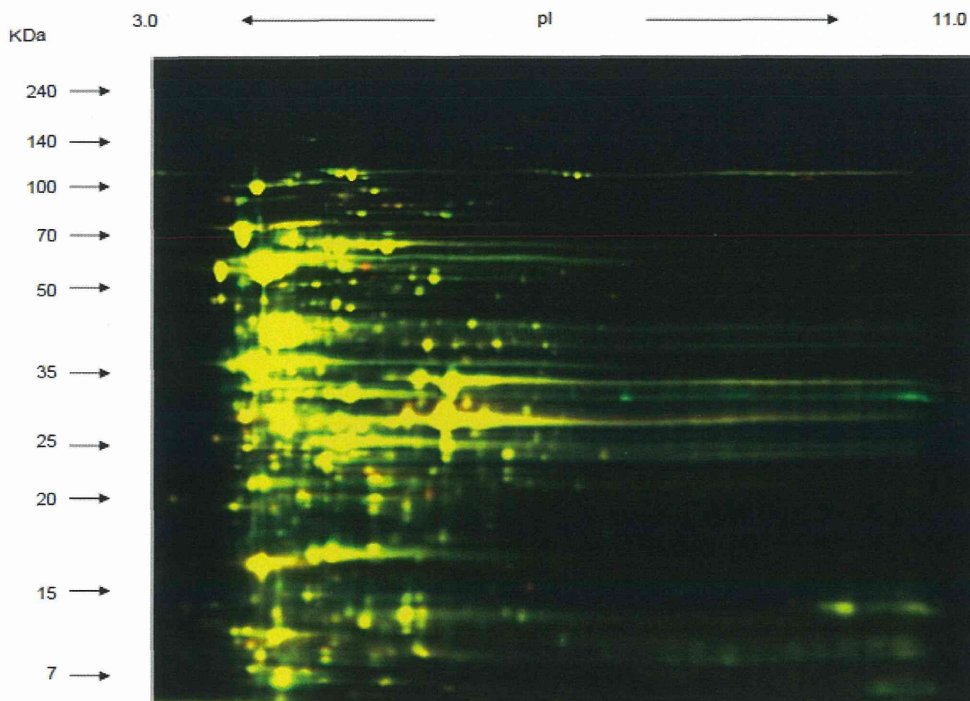


図1 No.1 と No.2 の重ね合わせ 2D-DIGE-gel イメージ
 Cy3: 緑- No.1(GM), Cy5: 赤-No.2(non-GM)
 両サンプルに同程度含まれるスポットは黄色で表示される。

表1. No.1に対してNo.2で 2/3倍以下の減少が検出されたスポット

Protein Table T-test and Av.Ratio: No2 / No1

No.	Master No.	P-value	Av. Ratio	1-ANOVA
1	2266	4.10E-05	-5.17	4.10E-05
2	2212	4.20E-05	-4.04	4.20E-05
3	898	0.00031	-3.03	0.00031
4	822	0.00015	-1.63	0.00015
5	964	0.0016	-1.60	0.0016
6	594	0.00071	-1.53	0.00071

表2. No.1に対してNo.2で 1.5倍以上の増加が検出されたスポット

No.	Master No.	P-value	Av. Ratio	1-ANOVA
1	3393	3.60E-05	2.76	3.60E-05
2	821	4.40E-05	2.12	4.40E-05
3	672	1.10E-05	1.88	1.10E-05
4	1355	0.0006	1.84	0.0006
5	2942	0.0019	1.82	0.0019
6	2272	0.0017	1.63	0.0017
7	886	0.0065	1.52	0.0065

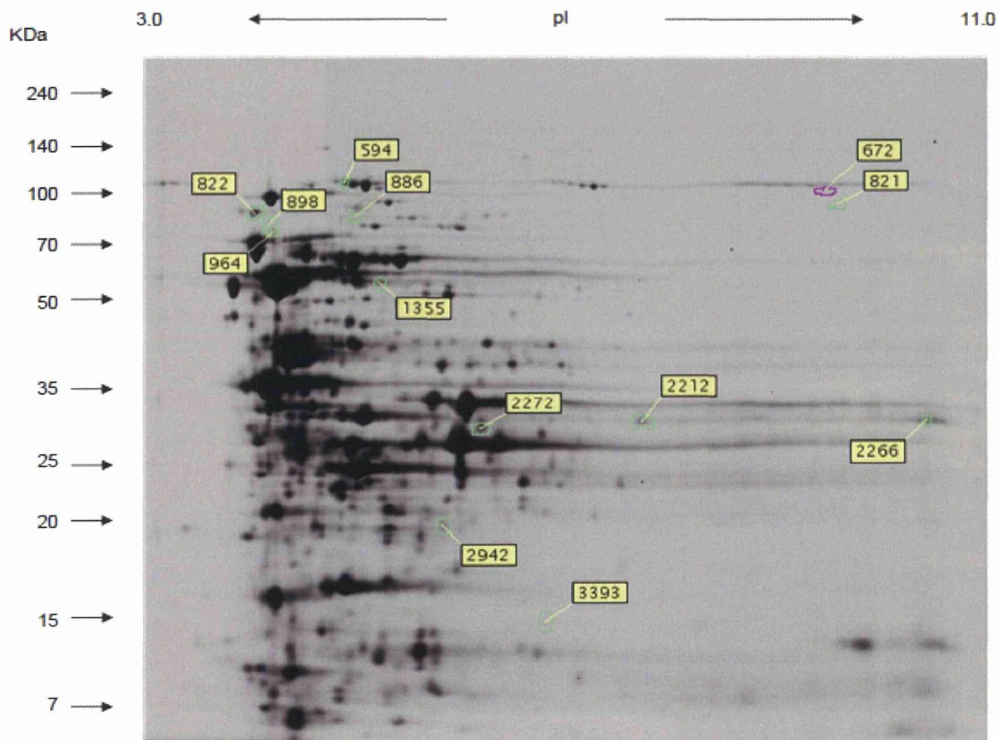


図2 No. 1 と No.2 間で発現量に差 (1.5 倍以上の増減, p 値<0.01) が検出されたスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

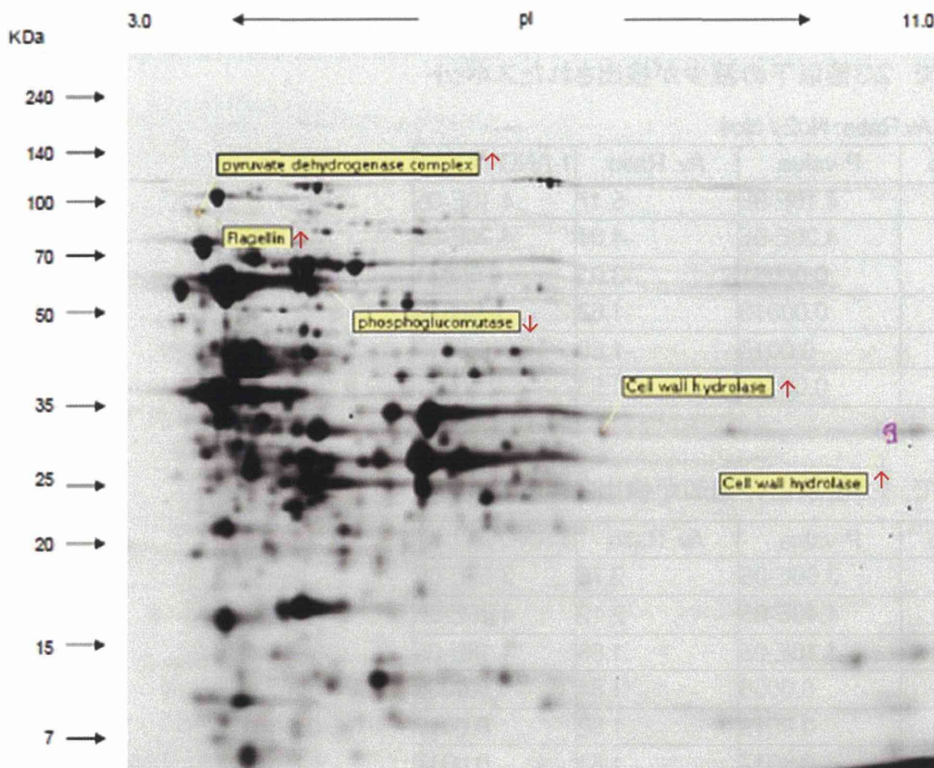


図3 MS 解析で同定されたスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置
試料 No.1-No.2 間で変動が検出されたスポット(↑: No.1>No.2, ↓: No.1<No.2)

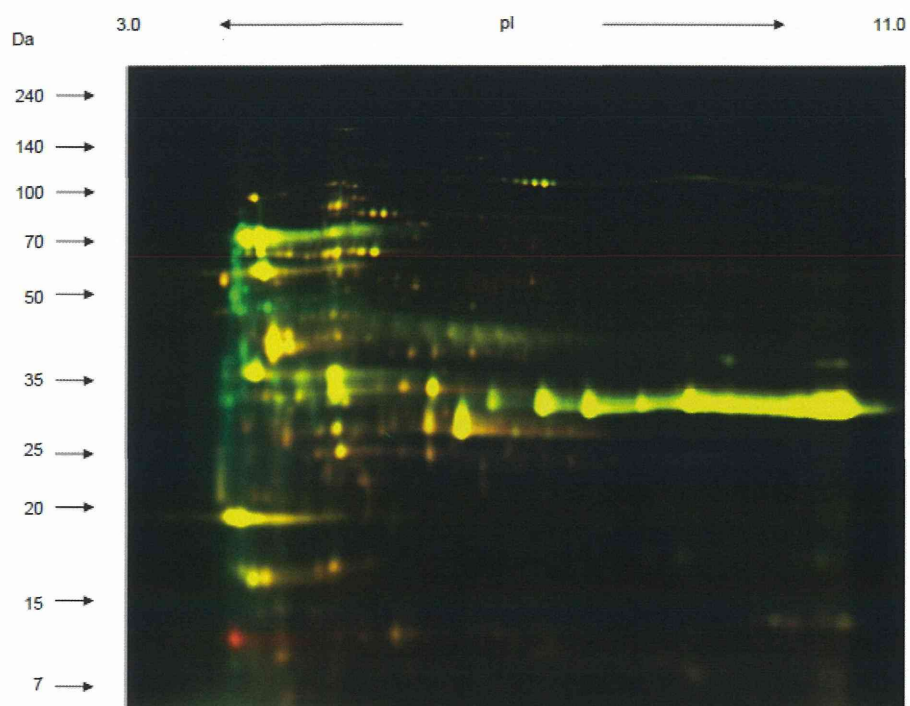


図4 No.3 と No.4 の重ね合わせ 2D-DIGE-gel イメージ
Cy3: 緑- No.3 (GM), Cy5: 赤-No.4(non-GM)

表3. No.3に対してNo.4で 2/3倍以下の減少が検出されたスポット

No.	Master No.	p-value	Av. Ratio	1-ANOVA
1	1343	0.00054	-33.68	0.00054
2	856	0.0015	-20.00	0.0015
3	1177	9.70E-05	-8.79	9.70E-05
4	637	0.00046	-6.73	0.00046
5	900	1.30E-05	-6.53	1.30E-05
6	1233	0.00079	-5.38	0.00079
7	286	0.0002	-3.46	0.0002
8	912	0.035	-2.38	0.035
9	573	0.00087	-2.13	0.00087
10	1067	0.0023	-2.08	0.0023
11	885	0.00017	2.08	0.00017

表4. No.1に対してNo.2で 1.5倍以上の増加が検出されたスポット

No.	Master No.	p-value	Av. Ratio	1-ANOVA
1	2233	0.0014	2.60	0.0014
2	655	0.006	3.52	0.006
3	654	4.10E-05	4.35	4.10E-05
4	2426	0.00062	5.44	0.00062

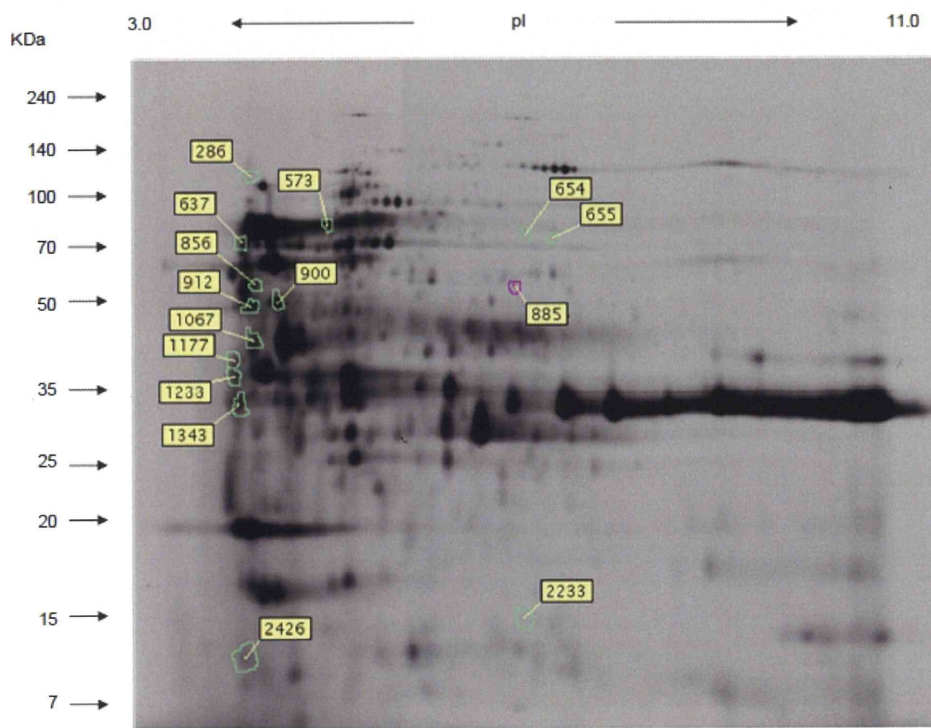


図5 試料 No. 3 と No. 4 間で発現量に差 (1.5 倍以上の増減, p 値<0.01) が検出されたスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

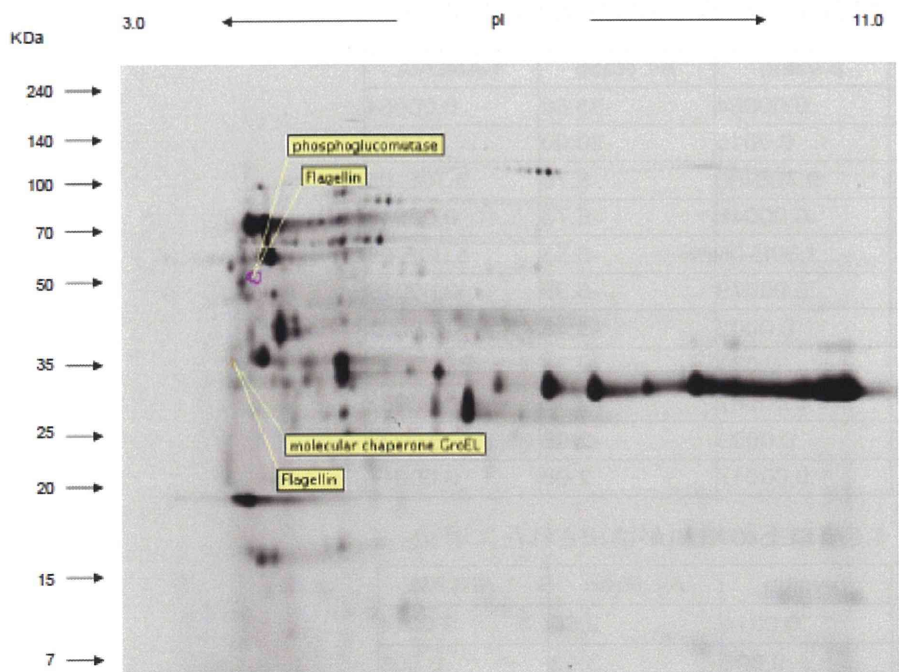


図6 MS 解析で同定されたスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置
試料 No.3-No.4 間で変動(No.3>No.4)が検出された 2 スポットを選択

表 5 経皮感作モデルにおいて誘発されたアナフィラキシー症状

症状	OVA/P	OVA/SDS-P
	(観察例数/群匹数)	
口、耳、鼻などを掻く	4/5	—
後ろ足で耳の穴を掻く	—	1/4
立毛	4/5	4/4
1分以上動かない	5/5	4/4
口の周囲や尾のチアノーゼ	—	1/4
ひげに触れても反応しない	—	4/4

表 6 経口感作モデルにおいて誘発されたアナフィラキシー症状

症状	OVA/S	OVA/E+SA
	(観察例数/群匹数)	
症状なし	6/6	2/6
鼻の周囲を掻く	—	1/6
下痢	—	3/6
チアノーゼ	—	1/6

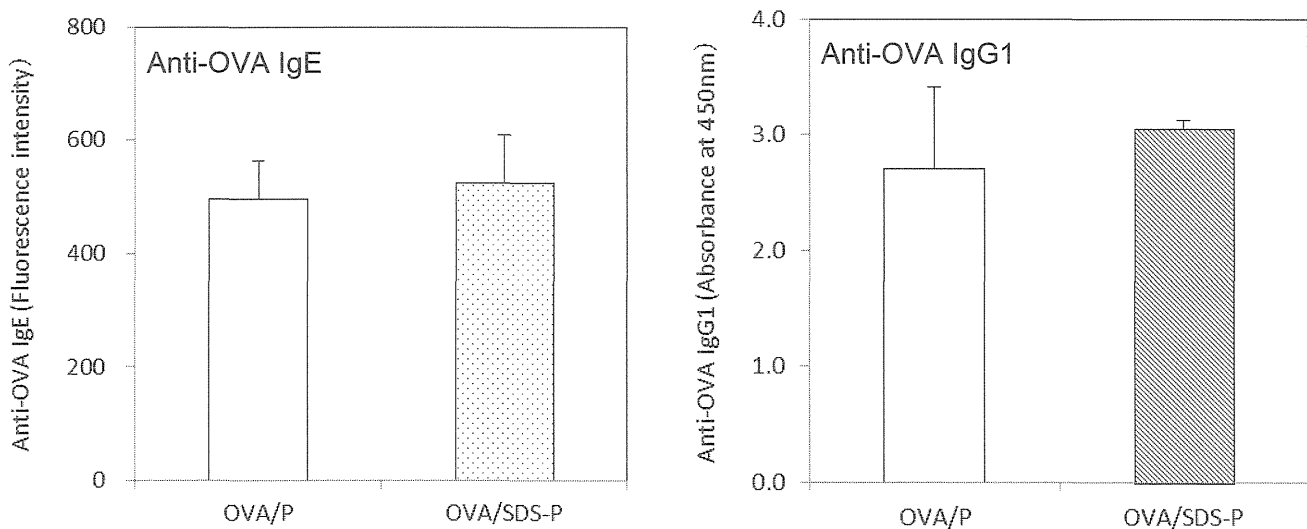


図 7 経皮感作による OVA 特異抗体の産生

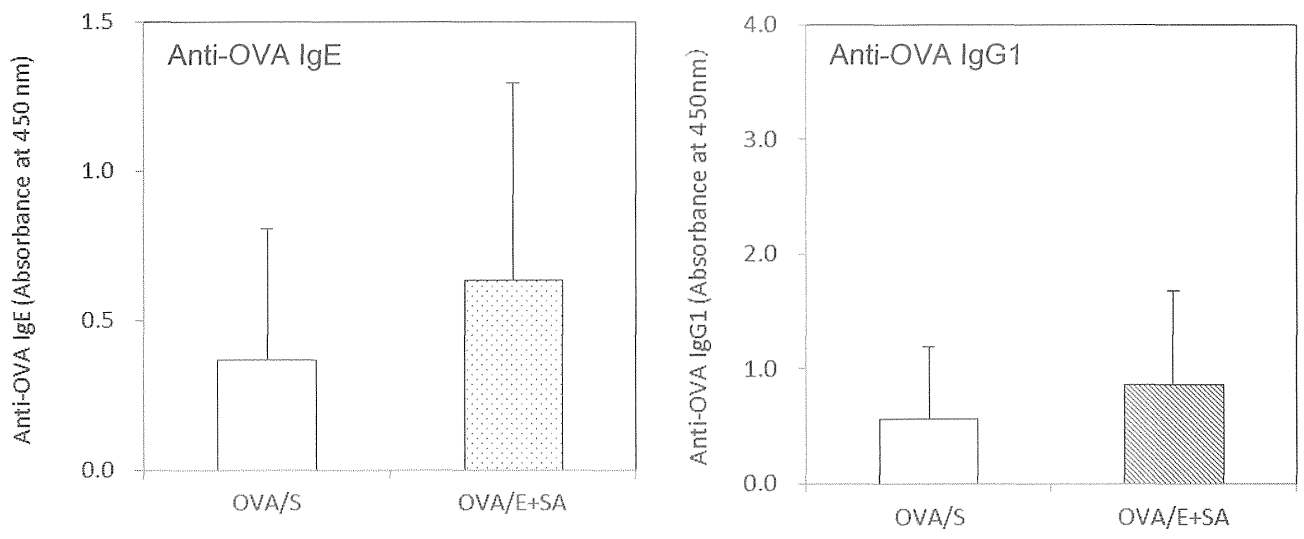


図8 経口感作によるOVA特異抗体の産生

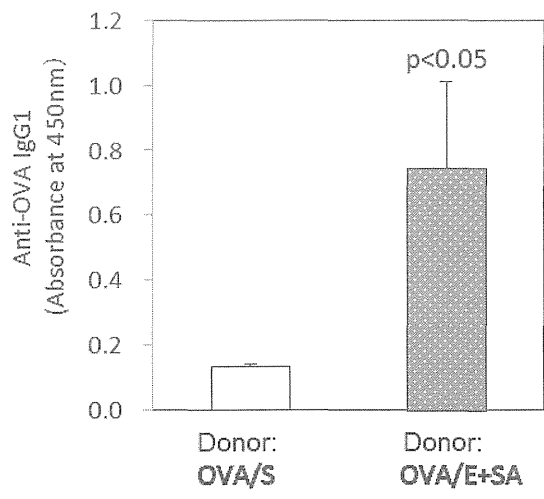


図9 経口感作マウスの腸管膜リンパ節CD4⁺細胞の移入による抗原特異IgG1抗体の産生

表7 本年度新たに追加したエピトープ情報

Name	start	end	Sequence	Method	CTYPE	Reference	UniProt acc.No
001 Scyp ?	127	141	CGRSMEGYPFNPOLT	SPOTs	L	PMID 23911402	H6VGI3
Scyp ?	141	155	TEAQYKEMESKVSST	SPOTs	L	PMID 23911402	H6VGI3
Scyp ?	211	225	YHNDNKTFVLWDNEE	SPOTs	L	PMID 23911402	H6VGI3
Scyp ?				Dot-blot/ELISA	C	PMID 23911402	H6VGI3
002 Der p 7	168	182	HIGGLSILDPIFAVL	Dot-blot inhibition	L	PMID 23940735	P49273
003 Bos d 8	21	35	IKHQGLPQEVLNENL	Peptide array	L	PMID 24035023	P02662
Bos d 8	26	40	LPQEVLNENLLRFFV	Peptide array	L	PMID 24035023	P02662
Bos d 8	91	105	VEQKHIQKEDVPSEK	Peptide array	L	PMID 24035023	P02662
Bos d 8	140	155	GIHAQQKKEPMIGVND	Peptide array	L	PMID 24035023	P02662
Bos d 8	186	200	TQYTDAPSFSDIPNP	Peptide array	L	PMID 24035023	P02662
004 Phi p 5.0101				inhibition ELISA with anti-peptide serum	C	PMID 24182774	Q40960
005 Ara h 1				phage display	C	PMID 24365751	P43237
006 Hev b 2	63	63	N63	direct ELISA/Basophil activation	S	PMID 24531467	A2TM14
Hev b 2	350	350	N350	direct ELISA/Basophil activation	S	PMID 24531467	A2TM14
007 Pen cr 26						PMID 23902156	H2E5X2

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）
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書（平成26年度）
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 生化学部 室長

研究要旨

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 現在、わが国では、安全性承認済み遺伝子組換え(GM)コメは1品種も認められていない。そのため、GMコメの食品への混入は食品衛生法により禁じられている。しかし、諸外国ではGMコメを食品として認可している。そのような状況の中、これまでに2006年には米国産除草剤耐性のLLRICE601系統、2007年と2009年には中国産害虫抵抗性のBt63とKemingdao及びKefeng6系統のコメ加工食品への意図せぬ混入が報告された。欧州では、わが国同様にGMコメは食用として1品種も認められていない状況にあるが、2013年1月から2014年11月末までに欧州食品飼料緊急警告システム(RASFF)は、GMコメ(Bt63系統など)の混入を27件報じた。わが国のGMコメ混入に関する違反事例では、いずれのケースも極めて微量の混入であることが確認されており、そのため、食品中のGMコメをより高感度に検出する方法が求められる。そこで、本研究では、GMコメの混入した加工食品の実サンプル中に存在する標的配列のコピー数を算出し、GMコメの標的配列の特性を明らかにしたので報告する。2) 標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み 真核生物の細胞に感染したDNAウイルスのウィルスゲノムDNAは、宿主から高度なエピジェネティック修飾を受けることが報告されている。本研究では、多種多様なGM作物の作出に汎用されるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35S RNAプロモーター(P35S)に着目した。P35Sの検出は、GM食品の混入に関する種々のスクリーニング試験に使用されている。しかし、野菜ジュースや片栗粉などの加工食品中にCaMVの混入が度々報告されていることから、P35Sが検出された食品はGM食品の混入に関する「擬陽性」判定となる問題が生じていた。そこで、植物に感染させたCaMVのP35S並びにGM作物の目的遺伝子発現のために導入されたP35SのDNAメチル化修飾パターンを解析した。その結果、CaMVのP35Sは高度にメチル化されており、またGM作物のP35Sメチル化修飾パターンとは全く異なることが判明した。本研究では、P35SのDNAメチル化量とDNAメチル化パターンを検出することで、ウイルスまたはGM作物の混入を検知する手法に新規性を見出した。3) CaNCED配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発 近年、インドやバングラディッシュなど南アジアの国々では、害虫抵抗性を獲得させたGMヒヨコマメの商業栽培に向けた開発が進められている。GMヒヨコマメは、我が国では未だ安全性未審査であるため、食品衛生法により国内への流通・販売が禁止されている。したがって今後、GMヒヨコマメの食品への意図せぬ混入に関し注意が必要である。本研究では、リアルタイムPCRを用いてGMヒヨコマメの混入を検知する際の陽性コントロールに使用するヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を開発した。今年度は、世界中で栽培される様々なヒヨコマメ品種より標的ヒヨコマメ遺伝子NCED1の塩基配列をクローニングし、ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の標的配列としての特異性について確認したので報告する。4) 遺伝子組換え混入検査対象の食品に含有する食品添加物のDNA検体精製効率に与える影響 加工食品の製造加工工程における加圧、加熱、破碎などの物理的な影響は、GM食品検査の際に使用するPCR反応の鋳型DNAを著しく断片化させ、それ故、検査の感度を低下させることで偽陰性判定を招く恐れが懸念されてきた。そのため、加工食品に含有する短いDNA断片をより効率的に回収するDNA抽出精製法が求められていた。現行のGM食品通知試験法では、短いDNA断片を抽出・精製可能な陰イオン交換樹脂を使用したキアゲン社製

Genomic-tip法が用いられる。しかし、これまでに加工食品に含有する食品添加物によるGenomic-tipを使用した場合のDNA抽出・精製効率へ与える影響については未だ報告されていない。そこで本研究では、ビーフン等の加工食品に汎用される添加物増粘多糖類のカルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)のコメ由来DNAの収量および精製度に与える影響に関して解析を行ったので報告する。

協力研究者

中村公亮 (国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

現在、第3世代を含めた遺伝子組換え(GM)食品の多様化が進んでいる。未承認GM食品の加工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食品の流通阻止を監視するシステムの確立と、それらの検知技術の高度化及び新規検知技術の導入を検討した。

B. 研究方法

1) 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コメ加工食品(コメ粉)4種類(7-123、12191、6-1219、6-1214)を使用した。試料からのDNAの抽出・精製は、通知試験法(食安発0703第2号(平成25年7月3日))に基づき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 7900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、既報のものを使用した(表1)。デジタルPCR解析には、QuantStudio3D(Life Technologies社)を使用した。

2) 標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み

1. 試料

P35Sが導入されているGM作物のモデル

として、GMパパイヤ55-1系統の果肉部位を使用した。カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)検体は、農業生物資源研究所より提供されたアブラムシ伝搬性のCaMV(M株, MAFF番号104018)を用いた。感染実験には、CaMVの感染が成立するアブラナ科植物(コカブ、キャベツ、ブロッコリー)を宿主に使用した。カリフラワーモザイクウイルスの感染には、乳鉢・乳棒を使用して感染葉を重量比で5倍のPBS(pH7.5)を加え磨砕した溶液を使用した。柔らかい若葉の表葉にカーボランダム600メッシュで傷を付けウイルス感染葉の磨砕液を接種させ1か月間感染後、接種を行っていない上位葉を実験に使用した。形質転換用プロモーターは、GM作物に汎用されるP35S(GenBank no.: E05206.1)を参照した。

2. DNA試料の調製

葉からのDNAの精製には、キアゲン製DNeasy Plant Mini Kitを使用した。葉は、液体窒素を使用して瞬間冷凍させ均質に粉砕した。粉砕した試料は、0.1gをポリプロピレン製遠沈管(1.5mL容)に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液400mLとRNaseA 4mLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで10分間加温した。その間2~3回、遠沈管を反転させて試料を攪拌した。AP2緩衝液130mLを加え混合し、氷上で5分間静置した。13,000rpm、室温の条件で5分間遠心後、得られた上清をQIAshredder spin columnに負荷し、13,000rpm、2分間遠心後、溶出液の上清を新しい遠沈管(1.5mL容)に移した。その溶出液の1.5倍量のAW1緩衝液を加えた。混合液650mLをmini spin columnに負荷し、13,000rpmで1分間遠心し、溶出液を捨てた。最終的に混合液がすべてなく

なるまで同様の操作でmini spin columnに負荷した。次いでAW2 緩衝液500 mLを負荷し、13,000 rpm、で1分間遠心し、溶出液を捨て、再度AW2 緩衝液500 mLを負荷し、13,000 rpmで1分間遠心した。溶出液を捨てた後、mini spin columnを乾燥させるため、13,000 rpmで2分間遠心した。mini spin columnを新しい遠沈管(1.5 mL 容)に移し、あらかじめ65°Cに温めておいたAE溶液50 mLを加え、5分間静置した後、13,000 rpmで1分間遠心しDNAを溶出した。さらにAE溶液50 mLを加え、5分間静置した後、13,000 rpmで1分間遠心しDNAを溶出した。得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とした。

3. バイサルファイト処理

MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kitを用いてバイサルファイト処理およびバイサルファイト処理後のDNAの精製を行った。15 ng/mLに調整したDNA溶液20 mLをPCR用0.2 mL tubeに入れ、3 M NaOH 2.2 mLを混合し、サーマルサイクラーで37 °C、15分間保温した。あらかじめ結晶を溶かし80°C、15分間温めておいたReagent1 + Reagent2混合液を220 mL加え混合した。その液をPCR用0.2 mL tubeに80 mLずつ分注し、サーマルサイクラーで80°C、45分間保温した。新しい遠沈管(1.5 mL 容)に溶液を移し、反応溶液240 mLに対しあらかじめ60°Cに温めておいたReagent3 240 mLを加えよく混合し、カラムに負荷した。13,000 rpmで1分間遠心し、溶出液を捨てた後、Reagent4 を300 mL加え、13,000 rpmで1分間遠心した。再びReagent4 を300 mL加え、13,000 rpmで1分間遠心し、溶出液を捨てた。カラムを乾燥させるため、13,000 rpmで4分間遠心した後、新しい遠沈管(1.5 mL 容)に移し、あらかじめ70°Cに温めておいたReagent5を30 mLを加え、13,000 rpmで1分間遠心しDNAを溶出した。DNA溶出液はPCR用0.2 mL tubeに移し、サーマルサイクラーで95°C、20分間保温した。バイサルファイト処理後のDNAサンプル

は、すぐにPCRに用いる、もしくは、分注し-20°Cで保存したものは、1度の融解に限り使用した。

4. PCRプライマーの設計

バイサルファイト処理後のPCR用プライマー対(150~400 bpのアンプリコンサイズ)は、CaMV及びGMパパイヤのゲノム配列に基づいてKismeth Bisulfite Primer designソフト

(<http://katahdin.mssm.edu/kismeth>)を使用して設計した。P35Sを増幅させるために使用したプライマー対は以下の通りである。

MT-5F-Y (Primer1);

5' GAAGGTTAAAGATGYAGTYAAAAG3'

MT-8F-Y (Primer2);

5' TTGAGAYTTTTYAAYAAAAGGGT3'

MT-8R-R (Primer3);

5' TACCCTTTRTTRAAAARTCTCA3'

MT-0R-R5 (Primer 4);

5' TTCTTTTCCACRATRCTCCT3'

MT-0R-R5 (Primer 5);

5' RARATATCACATCAATCCACT3'

MT-0R-R4 (Primer6);

5' CTCTCCAAATRAAATRAACTTCC3'

PCR反応は、バイサルファイト処理したDNAを効率よく増幅させるTaKaRa EpiTaqHS DNA polymerase(タカラバイオ社)を使用した。反応液の組成は以下の通りである。5 U/mL TaKaRa EpiTaqHS 0.25 mL、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 mmol/L)0.25 µL、2.5 mM dNTP 6 mL、10 X PCR buffer 5 mLを混合し、水で全量50mLに調製後、バイサルファイト処理後のDNA試料液5 mLを添加した。プライマーは、プライマーセット4種類(1, MT-5F-Y/MT-8R-R; 2, MT-8F-Y/MT-0R-R4; 3, MT-8F-Y/MT-0R-R5; 4, MT-8F-Y/MT-0R-R6)を使用した。ホットスタート法で94°C、2分間の条件で保持し反応を開始した。その後、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 30秒を1サイクルとして、30サイクルの増幅反応を行った。得られたPCR産物はアガロース電気泳動により検

出し、目的増幅配列を切り出し抽出・精製を行った。泳動にはGelRedを含む2% (w/v)アガロースゲルを用いた。PCR反応液の全量をTAE (tris-acetate EDTA)緩衝液中で100 V定電圧で電気泳動を行った。次いで、ゲルイメージ解析装置を使用し、UV (312 nm)照射下で画像を取り込み、増幅されるDNAの検出を行った。また、予想される長さのDNAが増幅された場合は、その増幅産物をQIAquick PCR purification kit (キアゲン製)により精製し、該当するPCR産物 3.5 mLに、5 mLの2X T4 DNA ligase buffer(プロメガ製)を加え、0.5 mLのpGEM-T easyベクター(プロメガ製)、1 mLのT4 DNA ligase(タカラバイオ製)を加えて室温で1時間反応させTA-cloningベクターへのライゲーションを行った。その後、DH5a大腸菌の形質転換を行い、クローニングを行った。形質転換した大腸菌を100 mg/mlカルベニシリン入りLB-agar寒天培地にまき、一晚37°Cで培養後、各コロニーからillustra TempliPhi DNA Amplification Kitを用いてシーケンス解析用サンプルを調製した。PCR用0.2 mL tubeにSample buffer 5 mLを分注し、その溶液にコロニーを溶解した。サーマルサイクラーで95°C、3 分間保温した後、あらかじめ調整しておいたPre-mix (Reaction buffer 5 mL + Enzyme mix 0.2 mL) 5 mL加えた。サーマルサイクラーで30°C、5時間保温し、次いで65°C、10 分間保温した後、得られた溶液を水で10倍希釈しシーケンス解析用DNA試料とした。メチル化の頻度は、PCRで増幅後クローニングして得られた23個以上のクローンの配列より算出した。

5. メチル化感受性制限酵素を使用したメチル化率の算出

メチル化感受性制限酵素HpyCH4IV (NEB製)を用いて37°Cで1時間精製DNA 300 ngを処理した後、フェノール・クロロホルムでタンパク質除去を行い、1/10倍量の3M 酢酸ナトリウムと2.5倍量のエタノールを混合してDNAをエタノール沈殿後、

13,000 ×g以上、4°Cの条件で5分間遠心した。次いで、DNA沈殿物は70%(v/v)エタノールで洗浄し13,000 ×g以上、4°Cの条件で5分間遠心後、エタノールを除去し、水25 μLを加えに精製DNAを溶解させた。リアルタイムPCR反応は、Universal Master Mix(ライフテクノロジー製)を使用して行った。反応液の組成は以下の通りである。Universal Master Mix 12.5 mL、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 mmol/L)0.4 mL、試料 5 mLを混合し、水で全量25 mLに調製した。50°C、1分間反応後、ホットスタート法で95°C、10分間の条件で保持し反応を開始した。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。PCR増幅曲線から、Threshold Line 0.2の交点(Ct値)を記録した。サンプル間のメチル化の相対比は、メチル化感受性制限酵素で切断の影響を受けないリファレンス標的配列を検出するプライマー・プローブ(ref., アンプリコンサイズ76 bp)と受ける配列を検出するプライマー・プローブ(CaMV, アンプリコンサイズ101 bp)を使用した。それぞれの配列は以下の通りである。

Ref. :

5' TAAGGGATGACGCACAATC3' (Forward primer, p35S-1-F2)

5' CTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT3' (Reverse primer, p35S-1-R2)

FAM-TAGAGGAAGGGTCTTGCGAAGGATAGT-TAMRA (Probe, p35S-1-P2)

CaMV:

5' ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT3' (Forward primer, P35S 1-5')

5' CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT3' (Reverse primer, P35S 2-3')

FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCCT-TAMRA (Probe, P35S-Taq)

メチル化相対比率は、GMパパイヤのP35Sを1として算出した。すなわち、ref.とCaMVプライマー・プローブから得られ

たCt値の差(ΔCt)をサンプル毎に算出し、GMパパイアのP35Sをリファレンスに $\Delta \Delta Ct$ 値をもとめ、相対比率($2^{-\Delta \Delta Ct}$)を算出した。

3) CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ 内在性遺伝子検知法の開発

供試ヒヨコマメ(非 GM)には、(独)農業生物資源研究所より入手した T-87-2 品種(配布番号: JP97097)、NEC-143 品種(配布番号: JP 97333)、P-843 品種(配布番号: JP 97307)、NEC-2290 品種(配布番号: JP 97252)、PI 215702 品種(配布番号: JP 96860)、P-922-1 品種(配布番号: JP 97321)、NEC-204 品種(配布番号: JP 96947)、P-9897 品種(配布番号: JP 96982)、米国 USDA より入手した Krokmal #2 品種(配布番号: W6 11343)、Krokmal #3 品種(配布番号: W6 11344)、Sovhoznii 14 品種(配布番号: W6 11345)、2728(8) 品種(配布番号: W6 15637)、ICC 8159 品種(配布番号: PI 115448)、NO. 12620 品種(配布番号: PI 207470)、ICC 6293 品種(配布番号: PI 239859)、SHIMBRA 品種(配布番号: PI 331381)、及び、マメ科作物には 6 種類の植物(ササゲ、スタイロ、エンドウ、インゲン、ラッカセイ、ダイズ)を用いた。

4) 遺伝子組換え混入検査対象の食品に含有する食品添加物の DNA 検体精製効率に与える影響

コメ加工食品からの DNA の抽出精製に関する調査は、市販の製品(コメ粉、ライスヌードル、ライスペーパー、ビーフン)を試料に供した。CMC は、和光純薬工業株式会社製のものを使用した(図 1-1)。CMC の添加試験には、ライスヌードルを粉砕した後、CMC の重量比が 0~4% になるよう添加した試料を用いた。試料からの DNA の抽出精製は、通知試験法に従いキアゲン社製 Genomic-tip (100/G) を使用して行った。DNA の収量および精製度は、紫外吸光度により概算した。

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 の標的配列を導入した陽性プラスミドを構築し、各プライマー対、プローブを使用した PCR 反応の検出下限を測定した。構築した陽性プラスミドは、コメ内在性遺伝子を検知する SPS 検知法、Kefeng6 系統の系統特異的及び構造特異的検知法、Shanyou63 系統の系統特異的及び構造特異的検知法のそれぞれの標的配列を組込んだものを使用した(図 1 A)。Kefeng6 系統を検出する CpTI 検知法は、構造特異的であり、CpTI と *Nopaline synthase* ターミネーターの境界を標的とし、また、同系統を検出する Kefeng6-3 検知法は系統特異的で、*CryIAc* とゲノムの境界を標的とする(図 1 B)。Shanyou63 系統を検出する Bt63 検知法は構造特異的で、*CryIA* と *Nopaline synthase* ターミネーターの境界を標的とする。また、同系統を検出する TT51-1 検知法は系統特異的で、ゲノムと *Actin I* プロモーターの境界を標的とする。本実験では、この陽性プラスミドのコピー数を 250,000、25,000、2,500、250、125、62.5、31.25 と段階希釈し、各検知法で得られる Ct 値と Ct 値 48 以下(PCR 反応 50 サイクル)に設定した場合の検出回数を調べた。その結果、SPS、Kefeng6-3、TT51-1、Bt63 検知法では 250 コピーまでを 12 回試験中、12 回標的配列を指数関数的な増幅により検出した。CpTI 検出法では、2,500 コピーまでを 12 回試験中、12 回指数関数的な増幅を確認した(表 2)。また、PCR 増幅効率は、81~93% (Kefeng6 系統: 81% 系統特異的, 82% 構造特異的; Shanyou63 系統: 86% 系統特異的, 93% 構造特異的)であった(図 2)。

デジタル PCR 法を用いたコメ及びコメ加工食品中のコピー数の測定

デジタル PCR の試験には、Shanyou63 系統のビーフン(no. 2)と陽性コントロール、Kefeng6 系統の混入したコメ粉試料 7-123、12191、6-1219、6-1214 から精製した DNA を鋳型に供した。VIC 蛍光プローブで内在性遺伝子 SPS の検出を行い、FAM

蛍光プローブで TT51-1、Bt63、Kefeng6-3、CpTI 検知法による GM コメ標的配列の検出を行った。各試験は 3 反復行った(表 3)。SPS 検知法は、どのサンプルも全ウェル中の 90%前後が陽性であった。サンプルごとの FAM の測定結果では、陽性コントロールの場合、TT51-1 検知法では、全ウェル中の約 65%前後が陽性であり、検出されたコピー数は約 1,132 ~ 1,266 copies/ μ L で、測定された VIC コピー数 10,000 分の 1 のうち FAM は、平均して 3,487.4 測定された。Bt63 検知法では、全ウェル中の約 85%前後が光り、検出されたコピー数は、2,077~2,392 copies/ μ L で、VIC コピー数 10,000 分の 1 のうち平均で 6,080.5 測定された。ビーフンの場合、TT51-1 検知法では、全ウェル中の 0.05%前後しか光らず、測定されたコピー数は、0.284~0.786 copies/ μ L で、VIC コピー数 10,000 分の 1 の中、平均で 1.27 検出された。Bt63 検知法では、全ウェル中の約 0.1%前後が検出され、検出されたコピー数は 0.909~1.510 copies/ μ L であった。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 3.12 検出された。コメ粉 7-123 の場合、Kefeng6-3 検知法では全ウェル中の 0.03%前後が陽性であり、コピー数は 0.307~0.479 copies/ μ L であった。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 1.92 コピー数検出された。CpTI 検知法では、全ウェル中の約 0.5%前後が陽性であり、コピー数は 2.732~7.332 copies/ μ L であった。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 23.31 検出された。コメ粉 12191 の場合、Kefeng6-3 検知法では、全ウェル中の 0.1%前後が陽性であり、コピー数は 1.066~1.182 copies/ μ L 検出された。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 2.26 検出された。CpTI 検知法では、全ウェル中の 0.7%前後が陽性であり、コピー数は 8.011~8.648 copies/ μ L 検出された。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 19.41 検出された。コメ粉 6-1219 の場合、Kefeng6-3 検知法では、全ウェル中の 0.07%前後が陽性であり、コピー数は

0.740~0.844 copies/ μ L 測定された。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 2.07 検出された。CpTI 検知法では、全ウェル中の 0.68%前後が陽性であり、コピー数は 7.784~8.205 copies/ μ L 検出された。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 19.10 検出された。コメ粉 6-1214 の場合、Kefeng6-3 検知法では、全ウェル中の 0.05%前後が検出され、コピー数は 0.449~0.824 copies/ μ L 検出された。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 1.26 検出された。CpTI 検知法では、全ウェル中の 0.6%前後が陽性であり、コピー数は 6.426~7.792 copies/ μ L であった。VIC コピー数 10,000 分の 1 あたり平均で 20.05 検出された。系統特異的検知法で検出された FAM のコピー数の平均を 1 とすると Shanyou63 系統のコメの場合、構造特異的検知法 Bt63 の方が、1.7~2.5 倍系統特異的検知法 TT51-1 よりも多くコピー数を測定された。また、Kefeng 系統のコメ粉の場合では、構造特異的検知法 CpTI の方が、系統特異的検知法 Kefeng6-3 よりも 8.6~15.9 倍多くのコピー数を検出した。

2) 標的 DNA のメチル化の頻度およびパターン解析による新規 GM 検知法確立の試み

GM 作物の作出に汎用される P35S 配列のメチル化標的配列(CpNpG 及び CpG)を図 3 A に示す。バイサルファイト処理後のゲノム DNA 配列を基に、PCR 用プライマーペア (primer1/3, primer2/6, primer2/4, primer 2/5) の設計を行った。設計した primer1/3 を使用し非特異的増幅の見られない PCR を行うことに成功した(図 3 B)。バイサルファイトシーケンシングの結果、コカブに感染させた CaMV ゲノムの P35S 配列 339 bp のうち、メチル化対象候補 69 個の全てのシトシン塩基がメチル化されており、またメチル化の頻度は 35~82%であった(図 4)。一方、GM パパイヤの P35S 配列については、メチル化対象候補のシトシン塩基約 1/3 の 21 個がメチル化されており、またメチル化の頻度は 4

～12%と低かった(図5)。これらの結果より、宿主に感染し複製したCaMVのP35Sは高度にメチル化され、そのメチル化率とパターンはGM作物ゲノムのP35Sとは大きく異なることが示唆された。得られたメチル化率とパターンを利用して、メチル化感受性制限酵素処理を行ったDNAをリアルタイムPCRにより定量することで、GM配列とCaMV由来配列とを判別できるか検討を行った(図6)。リアルタイムPCRの標的配列は、それぞれメチル化感受性制限酵素HpyCH4IVで切断されるもしくは切断されない配列を標的に設計を行った(図7)。リアルタイムPCR検査法の手順を図8に示す。リアルタイムPCRより得られたCt値(Threshold値0.2)を基に、メチル化比率を算出した。その結果、ブロッコリー、キャベツ及びコカブに感染したCaMVはGMパパイヤ55-1系統と比較し31～225倍であった(表4)。

3) CaNCED配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

ヒヨコマメのゲノムDNAよりCaNCEDを解析した結果、解析を行った全16種類のヒヨコマメ品種においていずれの品種においても1860bpの長さのORF配列を得た。また、品種間には塩基配列は完全に一致しており、高い保存性のある遺伝子であることが確認された。得られた配列は遺伝子データベースに計16種類の新規遺伝子配列として登録を行った(GenBank accession no. AB771415、LC025620～LC025954)(表5)。ヒヨコマメのcDNA配列を解析した結果、CaNCEDはイントロンレスであった。他のマメ科作物由来のNCEDとアミノ酸配列を比較したところ、特にN末側配列は低い相同性を示した(図10)。

4) 遺伝子組換え混入検査対象の食品に含有する食品添加物のDNA検体精製効率に与える影響

コメ加工食品のうち、DNAの収量はビーフン(0.32±0.02 µg/g～3.05±0.08 µg/g)、コメ粉(1.88±0.41 µg/g～1.91±1.65 µg/g)、ライスペーパー

(0.44±0.08 µg/g～9.16±0.27 µg/g)、ライスヌードル(5.42±0.43 µg/g～11.01±0.02 µg/g)の順に高かった(図12A)。DNAの精製度に関しては、ビーフンが230、260、280nm波長の吸光度比(A_{260nm}/A_{230nm}およびA_{260nm}/A_{280nm})が最も低かった(図12B、C)。ライスヌードルのDNAの収量は、CMCを重量比2%になるよう添加した場合、無添加の試料と比較して88%(12.2±0.13 µg/g)、重量比4%添加では67%(9.3±0.3 µg/g)に低下した(各添加濃度n=3)(図13)。

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

昨年度の結果より、リアルタイムPCRを使用してShanyou63系統陽性のコメサンプル(R5)の検出を試みた場合、TT51-1検出法とBt63検出法のCt値に約1サイクルの違いが生じることから、Bt63検出法とTT51-1検出法で検出できる鋳型DNA量の差は、約2倍程度であると考えられた。このことから、TT51-1系統特異的検出法よりもBt63構造特異的検出法の方がShanyou63系統を感度良く検出できることが確認された。よって、構造特異的検出法を用いてリアルタイムPCRを行った方が、より感度良く検出されることが示唆された。また、Kefeng6系統の混入したコメ試料に関しても、同様の結果を示したことから、構造特異的検出法のほうがより効果的に検出できる方法であると考えられた。リアルタイムPCR法による検出下限の測定においては、いずれのリアルタイムPCRを使用した検出法においても少なくとも試料中に250コピー以上の標的配列が存在する場合、リアルタイムPCRによる増幅が可能であることが示唆された。よって、いずれの検出法においても検出感度は変わらないことが確認された。

デジタルPCRによる試料中に含有する標的配列のコピー数の測定結果から、Shanyou63系統のコメの場合、構造特異的検出法Bt63の方が、1.7～2.5倍系統特異的検出法TT51-1よりも多く検出された。また、Kefeng6系統のコメ粉の場合では、構造特異的検出法CpTIの方が、系統特異的検出法

Kefeng6-3よりも8.6~15.9倍多くコピー数を検出した。この結果から、Kefeng系6統の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示唆された。

以上の結果から、GMコメへの遺伝子導入には、1ゲノム中に数十コピーを導入可能なパーティクルガンを使用したのではないかと推測された。また、Shanyou63系統のコメの場合は、構造特異的配列の方が、系統特異的配列に比べ約2倍多く混入していることが示唆されたことから、1ゲノム中に数コピーを導入することができるアグロバクテリウム法により遺伝子を導入し開発されたGMコメであると考えられた。この結果から、デジタルPCR法を用いれば、GMコメ中に導入された配列は、従来より汎用性の高い遺伝子導入法であるパーティクルガン法またはアグロバクテリウム法で導入されたかを推測可能であることが示唆された。デジタルPCR法で測定したコピー数を、リアルタイムPCR法で測定した場合のコピー数に換算すると、ビーフン(no. 2)を除く試料は、構造特異的検知法の標的配列を含むDNAのコピー数は、250コピーを超えている。この結果は、250コピー以上のコピー数であればリアルタイムPCRで検出下限値を上回る標的配列濃度の測定が可能であることと合致した。

2) 標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み

CaMVは主にアブラナ科の植物に感染することで葉にモザイク状の病斑を起し、アブラムシより伝搬される。本研究では、アブラナ科のブロッコリー、キャベツ及びコカブに感染させたCaMVのP35Sのメチル化パターンを解析した(図9A)。その結果、いずれの植物に感染したCaMVにおいてもP35Sは高度にメチル化されていた。一方、GMパパイヤに導入された同配列は、低メチル化されていた。解析を行った339bpのうち67か所のシトシン塩基のメチル化パターンの多変量解析の結果、CaMV感染ウイルス由来とGMパパイヤ由来のP35SのDNAメチル化修飾をグルーピング化することができ、それぞれを明確に

見分けることが可能であった(図9B)。また、メチル化パターンとメチル化量の情報を基に、メチル化感受性制限酵素処理やリアルタイムPCR法を駆使し、加工食品中に混入したGM作物とCaMVの混入を検知できるメチル化率定量判別法を確立することができた。

3) CaNCED配列を標的とした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応答遺伝子であるNCEDは、多くの植物において必須遺伝子であることが報告されている。既知のNCEDの塩基配列を比較したところ、属および種間において相同性が低いことから、ヒヨコマメに特異的な塩基配列を有する可能性が示唆された。特にリアルタイムPCR用のプライマー・プローブの設計に使用したCaNCEDの5'末側のORF配列は、既知のマメ科作物由来のNCEDのものと比較し保存されている配列は少なかった(図10)。また、サザンブロットングにより、CaNCEDはヒヨコマメのゲノムに1コピーのみ存在することが確認された。本研究結果より、CaNCEDの5'末側のORF配列を標的に開発したリアルタイムPCR法は食品中のヒヨコマメを特異的に検知することができ、GMヒヨコマメの混入を定量・定性的に検知する際に有用であることが示唆された。

4) 遺伝子組換え混入検査対象の食品に含有する食品添加物のDNA検体精製効率に与える影響

CMCは、食品添加物の使用量として重量比2%まで認められている。CMCのDNAの収量に与える影響について解析した結果、添加しない場合に比べ12%低下した。さらにCMC溶液のみをGenomic-tip 100/Gカラムに負荷した際の溶出液にイソプロパノールを加えアルコール沈殿を行ったところ、白色沈殿物が認められた。この白色沈殿物の¹H-NMRを測定したところ、CMCの標準品と同じスペクトルを示した(図14)。これらの結果から、抽出液中に共存するCMCは、DNAの陰イオン交換カラムへの吸着を競合的に阻害し、DNAの精製効率に負の影響を与えていると推察された。

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

近年、GM技術が身近なものとなり、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未承認GM作物の食品への混入が大きな社会問題となっている。そのようなGM食品を偽陰性・偽陽性判定を防ぎより正確に解析することが求められている。本研究では、より高感度にGMコメを検出する方法を開発することを目的に、GMコメを検出する際のDNA標的配列の評価を行った。

コメに遺伝子導入する際、アグロバクテリウム法を使用するとコメゲノム中に数コピーの遺伝子が導入され、パーティクルガン法を用いるとコメゲノム中に数十コピーの遺伝子が導入されることが報告されている。デジタルPCRの実験結果から、Shanyou63系統の構造特異的な配列は系統特異的な配列の約2倍、Kefeng6系統の構造特異的な配列は系統特異的な配列の約9～16倍検出された。このことから、Shanyou63系統はアグロバクテリウム法で、Kefeng6系統はパーティクルガン法で開発されたGMコメであることが推察された。リアルタイムPCRを使用した場合、DNA試料中にGMコメの標的配列が少なくとも250コピー含まれていれば感度良くGMコメを検出可能であることが判明した。デジタルPCRを用いてコメ試料中に含有する標的配列のコピー数を測定したところ、リアルタイムPCRの鋳型DNA50 ng中にKefeng6系統の混入した試料には、系統特異的な配列が18～32コピー、構造特異的な配列が273～333コピーであった。この結果から、リアルタイムPCRを用いてGMコメをより効果的に検出するには、系統特異的な配列よりも構造特異的な配列を標的とした方が有効であることが確認された。

本研究結果から、より高感度に未承認GMコメを検査するためには、構造特異的な標的配列を検出する方法を用いてGMコメの食品への混入に関する実態調査を行っていく必要があると考えられた。

2) 標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み

P35Sのメチル化パターンを解析した結果、組換え操作によって導入されたP35Sは非メ

チル化されており、一方でCaMVのP35Sは高度にメチル化されていた。植物に感染させたCaMVのP35S並びにGM作物の目的遺伝子発現のために導入されたP35SのDNAメチル化量と修飾パターンに明確な差が存在し、その差を利用することでCaMVとGM作物由来のP35Sを検知する方法を開発することが可能であった。

3) CaNCED配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

16種類のヒヨコマメ品種よりNCED1遺伝子のクローニングに成功した。NCED1遺伝子配列は、データベースへの登録を行い以下のアクセス番号において公開される予定である(K. Nakamura, et al.: GenBank accession no. AB771415, LC025620～LC025954)。

4) 遺伝子組換え混入検査対象の食品に含有する食品添加物のDNA検体精製効率に与える影響

市販のコメ加工食品のDNAの抽出精製に関する調査を行った結果、加工度の高いビーフンのDNAの収量および精製度が最も低く、GM食品検査の偽陰性判定を招く可能性が考えられた。そのため、ビーフンのような加工食品にCMCが添加された場合、現行のGenomic-tip 100/Gを使用したDNA抽出精製法に代わる新たな方法について検討する必要性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 論文発表

1. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. Food Control, 50, 949-955, 2015
2. Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R. Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK,

- Ikushugaku Kenkyu, 16, 158-161, 2014
3. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
 4. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 247-253, 2014
 5. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2340-7
 6. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014
 7. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014
- 学会発表
1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014年9月.
 2. Fukasawa, A., Sakagami, H., Nakahara, Y., Nakamura, K., Ogawa, H. Immobilization method of glycosylated Fmoc-amino acid for SPR and interaction analysis between *Pleurocybella porrigens* lectin and carbohydrates, 27th International Carbohydrate Symposium, India, 2014年1月.
 3. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子: 標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 4. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子: CaNCED配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 5. 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: 加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しいDNA抽出精製法の検討、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 6. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵: 食品中に含有する添加物のDNA精製効率に与える影響について、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 7. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: Multiplex real-time PCRを用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 8. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 9. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田