

- こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橋田和美、最上（西巻）知子：成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
10. 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、橋田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上（西巻）知子：2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 11. 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：RFLPおよびReal-time PCR法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 12. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橋田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2014年6月
 13. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上（西巻）知子：次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内での遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
 14. 中村公亮：未承認遺伝子組換え食品の検知法の開発に関する研究、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5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、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏：DNA マイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパイヤのスクリーニング検査法、日本

食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月

16. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月

Ⅱ. 知的財産権の取得状況

特許取得

1. 小川温子、中村公亮、坂上ひろみ、棚元憲一：抗ウイルス剤、特許第5633717号、登録日：2014年10月24日.
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1. GMコマ検知に使用したプライマー・プローブ一覧

Test name	Name of oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon size (bp)	Specificity	Reference
SPS	Sps-P	FAM-TCCGAGCCGTCGCTGCGTC-TAMRA	SPS	81	Rice endogenous gene	Jiang, L., et al., J. Agric. Food Chem., 57, 3525-3532 (2009)
	Sps-taq-1F	TTGCGCCCTGAACGGATAT				
	Sps-taq-1R	CGGTTGATCTTTTCGGGATG				
Bt63	GM63-Taq	FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA	Bt rice (Shanyou63)	147	Construct-specific sequence	Akiyama, H., et al., J. Agric. Food Chem., 55, 5942-5947 (2007)
	T52-SF	GCAGGAGTGATTATCGACAGATTC				
	O _s NOS-R2	AAGACCGGCAACAGGATTCA				
CpTI	KDEL-P	FAM-ATGAGAAAGATGAACCTAG-MGB	CpTI-KDEL-T-nos	121	Construct-specific sequence	Nakamura, K., et al., Food Chem., 141, 2618-2624 (2013)
	CpTI-2F	TGCAAGTCCAGGGATGAAGAT				
	NOS-1R	ACCGGCAACAGGATTCAATC				
TT51-1	TT511P	FAM-ATCTGCCCGAGCTCGTCCG-BHQ1	Event TT51-1	120	Event-specific sequence	Wu, G., et al., Food Chem., 119, 417-422 (2010)
	TT511V	AGAGACTGGTGATTTCCAGCGGG				
	TT511G	GCGTCCAGAAGGAAAAGGAATA				
Kefeng6-3	Kef6 hydrolysis probe	FAM-AGGGCGATTGCTGGCGAGGC-TAMRA	Event Kefeng6	128	Event-specific sequence	Guertler, P., et al., J. Verbr. Lebensm., 7, 63-70 (2012)
	Kef6 forward	TGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTT				
	Kef6 reverse	CAAGAAGCAAGCTGAGGCAACAAGCT				

表2. 各検知法の検出限界試験*1結果

SPS				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	26.85	0.1	0.3
25,000	12/12	30.41	0.2	0.6
2,500	12/12	34.15	0.4	1.3
250	12/12	37.86	1.1	2.8
125	11/12	38.96	1.5	3.8
62.5	9/12	38.88	0.5	1.3
31.25	1/12	43.29	-	-

Kefeng6-3				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	26.18	0.1	0.2
25,000	12/12	29.88	0.1	0.3
2,500	12/12	33.99	0.6	1.8
250	12/12	37.70	1.0	2.6
125	10/12	38.29	1.2	3.1
62.5	4/12	38.87	0.5	1.3
31.25	2/12	38.13	0.6	1.7

CpTI				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	29.90	0.4	1.5
25,000	12/12	33.30	0.4	1.2
2,500	12/12	37.22	0.5	1.3
250	11/12	41.44	1.0	2.4
125	5/12	41.42	0.9	2.1
62.5	3/12	43.67	4.4	10.0
31.25	2/12	45.27	5.8	12.8

TT51-1				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	25.79	0.1	0.3
25,000	12/12	29.57	0.2	0.6
2,500	12/12	33.46	0.4	1.3
250	12/12	36.87	1.0	2.8
125	11/12	38.69	1.3	3.4
62.5	3/12	41.82	5.0	11.9
31.25	1/12	37.52	-	-

Bt63				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	26.73	0.1	0.4
25,000	12/12	30.13	0.1	0.4
2,500	12/12	34.00	0.4	1.2
250	12/12	37.14	1.1	3.0
125	11/12	39.12	1.3	3.3
62.5	5/12	39.25	0.7	1.8
31.25	3/12	41.06	2.5	6.1

Kefeng6系統				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	26.18	0.1	0.2
25,000	12/12	29.88	0.1	0.3
2,500	12/12	33.99	0.6	1.8
250	12/12	37.70	1.0	2.6
125	10/12	38.29	1.2	3.1
62.5	4/12	38.87	0.5	1.3
31.25	2/12	38.13	0.6	1.7

Shanyou63系統				
copy number	signal rate	mean Ct value	SD	RSD (%)
250,000	12/12	25.79	0.1	0.3
25,000	12/12	29.57	0.2	0.6
2,500	12/12	33.46	0.4	1.3
250	12/12	36.87	1.0	2.8
125	11/12	38.69	1.3	3.4
62.5	3/12	41.82	5.0	11.9
31.25	1/12	37.52	-	-

*1リアルタイムPCR機器を使用し、各プラスミド濃度サンプルに付き12回の反復試験を行った。Ct値は閾値を0.2に設定した際の値を示す。

表3. デジタルPCRを用いたコメ及びコメ加工食品中のコピ一数の測定結果

Product form (sample name)	VIC			FAM					Template				
	SPS (copies/ μ l)	Fluorescent/well	% well	Target	Specificity	Target (copies/ μ l)	Fluorescent/well	% well	FAM/10 ⁴ VIC	FAM/10 ⁴ VIC average	Copy number ratio	Real-time PCR (copies/50 ng)	Mean (copies/50 ng)
Positive control (Sharyou83)	3198	16973 / 18112	93.7	TT51-1	Event	1132	11308 / 18112	62.4	3539.7	3487.4	1	56600.00	60417
	3534	11704 / 17895	65.4			1227	11704 / 17895	65.4	3472.0			61350.00	
	3669	18929 / 19756	95.8			1266	13149 / 19756	66.6	3450.5			63300.00	
	4621	17545 / 17637	99.5	Bt63	Construct	2392	15409 / 17637	87.4	5176.2	6080.5	2	119590.00	109497
	3399	19175 / 20245	94.7			2077	16887 / 20245	83.4	6110.6			103850.00	
	3021	18376 / 19829	92.7			2101	16609 / 19829	83.8	6954.7			105050.00	
Vermicelli (no.2)	4160	19797 / 20354	97.3	TT51-1	Event	0.284	5 / 20354	0.0	0.7	1.3	1	14.20	27
	4024	19969 / 20603	96.9			0.786	14 / 20603	0.1	2.0			39.30	
	4540	18952 / 19333	98.0			0.538	9 / 19333	0.0	1.2			26.90	
	4566	18030 / 18364	98.1	Bt63	Construct	1.510	24 / 18364	0.1	3.3	3.1	2	75.50	61
	3263	19319 / 20540	94.1			1.239	22 / 20540	0.1	3.8			61.95	
	4007	19728 / 20364	96.9			0.909	16 / 20364	0.1	2.3			45.45	
Powder (7-123)	1482	13619 / 18852	72.2	kefeng6-3	Event	0.307	5 / 18852	0.0	2.1	1.9	1	15.34	19
	2407	15818 / 18225	86.8			0.381	6 / 18225	0.0	1.6			19.04	
	2281	14538 / 16885	86.1			0.479	7 / 16885	0.0	2.1			23.97	
	1718	14516 / 18760	77.4	CpTi	Construct	3.580	58 / 18760	0.3	20.8	23.3	12	179.00	227
	2111	9421 / 11230	83.9			7.332	71 / 11230	0.6	34.7			366.60	
	1902	13677 / 16946	80.7			2.732	40 / 16946	0.2	14.4			136.60	
Powder (12191)	4914	19286 / 19565	98.6	kefeng6-3	Event	1.182	20 / 19565	0.1	2.4	2.3	1	59.10	56
	5325	20406 / 20612	99.0			1.066	19 / 20612	0.1	2.0			53.30	
	4764	20246 / 20580	98.4			1.124	20 / 20580	0.1	2.4			56.20	
	4041	18832 / 19421	97.0	CpTi	Construct	8.124	136 / 19421	0.7	20.1	19.4	9	406.20	413
	4259	18051 / 18516	97.5			8.648	138 / 18516	0.7	20.3			432.40	
	4496	18723 / 19114	98.0			8.011	132 / 19114	0.7	17.8			400.55	
Powder (6-1219)	4151	19988 / 20555	97.2	kefeng6-3	Event	0.844	15 / 20555	0.1	2.0	2.1	1	42.20	40
	3172	19013 / 20320	93.6			0.740	13 / 20320	0.1	2.3			37.00	
	4346	19824 / 20297	97.7			0.798	14 / 20297	0.1	1.8			39.90	
	3210	17138 / 18276	93.8	CpTi	Construct	7.807	123 / 18276	0.7	24.3	19.1	9	390.35	397
	5871	19968 / 20117	99.3			7.784	135 / 20117	0.7	13.7			389.20	
	4259	19987 / 20502	97.5			8.205	145 / 20502	0.7	19.3			410.25	
Powder (6-1214)	3400	19512 / 20600	94.7	kefeng6-3	Event	0.449	8 / 20600	0.0	1.3	1.3	1	22.45	32
	6557	8395 / 8424	99.7			0.824	6 / 8424	0.1	1.3			41.20	
	5349	19628 / 19822	99.0			0.642	11 / 19822	0.1	1.2			32.10	
	4792	19940 / 20261	98.4	CpTi	Construct	7.782	135 / 20261	0.7	16.3	20.1	16	389.60	355
	2389	17012 / 19498	87.2			7.077	119 / 19498	0.6	29.6			353.85	
	4504	19088 / 19484	98.0			6.426	108 / 19484	0.6	14.3			321.30	

表4. リアルタイムPCR法を使用したメチル化率の検出結果

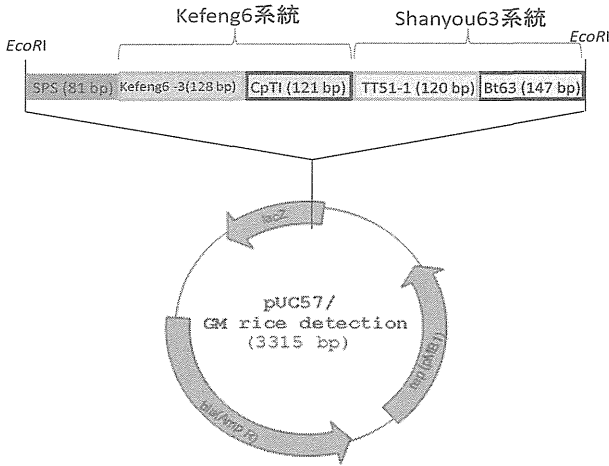
無処理					
サンプル	X (Ct値) ref	Y (Ct値) CaMV	Δ Ct値(X-Y)	$\Delta \Delta$ Ct値	$2^{-\Delta \Delta Ct}$ 相対値
GMノパパイヤ	23.17	23.49	-0.3203825	0	1
ブロッコリー	13.65	13.64	0.0042625	-0.324645	1
キャベツ	14.32	13.97	0.349933	-0.6703155	2
コカブ	10.27	9.94	0.325614	-0.6459965	2
制限酵素処理					
サンプル	X (Ct値) ref	Y (Ct値) CaMV	Δ Ct値(X-Y)	$\Delta \Delta$ Ct値	$2^{-\Delta \Delta Ct}$ 相対値
GMノパパイヤ	25.30	35.41	-10.1070165	0	1
ブロッコリー	13.26	15.83	-2.5748925	-7.532124	185
キャベツ	13.34	15.63	-2.2935575	-7.813459	225
コカブ	10.79	15.95	-5.158473	-4.9485435	31

表5. NCED1遺伝子配列解析に使用したヒヨコマメ品種一覧

Name	Line name	Seed provider*	Accession no.	Origin	Seed appearance	NCED GenBank accession no.
Ca-0	T-87-2	NIAS, Japan	JP 97097	India	yellow and white	AB771415
Ca-1	Krokhmal #2	USDA, USA	W6 11343	Ukraine	yellow and white	LC025620
Ca-2	Krokhmal #3	USDA, USA	W6 11344	Ukraine	brown	LC025941
Ca-3	Sovhoznii 14	USDA, USA	W6 11345	Ukraine	black	LC025942
Ca-4	2728(8)	USDA, USA	W6 15637	Pakistan	light brown	LC025943
Ca-5	ICC 8159	USDA, USA	PI 115448	Unknown	black	LC025944
Ca-6	NO.12620	USDA, USA	PI 207470	Afghanistan	yellow and white	LC025945
Ca-7	ICC 6293	USDA, USA	PI 239859	Iran	black	LC025946
Ca-8	SHIMBRA	USDA, USA	PI 331381	Ethiopia	brown	LC025947
Ca-9	NEC-143	NIAS, Japan	JP 97333	Sudan	yellow and white	LC025948
Ca-10	P-843	NIAS, Japan	JP 97307	Morocco	light brown to yellow and white	LC025949
Ca-11	NEC-2290	NIAS, Japan	JP 97252	Iran	yellow and white	LC025950
Ca-12	PI 215702	NIAS, Japan	JP 96860	Peru	yellow and white	LC025951
Ca-13	P-922-1	NIAS, Japan	JP 97321	Spain	brown	LC025952
Ca-14	NEC-204	NIAS, Japan	JP 96947	Egypt	light brown	LC025953
Ca-15	P-9897	NIAS, Japan	JP 96982	Greece	black	LC025954

*USDA, United States Department of Agriculture; NIAS, National Institute of Agrobiological Sciences

(A)



(B)

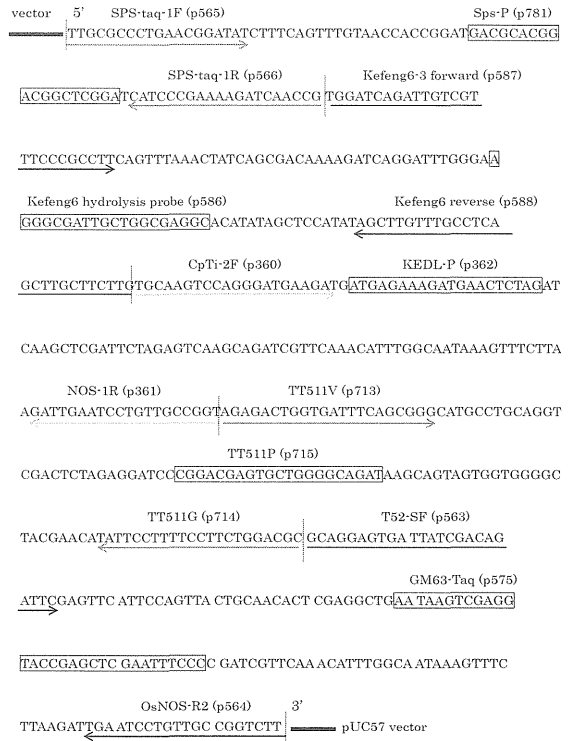


図1. GMコメ検知用陽性プラスミドの構築
 (A)陽性プラスミド内の挿入遺伝子模式図
 (B)挿入遺伝子配列及びリアルタイムPCR反応の標的とする塩基配列

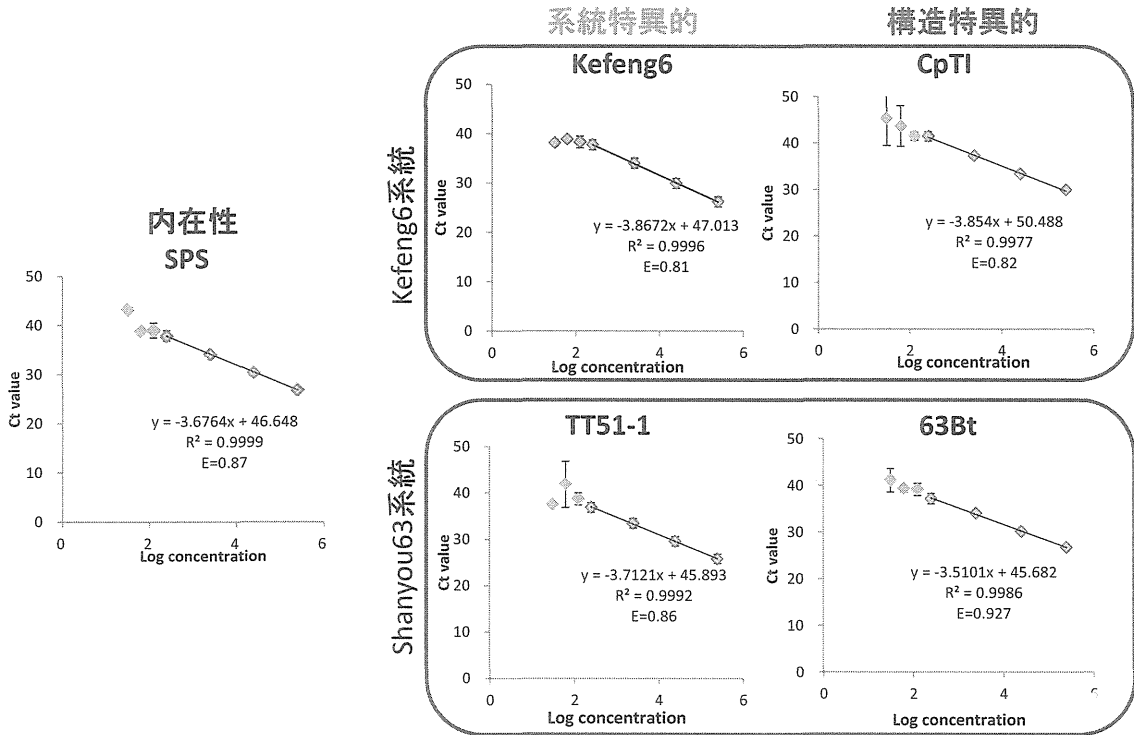
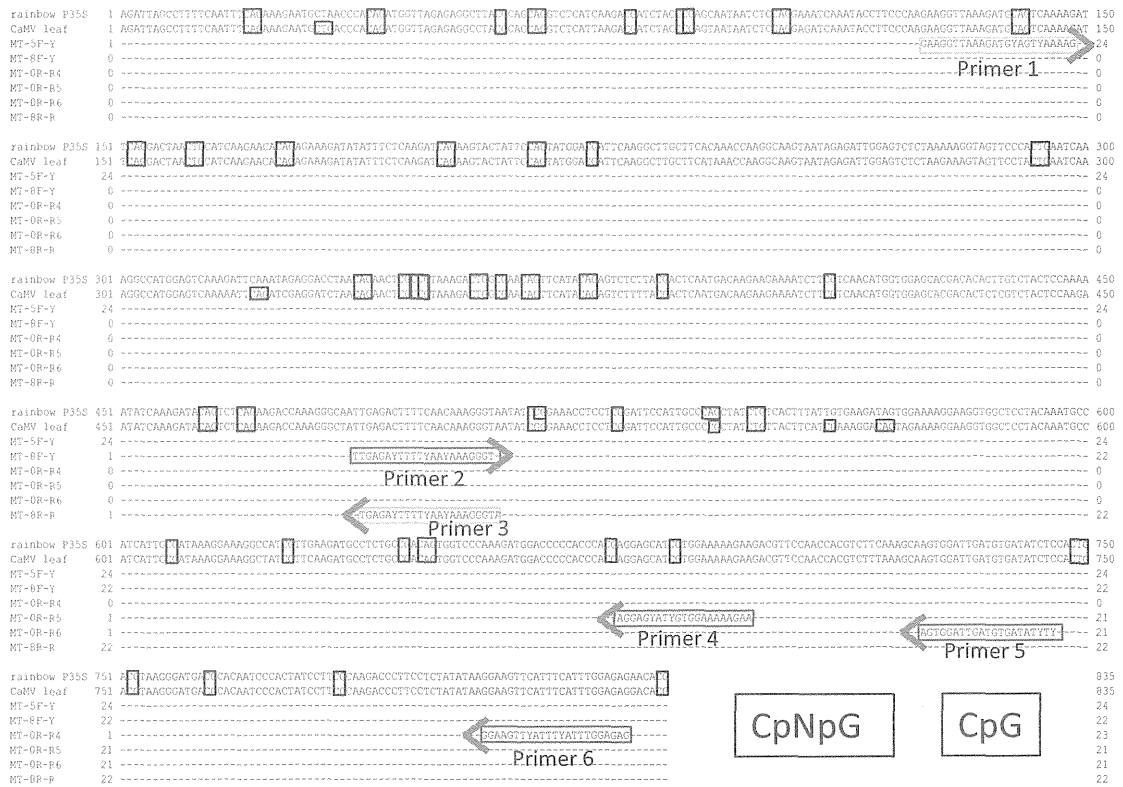


図2. 各検査法のPCR効率

A



B

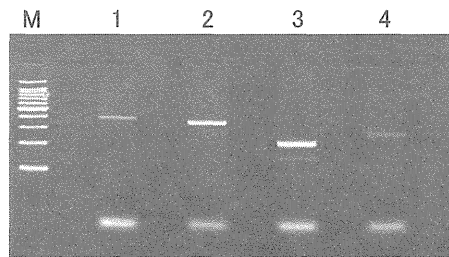


図3. カリフラワーモザイクウイルス由来P35S配列のDNAメチル化パターン解析

(A) メチル化対象のシトシン配列 (CpNpG, CpG) の位置を示す。Forward primer 1, 2とReverse primer 3, 4, 5, 6を使用してバイサルファイト処理後のDNAの増幅を行った。

(B) 2% (w/v)アガロース電気泳動図 Lane 1, primer 1/3 (385 bp); lane 2, primer 2/6 (343 bp); lane 3, primer 2/4 (212 bp); lane 4, primer 2/5 (259 bp)

コカブ感染

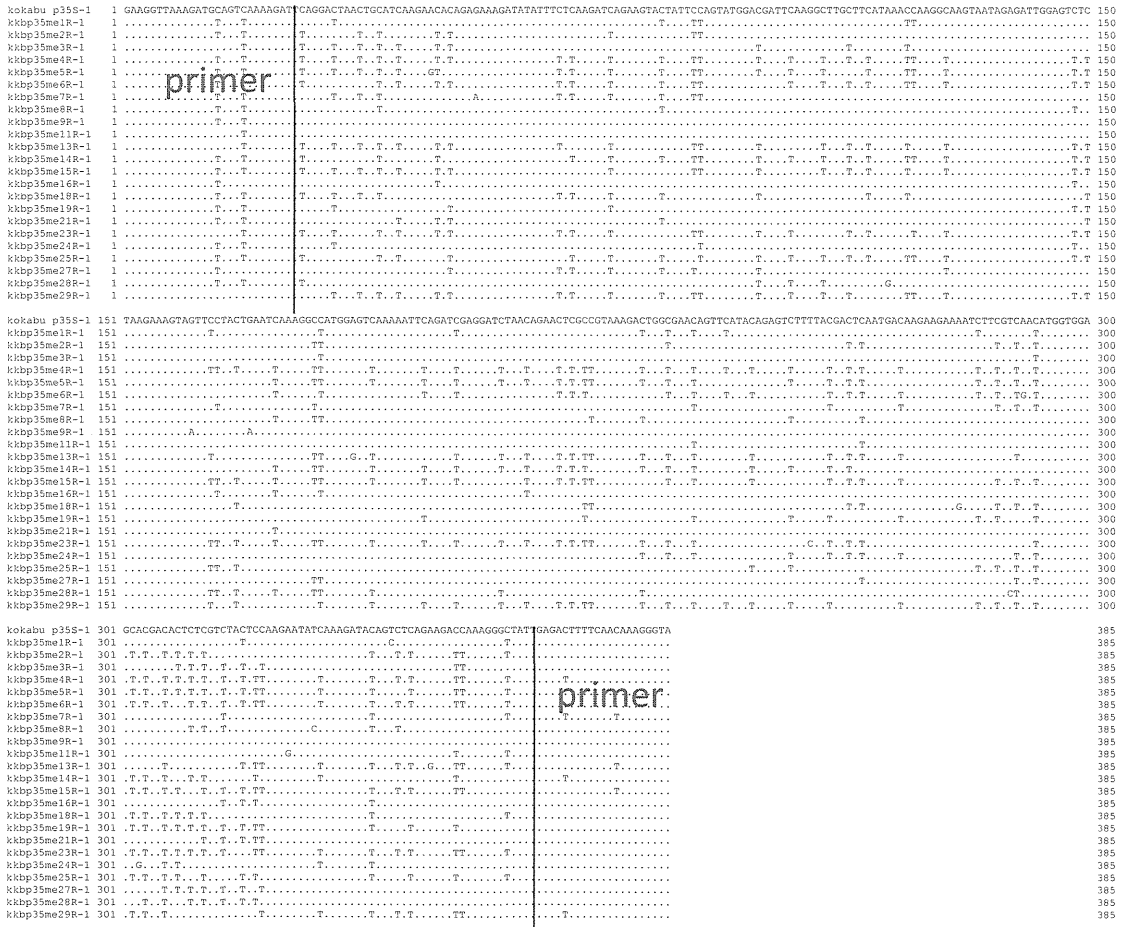


図4. バイサルファイトシーケンシング結果1
 コカブに感染したCaMV由来のP35S塩基配列のメチル化パターンをバイサルファイトシーケンシング
 法より解析した。23クローン配列のアライメントを示す。

GMノパイヤ (Rainbow)

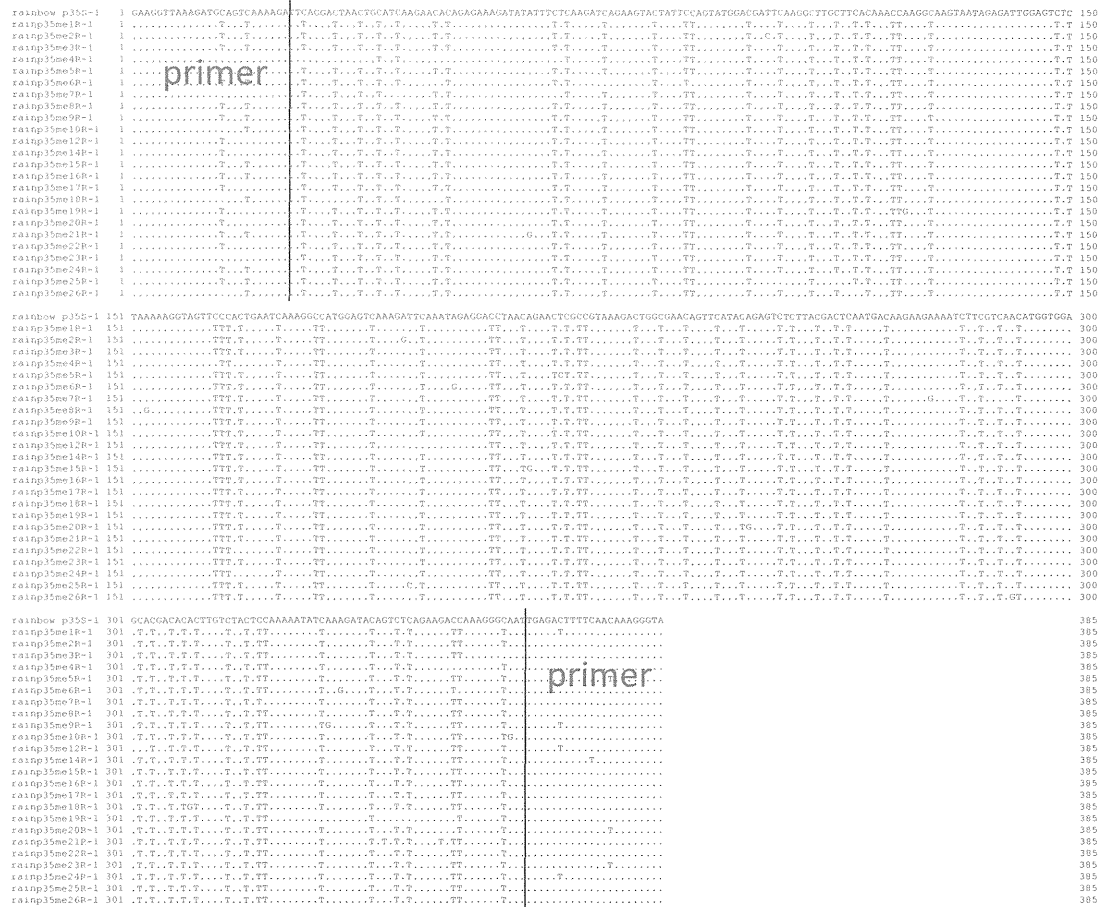


図5. バイサルファイトシーケンシング結果2

GMノパイヤ (Rainbow) に導入されたP35S塩基配列のメチル化パターンをバイサルファイトシーケンシング法より解析した。25クローン配列のアライメントを示す。

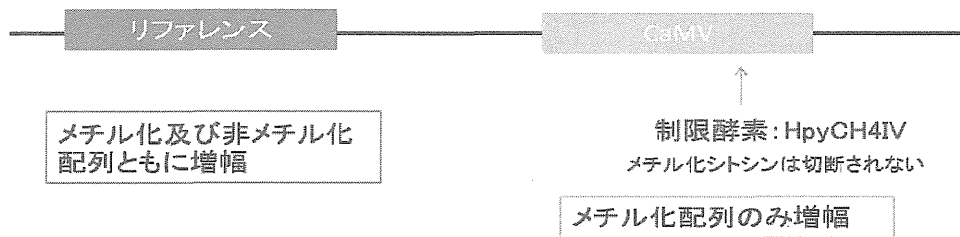


図6. メチル化パターンを利用した解析例
 バイサルファイトシーケンシングより得られたメチル化パターンを利用し、メチル化感受性制限酵素の影響を受けないリファレンス配(ref.)列と、メチル化の影響を受ける配列(CaMV)を設定した。

rainbow P35S	1	AGATTACGCTTTCAATTCAGAGAAAGCTAACCCACGATGGTFAAGAGGCTTACGGAGAGCTCTATCAGAGGATACCCGAGCAATAATCTCCAGSAAATCAATATCTCCAGAGAGCTTAAAGATCCA	140
CaMV leaf p35S	1	AGATTACGCTTTCAATTCAGAGAAAGCTAACCCACGATGGTFAAGAGGCTTACGGAGAGCTCTATCAGAGGATACCCGAGCAATAATCTCCAGSAAATCAATATCTCCAGAGAGCTTAAAGATCCA	140
P35S 1-5'	0	-----	0
P35S-Taq	0	-----	0
P35S 2-3'	0	-----	0
p35S-1-F2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
rainbow P35S	141	GTCAAAAGATTCAAGGACTAAGTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTCTCAAGATCAGAGACTATTCAGATATGGACGATTCAAGGCTTGTTCACAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAA	280
CaMV leaf p35S	141	GTCAAAAGATTCAAGGACTAAGTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTCTCAAGATCAGAGACTATTCAGATATGGACGATTCAAGGCTTGTTCATAAACCAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAA	280
P35S 1-5'	0	-----	0
P35S-Taq	0	-----	0
P35S 2-3'	0	-----	0
p35S-1-F2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
rainbow P35S	281	GGTAGTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAAATAGAGSACTAACAGAACTCCGCCGTAAGACTGGCGAAGCAATACAGAGTCTTTACGACTCAATGACAAGAAAGAAATCTTCGTCAACATGG	420
CaMV leaf p35S	281	GGTAGTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAAATAGAGSACTAACAGAACTCCGCCGTAAGACTGGCGAAGCAATACAGAGTCTTTACGACTCAATGACAAGAAAGAAATCTTCGTCAACATGG	420
P35S 1-5'	0	-----	0
P35S-Taq	0	-----	0
P35S 2-3'	0	-----	0
p35S-1-F2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
rainbow P35S	421	TGGAGCAGCACACTTCTCTACTCCAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAGACCAAGGAGCAATTCAGACTTTTCAACAAGGGTAATATCCGGAACCTCTCGGATTCATTGCCACCTATCTCACTTTAT	560
CaMV leaf p35S	421	TGGAGCAGCACACTTCTCTACTCCAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAGACCAAGGAGCAATTCAGACTTTTCAACAAGGGTAATATCCGGAACCTCTCGGATTCATTGCCACCTATCTCACTTTAT	560
P35S 1-5'	0	-----	0
P35S-Taq	0	-----	0
P35S 2-3'	0	-----	0
p35S-1-F2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
rainbow P35S	561	GTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGTGGCTCTCTACAAATGCCATCATTCGCATAAAGGAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAACCCACCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGA	700
CaMV leaf p35S	561	GTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGTGGCTCTCTACAAATGCCATCATTCGCATAAAGGAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAACCCACCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGA	700
P35S 1-5'	0	-----	0
P35S-Taq	0	-----	0
P35S 2-3'	0	-----	0
p35S-1-F2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
p35S-1-R2	0	-----	0
rainbow P35S	701	CGTCCCAACACGCTCTTAAAGCAAGTGGATTGATGTGATCTCCACTGCTTCAAGGGATGAGCAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGAACAG	835
CaMV leaf p35S	701	CGTCCCAACACGCTCTTAAAGCAAGTGGATTGATGTGATCTCCACTGCTTCAAGGGATGAGCAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGAACAG	835
P35S 1-5'	1	-----	25
P35S-Taq	1	-----	27
P35S 2-3'	1	-----	25
p35S-1-F2	1	-----	19
p35S-1-R2	1	-----	27
p35S-1-R2	1	-----	24

図7. リアルタイムPCR標的配列
 リファレンス及びCaMVを標的としたリアルタイムPCR用プライマー及びプローブの配列。メチル化感受性制限酵素(HpyCH4IV)の認識配列を青で示す。

・制限酵素処理

	uL
ゲノムDNA(10ng/uL)	30
10 × CutsmartBuffer	5
HpyCH4IV (10U/uL)	2
Water	13
	50

37°C overnight
HpyCH4IV 1 uL 37°C 1h反応

フェノクロ/エタノール沈殿後
水25 μLに溶解
Realtime PCRには5 μL/wel

・realtimePCR

	酵素処理無				酵素処理有			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	NTC		NTC					
B	rainbow		rainbow		rainbow 酵素		rainbow 酵素	
C	フロコリー		フロコリー		フロコリー 酵素		フロコリー 酵素	
D	キャベツ		キャベツ		キャベツ 酵素		キャベツ 酵素	
E	コカブ		コカブ		コカブ 酵素		コカブ 酵素	

	uL/well
universal master mix	12.5
probe(10umol/l)	0.25
primerF(50umol/l)	0.4
primerR(50umol/l)	0.4
DW	0.45
DNA(10ng/uL)	5
total	25

50°C	95°C	95°C	60°C
1min	10min	15s	1min
50cycle			

ABI PRISM 7900HT

ref	CaMV
p35S-1-F2	P35S 1-5'
p35S-1-R2	P35S 2-3'
p35S-1-P2	P35S-Taq

	ターゲット	primer配列(5' -3')	増幅断片長
ref	p35S-1-F2	TAAGGGATGACGCACAATC	76bp
	p35S-1-R2	CTCTCCAATGAAATGAACCTCCT	
	p35S-1-P2 (FAM/TAMRA)	TAGAGGAAGGGTCTTGCGAAGGATAGT	
CaMV	P35S 1-5'	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT	101bp
	P35S 2-3'	CCTCTCCAATGAAATGAACCTCCT	
	P35S-Taq (FAM/TAMRA)	CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTCCT	

図8. リアルタイムPCR法を使用したメチル化率の検出法

制限酵素処理及びリアルタイムPCR反応の条件と、設計したオリゴ配列を示す。

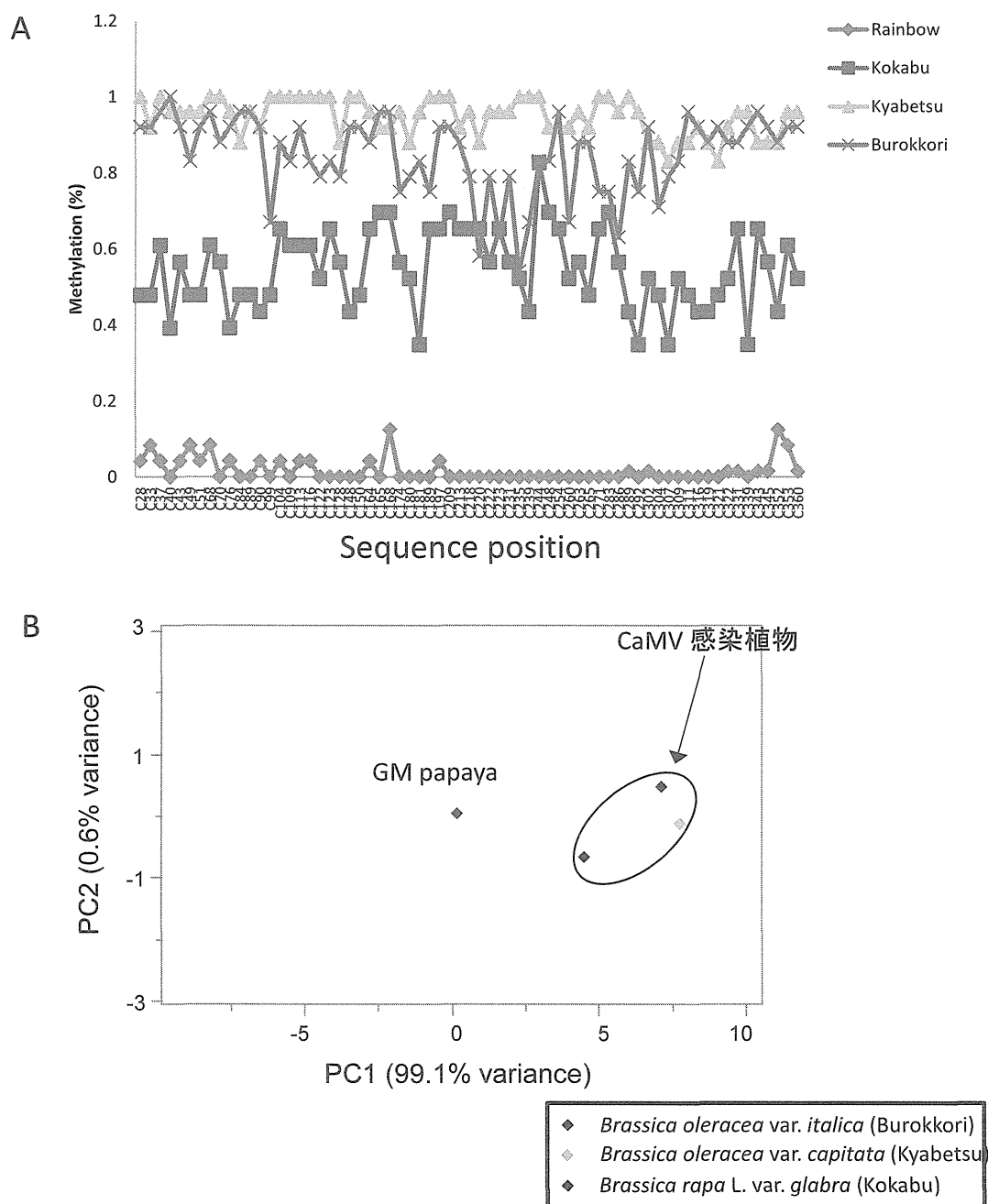
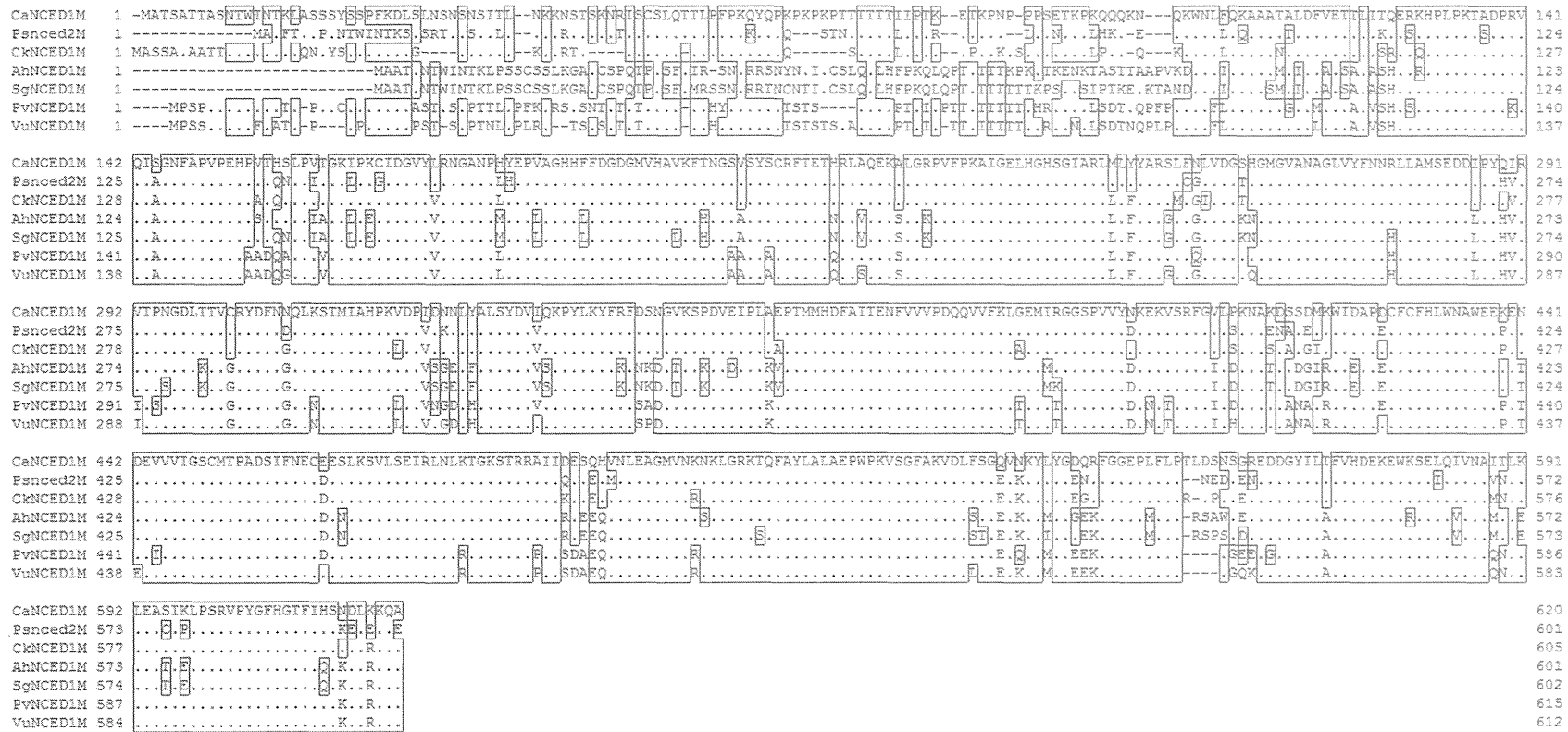
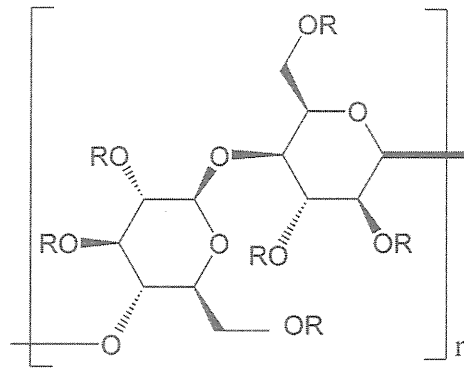


図9. DNAメチル化パターン解析の結果

(A)P35S DNAメチル化対象配列のメチル化率 GMパパイア(Rainbow品種)とCaMVの感染したアブラナ科植物を例に示す。(B) アブラナ科植物(ブロッコリー、キャベツ、コカブ)に感染したP35Sメチル化パターンの多変量解析の結果

図 10. マメ科植物由来NCED1のアミノ酸配列アライメント





R : CH₂COONa

図11. 本研究で使用したカルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC;平均分子量100,000~110000)の化学構造
加工食品の乳化剤、安定剤、増粘剤として使用される。

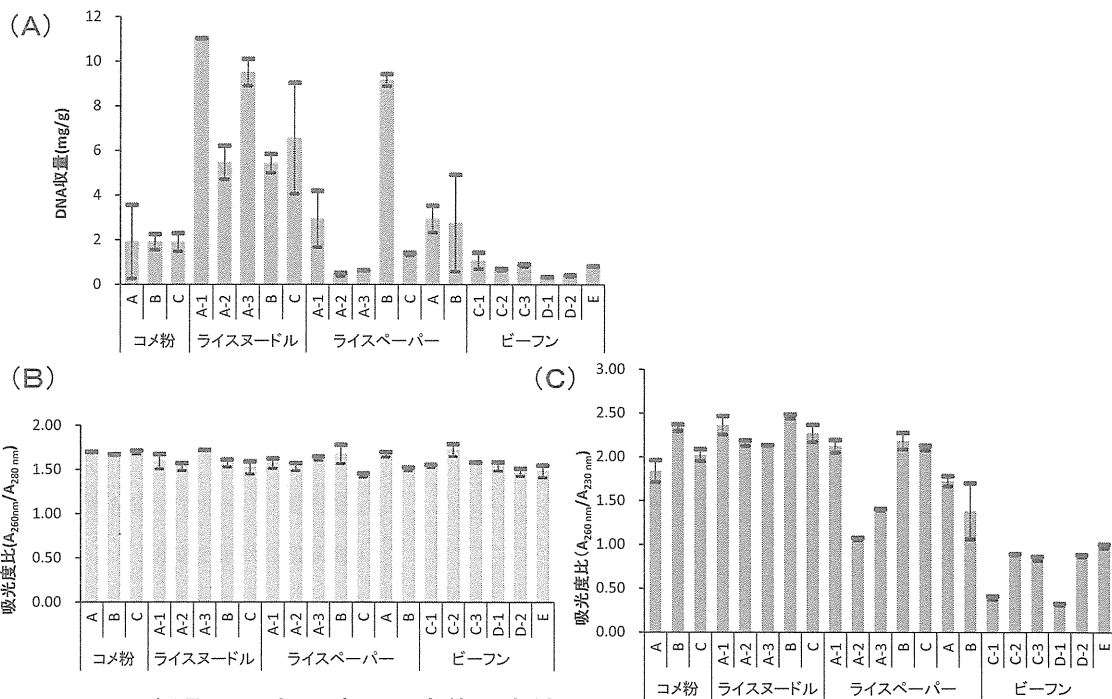


図12. 市販のコメ加工食品の実態調査結果
コメ粉、ライスヌードル、ライスペーパー、ビーフンより抽出精製したDNAの解析結果。
(A) DNA収量 (DNA amount [mg]/sampling amount [g])、吸光度比 (B, A_{260 nm}/A_{280 nm}; C, A_{260 nm}/A_{230 nm})

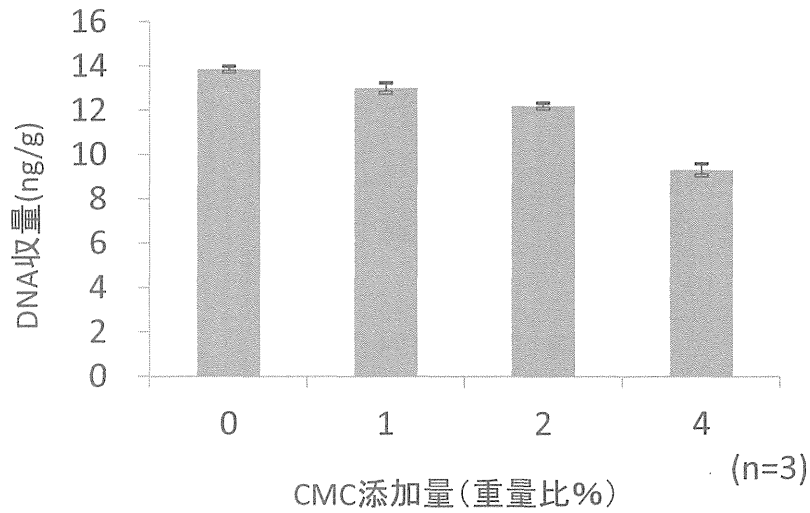


図13. CMC添加試験結果
 ライスヌードル粉碎試料にCMC重量比で0~4%添加し、G-tipより抽出精製したDNA収量を解析した結果

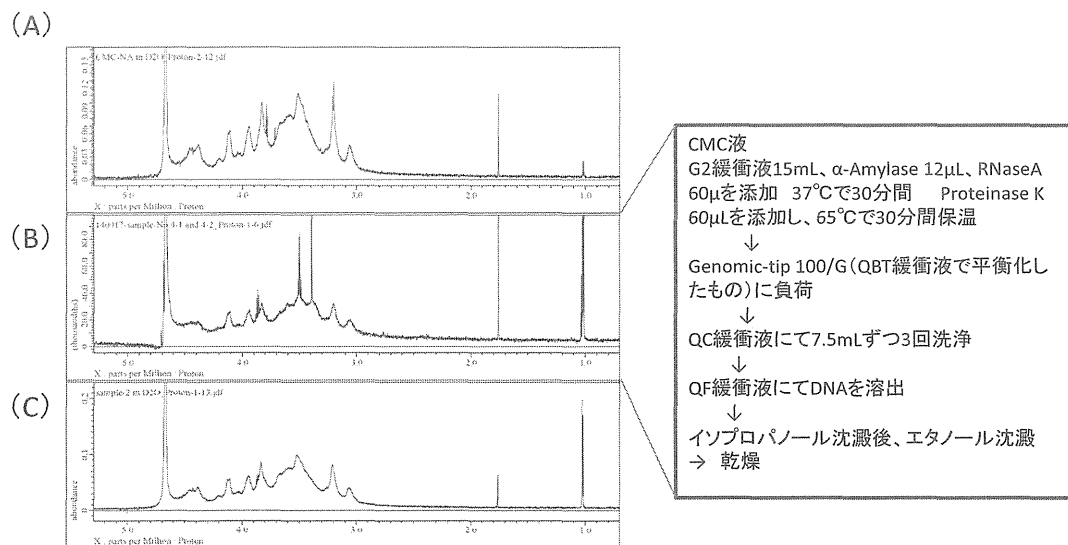


図14. ^1H NMRスペクトル
 (A) CMC標準試料液、(B) CMC溶液をG-tipにロードし、DNA精製プロトコールに沿って溶出されたもの (C) CMC溶液のアルコール沈殿したもの

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）

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：

近年、開発・栽培が急速に進んでいるスタック品種トウモロコシは一粒中に特性の異なる複数の遺伝子組換え（GM）系統の DNA 配列を含んでいるため、従来のリアルタイム PCR による系統特異的定量法を用いた場合、混入率が実際の値より高く見積もられる可能性がある。以前に我々が開発した粒検査法はこの問題を解決し、正確な混入率を割出せる検査法であるが、高価な試料粉碎機器を使用するため、実施できる検査機関が限られている。また、DNA 抽出・精製操作に大きな労力を要することも問題となっている。そこで、本年度は高価な試料粉碎機器を使用せず、DNA 抽出操作を簡便化した改良型粒検査法を開発を行った。DNA 試料液の希釈条件を検討したところ、DNA 試料液を蒸留水で希釈する条件では PCR 増幅の効率が低下することが判明した。そこで本研究では DNA 試料液の原液を用いて GM 系統の検出試験を行った。本検査法は高い感度を示し、抽出バッファー成分による PCR 阻害の影響は少なかった。DNA 抽出条件を検討した結果、ダルマピンを用いた場合のほうが紙ヤスリを用いた場合に比べ、良好な結果が得られ、さらに紙ヤスリを用いた場合にはコンタミネーションや大きな労力が懸念された。以上のことから、DNA 抽出にはダルマピンを用いた方法を採用することにした。本研究で開発した改良型粒検査法は、昨年度開発したスクリーニング検査法に対する確認試験として位置付けられるが、これら 2 つの検査法は現行の安全性承認済み GM トウモロコシ検査法に置き換わる検査法として期待される。

A. 研究目的

近年、異なる系統由来の遺伝子組換え（GM）トウモロコシを掛け合わせたスタック品種トウモロコシの開発が急速に進んでいる。これらは一粒中に特性の異なる複数の GM 系統の DNA 配列を含んでいる。スタック品種が混入した試料では、従来のリアルタイム PCR による系統特異的定量法を用いた場合、混入率が実際の値より高

く見積もられる可能性がある。そのため、以前に我々は粒単位で DNA 抽出、定性試験を行い、正確な GM 混入率を算出する粒検査法を開発した¹⁻³⁾。しかし、本方法は高価な試料粉碎機器を使用するため、実施できる検査機関が限られている。また、DNA 抽出・精製操作に大きな労力を要することも問題となっている。そこで、本研究では高価な試料粉碎機器を使用せず、DNA 抽出

操作を簡便化した改良型粒検査法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

非組換え (non-GM) トウモロコシ 3 品種ならびに GM トウモロコシ MON810, GA21, NK603, MON863, MON89034 および MON88017 の種子は MONSANT 社, Bt11, 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. コントロールプラスミドの作製

本方法に用いるリアルタイム PCR 法を評価するために、内在性遺伝子 *starch synthase IIb* (*SSIb*), GM 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-SSIb, 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 PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。さらに、エタノール沈殿を行い、乾燥後の沈殿を 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-3. DNA 抽出

各トウモロコシ種子につき 4 粒ずつを 1% SDS にて洗浄した後、蒸留水にて数回すすいだ。洗浄後のトウモロコシ種子を市販のダルマピンまたは紙ヤスリ (#100) に

て傷をつけた。その際、ダルマピンを用いた場合は 2 ヲ所穴をあけ、紙ヤスリを用いた場合は胚乳がむき出しになる程度に傷をつけた。1 ウェルあたり 1 粒を 48 ウェルユニプレート (Whatman) に入れ、各ウェルに抽出バッファー (20 mM Tris/HCl (pH8.0), 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS) 0.5 mL を添加した。75 mm 幅のビニールテープにて蓋をし、恒温槽にて 50°C で 1 時間保温した。その際、20 分ごとにビニールテープに液体が付かない程度に軽く振盪させた。保温後、スイング式遠心分離器にて遠心分離し (1,000×g, 室温, 10 分間), 上清を 0.25 mL 採取し、DNA 試料液とした。

B-4. リアルタイム PCR

GM 系統の検出試験は *SSIb*, 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。リアルタイム PCR 機器には LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を用いた。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。DirectAce qPCR Mix ((株)ニッポンジーン) 5 μL, *SSIb*3-5'/*SSIb*3-3' (各 0.08 μM), P35S1-5'/P35S1-3' (各 0.25 μM), NOS ter 3-5'/ NOS ter 2-3' (各 0.3 μM), *SSIb*-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。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。後述する DNA 抽出液の希釈条件の検討に用いたコントロールプラスミド pUC-551 の検出は、下記の PCR 用反

応液の組成にて行った。DirectAce qPCR Mix 5 μ L, 55-1 primer1/55-1 primer2 (各 1.25 μ M), 55-1 probe (0.5 μ M) を混合し, DNA 試料液またはブランク試料液(蒸留水) 1 μ L を添加し, 滅菌水で全量 10 μ L に調製した。反応は上述の条件と同様に行った。プラスミドのコピー数を算出する定量試験は, singleplex リアルタイム PCR にて行った。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 μ L, 対象プライマー対溶液 (各 0.5 μ M), 対象プローブ溶液 (0.2 μ M, *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 μ L] またはブランク試料液 (5 ng/ μ L ColE1/TE) 1 μ L を添加し, 滅菌水で全量 10 μ L に調製した。反応は上述の条件と同様に行った。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. DNA 抽出液の希釈条件の検討

MON810 または MIR162 の種子を Mixer Mill MM200 (Retsch) を用いて粉碎した。粉末試料 0.25 g を 2 mL チューブに入れ, 抽出バッファーを 1 mL 添加した。ボルテックスミキサーにて 10 秒間激しく攪拌した後, 室温で 20 分静置した。遠心分離を行い (14,000 \times g, 室温, 10 分間), 上清を回収した。上清を蒸留水あるいは抽出バッファーにて 2, 5, 10, 100 倍に希釈し, GM 系統の検出試験を行った。また, GM トウモロコシのゲノム配列と相同性を示さない GM パパイヤ 55-1 系統の部分配列を組み込んだコントロールプラスミド pUC-551 (40

copies/ μ L) を DNA 抽出液の希釈系列に添加し, 55-1 系統の検出試験を行った。

B-6. リアルタイム PCR 系の評価

検出限界の算出は, コントロールプラスミド (pUC-*SSIIb*: 5~40 copies/ μ L, pUC-P35S および tNOS: 5~40 copies/ μ L*, *10~80 copies/ μ L pUC-*SSIIb* にて希釈) を用いて行った。抽出バッファー成分の PCR への影響については, 各コントロールプラスミド 40 copies/ μ L を鋳型として, 0.03~0.5% SDS, 40~200 mM NaCl, 0.5~2 mM EDTA (それぞれ終濃度) または抽出バッファーを反応溶液に添加し, リアルタイム PCR を行った。

C. 研究結果

C-1. DNA 抽出液の希釈条件の検討

リアルタイム PCR 試薬として DirectAce qPCR Mix を使用するにあたり, 本試薬の説明書に DNA 抽出液を蒸留水にて 2 倍以上希釈する記述があったため, DNA 抽出液の希釈条件を検討した。*SSIIb* の増幅を試みた結果, 蒸留水で希釈した試料において MON810 では 5 倍以上, MIR162 では 100 倍希釈した試料において検出されなかった (図 2)。一方で, 抽出バッファーで希釈した試料においては, 両 GM 系統ともに 100 倍希釈した試料においても検出された (図 2)。また, P35S+tNOS の増幅を試みた結果, 蒸留水で希釈した試料は抽出バッファーで希釈した試料に比べ, C_q 値が高い傾向を示した (図 2)。さらに, MON810 の DNA 抽出液の希釈系列に pUC-551 を添加し, 55-1 系統の検出試験を行った結果, 抽出バッファーで希釈した場合には C_q 値は一定であったが, 蒸留水で希釈した場合には希釈倍率の増加に伴い C_q 値の増加がみられた (図

2). 一方で、抽出バッファーを蒸留水で希釈した試料に pUC-551 を添加した場合には、 C_q 値は一定であった (図 2). 以上の結果から、本研究での実験条件においてトウモロコシからの DNA 抽出液は、蒸留水で希釈した場合、十分な PCR 増幅が得られないことが示唆された。以降の実験では、DNA 試料液の希釈は行わず、原液を用いて GM 系統の検出試験を行った。

C-2. リアルタイム PCR 系の評価

コントロールプラスミドを用いて検出限界を評価した結果、P35S は 10 copies/ μ L、*SSIIB* および tNOS は 20 copies/ μ L であった (表 2)。また、各検出対象の検出限界における平均 C_q 値は、それぞれ 39.2 (*SSIIB*)、37.6 (P35S)、39.0 (tNOS) であった。抽出バッファーの PCR への影響を評価した結果、0.3% SDS、100 mM NaCl、5 mM EDTA において阻害が見られたが、抽出バッファーと同じ条件では全ての標的配列の増幅が確認された (表 3)。

C-3. DNA 抽出法の評価

DNA 抽出の簡便化のために、トウモロコシ種子にダルマピンまたは紙ヤスリにて傷をつけ、抽出バッファーに DNA を溶出させる方法を検討した。ダルマピンを用いた場合には、全ての試料において 3 併行ともに *SSIIB* を検出することができた (表 4)。また、non-GM 以外の全ての試料において 3 併行ともに P35S+tNOS を検出することができた (表 4)。一方で、紙ヤスリを用いた場合には、3272 系統の 1 粒において *SSIIB* および P35S+tNOS を 2 ウェルおよび 3 ウェルで検出できなかった (表 5)。また、T25 系統の 1 粒において P35S+tNOS を 1 ウェルで検出できなかった (表 5)。しかしながら、

平均 C_q 値は、ダルマピンを用いた場合には 34.25 (*SSIIB*)、33.02 (P35S+tNOS) で、紙ヤスリを用いた場合 [32.31 (*SSIIB*)、31.89 (P35S+tNOS)] に比べ高い傾向を示した (図 3)。なお、すべての系統の平均 C_q 値は、各検出対象の検出限界における平均 C_q 値を超えることはなかった (図 3)。

D. 考察

数多くのスタック品種が開発・栽培されている現状において、現行で用いられている系統特異的定量法による検査法では混入率の過剰定量が起こる可能性がある。この問題を解決するために、粒検査法が開発されたが、高価な試料粉碎機器を使用し、DNA 抽出・精製操作に大きな労力を要することが問題となっていた。本研究では、これらの問題を解決した改良型粒検査法を開発した。

現行の粒検査法は、P35S と GA21 特異的配列を標的配列としているため、これらの配列を持たない新開発 GM 品種を検出することができない。この問題を解決するため、改良型粒検査法では P35S と tNOS を標的配列とした。

本検査法を開発するにあたり、DNA 抽出液の希釈条件を検討したところ、本研究の実験条件では DNA 抽出液を蒸留水で希釈すると PCR 増幅の効率が低下することが判明した。この理由として、DNA 抽出液を蒸留水で希釈することで反応液中の SDS 濃度が低下してミセルが崩壊し、PCR 阻害物質が溶け出したためであると予想された。そこで本研究では DNA 試料液の原液を用いて GM 系統の検出試験を行った。

コントロールプラスミドを用いた検討に

より、本検査法は高い感度を示し、抽出バッファー成分による PCR 阻害の影響は少なかった。

DNA 抽出条件を検討した結果、紙ヤスリを用いた場合のほうがダルマピンを用いた場合に比べ、低い平均 C_q 値を示したが、前者は偽陰性試料がいくつか存在した。また、紙ヤスリを用いてトウモロコシ種子に傷をつける際にトウモロコシの粉が散らばり、コンタミネーションの可能性が懸念された。さらに、ダルマピンを用いた場合のほうが紙ヤスリを用いた場合に比べ、労力が少なかった。以上のことから、DNA 抽出にはダルマピンを用いた方法を採用することにした。

E. 結論

本研究では、従来の粒検査法の問題点を改善した簡便な改良型粒検査法を開発した。本検査法は高価な試料粉碎機器を使用しないため、多くの検査機関で実施可能であり、簡便化により実験の労力を減らすことで、検査の精度を向上させることができると期待される。改良型粒検査法は、昨年度開発した安全性承認済み GM トウモロコシのスクリーニング検査法に対する確認試験として位置付けられが、これら 2 つの検査法は現行のスクリーニング検査法、系統特異的検査法、粒検査法に置き換わる検査法として期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K. and Nishimaki-Mogami, T. (2015) A novel trait-specific real-time PCR method enable quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *Eur. Food Res. Technol.* in press
- (2) Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J. and Kitta, K. (2015) Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control* in press
- (3) Takabatake, R., Masubuchi, T., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R., Kurashima, T., Mano, J. and Kitta, K. (2014) Development and Validation of an Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Maize MIR162. *Food Hyg. Saf. Sci.* **55**, 205-209

2. 学会発表

- (1) 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
- (2) 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：*CaNCE1* 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
- (3) 真野潤一，西辻泰之，菊池洋介，福留真一，林田拓也，川上裕之，栗本洋一，野口秋雄，近藤一成，最上(西巻)知子，高畠令王奈，橘田和美：加工食品中の遺伝子組換え農産物混入率評価手法の検討，第108回日本食品衛生学会学術講演会，金沢，2014年12月
- (4) 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
- (5) 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，穂山浩，手島玲子，近藤一成，最上(西巻)知子：2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析，第51回全国衛生化学技術協議会年会，別府，2014年11月
- (6) 野口秋雄：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，第51回全国衛生化学技術協議会年会，別府，2014年11月
- (7) 中村公亮，近藤一成，小林友子，坂田こずえ，野口秋雄，名古屋博之，真野潤一，橘田和美，最上(西巻)知子：試験室間共同試験による成長ホルモン遺伝子組換えサケ検知法の妥当性確認，第51回全国衛生化学技術協議会年会，別府，2014年11月
- (8) 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：*RFLP* および *Real-time PCR* 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法，第51回全国衛生化学技術協議会年会，別府，2014年11月
- (9) Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Sakata, K., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Nishimaki-Mogami, T. 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, 2014.9
- (10) 高畠令王奈，大西真理，布籐聡，峯岸恭孝，野口秋雄，中村公亮，近藤一成，手島玲子，真野潤一，橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討，2014年度 AOAC 日本セクション年次大会，東京，2014年6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