

μL, α-amylase (高濃度品) 20 μL と RNase A (100 mg/mL) 20 μL を加え混合し, 50°C で 1 時間保温した。次に, Proteinase K (20 mg/mL) 200 μL を加え混合し, 50°C で 1 時間保温した。その他の作物は種子を均質に細粉碎し, 0.5 g を DNA 抽出用試料とした。G2 緩衝液 10 mL, Cellulase 167 μL, α-amylase (高濃度品) 6.7 μL と RNase A (100 mg/mL) 6.7 μL を加え混合し, 50°C で 1 時間保温した。次に, Proteinase K (20 mg/mL) 67 μL を加え混合し, 50°C で 1 時間保温した。酵素処理後, その遠沈管を 3,000×g, 4°C, 15 分間遠心した。その間, あらかじめ 50 mL 遠沈管上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液 3 mL を通して平衡化した。遠心終了後, 得られた上清を, 平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。次に, QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後, あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し, 溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しい遠沈管上にセットし, 再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し, DNA を溶出した。DNA 溶出液にイソプロピルアルコール 2 mL を加えよく混合した。マイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) 1 本当たり 1 mL 程度ずつ, 混合した溶液を移し, 10,000×g 以上で, 4°C, 15 分間遠心した。上清を捨て, 70% (v/v) エタノールを 1 mL ずつ加え 10,000×g 以上で 4°C, 5 分間遠心した。上清を捨て, 残った沈殿を風乾させた後, 予め 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 μL に溶解し, DNA 試料原液とした。

3. コメ内在性遺伝子を標的とした定性リアルタイム PCR 用プライマー・プローブ  
本研究で使用した 3 種のコメ内在性遺伝子を検出するためのオリゴの塩基配列は以下の通りである。

・ Phospholipase D (GenBank accession no. AB001919) を検出するコメ陽性対照プライマー・プローブ (PLD)

< PLD1 (バイエル社で開発) >

KVM159 :  
5'-TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'  
KVM160 :  
5'-CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'  
TM013 :

FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

< PLD2 (本研究で開発) >

PLD3959F :  
5'-GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT-3',  
PLD4038R :  
5'-CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA-3'  
PLD-P :  
FAM-TGAGTATGAACCTGCAGGTCGC-TAMRA

・ Sucrose phosphate synthase (GenBank accession no. U33175) を検出するコメ陽性対照プライマー・プローブ (SPS)

< SPS (J. Agric. Food Chem. 58, 11543-11547, 2010) >

Sps-Taq-1F :  
5'-TTGCGCCCTGAACGGATAT-3'  
Sps-Taq-1R :  
5'-CGGTTGATCTTTTCGGGATG-3'  
Sps-P :  
FAM-TCCGAGCCGTCCGTGCGTC-TAMRA

・ Rice Starch branching enzyme 4 (GenBank accession no. EF055878) を検出するコメ陽性対照プライマー・プローブ (RBE4)

< RBE4 (Eur. Food Res. Technol., 234, 981-993, 2012) >

Rbe4rt-F:  
5'-GTTTTAGTTGGGTGAAAGCGGTT-3'  
Rbe4rt-R:  
5'-CCTGTTAGTTCTTCCAATGCCCTTA-3'  
Rbe4rt-P:  
FAM-TCTGGTTGGGAATAGATACT-MGB

4. リアルタイム PCR 反応及び結果解析  
PCR 用反応液は 25 μL/well として組成は以下のとおり調製した。Universal PCR Master Mix 12.5 μL, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50 μmol/L) 各 0.4 μL, 対象プローブ溶液 (10 μmol/L) 0.25 μL を混合し, DNA 試料液 5 μL (10 ng/μL) を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μL とした。PCR のブランク反応液として, 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、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 20秒、60°C 1分を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン (3サイクルから15サイクル) の $\Delta Rn$ 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. 特異性確認試験

日本晴及びコメ以外の13種の作物から精製したDNA溶液を10 ng/ $\mu$ Lに調整し、4種のコメ陽性対照プライマー及びプローブを用いてリアルタイムPCR反応を行った。増幅曲線とCt値の確認を行うとともに、Agilent2100 バイオアナライザを用いて、PCR産物のサイズを確認した。

泳動に用いたDNAは、リアルタイムPCR後に得られた反応液を1/10に希釈し、それをバイオアナライザの解析に供した。試薬及びDNA用ラボチップはAgilent DNA1000キットを用いた。分析サンプルの準備は以下の方法で行った。キットに含まれているGel(赤)に室温に戻したDye(青)15  $\mu$ Lを加えボルテックスでよく混合し、2240 $\times$ g、10分間、室温でスピンドフィルターを用いて遠心濾過しGel-Dye Mixを作成した。そのGel-Dye Mix 9  $\mu$ LをDNAチップの「G (白抜き)」ウェルに入れ、チップ調整スタンドにセットし、プランジャーを押し、クリップにひっかけたまま60秒放置した。次に、クリップのストッパーをはずし5秒後にゆっくりプランジャーを元の位置に戻した。チップにゲルが充填されたことを確認し、残りの「G」ウェル3か所にGel-Dye Mix 各9  $\mu$ Lずつ入れた。その後、マーカー(緑)5  $\mu$ Lをラダウェルとサンプルウェルにそれぞれ加えた。さらにラダー (黄) 1  $\mu$ Lをラダウェルに入れ、調整したDNA溶液1  $\mu$ Lをサ

ンプルウェルに入れ、専用ミキサーで目盛2400/min、1分間攪拌した。また、MilliQ 350  $\mu$ Lをいれた電極クリーナーチップで電極を洗浄し、分析を開始した。分析の終了後、ゲルイメージとエレクトロフェログラムのデータから、PCR増幅産物のサイズや増幅量を概算した。

#### 6. 増幅効率算出

5段階希釈したコメDNA(5 $\times$ 10<sup>-3</sup>, 5 $\times$ 10<sup>-2</sup>, 5 $\times$ 10<sup>-1</sup>, 5 $\times$ 10<sup>0</sup>, 5 $\times$ 10<sup>1</sup> ng)を鋳型にリアルタイムPCR試験より得られたCt値から検量線を作成し、そこから得られた検量線の傾き (slope) から増幅効率  $E=10^{(-1/slope)}-1$  を算出した。

### 3. リアルタイムPCRを用いたGM作物スクリーニング検査法の開発

#### 1. 試料

GM作物のスクリーニング対象作物として、13種の作物 (コメ、トマト、ピーマン、ナス、トウモロコシ、コムギ、ダイズ、ヒヨコマメ、ナタネ、テンサイ、アマ、ワタ、パパイヤ) から精製したDNAを試験に供した。加工食品の実態調査用としてトマト加工食品9種、ピーマン加工食品3種、ヒヨコマメ加工食品4種、ナス加工食品3種を都内のスーパーやインターネットより購入した。

#### 2. DNA試料の調製

DNAの抽出・精製は、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製カラム (QIAGEN Genomic-tip) を使用し、以下の方法により行った。

トマトペーストは3g、パプリカパウダーは5gを使用した。ヒヨコマメ加工食品の乾燥粉末サンプルは0.4g、その他のヒヨコマメ加工食品はミルサーで粉砕し5gを使用した。ヒヨコマメ以外の生鮮や加工食品はミルサーで粉砕し10gを使用した。揚げナスに関しては、等量の水と混合しミルサーで粉砕した試料を10g使用した。カレーに含まれるヒヨコマメ及びナスは目視で選別し、水洗いしたサンプルを粉砕し試料とした。

試料は、G2緩衝液30 mL、Cellulase 500  $\mu$ L、 $\alpha$ -amylase (高濃度品) 20  $\mu$ LとRNase A (100

mg/mL) 20  $\mu$ L を加え混合し、50°C で 1 時間保温した。次に、Proteinase K (20 mg/mL) 200  $\mu$ L を加え混合し、50°C で 1 時間保温した。その後、その遠沈管を 3,000 $\times$ g, 4°C, 15 分間遠心した。その間、あらかじめ 50 mL 遠沈管上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液 3 mL を通して平衡化した。遠心終了後、得られた上清を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し、溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しい遠沈管上にセットし、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し、DNA を溶出した。DNA 溶出液にイソプロピルアルコール 2 mL を加えよく混合した。マイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) 1 本当たり 1 mL 程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000 $\times$ g 以上で、4°C, 15 分間遠心した。上清は捨て、70% (v/v) エタノールを 1 mL ずつ 10,000 $\times$ g 以上で 4°C, 5 分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を風乾させた後、予め 50°C に温めた滅菌蒸留水 50  $\mu$ L に溶解し、DNA 試料原液とした。

### 3. 定性リアルタイム PCR 検出用プライマー及びプローブ

各作物の内在性遺伝子検出用 (トマト, LAT; パパイヤ, CHY; コメ, PLD; トウモロコシ, SSIIB; ダイズ, Le1; ナタネ, FatA, アマ, SAD) 及び GM 作物検出用 (汎用プロモーター 3 種類: AINT, PUBi, PNOS, P35S, 汎用ターミネーター 2 種類: T35S, tNos, 抗生物質選択マーカー遺伝子 2 種類: HPT, NPTII, 除草剤耐性遺伝子 5 種類: PAT, BAR, GOX, EPSPS1, EPSPS2) プライマー・プローブは表 2 に示した。

### 4. リアルタイム PCR 及び結果の解析

PCR 用反応液は、25  $\mu$ L /well として調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, 対象プローブ溶液 (10  $\mu$ mol/L) 0.25  $\mu$ L を混合し、DNA 試料液 5  $\mu$ L (10 ng/ $\mu$ L) を添加し滅菌蒸留水で全量 25  $\mu$ L に調製した。PCR のブランク反応液として、

必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA 試料液あたり 2 ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad をのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、50°C で 2 分間、次いで 95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15 秒, 60°C 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び、multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) の  $\Delta Rn$  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。

## 4. バスマティ米への GM コメ混入に関する実態調査

### 1. 試料

非 GM コメは日本晴品種を使用し、検査対象のバスマティ米は、パキスタン産及びインド産の計 9 種を購入し、GM コメ混入スクリーニング検査に供した。

### 2. DNA 精製

DNA の抽出・精製は、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出・精製カラム (QIAGEN Genomic-tip) を使用して行った。均質に細粉碎し得た試料 500 mg は、G2 緩衝液 15 mL,  $\alpha$ -amylase (高濃度品) 12  $\mu$ L と RNase A (100 mg/mL) 30  $\mu$ L を加え混合し、37°C で 30 分保温した。次に、Proteinase K (20 mg/mL) 60  $\mu$ L を加え混合し、65°C で 30 分保温した。その後、その遠沈管を 3,000 $\times$ g, 4°C, 15 分間遠心した。その間、あらかじめ 50 mL 遠沈管上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液 4 mL を通して平衡化した。遠心終了後、得られた上清を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄

した後、あらかじめ 50℃に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し、溶出液は捨てた。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しい遠沈管上にセットし、再度 50℃に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し、DNA を溶出した。DNA 溶出液にイソプロピルアルコール 2 mL を加えよく混合した。マイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) 1 本当たり 1 mL 程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000×g 以上で、4℃、15 分間遠心した。上清を捨て、70% (v/v) エタノールを 1 mL ずつ 10,000×g 以上で 4℃、5 分間遠心した。上清を捨て、残った沈殿を風乾させた後、予め 50℃に温めた滅菌蒸留水 50 μL に溶解し、DNA 試料原液とした。

### 3.リアルタイム PCR 用プライマー及びプローブ

P35S, tNos を検出するリアルタイム PCR 用プライマー及びプローブは、表 2 に示したものを使用した。害虫抵抗性 GM コメの検出には、厚生労働省より通知された GM コメ検査法 (食安発 1116 (平成 24 年 11 月 16 日)) の GM コメ (63Bt, NNBt, 及び CpTI コメ) を検出するリアルタイム PCR 用プライマー対及びプローブを使用した。

#### トリプシンインヒビター導入 GM コメ (CpTI コメ) 検知法 :

CpTI-2F:  
5'- TGC AAG TCC AGG GAT GAA GAT-3'  
NOS-1R:  
5'- ACC GGC AAC AGG ATT CAA TC-3'  
KDEL-P:  
FAM-ATG AGA AAG ATG AAC TCT  
AG-MGB

#### Cry1Ac/Ab 導入 GM コメ (63Bt, NNBt コメ)

##### 検知法 :

63Bt, NNBt コメ検出用のプライマー対  
T52-SF : 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC  
AGA TTC-3'  
OsNOS-R2 : 5'- AAG ACC GGC AAC AGG  
ATT CA-3'  
63Bt コメ検出用プローブ  
GM63-Taq :  
FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGA  
ATTTCCC-TAMRA  
NNBt コメ検出用プローブ  
NGMr-Taq :

FAM-AATGAGAATTCGGTACCCCGACCTG  
CA-TAMRA

#### コメ陽性対照用 phospholipase D (PLD2) 検知法 :

PLD3959F :  
5'-GCT TAG GGA ACA GGG AAG TAA AGT  
T-3'  
PLD4038R :  
5'-CTT AGC ATA GTC TGT GCC ATC CA-3'  
PLD-P :  
FAM-TGA GTA TGA ACC TGC AGG TCG  
C-TAMRA

### 4. リアルタイム PCR 反応及び結果解析

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix 12.5 μL, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50 μmol/L) 各 0.4 μL, 対象プローブ溶液 (10 μmol/L) 0.25 μL を混合し、DNA 試料液 5 μL (10 ng/μL) を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μL 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、95℃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℃ 20 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 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. Line 0.2) を選択した。その Th. line から Ct 値を得た。

### 5. 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

(その 1)  
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ものをを用いた。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, 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。

(その2)

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。デジタル PCR 解析には、QuantStudio3D (Life Technologies 社)を使用した。

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

試料は、市販ドライフルーツ (パパイヤとトマト) をを用いた。亜硫酸塩処理されたドライパパイヤ9製品とドライトマト4製品、亜硫酸塩未処理のドライパパイヤ1製品とドライトマト2製品を陽性対照試験に供試した。試料からの DNA 抽出と精製法は、

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

#### 7. 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。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。

## 8. 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碎した。粉碎した試料は、0.1 g をポリプロピレン製遠沈管(1.5 mL 容)に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 400 mL と RNaseA 4 mL 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 130 mL を加え混合し、氷上で 5 分間 静置した。13,000 rpm、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、13,000 rpm、2 分間遠心後、溶出液の上清を新しい遠沈管(1.5 mL 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 650 mL を mini spin column に負荷し、13,000 rpm 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'TTGAGAYTTTTTYAAAYAAAGGGT3'

MT-8R-R (Primer3);

5'TACCCTTTRTTRAAAARTCTCA3'

MT-0R-R5 (Primer 4);

5'TTCTTTTTCCACRATRCTCT3'

MT-0R-R5 (Primer 5);

5'RARATATCACATCAATCCACT3'

MT-0R-R4 (Primer6);

5'CTCTCCAAATRAAAATRAACTTCC3'

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  $\mu$ L、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 TemphiPhi 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

$\times$ 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  $\times$ 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  $\mu$ L 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-TAGAGGAAGGGTCTTGC GAAGGAT AGT-TAMRA (Probe, p35S-1-P2)

CaMV:

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

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

FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTC CT-TAMRA (Probe, P35S-Taq)

メチル化相対比率は、GM パパイアの 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( $\Delta Ct$ )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。

## 9. 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。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. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

マメ科の NCED 遺伝子(ササゲ, GenBank accession no. AB030293, *VuNCED*; スタイロザンデス, GenBank accession no. DQ062150, *SgNCED*; エンドウ, GenBank accession no. AJ574819, *PsNCED*; インゲン, GenBank accession no. AB030293, *CkNCED*; ラッカセ

イ, GenBank accession no. AJ574819, *AhNCED*; カラガナ, GenBank accession no. GQ395772, *CkNCED*) の相同配列領域を基に PCR 用プライマー対(DP1,5'A/ DP2,5')を設計した。PCR より、約 850 bp の増幅産物を得た。シークエンス解析から得られた配列とマメ科由来の NCED 配列より系統樹を作成したところ、CaNCED はエンドウ由来のものに最も近縁であることが示唆された。エンドウ由来の NCED 配列を基に CaNCED 遺伝子の 5'側を増幅させるプライマー対(CP-F1 or CP-F2/ CP-R1)を設計し、PCR を行ったところ約 560 bp と約 480 bp の増幅断産物を得た。CaNCED 遺伝子の 3'側も同様にプライマー対(CP-R2 or CP-R3/ CP-F3)を設計し、PCR を行ったところ約 880 bp と約 400 bp の増幅産物を得た。ゲノムウォーキング法より既知配列から CaNCED 配列の末端配列を解析した。その結果、全長 1863 bp のヒヨコマメ由来 NCED1 (CaNCED) の ORF 配列(GenBank no. AB771415)を得た。CaNCED のサザンブロッティング解析の結果、検出用プローブに使用した塩基配列内で消化されない *Xba*I で処理した DNA には、約 5.5 kb に 1 本のバンドを検出した。

### 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。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



界および定量限界は 250 コピーであった。

### 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 1860 bp 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)。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。

### 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。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。

### 2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討

$5 \times 10^{-3}$  ng のコメ DNA を鋳型にリアルタイム PCR を行ったところ、全てのプライマー・プローブセットにおいてそれぞれ目的の PCR 増幅断片長 (PLD1 : 68 bp, PLD2 : 80 bp, SPS : 81 bp, RBE4 : 106 bp) を検出した。PLD1 はトウモロコシにおいて交差反応が見られたが、PLD2, SPS 及び RBE4 はコメのみを検出し、他の作物との交差反応性は見られず高い特異性を示した。5 段階希釈した日本晴コメ DNA ( $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^0$ ,  $5 \times 10^1$  ng) を鋳型にリアルタイム PCR を行った。PCR 増幅効率 (E) は、PLD1 (E=0.89), PLD2 (E=0.98), SPS (E=1.00), RBE4 (E=0.91) であった。Threshold Line 0.2 の Ct 値で PCR 増幅効率 (E) を比較すると PLD2 と SPS はほぼ一致し PLD1 と RBE4 はそれに比べ劣った。また、PCR 増幅曲線の形状において、SPS はその他のプライマー・プローブセットに比べ増幅曲線の立ち上がりが悪く、DNA 濃度によってエンドポイント値に差が生じた。

### 3. リアルタイム PCR を用いた GM 作物スクリーニング検査法の開発

リアルタイム PCR を用いて作物の形質転換に汎用される遺伝子配列の検出を試みた。13 種の非 GM 作物 (コメ、トマト、ピーマン、ナス、トウモロコシ、コムギ、ダイズ、ヒヨコマメ、ナタネ、テンサイ、アマ、ワタ、パパイヤ) を試験対象にした結果、アマ、コムギ、テンサイ、トウモロコシの 4 種に NPT II が検出された。検出された NPT II は Ct 値が高いため、試料への細菌の混入による可能性が高いことが示唆された。コメの AINT、トウモロコシの Pubi は内在性遺伝子のため陽性 (コメの AINT の検出 Ct 値 : 23.57, 23.66; トウモロコシの Pubi の検出 Ct 値 : 26.54, 26.73) であった。

NPT II 以外は、すべての作物で検出は確認されなかった。

#### 4. バスマティ米への GM コメ混入に関する実態調査

計 9 種類のバスマティ精米製品（パキスタン産 5 種類 SC-1, SC-2, SC-6, SC-8, SC-9, インド産 4 種類 SC-3, SC-4, SC-5, SC-7）から DNA を抽出・精製を行った結果、SC-3, SC-4, SC-7, SC-8, SC-9 の 5 製品から精製した DNA 試料の吸光度比は、A260/A280 1.8 以上、A260/A280 1.2 以上が得られ良好な DNA 精製度であった。SC-1, SC-2, SC-5, SC-6 の 4 製品から精製した DNA 試料は、A260/A280 1.6 以上、A260/A280 0.7~1.0 程度が得られ精製度はやや劣ったが、リアルタイム PCR を用いて 50 ng を鋳型に PLD の検出を行ったところ、いずれの DNA 試料においても Ct 値 22~24 (threshold 値 0.2) が得られ標的遺伝子の高感度な検出が可能であることが示唆された。GM コメ混入に関する実態調査を行った結果、どの検体からも GM コメ陽性の結果は得られなかった。

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。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。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、土壤細菌やウィ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。

#### 5. 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

##### (その 1)

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。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。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。

##### (その 2)

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み込んだものを使用した。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、Cry1Ac とゲノムの境界を標的とする。Shanyou63 系統を検出する Bt63 検知法は構造特異的で、Cry1A 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。また、PCR 増幅効率、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。

(その 3)

#### 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。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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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。

#### 6. 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。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。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)。

### 7. 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) 設定した。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, primer2/5) 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。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339bp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。一方、GM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。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。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。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パイヤ55-1系統と比較し31~225倍であった。

### 8. 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 ( $0.32 \pm 0.02 \mu\text{g/g} \sim 3.05 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ )、コメ粉 ( $1.88 \pm 0.41 \mu\text{g/g} \sim 1.91 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ )、ライスペーパー ( $0.44 \pm 0.08 \mu\text{g/g} \sim 9.16 \pm 0.27 \mu\text{g/g}$ )、ライスヌードル ( $5.42 \pm 0.43 \mu\text{g/g} \sim 11.01 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ ) の順に高かった。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 ( $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  および  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) が最も低かった。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% ( $12.2 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$ )、重量比4%添加では67% ( $9.3 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ ) に低下した (各添加濃度  $n=3$ )。

## D. 考察

### 1. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発 遺伝子配列解析

植物の乾燥ストレス耐性に機能するとされるNCEDは、ササゲ、スタイロ、エンドウ、インゲン、ラッカセイなどのマメ科植物や、コメ、トマト、ジャガイモ、アボカド、ブドウ、トウモロコシ、アラビドプシスなどの多くの植物に発現していることが報告されている。データベースより既知のNCED塩基配列を比較すると、属及び種間において相同性が低いことから、ヒヨコマメに特異性の高い遺伝子となる可能性が示唆された。本研究では、GMヒヨコマメ検査のリファレンスに使用するヒヨコマメ内在性遺伝子検知用プライマー・プローブを設計することを目的に、ヒヨコマメのNCED遺伝

子 (CaNCED) のクローニングを行い、ORF の塩基配列を明らかにした。サザンブロット法により、CaNCED 遺伝子はゲノム上に1コピーのみ存在することが確認された。また、シーケンス解析の結果、CaNCED の5'末側の ORF は、各種マメ科のものと比較し非相同的であった。以上のことから、CaNCED の非相同領域を標的に定性及び定量用のヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を確立可能であると示唆された。

#### 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。

#### 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、サザンブロット法により、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・定性的に検出する際に有用であることが示唆された。

#### 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つたが、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。

#### 2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討 (コメ内在性遺伝子)

コメ内在性遺伝子を検出する4種のリアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットを比較した結果、本研究で開発した PLD2 はコメのみに特異性を示し、日本晴 DNA を鋳型に高い検出感度と増幅効率を示した。また、PLD 遺伝子はコメ染色体上に17種のアイソフォームの存在を確認しているが、BLAST 検索において PLD2 の標的配列に相同性を示す他の配列は確認されなかった。以上のことから、定性リアルタイム PCR を用いた GM コメ検査法におけるコメ内在性遺伝子の検知には、PLD2 が PCR 検出感度、特異性及び増幅効率ともに優れていることが示唆された。

### 3. リアルタイム PCR を用いた GM 作物スクリーニング検査法の開発

リアルタイム PCR を用いることで、食品に混入した GM 作物に由来する特異的な配列を検出することが可能であった。NPTII は、試料中のバクテリアの混入を検出してしまふ恐れが考えられることから、GM 作物の混入を高感度に検出する際には、得られる Ct 値の値から判断する必要が示唆された。また、検査にはナス、ピーマン、ヒヨコマメ、ワタ、コムギ、テンサイの内在性遺伝子を特異的に検出するリアルタイム PCR 法の開発が求められた。今後、リアルタイム PCR を使用した高感度 GM 作物混入に関するスクリーニングで陽性と判定された試料に関しては、次世代シーケンシングを利用した方法、Inverse-PCR 法、Genome-walking 法などで導入遺伝子配列の同定を行い（図 9）、新規検知法を開発していく予定である。

### 4. バスマティ米への GM コメ混入に関する実態調査

厚生労働省より通知された GM コメ検査法（食安発 1116（平成 24 年 11 月 16 日））に従って、バスマティ米製品の GM コメ混入に関する検査を行ったところ、試験を行った 9 製品において陽性と判定された製品はなかった。また、P35S 及び tNOS を検出する GM コメスクリーニング結果においても陰性であったことから、EU の検査で陽性であった害虫抵抗性 GM コメの混入はないことが示唆された。

### 5. 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。

### 6. 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 検知法と TT51-1 検知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、構造特異的検知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 を使用した検知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、いずれの検知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 倍多くコピー数を検出した。この結果から、Kefeng6 系統の 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。

#### 7. 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。

#### 8. 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こし、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。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 339 bp 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プ化することができ、それぞれを明確に見分けることが可能であった。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。

#### 9. 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<sup>1</sup>H-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。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. ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発

ヒヨコマメ由来9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase (CaNCED)のORFの塩基配列を明らかにした。CaNCEDはヒヨコマメゲノム上に1コピーのみ存在していた。今後、ヒヨコマメに特異的な内在性遺伝子検知法を確立する予定である。

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  
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。

### 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ッション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)。

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。

### 2. コメ陽性対照用プライマー及びプローブの比較検討

コメ内在性遺伝子PLDに特異的で増幅効率に優れているリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットPLD2を開発した。

### 3. リアルタイムPCRを用いたGM作物スクリーニング検査法の開発

リアルタイムPCRを用いたGM作物の食品への混入を網羅的に検出するスクリーニング法を確立した。

### 4. バスマティ米へのGMコメ混入に関する実態調査

平成24年度にインターネットを通じて市販されているパキスタン産及びインド産のバスマティ米に害虫抵抗性GMコメの混入は検出されなかった。

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  
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。

### 5. 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。



## 6. 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。

## 7. 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・学会発表

#### 平成24年度論文発表

1) 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*, 2013, in press.

2) 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*, 2013, in press.

3) 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

4) 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(2), 895-901, 2013

5) 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(3), 215-222, 2012

6) 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 Hyg. Saf. Sci.*, 53(4), 157-165, 2012

7) 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

8) Mano, J., Harada, M., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Noritake, H., Iizuka, T., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K. Single-laboratory validation of comprehensive GMO detection method using real-time PCR array. *Journal of AOAC International*, 95, 508-516, 2012

#### 平成24年度学会発表

1) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Apple procyanidins inhibit development of collagen-induced arthritis via down-regulation of Th17 response. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.2)

2) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano,

N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting genetically modified Bt rice lines harboring CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct in rice product. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)

3) Morimoto, K., Katayama, S., Fukumoto, T., Nakamura, K., Nakamura, S. Amyloidogenicities of artificially synthesized human stefins A and B. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)

4) Nakamura, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R. Applicability of Qualitative and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Genetically Modified Papaya Line 55-1 to Papaya Products. 126th AOAC Annual Meeting & Exposition, Las Vegas, USA, (2012.10)

5) 中村公亮, 穂山浩, 松岡英樹, 中島翔平, 神田智正, 近藤一成, 手島玲子: リンゴプロシアニジン(ACT)の経口摂取によるコラーゲン誘導性関節炎の発症遅延効果, 日本薬学会 第 133 年会, 横浜, (2013.3)

6) 中島治, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子: ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について, 日本薬学会 第 133 年会, 横浜, (2013.3)

7) 近藤一成, 小櫃冴未, 小林友子, 中村公亮, 坂田こずえ, 野口秋雄, 手島玲子: PCR-RFLP 法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法, 日本薬学会 第 133 年会, 横浜, (2013.3)

8) 中村公亮, 穂山浩, 野口秋雄, 小林友子, 坂田こずえ, 近藤一成, 大森清美, 笠原正輝, 高島令王奈, 橋田和美, 手島玲子: パパイア加工品の遺伝子組換えパパイア含有に関する総合的評価法, 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会, 香川, (2012.11)

9) 野口秋雄, 中村公亮, 坂田こずえ, 小林友子, 大森清美, 笠原正輝, 高島令王奈, 橋田和美, 穂山浩, 近藤一成, 手島玲子: 遺伝子組換えパパイア 55-1 系統特異的検知法の妥当性評価, 第 49 回全国衛生化学技術

協議会年会, 香川, (2012.11)

10) 近藤一成, 坂田こずえ, 小櫃冴未, 中村公亮, 野口秋雄, 手島玲子: フロクマリン類の in vitro 光毒性について, 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会, 香川, (2012.11)

11) 野口秋雄, 穂山浩, 中村公亮, 坂田こずえ, 真野潤一, 高島令王奈, 峯岸恭孝, 布藤聡, 橋田和美, 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 (第二報), 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)

12) 小林友子, 中村公亮, 近藤一成, 野口秋雄, 小櫃冴未, 峯岸恭孝, 真野潤一, 高島令王奈, 橋田和美, 手島玲子: 遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討, 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)

13) 中村公亮, 南竹優美, 近藤一成, 野口秋雄, 小櫃冴未, 真野潤一, 高島令王奈, 橋田和美, 穂山浩, 川上浩, 手島玲子: 遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモ DNA の断片長について, 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)

14) 真野潤一, 高島かおり, 峯岸恭孝, 二宮健二, 布藤聡, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, 高島令王奈, 橋田和美: 遺伝子組換えトウモロコシグループテスト法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立, 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)

15) 西辻泰之, 菊池洋介, 真野潤一, 福留真一, 遠藤繁, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, 高島令王奈, 橋田和美: プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイム PCR アレイ法への適用, 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会, 岡山, (2012.9)

16) 中村公亮, 穂山浩, 河野徳昭, 吉松嘉代, 野口秋雄, 近藤一成, 真野潤一, 橋田和美, 手島玲子: 日欧で検出された安全性未審査遺伝子組換えコメ(Kefeng 系統)混入に関する検知技術の開発について(第2報), 日本食品化学学会 第 18 回 総会・学術大

会, 函館, (2012.6)

17) 高畠令王奈, 則武寛通, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 穂山浩, 手島玲子, 真野潤一, 橘田和美: 加工品を含む複数のスイートコーン試料からの DNA 抽出法の検討, 日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会, 函館, (2012.6)

平成 25 年度論文発表:

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

平成 25 年度学会発表 :

1. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013 年 11 月.
2. Ogawa, H., Kano, F., Otsuki, T., Hoshino, H., Nakamura, K., Mori, H., Sakagami, H. Characterization of the anti-HIV-1 mechanism of a pseudoproteoglycan produced by conjugating unsulfated dextran with poly-L-lysine. the 22nd International Symposium on Glycoconjugates, Dalian, China, 2013 年 6 月.
3. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. Pharma-nutrition 2013, Singapore, 2013 年 4 月.
4. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子 : 安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について (コメの場合)、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
5. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子 : 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
6. 野口秋雄、穂山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子 : スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
7. 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、

手島玲子、高島令王奈、橘田和美 : ダイレクショナルタイム PCR による食品分析の可能性検証、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月

8. 野口秋雄、坂田こずえ 真野潤一、中村公亮、高島令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上 (西巻) 知子 : 2010 年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
9. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上 (西巻) 知子 : 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
10. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高島令王奈、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上 (西巻) 知子 : 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
11. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、最上 (西巻) 知子、手島玲子、長澤栄史、近藤一成 : ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
12. 近藤一成、中村公亮 野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ、手島玲子、最上 (西巻) 知子 : 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
13. 坂田こずえ、小櫃冨未、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、