

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

**次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発**

研究分担者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 石垣拓実 国立医薬品食品衛生研究所

**研究要旨**

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：次世代ゲノム編集技術は、ゲノム上の任意の配列を標的に DNA の導入や欠失を高効率で行うことを可能にする。今後、この技術を応用した遺伝子組換え（GM）食品の開発が期待される。しかし、DNA の導入や欠失に伴うゲノムへの影響、特にゲノム構造、内在性遺伝子の発現やエピゲノムに与える影響に関する情報は十分に得られていない。本研究では、次世代ゲノム編集技術の一つである Transcription activator-like effector nuclease（TALEN）を利用してニワトリゲノムの  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、動物細胞内で構成的にかつ大量の転写産物の発現を可能にする汎用性の高い Cytomegarovirus（CMV）及び Simian virus 40（SV40）ウィルスプロモーター遺伝子発現カセットを導入し、内在性遺伝子発現量、ゲノム構造及びエピゲノムに及ぼす影響に関して解析した。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：近年、主に新興国で開発され規制外に流通した GM 食品の食品への混入が欧州及び日本で度々問題となっている。今後は、GM 作物の開発に汎用されている従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いた組換えのみならず、次世代バイオ技術を応用した多種多様な形態の GM 食品の意図せぬ混入が考えられる。そこで、安全性未承認 GM パパイア PRSV-YK 系統をモデルに、19 bp 程度の短い配列をアンカーとして次世代シーケンサー MiSeq を使用し得られた配列データベースより、GM 作物のゲノムに挿入されたトランスジェニック構造配列の解析及び系統の特定を可能とする迅速検知法を開発を行った。

**A. 研究目的**

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

次世代ゲノム編集技術は、ゲノム上の任意の配列を標的に DNA の導入や欠失を高効率で行うことを可能にする。今後、この技術を応用した遺伝子組換え（GM）食品の開発が期待される。しかし、DNA の導入や欠失に伴うゲノムへの影響、特にゲノム構造、内在性遺伝子の発現やエピゲノムに与える影響に関する情報は十分に得られていない。本研究では、次世代ゲノム編集技術の一つである Transcription

activator-like effector nuclease（TALEN）を利用してニワトリゲノムの  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに解析し総合的に解釈した。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

近年、主に新興国で開発され規制外に流通した GM 食品の食品への混入が欧州及び日本で度々問題となっている。2013 年 1 月から 2014 年 11 月末現在までに欧州食品飼料緊急警告システム（RASFF）では GM トウモロコシ

(Bt176 系統) コメ (Bt63 系統など) パパイア (系統名不明) の混入 66 件を報じた。日本では、2013 年 7 月にタイ産未承認 GM パパイア PRSV-SC 系統の食品への混入を報じている。今後は、従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いた組換えのみならず、次世代バイオ技術を応用した多種多様な形態の GM 食品の意図せぬ混入が考えられる。そこで、2011 年に国内のパパイア加工食品より検出された安全性未承認 GM パパイア PRSV-YK 系統の果実から精製したゲノム DNA をモデルに、次世代シーケンサー-MiSeq を使用した GM 作物の迅速検知法の開発を行った。

## B. 研究方法

### 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

#### 1) 培養細胞

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

#### 2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローン化

TALEN を用いて培養細胞への GM 操作を行った。TALEN の標的配列は、昨年度と同様にニワトリ 14 番染色体のグロビン遺伝子クラスターの非コード DNA 領域 (120,080,385 ~ 12,080,440) とした。TALEN の DNA 結合ドメイン標的配列は、上流側には、5'-CTTTCATGTTCCACCTAC-3'、下流側には 5'-AGTGATTTCCAAACACAC-3' の 18 bp とし、それぞれの配列を認識する TALEN 発現ベクターを *in vitro* で転写後、得られた mRNA を細胞

へ導入した。pCDNA-DEST40 ベクター中の T7 プロモーターで T7RNA polymerase により転写させた。*In vitro* 転写には、mMESSAGE mMACHINE<sup>®</sup> T7 ULTRA Transcription Kit (Life Technologies) を使用して mRNA の合成を行い、MEGAclean<sup>™</sup> Transcription Clean-Up Kit (Life Technologies) より mRNA の精製を行った。TALEN による DNA 二本鎖切断 (DSB) 処理後に導入した配列は、SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する AcGFP (*Aequorea coerulescens* green fluorescent protein) 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pAcGFP1-N1 プラスミド (Clontech, CA, USA) の遺伝子発現カセットと、SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するピューロマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する Venus 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pcDNA4-TO-Puromycin-mVenus- MAP プラスミド (ID no.44118, Addgene, MA, USA) の遺伝子発現カセットとした。Targeting ベクターには、pUC19 プラスミドを使用し標的配列の 5' 及び 3' 側にニワトリゲノムの相同組換え配列 (800 bp) を組み込んだものを使用した。標的配列のセンス側及びアンチセンス側をそれぞれ認識する TALEN をコードする 16 µg mRNA と 10 µg ターゲティングベクターを DT40 株にはエレクトロポレーション法 (Poring pulse 1 回: 電圧 175 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 10%、Transfer pulse +極 5 回-極 5 回計 10 回: 電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40%)、LMH 株にはリポフェクタミンによりトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、終濃度 2 mg/ml G418 及び 0.75 µg/ml puromycin を加え、薬剤耐性細胞を選択的に 10 日間培養し、その後、通常培地に戻しクローニングを行った。細

胞のクローン化は、浮遊系の DT40 細胞は限外希釈法、接着性の LMH 細胞はシングルコロニーよりトリプシン-EDTA 処理により剥離する方法により行った。標的配列への GM 操作の確認は、Cel-I アッセイ法、制限酵素(HpyAV)消化試験法及び PCR 法により行った。

### 3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量化

組換えの標的とする配列から両側 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子の発現測定は、RT-リアルタイム PCR 法より行った。80%コンフルエントに培養した細胞を ( $5 \sim 10 \times 10^7$  個) を回収し、RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて total RNA を精製した。DNA は RNase-free DNase I (Qiagen) を用いて完全に消化させた。500 ng の精製 RNA を逆転写酵素 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) と oligo dT20 のプライマーを使用して 20  $\mu$ l の反応液中で逆転写反応を行い cDNA を作成した。2  $\mu$ l の cDNA を鋳型に、exon-intron 間でスプライシング標的的境界領域に設定したプライマー対による QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) を用いたリアルタイム PCR により遺伝子発現を定量化した。PCR 反応液は、20  $\mu$ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。2 $\times$  QuantiTect SYBR® Green PCR master mix 10  $\mu$ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50  $\mu$ mol/L) 各 0.2  $\mu$ L を混合し、cDNA 試料液 0.5  $\mu$ L を添加し滅菌蒸留水で全量 20  $\mu$ L に調製した。反応条件は、50 で 2 分間、95 で 10 分間加温し、その後、95 15 秒、60 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

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

10 mL 培養液に懸濁させた  $1 \times 10^7$  細胞を 2% (v/v) ホルムアミドでタンパク質-DNA の架橋固定を行い、0.125 M グリシンを添加することにより反応を停止させた。その後、PBS で細胞を洗浄し、細胞溶解液(10 mM Tris-HCl [pH8.0],

10 mM NaCl, 0.2% NP-40, proteinase inhibitors cocktail [Nacalai, Kyoto, Japan]) を加え細胞を溶解させた。1 $\times$  制限酵素緩衝液中に 0.3% (w/v) SDS を加え 37 1 時間インキュベーションさせタンパク質を変性した後、1.8% (v/v) Triton X-100 を加えさらに 37 1 時間反応させた。次に、400 U *Bgl*II/400 U *Bam*HI 又は 400 U *Mbo*I を加え、DNA を 37 16 時間消化させた後、65 20 分間加熱し、制限酵素を不活化させた。反応液に 7 mL 1 $\times$  T4DNA ligase buffer と終濃度が 1% (v/v) になるよう TritonX-100 を加え、37 1 時間インキュベーションした後、4000 U T4DNA ligase を 16 で 4 時間反応させた。反応後、proteinaseK 及び RNase でタンパク質及び RNA をそれぞれ分解後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿より DNA の回収・精製を行った。ゲノムの構造解析には、得られた DNA を鋳型にリアルタイム PCR を実施した。

### 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立:

モデル食品には、安全性未承認 GM パパイヤ PSRV-YK 系統の果実から精製したゲノム DNA を使用した。DNA はサンプル識別用インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動により 400 ~ 500 bp の断片を切り出し精製し、アダプター PCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina Miseq による全シーケンシングを行った。マッピング解析には、既知のパパイヤゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスとして使用した。マッピングに使用した配列は、両側とも 50 塩基以上にわたり QV20 を保っていた配列のフォワード側の最初の 50 塩基 (一番信頼性の高い部分) で、解析には bowtie2 を使用した。De novo assemble には、velvet を使用し、k=21 とし全結果をまとめてインプットした。

## C. 研究結果

### 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

遺伝子発現カセットを挿入した際に起こり得る、内在性遺伝子の発現量の変化を解析するため、遺伝子導入の標的としたニワトリゲノム 14 番染色体に存在する  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター周辺 270 kb 内に存在する 9 つの内在性遺伝子 ( uncharacterized protein KIAA0556 [GenBank accession no. XP\_003642159.2], general transcription factor 3C polypeptide 1 [TFIIC, GenBank accession no. XP\_004945401.1], protein argonaute 14 isoform X5 [Loc425933, GenBank accession no. XP\_423619.3], inactive rhomboid protein 1 isoform X18 [RHBDF1, GenBank accession no. XP\_004945411.1], DNA-3-methyladenine glycosylase [MPG, GenBank accession no. XP\_414945.4], nitrogen permease regulator 3-like protein isoform X1 [ggPRx, GenBank accession no. XP\_003642182.1], transmembrane protein 8A isoform X3 [TMEM8, GenBank accession no. XP\_004945418.1], 39S ribosomal protein L28, mitochondrial-like [P15, GenBank accession no. XP\_003642183.1], Axin-1 [Axin1, GenBank accession no. NP\_990275.1] ) と  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター内の  $\pi$ ,  $\alpha D$  及び  $\alpha A$  の発現量を RT-リアルタイム PCR より定量した。GFP/Neo<sup>R</sup> 遺伝子を挿入して作成したホモ型細胞と野生型内における内在性遺伝子の発現量を測定した ( Figure 1 )。挿入配列から 123 kb 離れた Loc425933、5 kb 離れた  $\alpha A$ 、55 kb 離れた Axin1 遺伝子の発現量をそれぞれリファレンスとして他の遺伝子の発現量比を算出したところ、遺伝子導入箇所から 20 kb 内に存在する  $\pi$ ,  $\alpha D$  及び  $\alpha A$  遺伝子の発現量が顕著に上昇した。ヘテロ型細胞株においても同様に 20 kb 内の遺伝子  $\pi$ ,  $\alpha D$  及び  $\alpha A$  遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された ( Figure 2 )。導入した遺伝子やカセット配列長による影響について解析するため、GFP/Neo<sup>R</sup> と Venus/Puro<sup>R</sup> を有するホモ型細胞株を作成し

た ( Figure 3, 4 )。内在性遺伝子の発現量変化について解析を行ったところ、遺伝子発現コンストラクトを変えたホモ型細胞株も、20 kb 内の遺伝子  $\pi$ ,  $\alpha D$  及び  $\alpha A$  遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された ( Figure 5 )。4.7 kb の GFP/NeoR と Venus/PuroR をそれぞれ発現させる発現カセットのゲノムへの導入によるゲノム構造への影響について解析するため、3C 解析を行った ( Figure 6 )。その結果、4.7 kb の発現カセットを新たに導入することによるゲノム構造の大きな変化は誘導されず、野生型と同様の 5.2 kb と 3.8 kb のゲノムループ構造が検出された。

遺伝子導入によるエピゲノム変化を解析するため、5.2 kb と 3.8 kb のゲノムループ構造に近接して存在する DNA メチル化標的配列である CpG アイランド配列を検索したところ、5 ~ 6 kb 上流に CpG 繰り返し配列の多い CpG アイランドを見出した ( Figure 7 )。DNA メチル化解析を行うためバイサルファイトシーケンシング用プライマー対を 3 対設計し、CpG アイランド内の約 1kb を解析した ( Figure 8 )。バイサルファイト処理後の DT40 細胞及び LMH 細胞より抽出精製した DNA を鋳型に PCR を行ったところ、特異性の高い PCR を行うことに成功した ( Figure 9 )。PCR 産物をクローニング後、DNA メチル化パターンを調べた結果 ( Figure 10, 11 )、細胞株によってメチル化パターンが異なることが示唆された ( Figure 12 )。

### 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

本研究では、Illumina HiSeq と比較しより安価でランニングコストの低い MiSeq を使用し、パパイヤ果実から精製したゲノム DNA のシーケンスを行った。その結果、パパイヤゲノムの 31.16 倍 ( 18,177,038 pair 、 10,906,222,800 bp ) の出力配列を得た。解析用インプット配列は、低精度トリミングの閾値を Q20 ( 99% 精度 ) 50 塩基以上の長さとした場合、17,375,285 pair を得ることができた。

パパイヤ SunUp 品種のゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスに bowtie2 を使用してマッピングを行った結果、49.84%マッピングされた。マップリードとそのペアリード配列を特定し、リードの抽出を行い、抽出したリードを出力データとして、ショートリード用アセンブラーである velvet を用いてアセンブルを行った。その結果、411,911 Contigs、267,082,851 bases を得た。この *de novo* アセンブルデータを使用して、アグロバクテリウム法により挿入された遺伝子組換え配列に共通して存在する Right border 配列、及び、Left border 配列をアンカーに検索を行ったところ、19 bp の right-border 周辺配列 (TCAGTGTGAATGAGATAG) をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、100%相同配列を有する NODE\_446,121(1740 bp) のコンティグを得た (Figure 13)。このパパイヤゲノム配列は、Sunup リファレンスの Supercontig16 に帰属するものであることが示唆された。配列を詳細に解析したところ、1~836 bp にトランスジーン配列と Right border 配列、837~1740 bp にパパイヤゲノム配列であることが判明した。以上の結果から、19 bp の right-border 周辺配列をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、GM パパイヤの系統特異的な配列を得ることが可能であることが示唆された。次に 19 bp の left-border 周辺配列 (TGTTTACACCAC AATAT) をアンカーとして、*de novo* アセンブルデータを検索したところ、一致する配列は得られなかった。そこで、リファレンス配列にマッピングされなかった unmapped reads を基に検索したところ、369 bp 配列長の 1 リード一致する配列 (A5FPB:1:1114:21442:18611) が得られた (Figure 14)。同配列中にはパパイヤゲノム配列 (1~132 bp) と Right border 配列と Transgene 配列 (133~369 bp) を含むものであった。

GM パパイヤの transgene 発現に汎用されるカリフラワーモザイクウイルス 35SRNA プ

ロモーターの部分配列から GM パパイヤに導入された遺伝子発現用カセット構造配列が抽出可能であるかを検証した。その結果、リファレンス配列にマップされなかった配列を含む 719 bp の 1 リードに P35S 配列 (GenBank access. no. EU327975) に一致する配列とマップされた配列をアセンブルした contig から得られた 1 リード (NODE\_344501) に PRSV coat protein gene (GenBank access. no. X97251.1) と一致する配列が得られた。両リードは 68 bp 合致する配列を有した (Figure 15,16)。

#### D. 考察

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

DT40 及び LMH において  $\alpha$  遺伝子クラスター周辺の 270 kb ゲノム領域に 3.8 kb と 5.2 kb の 2 つのループを形成することが確認された。5.2 kb ループ内へ導入された遺伝子発現カセットの周辺に存在する内在性遺伝子の発現量を定量したところ、遺伝子発現カセットが導入された配列の 20 kb 内でかつ遺伝子クラスター内で同じゲノムループ内で構成する  $\pi$  と  $\alpha D$  遺伝子の発現量の変化が顕著であった。野生型と比較すると、 $\pi$  遺伝子は hetero 型で 1 オーダー、homo 型で 2 オーダー、 $\alpha D$  遺伝子は homo 型で 1 オーダーの違いがあった。遺伝子発現カセット内の遺伝子を代えても同様の結果を示した。また、遺伝子発現カセットのプロモーターと同じ転写方向に並んだ遺伝子 (タンDEM遺伝子) の発現は上昇した。この結果から、ループ内で構成するタンDEM遺伝子は、基本転写因子群を共有し転写活性を調節する可能性が示唆された。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

MiSeq を利用して得られた 18.2 M pair reads、10,906,222,800 bases のデータベースより、アグロバクテリウム法を利用し組換えら

れた際に共通して存在する Ti ベクター由来の Right border と Left border 配列 (19 bp) をアンカーに GM パパイアの系統特異的配列を見出すことができた。また、GM パパイアに汎用される遺伝子発現用プロモーター (P35S) をアンカーに GM パパイアの構造特異的配列を得ることができた。次世代シーケンシング解析より得られる配列データベースより、リアルタイム PCR やシーケンシング解析より得られる GM 作物の部分配列を基にどのような構造遺伝子がゲノム中に導入され、どのような GM 作物の系統であるかを特定できる可能性が示唆された。

## E. 結論

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

ゲノムループなどゲノムの高次構造の変化は、遺伝子発現カセットを挿入した配列から 20 kb 内に存在する内在性遺伝子の発現量を大きく変化させる可能性が示唆された。またゲノムループ構造内では、転写因子複合体が遺伝子間で共有することで転写効率を上げていることを示唆するデータを得た。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

GM 作物に共通する 19 bp 程度の配列から illumina Miseq で得られる配列データを利用し、GM 作物の系統特異的及び構造特異的な配列を探索可能であることが示された。今後は、加工食品より得られる DNA より同方法で解析可能かを検証する予定である。

## 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

- 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

- 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.
- 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, 27<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium, India, 2014年1月.
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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：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
- 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子：2010 年度米国産不分別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
- 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、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 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、穠山 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パイア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

## H. 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

