

ルとして行った。反応液は 0.8%アガロースゲルに電気泳動で流し、得られた 1800 bp バンドから Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて cDNA を精製し、これをシーケンスし、*HygBr* 配列が細胞ゲノム内に組込まれている事を確認した。

C. 研究結果

① ゲノム特異的配列への遺伝子導入または欠失に伴うゲノムへの影響：ニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞株を使用して、ニワトリゲノム 14 番染色体上の α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、ゲノム編集の標的配列周辺のクロマチン構造、CpG アイランド内の DNA メチル化修飾、並びに、内在性遺伝子の発現への影響を解析した (Figure 1)。

1. トランスジェニック構造配列内の遺伝子の転写方向が内在性遺伝子の転写方向と対立方向 (ディバージェント) に並んだ場合の影響

TALEN を使用して、蛍光タンパク質 AcGFP 又は mVenus、及び、薬剤定性遺伝子 Neo^R 又は Puro^R を発現するトランスジェニック構造配列を、 π グロビン遺伝子のターミネーター配列下流と αD グロビン遺伝子のプロモーター配列の上流に挿入するよう設計したターゲティングベクターを作成した (Figure 2A,B)。内在性遺伝子である π と αD グロビン遺伝子の転写方向と比較して挿入した両遺伝子の転写方向は、ディバージェント型となるように設計した (Figure 2C)。細胞へのトランスフェクション後、ネオマイシン及びピューロマイシン耐性株を単離し、限界希釈してクローニ

ングした細胞株を定性 PCR にて、ゲノム標的配列への遺伝子導入の確認を行った。その結果、細胞株 4B において、標的配列への AcGFP/Neo^R と mVenus/Puro^R からなる 2 種類のトランスジェニック構造配列ホモ型細胞株の構築に成功した (Figure 3)。昨年度の結果より、内在性遺伝子の転写方向と平行 (タンデム) に配列させた 5.4 kb からなるトランスジェニック構造配列を導入した際、ゲノム構造の変化は確認されなかった。そこで、同サイズのトランスジェニック構造配列を導入した細胞株 4B におけるゲノム構造変化の有無を確認するため 3C 解析を行った (Figure 4)。その結果、5.2 kb 及び 3.8 kb のクロマチンループ構造が検出されたことから、野生型細胞株と比較してゲノム構造変化は見られないことが確認された。よって、細胞株 4B の α グロビン遺伝子クラスター領域周辺のゲノム構造において、大きなゲノム変化は認められなかった。

トランスジェニック構造配列の CMV プロモーター約 1 kb を削除し、AcGFP 遺伝子を発現しないよう作成したトランスジェニック構造配列を含むターゲティングベクターを構築した (Figure 5)。TALEN を使用して同ターゲティングベクターを細胞へ導入した結果、同トランスジェニック構造配列がゲノム標的配列へ挿入された細胞 FF4 株のクローニングに成功した。そのクローニ化細胞株中に発現する内在性遺伝子の発現量をリアルタイム PCR より定量した (Figure 6)。Loc425933、 αA 、又は、Axin1 遺伝子の発現量リファレンスに、野生型細胞株の遺伝子発現量と比較定量した。その結果、数十倍以上の差の変化のある遺

伝子は、トランスジェニック配列の挿入された 5.3 kb のクロマチンループ構造内に存在する α と αD グロビン遺伝子のみであることが確認された。タンデム方向に挿入したトランスジェニック遺伝子の影響により、ホモ型細胞では α グロビン遺伝子は 2 オーダー、 αD グロビン遺伝子は 1 オーダーの上昇が検出された。一方で、ヘテロ型細胞では、遺伝子発現量の上昇は、ホモ型細胞と比較して 1 オーダー低かった。ディバージェント型に挿入したトランスジェニック遺伝子の影響により、ホモ型細胞では α グロビン遺伝子の発現量の変化は検出されず、 αD グロビン遺伝子は 4 オーダーの上昇が検出された。蛍光タンパク質を発現させる際に使用した CMV プロモーターを削除したトランスジェニック構造配列をゲノムへ導入したホモ型細胞株では、同じく α グロビン遺伝子の発現量の変化は検出されず、 αD グロビン遺伝子は 1 オーダーの上昇が検出された。以上の結果より、トランスジェニック構造配列の転写方向は、クロマチンループ構造内の内在性遺伝子発現量に影響を与え、タンデム方向では上昇に働くことが示唆された。なお、ディバージェント方向では内在性遺伝子の発現量の変化は検出されなかった。また、発現量の変化は、トランスジェニック構造内のプロモーターの影響によることが示唆された。

2. α グロビン遺伝子クラスター内の CpG アイランドメチル化への影響

ゲノム編集技術を利用して作成した遺伝子組換え細胞内において、標的配列周辺に存在する CpG アイランドの DNA メチル化に与える影響について、バイサルファイト

シーケンシング法を用いて解析を行った (Figure 7)。昨年度設計した、バイサルファイトシーケンシング用 PCR プライマー対を使用して、バイサルファイト後の DNA を鋳型に標的配列を 3 分割し、PCR より得られた約 300 bp のアンプリコンのシーケンシング解析を行った。その結果、野生型細胞株と比較し、標的配列に挿入したタンデム型及びディバージェント型 GM 細胞株中の CpG アイランドのメチル化量の大きな変化は認められなかった。

②安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用：

1. 次世代シーケンシングデータを基にした未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統特異的検知法の開発

昨年度得られた次世代シーケンシングデータより、GM 作物開発において汎用性の高い既知のカリフラワーモザイクウイルス 35SRMA プロモーター配列 (P35S) を基に検索して得られた Contig_1 と Contig_344501 のリード配列をパパイヤゲノムリファレンス配列にマッピングした結果を Figure 8A に示す。得られた 2 つの Contig は、安全性未承認 GM パパイヤのトランスジェニック構造配列を含むものであることが昨年度の解析より判った。得られた配列を基に、P35S を認識するよう設計したプライマー p981 及び GM パパイヤ PRSV-YK 系統の目的遺伝子であるパパイヤリングスポットウイルス外皮タンパク質遺伝子 (PRSV CP) 配列を認識するよう設計したプライマー p982 を使用して、定性 PCR を行った (Figure 8B)。得られた PCR 増幅産物のシーケンシング結果より得られた

配列には、P35S と *PRSV-CP* の境界領域にトランスジェニックベクター配列などを含む人工配列が検出された (Figure 8C)。そこで、得られた情報を基に、P35S と *PRSV-CP* の境界領域の配列を検知するためのリアルタイム PCR 用プライマープローブを設計した (Table 1, Figure 8C)。設計したプライマープローブ配列は、全ゲノムシーケンシングデータ及びデータベース上の配列と BLASTn 検索して、配列ベースで特異性を確認した。

2. 次世代シーケンシングデータを基にした GM パパイヤ *PRSV-YK* 系統検知法の特異性及び検出限界試験結果

パパイヤを含む 9 種類の作物より抽出精製したゲノム DNA を鋳型に、開発した未承認 GM パパイヤ *PRSV-YK* 系統検知法 (*PRSV-YK* 検知法) の特異性試験を行った (Table 2, Figure 9)。その結果、パパイヤ内在性遺伝子検知試験 (*Chy* 検知法) を使用しパパイヤ由来ゲノム DNA を鋳型に反応させた試験のみ 2 並行試験で Ct 値 23.93/23.91 の指数関数的な増幅曲線を得た (Figure 9)。一方、*PRSV-YK* 検知法においては、すべてのゲノム DNA を鋳型に指数関数的な増幅曲線は得られなかった。よって設計した *PRSV-YK* 検知法の高い特異性が示唆された。

PRSV-YK 検知法の検出限界試験には、*PRSV-YK* 系統のパパイヤ果実から精製したゲノム DNA を野生型パパイヤのゲノム DNA で、0.001~0.100% (w/w) となるよう希釈し、希釈して得られた DNA 溶液を鋳型に使用した (Table 3, Figure 10)。21 並行試験を行い、全ての反応でリアルタイ

ム PCR 増幅曲線 (Ct 値 RSD<2.15%、閾値 0.2) が得られた濃度は 0.010%以上であった。この結果から、*PRSV-YK* 系統検知法の検出限界は 0.001%~0.010%であることが示唆された。

3. 開発した *PRSV-YK* 系統検知法を使用したパパイヤ食品への適用性について

インターネットより購入可能なパパイヤ加工食品 (パパイヤ漬物、パパイヤ茶、パパイヤジャム、パパイヤ果実) から得られた DNA サンプルを鋳型に使用し、本研究で開発した *PRSV-YK* 系統検知法の様々なパパイヤ加工食品への適用性について解析を行った。その結果、全ての加工食品において、*PRSV-YK* 系統の混入が認められるものにおいて、陽性反応が得られた (Table 4)。以上の結果より、開発した *PRSV-YK* 系統検知法は幅広いパパイヤ加工食品へ適用可能であることが示唆された。

③全ゲノム中の人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する技術開発: Figure 11 に全ゲノム配列を対象にした人工ヌクレアーゼ標的配列の新規検知法の概略図を示す。エンドヌクレアーゼを使用して 300~400 bp 程度に分解したゲノム断片をルシフェラーゼ又はハイグロマイシン耐性遺伝子をコードする配列の間に挿入した。ベクターライブラリに特有のタグを付加するため、N₁₇ のランダム配列をベクターに組込んだ。ベクター中に組換えられ、特有のタグ配列を有したベクターを、次世代シーケンサーで解析し、各ゲノム断片にタグ配列を付加し識別可能な配列データベースの作成を試みた。また、前述した、 α グロビン遺伝子クラス

ター内の α と αD グロビン遺伝子間の配列を特異的に切断する TALEN を使用して、ニワトリゲノム断片を導入し作成したベクターライブラリを HEK293 細胞へトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイ (Figure 12) と薬剤耐性アッセイ (Figure 13) を行った。その結果、TALEN を同時にトランスフェクションした細胞においてルシフェラーゼの発光が確認され、また、ハイグロマイシン耐性株を得ることができた。

D. 考察

①ゲノム特異的配列への遺伝子導入または欠失に伴うゲノムへの影響：昨年度の結果より、トランスジェニック構造配列内の遺伝子の転写方向とタンデムに並んだ α グロビクラスター領域内の内在性遺伝子発現量の変化は、クロマチンロープ構造内に限定されることが判った。本年度では、ディバージェント型細胞株を作成することに成功し、ゲノム構造、並びに、内在性遺伝子の発現量の変化を詳細に解析した。その結果、ディバージェント方向に挿入したトランスジェニック遺伝子の影響により、ホモ型細胞では α グロビン遺伝子の発現量の変化は検出されず、 αD グロビン遺伝子は 4 オーダーの上昇が検出された。また、蛍光タンパク質を発現させる際に使用した CMV プロモーターを欠失させたトランスジェニック配列を標的ゲノム配列へ挿入した場合、遺伝子発現量の変化は低下することが確認された。トランスジェニック構造配列内の遺伝子の転写方向は、クロマチンロープ構造内の内在性遺伝子発現量に影響を与え、タンデム方向では上昇に働くこと

が示唆され、ディバージェント方向では内在性遺伝子の発現量の変化は検出されないことが確認された。また、遺伝子発現量の変化は、トランスジェニック構造内のプロモーターの影響を受けることが示唆された。なお、トランスジェニック構造配列をゲノムへ導入することで、ゲノムの周辺領域に存在する CpG アイランドの DNA メチル化への影響は確認されなかった。以上の結果より、トランスジェニック構造配列をゲノムへ挿入し、GM 食品を開発する際には、意図しない標的配列周辺のゲノム構造並びにクロマチンロープ内の内在性遺伝子の発現量変化を避ける必要があることが示唆された。

②安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用：本研究結果より、次世代シーケンスより得られる配列データ (パパイヤゲノムの 31.16 倍; 18,177,0388 pair, 10,906,222,800 bp) を基に、17 bp 程度の既知配列を使用して目的ゲノム配列周辺を迅速に検索、データベース情報より由来を同定することが可能であることが示唆された。得られた僅か 1 リードのみの情報を利用し、ゲノム DNA サンプルより目的配列を PCR 増幅可能であることが示された。得られた PCR 増幅産物より、GM パパイヤのトランスジェニック構造配列並びに系統特異的配列の情報を得ることが可能であった。得られた情報は、リアルタイム PCR 用のプライマープローブを設計する際に使用し、様々なパパイヤ加工食品を検体に高い特異性と検出感度を有した GM パパイヤ検知法を開発可能であることが示唆された。

③全ゲノム中の人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する技術開発：全ゲノムを対象に人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する新規 *in vitro* アッセイ方法を考案した。今後は、ルシフェラーゼアッセイと薬剤耐性アッセイ用のライブラリー構築する条件を検討し、また全ゲノムを網羅したベクターライブラリーデータベースの作成を目指す予定である。

E. 結論

①ゲノム特異的配列への遺伝子導入または欠失に伴うゲノムへの影響：ゲノム編集技術を応用し作成される GM 作物中の意図しない内在性遺伝子発現量の変化を避けるため、トランスジェニック構造配列導入の標的配列として内在性遺伝子が存在するクロマチンループ構造内を避ける必要があることが示唆された。すなわち、ゲノム編集技術を応用し組換えを行う際の内在性遺伝子発現量の変化を回避させるため、「ゲノムセーフバーバー座位」の必要性が改めて示唆された。

②安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用：次世代シーケンサーを利用して、得られる配列データを基に、>17 bp の既知配列より遺伝子組換えパパイヤ由来の系統特異的及び構造特異的な配列を検知することが可能であることを報告した (Nakamura, et al., *Food Chemistry*, 2016 in press)。得られた配列を基に、リアルタイム PCR を使用した特異的で高感度な検知法を開発することが可能であることを実証した (Nakamura, et al.,

Data in Brief, 2016 in press)。なお開発したリアルタイム PCR 法を使用して、様々な加工食品へ適用可能であることが判った。今後、本研究手法が、パパイヤよりもゲノムサイズの大きい他の作物や加工食品へ適用可能かを検証していく予定である。

③全ゲノム中の人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する技術開発：人工ヌクレアーゼのゲノム DNA 切断標的配列検出用の新規 *in vitro* アッセイ法を構築した。今後は、全ゲノムを網羅したベクターライブラリの実用化を目指し、構築した方法の実証実験を行う予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., & Nishimaki-Mogami, T. Interlaboratory study on unauthorized genetically modified papaya PRSV-YK real-time PCR detection method. *Data in Brief*, 2016, in press.
2. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T. Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified

papaya for development of a specific detection method. Food Chemistry, in press.

学会発表

- 1) Nakamura, K., Ishigaki, T., Hanada, K., Akimoto, S., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. DNA methylation pattern analysis of common plant virus promoter used to develop genetically modified crops, PacifiChem2015, Hawaii, USA, 2015年12月.
- 2) Kondo, K., Sakata, K., Noguchi, A., Nakamura, K., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. A new analytical methodology for unknown genetically modified organisms using linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR), 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015年11月.
- 3) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上（西巻）知子：汎用性ウィルスプロモーター導入によるクロマチンループ内の内在性遺伝子発現への影響、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月
- 4) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、布施谷実聡、川上浩、田中秀典、明石良、真野潤一、橘田和美、最上（西巻）知子：我が国における未承認遺伝子組換えパパイヤの食品への混入に関する事例と検知法開発の現状、第52回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015年12月
- 5) 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、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妥当性評価、第52回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015年12月
- 6) 福田（佐藤）のぞみ、近藤一成、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、最上（西巻）知子：遺伝毒性試験および全ゲノム解析を用いた CRISPR/Cas9 の DNA2 本鎖切断ポテンシャル、第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月
- 7) 坂田こずえ、近藤一成、野口秋雄、中村公亮、福田のぞみ、石垣拓実、最上（西巻）知子、LAM-PCR を用いた組換え作物中の未知領域解析法の検討、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 8) 野口秋雄、町井香苗、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 9) 中村公亮、近藤一成、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、真野潤一、橘田和美、最上（西巻）知子：安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-HN 系統）の検出と検知法開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 10) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穂山浩、近藤一

成、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、最上（西巻）知子：未承認遺伝子組換え食品検知法の開発：未承認遺伝子組換えジャガイモ検知を例に、第 1 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、千葉、2015 年 9 月

11) 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：食品遺伝子検査を簡易化するダイレクトリアルタイム PCR、2015 年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2015 年 6 月

12) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上

（西巻）知子：次世代ゲノム編集技術による遺伝子組換え食品の内在性遺伝子発現への影響、日本食品化学学会 第 21 回総会・学術大会、東京、2015 年 5 月

13) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えヒヨコマメ検査法確立に向けたヒヨコマメ内在性遺伝子（CaNCED）特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第 21 回総会・学術大会、東京、2015 年 5 月

G. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

【資料】

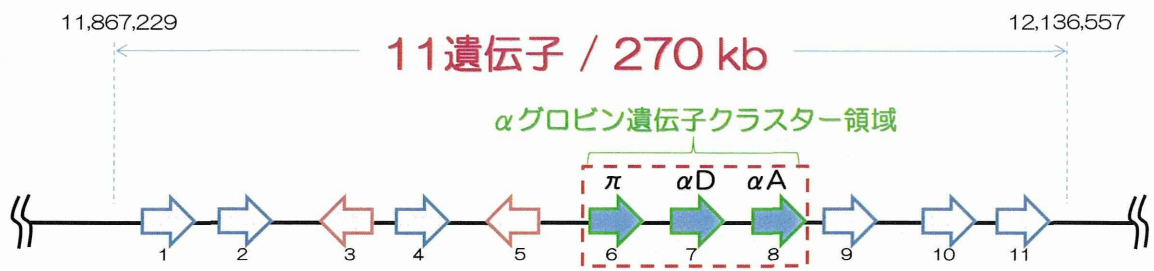


Figure 1. 本研究の解析モデルに使用した、ニワトリゲノム 14 番染色体 (GenBank accession no. UCD001) 上の α グロビン遺伝子クラスター領域周辺 270 kb 内に存在する遺伝子の配置模式図

α グロビン遺伝子クラスターの転写方向と比較し、1,2,4,9,10,11 遺伝子はタンデム方向に、3,5 遺伝子はディバージェント方向に配置されている。

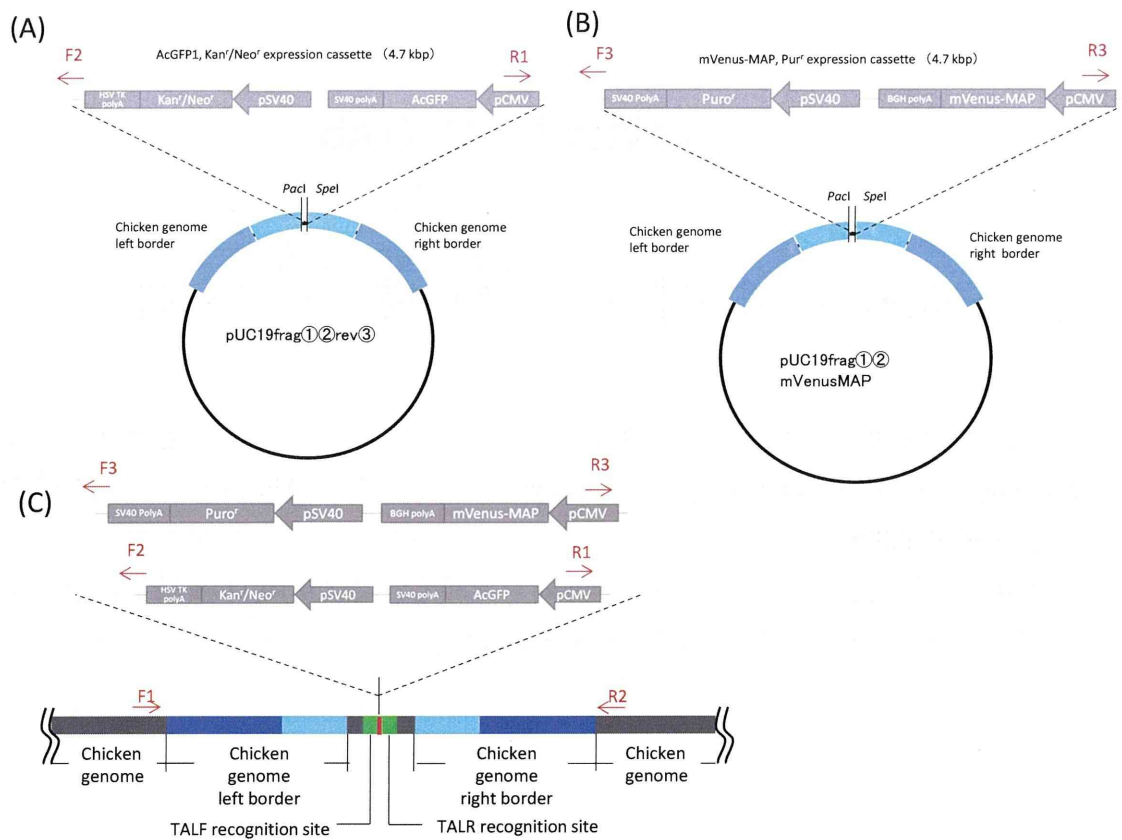


Figure 2. ゲノム標的配列の遺伝子挿入に使用したターゲティングベクターの構造

☒

π と αD グロビン遺伝子と逆向きに転写するよう設計した (A) リバース型 GFP/Neo^R 遺伝子と (B) リバース型 mVenus/Pur^R 遺伝子を挿入したベクター構造 (C) TALEN を使用したニワトリゲノムの相同組換え領域を示す。矢印は遺伝子挿入を確認する際に使用したプライマーの標的箇所を示す。

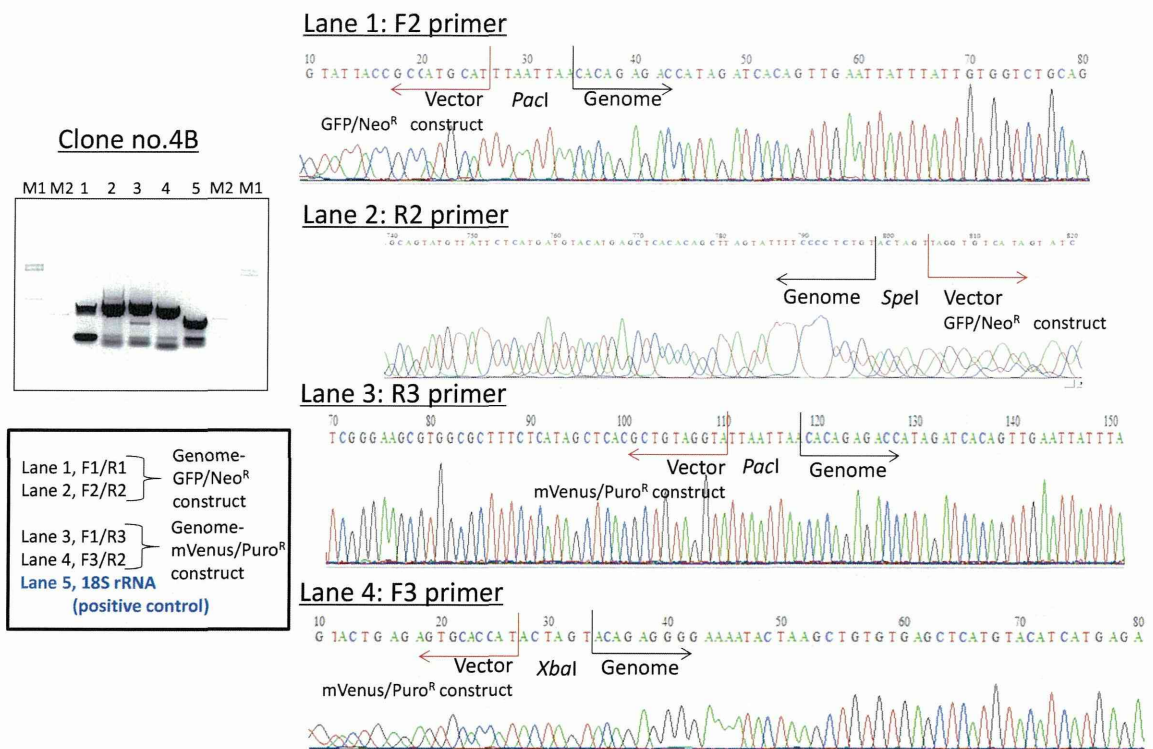


Figure 3. ホモ型 DT40 細胞クローン no.4B (リバース型) のターゲティングベクター由来の配列が挿入されたゲノム配列の確認
 Figure 2 で示したプライマー対を使用し定性 PCR より得られた配列を解析した。

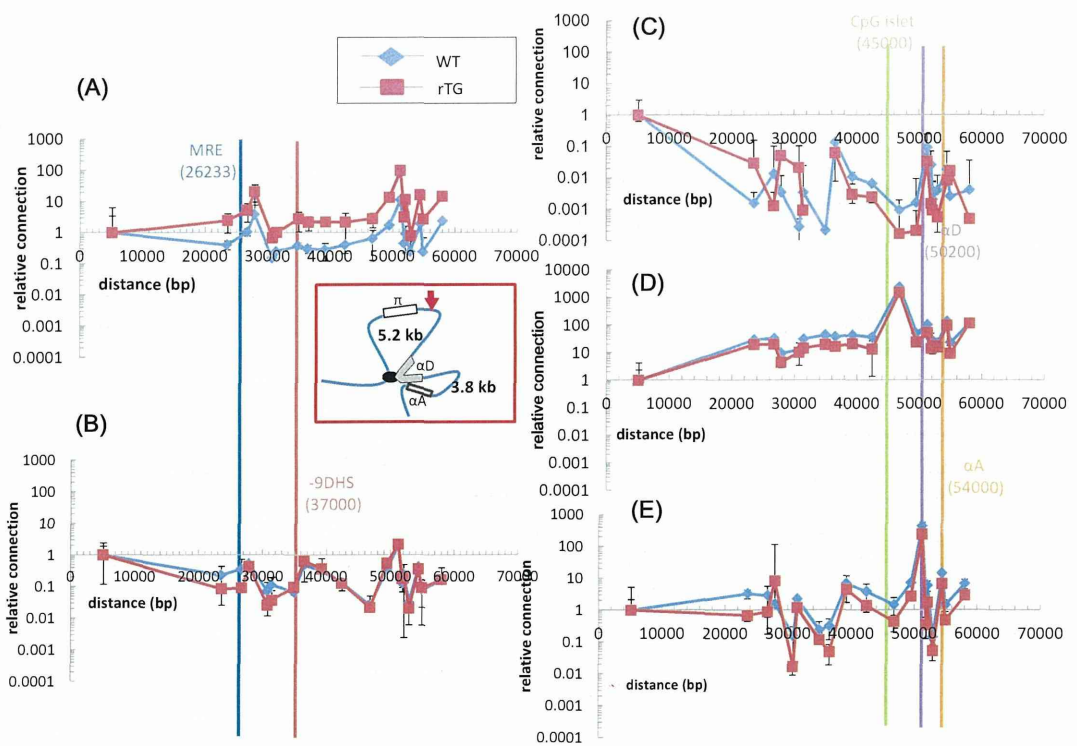


Figure 4. ホモ型 DT40 細胞 (reverse GFP/Neo^R & Venus/Puro^R) の 3C 解析
*Bgl*II, *Bam*HI で処理したゲノムを鋳型に、(A) MRE、(B)-9DHS、(C) CpG island、(D) α D、(E) α A の 5 か所に設定したリアルタイム PCR 用プローブをアンカーに約 550 kb 範囲内を認識するよう設計したプライマーを用いて解析を行った。

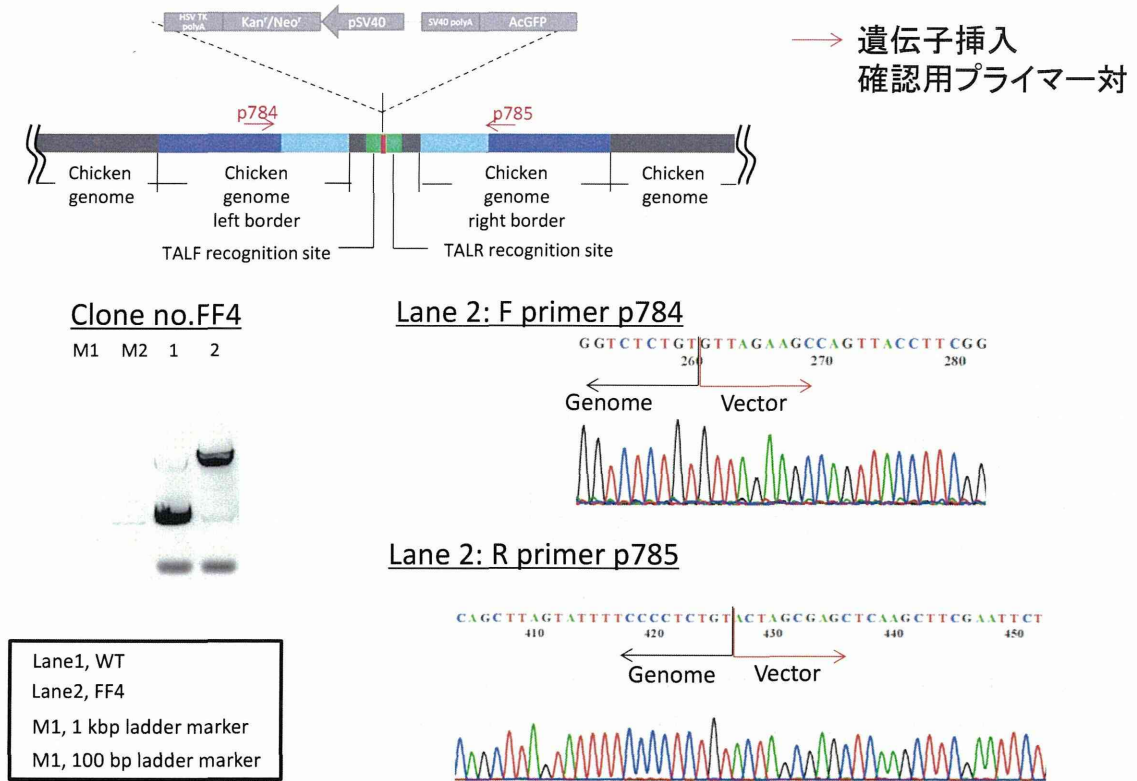


Figure 5. ホモ型 DT40 細胞クローン FF4 株 (-CMVp GFP reverse 型) の確認
ターゲティングベクター由来配列の挿入されたゲノム領域を PCR にて増幅し、シー
ケンス確認を行った結果を示す。

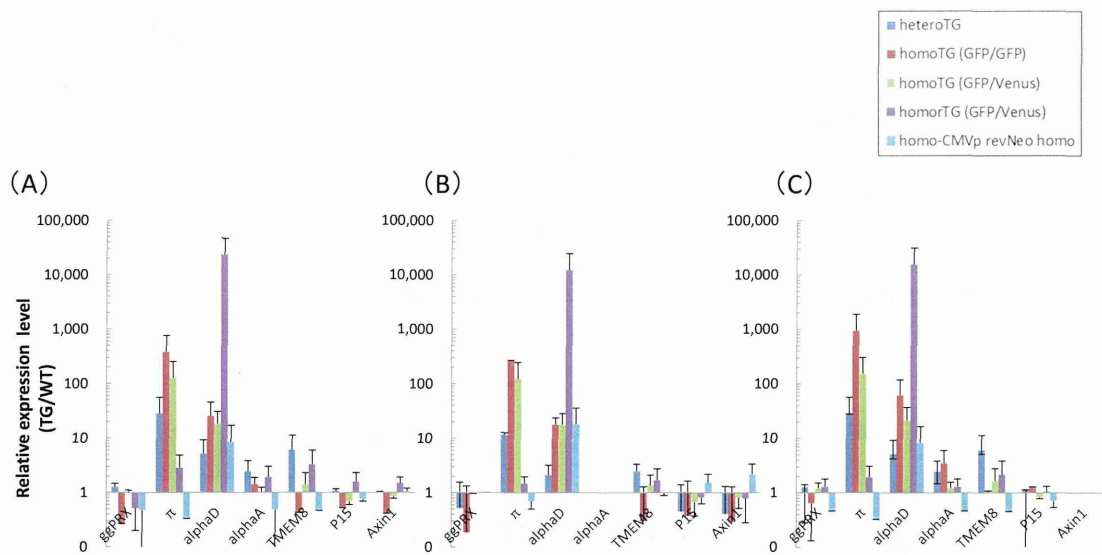


Figure 6. ゲノム編集細胞株中の内在性遺伝子発現量の比較

ゲノム編集を行い構築した5種類の細胞株中に発現する内在性遺伝子の発現量を、(A) Loc425933、(B) α A、又は、(C) Axin1 遺伝子をリファレンスに野生型細胞株の発現量比を算出した。

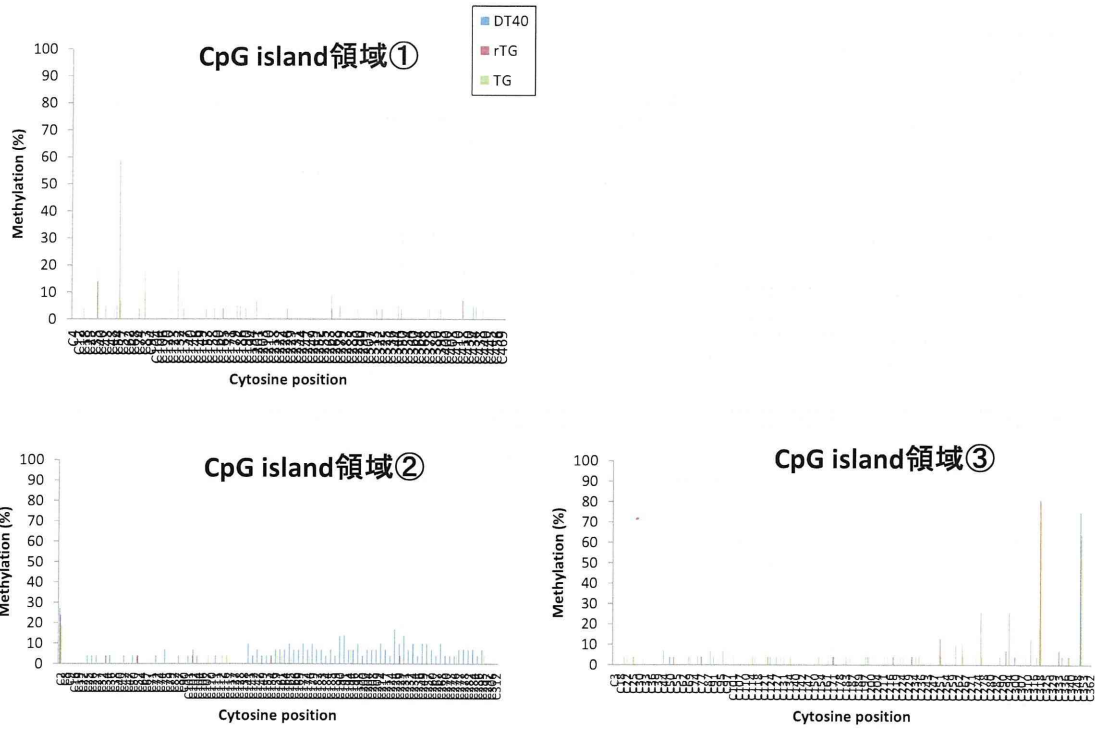


Figure 7. α グロビン遺伝子クラスター内の CpG アイランドメチル化の定量
 バイサルファイトシーケンシングを3つの領域に分けて解析を行った。CpG アイランドに存在するメチル化対象シトシンのメチル化量を示す。

Table 1

次世代ゲノムシーケンシングデータより得られた配列より設計した未承認GMパパイア検知リアルタイムPCRプライマープローブ配列一覧

Detection method	Target sequence	Oligonucleotide name	Nucleotide sequence (5'→3')	Amplicon (bp)	Reference
<i>Chy</i> (Real-time PCR)	Papaya endogenous chymopapain gene	Q-Chy-1F2	CCATGCGATCCTCCCA	72	Food Chem. 136, 895-901, 2013
		Q-Chy-2R	CATCGTAGCCATTGTAACA CTAGCTAA		
		Q-Chy-P ^a	FAM-TTCCCTTCAI(BHQ1)C CATTCCCACTCTTGAGA		
PRSV-YK (Real-time PCR)	Boundary sequence between <i>Papaya ringspot virus</i> coat protein gene and <i>Cauliflower mosaic virus 35S RNA</i> promoter in the GM papaya line PRSV-YK	YK-2F	ACACGGGGGACTCTAGAG	76	This study
		YK-2R	ACCGGTATCCACAGCTTC		
		YK-2P	FAM-TCCCTTCCATGGCGTC-TAMRA		

^aBlack-hole quencher 1 (BHQ1) of underlined T base was used.

Table 2

未承認GMパパイアPRSV-YK系統検知法の特異性試験結果

Plant species	Detection method ^b	
	<i>Chy</i>	PRSV-YK
Papaya	23.93/23.91	-/-
Rice	-/-	-/-
Soybean	-/-	-/-
Maize	-/-	-/-
Potato	-/-	-/-
Rapeseed	-/-	-/-
Pineapple	-/-	-/-
Peach	-/-	-/-
Passion fruit	-/-	-/-

^aCt values (threshold value at 0.2) were recorded in a duplicate test using DNAs purified from each plant species.

^b-, scored negative.

Table 3
未承認GMパパイヤPRSV-YK 検知法の検出限界試験結果

Line PRSV-YK DNA content (w/w [%])	Signal rate ^a		Mean Ct value		SD		RSD (%)	
	PRSV-YK	<i>Chy</i>	PRSV-YK	<i>Chy</i>	PRSV-YK	<i>Chy</i>	PRSV-YK	<i>Chy</i>
0.100	21/21	21/21	37.37	22.34	0.33	0.25	0.88	1.12
0.020	21/21	21/21	40.62	22.40	0.85	0.36	2.09	1.59
0.010	21/21	21/21	41.48	22.42	0.89	0.42	2.15	1.85
0.001	4/21	21/21		22.36		0.39		1.73

^a Signal rate is indicated by number of positive signals out of 21 experimental trials.
SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation

Table 4
構築した未承認GMパパイヤPRSV-YK系統検知法を使用したパパイヤ加工食品への適用性試験

Product type	Sample ID	DNA purification trial	Total purified DNA (ng)	Sampling amount (g)	DNA purification efficiency (ng/g)	Absorbance ratio		Real-time PCR detection ^a	
						$A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}} / A_{230\text{ nm}}$	<i>Chy</i>	PRSV-YK
Non-GM papaya (Sunset)		1	12510.00	10.00	1251.00	1.90	2.36	23.58	—
Pickled	A	1	32629.20	10.60	3078.23	1.69	1.12	26.54	36.65
		2	30674.80	10.80	2840.26	1.65	1.05	26.25	36.67
	B	1	11172.75	10.00	1117.28	1.83	1.99	21.19	33.24
		2	10263.40	11.02	931.34	1.80	1.87	22.29	N/D
	C	1	10400.60	11.27	922.86	1.86	2.15	21.70	—
Papaya-leaf tea	A	1	48152.00	1.59	30284.28	1.77	1.54	24.58	24.22
		2	53116.60	2.11	25173.74	1.79	1.78	22.90	N/D
	B	1	1168.80	2.26	517.17	1.86	2.12	23.96	33.86
		2	1688.80	2.03	831.92	1.68	1.75	25.66	34.08
	C	1	549.40	2.02	271.98	1.60	1.28	28.60	—
Jam	A	1	387.75	13.50	28.72	1.77	1.33	28.66	27.56
		2	138.80	10.97	12.65	3.50	0.93	27.20	30.32
	B	1	156.40	30.17	5.18	1.92	0.79	25.73	—
Fresh fruit		1	5632.00	11.30	498.41	1.87	1.92	22.58	24.65

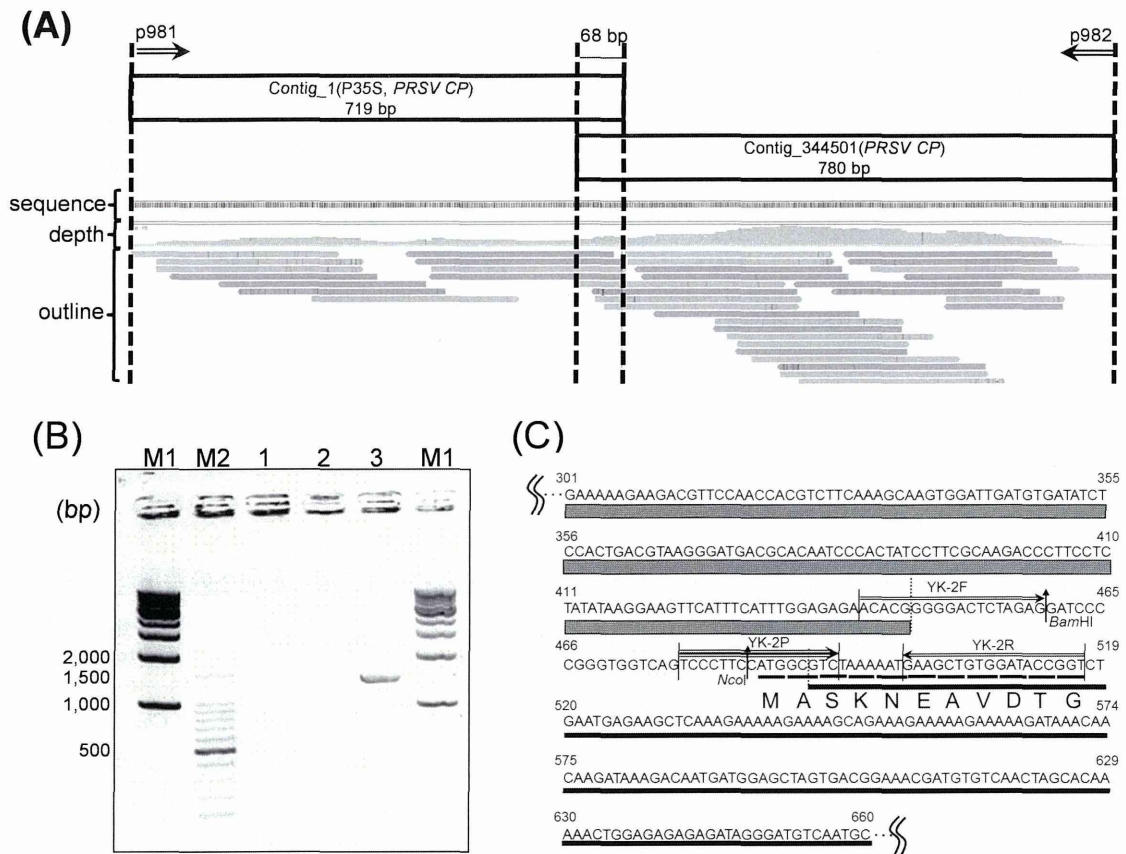


Figure 8. 次世代シーケンシングデータより構築した Contig_1 及び Contig_344501 配列を基に設計したリアルタイム PCR 用プライマープローブ配列

(A) 昨年度得られたリード配列をパパイヤゲノム配列へマッピングし、得られた Contig 配列を示す。(B) Contig 配列より設計した定性 PCR 確認用プライマー対 (p981/p982) を使用し、得られた PCR 増幅産物をアガロース電気泳動より解析した電気泳動図 (M1, 1 kbp DNA ラダーマーカー ; M2, 100 bp DNA マーカー ; 1, 蒸留水 ; 2, 非 GM パパイヤ DNA ; 3, GM パパイヤフルーツ DNA)、(C) 得られた PCR 増幅産物のシーケンシング配列よりリアルタイム PCR 用プライマープローブの標的配列の位置を示す

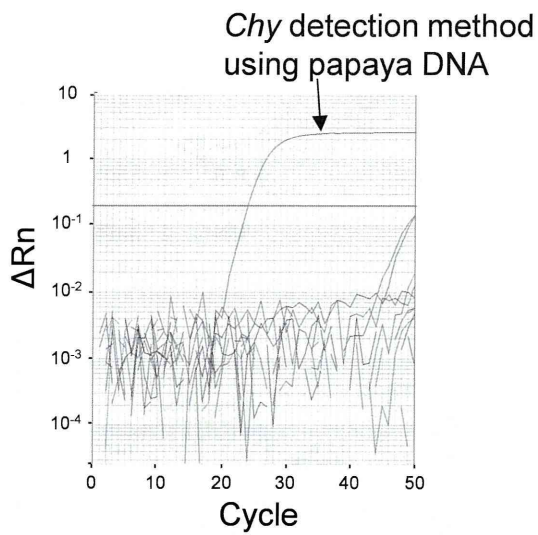


Figure 9. 設計したリアルタイム PCR 用プライマープローブを使用し、特異性試験のため9種類の作物より抽出精製した DNA を鋳型にリアルタイム PCR を行った際に得られた増幅曲線

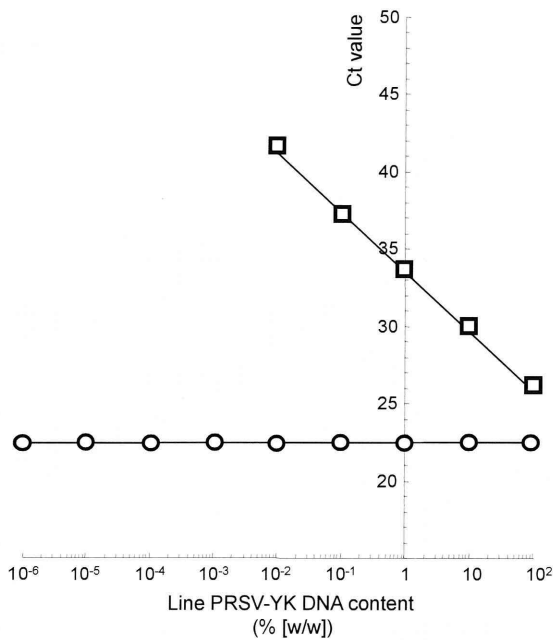


Figure 10. 設計したリアルタイム PCR 用プライマープローブを使用し、検出限界試験を行った結果

○・・・内在性 Chy 検知法、◇・・・PRSV-YK 検知法

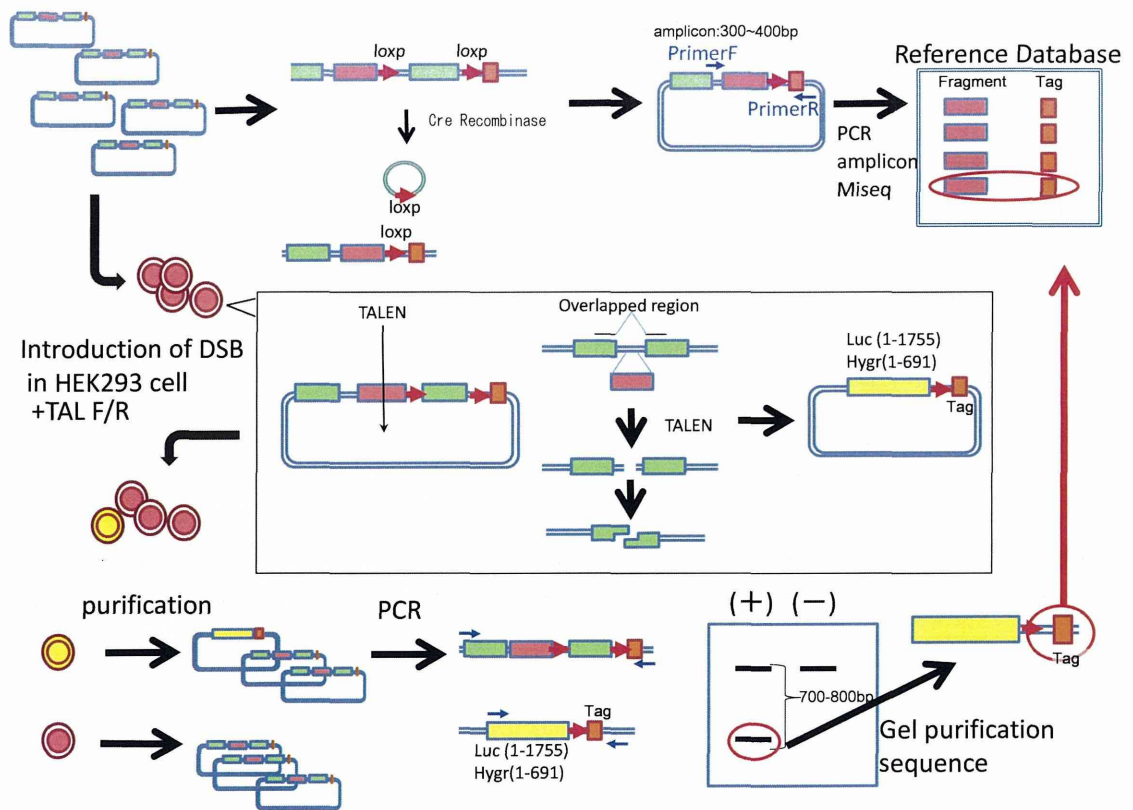
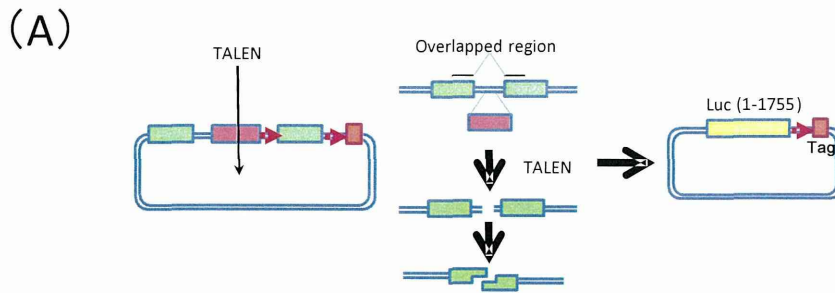


Figure 11. 全ゲノム配列を対象にした人工ヌクレアーゼ標的配列の新規検知法の概略



(B)

	1	2
TALEN(+)	123301	341700
TALEN(-)	57707	89347
HEK293T	27	-

Figure 12. 標的配列を挿入したベクターを使用した Luciferase assay プレ試験の結果
 (A) Luciferase assay 試験の概略を示す、(B) 蛍光プレートリーダーより得られた
 蛍光強度測定値 (2 並行試験) の結果を示す。

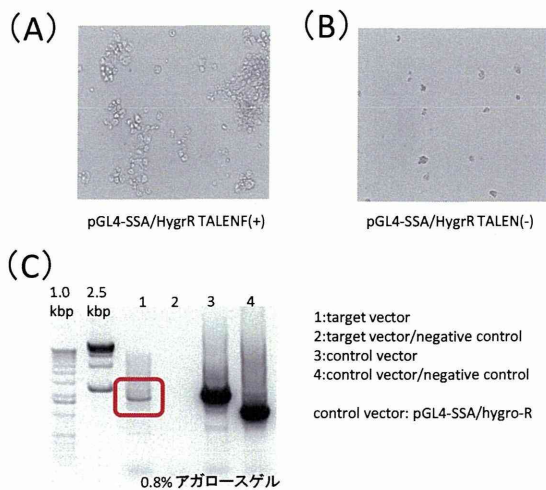


Figure 13. 標的配列を挿入したベクターを使用したハイグロマイシン耐性株の確認
 結果

TAL 発現ベクター同時導入した細胞 (A) しない細胞 (B) の顕微鏡下写真 (C) Hyg
 耐性株 DNA を鋳型に PCR を行った増幅産物のアガロース電気泳動図
 赤枠：標的 DNA 増幅産物バンド