

Q22
必須

あなたの職業を教えてください。当てはまるものをひとつ選んでください。

- 1.会社員（役員含む）
- 2.公務員
- 3.その他法人勤務
- 4.自営業
- 5.学生
- 6.専業主婦
- 7.無職
- 8.その他

Q23
必須

あなたは、農産物や水産物、食品の製造や流通に専門的に関わるような仕事をされていますか。あなたの職業に最も近いものを選んでください。

- 1.農業
- 2.漁業・魚の養殖業
- 3.食品加工・製造
- 4.食品流通
- 5.研究・開発
- 6.食品関連行政
- 7.その他の食品の製造や流通に専門的に関わるような仕事
- 8.特に食品に専門的に関わるような仕事はしていない

Q24
必須

あなたの最終学歴を教えてください。当てはまるものをひとつ選んでください。

- 1. 中学校卒業もしくは在学中
- 2. 高等学校卒業もしくは在学中
- 3. 専門学校卒業もしくは在学中
- 4. 短大卒業もしくは在学中
- 5. 高等専門学校卒業もしくは在学中
- 6. 大学（文系）卒業もしくは在学中
- 7. 大学（理系）卒業もしくは在学中
- 8. 大学院（文系）卒業もしくは在学中
- 9. 大学院（理系）卒業もしくは在学中

Q25
必須

あなたの世帯全体の年収はどのくらいですか。最も近いものをひとつ選んでください。

- 100万円以下
- 100万円台
- 200万円台
- 300万円台
- 400万円台
- 500万円台
- 600万円台
- 700万円台
- 800万円台
- 900万円台
- 1000万円以上

アンケートにご回答いただき、ありがとうございました。

【高校での生物学習状況とGM食品の受容性に関する調査】の獲得ポイント

〇〇ポイント

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）

「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究」

研究報告書（平成 27 年度）

－ 遺伝子組換え食品の検知技術の開発 －

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

パパイヤリングスポットウイルス（PRSV）病に抵抗性を有する遺伝子組換え（GM）パパイヤは、東南アジアなど世界的に開発されてきた。これまでに、台湾産、タイ産、中国産などが未承認 GM パパイヤとして報告されてきた。このような背景から、今後国内侵入の可能性のある様々な GM パパイヤ系統を網羅的に検出して未承認済 GM パパイヤ系統を判別可能な効率的な検出技術開発が求められている。その結果、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが混入した食品を検知可能なスクリーニング法を開発した。GM パパイヤゲノムに導入された P35S と T-nos を標的にリアルタイム PCR より概算されるコピー数から、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤの判定を可能にした。また、PRSV 株由来外皮タンパク質（PRSV-cp）を発現するトランジェニック構造配列のシーケンスから GM パパイヤ系統の同定も可能であることが示唆された。

内在性プロモーターの使用や新植物育種法(NBT) によって開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では遺伝子組換え体であることを確認することは極めて困難である。この問題を解決する手法の一つで、既知配列から導入遺伝子やゲノム上の導入位置を迅速に明らかにできる Linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR)法について、本研究では配列情報が既知である GM パパイヤ 55-1 系統をモデル作物として検討を行った。対象の既知 DNA 配列として、導入された遺伝子カセット以外に異なる染色体に導入されている *nptII* 部分配列および導入された遺伝子カセットには存在しない *tetA* 部分配列を用いた。*nptII* 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施した結果、2つの増幅産物が検出され、ゲノム中のコピー数が 2 であることが確認された。また、導入された遺伝子カセットの *nptII* 周辺領域、および導入された遺伝子カセット以外の *nptII* 部分配列におけるゲノムとの境界領域の情報が得られた。一方で、*tetA* 部分配列をもとに LAM-PCR を実施した結果でもコピー数と周辺ゲノム境界領域が解明出来た。以上の結果から、LAM-PCR 法は小さい既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできる有効な手段の一つであることが示された。LAM-PCR 法を用いることで、内在性プロモーターの使用や NBT によって開発された GM 作物を迅速に特定することが可能になると期待される。

研究協力者

中村公亮, 野口秋雄, 坂田こずえ

(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

(1) スクリーニング法開発

(パパイヤの例)

GM パパイヤは、パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) 病に抵抗性を有する遺伝子組換え (GM) パパイヤの開発は、1990年代に初めて米国で GM パパイヤ 55-1 系統について報告されて以来、東南アジアなど熱帯・亜熱帯地域を中心に世界的に行われてきた。ウイルス抵抗性を獲得させるため、PRSV 株由来の外皮タンパク質 (PRSV-cp) または複製酵素 (replicase) を発現する様々な GM パパイヤ系統が開発されてきた。現在我が国で唯一の承認済 GM パパイヤは米国ハワイ産 55-1 系統であるが、2011 年に台湾産 GM パパイヤ PRSV-YK 系統がパパイヤ茶製品に混入していたこと、また、2013 年にタイ産 GM パパイヤ PRSV-SC 系統が乾燥パパイヤ製品に混入していたことが報告された。2015 年には、中国産 GM パパイヤ PRSV-HN 系統の混入がベトナム産冷凍青パパイヤ千切り製品で報告された。今後も、他の産地からの GM パパイヤが発見される可能性がある。一方、検査を行う側から見れば、これ以上の系統数の増加は一検の検査効率が低下する問題がある。近年、これまで以上に多様な GM 作物が開発されている現状から、GM 食品検査においても検査の効率化が重要な課題である。そこで、GM パパイヤを対象にして、検査の効率化を念頭にスクリーニング法の検討を行った。

(2) LAM-PCR を用いた短い既知配列から周辺未知配列の解析

2013 年以降、遺伝子組換え (GM) 作物の栽培面積はアジア・アフリカなど発展途上国が先進国を上回っている。一方、アメリカを中心とする先進国では新たな GM 作物が次々と開発されている。遺伝子発現を制御するプロモーターについては、汎用されてきたカリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーターに代わりコメアクチンプロモーター、トウモロコシユビキチンプロモーター、あるいはジャガイモ 顆粒デンプン合成酵素プロモーターなどの内在性プロモーターが使用される傾向にある。導入遺伝子については、交雑可能近縁種由来のものや、新植物育種法 (NBT) を用いた数塩基の変異を誘導したものなどが研究されている。このような作物の場合、遺伝子組換え体 (GMO) であることをプロモーターやターミネーターを用いたスクリーニング検査で迅速に確認することが極めて困難である。NBT に関しては、現在ゲノム上に導入された小さな DNA 断片のコピー数やゲノム上の位置を明らかにする有効な分析手段が、次世代シーケンス解析以外には存在しないことも問題である。これらの問題を解決するためには、小さな既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の種類やコピー数および挿入位置を安価で迅速に明らかにする分析手法が必要である。そこで、本研究では Linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR) 法の検討を行った。対象作物にはゲノム情報が公開されている GM パパイヤ 55-1 系統を用い、導入遺伝子の短い配列情報からゲノムとの境界領域の情報や導入遺伝子の解

明が可能であるかを検討した。

B. 研究方法

(1) スクリーニング法開発(パパイヤ)

1. データベース検索

これまでに開発された GM パパイヤに使用されているトランスジェニック構造配列は、米国国立医学図書館の国立生物工学情報センター (NCBI) が提供する PubMed, ウェブ検索サイト Google が提供する Google Scholar 及び Chemical Abstracts Service (CAS) が提供している SciFinder を使用して、学術文献及び特許情報を使用して調査した。

2. 試料、試薬および機器

(1) 試料

試験に供したパパイヤ DNA は、国立医薬品食品衛生研究所が所有していた以下の系統のものを用いた。55-1 系統のパパイヤ (SunUp, Rainbow)、PRSV-YK 系統のパパイヤ (YK)、PRSV-SC 系統のパパイヤ (SC)、Huanong No.1(HN)、非 GM パパイヤ (Sunset)。試験法の妥当性の確認試験に使用した加工食品は、インターネットで購入したパパイヤ茶、乾燥パパイヤ、缶詰、ピューレ、フルーツボールをそれぞれ 1 製品ずつ用いた。いずれも非 GM パパイヤ製品であることを確認し、調査に供した。

(2) 試薬

DNA の抽出・精製には、QIAGEN 製イオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tip 100/G) を用いた。DNA の抽出・精製時に用いた分解酵素には、(株)ニッポンジーン製 α -amylase (高濃度品) (Cat. No.316-04751)、和光純薬工業 (株) 製 Proteinase K (Cat.

No.160-22752)、QIAGEN 製 100 mg/mL RNaseA (Cat. No.145048133)、シグマアルドリッチジャパン(株)製 Cellulase (Cat. No.C2730) を用いた。また、DNA の抽出・精製時に用いた緩衝液は QIAGEN 製 Genomic DNA Buffer Set を用いた。イソプロパノールとエタノールは、ナカライテスク(株)のものを用いた。試薬は全て analytical grade を使用した。リアルタイム PCR には、Applied Biosystems™ 製 TaqMan® Gene Expression Master Mix (Cat. No.94404) を用いた。定性 PCR 反応液には、東洋紡製の 2× KODFX buffer と KODFX を用い、タカラバイオ(株)製の dNTP Mix ture を用いた。リアルタイム PCR、定性 PCR 共にプライマーは、ファスマック製のものを用いた。DNA 電気泳動解析に使用したアガロースは、タカラバイオ(株)製 LO3「TAKARA」(Cat. No.5003) を用い、核酸蛍光染色試薬として Biotium 製 GelRed™ Nucleic Acid Gel Strain, 10,000× in water (Cat. No.41003) を用いた。サンプルの添加液 (Loading Buffer) は、タカラバイオ(株)製 (Cat. No.A6310A) を用いた。標準 DNA サイズマーカーは、タカラバイオ(株)製 100bp ラダー (Cat.No.3407A) と invitrogen 製 1kb ラダー (Cat. No.15615-016) を用いた。遠心法プロトコルには、プロメガ製 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9282) を用いた。実験に使用した水は、日本ミリポア(株)製 Mill-Q Synthesis A10 で精製した超純粋を用いた。その他の試薬は、全て市販特級品を用いた。

3. 機器

粉碎機は、Retsch 製ミルサーミル MM200、

及び、Iwatani製 MILLSER ミルサー 720G-Y を用いた。電子天秤は、ザルトリウスメカトロニクス(株)製 BP 210 S を用いた。恒温槽は、タイテック製ドライサーモユニット DTU-1B を用いた。冷却遠心機は、トミー製 MX-305 を用いた。卓上遠心機は、フナコシ(株)製 KR-1000、05-514-0、KURABO 製 DISKBOY を用いた。96 ウェルプレート遠心機は、Labnet 製 mps 1000 を用いた。タッチミキサーは、大和製 MT-5 と Scientific Industries 製 VORTEX GENIE-2 (G-560) を用いた。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems™製 PRISMTM 7900HT を用いた。マグネチックホットスターラーは、三田村理研工業(株)製 MRK を用いた。電気泳動装置は、(株)アドバンス製 Mupid II を用いた。ゲルイメージ解析装置は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだものを用いた。UV ボードは、UVP 製 Benchtop2UV Transilluminator を用いた。分光光度計は、Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop 1000 を用いた。サーマルサイクラーは、BIO-RAD 製 iCycler を用いた。

4. パパイヤ、パパイヤ加工製品からの DNA の抽出・精製

試料には、パパイヤとパパイヤ加工食品はパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し(生鮮パパイヤは種子・果皮を除いた果肉の部分)、Millser 等で粉碎した。粉碎した試料 10 g (乾物製品は 2 g) をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量りとり、G2 緩衝液 30mL を加え、よく転倒混和して均質にした。粉碎した各試料は、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip 100/G) を用い、付

属のプロトコルを改変し以下の通り DNA の抽出・精製を行った。DNA 抽出用試料に、100 mg/mL RNaseA 20 μ L、cellulase 500 μ L を加えて転倒混合し均質化した後、50°C で 1 時間放置した。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。次いで、その遠沈管を 3,000 \times g、低温下 (4°C)、20 分間遠心し、得られた上清 (約 25~35 mL) を採取し、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷した。次いで、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、はじめの溶出液は捨てた。新しい遠沈管に移し、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。溶出液と等量のイソプロピルアルコールを加え、よく混合し、遠沈管 (1.5 mL もしくは 2.0 mL 容) に移し、10,000 \times g 以上で、低温下 (4°C) 15 分間遠心した。そして上清を捨てた。この際、上清を極力除去し、沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を除去した。70%エタノール 1 mL を加え、さらに 10,000 \times g 以上で、低温下 (4°C) 5 分間遠心した。さらに上清を捨て、残った沈殿物を十分に乾燥させた後、あらかじめ 50°C に温めておいた滅菌蒸留水 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とした。実験に使用せず、残った試料は、ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) にとり、冷凍庫 (-30°C) で保管した。

抽出した DNA 原液は、230、260 及び 280 nm の吸光度を測定することで DNA の定量及び純度の推定を行った。吸光度の測定は、NanoDrop 社製分光光度計 ND-1000 V3.2 を

使用した。吸光度の測定比 260 nm/230 nm から塩類などの夾雑物量を推定し、260 nm/280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。得られた DNA 濃度から、DNA 原液を 10 ng/μL に水で希釈して調製し DNA 試料液とした。なお、DNA 原液の濃度が 10 ng/μL に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いた。

5. リアルタイム PCR 解析

リアルタイム PCR の反応メカニズムを Fig 1 に示す。

(1) 反応液の調製

リアルタイム PCR 反応液は 25 μL/well として調製した。組成は以下のとおりである。Tap Man Gene Expression Master Mix 12.5 μL と対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μmol/L に調製）各 0.4 μL、対象プローブ溶液（10 μmol/L に調製）0.25 μL を混合し、水で全量 20 μL に調製後、DNA 試料液 5 μL（10 ng/μL に調製）を添加し、空気が入らないように注意しながらピペッティングを行った。表 1 には、リアルタイム PCR に使用したプライマープローブの配列及び標的配列の増幅断片長等の情報を示した。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えていないコントロール試料についても同時に調製し、DNA 試料液の添加の際、DNA 試料液の代わりに水をウェルに 5 μL 添加したものをネガティブコントロールに使用した。反応液の調製は、氷上で、また、プローブ溶液に光が当たらないように注意して行った。分注操作終了後、真上からシール（Thermo Fisher Scientific 製）を貼り、完全にウェルを密閉した。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリ

ングアプリーケーター（Thermo Fisher Scientific 製）を用いて行った。最後にウェル底の観察し、底に気泡がある場合は、96 ウェルプレート（Thermo Fisher Scientific 製）の縁を軽く叩いて気泡を抜き、96 ウェルプレート（Thermo Fisher Scientific 製）を遠心した。遠心後、ABI RRISM Optical Cover Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 製）を茶色の面が上になるように 96 ウェルプレートの上面にセットした。

(2) 増幅条件

リアルタイム PCR 装置に 96 ウェルプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C 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 秒間、60°C 1 分間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。Remaining time が 0 分になっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行った。

(3) データの解析

ベースラインは、3~15 サイクルに設定した。Ct 値をプロットするための ΔRn threshold は指数関数的な増幅の間、0.2 に設定した。指数関数的な増幅が確認され、Ct 値が 48 未満の場合、陽性であると判定した。Ct 値が得られない場合は、陰性と判定した。

6. 定性 PCR 解析

(1) 反応液の調製

定性 PCR 用反応液は 25 μL/well として調製した。調製は以下のとおりである。水 4.25 μL に、2×KODFX buffer を 12.5 μL と dNTP

を 5 μL 加えて混合し、プライマーを 0.25 μL ずつ加え全量 22.5 μL に調製した。先にウェルに DNA 試料液 2.5 μL を底に付けるように添加し、その後調製液を DNA 試料液と混合させながら添加した。

(2) 増幅条件

定性 PCR 装置にチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、75 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った後、72 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間の条件で保持し、4 $^{\circ}\text{C}$ 保存した。

(3) 電気泳動及び画像解析

定性 PCR 後の解析には、1% (w/v) アガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。タカラバイオ製のアガロースを 1 g 電子天秤で量りとり、三角フラスコ (500 mL 容) の中に入れ、1 \times TAE buffer 100 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の出入りができるように穴を 2~3 個開け、電子レンジで加熱しながら溶解させた。このとき吹きこぼれに注意した。加熱させた後、溶液はマグネチックホットスターラーで攪拌した。光に当てて観察し、アガロースが完全に溶けてなくなっていることが確認できるまでこの加熱作業を繰り返した。次に発癌の可能性のあるため手袋をして GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 \times in water を 5 μL を加え、攪拌した。攪拌後、耐熱性ゲルトレイの型に厚さ約 5 mm になるようにゆっくり流し入れた。流し入れる際にできた気泡は、チップの先やキムワイプなどを用いて除去した。サン

ルウェルの型は、ゲル作成用マルチコームを用いて作成した。常温で 2 時間ほど放置しゲル化させた。作成したアガロースゲルを用いて、PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行い、DNA 電気泳動パターン解析を行った。PCR 反応液は PCR 反応後、PCR チューブごと軽く遠心し試料とした。1%アガロースゲルのサンプルウェルに 100 bp マーカーを 5 μL 、1 kbp マーカーを 5 μL 、試料 5 μL (10 \times Loading buffer 0.5 μL ずつ加え混合した) を入れ電気泳動 (100 V、15~20 分程度) を行った。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。

(4) シーケンス解析

UV ボードの上にエタノールを吹きかけ、ラップを張り、その上に 1%アガロースゲルを置き、320 nm UV 照射下で DNA を検出した。そして、電気泳動を行った際の DNA バンドをメスで切り出した。このとき、DNA を切断しないように注意した。メスは使うたびにエタノールで消毒して使用した。次いでゲルからの DNA の精製を行った。DNA 濃度を測定し、15 ng/ μL に調製した。精製したサンプルは、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer を使用しサンガー法にてシーケンス解析を行った。

LAM-PCR を用いた周辺未知配列の解析

1. 試料

非組換え(non-GM)パパイヤ Sunset 品種および GM パパイヤ 55-1 系統 Rainbow 品種は、消費者庁を通じてハワイパパイヤ産

業協会から入手したものを使用した。DNA抽出は、消費者庁通知に記載されている方法に従い¹⁾、蒸留水にて 100 ng/ μ L に希釈したものを実験に用いた。

2. プライマーの設計

GM パパイヤ 55-1 系統に導入されている *npII* 部分配列および *tetA* 部分配列の情報から、これらの配列の前後(Fw および Rv)それぞれを増幅するプライマーを設計した(図 1 および表 1)。Linear PCR および 1st nested PCR には biotin 化プライマーを用いた。

3. LAM-PCR

【Linear PCR】反応液組成は以下の通りである。10 \times ExTaq Buffer (TAKARA) 5 μ L, 2.5 mM each dNTP Mixture (TAKARA) 4 μ L, 50 μ M primer LTRI 0.5 μ L, 5 U/ μ L ExTaq HS (TAKARA) 0.25 μ L を混合し、non-GM パパイヤまたは GM パパイヤ 55-1 系統から抽出した DNA 試料液 5 μ L を添加し、蒸留水で全量 50 μ L に調製した。反応は GeneAmp[®] PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用い、98 $^{\circ}$ C で 5 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、98 $^{\circ}$ C, 1 分, 60 $^{\circ}$ C, 30 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。増幅産物は既報の方法²⁾に従って、磁気化 streptavidin ビーズ (Streptavidin Mag Sepharose, GE Healthcare) に補足させた。

【dsDNA 合成】反応液組成は以下の通りである。10 \times hexanucleotide mixture (Sigma-Aldrich) 2 μ L, 200 μ M each dNTPs 0.5 μ L, 2 U/ μ L Klenow polymerase (New England Biolabs) 0.25 μ L を混合し、蒸留水で全量 20

μ L に調製した。増幅産物を補足させたビーズに反応液を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応後、既報の方法²⁾に従ってビーズを洗浄した。

【制限酵素処理】MseI の反応液組成は以下の通りである。10 \times CutSmart Buffer (New England Biolabs) 2 μ L, 4 U/ μ L MseI (New England Biolabs) 1 μ L を混合し、蒸留水で全量 20 μ L に調製した。HpyCH4IV の反応液組成は以下の通りである。10 \times CutSmart Buffer 2 μ L, 10 U/ μ L HpyCH4IV (New England Biolabs) 1 μ L を混合し、蒸留水で全量 20 μ L に調製した。dsDNA 合成後のビーズに反応液を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応後、既報の方法²⁾に従ってビーズを洗浄した。なお、MseI 反応系は *npII* 部分配列および *tetA* 部分配列に対して実施し、HpyCH4IV 反応系は *npII* 部分配列に対してのみ実施した。

【リンカーカセットの調整】リンカーカセット調整液の組成は以下の通りである。1 M Tris-HCl (pH7.2) 20 μ L, 25 mM MgCl₂ 40 μ L, 100 μ M LC1 (5'-GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCACAGCAGTTAGG-3') 40 μ L, 100 μ M LC4 (MseI 用), 5'-TACCTAACTGCTGTGCCACTGAATCAGATC-3') または LC5 (HpyCH4IV 用, 5'-CGCCTAACTGCTGTGCCACTGAATCAGATC-3') 40 μ L を混合し、蒸留水で全量 200 μ L に調製した。GeneAmp[®] PCR System 9700 を用い、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加温し、13 時間かけて 20 $^{\circ}$ C に冷却した。冷却後、Amicon[®] Ultra - 0.5 mL Ultracel[®] - 30K

(Merck Millipore)を用いて脱塩・濃縮した(最終液量 80 μ L).

【リンカーライゲーション】反応液組成は以下の通りである。10 \times T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs) 2 μ L, 4 U/ μ L MseI (New England Biolabs) 1 μ L, リンカーカセット 2 μ L を混合し, 蒸留水で全量 20 μ L に調製した。制限酵素処理後のビーズに反応液を加え, 室温で1時間インキュベートした。反応後, 既報の方法²⁾に従ってビーズを洗浄した。

【一本鎖 DNA の遊離】リンカーライゲーション後のビーズに 0.1 M NaOH 10 μ L を加え, 室温で 30 分間インキュベートし, 一本鎖 DNA を遊離させた。

【1st Nested PCR】反応液組成は以下の通りである。10 \times ExTaq Buffer 5 μ L, 2.5 mM each dNTP Mixture 4 μ L, 50 μ M primer LTRII 0.5 μ L, 50 μ M primer LCI 0.5 μ L, 5 U/ μ L ExTaq HS 0.25 μ L を混合し, 一本鎖 DNA 溶液 1 μ L を添加し, 蒸留水で全量 50 μ L に調製した。反応は GeneAmp® PCR System 9700 を用い, 98°C で 5 分間加温し, ホットスタート法で反応を開始した。その後, 98°C, 10 秒, 60°C, 30 秒, 72°C, 1 分を 1 サイクルとして, 35 サイクルの増幅反応を行い, その後 72°C, 10 分反応させた。増幅産物は既報の方法²⁾に従って, 磁気化 streptavidin ビーズに補足させた。その後, 0.1 M NaOH 10 μ L を加え, 室温で 30 分間インキュベートし, 一本鎖 DNA を遊離させた。

【2nd Nested PCR】反応液組成は以下の通

りである。10 \times ExTaq Buffer 5 μ L, 2.5 mM each dNTP Mixture 4 μ L, 50 μ M primer LTRIII 0.5 μ L, 50 μ M primer LCII 0.5 μ L, 5 U/ μ L ExTaq HS 0.25 μ L を混合し, 1st Nested PCR 産物 1 μ L を添加し, 蒸留水で全量 50 μ L に調製した。反応は GeneAmp® PCR System 9700 を用い, 98°C で 5 分間加温し, ホットスタート法で反応を開始した。その後, 98°C, 10 秒, 60°C, 30 秒, 72°C, 1 分を 1 サイクルとして, 35 サイクルの増幅反応を行い, その後 72°C, 10 分反応させた。

4. シーケンス解析

LAM-PCR 増幅産物は 2%アガロースゲル電気泳動[アガロース, Agarose 21 (ニッポンジーン); 染色剤, Gel Red (Biotium)]に供し, 検出された主要バンドを切り出し, 精製した。精製した LAM-PCR 増幅産物および pGEM-T Easy Vector Systems (Promega)を用いてクローニングしたプラスミド DNA をシーケンス解析した。

1) 消費表第 201 号, 消費者庁食品表示課 (2012).

2) Schmidt, M. et al., *Nat. Methods*, 4, 1051-1057 (2007).

B. 研究結果

(1) スクリーニング法開発(パパイヤ)

・各種 GM パパイヤ系統をサンプルとしたリアルタイム PCR 反応性について

リアルタイム PCR にて各種 GM パパイヤ系統の増幅曲線の特徴を調べたものを図 1 に示した。パパイヤの内在性遺伝子 Chymopapain 遺伝子 (*Chy*) を検出するリアルタイム PCR 法 (*Chy*)、カリフラワーモザイクウイルス由来 35SRNA プロモーター

を検出するリアルタイム PCR 法 (P35S)、ノパリンシンテターゼプロモーターを検出するリアルタイム PCR 法 (T-nos)、パパイヤ 55-1 系統遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法 (55-1) を用いて、非 GM (Sunset)、承認済 55-1 系統のホモ型 (SunUp) とヘテロ型 (Rainbow)、未承認のパパイヤの DNA を検体としてリアルタイム PCR を行った。その結果、Sunset は Chy のみ検出され、55-1 系統は Chy、55-1、P35S、T-nos が検出された。また、PRSV-YK、PRSV-SC、Huanong No.1 は 55-1 以外の Chy、P35S、T-nos が検出された。表 2 に増幅曲線と蛍光強度の差を表す ΔRn 0.2 と交わる点から得られる Ct 値をまとめた。それぞれの方法で得られた Ct 値は、Sunset (Chy, 24.89 ± 0.81)、SunUp (Chy, 24.58 ± 0.01 ; 55-1, 25.91 ± 0.05 ; P35S, 22.04 ± 0.28 ; T-nos, 25.60 ± 0.04)、Rainbow (Chy, 24.37 ± 0.23 ; 55-1, 26.95 ± 0.01 ; P35S, 26.48 ± 0.07 ; T-nos, 26.76 ± 0.36)、PRSV-YK (Chy, 25.86 ± 0.01 ; P35S, 25.72 ± 0.02 ; T-nos, 25.59 ± 0.03)、PRSV-SC (Chy, 22.04 ± 0.28 ; P35S, 21.61 ± 0.02 ; T-nos, 21.48 ± 0.64)、Huanong No.1 (Chy, 31.87 ± 0.12 ; P35S, 36.16 ± 0.38 ; T-nos, 35.22 ± 0.28) であった。これらの Ct 値から ΔCt 値と $\Delta \Delta Ct$ 値から算出されたコピー数を表 3 にまとめた。 ΔCt 値は 55-1、P35S、T-nos から得られた Ct 値を Chy から得られた Ct 値を引いた値、 $\Delta \Delta Ct$ 値は各 GM 系統の ΔCt 値から Rainbow の ΔCt 値を引いた値である。また、relative difference は Rainbow を基準としたときのコピー数を表しており、 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ の式より算出した。SunUp の 55-1 のコピー数は Rainbow の 2.38 倍、P35S は 2.38 倍、T-nos は 2.58 倍、PRSV-YK の P35S は 19.45 倍、

T-nos は 25.73 倍、PRSV-SC の P35S は 5.83 倍、T-nos は 7.72 倍、Huanong No.1 の P35S は 0.05 倍、T-nos は 0.13 倍であった。

そこで GM パパイヤの標的配列の特徴から新規スクリーニング法を考案し、図 2 にその方法の概略を示した。Chy のみが検出された場合は非 GM パパイヤであり、Chy と 55-1 が検出された場合は承認済 55-1 系統のパパイヤとなる。55-1 以外の Chy、P35S、T-nos が検出された場合は未承認 GM パパイヤと判定される可能性が考えられた。しかし、Chy、55-1、P35S、T-nos すべて検出された場合は 55-1 系統と未承認 GM パパイヤの同時混入の可能性があり、その場合には各 GM パパイヤの系統に存在する標的コピー数の違いを検出することにより判定可能であることが考えられた。

承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤの同時混入が認められた場合の定量的判定法の検討について

リアルタイム PCR に使用する DNA サンプルとして、未承認 GM パパイヤ系統と承認済 GM パパイヤ 55-1 系統 (Rainbow 品種) を、4 : 1、3 : 2、2 : 3、1 : 4 の割合で混合した。Ct 値と ΔCt 値の数値を表 3 にまとめた。DNA が Rainbow (55-1 系統) のみ使用されていた場合は、55-1、P35S、T-nos のコピー数の比率は 1 : 1 : 1 (55-1 : P35S : T-nos) であった。Rainbow に未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) が 1 : 4 の割合で混合すると、0.38 : 3.12 : 4.30 となった。Rainbow に PRSV-SC を 2 : 3 の割合で混合させると、0.07 : 4.20 : 5.64 の比率であった。このことから、承認済の GM パパイヤと未承認 GM パパイヤを混合させると 1 : 1 : 1 の比率が

らずれが生じることが分かった。承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤの同時混入が認められた時の検量線を作るために、55-1 を段階的に希釈しリアルタイム PCR を行った (図 3、4)。図 3 は Rainbow を 0% から 100% を 4 段階、に希釈した場合の増幅曲線を示し、図 4 は SunUp を図 3 の Rainbow 濃度より低濃度側で希釈しリアルタイム PCR を行ったものを示した。Rainbow と SunUp の濃度を希釈しても Chy の Ct 値の変化はないが、55-1、P35S、T-nos の増幅曲線が徐々に右へ移動し Ct 値は高くなった。図 5、6 の (A) に図 3、4 の Ct 値の変化を検量線で示した。図中の (A~C) は Ct 値、(D~F) は Δ Ct 値を示している。(A) の検量線を基準とし 55-1 (SunUp 品種) が 25%、0.1% の時の PRSV-YK と PRSV-SC の DNA の変化を検討した。図 5、6 より、未承認 GM パパイヤの濃度を高くすると 55-1 と Chy の Ct 値は一定であった。P35S と T-nos には変化が見られた。55-1 を 25% とした場合、PRSV-YK が 1% では、P35S (27.78)、T-nos (27.84) となり、PRSV-YK を 10% にすると、P35S (26.02)、T-nos (25.97) と Ct 値が低下した。55-1 を 0.1% にした場合も P35S (37.18)、T-nos (30.52)、PRSV-YK を 10% にすると P35S (26.35)、T-nos (26.48) と Ct 値が低下した。PRSV-SC においても PRSV-YK と同じ変化が得られた。55-1 を 25% とした場合、PRSV-SC を 0.1% にすると P35S (28.36)、T-nos (27.71) となり、PRSV-SC 1% では、P35S (26.48)、T-nos (25.71) と低下した。P35S と T-nos の Ct 値が低下したことにより、 Δ Ct 値 (Ct 値 P35S - Ct 値 Chy と Ct 値 T-nos - Ct 値 Chy) は低下した。これらの結果より、承認済 GM

パパイヤと未承認 GM パパイヤが同時混入した際、リアルタイム PCR を使用した定量的判定が可能であることが示唆された。

・未承認 GM パパイヤの混入が検出された際の判定法の検討について

DNA の塩基配列より、未承認 GM パパイヤの混入を同定するための定性 PCR 法の検討を行った。外皮タンパク質をコードする遺伝子配列 (PRSV-cp) を調べるために定性用プライマーの位置を図 7 に示した。実験モデルとして 55-1 のみと 55-1 に PRSV-SC を混合した DNA を鋳型にして使用した。電気泳動より、DNA 増幅断片長を推定した (図 8)。55-1 と PRSV-SC のバンドは 200~300 bp であった。55-1 と PRSV-SC を配列で判定するため、検出されたバンドを切り出し、シークエンスを行った (図 9)。各地域で流行しているウィルスに抵抗を獲得するために開発された各種 GM パパイヤ系統に導入された配列を使用し、それぞれの PRSV-cp の配列とのアライメントを行った。その結果、55-1 と PRSV-SC を混合させた検体②の PRSV-cp 配列は、PRSV-SC と同様の配列を持つタイ産 GM パパイヤ (Chiangmai、Chiangmai 2、Samut Sakhon SMK 1) の部分配列 (配列番号 100~203 番) において相同性を示した。検体②の配列番号 100 番は 55-1 系統のみであればグアニンを示す部分がアデニンを示し、143 番はチミンを示す部分がアデニンだった。この結果より、配列を調べることによって遺伝子の同定が可能であることが示唆された。

・開発した新規スクリーニング法の妥当性

の確認試験

図 2 に示した本研究で開発した新規スクリーニング法の妥当性の確認のため、実際に国内で流通している非 GM パパイヤ食品を用いて試験を行った。使用した製品は、GM パパイヤの開発が行われている熱帯・亜熱帯地域の国を原産国としているものをインターネットより購入して使用した(表 4)。様々な種類のパパイヤ加工食品を検体にリアルタイム PCR 法に供した。増幅曲線を図 1 O に示した。今回の結果は、すべての検体の増幅曲線から Chy のみ検出されたので非 GM パパイヤであることが示唆された。表 5 に得られた Ct 値をまとめた。ポジティブコントロールは、55-1 系統の SunUp を使用した。SunUp の Ct 値は Chy (24.63 / 24.98)、55-1 (26.22 / 25.75)、P35S (25.97 / 25.96)、T-nos (25.28 / 25.05) であった。パパイヤ加工食品は Chy のみが検出され、Ct 値は、A (22.86 / 22.95)、B (23.58 / 23.41)、C (41.79 / 41.26)、D (23.71 / 23.71)、E (22.24 / 22.31) であった。Chy はどの検体でも検出され、55-1、P35S、T-nos は検出されなかった。この結果より、網羅的に GM パパイヤを検出可能なスクリーニング法を用いた場合でも、試験を行った全てのパパイヤ加工食品は非 GM パパイヤであることが確認された。PRSV-YK、PRSV-SC、Huanong No.1 の陽性 GM 試料 (DNA) も適切に検出できたことと合わせて、本法の有用性が示唆された。

(2) LAM-PCR を用いた周辺未知配列の解析

・ LAM-PCR による *nptII* 周辺配列の増幅
GM パパイヤ 55-1 系統には、導入された

遺伝子カセット以外にも *nptII* 部分配列が異なる染色体に導入されている。そのため、LAM-PCR によって *nptII* の周辺配列を増幅させた場合、適切な制限酵素を選択すれば 2 つの増幅断片が形成されると考えられる(図 2)。GM パパイヤ 55-1 系統から抽出した DNA 溶液に対する LAM-PCR の結果、HpyCH4IV 反応系の 1st Nested PCR において、予想される 2 本のバンド(Fw: 168 bp/309 bp; Rv: 336 bp/377 bp)が検出された(図 3A)。さらに、2nd Nested PCR においても、非特異的なバンドが若干検出されたものの予想される 2 本のバンド(Fw: 111 bp/252 bp; Rv: 294 bp/335 bp)が検出された(図 3B)。一方、MseI 反応系の 1st Nested PCR においても、予想される 2 本のバンド(Fw: 371 bp/798 bp; Rv: 306 bp/692 bp)が検出された(図 4A)。ただし、長鎖のバンド(Fw: 798 bp; Rv: 692 bp)においては、増幅量はわずかであった(図 4A)。また、2nd Nested PCR においては、予想される短鎖のバンド(Fw: 314 bp; Rv: 262 bp)は検出されたが、長鎖のバンド(Fw: 741 bp; Rv: 648 bp)は検出されなかった(図 4B)。一方で、non-GM パパイヤから抽出した DNA 溶液に対して LAM-PCR を実施した際には、1st Nested PCR、2nd Nested PCR とともに主要なバンドは検出されなかった(図 3, 4)。

・ *nptII* 周辺配列のシーケンス解析

C-1 にて増幅された主要バンドを精製し、シーケンス解析を行った。その結果、MseI 反応系の 1st Nested PCR にて増幅量がわずかであった長鎖の増幅産物(Fw: 798 bp; Rv: 692 bp)を含めて、全ての増幅産物の配列はゲノム配列と完全に一致した。また、

HpyCH4IV 反応系の増幅産物[1st Nested PCR: 309 bp (Fw), 336 bp (Rv); 2nd Nested PCR: 252 bp (Fw), 294 bp (Rv)]および MseI 反応系の増幅産物[1st Nested PCR: 371 bp (Fw), 306 bp (Rv); 2nd Nested PCR: 314 bp (Fw), 262 bp (Rv)]のシーケンス解析の結果から、導入された遺伝子カセット以外の *nptII* 部分配列においてゲノムとの境界領域の情報が得られた(図 5)。一方で、増幅産物をクローニングし、シーケンス解析を行った結果、PCR エラーによる数塩基の変異が観察されたものも存在したが、ゲノム配列とほぼ一致していた。

・LAM-PCR による *tetA* 周辺配列の増幅

GM パパイヤ 55-1 系統には、導入された遺伝子カセットには含まれない *tetA* 部分配列が導入されている。この配列は GM パパイヤ 55-1 系統のゲノム中に 1 コピー存在するため、LAM-PCR によって *tetA* 周辺配列を増幅させた場合、1 つの増幅断片が形成されると考えられる(図 2)。GM パパイヤ 55-1 系統から抽出した DNA 溶液に対する MseI 反応系の LAM-PCR の結果、1st Nested PCR (Fw: 307 bp; Rv: 403 bp), 2nd Nested PCR (Fw: 257 bp; Rv: 353 bp)ともに予想される 1 本のバンドが検出された(図 4)。一方で、non-GM パパイヤから抽出した DNA 溶液に対して LAM-PCR を実施した際には、1st Nested PCR, 2nd Nested PCR ともに主要なバンドは検出されなかった(図 4)。

・*tetA* 周辺配列のシーケンス解析

C-3 にて増幅された主要バンドを精製し、シーケンス解析を行った。その結果、全ての増幅産物の配列はゲノム配列と完全に一

致した。しかし、増幅産物の鎖長が短かったため、シーケンス解析の結果から *tetA* 部分配列についてゲノムとの境界領域の情報を得るには至らなかった。一方で、増幅産物をクローニングし、シーケンス解析を行った結果、PCR エラーによる数塩基の変異が観察されたものも存在したが、ゲノム配列とほぼ一致していた。

C. 考察

(1) スクリーニング法開発(パパイヤ)

・網羅的未承認遺伝子組換えパパイヤ検知のためのスクリーニング法開発

現在、世界中で PRSV の感染に抵抗性を有する GM パパイヤが生産されている中で、GM パパイヤ混入に関する検査が国内の検査機関で行われている。現在、我が国で安全性が審査され承認された GM パパイヤはハワイ産の 55-1 系統のみである。しかし、これまでに未承認 GM パパイヤの食品への混入が報告されている。そこで、今後の様々な未承認 GM パパイヤの混入を想定し、簡易的に GM パパイヤの判定が可能な方法が求められた。本研究では、リアルタイム PCR 法と DNA 配列のアライメントを行うことによって判定可能な GM パパイヤスクリーニング法を開発した。

表 6 より、世界で開発されている代表的な GM パパイヤ系統を示している。主に、熱帯・亜熱帯地域で開発され、各地域に蔓延しているウィルス (PRSV) に対して抵抗性のある遺伝子配列がパパイヤゲノムへ導入されている。GM パパイヤ系統によって、様々な導入遺伝子が発現している。そのため GM パパイヤの系統によっては PRSV に対する抵抗性は大きく異なる。また、目的

遺伝子を発現させるために、重要なプロモーターとターミネーターが存在する。GM パパイヤには、P35S と T-nos が共通して導入されているという特徴がある。目的遺伝子の導入方法としては、細菌を使用したアグロバクテリウム法や物理的に遺伝子を導入するパーティクルガン法が使用されている。GM パパイヤの系統間では、特徴的な塩基配列を有し、ウィルスに抵抗するために導入された P35S と T-nos のコピー数が異なる。つまり、各 GM パパイヤ系統は遺伝学的に全く異なる系統であることを示唆する。リアルタイム PCR 法で反応性を確認したところ、未承認 GM パパイヤと承認済 GM パパイヤでは、各標的配列を検知した際、まったく違う増幅曲線パターンを示した。各 GM パパイヤ系統の増幅曲線より、標的配列のコピー数を算出した。その結果、55-1 系統の Rainbow 品種のコピー数を 1 とした場合、ホモ型の 55-1 系統 SunUp 品種は 55-1、P35S、T-nos のコピー数は 2 倍導入されていることが確認された。一方、未承認 GM パパイヤである PRSV-YK 系統、PRSV-SC 系統、Huanong No.1 系統においては、55-1 系統と比較すると標的配列のコピー数に特徴的なパターンが確認された。以上の結果より、P35S と T-nos を標的にコピー数の違いを検出することで GM パパイヤ系統を判定可能であることが示唆された。しかし、問題はサンプル中に承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが同時に混入した場合である。

表 3 に示す通り、コピー数の存在比率が 55-1 系統 100% の場合と比較すると、未承認 GM パパイヤと 55-1 系統混合の場合ではまったく違うパターンを示すことが示唆さ

れた。導入されている P35S と T-nos のコピー数の存在比率を定量的に検出すれば GM パパイヤを判定可能であることが示唆された。そこで、55-1 系統が 100% の場合の検量線を作成し、これを基に 55-1 系統に PRSV-YK 系統と PRSV-SC 系統をそれぞれ添加して実験を行った。その結果、各系統の P35S と T-nos のコピー数が異なることによって Ct 値および ΔCt 値に変化が生じることが確認された。このことから、55-1 系統に未承認 GM パパイヤが混入した場合、P35S と T-nos のコピー数を定量的に検出することで判定可能であることが示唆された。

未承認 GM パパイヤが食品へ混入した場合、我が国ではその食品の国内流通は認められていない。未承認 GM パパイヤが食品へ混入したことが確認された場合は、GM パパイヤの詳細を調べる前提として、系統を同定する必要がある。同定には、DNA の塩基配列より行う必要がある。本研究では、GM パパイヤで導入されている P35S と PRSV-cp の相同性の高い塩基配列を標的に PCR 用プライマー対を設定し、GM パパイヤの系統を判定可能な定性 PCR 法を考案した。55-1 系統に PRSV-SC が混入した実験モデルを構築して、上述したプライマー対を用いて定性 PCR を行った。得られた増幅産物のシーケンスを行い、塩基配列のアライメント及び BLASTn より、データベース上で検索した。その結果、GM パパイヤ系統の開発地域が予想可能であることが示唆された。

PRSV-YK、PRSV-SC、Huanong No.1 の陽性 GM 試料および非 GM パパイヤ加工食品を用いて、本研究で構築した新規 GM パパイヤスクリーニング法の妥当性の確認を行

った。その結果、PRSV-YK, PRSV-SC, Huanong No.1 はスクリーニング陽性と適切に判定され、また、調査を行ったすべての非パパイヤ加工食品検体において、パパイヤ内在性遺伝子である *Chy* のみ検出され、試験法の妥当性が確認された。

(2) LAM-PCR を用いた周辺未知配列の解析

内在性プロモーターの使用や NBT によって開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では GMO であることを迅速に確認することは極めて困難である。これらの問題を解決する手法の一つである LAM-PCR 法について、本研究では GM パパイヤ 55-1 系統を対象に検討を行った。GM パパイヤ 55-1 系統には、導入された遺伝子カセット以外にも *nptII* 部分配列が異なる染色体に導入されている。*nptII* 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施した結果、2 本の増幅産物が検出され、ゲノム中のコピー数が 2 であることが確認された。また、導入された遺伝子カセットの *nptII* 周辺領域、および導入された遺伝子カセット以外の *nptII* 部分配列におけるゲノムとの境界領域の情報が得られた。一方、GM パパイヤ 55-1 系統には、導入された遺伝子カセットには含まれない *tetA* 部分配列が導入されている。*tetA* 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施した結果、1 本の増幅産物が確認され、ゲノム中のコピー数が 1 であることが確認された。また、周辺領域の情報が得られた。今回増幅産物の鎖長が短かったため、ゲノムとの境界領域の情報を得るには至らなかったが、得られた周辺領域の情報から新た

なプライマーを設計して LAM-PCR を実施することで、ゲノムとの境界領域の情報を得ることができると考えられる。以上の結果から、LAM-PCR 法は小さい既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできることが示された。

nptII の部分配列に関して、今回選択した 2 種類の制限酵素では 2 本の増幅産物が検出され、ゲノム中に 2 コピー存在することが確認されたが、使用する制限酵素によっては、ゲノムとの境界領域まで増幅されず、1 本しか増幅産物が検出されない場合も考えられる。また、長鎖の増幅産物(600~800 bp)の増幅量がわずかであったことから、LAM-PCR 法では長鎖配列の増幅は困難であると考えられる。以上のことから、LAM-PCR 法を実施する際には、複数の制限酵素を使用することが強く推奨される。

E. 結論

(1) スクリーニング法開発(パパイヤ)

現在、GM パパイヤはハワイ産 55-1 系統のみ国内での流通が認められている。しかし、未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK 系統、PRSV-SC 系統、Huanong No.1 系統) の食品への混入が過去に報告された。

本研究では、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが混入した食品を検知可能なスクリーニング法を開発した。GM パパイヤゲノムに導入された P35S と T-nos を標的にリアルタイム PCR より概算されるコピー数から、承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤの判定を可能にした。また、定性 PCR より、PRSV 株由来外皮タンパク質 (PRSV-cp) を発現するトランジェニッ

ク構造配列を検出するプライマー対を設計し、得られる PCR 増幅産物のシークエンスから GM パパイヤ系統の同定も可能であることが示唆された。我々は既に今回の研究で使用した 55-1 と Chy の特異性と高い検出感度を学術論文で報告している。今後は、P35S と T-nos の特異性と検出感度試験を行い、どの程度の混入までは検出できるかを実証していく必要性が考えられた。また、本研究で開発した方法の適用性について、様々なパパイヤ加工食品を検体に調べる必要性も考えられた。開発した本法の実用化に向けて更なる検討を進めていく予定である。

(2) LAM-PCR を用いた周辺未知配列の解析

ゲノム情報が公開されている GM パパイヤ 55-1 系統を対象に LAM-PCR 法の検討を行った結果、小さい既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできることが示された。使用する制限酵素によっては、長鎖の増幅産物の検出が困難になったり、ゲノムとの境界領域まで増幅されず、コピー数を少なく見積もってしまう可能性があるため、LAM-PCR 法を実施する際には、複数の制限酵素を使用することが強く推奨される。LAM-PCR 法を用いることで、内在性プロモーターの使用や NBT によって開発された GM 作物を迅速に特定することが可能になると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Nishimaki-Mogami, T., Akiyama, H. Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via down-regulation of T helper 17 (Th17) cell responses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 1406-1410, 2015.
2. 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.
3. 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*, 240, 413-422, 2015.
4. 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. (Accepted)

5. 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, 2016. (Accepted).
6. Mano, J., Takashima, K., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R. and Kitta, K. (2015) Method modifications and validation of group testing, evaluation method of GM maize content. *Rep. Nat'l Food Res. Inst.* 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) Kondo, K., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. Rapid identification of poisonous *Entoloma rhodopolium* and edible *E. sarcopum* mushrooms using PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR, 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015年11月.
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

- 卷) 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
- 7) 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(西卷)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
- 8) 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(西卷)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
- 9) 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(西卷)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
- 10) 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、青塚圭二、鈴木智宏、最上知子、手島玲子、近藤一成：ツキヨタケの PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討(第2法)：加熱、消化処理サンプルへの適用、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 11) 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(西卷)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
- 12) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穠山浩、近藤一成、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上(西卷)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
- 13) 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、高畠令王奈、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日本セッション年次大会、東京、2015年6月
- 14) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西卷)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
- 15) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上(西卷)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
- 16) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上(西卷)知子、高畠令王奈、橘田和美：リアルタイムPCRによるDNA断片化測定法の改良

と市販加工食品の分析, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会京都, 2015 年 10 月

- 17) 高嶋令王奈, 鍵屋ゆかり, 峯岸恭孝, Sabina Yeasmin, 布籐聡, 野口秋雄, 近藤一成, 最上(西巻)知子, 真野潤一, 橘田和美: LAMP 法による安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの網羅的簡易迅速検知法の開発, 第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会京都, 2015 年 10 月野口秋雄, 近藤一成, 最上(西巻)知子: LAMP 法を用いた遺伝子組換え作物の簡易検査法

の開発, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015 年 10 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