

表1. 本研究で利用したリアルタイムPCR用プライマープローブ配列情報

Method name	Target	Type	Primer name	Sequence (5'→3')	Amplicon (bp)	Reference
Chy	Chymopapain gene	Endogenous gene	Q-Chy-1F2	CCATGCGATCCTCCCA	72	21)
			Q-Chy-2R	CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA		
			Q-Chy-P'	FAM-TTCCCTTCAT(BHQ1)CCATTCCCACTCTTGAGA-P		
55-1	Border sequence transgenic construct and genome sequence	Event-specific sequence	55-1 primer1	CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA	71	17)
			55-1 primer2	TCCGCCTCCATCCAGTCTATT		
			55-1 probe	FAM-TCTTCTAGCTTCCCGCAACAAT-TAMRA		
P35S	Cauliflower mosaic virus 35S promoter	Cis-element-specific sequence	NEWP35S-F1	GACGTTCCAACCACGTCTTCA	65	26)
			NEWP35S-R1	TCATCCCTTACGTCAGTGGAGAT		
			NEWP35S-P1	FAM-AGCAAGTGGATTGATGTGA-MGB		
T-nos	Nosipine synthase promoter	Cis-element-specific sequence	SCN-Tnos F	TTATGATTAGAGTCCCGCAATTAT	69	26)
			SCN-Tnos R	CCTAGTTTGGCGGCTATATT		
			SCN-Tnos P	FAM-CATTTAATACGGGATAGAA-MGB		

表2. リアルタイムPCRスクリーニング試験より得られたCt値一覧

Real-time PCR method	NTC*	Approved (55-1)			Unauthorized		
		SunSet (-/-)	SunUp (+/+) Homo strain	Rainbow (+/-) Hetero strain	PRSV-YK	PRSV-SC	Huanong No.1
Chy	-	24.89±0.81	24.58±0.01	24.37±0.23	25.86±0.01	22.04±0.28	31.87±0.12
55-1	-	-	25.91±0.05	26.95±0.01	-	-	-
P35S	-	-	22.04±0.28	26.48±0.07	25.72±0.02	21.61±0.02	36.16±0.38
T-nos	-	-	25.60±0.04	26.76±0.36	25.59±0.03	21.48±0.64	35.22±0.28

*NTC, no template control

表3. リアルタイムPCRスクリーニング試験より得られたCt値から算出された標的配列コピー数一覧

Detection method	Authorized		Qualitative detection							Quantitative detection								
	Rainbow 55-1 hetero (+/-)	Sunup 55-1 homo (+/-)	Unauthorized			YK:55-1(Rainbow)				SC:55-1(Rainbow)				HN:55-1(Rainbow)				
			YK	SC	HN	4:1	3:2	2:3	1:4	4:1	3:2	2:3	1:4	4:1	3:2	2:3	1:4	
target sequence	Chy	24.37	24.58	27.89	22.04	29.84	25.82	24.68	24.71	24.47	21.85	22.10	22.67	23.10	26.98	25.96	25.22	24.76
	55-1	26.95	25.91	N/D	N/D	N/D	29.79	28.72	27.95	27.44	29.49	28.46	27.91	27.37	29.11	28.64	27.97	27.40
	P35S	26.48	25.44	25.72	21.61	36.16	26.29	25.08	25.53	25.93	21.80	22.14	22.81	23.73	29.14	28.02	27.54	27.06
	T-nos	26.76	25.60	25.59	21.48	35.22	26.11	25.10	25.27	25.84	21.61	21.99	22.56	23.50	29.39	28.21	27.64	27.16
55-1 event-specific	Δ Ct	2.58	1.33				3.97	4.05	3.24	2.98	7.65	6.37	5.24	4.27	2.13	2.68	2.75	2.65
	$\Delta \Delta$ Ct	0.00	-1.25				1.39	1.47	0.65	0.40	5.07	3.79	2.66	1.69	-0.45	0.09	0.17	0.06
	relative difference	1.00	2.38				0.38	0.36	0.64	0.76	0.03	0.07	0.16	0.31	1.37	0.94	0.89	0.96
P35S	Δ Ct	2.11	0.86	-2.17	-0.43	6.32	0.47	0.41	0.82	1.46	-0.04	0.04	0.15	0.63	2.16	2.06	2.33	2.31
	$\Delta \Delta$ Ct	0.00	-1.25	-4.28	-2.54	6.32	-1.64	-1.71	-1.29	-0.65	-2.16	-2.07	-1.97	-1.48	0.05	-0.05	0.21	0.20
	relative difference	1.00	2.38	19.45	5.83	0.01	3.12	3.26	2.45	1.57	4.45	4.20	3.90	2.79	0.97	1.04	0.86	0.87
T-nos	Δ Ct	2.39	1.02	-2.30	-0.56	5.38	0.29	0.42	0.56	1.37	-0.23	-0.10	-0.10	0.41	2.41	2.25	2.43	2.41
	$\Delta \Delta$ Ct	0.00	-1.37	-4.69	-2.95	5.38	-2.11	-1.97	-1.84	-1.02	-2.63	-2.50	-2.50	-1.99	0.02	-0.14	0.04	0.01
	relative difference	1.00	2.58	25.73	7.72	0.02	4.30	3.92	3.57	2.03	6.17	5.64	5.64	3.96	0.99	1.10	0.98	0.99

表4. 開発した遺伝子組換えパパイヤスクリーニング試験法を使用した実態調査結果

Sample name	Food product	Ingredient	Production country
A	leaf-tea	papaya leaf	India
B	dried food	a green papaya, papaya stem	Vietnam
C	canned food	papaya, suger, citric acid, perfume, propylane glycol	Indonesia
D	puree	papaya juice, suger	Colombia
E	fruits bowl	papaya, suger, lemon juice, sorbitol, antioxidant(V.C)	Vietnam

表5. パパイヤ加工食品を対象に実態調査を行った結果

	Detection method	Sample					
		A	B	C	D	E	SunUp
Ct value	Chy	22.86/22.95	23.58/23.41	41.79/41.26	23.71/23.71	22.24/22.31	24.63/24.98
	55-1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	26.22/25.75
	P35S	-/-	-/-	-/-	41.48/-	-/-	25.97/25.96
	T-nos	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	25.28/25.05
Δ Ct value	55-1-Chy	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1.18
	P35S-Chy	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1.16
	T-nos-Chy	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.36
Result		non GM	non GM	non GM	non GM	non GM	GM

N/A: not applicable

表6. これまでに開発された遺伝子組換えパパイヤのトランスジェニック構造配列一覧

Event name	Production country	Transgenic gene			Construct sequence			
		Type	PRSV strain	GenBank No.	P35S	TNOS	GUS	NPT II
55-1	Hawaii	PRSV-coat protein	HA5-1	S46722	○	○	○	○
63-1	Hawaii	PRSV-coat protein	HA5-1	S46722	○	○	×	○
X17-2	Florida	PRSV-coat protein	H1K	AF196839	○	○	×	○
PRSV-YK (16-0-1/17-0-5, 18-2-4)	Taiwan	PRSV-coat protein	YK	X97251	○	○	×	○
PRSV-SC	Thailand	PRSV-coat protein	Samut Sakhon SMK1	DQ085864	○	○	No information	○
Huanong No.1	China	PRSV-replicase	No information	FJ490192	○	○	×	○

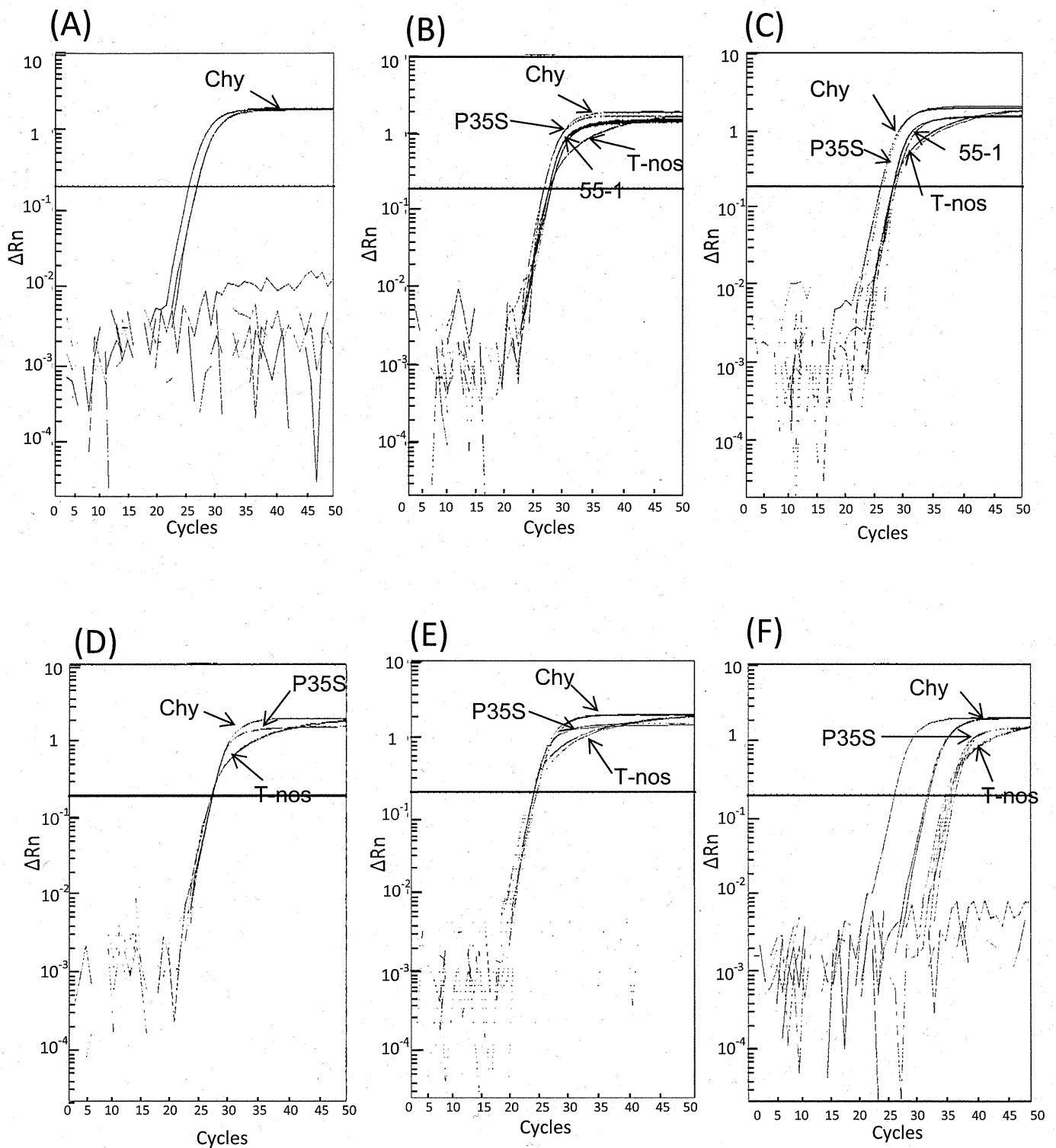


図1. 遺伝子組換えパパイヤのリアルタイムPCRスクリーニング検知法の増幅曲線
 パパイヤサンプル ([A] Sunset, [B] SunUp (the 55-1 homo cultivar), [C] Rainbow (the 55-1 hetero cultivar), [D] the PRSV-YK, [E] the PRSV-SC, [F] the Huanong No.1) より抽出・精製したDNA50 ngを鋳型に供した。Chy、P35S、T-nos 又は 55-1 検知試験用のリアルタイムPCRプライマープローブセットを使用した。

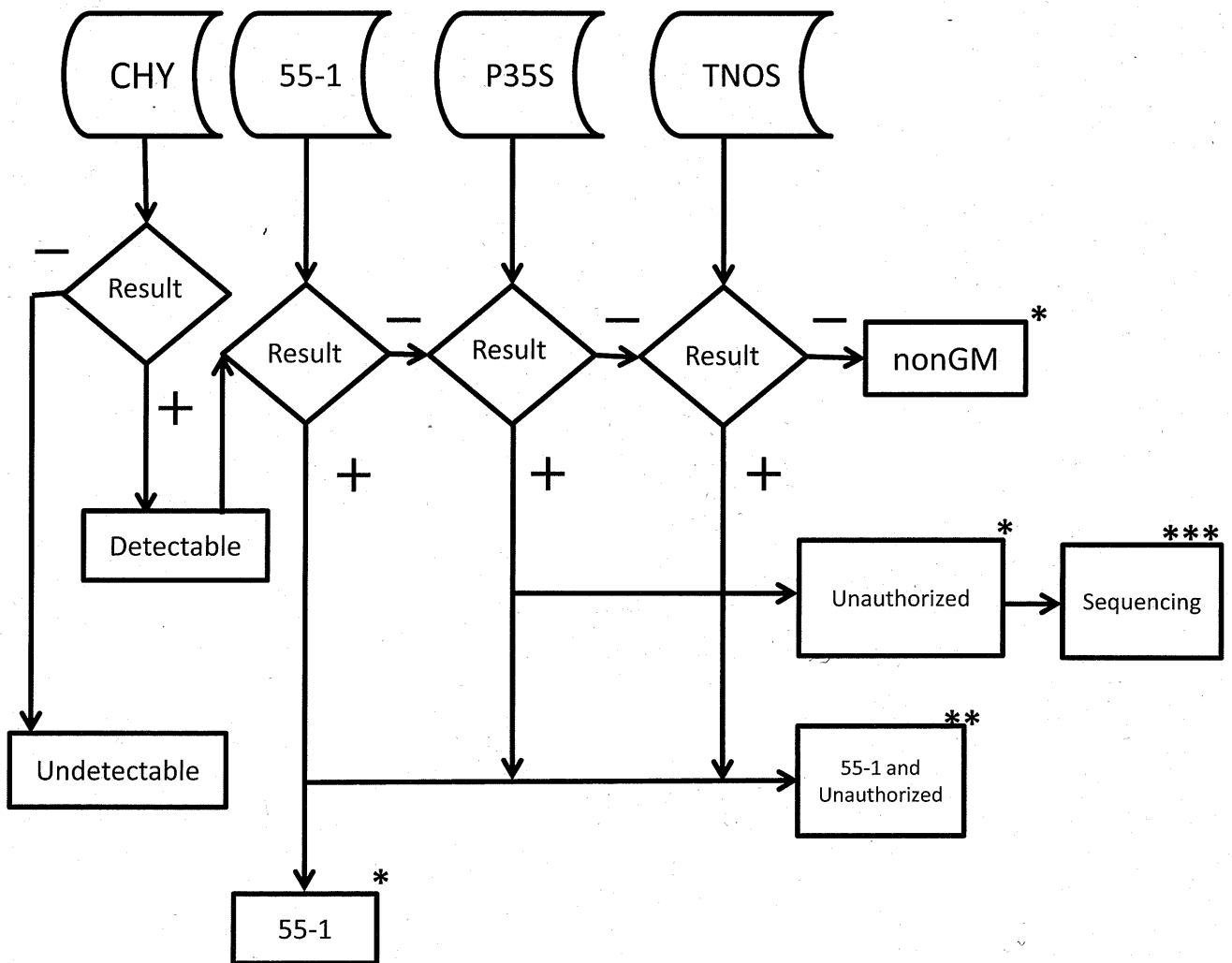


図2. 遺伝子組換えパイヤ検出のためのスクリーニング法スキーム

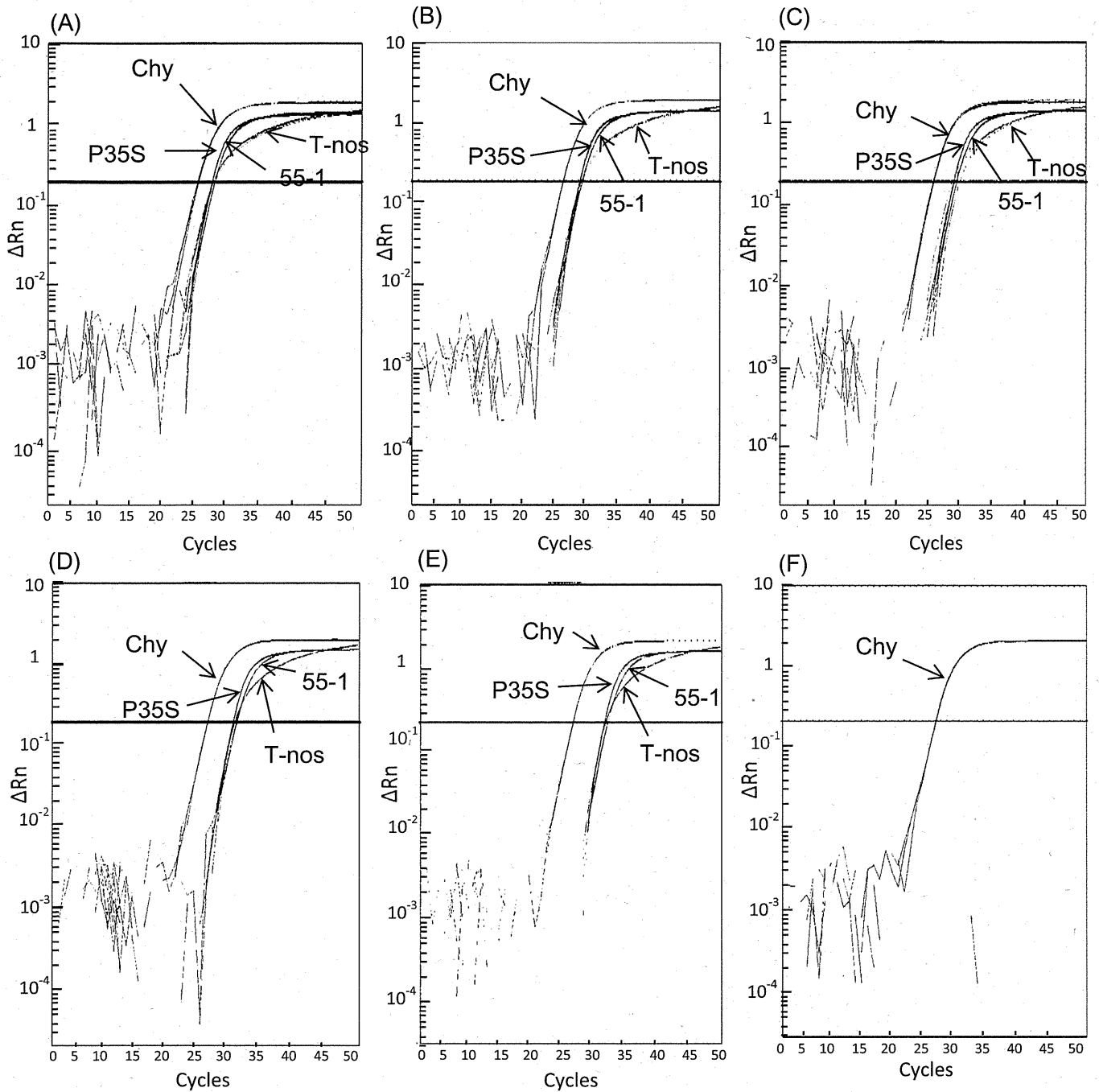


図3.リアルタイムPCRスクリーニングの増幅曲線

遺伝子組換えパパイヤRainbow品種より抽出精製したDNAを非遺伝子組換えパパイヤサンセット品種で(A) 100%、(B) 50%、(C) 25%、(D) 12.5%、(E) 6.25%、(F) 0%となるよう希釈した。50 ng DNAを試験の鋳型に供した。スクリーニング試験法には、Chy、P35S、T-nosと55-1 検知法を使用した。

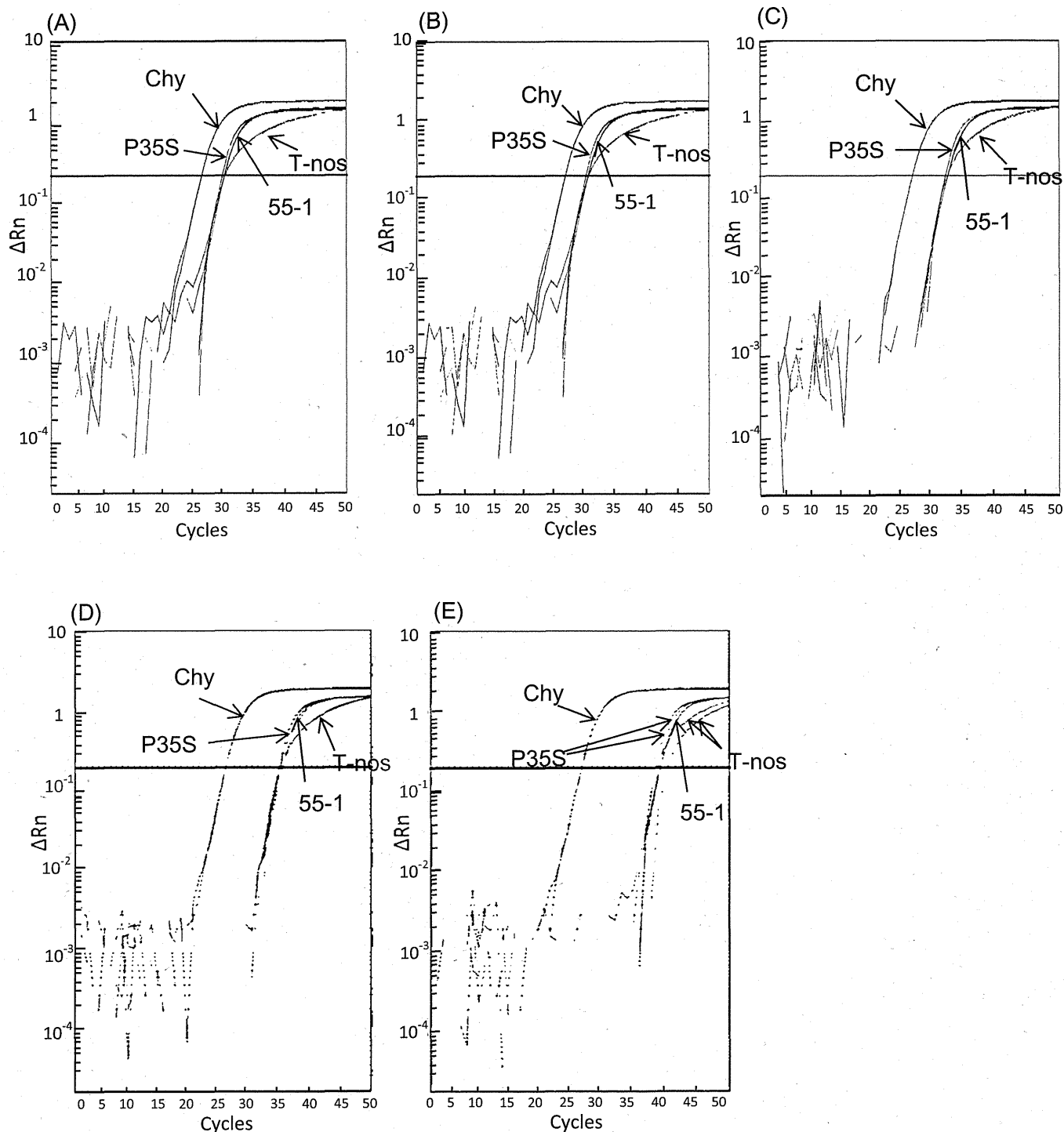


図4.リアルタイムPCRスクリーニングの増幅曲線

遺伝子組換えパパイヤSunUp品種より抽出精製したDNAを非遺伝子組換えパパイヤサンセット品種で(A) 25%, (B) 12.5%, (C) 6.25%, (D) 0.625%, (E) 0.0625% となるよう希釈した。50 ngDNAを試験の鑄型に供した。スクリーニング試験法には、Chy、P35S、T-nosと55-1 検知法を使用した。

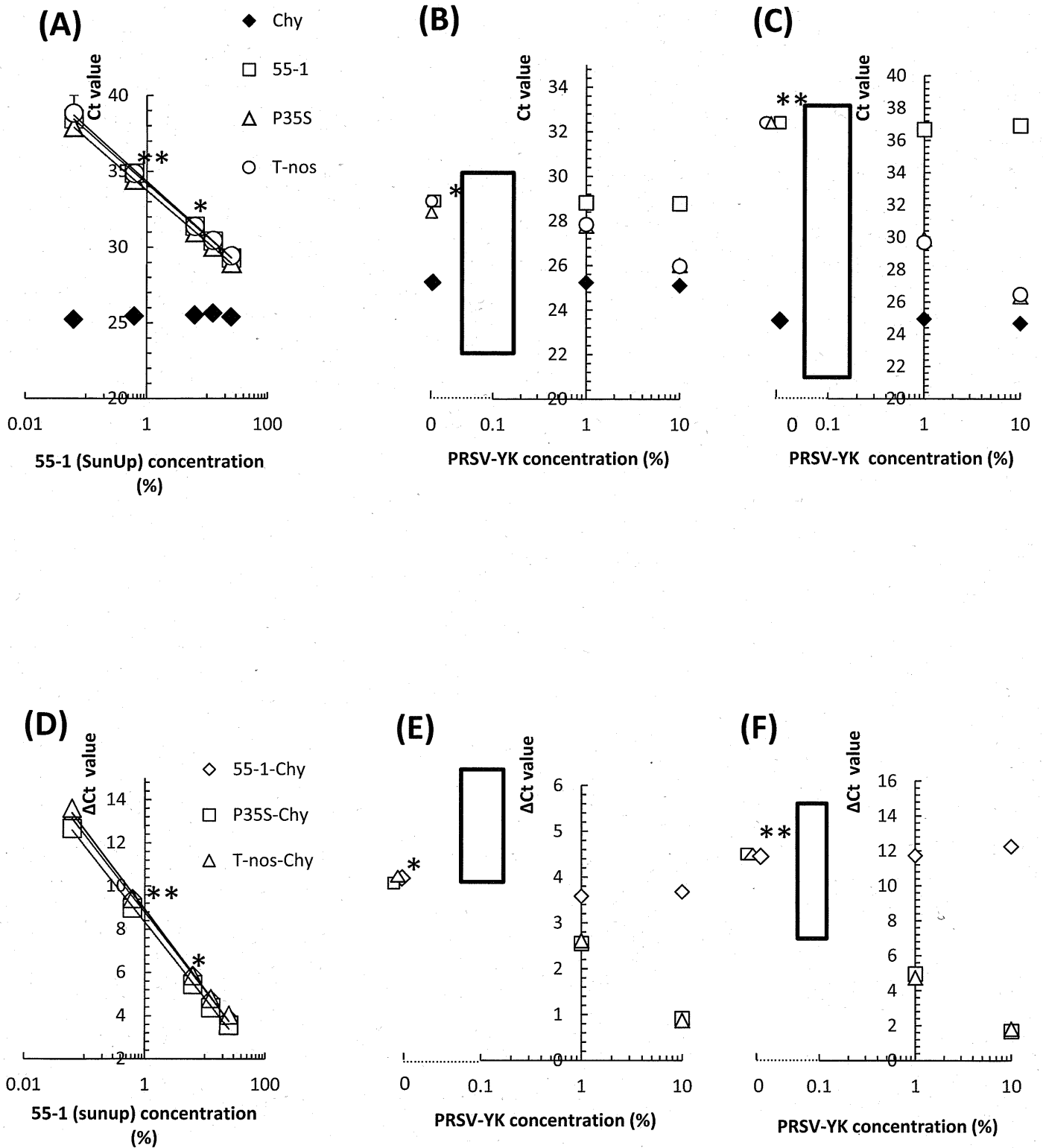


図5.リアルタイムPCRスクリーニングの増幅曲線

遺伝子組換えパイヤサンアップ品種より抽出精製したDNAを非遺伝子組換えパイヤサンセット品種で (B,E) 25%、(C,F) 0.1%となるよう希釈したサンプル、もしくは、(A,D)サンアップ品種100%のサンプルにPRSV-YK DNAを0~10% (B, C, E, F)添加して50 ng DNAを試験の鋳型に供した。スクリーニング試験法には、Chy、P35S、T-nosと55-1 検知法を使用した。

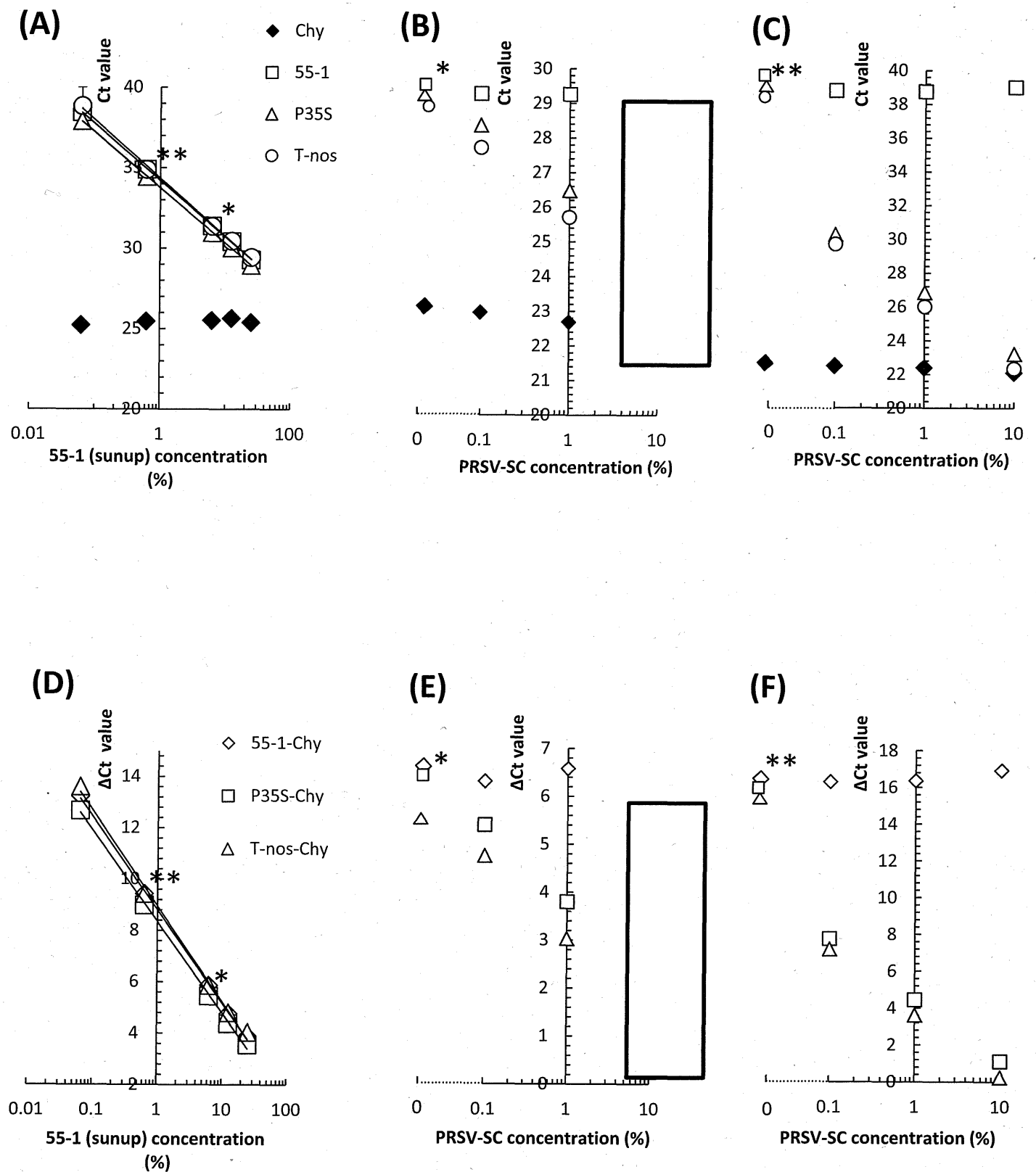


図6.リアルタイムPCRスクリーニングの増幅曲線

遺伝子組換えパパイヤサンアップ品種より抽出精製したDNAを非遺伝子組換えパパイヤサンセット品種で(B,E) 25%、又は、(C,F) 0.1%となるよう希釈したサンプル、もしくは、(A,D)サンアップ品種100%のサンプルにPRSV-SC DNAを0~10% (B, C, E, F)添加して50 ngDNAを試験の鋳型に供した。スクリーニング試験法には、Chy、P35S、T-nosと55-1 検知法を使用した。

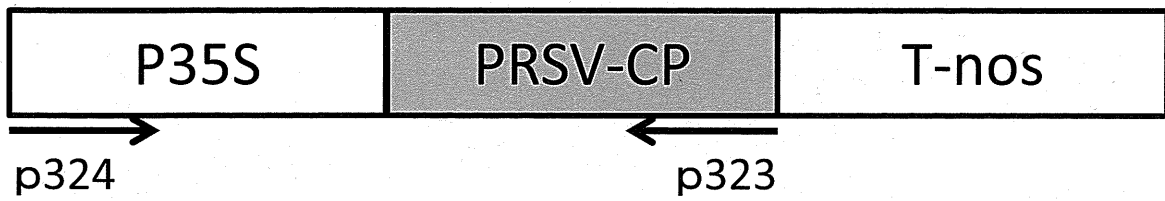


図7.PRSV-CPを含むトランスジェニック構造配列を検出する定性PCR試験用プライマー対のデザイン
P35S、カリフラワーモザイクウイルス35SRNAプロモーター;T-nos、ノパリンシンターゼターミネーター;
p324、フォワードプライマー;p325、リバースプライマー

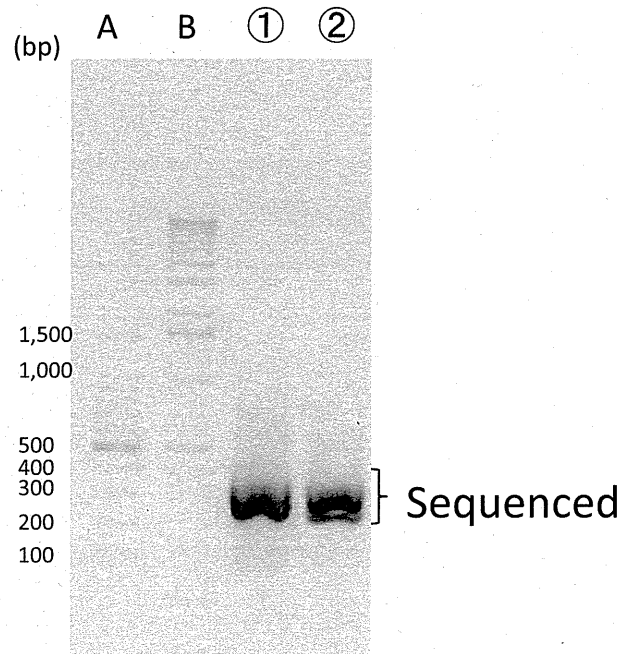


図8. 定性PCR法を使用して検出した遺伝子組換えパパイヤのトランスジェニック構造配列
 Lane A, 100 bp DNA ラダーマーカー; lane B, 1 kb DNA ラダーマーカー; lane ①, SunUp 100%; lane ②,
 SunUp 0.1% PRSV-SC 0.1%

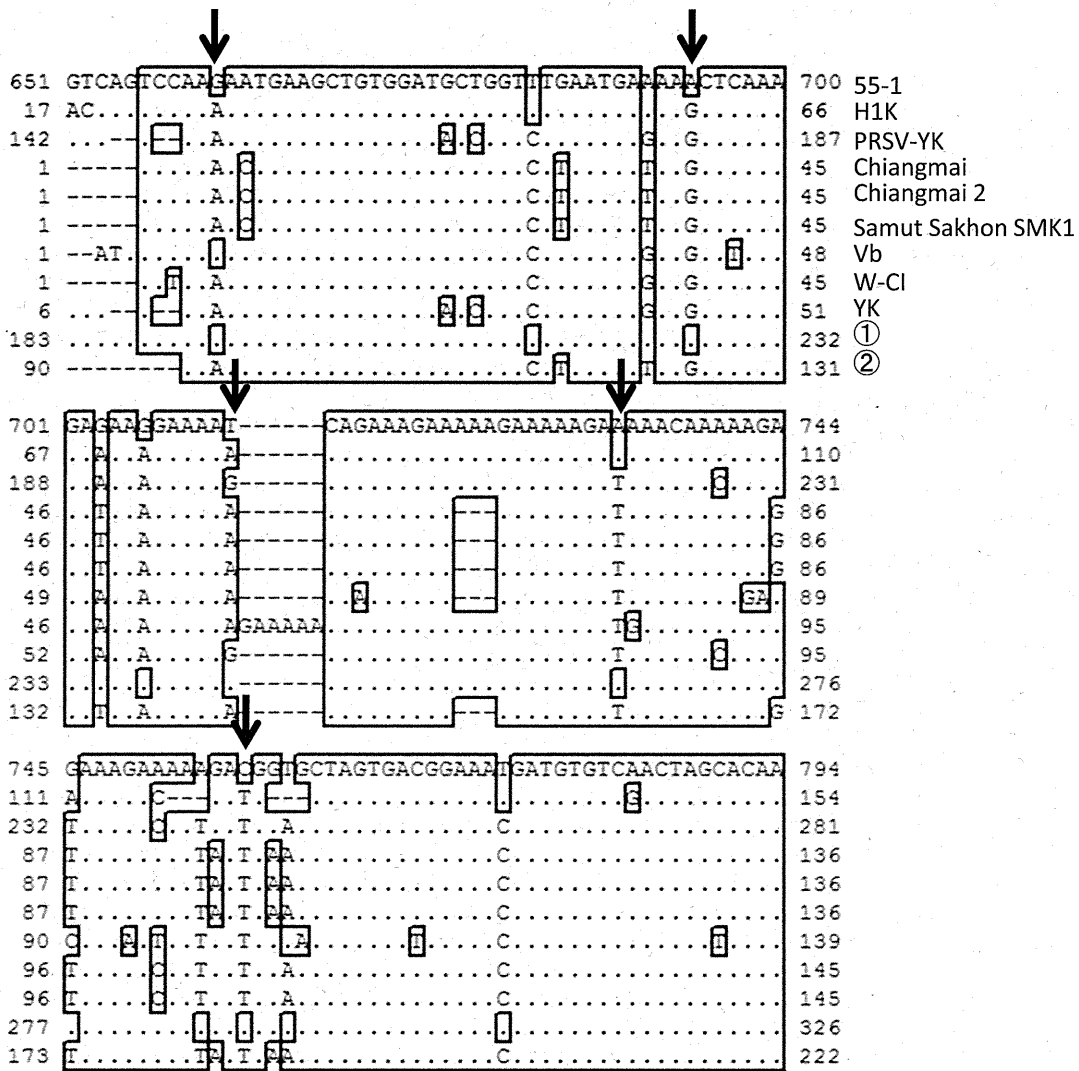


図9. 遺伝子組換えパパイヤPRSV-SCのトランスジェニック構造配列の相同配列検索結果
 塩基配列のアラインメントには、様々なPRSV株由来のPRSV-CP配列 (55-1 [Hawaii]; H1K [Florida];
 PRSV-YK [Taiwan]; Chianamai [Thailand]; Chiangmai2 [Thailand]; Samut Sakhon SMK1 [Thailand]; Vb
 [China]; W-CI [Taiwan]; YK [Taiwan]) をリファレンスに使用した。比較対象の試験試料サンプルから
 得られた配列 ① SunUp (100%)と ② SunUp (0.1%), PRSV-SC (0.1%), Sunset (99.8%)をリファレンスと
 アラインメントを行った。

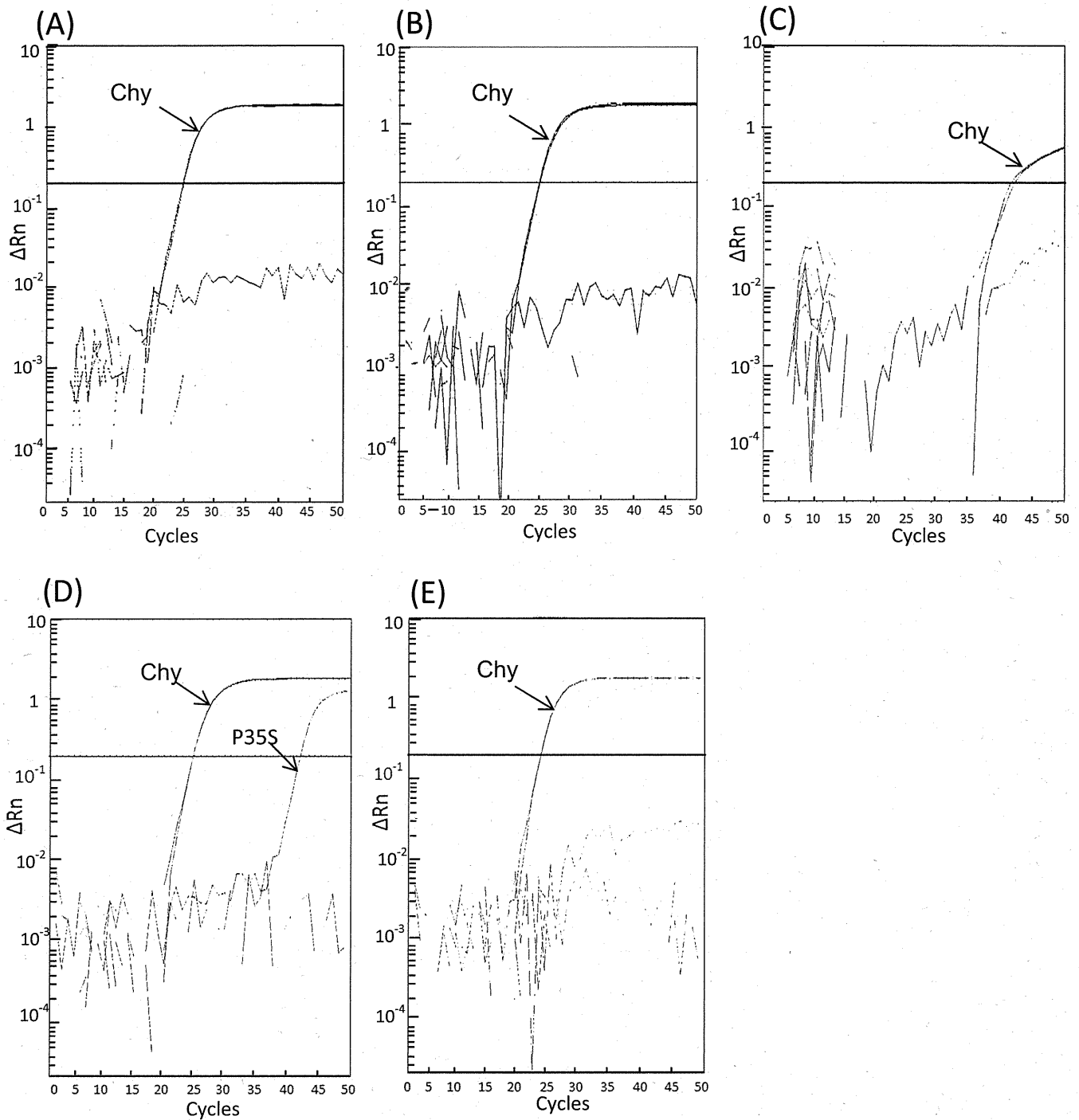


図10. 遺伝子組換えパパイヤスクリーニング試験法の実態調査の増幅曲線
 (A) パパイヤ茶、(B) 乾燥パパイヤ、(C) パパイヤ缶詰、(D) パパイヤピューレ、(E) 砂糖漬けパパイヤより抽出精製したDNAを鋳型にスクリーニング試験を行ったリアルタイムPCR増幅曲線を示す。

表 1 LAM-PCR に使用したプライマー

name	Sequence (5'-3')
<i>nptII</i>	
nptII-Rv-LTRI	[biotin]TGGATTCATCGACTGTGGCC
nptII-Rv-LTRII	[biotin]GGACCGCTATCAGGACATAG
nptII-Rv-LTRIII	TTGGCTACCCGTGATATTGC
nptII-Fw-LTRI	[biotin]ATATTTCGGCAAGCAGGCATC
nptII-Fw-LTRII	[biotin]GGGTCACGACGAGATCCTC
nptII-Fw-LTRIII	CTTGAGCCTGGCGAACAGT
<i>tetA</i>	
tetA-Rv-LTRI	[biotin]GCGGCTTCTATAACAACGTG
tetA-Rv-LTRII	[biotin]GAACGGGTGGGCATGGATT
tetA-Rv-LTRIII	CCTCTACTTGCTCTGCCTG
tetA-Fw-LTRI	[biotin]CACGTTGTTATAGAAGCCGC
tetA-Fw-LTRII	[biotin]TAGATCGCCGTGAAGAGGAG
tetA-Fw-LTRIII	ATCGAGGTCAGGCTGGTGA
<i>LC</i>	
LCI	GACCCGGGAGATCTGAATTC
LCII	AGTGGCACAGCAGTTAGG

A

GGATGATTGCCAGTTGGATTAACTCTTGCCCTTCCCGCATGAATAATATGATGAATGCATGCGTGAGGGGATTTTCGATTTGGCAATAGCTGCAATT
 GCCGGACATCCTCCAACGAGCATAATTCTTCAGAAAAATAGCGATGTTCCATGTTGTTCAGGGCATGCATGATGCACGTTATGAGGTGACGGTGTAGGC
 AGTATTCCTCAAAGTTTCATAGTCAGTATCATATTTCATTCATTCCATTCCTGCAAGAGAGAATTGAGACGCAATCCACACGCTGCGGCAACCTTCCGGCG
 TTCGTGGTCTATTTGCTCTGGACGTTGCAAAACCTAAGTGTGGATCGGGTGGCGAAGAAGTCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGC
 CGCGCTCCCGAAAACGATTCGGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGCGCGGTTGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGCGCTCGTTGGTGGTCTCAT

TTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGGATACCGTAAAGCAGGAGGAAGC

GGTCAGCCCATTCGCCCAAGCTCTTCAACAATATCACGGGTAGCCAACTGATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAA

TCCAAGAAAGCGGCCATTTCCACCATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGATGCGCGCTTGAGCCTG

GCGAACAGTTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTCCATCCGAGTACCTGCTCGCTCGATGCGAT

GTTTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGATCATAGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGAGCAAGGTG
 AGATGACAGGAGATCTGCCCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTC
 GTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTGCAGTTCATTAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACA
 GCCGGAACACGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCAATAGCCGAATAGCCCTTCCACCCAAAGCGGCGGAGAACCTGCCCAGGATCCG
 GCGGAAATAGGTAAGAAGTTCGGGATAAGGTAATTGCCATTGCAGATTTATTGGATTGAGAGTGAATATGAGACTTAATGGATACCGAGGGGAATT
 TATGGAACGTCAGTGGAGCAATTTTGACAAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTACCTTAGCCGACTTTTGAACGCGCAATAATGGTTTCTGACGTATGTG
 CTTAGCTCACTTAACTCCAGAACCCTCGGCTGAGTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAGTTCCAACGTAACCGGCTTGTCCCGGCTCATCGGC

図 1 LAM-PCR 増幅断片周辺の DNA 配列

(A) GM パパイヤ 55-1 系統に導入された遺伝子カセットの *nptII* 周辺配列. (B) GM パパイヤ 55-1 系統に導入された遺伝子カセット以外の *nptII* 部分配列の周辺配列. (C) GM パパイヤ 55-1 系統に導入された *tetA* 部分配列の周辺配列. 青字配列, ゲノム DNA 配列. 矢印ボックス, プライマーに用いた配列. ボックス, MseI サイト. 網掛け, HpyCH4IV サイト. B, biotin 修飾位置.

B

GGATGGGATTACTTCCTTGGTTTGTAACAAGTATTTTTCTTTCGTTAATACTACTATTCTGGATACGGTCATGGTACGGGGTATTTGGACTACAAGATTAA
 AATCAGATTCTAGAGCAAGATTTGATAAGTAGTAGTCAACAAATTGGAATTCATTTATCAACAGATTTTTTCTTCCATTTGAACACTATTTCGATAATTC
 TTTTAGTTGCTTTGATAGGTGCAATTGCTGTGGCTCGTCAGTAAGAAATCTTTATAATTAGAAAGCGGGGATACCGTAAAGCAGGAAAGCGGTGAGCC
 CATTCGCCGCCAAGCTCTTCA GCAATATCACGGGTAGCCAAACGCTATGTCTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAA
 AGCGGCCATTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATGCCCATGGGTCACGACGAGATCCTCCCGTCCGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAG
 TFCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAAGAAGGGTCCATAACTTCTATTCAAGCAGTTTATGTACCTGCGGATG
 ATTTGACCGACCCCTGCTCCTGCCACGACATTTGCACATTTAGATGCTACTACCGTACTATCAAGAGGATTAGCTGCAAAGGTATCTATCCGGCGGTAGA
 TCCTTTAGACTCAACGTCACATATGCTCCAACCTCGGATCGTTGGTGAGGAGCATTATGAAACCGCGCAAAGAGTTAAACAAACTTTACAACGTTATAAA

C

TAGCTTTAGTGTGTTGATCCGCCAATCCCGATGCCTACAGGAACCAATGTTCTCGGCCTGGCGTGGCTCGGCCCTGATCGGAGCGGGTTTAACTACTTCCT
 TTGGTTCCGGGGGATCTCGCGACTCGAACCTACAGTTGTTTCCTACTGGGCTTCTCAGCCCGGGGACCCCGTGTGCTAGGATGGTTGTTCTGGAT
 CAGACGCTGAGTGCCTTCAAATCATCGCGCTCTGCTCGTGTGATCGGGAGTATCTGGCTGGGCCAACGTTCCACCCGCACTCCTAGGGCGGTATAGCTT
 GCGGAAAGTGCCTTGACCCCGCATGGCATAGGCCATCGTTTCCAGATCAGCGATCGGCTCGTTGCCCTGCGCGCTCAAAGCCCGGACGCGAGCGCC
 GGTAGGACAGCAAGTAGAGGCAGCGCCTGCATCCATGCCACCCGTTCCACGTTGTTATAGAAGCCGATAGATCGCCGTGAAGAGGAGGGTCCGA
 CGATCGAGGTCAGGCTGGTGAACGCCCGCAGTGAGCCTTGCAGCTGCCCTGACGTTCTCCATCCACTGGTGCATTGCAAACGCTAGGGCCTTGTTAGG
 TCAGTTCCAGCTGGGGTTTCAGCAGCCAACGCTTTACTGGCATTTCAGGAACAAGCGGGCACTGCTCGACGCACCTTGCCTCGCTCAGTATCGCTCGGGAC
 GCACGGCGCGCTCTACGAACCTGCCGATAAACAGAGGATTTAAATTGACAATTGTGATTAAGGCTCAGATTCGACGGCTTGGAGCGCCGACGTCAGGAT

図1 LAM-PCR 増幅断片周辺の DNA 配列 (続き)

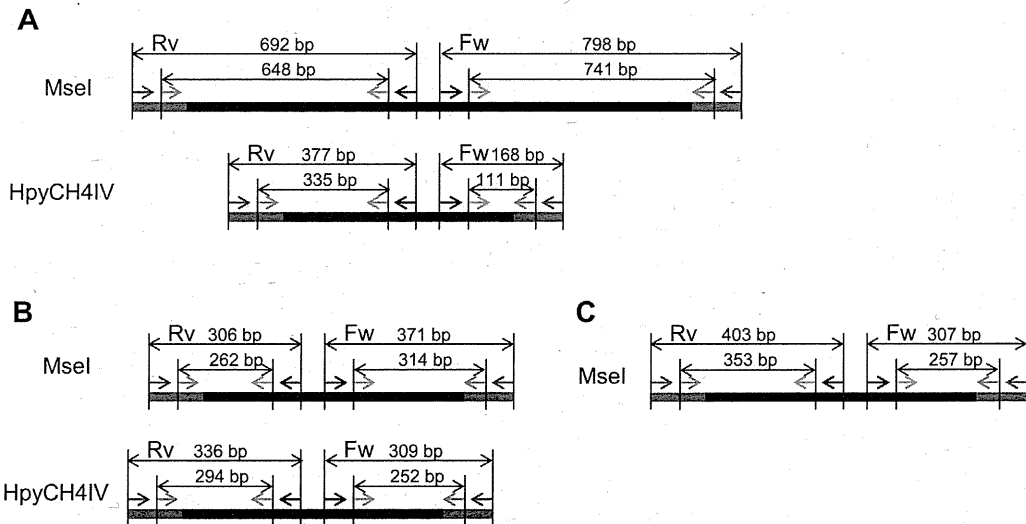


図2 LAM-PCR 増幅断片の模式図

(A) GM パパイヤ 55-1 系統に導入された遺伝子カセットの *nptII* 周辺配列. (B) GM パパイヤ 55-1 系統に導入された遺伝子カセット以外の *nptII* 部分配列の周辺配列. (C) GM パパイヤ 55-1 系統に導入された *tetA* 部分配列の周辺配列. 黒ボックス, LAM-PCR 増幅断片. 赤ボックス, リンカーカセット. 青矢印, primer LTII. 水色矢印, primer LTIII. 赤矢印, primer LCI. 桃色矢印, primer LCII.

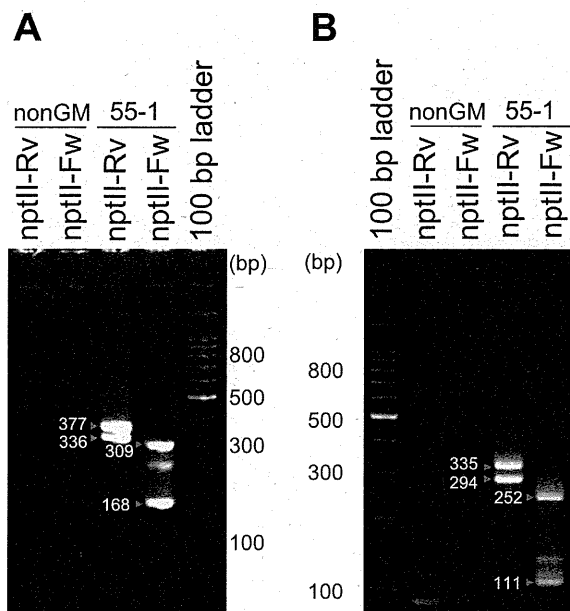


図3 HpyCH4IV 反応系の LAM-PCR 増幅断片のアガロース電気泳動解析

(A) 1st Nested PCR. (B) 2nd Nested PCR. 赤矢印, 予想された増幅バンド. 写真内の数字, 増幅断片の予想サイズ.

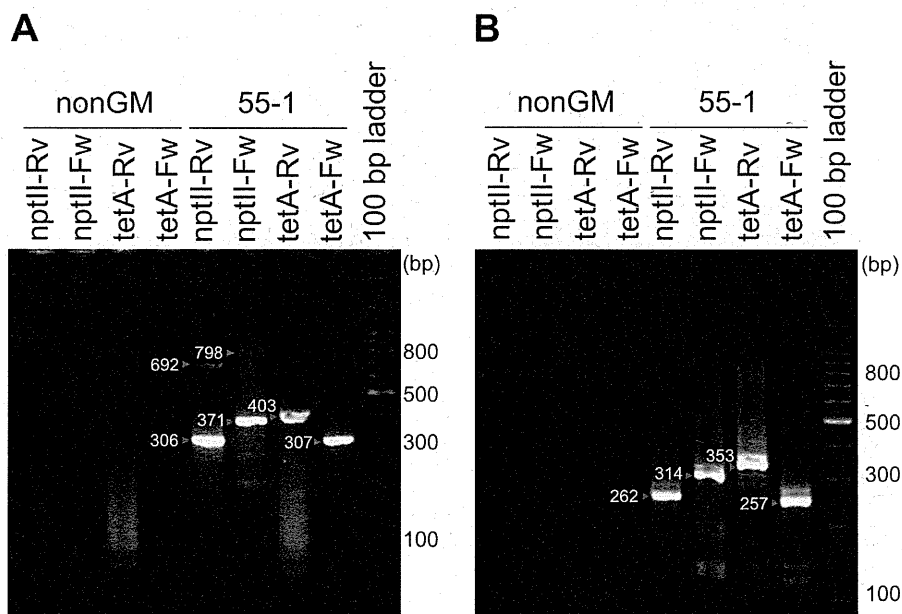


図4 MseI 反応系の LAM-PCR 増幅断片のアガロース電気泳動解析

(A) 1st Nested PCR. (B) 2nd Nested PCR. 赤矢印, 予想された増幅バンド. 写真内の数字, 増幅断片の予想サイズ.

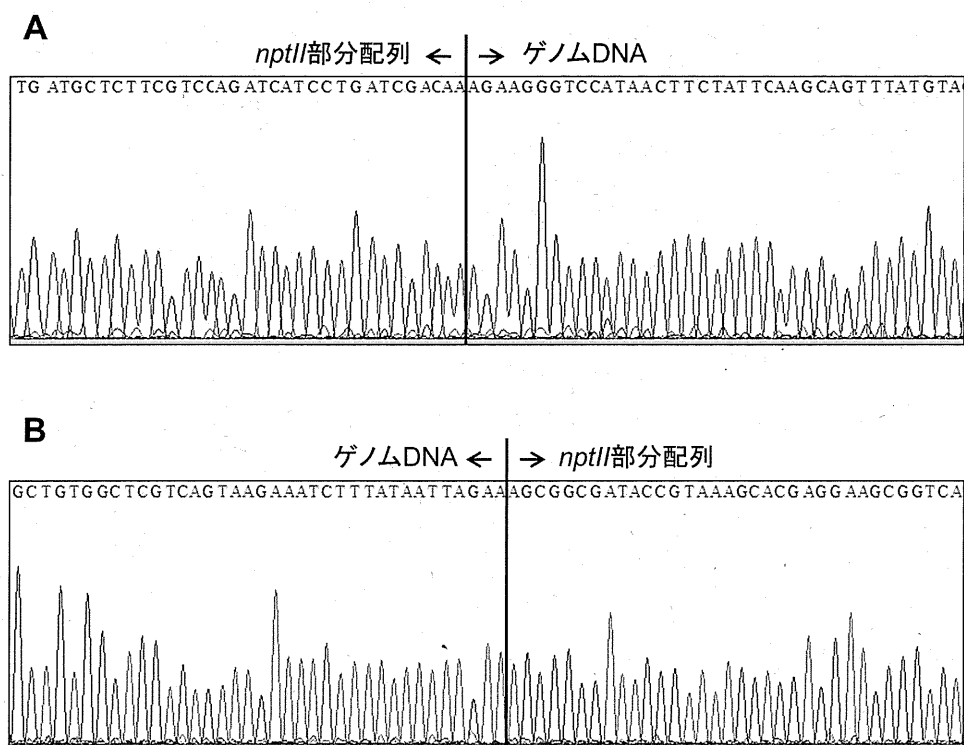


図5 HpyCH4IV 反応系の LAM-PCR 増幅断片におけるゲノムとの境界領域のシーケンス解析結果
 (A) 1st Nested PCR の Fw 方向増幅断片(309 bp). (B) 1st Nested PCR の Rv 方向増幅断片(336 bp).