

201522047A

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

遺伝子組換え作物由来のRNAi産物の
安全性評価法確立に向けた検出技術の開発

平成27年度 総括研究報告書
(H27-食品-若手-019)

研究代表者 野口 秋雄

平成28(2016)年 5月

目 次

I. 総括研究報告 遺伝子組換え作物由来のRNAi産物の 安全性評価法確立に向けた検出技術の開発 野口 秋雄	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19

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）
「遺伝子組換え作物由来の RNAi 産物の安全性評価法確立に向けた検出技術の開発」
総括研究報告書

研究代表者 野口 秋雄 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

研究要旨：

近年 RNA 干渉 (RNAi) 技術を利用した害虫抵抗性の遺伝子組換え (GM) 作物の開発が進んでいる。このような GM 作物は従来の GM 作物とは異なり新たなタンパク質を産生しないため、アレルギー性評価は不要であり、そのような点からは安全性が高いと考えられる。これらの GM 作物について開発状況等の知見の収集のため、文献調査を行った結果、19 の開発報告があることが判明した。また、現在までの知見においては、影響はないと考えられるが、摂食した RNAi 産物の影響についての評価が必要であるとしている文献も見られた。このため、動物実験等において、RNAi 産物が体内に取り込まれていないことを確認する手段として、RNAi 産物の検出法を開発を行った。

検出法の開発においては、最も実用化が近いと考えられる害虫抵抗性トウモロコシ MON87411 系統をモデルとして用い、産生されると予想される RNAi 産物候補を対象として検出技術を開発した。本研究で開発した検出技術は、従来の方法とは異なり、数塩基鎖長が異なる複数の RNAi 産物を一つのアッセイ系で検出できた。さらに、検量線を必要とせず定量が可能なデジタル PCR へ本検出系を適用することができれば、将来的にはより高感度な定量が可能になると考えられた。また、本検出法については、安全性未審査の RNAi 技術応用作物の検出法として応用できる可能性もある。

A. 研究目的

近年 RNA 干渉 (RNAi) 技術を利用した害虫抵抗性の遺伝子組換え (GM) 作物の開発が進んでいる。これらの GM 作物は、害虫の生存に必要な遺伝子に相同性がある二本鎖 RNA (dsRNA) を産生する。これらの dsRNA を害虫が経口摂取すると、体内に取り込まれた dsRNA は分解酵素である Dicer によって切断され低分子干渉 RNA (siRNA) が形成される。siRNA は数種のタンパク質と結合し RNA-タンパク質複合体 (RISC) となり、標的遺伝子の mRNA を分解することで害虫に対し殺虫活性をもたらす。RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物は、従来の GM 作物とは異なり新たなタンパク質を産生しないので、アレルギー性評価は不要と考えられる。また、元来ヒトを含めた脊椎動物は食物に含まれる外来 RNA を経口摂取しても、その活性を妨げる障壁を持っていると考えられており、産生される新たな RNAi 産物(本研究では RNAi 技術を利用した GM

作物の dsRNA から産生される RNA を総称してこう呼ぶことにする) についても、現在までの知見においてはリスクは低いと考えられる¹⁾⁻⁵⁾。一方で、RNAi 産物を摂食した影響についての評価が必要であるとしている文献も見られた⁶⁾⁻⁷⁾。そのため、本研究では動物実験等において、摂取された RNAi 産物が消化されずにそのまま体内に取り込まれていないことを確認することが必要となった場合に備え、RNAi 産物を検出できる手法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1. 検出対象とする配列の検討

本研究の検出法の対象とする RNAi 産物として、ヒトの遺伝子に相同性のある配列を持つものとした。報告されている RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物の中で、最も実用化が近いと考えられる害虫抵抗性トウモロコシ MON87411 系統をモデルとし、産生される dsRNA (DvSnf7) から、ヒトの遺伝

子に対して配列相同性のある RNAi 産物候補を検索した。

まず、1 断片を 30 塩基長とし、互いに 20 塩基長のオーバーラップが生じるように DvSnf7 dsRNA を分割し、それぞれを DvSnf_1-30~DvSnf_211-240 と命名した (図 1)。次に、これらの断片をクエリーにして、ヒトの遺伝子に対し相同性検索を行った。この際、100%の相同性を持つ配列に加え、ある程度の相同性を持つ配列についても検索を行った。検索の条件として、RNAi 産物候補の seed 領域 (5'末端側 2~8 番目の塩基) が完全マッチし、ハイブリット形成の最小自由エネルギー (MFE) が -17 kcal/mol 以下である ORF または UTR 配列を選び出した。

B-2. オリゴヌクレオチドの合成

3'末端をメチル化修飾した合成 RNA (植物由来 miRNA は植物体内でこのような修飾がなされる⁸⁾) は株式会社ファスマックから購入した。プライマーは、株式会社ファスマックあるいは Eurofins Genomics 社から、プローブは Thermo Fisher Scientific 社から購入した。

B-3. リアルタイム RT-PCR

逆転写 (RT) 反応は、TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。プライマーとしては表 1 および図 2 に示す loop primer を用いた。RT 反応液の組成は以下の通りである。10×Transcription Buffer 0.75 μL, 100 mM dNTPs (with dTTP) 0.075 μL, 20 U/μL RNase Inhibitor 0.095 μL, 50 U/μL MultiScribe Reverse Transcriptase 0.075 μL, 375 nM loop primer 1 μL (終濃度 50 μM) を混合し、RNA 試料液またはブランク試料液 (RNase-free 水) 1 μL を添加し、RNase-free 水で全量 7.5 μL に調製した。反応は GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用い、16°C で 30 分間、42°C で 30 分間反応を行い、85°C で 5 分間処理することで反応を停止した。

リアルタイム PCR は、表 1 および図 3 に示すプライマーおよびプローブを用い、リアルタイム PCR 機器として LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を用いて実施した。PCR 用反応液の組成は以下の通りで

ある。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 5 μL, 1.5 μM DvSnf48-68A_F, 0.7 μM miR-Rv, 0.2 μM probe を混合し、cDNA 試料液 1 μL を添加し、滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応条件は以下の通りである。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、40 または 45 サイクルの増幅反応を行った。各 cDNA 試料液あたり 3 併行で反応を行い、平均 C_q 値を求めた。

B-4. 検出法の評価

検出限界の算出は、合成 RNA 希釈系列 (200~6.4K copies/well) を用いて、1 濃度につき 21 回の試験を行い、95%以上の陽性率を示す最低濃度を検出限界とした。定量性の評価は、合成 RNA 希釈系列 (1K~10M copies/well) を用いて行った。

C. 研究結果

C-1. RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物の開発状況の調査

RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物の開発状況について、文献調査を行った結果、表 2 に示すように 19 の報告があった。このうち、主要作物としてはトウモロコシ 2 報、イネ 2 報、ワタ 2 報、コムギ 1 報、オオムギ 1 報、ジャガイモ 1 報が報告されており、モデル植物としてはタバコおよびその近縁種 8 報、シロイヌナズナ 6 報が報告されている (1 報中で複数 GM 植物の作製が報告されているものもある)。

C-2. 検出対象とする配列情報の検索

害虫抵抗性トウモロコシ MON87411 系統について、ヒトの遺伝子に相同性のある配列情報を検索した。この系統が生産する dsRNA は、トウモロコシ害虫の 1 つである western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) の DvSnf7 をターゲットとしている。DvSnf7 はオートファジー経路に関与する ESCRT-III 複合体の一部を構成するタンパク質をコードしており、低濃度の dsRNA によって殺虫効果を示すことが知られている⁹⁾⁻¹²⁾。RNAi 産物として機能する 21 塩基長の配列を検索する際、dsRNA の配

列情報から産生される全ての配列を検索するのが最も単純な方法であるが、公開されている DvSnf7 dsRNA は 240 塩基長であるため⁹⁾、合計 220 配列を検索する必要がある。そこで、検索操作を簡便化するため、DvSnf7 dsRNA を DvSnf_1-30 ~ DvSnf_211-240 に分割し (計 22 配列, 図 1)、ヒトの遺伝子に対して配列相同性がある RNAi 産物候補を検索した。その結果、ヒトの ORF または UTR 配列に対し 100%の相同性を示す 21 塩基長の RNAi 産物候補は見つからなかった。一方で、ある程度の相同性を持つ配列候補としては 35 配列が見つかった (表 3 および表 4)。

C-3. 検出法の構築

DvSnf7 dsRNA から産生され、ヒトの遺伝子に配列相同性のある RNAi 産物候補 (DvSnf_48-68A) に関して、loop primer を用いたリアルタイム RT-PCR による検出法の構築を行った。RNAi 産物としては 21~25 塩基長のものであることが知られているが、これを考慮すると 3'末端の長さが異なる DvSnf_48-68A ~ DvSnf_44-68A が RNAi 産物候補として挙げられる (図 4)。

まず、個々の RNAi 産物候補に対する検出法 (図 5A) を構築することにした。既報の方法¹³⁾を参考にして、表 1 に示す loop primer ならびにプライマーおよびプローブを設計し、合成 RNA (100, 10K, 10M copies/well) を用いてリアルタイム RT-PCR を行った。その結果、全てのアッセイ系において 10K および 10M copies/well 合成 RNA を 3 併行とも検出することができた (図 6)。DvSnf_45-68A アッセイ系では、100 copies/well 合成 RNA を 3 併行とも検出することができたが、その他のアッセイ系では 3 併行とも検出できたものはなかった (図 6)。なお、ブランク試料液に対しては全てのアッセイ系において増幅曲線は観察されなかった。

次に、構築した各アッセイ系を用いて各 RNAi 産物候補 (10M copies/well) に対する反応性を比較した。その結果、DvSnf_48-68A アッセイ系を用いた場合、平均 C_q 値が若干高くなったが (1.4~5.5)、RNA の 3'末端でオーバーラップが生じる DvSnf_47-68A

~DvSnf_44-68A (図 5B) を検出することができた (図 7)。同様に、DvSnf_47-68A アッセイ系を用いた場合、DvSnf_46-68A~DvSnf_44-68A を検出することができた。しかし、loop primer と RNA のアニーリング塩基対長が短くなる DvSnf_48-68A (DvSnf_46-68A ~ DvSnf_44-68A では 6 塩基、DvSnf_48-68A では 5 塩基、図 5C) に対しては平均 C_q 値が著しく増加し (8.2)、他の検出系でも同様の結果であった (3~19.8, 図 7)。以上の結果から、DvSnf_48-68A アッセイ系を用いることで、5 種類全ての RNAi 産物候補 (DvSnf_48-68A ~ DvSnf_44-68A) を検出できることが示唆された。

続いて、DvSnf_48-68A アッセイ系の最適化を試みた。loop primer については、アニーリング塩基対長および濃度、リアルタイム PCR の forward primer については、アニーリング塩基対長の検討を行った。アニーリング塩基対長の検討では、鋳型に 1K copies/well DvSnf_48-68A~DvSnf_44-68A を、濃度の検討では鋳型に 1K copies/well DvSnf_48-68A を用いた。その結果、loop primer としてはアニーリング塩基対長が 7 塩基である DvSnf48-68A_RT2 (表 1) は、6 塩基である DvSnf48-68A_RT に比べて 3 併行での検出数が多く、平均 C_q 値が低かった (図 8)。また、DvSnf48-68A_RT2 の濃度として終濃度 17, 33, 50 μ M で検討した結果、終濃度 50 μ M にて最も低い平均 C_q 値が得られた (図 9)。以上の結果から、loop primer としては終濃度 50 μ M で DvSnf48-68A_RT2 を用いる条件が最適であることが示唆された。一方、リアルタイム PCR の forward primer としてはアニーリング塩基対長が 17 塩基である DvSnf48-68A_F2 にて 3 併行での検出数が最も多く、平均 C_q 値が最も低かった (図 8)。続いてアニーリング塩基対長が 16 塩基である DvSnf48-68A_F、15 塩基である DvSnf48-68A_F3 と反応性が低下した (図 8)。しかし、DvSnf48-68A_F2 を用いた場合には、ブランク試料液に対して非特異的な増幅が観察された (図 10A)。一方で、DvSnf48-68A_F および DvSnf48-68A_F3 ではブランク試料液に対して非特異的な増幅は観察されなかった (図 10B, C)。以上の結果から、リアル

タイム PCR の forward primer としては DvSnf48-68A_F が最適であることが示唆された。

最後に、本検出法の検出限界と定量性を評価した。その結果、検出限界は DvSnf_48-68A および DvSnf_47-68A に対しては 800 copies/well、DvSnf_46-68A に対しては 1.6K copies/well、DvSnf_45-68A および DvSnf_44-68A に対しては 6.4K copies/well であった (表 5)。また、横軸に RNA コピー数の対数、縦軸に C_q 値をプロットしたところ、DvSnf_48-68A ($R^2 = 0.997$)、DvSnf_47-68A ($R^2 = 0.999$) および DvSnf_46-68A ($R^2 = 0.999$) に対しては 1K~10M copies/well、DvSnf_45-68A ($R^2 = 0.994$) および DvSnf_44-68A ($R^2 = 0.993$) に対しては 10K~10M copies/well の範囲で高い直線性を示し、十分な定量性が確認された (図 11)。

D. 考察

一般的にヒトを含めた哺乳類において、miRNA は通常体内に存在しており、産生した細胞自体や他の細胞の遺伝子発現の制御を行ったりすることが知られている¹⁴⁾⁻¹⁹⁾。がん²⁰⁾、心血管疾患²¹⁾、神経変性疾患²²⁾、精神疾患²³⁾、慢性炎症性疾患²⁴⁾などの発症と進行に関わっており、miRNA は核酸医薬品や診断のためのバイオマーカーへの応用が期待されている。一方で、線虫-細菌、昆虫-細菌、昆虫-植物、菌類-植物などの異種生物間における低分子 RNA を用いたコミュニケーションが報告されており、このような現象を利用した応用研究もなされている^{25), 26)}。なかでも RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物は近年開発が進んでいる。開発状況を調査した結果、現在までに 19 の報告があり、その約半数はトウモロコシなどの主要作物で、将来実用化される可能性が考えられる。最も実用化が近いと考えられる害虫抵抗性トウモロコシ MON87411 系統から産生されると予想される RNAi 産物において、ヒトの ORF または UTR 配列に対し 100%の相同性を示す産物候補は見つからなかった。ある程度の相同性を有する RNAi 産物候補としては 35 配列が見つかった。現時点での知見からは、哺乳類において、摂食された外

来性の RNAi 産物が分解されずに体内に吸収され、内在性の miRNA のように血中を循環する可能性は低いと考えられる¹⁾⁻⁴⁾。ただし、将来的に動物実験等にて RNAi 産物を摂食した際に分解されずにそのまま取り込まれることがないことを示すことが必要となった場合に備えて、検出法を開発することは有用と考えられる。

検出法開発においては、血中あるいは組織中の RNAi 産物量を測定することを想定した。なぜならば、哺乳類の内在性 miRNA は数百コピー/cell で機能することが報告されており²⁷⁾、生体中の RNAi 産物量がこのレベルに達しているかどうかを判定する必要があるからである。本研究では、MON87411 系統から産生され、ヒトの遺伝子に配列相同性のある RNAi 産物候補の一つである DvSnf_48-68A および 3' 末端の長さが異なる DvSnf_47-68A~DvSnf_44-68A に対する検出法の構築を行った。まず、個々の RNAi 産物候補に対するアッセイ系を構築した。これらのアッセイ系を用いて各 RNAi 産物候補への反応性を検討した結果、RNA の 3' 末端でオーバーラップが生じる組み合わせでは反応性が若干落ちる程度であったが、loop primer と RNA がアニーリングする塩基対長が短くなる組み合わせでは反応性が著しく低下した。以上の結果から、RT 反応の効率性は loop primer と RNA がアニーリングする塩基対長に大きく依存することが明らかになった。DvSnf_48-68A アッセイ系を用いることで DvSnf_48-68A~DvSnf_44-68A 全てを検出することが可能であったが、その際の検出感度は動物の血清中の miRNA (数 fM~数十 fM) を検出するには十分であった。また、十分な定量性を示したことから、合成した DvSnf_48-68A~DvSnf_44-68A を検量線として用いることで、生体試料における大まかな定量も可能であると考えられる。さらに、本研究の手法を用いれば、他のターゲットについても同様の検出系を構築できると考えられる。また、検量線を必要とせず定量が可能なデジタル PCR へ本検出系を適用することができれば、将来的にはより高感度な定量が可能になると考えられる。

E. 結論

RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物に関して 19 の開発報告があった。最も実用化が近いと考えられる GM 作物をモデルとして用い、産生されると予想される RNAi 産物に対する検出技術を開発した。本検出技術は数塩基鎖長が異なる複数の RNAi 産物を一つのアッセイ系で検出でき、生体試料における大まかな濃度を推定できると考えられる。将来的には、より高感度な定量が可能なデジタル PCR への適用が期待される。また、安全性未審査の RNAi 技術応用作物の検知法として応用できる可能性についても今後検討を行っていききたい。

【参考文献】

- 1) Witwer, K.W. and Hirschi, K. D. (2014) Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: Concepts in search of corroboration. *Bioessays*, **36**, 394-406
- 2) Zhang, Y., Wiggins, B.E., Lawrence, C., Petrick, J., Ivashuta, S. and Heck, G. (2012) Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics.*, **13**, 381
- 3) Dickinson, B., Zhang, Y., Petrick, J.S., Heck, G., Ivashuta, S. and Marshall, W.S. (2013) Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 965-967
- 4) Witwer, K.W., McAlexander, M.A., Queen, S.E. and Adams, R.J. (2013) Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA Biol.*, **10**, 1080-1086
- 5) Snow, J.W., Hale, A.E., Isaacs, S.K., Baggish, A.L. and Chan, S.Y. (2013) Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biol.*, **10**, 1107-1116
- 6) Roberts, A. F., Devos, Y., Lemgo, G. N. and Zhou, X. (2015) Biosafety research for non-target organism risk assessment of RNAi-based GE plants. *Front. Plant Sci.*, **6**, 958
- 7) Cottrill, K. A. and Chan, S. Y. (2014) Diet-Derived MicroRNAs: Separating the Dream from Reality. *microRNA Diagn*, **1**, 46-57
- 8) Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R. and Chen, X. (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, **307**, 932-935
- 9) Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G. and Segers, G. (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PloS ONE*, **7**, e47534
- 10) Ramaseshadri, P., Segers, G., Flannagan, R., Wiggins, E., Clinton, W., Ilagan, O., McNulty, B., Clark, T. and Bolognesi, R. (2013) Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of Snf7 orthologue in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. *PloS ONE*, **8**, e54270
- 11) Armstrong, T.A., Chen, H., Ziegler, T.E., Iyadurai, K.R., Gao, A.G., Wang, Y., Song, Z., Tian, Q., Zhang, Q., Ward, J.M., Segers, G.C., Heck, G.R. and Staub, J.M. (2013) Quantification of transgene-derived double-stranded RNA in plants using the QuantiGene nucleic acid detection platform. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 12557-12564
- 12) Koči, J., Ramaseshadri, P., Bolognesi, R., Segers, G., Flannagan, R. and Park, Y. (2014) Ultrastructural changes caused by Snf7 RNAi in larval enterocytes of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte). *PloS ONE*, **9**, e83985
- 13) Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J. and Guegler, K.J. (2005) Real-time

- quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic. Acids Res.*, **33**, e179
- 14) Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T. Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M. and Breakefield, X.O. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1470-1476
- 15) Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J. and Lötvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654-659
- 16) Collino, F., Deregibus, M.C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C. and Camussi, G. (2010) Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS ONE*, **5**, e11803
- 17) Meckes, D.G. Jr., Shair, K.H., Marquitz, A.R., Kung, C.P., Edwards, R.H. and Raab-Traub, N. (2010) Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 20370-20375
- 18) Ogawa, R., Tanaka, C., Sato, M., Nagasaki, H., Sugimura, K., Okumura, K., Nakagawa, Y. and Aoki, N. (2010) Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **398**, 723-729
- 19) Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T. and Middeldorp, J.M. (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 6328-6333
- 20) Michael, T.M. (2003) MicroRNAs and cancer. *Semin. Cancer Biol.*, **13**, 253-258
- 21) Wisløff, U., Najjar, S.M., Ellingsen, O., Haram, P.M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernström, M., Rezaei, K., Lee, S.J., Koch, L.G. and Britton, S.L. (2005) Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, **307**, 418-420
- 22) Kinoshita, C., Aoyama, K., Matsumura, N., Kikuchi-Utsumi, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2014) Rhythmic oscillations of the microRNA miR-96-5p play a neuroprotective role by indirectly regulating glutathione levels. *Nat. Commun.*, **5**, 3823
- 23) Wright, C., Turner, J.A., Calhoun, V.D. and Perrone-Bizzozero, N. (2013) Potential Impact of miR-137 and Its Targets in Schizophrenia. *Front. Genet.*, **4**, 58
- 24) Buckland, J. (2010) Biomarkers: microRNAs under the spotlight in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **6**, 436
- 25) Mayoral, J. G., Hussain, M., Joubert, D. A., Iturbe-Ormaetxe, I.2, O'Neill, S. L. and Asgari, S. (2014) Wolbachia small noncoding RNAs and their role in cross-kingdom communications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 18721-18726
- 26) Weiberg, A., Bellinger, M. and Jin, H. (2015) Conversations between kingdoms: small RNAs. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **32**, 207-215
- 27) Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccarini, A., Lazzari, G., Galli, C. and Naldini, L. (2007) Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1457-1467
- F. 健康危険情報**
なし
- G. 研究発表**
1. 論文発表
なし

なし

2. 学会発表

- (1) 野口秋雄, 中村公亮, 坂田こずえ, 福田のぞみ, 石垣拓実, 真野潤一, 高島令王奈, 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
- (2) 中村公亮, 近藤一成, 稚山浩, 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
- (3) 野口秋雄, 町井香苗, 中村公亮, 坂田こずえ, 福田のぞみ, 石垣拓実, 真野潤一, 高島令王奈, 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, 京都, 2015年10月
- (4) 高島令王奈, 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, 京都, 2015年10月
- (5) 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, 京都, 2015年10月
- (6) 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

表 1 リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー・プローブ

name	sequence (5'-3')
<i>loop primer</i>	
DvSnf48-68A_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAAAAA
DvSnf47-68A_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAAAA
DvSnf46-68A_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTCAAA
DvSnf45-68A_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCCTCAA
DvSnf44-68A_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCCTCA
DvSnf48-68A_RT2	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAAAAAAG
<i>forward primer</i>	
DvSnf48-68A_F	CGGCGGTCCAATCGTTTCTTCT
DvSnf48-68A_F2	CGGCGGTCCAATCGTTTCTTCTT
DvSnf48-68A_F3	CGGCGGTCCAATCGTTTCTTC
<i>reverse primer</i>	
miR-Rv	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>probe</i>	
DvSnf48-68A_P	TGGATACGACCAAAAAAG
DvSnf47-68A_P	TGGATACGACTCAAAAAAG
DvSnf46-68A_P	TGGATACGACCTCAAAAAAG
DvSnf45-68A_P	TGGATACGACCCCTCAAAAAAG
DvSnf44-68A_P	TGGATACGACCCCTCAAAAAAG

表 2 RNAi 技術を利用した害虫抵抗性 GM 作物の開発状況

	plant	insect pest	year	journal title	Vol.	page	title	author
1	corn	western corn rootworm	2007	Nat. Biotechnol.	25	1322-1326	Control of coleopteran insect pests through RNA interference.	Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J.
2	<i>Arabidopsis thaliana</i> tobacco cotton	cotton bollworm	2007	Nat. Biotechnol.	25	1307-1313	Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol.	Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY.
3	rice	brown planthopper	2011	PLoS One	6	e20504	Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect <i>Nilaparvata lugens</i> .	Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G
4	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana benthamiana</i>	pea aphid	2011	PLoS One	6	e25709	Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants.	Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA
5	<i>Nicotiana attenuata</i> (coyote tobacco)	<i>Manduca sexta</i>	2012	PLoS One	7	e31347	Tobacco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing <i>manduca sexta</i> genes by plant mediated RNA interference.	Kumar P, Pandit SS, Baldwin IT
6	tobacco	cotton bollworm	2012	PLoS One	7	e38572	Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene <i>EcR</i> .	Zhu JQ, Liu S, Ma Y, Zhang JQ, Qi HS, Wei ZJ, Yao Q, Zhang WQ, Li S
7	corn	western corn rootworm	2012	PLoS One	7	e47534	Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte).	Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, Ilagan O, Lawrence C, Levine S, Moar W, Mueller G, Tan J, Uffman J, Wiggins E, Heck G, Segers G.
			2013	PLoS One	8	e54270	Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of <i>Snf7</i> orthologue in western corn rootworm (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>) larvae.	Ramaseshadri P, Segers G, Flannagan R, Wiggins E, Clinton W, Ilagan O, McNulty B, Clark T, Bolognesi R
			2013	J. Agric. Food Chem.	61	12557-12564	Quantification of transgene-derived double-stranded RNA in plants using the QuantiGene nucleic acid detection platform.	Armstrong TA, Chen H, Ziegler TE, Iyadurai KR, Gao AG, Wang Y, Song Z, Tian Q, Zhang Q, Ward JM, Segers GC, Heck GR, Staub JM
			2014	PLoS One	9	e83985	Ultrastructural changes caused by <i>Snf7</i> RNAi in larval enterocytes of western corn rootworm (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> Le Conte).	Koči J, Ramaseshadri P, Bolognesi R, Segers G, Flannagan R, Park Y
8	tobacco	cotton bollworm	2013	Int. J. Biol. Sci.	9	370-381	Silencing the <i>HaHR3</i> gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt <i>Helicoverpa armigera</i> development	Xiong Y, Zeng H, Zhang Y, Xu D, Qiu D
9	<i>Arabidopsis thaliana</i> cotton	cotton bollworm	2013	Plant Mol. Biol.	83	119-129	Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference.	Mao YB, Xue XY, Tao XY, Yang CQ, Wang LJ, Chen XY
10	rice	brown planthopper	2014	Int. J. Biol. Sci.	10	1171-1180	The insect ecdysone receptor is a good potential target for RNAi-based pest control.	Yu R, Xu X, Liang Y, Tian H, Pan Z, Jin S, Wang N, Zhang W.
11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	aphid	2014	Methods Mol. Biol.	1127	125-136	Silencing of aphid genes by feeding on stable transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> .	Coleman AD, Pitino M, Hogenhout SA
12	tobacco	whitefly	2014	PLoS One	9	e87235	Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene.	Thakur N, Upadhyay SK, Verma PC, Chandrashekar K, Tuli R, Singh PK

13	wheat	aphid	2014	Transgenic Res.	23	389-396	Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs <i>Sitobion avenae</i> tolerance of Phoxim insecticides.	Xu L, Duan X, Lv Y, Zhang X, Nie Z, Xie C, Ni Z, Liang R
14	tobacco	aphid	2014	Transgenic Res.	23	145-152	Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the <i>Myzus persicae</i> .	Mao J, Zeng F
15	tobacco	cotton bollworm	2015	Plant Biotechnol. J.	13	435-446	Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts <i>Helicoverpa armigera</i> larval development and pupation.	Jin S, Singh ND, Li L, Zhang X, Daniell H.
16	potato	colorado potato beetle	2015	Science	347	991-994	Pest control. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids.	Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DG, Bock R
17	barley	grain aphid	2015	Plant Biotechnol. J.	13	849-857	Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid <i>Sitobion avenae</i> .	Abdellatef E, Will T, Koch A, Imani J, Vilcinskis A, Kogel KH.
18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	2015	Int. J. Biol. Sci.	11	67-74	Silencing the HaAK gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of <i>Helicoverpa armigera</i> .	Liu F, Wang XD, Zhao YY, Li YJ, Liu YC, Sun J
19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	green peach aphid	2015	J. Exp. Bot.	66	541-548	Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids.	Coleman AD, Wouters RH, Mugford ST, Hogenhout SA

表3 ヒト遺伝子に対しある程度の相同性を持つ RNAi 産物候補

name	matching	MFE (kcal/mol)	target gene	position	direction	protein	function or disease*
DvSnf_16-36	19/21	-19.7	<i>TPH2</i>	3'UTR	antisense	tryptophan 5-hydroxylase 2 isoform	(D)
DvSnf_31-51	15/21	-28.0	<i>RPS24</i>	3'UTR	sense	ribosomal protein S24	(A) Diamond-Blackfan anemia
DvSnf_32-52	15/21	-25.5	<i>DACT2</i>	ORF	antisense	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 2	(D)
DvSnf_33-53	18/21	-25.3	<i>TCP11L2</i>	ORF	antisense	T-complex protein 11-like protein 2	(D)
DvSnf_36-56	16/21	-24.0	<i>GSTM1</i>	ORF	sense	glutathione S-transferase mu 1	(D)
DvSnf_41-61	16/21	-22.1	<i>FBXW7</i>	3'UTR	sense	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase	(D)
DvSnf_44-64	15/21	-17.0	<i>ZFH2</i>	3'UTR	antisense	zinc finger homeobox 2	(D)
DvSnf_45-65	17/21	-20.3	<i>SLC35F6</i>	3'UTR	sense	solute carrier family 35, member F6	(B) drug-metabolite transporter
DvSnf_48-68	19/21	-23.7	<i>STK32B</i>	ORF	antisense	serine/threonine-protein kinase 32B isoform	(A) Ellis-van Creveld syndrome
DvSnf_49-69	19/21	-18.5	<i>UBASH3A</i>	3'UTR	sense	ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein A isoform	(D)
DvSnf_64-84	16/21	-22.3	<i>CCDC62</i>	ORF	antisense	coiled-coil domain containing 62	(D)
DvSnf_66-86	17/21	-22.7	<i>CLEC16A</i>	ORF	antisense	C-type lectin domain family 16, member A	(D)
DvSnf_75-95	15/21	-17.4	<i>SIPR3</i>	3'UTR	antisense	sphingosine-1-phosphate receptor 3	(B) negatively regulation of collagen type I/III expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cell
DvSnf_100-120	15/21	-17.5	<i>AKAP11</i>	ORF	antisense	A kinase (PRKA) anchor protein 11	(D)
DvSnf_102-122	17/21	-23.2	<i>NSL1</i>	ORF	antisense	NSL1, MIS12 kinetochore complex component	(B) outer kinetochore assembly
DvSnf_107-127	17/21	-24.5	<i>COL20A1</i>	3'UTR	antisense	collagen alpha-1(XX) chain isoform	(D)
DvSnf_111-131	16/21	-26.1	<i>TIMP4</i>	5'UTR	sense	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	(B) synaptic plasticity, neuronal cell differentiation and neuroprotection in the central nervous system
DvSnf_113-133	20/21	-36.2	<i>FRMD5</i>	3'UTR	antisense	FERM domain-containing protein 5 isoform	(C) tumor progression
DvSnf_119-139	18/21	-29.5	<i>GIPR</i>	ORF	sense	gastric inhibitory polypeptide receptor	(C) pancreatic neuroendocrine tumor
DvSnf_139-159	16/21	-18.4	<i>ATP2B1</i>	3'UTR	antisense	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	(D)
DvSnf_140-160	17/21	-17.0	<i>ZMYM2</i>	ORF	sense	zinc finger MYM-type protein 2 isoform	(D)
DvSnf_145-165	17/21	-20.1	<i>RECQL</i>	ORF	sense	RecQ helicase-like	(D)
DvSnf_157-177	18/21	-18.3	<i>SYT4</i>	3'UTR	antisense	synaptotagmin IV	(B)Neuropeptide exocytosis
DvSnf_164-184	15/21	-18.7	<i>RAB11FIP2</i>	3'UTR	antisense	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	(D)
DvSnf_167-187	16/21	-20.7	<i>MCOLN2</i>	3'UTR	sense	mucolipin 2	(D)
DvSnf_171-191	15/21	-24.6	<i>TNRC6B</i>	3'UTR	sense	trinucleotide repeat containing 6B	(C) Uterine fibroid
DvSnf_172-192	16/21	-27.7	<i>SIPAIL2</i>	ORF	sense	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	(D)
DvSnf_174-194	19/21	-27.7	<i>ZC3H3</i>	ORF	sense	zinc finger CCCH-type containing 3	(D)
DvSnf_186-206	17/21	-20.3	<i>IDO2</i>	ORF	sense	indoleamine 2,3-dioxygenase 2	(B) catalyze the first step in the kynurenine pathway of tryptophan metabolism, pancreatic ductal adenocarcinomas
DvSnf_191-211	15/21	-19.5	<i>MB21D2</i>	3'UTR	sense	Mab-21 domain containing 2	(D)
DvSnf_195-215	16/21	-17.3	<i>TAOK1</i>	3'UTR	sense	TAO kinase 1	(D)
DvSnf_198-218	18/21	-18.9	<i>MCMDC2</i>	ORF	antisense	MCM domain-containing protein 2 isoform	(B) DNA replication
DvSnf_205-225	15/21	-17.2	<i>POLN</i>	3'UTR	sense	polymerase (DNA directed) nu	(D)
DvSnf_211-231	18/21	-20.7	<i>SLC9A7</i>	ORF	antisense	solute carrier family 9, subfamily A (NHE7, cation proton antiporter 7), member 7	(D)
DvSnf_215-235	15/21	-21.1	<i>SYT7</i>	ORF	sense	synaptotagmin VII	(D)

* A, 先天性の疾病に関わる遺伝子. B, 生体機能に重要な遺伝子. C, ガンや良性腫瘍で発現量が増加する遺伝子. D, 機能未知な遺伝子.

表 4 ヒト遺伝子に対しある程度の相同性を持つ RNAi 産物候補の配列

	sequence (5'-3')
DvSnf_16-36A	UGCAACUCUUUUUUUUUUCGA
DvSnf_31-51S	GUUGCACUCCAAGCCCUCAAA
DvSnf_32-52A	UUUUGAGGGCUUGGAGUGCAA
DvSnf_33-53A	UUUUUGAGGGCUUGGAGUGCA
DvSnf_36-56S	ACUCCAAGCCCUCAAAAAGAA
DvSnf_41-61S	AAGCCCUCAAAAAGAAGAAAC
DvSnf_44-64A	AUCGUUUUCUUCUUUUUGAGGG
DvSnf_45-65S	CCUCAAAAAGAAGAAACGAUU
DvSnf_48-68A	UCCAAUCGUUUUCUUCUUUUUG
DvSnf_49-69S	AAAAAGAAGAAACGAUUGGAA
DvSnf_64-84A	UUGUAGUUGGGUCUUUCCAA
DvSnf_66-86A	AUUUGUAGUUGGGUCUUUCC
DvSnf_75-95A	GUCCAUCUAUUUGUAGUUGG
DvSnf_100-120A	CCUCUGCAUUUCAAUAGUUGU
DvSnf_102-122A	UCCUCUGCAUUUCAAUAGUU
DvSnf_107-127A	GGGCUUCCUCUGCAUUUCA
DvSnf_111-131S	AAUGCAGAGGGAGCCUCGA
DvSnf_113-133A	CUUCGAGGGCUUCCUCUGCA
DvSnf_119-139S	GGGAAGCCUCGAGGAGGCUA
DvSnf_139-159A	UAAUACAGCAGUAUUUGUCU
DvSnf_140-160S	GCACAAUACUGCUGUAUUAG
DvSnf_145-165S	AAUACUGCUGUAUUAGAUUCU
DvSnf_157-177A	AGCAUUUUUCAUAGAAUCUAA
DvSnf_164-184A	CAUCUGCAGCAUUUUUCAUAG
DvSnf_167-187S	UGAAAAUUGCUGCAGAUGCCC
DvSnf_171-191S	AAAUGCUGCAGAUGCCCUUAA
DvSnf_172-192S	AAUGCUGCAGAUGCCCUAAG
DvSnf_174-194S	UGCUGCAGAUGCCCUAAGAA
DvSnf_186-206S	CCUUAAGAAAGCUCAUAAGAA
DvSnf_191-211S	AGAAAGCUCAUAAGAAUUUGA
DvSnf_195-215S	AGCUCAUAAGAAUUUGAAUGU
DvSnf_198-218A	UCUACAUAUCAAUUUUUAUGA
DvSnf_205-225S	AAUUUGAAUGUAGAUGAUGUU
DvSnf_211-231A	AUCGUGAACAUCAUCUACAUU
DvSnf_215-235S	UAGAUGAUGUUCACGAUAUCA

表 5 DvSnf_48-68A アッセイ系の検出限界

target RNA	theoretical copy number	number of positive reaction	positive rate (%)
DvSnf_48-68A	800	21/21	100
	400	19/21	91
	200	16/21	76
DvSnf_47-68A	800	21/21	100
	400	18/21	86
	200	15/21	71
DvSnf_46-68A	3.2K	21/21	100
	1.6K	21/21	100
	800	16/21	76
DvSnf_45-68A	6.4K	21/21	100
	3.2K	19/21	91
	1.6K	13/21	62
DvSnf_44-68A	6.4K	21/21	100
	3.2K	14/21	67
	1.6K	14/21	67



図3 各アッセイ系のリアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブ
青字で示した配列はDvSnf48-68A_F, 水色字で示した配列はmiR-Rv, 緑色で示した配列は各プローブ, 黒字で示した配列は各推定cDNA, 下線の配列はloop primerを示す。

DvSnf_48-68A	3'-GUUUUUUCUUCUUUGCUAACCU-5'
STK32B	5'-AAGCCACUUCACAAAAGAAGAAGCGAUUGGCAAAGAACA-3'
DvSnf_47-68A	3'-AGUUUUUCUUCUUUGCUAACCU-5'
STK32B	5'-AAGCCACUUCACAAAAGAAGAAGCGAUUGGCAAAGAACA-3'
DvSnf_46-68A	3'-GAGUUUUUCUUCUUUGCUAACCU-5'
STK32B	5'-AAGCCACUUCACAAAAGAAGAAGCGAUUGGCAAAGAACA-3'
DvSnf_45-68A	3'-GGAGUUUUUCUUCUUUGCUAACCU-5'
STK32B	5'-AAGCCACUUCACAAAAGAAGAAGCGAUUGGCAAAGAACA-3'
DvSnf_44-68A	3'-GGGAGUUUUUCUUCUUUGCUAACCU-5'
STK32B	5'-AAGCCACUUCACAAAAGAAGAAGCGAUUGGCAAAGAACA-3'

図4 DvSnf_48-68A~DvSnf_44-68A の配列およびヒト STK32B との予想されるハイブリット形成網掛けはRNAi産物候補のseed領域 (5'末端側2~8番目の塩基) を示す。

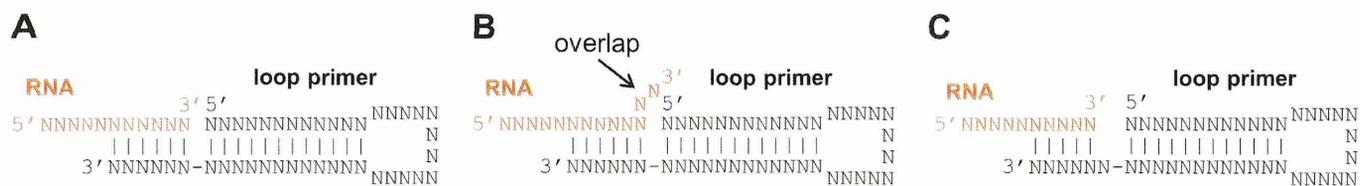


図5 RT反応時におけるアニーリングパターン

(A) 各RNAi産物候補に対し設計されたアッセイ系でのアニーリングパターン. (B) RNAの3'末端でオーバーラップが生じるアニーリングパターン. (C) loop primerとRNAのアニーリング塩基対長が短くなるアニーリングパターン.

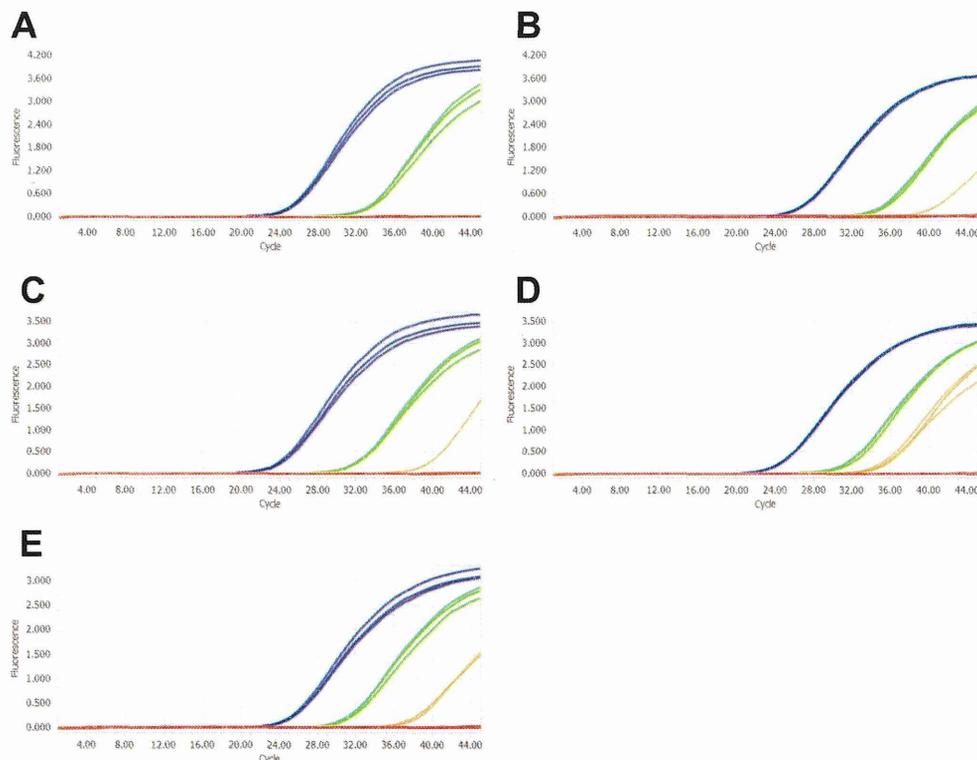


図6 個々のRNAi産物候補に対する検出法の検討

(A) DvSnf_48-68A アッセイ系で DvSnf_48-68A を, (B) DvSnf_47-68A アッセイ系で DvSnf_47-68A を, (C) DvSnf_46-68A アッセイ系で DvSnf_46-68A を, (D) DvSnf_45-68A アッセイ系で DvSnf_45-68A を, (E) DvSnf_44-68A アッセイ系で DvSnf_44-68A をそれぞれ検出した. 赤線はblank溶液, 橙線は 100 copies/well 合成 RNA, 緑線は 10K copies/well 合成 RNA, 青線は 10M copies/well 合成 RNA を鋳型にした時の増幅曲線を示す.

		synthetic RNA target (10M copies/well)					C _q mean
		48-68A	47-68A	46-68A	45-68A	44-68A	
miRNA assay	48-68A	19.0	20.4	22.7	24.5	23.9	
	47-68A	28.6	20.4	21.7	25.2	23.9	
	46-68A	30.3	26.7	18.5	21.6	19.3	
	45-68A	35.9	31.9	21.7	18.7	18.4	
	44-68A	38.3*	35.4	30.0	18.5	18.9	

高い 低い
 反応性

図7 個々の RNAi 産物候補に対するアッセイ系の検討

10M copies/well RNAi産物候補に対し各アッセイ系を試験し、平均C_q値を算出した。*は3併行反応中1反応が不検出であった。

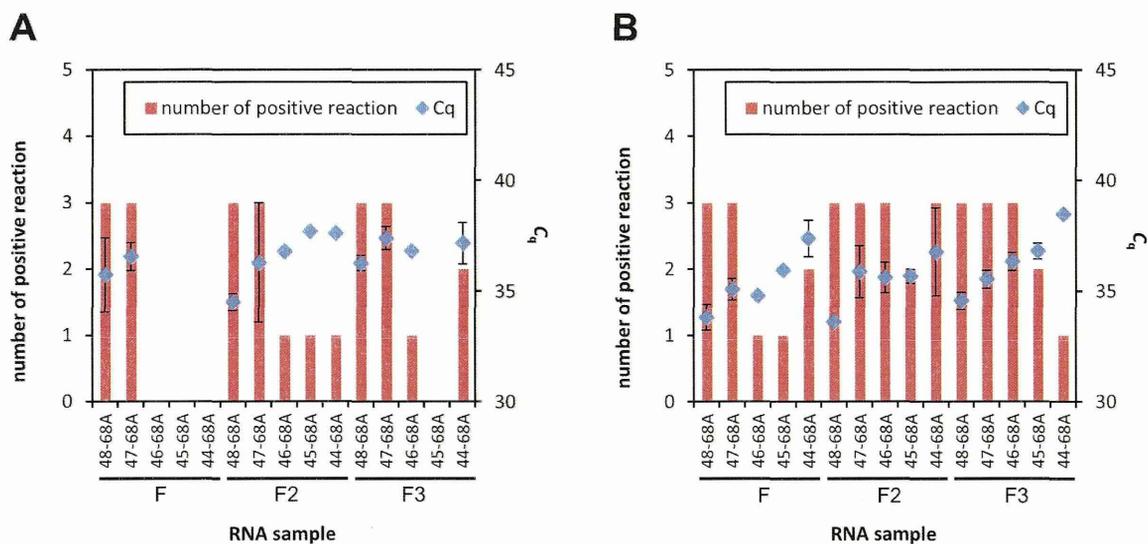


図8 DvSnf_48-68A アッセイ系における loop primer および forward primer の検討

1K copies/well RNAi産物候補に対しDvSnf_48-68Aアッセイ系を3併行で試験し、検出数（左縦軸）および平均C_q値（右縦軸）を算出した。loop primerとしては、(A) DvSnf48-68A_RTおよび (B) DvSnf48-68A_RT2を用いて検討した。forward primerとしては、DvSnf48-68A_F (F) , DvSnf48-68A_F2 (F2) およびDvSnf48-68A_F3 (F3) を用いて検討した。

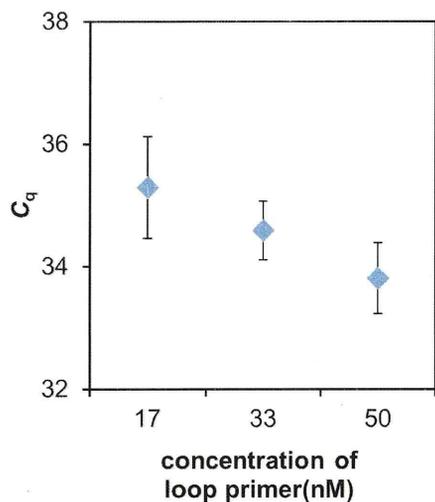


図9 DvSnf_48-68Aアッセイ系における loop primer 濃度の検討
 鋳型には1K copies/well DvSnf_48-68Aを用い、DvSnf48-68A_RT2の濃度としては終濃度17, 33, 50 μ Mで検討した。

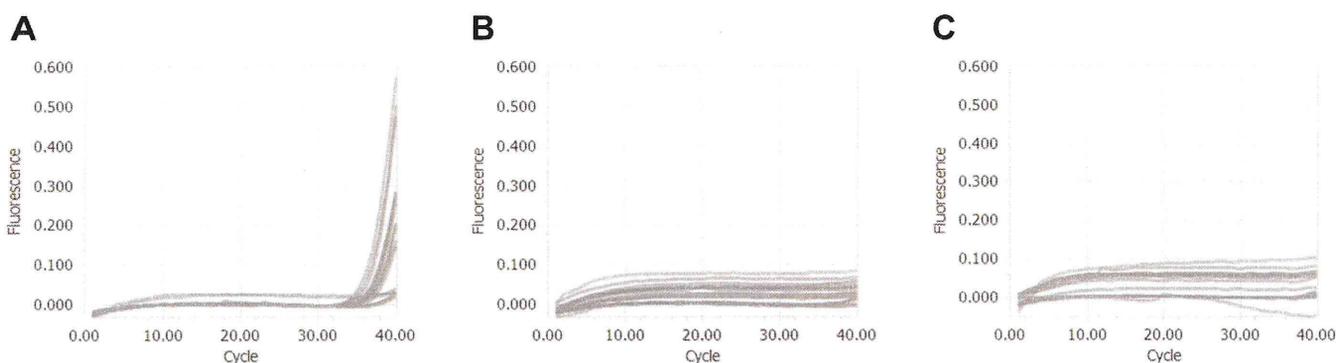


図10 DvSnf_48-68Aアッセイ系における各forward primerを使用した際の非特異的増幅の検討
 鋳型にはブランク試料液を、loop primerとしてはDvSnf48-68A_RT2を、forward primerとしては (A) DvSnf48-68A_F2, (B) DvSnf48-68A_Fおよび (C) DvSnf48-68A_F3を用いて18併行で検討した。

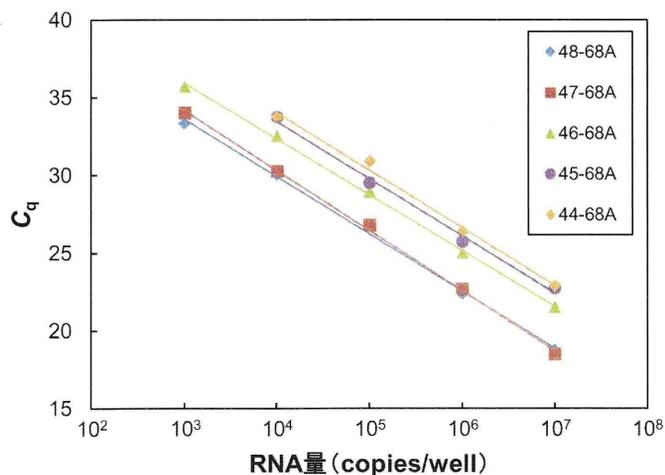


図11 DvSnf_48-68Aアッセイ系における 定量性の検討
 鋳型には合成RNA希釈系列 (1K~10M copies/well) を、loop primerとしてはDvSnf48-68A_RT2を、forward primerとしてはDvSnf48-68A_Fを用い、3併行で試験した。