

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）
平成 28 年度 分担研究報告書

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

安全性未審査の遺伝子組換え並びに新育種技術により
開発された作物の検知技術開発と安全性に関する知見の取集

研究分担者 中村公亮（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部第二室）
協力研究者 石垣拓実（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部第二室）

研究要旨

本研究では、1 塩基の変異を検知する方法の開発と性能比較を行った。試験には、oligonucleotide-directed mutagenesis 法（ODM 法）を用いて、セイヨウアブラナ由来アセト乳酸合成酵素遺伝子（*AHASIII*）に 1 塩基を変異させ、開発された除草剤耐性セイヨウアブラナ 5722 系統、化学物質を用いて同配列に変異を誘導し、開発された除草剤耐性セイヨウアブラナ 5715 系統、及び、同配列の自然変異型である除草剤耐性セイヨウアブラナ 5720 系統を供した。本年度では、Cell アッセイ法、制限酵素スクリーニング法、PCR 法、及び、本研究で開発した PCR-NGS 法の検出限界を算出した。PCR-NGS 法については、他の方法では不可能であった変異配列を特定すると同時に、絶対定量 (>1%) が可能な方法であることが示唆された。

A. 研究目的

除草剤耐性セイヨウアブラナ 5722 系統は、oligonucleotide-directed mutagenesis 法（ODM 法）（Plant Biotechnol. J., 14, 496-502, 2016）を用いて、セイヨウアブラナ由来アセト乳酸合成酵素遺伝子（*AHASIII*）の 1 塩基を変異させ、開発された除草剤耐性セイヨウアブラナである。北米においては、同系統の実用化に向けた報告がなされている。我が国では、同系統は安全性未審査である。本研究では、まず、このような 1 塩基の変異を有する作物を検知する方法の開発と性能比較を行った。

B. 研究方法

1. 試料、試薬および機器

(1) 試料

セイヨウアブラナは、Cibus 社より提供された標的遺伝子であるアセト乳酸合成酵素遺伝子（*AHAS*）に 1 塩基の変異を導入したセイヨウアブラナ 3 系統（Cibus 5715 系統、5720 系統、5722 系統）と野生型 2 品種（Bn2wt、東北 3 号）を試験に供した。

(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)製のものを用いた。試薬は全て analytical grade を使用した。

ゲノム増幅には、QIAGEN 製 REPLI-g Mini Kit（Cat. No.150025）を用いた。定性 PCR 反応液には、東洋紡製の 2× KOD FX buffer と KOD FX（Cat. No.KFX-201）を用い、タカラバイオ(株)製の dNTP Mixture を使用した。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 製の GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain（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 100 bp ラダー（Cat.No.3407A）と Invitrogen 製 1 kb ラダー（Cat. No.15615-016）を用いた。PCR 産物の精製にはプロメガ製 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System（A9282）を用いた。各アッセイの標的配列増幅のための PCR 反応には、

アジレント製の PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase & PCR Master Mix (Cat. No.600670) を用い、タカラバイオ(株)製の dNTP Mixture を用いた。Cel1 アッセイに使用した拡散分解酵素には、NEB 製の T7 EndonucleaseI (Cat. No.M0302S) および 10×NEBuffer2.0 を用い、アニーリング反応には、10×ハイブリダイゼーションバッファー (100 mM Tris-HCl (pH8.0)、750 mM KCl、15 mM MgCl₂)、反応停止試薬として EDTA を用いた。制限酵素アッセイには NEB 製の *BsrDI* (Cat. No.R0574S)、10×NEBuffer2.0 を用いた。次世代シーケンス解析は、Illumina Miseq を使用して行った。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。使用したプライマーの塩基配列は以下のものを使用した。

Cel1 アッセイ・制限酵素アッセイ用標的プライマー：

Cibus canola AHAS mut nt_F:

5'-ggacttctgctgcgattgg-3'

Cibus canola AHAS mut nt_R:

5'-gccaccactgggatcatcg-3'

次世代シーケンサー用 1st PCR プライマー：

1st_target-F:

5'-acactctttccctacacgacgctcttccgatctaacctgatgctgtt -3'

1st_target-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctcgaagctcctgaaact-3'

1st_control-F: 5'-

acactctttccctacacgacgctcttccgatctcgaagggaaggcaattatca -3'

1st_control-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctaagattctctacaggattgtgg-3'

次世代シーケンサー用 2nd PCR プライマー：

SET2-F1_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacatagcctacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F2_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacatagaggcacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F3_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacaccctatcctacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F4_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacggctctgaacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F5_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacagcggaagacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F6_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacactaatcttaacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F7_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacaccaggacgtacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-F8_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacgtactgacacactcttccctacacgacgc-3'

SET2-R1_Primer:

5'-caagcagaagacggcctacgagataatgagcgggtgactggagttcagacgtgtg-3'

SET2-R2_Primer:

5'-caagcagaagacggcctacgagatggaatctctgactggagttcagacgtgtg-3'

(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 VORTE× GENIE-2 (G-560) を用いた。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems™ 製 PRISM™ 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 製ケミルミイメーリアナライザーに 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、Applied Biosystems™ 製 Applied Biosystems Veriti® 96-Well サーマルサイクラーを用いた。バイオアナライザーに、アジレント製 Agilent2100 バイオアナライザーを用いた。

2.セイヨウアブラナからの DNA の抽出・精製

試験に供した種子は、Millser (Iwatani 社製) 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 30 mL 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/ μ L 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/ μ L に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いた。

3. DNA のランダム増幅

DNA のランダム増幅には、REPLI-g Mini Kit (Qiagen 社製) を使用した。反応に使用した BufferD1 (変性剤) として 5 サンプルあたり Reconstituted Buffer DLB 9 μ L、超純水 32 μ L を

加えて調製した。続いて BufferN1 (中和剤) として Stop solution 12 μ L、超純水 68 μ L を加えて調製した。次にマイクロチューブに試料 2.5 μ L、BufferD1 2.5 μ L を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、卓上遠心機でスピンドウンをした後、室温で 3 分間インキュベートした。続いて、BufferN1 5 μ L を加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、卓上遠心機でスピンドウンをした。次に、REPLIg Mini ReactionBuffer 29 μ L と REPLIg Mini DNA Polymerase 1 μ L、および超純水 10 μ L を氷上で混合して master mix を調製した後、全量を中和済みの試料 10 μ L へ加えた。これを、サーマルサイクラーを用いて、30°C で 16 時間インキュベートした後、65°C 3 分でポリメラーゼの不活化した。最後に試料溶液を超純水で 20 倍希釈し、PCR 用試料とした。

4. ナタネ標的配列の合成およびシーケンス

(1) 反応液の調製

定性 PCR 用反応液は、25 μ L/well として以下のとおり調製した。内訳は以下のとおりである。2 \times KOD FX buffer neo を 12.5 μ L と dNTP を 5 μ L 加えて混合し、プライマーを 0.2 μ L ずつ、KOD FX neo 0.5 μ L を加え全量 22.5 μ L に調製した。先にウェルに DNA 試料液もしくはランダム PCR 産物試料液 5 μ L を底に付けるように添加し、その後調製液を添加して混合した。

(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。94°C 2分間の条件で保持した後、98°C 10秒間、59°C 30秒間、68°C 30秒間を 1 サイクルとして、30 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 5分間の条件で保持し、4°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(株)製のアガロース 1 g を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、GelRed™ Nucleic Acid Gel Strain, 10,000× 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ブなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、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、試料 5 μL (10× 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 製ケミルミイメーリアナライザーに 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) シークエンス解析

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。ゲルからの DNA の精製は、MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を使用した。精製された DNA は、シーケンス用の試料として用いた。

5. Cell1 アッセイおよび制限酵素アッセイの試料液調整

(1) PCR反応液の調製

PCR 用反応液は 50 μL/well として以下のとおり調製した。超純水 33.6 μL に 10×Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 5 μL と dNTP を 5 μL 加えて混合し、プライマーを 0.2 μL ずつ、最後に PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase を 0.5 μL を加え、全量 45.0 μL となるようにした。先にウェルにランダム PCR 産物 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

サーマルサイクラー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。94°C 2分間の条件で保持した後、94°C 30

秒間、57°C 30秒間、72°C 30秒間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 5 分間の条件で保持し、4°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(株)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×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。次に発癌の可能性があるため手袋をして GelRed™ Nucleic Acid Gel Strain, 10,000× 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ブなどを用いて除去した。サンプルウェルの型は、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、試料 5 μL (10× 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 製ケミルミイメーリアナライザーに 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) DNA精製

アガロースゲルからの DNA の精製は、MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を使用した。精製された DNA は、シーケンス用の試料として用いた。精製 DNA の原液は、230 nm、260 nm、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。DNA 原液の濃度が 25 ng/μL に達しないときは、改め PCR を行い、2 回の PCR を合わせた精製 DNA 原液に対して 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の -20°C で冷却したエタノールを加え DNA をエタノール沈殿させ、13,000×g、4°C で 20 分間遠心し、上清を廃棄した後、-20°C で冷却した 70% (v/v) エタノール 1 mL を加え、さらに 13,000×g、4°C で 10 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿を乾燥させた。水 55 μL で沈殿物を溶解させ Cell アッセイ用の標的配列 cDNA 試料液とした。

6. Cell アッセイ

(1) 試料調整

変異非導入ナタネ (東北 3 号) の試料液に対して、変異導入ナタネ 3 系統 (Cibus 5715 系統、5720 系統、5722 系統) より任意の 1 系統の標的配列 cDNA 試料液を、以下に示す比率となるよう混合し、合計 200 ng の混合液を、PCR チューブに調製した。混合比率は、溶液に占める変異導入ナタネ濃度 50%、10%、1%、0.1%、0.01% の 5 段階をそれぞれ調製し、またネガティブコントロールとして変異導入ナタネ 100% および 0% の溶液も用意した。これら DNA 混合溶液の入った PCR チューブに、ハイブリダイゼーションバッファー (10×) 1.7 μL を加え、さらに超純水を合計液量が 17 μL に達する分量だけ加えて混合した。

(2) アニーリング条件

サーマルサイクラー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°C 5 分間の条件で試料を変性させた後、95-85°C を -2°C 秒、85-25°C を -0.1°C 秒の条件でアニーリングを行い、4°C 保存した。

(3) 酵素反応

アニーリング済み試料 17 μL に T7 Endonuclease I 1 μL、10×NEBuffer 2.0 2 μL を加えて混合する。T7 Endonuclease I は必要量以上に吸い上げないように注意しながらピペット操作を行った。その後、サーマルサイクラーを用いて 37°C 15 分の条件でインキュベートを行った。反応終了後、0.25 M EDTA を加えて混合し、酵素反応を停止させた。

(4) 電気泳動及び画像解析

Cell アッセイの解析には、1% (w/v) アガロースゲルによるアガロースゲル電気泳動を

用いた。タカラバイオ(株)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×TAE buffer 200 mL を加えた。三角フラスコにラップをして、空気の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、GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water を 10 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。サンプルウェルの型は、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。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、試料 5 μL (10× 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。バンドのパターンから、変異導入ナタネの検出限界濃度を推定した。

(5) バイオアナライザーによる解析

解析にはシリーズ II DNA1000 キットを用い、付属プロトコルに従って実験を行った。

7. 制限酵素アッセイ

(1) 反応液の調製

野生型ナタネ (東北 3 号) の試料液に対して、変異導入ナタネ 3 系統 (Cibus 5715 系統、5720 系統、5722 系統) より任意の 1 系統の標的配列 cDNA 試料液を、以下に示す比率となるよう混合し、合計 200 ng の混合液を、PCR チューブに調製した。混合比率は、溶液に占める変異導入ナタネ濃度 50%、10%、1%、0.1%、0.01% の 5 段階をそれぞれ調製し、またネガティブコントロールとして変異導入ナタネ 100% および 0% の溶液も用意した。これら DNA 混合溶液の入った PCR チューブに、BsrDI 1 μL、10×NEBuffer 2.0 5 μL を加え、全量 50 μL となるよう超純水を加えて混合した。

(2) 反応条件

サーマルサイクラー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。65°C 2時間の条件で酵素反応させた後、80°C 20分間の条件で酵素を不活性化し、4°Cで保存した。

(3) 電気泳動及び画像解析

Cell アッセイの解析には、1% (w/v) アガロースゲルによるアガロースゲル電気泳動を用いた。タカラバイオ(株)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×TAE buffer 200 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。次に発癌の可能性があるため手袋をして GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water を 10 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。サンプルウェルの型は、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。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、試料 5 µL (10× 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 製ケミルミイメーリアナライザーに 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。バンドのパターンから、変異導入ナタネの検出限界濃度を求めた。

(4) バイオアナライザーによる解析

解析にはシリーズ II DNA1000 キットを用い、付属プロトコルに従って実験を行った。

8. 次世代シーケンス解析

(1) 1st PCR反応液の調製

PCR 用反応液は、50 µL/well として以下の

とおり調製した。超純水 33.6 µL に 10×Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 5 µL と dNTP を 5 µL 加えて混合し、プライマーを 0.2 µL ずつ、最後に PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase を 0.5 µL を加え、全量 45.0 µL に調製した。先にウェルにランダム PCR 産物 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

サーマルサイクラー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。94°C 2分間の条件で保持した後、94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°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°C 5分間の条件で保持し、4°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(株)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×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、GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× 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。サンプルウェルの型は、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、試料 5 µL (10× 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 製ケミルミイメーリアナライザーに 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) DNA精製

上述した方法に従い、アガロースゲルからの DNA 精製を行い、精製した DNA の原液は、230 nm、260 nm、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 2ndPCR 用 DNA 試料液に供した。

(5) 2nd PCR試料の調製

1 塩基変異導入ナタネ 3 系統より得られた 2 種類の標的配列 cDNA (計 6 種類) について、野生型ナタネ cDNA を用いて希釈し、それぞれ野生型ナタネ由来 cDNA 濃度が 10%、1%、0.01% となるよう調製したものを 2ndPCR 用 DNA 試料液として供した。

(6) 2nd PCR反応液の調製

PCR 用反応液は 50 μL/well として以下のとおり調製した。超純水 33.6 μL に 10×Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 5 μL と dNTP を 5 μL 加えて混合し、プライマーを 0.2 μL ずつ、最後に PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase を 0.5 μL を加え、全量 45.0 μL に調製した。先に DNA 試料液をウェルに 15 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。プライマーと DNA 試料液の組み合わせ (全 16 通り) は以下の通りとした。

プライマー	濃度	標的配列	系統名	野生型 (ng)	変異型 (ng)	
R1	F1	10%	target	5715	45	5
	F2	10%	target	5720	45	5
	F4	1%	target	5715	49.5	0.5
	F5	1%	target	5720	49.5	0.5
	F7	0.001%	target	5715	50	0.0005
	F8	0.001%	target	5720	50	0.0005
	F7	0.001%	target	5722	50	0.0005
	F8	0%	target	-	50	0

プライマー	濃度	標的配列	系統名	野生型 (ng)	変異型 (ng)	
R2	F1	10%	control	5715	45	5
	F2	10%	control	5720	45	5
	F3	1%	control	5715	49.5	0.5

F4	1%	control	5720	49.5	0.5
F5	0.001%	control	5715	50	0.0005
F6	0.001%	control	5720	50	0.0005
F7	0.001%	control	5722	50	0.0005
F8	0%	control	-	50	0

(7) 増幅条件とシーケンス解析用サンプルの調製

サーマルサイクラー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。94°C 2分間の条件で保持した後、94°C 30秒間、59°C 30秒間、72°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°C 5分間の条件で保持し、4°C 保存した。

上述した方法と同様に、1%アガロースゲル電気泳動後、320 nm UV 照射下で DNA を検出し、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。次いで、ゲルからの DNA の精製を行った。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 濃度については、DNA 原液を約 20~50 ng/μL の範囲で濃度が揃うように水で希釈して調製し、Illumina MiSeq を使用してシーケンス解析を行った。

倫理面への配慮

(1) 人権保護について

該当なし。

(2) 法令遵守項目について

組換え DNA 実験にあたっては、平成 16 年 2 月に施行された、GM 生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (平成 15 年法律第 97 号) と所属研究機関の倫理規定、及び、GM 実験安全管理規則を遵守して実施した。

C. 研究結果

除草剤耐性セイヨウアブラナ Cibus5715 系統、5720 系統、5722 系統のスルフォイニルウレア系除草剤標的遺伝子 (AHASI [GenBank accession no. Z11524] 及び AHASIII [GenBank accession no. Z11526]) へ導入された 1 塩基変異

を、PCRにて標的配列周辺遺伝子を増幅させ、サンガー法を用いてシーケンス解析を行った(図1,2)。Cibus社より提供された情報を基に、1塩基変異配列を中心に420bp増幅断片長となるようプライマーを設計し、そのプライマーを使用してPCR後、アガロース電気泳動を使用して、増幅産物を確認した(図1)。その結果、PCRによる特異的な増幅産物を確認した。シーケンシングの結果、標的配列の蛍光ピークは1本の波長であることが確認された。よって、野生型の標的配列はグアニンであるのに対し、5715系統、5720系統、及び、5722系統すべてにおいてチミンに1塩基置換されていることが確認された。

1塩基置換された作物を検知する方法について解析するため、まず、Cibus5715系統、5720系統、及び、5722系統より抽出・精製したDNAを鋳型に、①酵素を用いた方法(Cell1アッセイ法、制限酵素アッセイ法)及び②次世代シーケンサーを使用した方法(PCR-NGS法)の各方法の検出感度に関する解析を行った。前述した1塩基変異の標的配列を含む420bpのPCR増幅断片長を用いて、各系統のPCR増幅断片を野生型のPCR増幅断片で希釈して希釈系列(0.01~50%)を調製し、熱変性によるリアネーリング後、T7 endonucleaseを使用して、Cell1アッセイを試みた(図3)。その結果、T7 endonucleaseにより、標的配列の野生型と変異型のヘテロ分子を分解後、アガロース電気泳動、又は、キャピラリー電気泳動により定性的に判別できる濃度は、10%であることが示唆された。1塩基変異導入型のPCR増幅断片を野生型のPCR増幅断片で希釈し、希釈系列(0.01~50%)を作成して、標的配列を認識して分解する制限酵素(*BsrDI*)で分解させて変異型を検出する制限酵素アッセイ法の検出感度を検証した。その結果、変異型の野生型への混入をアガロース電気泳動、又は、キャピラリー電気泳動により10%まで検出可能であることが確認された(図4)。

次に、PCR-NGS法の定量限界について解析を行った(図5)。図5に示す解析スキームに準じて、NGSの解析に供したサンプルは、標的配列を有さない領域をPCR増幅させたコントロールと標的配列を有する領域をPCR増幅させたターゲットを供した。次世代シーケンサーIllumina MiSeqに供して、シーケンシングを行うPCR増幅用のプライマー対は、表1,2に

示す。シーケンサーのフローセルに対応するよう、PCR増幅産物のタグ配列は16種類(コントロールとターゲットそれぞれの10%, 1%及び0.001%に調製した5715系統及び5720系統混入サンプルと、0.001%に調製した5722系統)を試験に供した(表3,4)。シーケンシングの結果、コントロールとターゲットをシーケンシングした配列は、全ての調製したサンプルにおいてリード配列をリファレンス配列へマッピング後、アラインメントを行った。シーケンシング解析結果より得られた塩基の積算値は、各サンプルで28万~38万塩基であった(図6)。得られたリードのデータから、野生型ゲノムDNAにはない、変異導入塩基配列の検出率を算出するため、本法のシーケンシングエラー率とバリエーション検出率の解析を行った。その結果、標的配列(4184番g→t)を含むリードは0.001%の濃度に調製した5715系統及び5720系統の両系統の混入率で検出可能であった。0.001%の混入率で、バリエーション検出率は、5715系統で0.388%、5720系統で0.376%であった。しかし、リード全体にわたって確認されるシーケンシングエラー率は、バリエーション検出率と同程度であった。一方で、1%の混入率ではバリエーション検出率は、5715系統で1.191%、5720系統で1.214%で、10%の混入率ではバリエーション検出率は、5715系統で7.488%、5720系統で8.237%であった(図7)。本研究で得られた、5715系統及び5720系統の混入率とバリエーション検出率をグラフ化した結果、両系統で相関性(5715系統, $R^2=0.9998$; 5720系統, $R^2=1.0000$)が示唆された。

D. 考察

新規育種技術を使用して開発された作物の食品への応用例として、Cibus社が開発した除草剤耐性セイヨウアブラナ系統を例に、1塩基置換された作物の各種検知技術法の検出感度について解析した。これまでに、スルフォニルウレア系除草剤耐性を獲得する標的遺伝子、*AHAS*、については、植物ゲノム上に複数のホモログを有する遺伝子であること(Theor. Appl. Genet., 80, 449-458, 1990, Mol. Gen. Genet., 229, 31-40, 1991, Plant J., 2, 321-330, 1992)が報告されている。また*AHAS*へのアミノ酸変異は、シロイヌナズナを例に解析が進んでおり(Plant Cell Rep., 8, 445-449, 1989)、本研究で使用した除草剤耐性セイヨウアブラナ系統5715系統及

び5722系統では、*AHASI* (W559L) と *AHASIII* (W556L)、5720系統では、*AHASI* (W559L) と *AHASIII* (W556LとR559W) の変異が導入されていることが報告されている。そこで本研究では、ODMの標的である *AHASIII* の W556L 変異について、ゲノム上の塩基配列を解析した。その結果、全系統中の *AHASIII* にグアニンがチミンに置換された1塩基変異を有していることが確認された。また、標的遺伝子以外の *AHAS* ホモログの塩基配列相同性は非常に高く、本研究で得られたサンガー法の蛍光ピークの解析から、*AHASI* [GenBank accession no. Z11524] と *AHASIII* [GenBank accession no. Z11526] の両遺伝子に変異が導入されたホモ型の作物であることが確認された。この結果から、ゲノム上に複数あると考えられる複数の遺伝子ホモログの標的塩基配列すべてにおいて、1塩基置換によるアミノ酸残基の置換が誘導された除草剤耐性を獲得したセイヨウアブラナ系統であることが示唆された。

変異が導入された塩基配列を検知する方法として、PCR増幅産物を分解させる酵素を使用した方法、並びに、DNA polymerase を使用し DNA 増幅を基本原理とした方法について解析を行った。PCR増幅産物を分解させる酵素を使用した方法として、*Cel1* アッセイ法と *BsrDI* を使用した制限酵素処理法を取りあげ、それぞれの検出限界を求めたところ、検出は定性的に混入率10%まで可能であることが示唆された。一方、DNA polymerase を使用したDNA増幅法には、244~247 bp アンプリコン配列を次世代シーケンサーを使用して解析した。得られたリードは、野生型セイヨウアブラナのリファレンス配列へマッピングし、標的塩基配列の変異を検出可能な混入率を解析した。バリエーション推定モデルには、倍数性を指定せずに、低頻度で見られるバリエーションを検出する「Low frequency variant detection」プログラムを使用して解析を行った。解析に使用した標的配列を含むPCR領域を次世代シーケンシング解析した結果、5%のバリエーション検出率で多数の変異箇所を同定した。多数の変異箇所を同定した要因としては、以下の3つの可能性が考えられた。

- ・元々存在している複数の遺伝子間の変異
- ・PCRバイアスによる変異
- ・MiSeq機器によるシーケンスエラー

500 bp以下の増幅断片長でPCR酵素は正確

性の高いDNA polymerase (アジレントテクノロジー社製Pfu Turbo DNA polymerase) を使用しており、同じ箇所の変異がサンプル間で見られることから、「元々存在している複数の遺伝子間の変異である可能性」が高いことが考えられた。また、本研究結果から、MiSeq機器及びPCR増幅によるシーケンスエラーは、最大0.5%程度の確立であることが示唆された。以上のことから、5%のバリエーション検出率が確認された配列は、元々存在している複数の遺伝子間の変異の可能性が高いことが示唆された。次世代シーケンシングの結果、並びに、1塩基標的配列周辺のPC増幅断片のシーケンシングの結果から、*AHAS* には複数のホモログが存在していることが確認された。

ODMを使用してセイヨウアブラナに除草剤耐性の表現型を獲得させるために変異導入された標的配列 (position : 4184) については、混入率とバリエーション検出率との間に相関関係が示唆された。また、同様に本研究で解析に使用した401 bp中において、両確率の相関関係のある配列は他には存在しないことが確認された。また、検出感度に関しては、0.001%までを変異の入ったリードを検出しているが、シーケンシングエラーと同等の確立で検出されたことから、1%以上のバリエーション配列の確立で配列を検索する閾値を設定すれば、本法を使用して1塩基変異導入のセイヨウアブラナの検出は可能であることが示唆された。よって、本法の検出感度は1%程度であることが判った。また、本法は、サンプル中に混入した標的変異配列を特定し、絶対定量的に混入率を概算することができる新しい方法 (PCR-NGS法) であることが示唆された。

E. 結論

1 塩基変異を有する作物を検出する方法の検出限界、及び、性質について、表5にまとめた。本研究結果から、*Cel1* アッセイ法、制限酵素スクリーニング法、及び、PCR法は、定性及び定量的に優れているが、本研究で開発したPCR-NGS法は、配列を特定すると同時に絶対定量可能な方法であることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyahara, T., Miyake, N., Sawahuji, K., Kitta, K., Nakamura, K., Kondo, K., Ozeki, Y. Wheat DNA fragmentation of commercial processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 23, 141-148, 2016.
 - 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. Interlaboratory validation data on real-time polymerase chain reaction detection for unauthorized genetically modified papaya line PRSV-YK. *Data in Brief*, 7, 1165-1170, 2016.
 - 3) 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*, 205, 272-279, 2016.
 - 4) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Sato-Fukuda, N., Ishigaki, T., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. Development and interlaboratory validation of a simple screening method for genetically modified maize using $\Delta\Delta Cq$ -based multiplex real-time PCR. *Analytical Chemistry*, 88, 4285-4293, 2016.
2. 学会発表
- 1) 中村公亮、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、加藤怜子、高畠令王奈、岸根、真野潤一、橘田和美、最上（西巻）知子、近藤一成：アクリルアミド産生低減並びに打撲黒斑低減を目的に開発された遺伝子組換えジャガイモ（J3, F10, E12 系統）の検知法開発（第 1 報）、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016 年 11 月
 - 2) 坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、石垣拓実、加藤怜子、近藤一成：ITS-RPB2 領域を用いたクサウラベニタケ系統分類と中毒事例検体の分析、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016 年 11 月
 - 3) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、石垣拓実、加藤怜子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上（西巻）知子、近藤一成：遺伝子組換えトウモロコシ粒検査法の簡易化、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016 年 11 月
 - 4) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、石垣拓実、加藤怜子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上（西巻）知子、近藤一成：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発（続報）、第 112 回 日本食品衛生学会 学術講演会、函館、2016 年 10 月
 - 5) 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、中村公亮、近藤一成、高畠令王奈、橘田和美：リアルタイム PCR を用いた DNA 断片化測定法の開発と性能評価、AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2016 年 7 月
 - 6) 中村公亮、近藤一成、穠山浩、石垣拓実、野口秋雄、勝又啓史、高崎一人、布藤聡、坂田こずえ、福田のぞみ、真野潤一、橘田和美、田中秀典、明石良、最上（西巻）知子：安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ検知に向けた全ゲノムシーケンシング技術応用の検討について、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月
 - 7) 石垣拓実、中村公亮、布施谷実聡、川上浩、近藤一成：ドライフルーツ食品を例とした、標的遺伝子コピー数の差に伴う内在性遺伝子の検出感度の違いについて、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月
 - 8) 三宅奈穂、宮原平、沢藤ことは、中村公亮、近藤一成、小関良宏：小麦加工食品におけるゲノム DNA 断片化の評価、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月
 - 9) 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、最上（西巻）知子、高畠令王奈、橘田和美：デジタル PCR を用いた遺伝子組換えトウモロコシ簡易定量スクリーニング法の開発、第 111 回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2016 年 5 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

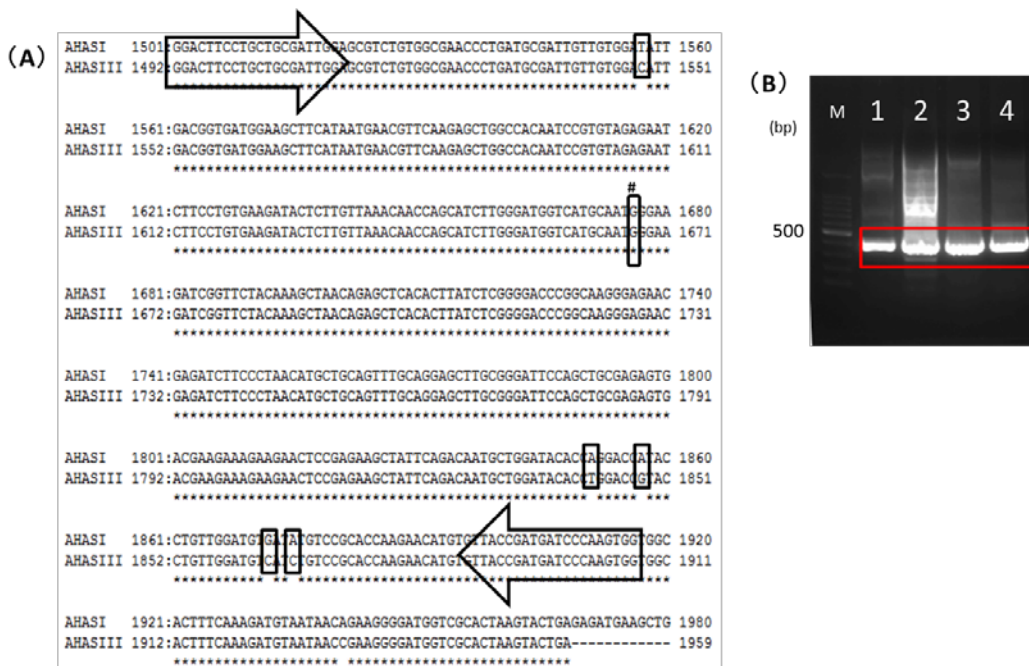


図 1. 除草剤耐性セイヨウアブラナ由来の AHASI/AHASIII 配列の確認

(A) AHAS 遺伝子の変異箇所を解析するための標的配列並びに PCR 解析用プライマー対の設計箇所。矢印は PCR に使用したプライマーがハイブリダイズする配列を、四角で囲った配列は、AHASI 及 AHASIII 間において塩基配列のミスマッチが検出されると予想される箇所、#は、変異導入配列を示す。(B) 1% (w/v) アガロース電気泳動図(レーン 1, 野生型 DNA; レーン 2, 5715 系統 DNA; レーン 3, 5720 系統 DNA; レーン 4, 5722 系統 DNA; レーン M, 100 bp DNA マーカー)

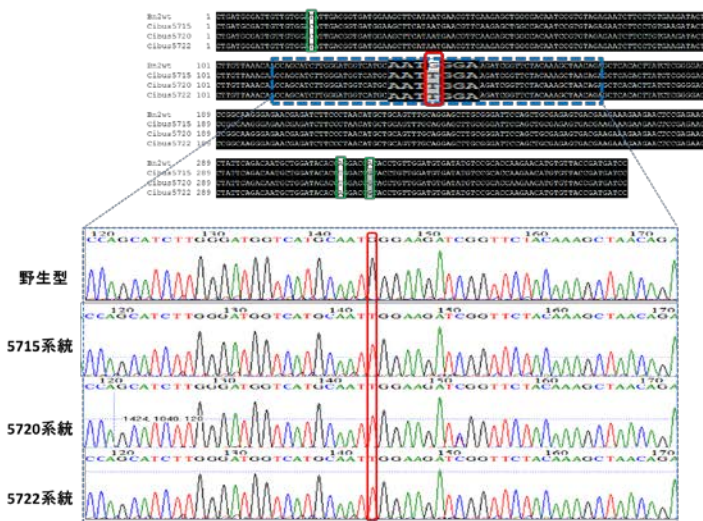


図 2. 変異型 AHASI/AHASIII のシーケンシング結果

野生型 DNA、5715 系統 DNA、5720 系統 DNA、5722 系統 DNA を鋳型に AHASI と AHASIII を PCR 増幅し、シーケンシングを行った結果を示す。標的配列（四角）は、野生型のグアニンは、3 系統すべてにおいてチミンに置換されていることを示す。

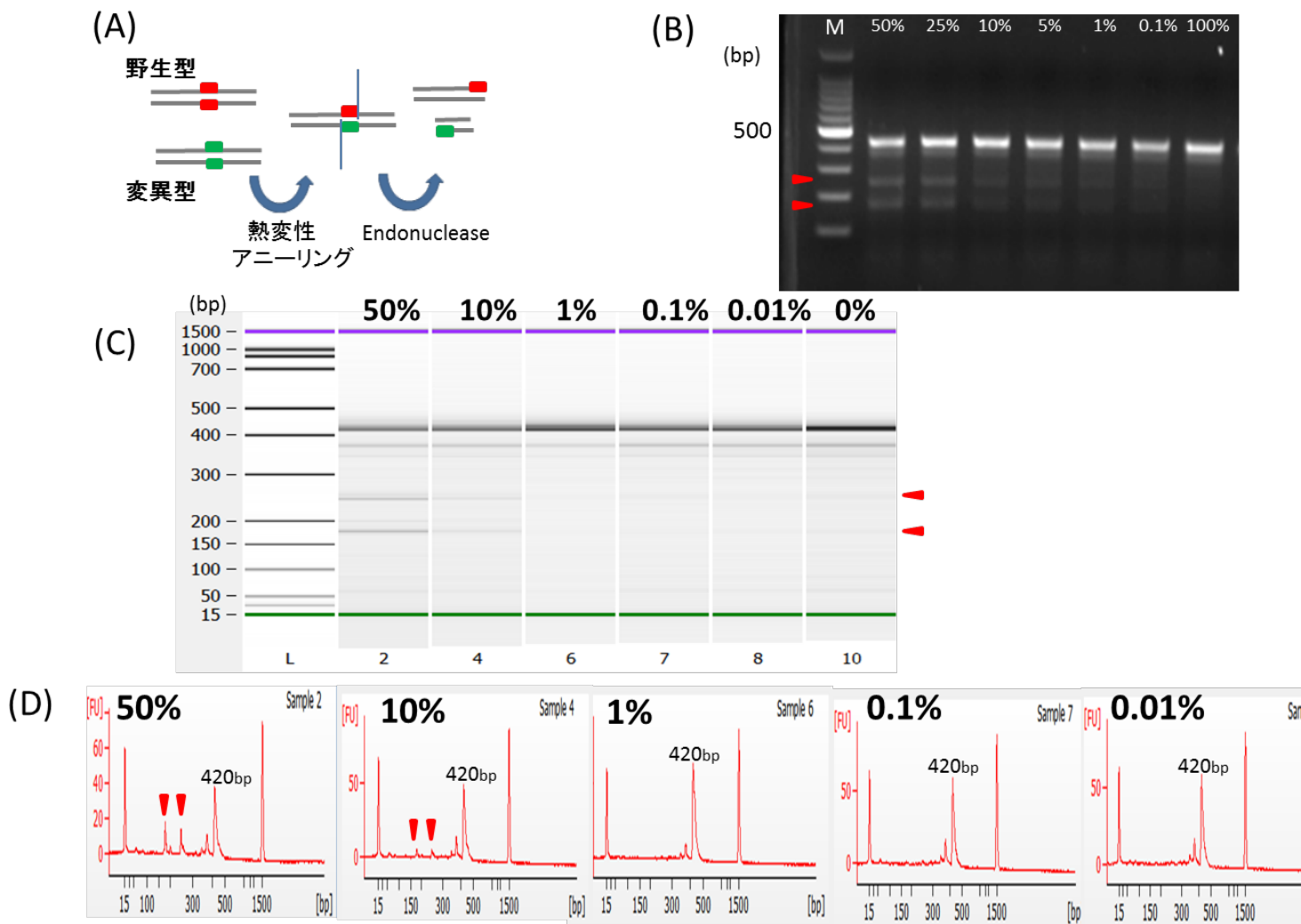


図 3. Cel1 アッセイ法を使用した際の 5722 系統検出感度の解析

(A) Cel1 アッセイ法の原理の概略図 5722 系統由来 DNA を鋳型に得られた PCR 増幅産物 (420 bp) を、野生型由来 DNA を鋳型に得られた PCR 増幅産物 (420 bp) で 0.1~50% まで希釈し、再アニーリング後、T7 エンドヌクレアーゼにより分解させたサンプルを (B) 2% (w/v) アガロース電気泳動、及び、(C) Bioanalyzer を使用してキャピラリー電気泳動を行った結果を示す。T7 エンドヌクレアーゼで分解された PCR 増幅産物 (252 bp、175 bp) を矢印で示す。

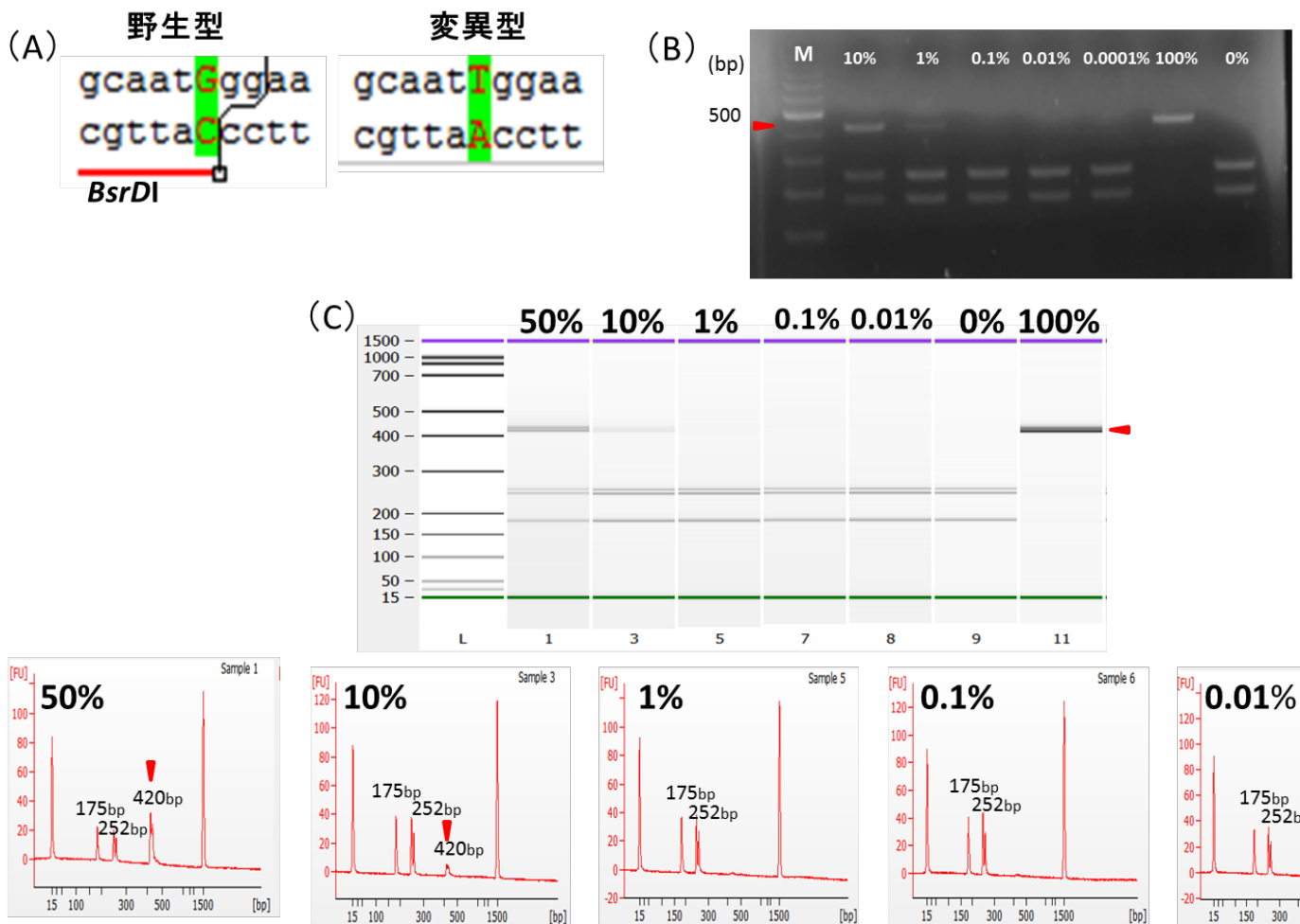


図 4. 制限酵素処理スクリーニング法を使用した際の 5722 系統検出感度の解析

(A) *BsrDI* 処理アッセイ法の原理 5722 系統由来 DNA を鋳型に得られた PCR 増幅産物 (420 bp) を、野生型由来 DNA を鋳型に得られた PCR 増幅産物 (420 bp) で 0.0001~50% まで希釈して *BsrDI* で分解後、(B) 2% (w/v) アガロース電気泳動の結果と (C) Bioanalyzer を使用してキャピラリー電気泳動を行った結果を示す。 *BsrDI* で分解されず残った PCR 増幅産物を矢印で示す。

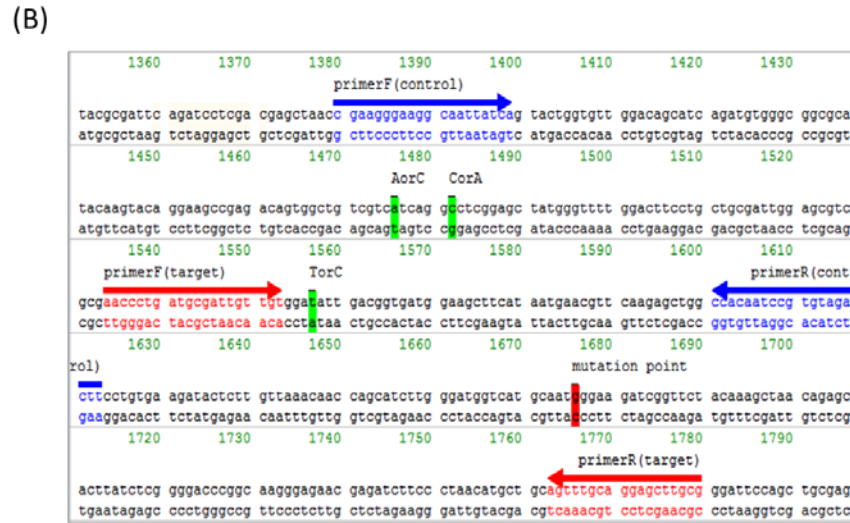
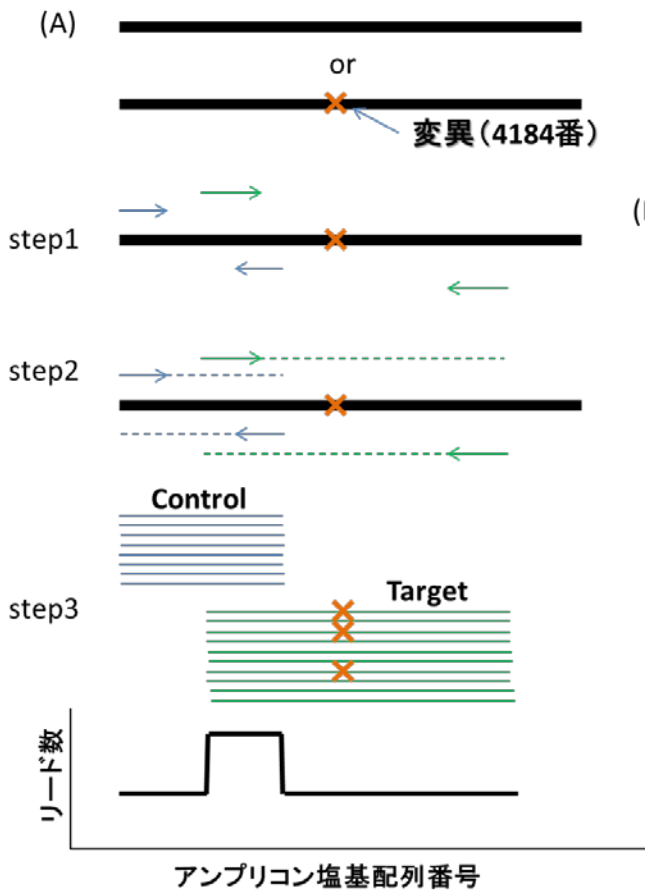


図 5. PCR-NGS 法

(A) 解析スキーム、(B) 変異導入配列を含むゲノム DNA2 本鎖配列と解析に使用したプライマー対。変異導入配列を含む「target」フラグメント (247 bp) と、それと隣り合う「control」フラグメント (244 bp) を設計

表1. PCR-NGS法に使用したアンプリコン調製用1stPCR用プライマーの配列

name	sequence(5'→3')
1st_target-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT aaccctgatgcgattgttgt
1st_target-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT cgcaagctcctgcaaact
1st_control-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT cgaaggaaggcaattatca
1st_control-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT aagattctctacacggattgtgg

*太字で示した配列は、2ndPCR用プライマーが結合するアダプター配列

表2. PCR-NGS法に使用したアンプリコン調製用2ndPCR用プライマーの配列

name	sequence(5'→3')
SET2-F1_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCT ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F2_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGC ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F3_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCT ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F4_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGA ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F5_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAG ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F6_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTA ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F7_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGT ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-F8_Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTACTGAC ACACTCTTTCCCTACACGACGC
SET2-R1_Primer	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAATGAGCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG
SET2-R2_Primer	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGAATCT CGTACTGGAGTTCAGACGTGTG

表3. 「control」フラグメントを得るための、
2ndPCR用サンプル濃度調製およびプライマー組み合わせ

	2 nd primer	GM (%)	標的配列	GM系統	WT (ng)	GM (ng)
R2	F1	10%	control	5715	45	5
	F2	10%	control	5720	45	5
	F3	1%	control	5715	49.5	0.5
	F4	1%	control	5720	49.5	0.5
	F5	0.001%	control	5715	50	0.0005
	F6	0.001%	control	5720	50	0.0005
	F7	0.001%	control	5722	50	0.0005
	F8	0%	control	-	50	0

表4. 「target」フラグメントを得るための、
2ndPCR用サンプル濃度調製およびプライマー組み合わせ

	2 nd primer	GM (%)	標的配列	GM系統	WT (ng)	GM (ng)
R1	F1	10%	target	5715	45	5
	F2	10%	target	5720	45	5
	F4	1%	target	5715	49.5	0.5
	F5	1%	target	5720	49.5	0.5
	F7	0.001%	target	5715	50	0.0005
	F8	0.001%	target	5720	50	0.0005
	F7	0.001%	target	5722	50	0.0005
	F8	0%	target	-	50	0

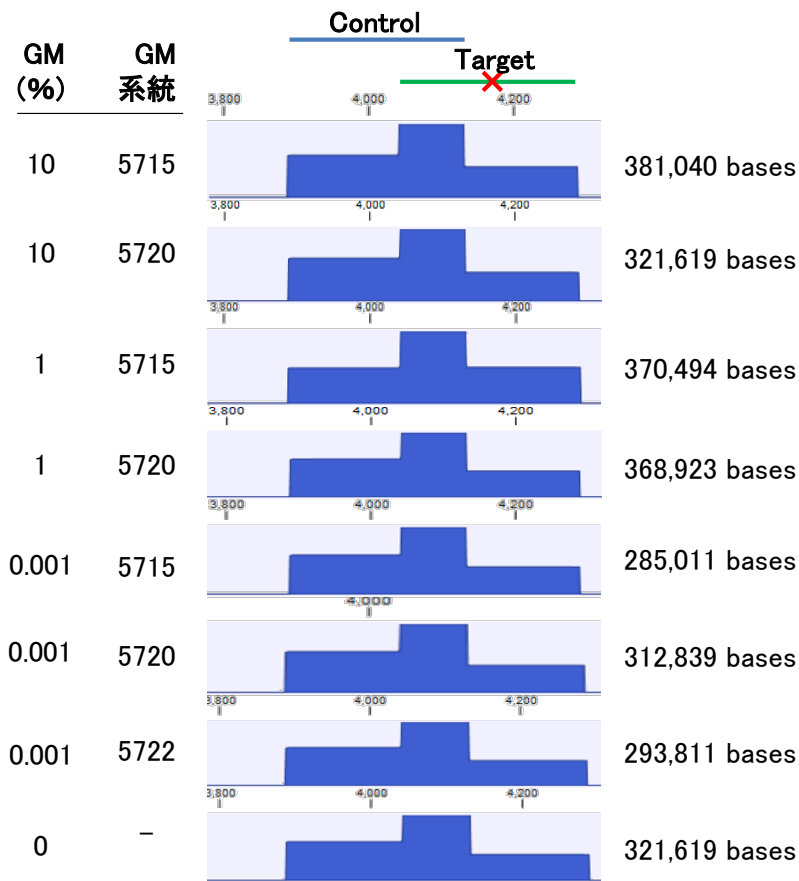


図 6. PCR-NGS 法による解析結果

得られた NGS リードデータのリファレンス配列へのマッピングとアラインメントした後、核酸の積算値をリファレンス配列番号順に示す。

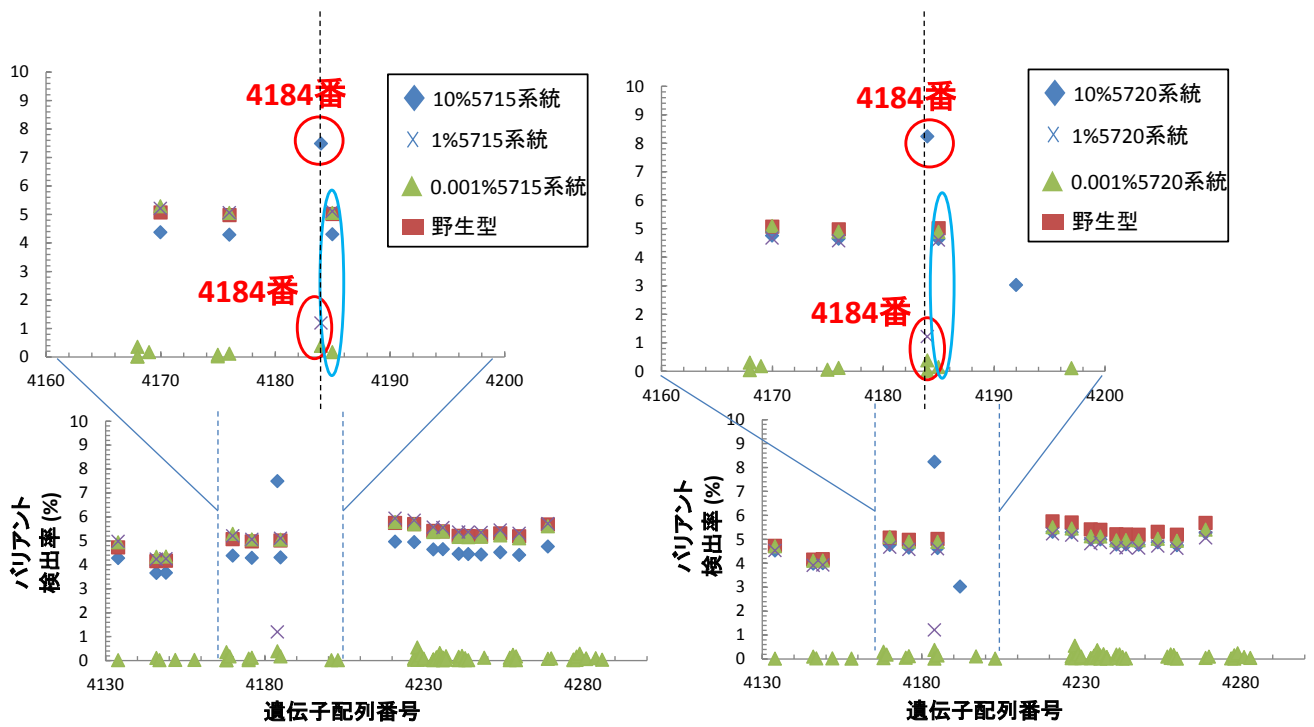


図 7. PCR-NGS 法のバリエント配列の検出

0.001%、1%、10%濃度に希釈した (A) 5715 系統、及び、(B) 5720 系統 DNA を鋳型に PCR-NGS 試験に供し、バリエント検出率を遺伝子配列番号順に算出した結果

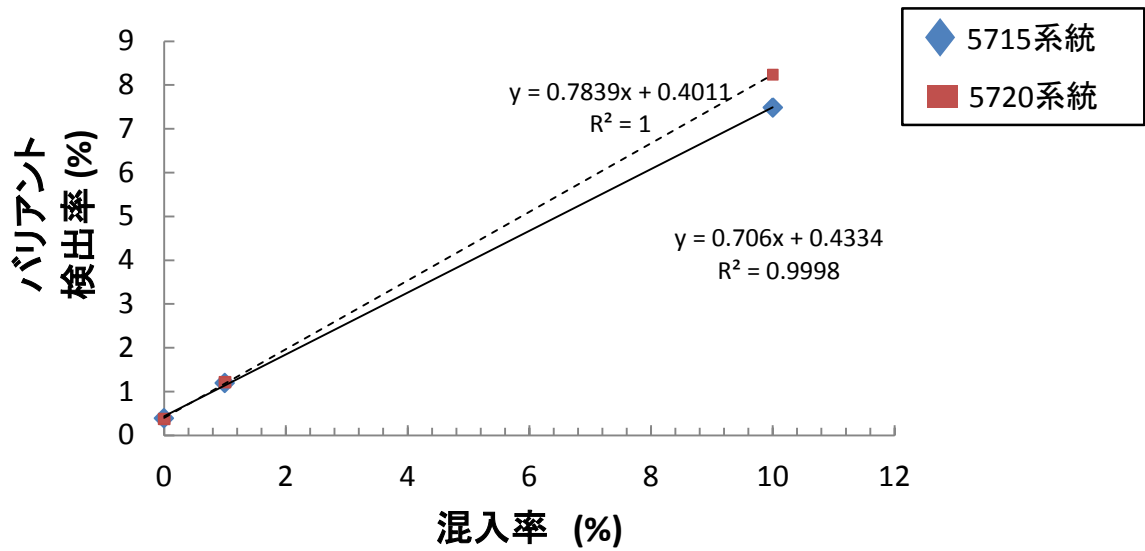


図 8. PCR-NGS 法によるバリエント検出率と除草剤耐性セイヨウアブラナの混入率の相関性
 0.001%、1%、10%濃度に希釈した (A) 5715 系統、及び、(B) 5720 系統 DNA を鋳型に PCR を行い、
 バリエント検出率を混入率に対してグラフ化

表5.1塩基変異を検知する方法の検出限界及び性質

検知法	検出限界値	性質
Cell assay	10%	定性
制限酵素スクリーニング	10%	定性
PCR	0.01~0.1%	定性・定量
次世代シーケンサー (PCR-NGS法)	1%	配列を特定・絶対定量