

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
総合研究報告書（平成 28～29 年度：分担）

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法に関する検討

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）

研究要旨

本分担研究では、平成 28 年度から 2 年間を通じて、わが国の合法的な遺伝子組換え (GM) 食品の流通を確保するために必要な①GM 食品を検知する技術、並びに、②既存の食品を比較対象にして、GM 食品の成分の相違を分析する技術の高度化を目指した。特に、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科学的知見の取集を行った。平成 28 年度では、GM 食品のゲノム DNA の 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。平成 29 年度では、引き続き新しい GM 食品の検知技術の開発を目的とし、(1) isothermal PCR (LAMP) -DNA クロマト法、並びに、(2) データベース上のリファレンスゲノム配列を使用した内在性遺伝子検知法の開発を行った。また、発芽ダイズ食品と発芽 GM ダイズ食品の成分の相違を分析する (3) トランスクリプトーム解析法の開発を行った。

協力研究者

石垣拓実（国立医薬品食品衛生研究所）
木俣慎弥（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

平成 28 年度では、遺伝子組換え (GM) 食品のゲノム DNA の 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。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。我が国では、同系統は、安全性未審査である。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。平成 29 年度では、引き続き新しい GM 食品の検知技術の開発を目的とし、以下の 3 つのテーマについて検討を行った。

1. LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の 1 粒からの検出について：世界では、GM コメの食品への混入が頻繁に報告されている。これまでに、コメを港やスーパーなどの現場で検査する汎用性に優れた方法は開発されずにいた。試料を採取する現場で、GM コメを検査するには、特殊な機器や試薬を必要とせず、迅速に判定する簡便な方法が求められる。そこで本研究では、

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて、スーパーなどで一般に市販されている、精米、無洗米、玄米などを穀粒 1 粒単位で検査する方法の開発を行った。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：GM 食品検査は、社会的、経済的な影響が大きいため、誤判定を避ける必要がある。そのため、GM 食品の検査には、高い特異性、感度及び精度が求められる。GM 食品由来のタンパク質を検査標的とした場合、加工されていない生鮮であれば、感度並びに精度よく検査は可能であるが、タンパク質は熱、加圧、pH などの物理的な影響を受け、分解又は変性しやすい。それ故、検査のための標的分子には向いていない。一方、GM 食品由来の DNA は、食品による加工の影響を比較的受けにくく、高い特異性、感度及び精度を担保した様々な加工食品の検査のための標的分子となり得るとされる。高い精度と感度を有する GM 食品検査法として、リアルタイム PCR を用いた DNA 増幅試験が用いられる。GM 食品検査を行う際には、内在性遺伝子を検知する方法が陽性コントロールとして用いられる。陽性コントロールの標的遺伝子には、組換えで挿入された有用遺伝子の最低コピー数を想定し、ゲノム中に 1 コピーのみ存在する GM 作物に特異的な内在性遺伝子の配列を標的とすることが理想とされる。本研究では、GM 食品検査用の内在性遺伝子検知法を作成する上で、ゲノム中に 1 コピーであること、リアルタイム

PCR 標的配列が特異的であることを、バイオインフォマティクスを取り入れた方法の確認を行った。また、ゲノム DNA の分解速度について、作物種子中のゲノムの状態と、ゲノム精製を行った後との違いについて、解析を行ったので報告する。

3. 発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発：発芽ダイズは発芽前を上回る栄養価が注目されており、菓子や健康食品などの加工食品に多く利用されている。しかし、これまで、ダイズ品種別に発芽前後の代謝産物の変化や遺伝子発現に関する網羅的研究が行われた報告はない。そこで、本研究テーマでは、発芽 GM ダイズのトランスクリプトーム解析、並びに、プロテオーム解析する方法の開発を行い、転写並びに翻訳レベルで発芽ダイズ品種別に、非 GM と GM ダイズ間の成分の相違を分析し、考察することとした。

B. 研究方法

平成 28 年度：

1. 試料、試薬および機器

(1) 試料

試験には、Cibus 社より提供されたセイヨウアブラナ 3 系統 (Cibus 5715 系統、5720 系統、5722 系統) と野生型品種 (Bn2wt、東北 3 号) を供した。

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

ゲノム DNA の増幅には、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、核酸染色試薬は、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。Cell アッセイに使用した核酸分解酵素は、NEB 製の T7 Endonuclease I (Cat. No.M0302S)、及び、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。制限酵素アッセイは、NEB 製の *BsrDI* (Cat. No.R0574S)、10×NEBuffer2.0 を用いた。次世代シーケンズ解析は、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。

Cell 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'-acactcttccctacacgacgctctccgatctaaccctgatgcgattgtgt-3'

1st_target-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctcgcaagctcctgcaact-3'

1st_control-F: 5'-

acactcttccctacacgacgctcttccgatctcgaagggaaggcaattca-3'

1st_control-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctaagattctctacacggattgtgg-3'

次世代シーケンサー用 2nd PCR プライマー：
SET2-F1_Primer:

5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacactatagcctacactctttc
cctacacgacgc-3'
SET2-F2_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacatagaggcacactcttt
ccctacacgacgc-3'
SET2-F3_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacaccctatcctacactctttc
cctacacgacgc-3'
SET2-F4_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacggctctgaacactctttc
cctacacgacgc-3'
SET2-F5_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacagggcgaagacactcttt
ccctacacgacgc-3'
SET2-F6_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacactaatcttaacactctttc
ctacacgacgc-3'
SET2-F7_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacaccaggacgtacactcttt
ccctacacgacgc-3'
SET2-F8_Primer:
5'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacgtactgacacactctttc
cctacacgacgc-3'
SET2-R1_Primer:
5'-caagcagaagacggcctacgagataatgagcgggtgactggagttc
agacgtgtg-3'
SET2-R2_Primer:
5'-caagcagaagacggcctacgagatggaatctcgtgactggagttc
agacgtgtg-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 VORTEX 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は、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 µL、cellulase 500 µL を加え、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×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×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×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 µL 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、REPLI-g Mini Reaction Buffer 29 μ L と REPLI-g Mini DNA Polymerase 1 μ L、及び、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 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベートした後、65 $^{\circ}$ C 3 分加熱し、DNA ポリメラーゼを不活化した。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、及び、シークエンス

(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 $^{\circ}$ C 2 分間の条件で保持した後、98 $^{\circ}$ C 10 秒間、59 $^{\circ}$ C 30 秒間、68 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 5 分間の条件で保持し、4 $^{\circ}$ 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、GelRedTM Nucleic Acid Gel Strain, 10,000 \times in water を 5 μ L 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 μ L、試料 5 μ L (10 \times Loading buffer 0.5 μ L ずつ加え混合した) をロードし、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、シークエンス用の試料として用いた。

5. Cel1 アッセイ、及び、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 μ L/well として以下のとおり調製した。超純水 33.6 μ L に 10 \times Pfu Ultra II reaction buffer Neo を 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、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) 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、残った沈殿物を乾燥させた。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 EndonucleaseI 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 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 (Agilent Technologies 社) 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×NEBuffer2.0 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。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 $\mu\text{L}/\text{well}$ として以下のとおり調製した。超純水 33.6 μL に 10 \times 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 $^{\circ}\text{C}$ 2分間の条件で保持した後、94 $^{\circ}\text{C}$ 30秒間、55 $^{\circ}\text{C}$ 30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ 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(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 \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、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 \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) 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ として以下のとおり調製した。超純水 33.6 μL に 10 \times 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。

(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 $^{\circ}\text{C}$ 2分間の条件で保持した後、94 $^{\circ}\text{C}$ 30秒間、59 $^{\circ}\text{C}$ 30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ 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°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。

平成 29 年度：

1. LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の 1 粒からの検出について：

試料

あきたこまち、ひとめぼれ、こしひかり、ゆめぴりか、つや姫の精米は、アイリスオーヤマの通信販売サイトを介して購入した。無洗米のこしひかりは、東京都内のスーパーで購入した。もち米は、山形・高島/東京農大 有機農業ネットワークで栽培されたものを使用した。LAMP 法の特異性試験には、24 種類の作物から抽出されたゲノム DNA 溶液 (10 ng/μL) を使用した。

試薬

ゲノム DNA の抽出には、HotSHOT 試薬¹⁾ Sol. A (25 mM NaOH + 0.2 mM EDTA) と Sol. B (40 mM Tris-HCl, pH 5) を使用した。コメの陽性コントロールは、ニッポンジーン社 より GM Rice Detection (IR) Rice Positive control plasmid (250 K copies/2.5 μL) をご提供いただいた。LAMP 法の反応試薬は、栄研化学製の Loopamp DNA 増幅試薬キット (Reaction mixture, RM; *Bst* DNA polymerase; 蒸留水, DW を含む) と蛍光目視検出試薬 (Fluorescent detection reagent, FD) を使用した。LAMP 法で用いたプライマーは、PrimerExplorer V5 (<http://primerexplorer.jp/>) で設計し、その合成はユーロフィンジェノミクス株式会社 に依頼した。

機器

LAMP 法による核酸増幅には、カネカ製の温調機能付き吸光度計 MyAbscope® を使用した。核酸増幅の観察は、付属のタブレット端末 (Nexus)

にインストールされた専用アプリケーションを介して行い、生データも同端末に保存した。LAMP 法で用いる試料の加熱には、タイテック製 Dry Thermo Unit DTU-1B (ヒートブロックインキュベーター) を使用した。

コメ一粒からのゲノム DNA 抽出

コメ一粒を 1.5 mL 容エッペンチューブに入れ、500 μL の超純水で 3 回洗浄した。コメについた水気をペーパータオルで拭き取り、それを新しい 1.5 mL 容エッペンチューブに移した。そこに HotSHOT 試薬 Sol. A を 100 μL 添加し、98°C のブロックインキュベーター内で 10 分間加熱した。その後、チューブを氷中に移し試料を冷却させた。次いで、HotSHOT 試薬 Sol. B を 100 μL 添加し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した。試料を 20,000 xg, 4°C の条件で 5 分間遠心し、透明な上清 50 μL をゲノム DNA 溶液として回収した。その溶液は LAMP 反応に使用するまで、4°C チャンバーに保管した。

コメ内在性遺伝子 *phospholipase D* (PLD) を標的とした LAMP 反応 (分光的検出)

PLD 遺伝子を増幅する LAMP プライマーには、以下のものを使用した。

F3: 5'-GACCTCCTCCTAGACCTCAA-3'

B3: 5'-TGACAAGGCCTGATCTTGC-3'

FIP:

5'-AACACTCCAGGCCTCACCGTGGCCGACCTCATTATTCCG-3'

BIP:

5'-GTTCCGGTCCATCGATGGCTGCAGCCTCTGGAGTGCTA-3'

LF: 5'-GGAACATCACCGGAGACGG-3'

LB: 5'-GCGGCCTGCTTTGGCTT-3'

まず、12.5 μL の 2 x RM (40 mM Tris, pH 8.8; 20 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 16 mM MgSO₄; 0.2% Tween 20; 1.6 M betaine; 2.8 mM each dNTPs を含む)、0.1 μL の 50 μM F3 (0.2 μM)、0.1 μL の 50 μM B3 (0.2 μM)、0.8 μL の 50 μM FIP (1.6 μM)、0.8 μL の 50 μM BIP (1.6 μM)、0.4 μL の 50 μM LF (0.8 μM)、0.4 μL の 50 μM LB (0.8 μM)、1 μL の FD、1 μL の *Bst* DNA polymerase と 2.9 μL の DW を混合した。この反応液 20 μL を予め 8 連 PCR チューブに分注した 5 μL の各作物由来ゲノム DNA 溶液 (50 ng)、または、4. で抽出したゲノム DNA (濃度未知) とよく混合し、25 μL の反応液系を調製した。特異性試験においては、高純度に精製された各ゲノム DNA (10 ng/μL) を用い、ポジティブコントロールとしてコメ由来 (日本晴) の DNA、ネガティブコントロールとして超純水 (NTC) を同時に解析した。

次に、MyAbscope®の測定プログラムを設定した。この設定は付属のタブレット端末を介して行った。測定波長は「B」、Delayは180 secに設定した。そして、Step1（核酸増幅）のHeatLidを80°C、Wellを63°C、Set timeを60 min、Step2（酵素失活）のHeatLidを80°C、Wellを80°C、Set timeを5 minに設定した。超純水を25 µLずつ分注した8連チューブを用いて補正を行い、チューブを取り出した後、加熱前処理を行った。こうして、測定機械のコンディションが整った後、測定用の8連チューブをセットし、Runをタップして測定を開始した。

測定終了後、タブレット端末に保存されたデータファイル（エクセル）を別のパソコンに移行させ、測定時間を横軸、吸光度を縦軸としたグラフを作成した。

目的遺伝子の検出可否の判定は、遺伝子の増幅に対応する吸光度の明確な上昇を基とした。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：

試料、試薬および機器

(1) 試料

試験には、農業生物資源ジーンバンク NARO より入手したダイズ品種 Williams82、Jack と Emerge、北海道立衛生研究所より入手した珠美人品種を供した。

(2) 試薬

ゲノム DNA の抽出・精製には、QIAGEN 製のイオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tip 100/G) と Genomic DNA Buffer Set を用いた。その試料前処理には、ニッポンジーン社製 α -amylase (Cat. No. 316-04751)、和光純正工業社製 Proteinase K (Cat. No. 160-22752)、ニッポンジーン社製 100 mg/mL RNase A (Cat. No. 318-06391)、シグマアルドリッチジャパン社製 Cellulase (Cat. No. C2730) を用いた。イソプロパノールとエタノールは、和光純正工業社製の特級グレードを使用した。定性 PCR 反応には、東洋紡社製の 2x KOD FX buffer、KOD FX (Cat. No. KFX-201) とタカラバイオ製の dNTP Mixture を使用した。PCR 用のプライマーは、ユーロフィンジェノミクス社に合成を依頼した。DNA の電気泳動に使用したアガロースは、タカラバイオ社製 LO3「TAKARA」(Cat. No. 5003) を用い、DNA の染色には、Biotium 社製 GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Cat. No. 41003) を用いた。Loading buffer は、タカラバイオ社製 (Cat. No. A6310A) を用いた。標準 DNA サイズマーカーは、タカタバイオ社製 100 bp ラダー (Cat. No. 3407A) と Invitrogen 社製 1 kbp ラダー (Cat. No. 15615-016) を用いた。PCR 産物の精製には、プロメガ社製

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9282) を用いた。プラスミド DNA の抽出・精製には、プロメガ社製 Wizard® SV Midipreps Purification System を使用した。プラスミド DNA の宿主には、東洋紡製 *E. coli* competent cell DH5 α を用いた。組換えプラスミドの作製には、クロンテック製 In-Fusion HD Cloning kit を使用した。そのプラスミドには、プロメガ社製 pGEM®-T Easy Vector を用いた。ベクターの一本鎖化には、New England BioLabs 社製の制限酵素 *EcoRI*-HF と *EcoRI* NEBuffer (x10) を使用した。リアルタイム PCR の反応溶液には、Roche 社製の FastStart universal probe master (ROX) を使用した。超純水は、ミリポア製 Milli-Q Integral 3 から採水した。

(3) 機器

粉碎機は、イワタニ社製ミルサー720G-Y を使用した。試料の加熱には、イワタニ社製カセットフーとガスボンベ、シュウ酸アルマイト鍋を用いた。または、タイテック社製 Dry Thermo Unit DTU-1B (ヒートブロックインキュベーター) もしくは Bio-Rad 社製サーマルサイクラー iCycler を使用した。定性 PCR の際のサーマルサイクラーは、Applied Biosystems 社製 Applied Biosystems Veriti®96-Well を使用した。リアルタイム PCR には、Applied Biosystems 社製 7900HT Fast Real Time PCR System を使用した。

1. 標的遺伝子配列の選定

National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されるダイズ (*Glycine max*) のゲノムデータベースより、全 20 本の染色体 DNA の配列を取得した。各番号の染色体からランダムに 1 遺伝子ずつ標的として選択した。標的の選択条件は、その遺伝子がダイズゲノム中に 1 コピーのみ存在することとし、これは NCBI の BLAST 検索を用いて推定した。標的遺伝子を検知するプライマープローブの特異性検索には、NCBI の Primer-BLAST を使用した。本研究では、いくつかの候補の内、1 番染色体上の microtubule-associated protein SPIRAL2-like 遺伝子、2 番染色体上の lectin 遺伝子、3 番染色体上の delta-Delta-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial-like 遺伝子と、8 番染色体上の HMGI/Y like protein 遺伝子の合計 4 遺伝子を標的とし、以下ではそれぞれの遺伝子を ch1, ch2, ch3, ch8 と呼称する。

3. 標的遺伝子を含むコントロールプラスミドベクターの作製

ch1, ch2, ch3 と ch8 遺伝子の各標的増幅領域は、

In-Fusion 反応 (Clontech 社) を利用して pGEM®-T Easy Vector (Promega 社) に導入した。In-Fusion 反応に要求される各 DNA 断片を増幅するために、融合箇所である末端 15 塩基には互いに相同配列を付加するよう以下の通りプライマーを設計した。

Insert ch1-F:

5'-GCGGCCGCGGGAATTTCTCAAAGTTATCAG TGGGAGGA-3'

Insert ch1-R:

5'-CATCGGAGAGAGCAGCCATTAGAAACAATG AG-3'

Insert ch2-F:

5'-AATGGCTGCTCTCTCCGATGTGGTCGATTT-3'

Insert ch2-R:

5'-ATTCCGCGCGGCAAATTGGAAGCAAAGA -3'

Insert ch3-F:

5'-CCAATTTGCCGCGGCGGAATTGATATAGTG-3'

Insert ch3-R:

5'-CATGGAGGAGTGCCGAACCCTACAATAAGC-3'

Insert ch8-F:

5'-GGGTTTCGGCACTCCTCCATGGACCCAAC-3'

Insert ch8-R:

5'-AGGCGGCCGCGAATTTGCTCGAACCATCTT TCTCC-3'

まず、ベクターに組み込む目的の DNA 断片は、上記プライマーを用い PCR で増幅した。12.5 µL の 2 x KOD FX PCR buffer (東洋紡)、0.75 µL の 50 µM primer-F、0.75 µL の 50 µM primer-R、5 µL の 2.5 mM dNTP mix、0.5 µL の KOD FX、2.5 µL の 10 ng/µL サイズゲノム DNA と 3 µL の滅菌水を混合した試薬を反応液として、次の条件で PCR を行った。95°C、2 分のプレヒーティング後、[98°C、10 秒; 60°C、30 秒; 72°C、30 秒]の反応を 30 サイクル繰り返した。その後、72°C で 7 分インキュベートした。増幅された各 DNA 断片は、1% アガロースゲル内で分離し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲルから精製した。次に、これら 4 遺伝子を導入するベクターを制限酵素を用いて一本鎖にした。500 ng の pGEM®-T Easy Vector、1 x NEBuffer (for EcoRI)、EcoRI-HF を含む 50 µL 溶液を 37°C で 1 時間インキュベートし、反応液を電気泳動後、目的の一本鎖ベクターを上記と同様の手法でゲルから精製した。以上、調製した 4 つの DNA 断片とベクターを次の条件で融合させた。増幅 DNA 断片 (各 5 ng)、2 µL の In-Fusion HD Enzyme Premix (5x) と滅菌水を混合し、合計 10 µL に調製した。この反応液を 50°C で 15 分間インキュベートし、氷冷した。この組換え

ベクターは、*E. coli* competent cell DH5α (東洋紡) に導入し、多量の組換えプラスミドベクターは、その培養菌体から Wizard® SV Midipreps Purification System (Promega) を用いて抽出精製した。ベクター内に挿入された目的 DNA の塩基配列の正確性は、サンガー法を用いたシーケンシングにより確認した。

4. リアルタイム PCR 用のプライマー対プローブの設計

各標的遺伝子 ch1, ch2, ch3 と ch8 とコントロール遺伝子 AquAdvantage (AquAd, 遺伝子組換えサケ) をリアルタイム PCR で増幅し、検出するためのプライマー対と Taq-Man プローブは、Primer Express ver.3.0.1 を用いて設計した。設計したオリゴヌクレオチド配列は、株式会社ユーロフィンに合成を依頼した。以下に設計した配列を示す。

Ch1 遺伝子

Ch1-forward:

5'-GGGAGGATTAGAGACAGAAGAACAC-3'

Ch1-reverse:

5'-CATGCAGGATGTTGGTTATGAA-3'

Ch1-probe:

5'-[FAM]CCTGCTTGTCATCCATGGGCACA-[TAMRA]-3'

Ch2 遺伝子

Ch2-forward: 5'-TCCCGAGTGGGTGAGGATAG-3'

Ch2-reverse: 5'-TCATGCGATTCCCCAGGTAT-3'

Ch2-probe:

5'-[FAM]TTCTCTGCTGCCACGGGACTCGA[TAMRA]-3'

Ch3 遺伝子

Ch3-forward:

5'-TCGGTGAAGGAAGTGGATTTG-3'

Ch3-reverse:

5'-ACAATAAGCGGCAACCTCTGA-3'

Ch3-probe:

5'-[FAM]CTTGCCGCTGACCTTGGCACTC[TAMRA]-3'

Ch8 遺伝子

Ch8-forward:

5'-CTTCACTGTCGAACCCAGCAA-3'

Ch8-reverse: 5'-ATCGTAAGGAGGGTGGTTGGT-3'

Ch8-probe:

5'-[FAM]CACGTGACCCCGCCGACA[TAMRA]-3'

AquAd 遺伝子

AquAd-F: 5'-TGCTGATGCCTCTGATACCAC-3'

AquAd-R:

5'-ATGCCTCTAGTGCAAGTTCAGTC-3'

AquAd-P:

5'-[FAM]CAGTAGTACAACGTTGGCAGATGTAT GAGAACT[BHQ]-3'

合成した各プライマーとプローブは、それぞれ蒸

留水で 50 μ M と 10 μ M に調製した。

5. 標的遺伝子の PCR 増幅効率

ch1, ch2, ch3 と ch8 遺伝子の増幅効率は、様々な DNA 鋳型濃度存在下で目的遺伝子を増加させ、そのリアルタイム PCR のデータ (Ct 値) を基に算出した。方法 4 で作成したコントロールプラスミド (3572 bp) を鋳型 DNA として用い、 $10^3 \sim 10^7$ コピー/5 μ L の 10 倍希釈系列の範囲で検討した。12.5 μ L Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4 μ L 各 primer-forward (50 μ M)、0.4 μ L 各 primer-reverse (50 μ M)、0.25 μ L probe (10 μ M)、6.45 μ L の蒸留水、5 μ L の各コピー数を含む鋳型 DNA が混合された 25 μ L の反応液を 96 ウェルプレートに分注した。これを 7900HT real time PCR system (Applied Biosystems) 内で 50°C, 2分、95°C, 10分でインキュベートした後、[95°C, 15秒; 60°C, 1分] の反応を 50 サイクル繰り返し目的遺伝子を増幅させた。得られた各増幅曲線の Ct 値は、SDS システムソフトウェア (Applied Biosystems) を用い、threshold を 0.2 に設定し定義した。次に、Microsoft 社のエクセルを用いて、鋳型 DNA 濃度を横軸 (x 軸)、Ct 値を縦軸 (y 軸) とした一次関数直線 $y=ax+b$ ($R^2 > 0.99$) を作成した。各遺伝子の PCR 増幅効率 E は、直線の傾き値 slope (a) を式: $[E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ に代入して見積もった。

6. ダイズゲノム DNA の抽出精製

ダイズ Williams82 品種の乾燥種子 6 g を超純水で 2 回洗浄し、ペーパータオルで水気をふき取った。その種子を粉砕機ミルサー (Iwatani) を用い 30 秒間破砕した。得られたダイズ粉末 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取り、これを 10 本用意した。このうち 1 本をこのゲノム抽出に用い、残りは後の実験に使用するまで -30°C に保管した。ゲノム DNA の抽出精製には、QIAGEN の Genomic tip 100/G と Genomic tip buffer set を用いた。まず、0.5 g の粉砕物に G2 緩衝液 15 mL, 500 μ L cellulase, 10 μ L RNase A (100 mg/mL)、5 μ L α -amylase (4 units/ μ L) を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。その間、数回チューブを上し溶液を混ぜた。その後、100 μ L の proteinase K (20 mg/mL) を添加し、攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。この抽出溶液を 10,000 xg, 4°C で 5 分間遠心分離し、上清 14 mL を回収した。この溶液全量を 10 秒間ボルテックスミキサーで緩やかに攪拌した後、4 mL の QBT 緩衝液で平衡化した Genomic-tip 100/G カラムにロードした。カラムを 6 mL の QC 緩衝液で 3 回洗浄した後、ゲ

ノム DNA は 50°C の QF 緩衝液 2 mL で溶出させた。そこに 2 mL のイソプロパノールを添加し、よく混和させた後、20,000 xg, 4°C, 15 分間の遠心分離で DNA を沈殿させた。上清を破棄した後、冷却 70% エタノールで沈殿をリンスし、再度 20,000 xg, 4°C で 10 分間遠心した。上清を破棄した後、数分間 DNA を風乾し 50-100 μ L の超純水で溶解させた。DNA 溶液の濃度は、Nanodrop ND1000 (Thermo) で測定し、使用するまで -20°C に保管した。

7. ダイズゲノム DNA の加熱処理

上記で抽出したダイズ Williams82 品種由来のゲノム DNA を、超純水で 10 ng/ μ L の濃度に調製した。これを 0.2 mL 容シングル PCR チューブに 100 μ L ずつ分注し、しっかりとキャップを閉めた。これと同じものを 6 本準備し、それぞれを 50, 70, 80, 90 または 100°C に設定したサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad 製) を用いて、0 (未処理)、2, 4, 6, 8, 10 分間加熱処理した。加熱直後、DNA 溶液を氷中で冷却した。これら試料を軽くボルテックス攪拌し、均質な溶液を次のリアルタイム PCR の鋳型 DNA に用いた。

8. コントロールプラスミド DNA の加熱処理

コントロールプラスミド DNA を超純水で 2×10^4 copy/ μ L となるように調製した。また、疑似ゲノム (ダイズ以外) として、じゃがいも (Atlantic 品種) から抽出したゲノム DNA を 20 ng/ μ L となるように調製した。両溶液を等量混合し、 10^4 copy プラスミド DNA/ μ L 10 ng ゲノム DNA 溶液を得た。これを 0.2 mL 容シングル PCR チューブに 100 μ L ずつ分注した。これと同じものを 4 本準備し、それぞれを 100°C に設定したサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad 製) を用いて、0 (未処理)、5, 10, 20 分間加熱処理した。加熱直後、DNA 溶液を氷中で冷却した。これら試料を軽くボルテックス攪拌し、均質な溶液を次のリアルタイム PCR の鋳型 DNA に用いた。

9. ダイズゲノム DNA またはプラスミド DNA の加熱処理による標的遺伝子の分解

加熱による標的遺伝子の DNA 分解は、リアルタイム PCR を用い、得られた Ct 値を基に相対的に評価した。96 ウェルプレートに、加熱ゲノム DNA またはコントロールプラスミド DNA を処理時間ごとに 3 ウェルずつ、4 標的分、5 μ L ずつ分注した (1 ウェルあたり 50 ng DNA)。そこに予め調製した 12.5 μ L Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4 μ L 各 primer-forward (50 μ M)、0.4 μ L 各 primer-reverse (50 μ M)、0.25 μ L probe

(10 μM) と 6.45 μL 超純水を含む反応混合液 (20 μL) を添加し、ゲノム DNA とよく混合した。このプレートを 7900HT fast real time PCR system (Applied Biosystems) 内で 50°C, 2分、95°C, 10分 でインキュベートした後、[95°C, 15秒; 60°C, 1分] の反応を 50 サイクル繰り返し目的遺伝子を増幅させた。得られた増幅曲線の Ct 値は、SDS システムソフトウェア (Applied Biosystems) を用い、auto threshold に設定し定義した。各標的遺伝子について、各処理時間サンプル (0~10 分加熱) の Ct 値から未処理 (0 分加熱) の Ct 値を減じ、 ΔCt 値を算出した。これら ΔCt 値の相対値を、PCR で増幅される鋳型 DNA の残存量、すなわち分解度として表した。 ΔCt 値の相対値への変換は、[式: $2^{-\Delta\text{Ct}}$] に代入して行った。

10. ダイズ種子粉砕物の加熱処理 (ボイル)

方法 6 で調製したダイズ Williams82 品種の種子粉砕物 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取った。そこに超純水 1 mL を添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。加熱の際の圧力上昇と蒸発を防ぐために、チューブのキャップを半開させ、その上からアルミホイルを被せた。これをカセットコンロで沸かした 99°C の湯内で 0~60 分間加熱した。加熱処理後は、試料を直ちに氷中に移し冷却した。

11. ダイズ種子粉砕物の加熱処理 (様々な温度)

上記加熱方法 (9) は直火によるため、特定の温度に設定することは難しい。そのため、ダイズ粉砕物試料を 70~100°C の温度で加熱する際は、別法としてブロックインキュベーター (TAITEC 製) を使用した。また、熱の伝導をより均一になるように、加える水の量を増加させた。方法 6 で調製したダイズ Williams82 品種の種子粉砕物 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取った。そこに超純水 5 mL を添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。加熱の際の圧力上昇と蒸発を防ぐために、チューブのキャップを半開させ、その上からアルミホイルを被せた。これを 70, 80, 90 または 100°C に設定したブロックインキュベーター内で、0~60 分間加熱した。加熱処理後は、試料は直ちに氷中で冷却した。

12. ダイズ粉砕物の加熱処理 (オートクレーブ)

方法 6 で調製したダイズ Williams82 品種の種子粉砕物 0.5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに計り取った。そこに超純水 1 mL を添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。チューブをメジュームビンの口で倒れないように固定し、キャップの代わりに綿栓でフタをした。こ

れを 121°C, 20 分の条件でオートクレーブ処理した。処理後は、試料は直ちに氷中で冷却した。処理時間に、管内の温度上昇にかかる時間は考慮しなかった。

13. 加熱処理したダイズ種子粉砕物からのゲノム DNA 抽出精製

方法 9 で得られた試料に G2 緩衝液 15 mL, 500 μL cellulase、10 μL RNase A (100 mg/mL)、5 μL α -amylase (4 units/ μL) と 5 μL のプラスミドベクター (1 ng/ μL) を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。その後、100 μL の proteinase K (20 mg/mL) を添加し、攪拌後、50°C で 1 時間インキュベートした。この抽出溶液を 10,000 $\times\text{g}$, 4°C で 5 分間遠心分離し、上清 14 mL を回収した。この溶液全量を 10 秒間ボルテックスミキサーで緩やかに攪拌した後、4 mL の QBT 緩衝液で平衡化した Genomic-tip 100/G カラムにロードした。カラムを 6 mL の QC 緩衝液で 3 回洗浄した後、ゲノム DNA は 50°C の QF 緩衝液 2 mL で溶出させた。これ以降の DNA の高純度化の工程 (イソプロパノール沈殿) は、各試料 DNA 濃度のばらつきを大きくする可能性が考えられたため、QF 画分を次のリアルタイム PCR の鋳型 DNA として保存した。抽出の際に添加したプラスミドベクターは、遺伝子組換えサケ (AquAdvantage) にユニークな塩基配列が組み込まれた pEX-A2J1 ベクターである。本研究では、外来性の遺伝子を抽出時に添加し、ダイズ由来の遺伝子と同時に検出することで、抽出効率の補正を試みた。

14. 加熱処理したダイズ粉砕物から抽出した DNA の分解

加熱処理したダイズ粉砕物から抽出した DNA の分解は、4 つの標的遺伝子 ch1, ch2, ch3 と ch8、1 つのコントロール遺伝子 AquAd を対象とし、それらのリアルタイム PCR で得られた各 Ct 値を基に相対的に評価した。まず、方法 12 で溶出した QF 画分を超純水で 100 倍希釈し、鋳型 DNA 溶液を調製した (希釈された QF 緩衝液が PCR に影響しないことは予め確認した)。96 ウェルプレートに、この DNA 溶液を処理時間ごとに 3 ウェルずつ、5 標的分、5 μL ずつ分注した (1 ウェルあたり 50 ng DNA)。そこに予め調製した 12.5 μL Faststart universal probe master (ROX) (Roche)、0.4 μL 各 primer-forward (50 μM)、0.4 μL 各 primer-reverse (50 μM)、0.25 μL probe (10 μM) と 6.45 μL 超純水を含む反応混合液 (20 μL) を添加し、ゲノム DNA とよく混合した。このプレートを 7900HT real time PCR system (Applied

Biosystems) 内で 50°C, 2分, 95°C, 10分でインキュベートした後、[95°C, 15秒; 60°C, 1分] の反応を 50 サイクル繰り返し目的遺伝子を増幅させた。得られた増幅曲線の Ct 値は、SDS システムソフトウェア (Applied Biosystems) を用い、auto threshold に設定し定義した。各標的遺伝子について、各処理時間サンプル (0~60 分加熱とオートクレーブ処理) の Ct 値から対応する AquAd 遺伝子の Ct 値を減じ、 ΔCt 値を算出した。さらに、各 ΔCt から未処理 (0 分加熱) の Ct 値を減じ $\Delta\Delta Ct$ 値を算出した。これら $\Delta\Delta Ct$ 値の相対値を、PCR で増幅される鋳型 DNA の残存量、すなわち分解度として表した。 $\Delta\Delta Ct$ 値の相対値への変換は、[式: $2^{-\Delta\Delta Ct}$] に代入して行った。

3. 発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発:

1. RNA-Seq 解析

1.1 試料の調製

発芽ダイズの調製は、宮崎大学フロンティア科学実験総合センターの隔離実験施設内で行った。発芽条件は、発芽ダイズ生産の条件下 (40°C、48 時間培養) とした。ダイズは実験に使用する量のみ発芽させ、発芽させたダイズは全て以下の実験に供した。発芽ダイズは、粒単位でトータル RNA の抽出・精製を行った。すなわち、1 粒を 1 試料に用い、乳鉢・乳棒を用いて液体窒素を加えながら粉状になるまで粉碎し、Qiagen RNeasy Plant Mini Kit の 2 カラム分を 1 試料に使用してトータル RNA を精製した。ゲノム DNA は、RNase-free DNase を使用して、完全に分解させた。得られた RNA の品質は、Agilent Bioanalyzer 2100 system (アジレントテクノロジー社) を使用し、RNA Integrity Number (RIN) 値を測定することにより評価した。RNA の濃度と精製度は、NanoDrop 2100 spectrophotometer (サーモサイエンティフィック社) を使用して推定した。得られたトータル RNA 1.5 μg を試料に次世代シーケンシング用のライブラリの調製に供した。ライブラリの調製には、NEBNext® UltraTM RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB 社) を使用し、各試料にはタグ配列を付加した。以下にその概要を記す。mRNA 精製は、poly-T oligo を付加した磁石ビーズで行った。得られた mRNA は、NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X) 中で加熱し、二価カチオン存在下で断片化させた。断片化させた mRNA は、ランダムヘキサマープライマーを使用し、M-MuLV Reverse Transcriptase (RNaseH-) により逆転写させた。cDNA の相補鎖は、dTTP の代わりに dUTP を含む dNTP を使用して DNA polymerase I により合成し RNase H を使用して mRNA を分解

させて行った。3'末をアデニル化した後、NEBNext Adaptor を付加した。合成した cDNA は、150~200 bp の鎖長を AMPure XP system (ベックマンコルター社) を使用して単離した。USER Enzyme (NEB 社) を使用して、ウラシルを含む DNA 鎖を断片化した。次に、Phusion High-Fidelity DNA polymerase、Universal PCR プライマー、Index タグプライマーを使用して PCR を行った。得られた PCR 産物は、AMPure XP system を使用して精製を行い、Agilent Bioanalyzer 2100 system を使用してクオリティチェックを行った。Index タグを付加したサンプルは、cBot Cluster Generation System (イルミナ社) を使用して、TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS キット (イルミナ社) によるフローセルへのクラスター化を行った。シーケンシングは、100-base paired-end でフローセルの 5 plex / 1 レーンを用いてイルミナ HiSeq2500 により行った。

1.2. データの解析

シーケンサーより得られた Fastq ファイルは、Genomic Workbench ver.9.0.1 を使用して、リード配列のトリミングを行った。トリミングは、アダプター配列の除去すること、10%以上の未解読塩基配列を含むリードであること、50%以上の塩基配列でクオリティスコア (Q値 ≤ 5) を有するリードの除去することを条件に行った。本試験に使用したアダプター配列は、以下の通りである。

5'アダプター:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

3'アダプター:

5'-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGT CACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3' (アンダーラインした 6 塩基は、タグ配列)

トリミングを行ったリードは、ダイズゲノム解析 (Nature, 463, 178-183, 2010) より得られた配列データベース (V1.0.29, ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-29/plants/fasta/glycine_max/dna/) をリファレンス配列に使用し、最も高いアラインメントスコアを示す場所にマッピングすると同時に、マッピング後のデータを local realignment (リマッピング) した。各サンプルに関して、RNA-Seq を行いサンプル間の遺伝子発現差解析を行った。発現差解析の条件は、各品種のデータを Two-group comparison (paired) で解析した。発現差解析では、カウントデータを使用し、データが負の二項分布に従うと仮定して平均値と Dispersion を推定し、検定を行った。Empirical Analysis of Digital Gene Expression (edgeR ソフトウェア, *Biostatistics*, 9, 321-332, 2008; *Bioinformatics*, 26, 139-140, 2010) を使用して 2 群の

比較検定を行った。条件の設定は、発現量があるとするための最初のカウント数を5リード数とした。リファレンス配列と比較し、遺伝子発現量が2倍量以上の差 ($p < 0.05$) のある遺伝子を選抜した。

2. プロテオーム解析用の試料調製

2.1. 分析試料

発芽ダイズは、解析するまでの間、 -80°C で保存した。

2.2. 試料粉碎と沈殿処理

ダイズの各品種より1粒ずつを液体窒素中で凍結し、乳鉢を用いて別々に粉碎した。粉碎物を、10%トリクロロ酢酸と0.07% 2-メルカプトエタノールを含むアセトン溶液 8 mL に懸濁した。懸濁液を 10-mL 遠沈管に回収し、 -20°C で45分間静置した。遠心分離 ($35,000\times g$, 0°C , 15分間) してから上清を除いた。沈殿は0.07% 2-メルカプトエタノールを含むアセトン溶液で3回洗浄した。洗浄後の沈殿を凍結乾燥して粉末試料を得た。

2.3. 粉末試料からのタンパク質抽出

粉末試料から 3 mg を 1.5-mL マイクロ容器に分取した。分取した粉末に抽出溶液 [6 M 尿素、2 M チオ尿素、60 mM ジチオトレイトール (DTT)、100 mM 重炭酸アンモニウム、pH 8.8] を 100 μL 加え、攪拌しながら 37°C で1時間保温した。その後、遠心分離 ($15,000\times g$, 20°C , 15分間) し、タンパク質を含む上清を回収した。

2.4. タンパク質濃度測定

回収した上清の一部を、Bradford 法による総タンパク質定量に供した。定量用の検量線は、ウシ血清アルブミンの溶液を段階希釈して作成した。

2.5. トリプシンによる試料タンパク質の加水分解

試料溶解液から総タンパク質 50 μg 分を 1.5-mL マイクロ容器に分取した。分取液に DTT を加え 37°C で 30 分間保温し、続いてヨードアセトアミドを加えてから室温で1時間静置した (還元アルキル化処理)。処理後の溶液に 100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、溶液の尿素濃度を 2 M まで下げた。最後にトリプシン 2.5 μg を加え、 37°C で 16 時間保温して加水分解反応を行った。反応後のペプチド溶液には C18 STAGE Tip による脱塩処理を施した (Anal. Chem., 75, 663-70, 2003)。脱塩後の試料を減圧下で乾燥した。

2.6. LC-MS/MS

乾燥状態のペプチド試料を、水、アセトニトリル、及び、トリフルオロ酢酸からなる溶媒 (体積比 98:2:0.1) に溶解した。出発総タンパク質量に換算して 200 ng 相当量を LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS システムの仕様と設定条件は、下記に示す。

LC : Ultimate3000 液体クロマトグラフ (ダイオネクス社)

- 分析用 C18 カラム (Tip column) : Nano HPLC Capillary Column (粒径 3 μm 、内径 75 μm 、長さ 15 cm、日京テクノス株式会社)

- 移動相 A の組成 : [水] : [アセトニトリル] : [ギ酸] = 98:2:0.1 (体積比)

- 移動相 B の組成 : [水] : [アセトニトリル] : [ギ酸] = 5:95:0.1 (体積比)

- アセトニトリル送液勾配 (分, %B, %アセトニトリル) : (0, 2, 3.86) \rightarrow (5, 2, 3.86) \rightarrow (120, 33, 32.69) \rightarrow (120.01, 95, 90.35) \rightarrow (130, 95, 90.35) \rightarrow (130.01, 2, 3.86) \rightarrow (145, 2, 3.86)

- 流速 : 毎分 350 nL

MS/MS : Q Exactive 質量分析計 (サーモフィッシャーサイエンティフィック)

- イオンモード : 陽イオンモード

- イオントランスファーキャピラリーの設定温度 : 250°C

- FullScan の m/z 走査範囲 (Scan range) : 300~1,500

- 質量分解能 (Resolution) : 70000 (MS) , 17500 (MS/MS)

- Lock Mass : On (Reference m/z = 391.28429, 445.12003)

- 測定条件ファイル : 「Top 10 Method」を用いた。すなわち、FullScan (m/z 300~1500) の質量スペクトルの上で、検出強度の高いピークから順に 10 個の MS/MS データを取得した。この FullScan と MS/MS データの取得を交互に実施するよう測定変数を設定した。前の試料由来のペプチドの検出 (キャリアオーバー) を抑えるため、各試料の測定の間それぞれ 3 回分の空測定を挿入した。

2.7. 配列データベース検索によるペプチド/タンパク質の同定

MS/MS データを配列データベース検索に供した。検索ソフトウェアとして Matrix Science 社の Mascot (ver. 2.5; <http://www.matrixscience.com/>) を用いた。検索用配列データセットは下記のとおり 4 種類作成し、アノテーションに用いた。

①CDS (Glycine max) : ダイズ CDS の配列データセット (計 73,319 件) に、3 種類の配列 [Bialaphos

resistant gene (bar)、Enhanced green-fluorescent protein (eGFP)、及び、lysyl-tRNA synthetase (SYNC1)] を加えて構築した。

②Uniprot (Glycine max) : Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) から出力したダイズ (Glycine max) のアミノ酸配列データベース (reference proteome set) 計 66,206 件 (<http://www.uniprot.org/proteomes/UP000008827>) に、上記と同様 3 種類の配列 (bar、eGFP、および SYNC1) を加えて構築した。

③Uniprot/SwissProt (Green Plants) : Uniprot/SwissProt (http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/) 2016_01 版 (計 550,299 件) から Green Plants に分類されるタンパク質配列を抜粋した (計 37,228 件)。

④NCBI/Genome (Glycine max) : NCBI Genome データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) から出力したダイズ (Glycine max) のアミノ酸配列データベース (計 71,526 件) に、上記と同様 3 種類の配列 (bar、eGFP、及び、SYNC1) を加えて構築した。

データベース検索の条件は次の通り :

Enzyme, Semi Trypsin
Maximum missed cleavage, 2
Peptide tolerance, ± 5 ppm
MS/MS tolerance, ± 0.02 Da
Mass, monoisotopic mass
Fixed Modification, Carbamidomethyl (C, +57.021)
Variable Modification, Oxidation (M, +15.995)

有意なペプチド同定は、False discovery rate (FDR) を指標にして選定した。すなわち、FDR が 1% になるようにペプチド同定のスコア閾値を調整した。

2.8. ペプチドの同定情報と検出強度値の連結

各試料から得られた LC-MS/MS のデータを Nonlinear Dynamics 社の Progenesis QI for proteomics (ver. 2.0; <http://www.nonlinear.com>) に入力し、各検出ピークの強度値を取得した。続いて、ペプチドの同定情報を各検出ピークに連結し、連結された検出ピークの強度を当該ペプチドの検出強度とした。また、タンパク質の計量値は、各タンパク質に帰属するユニークペプチドの検出強度の積算値とした。

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

平成 28 年度 :

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。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 420 bp 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。その結果、PCR による特異的な増幅産物を確認した。シーケンス解析の結果、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 420 bp 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、熱変性によるリアニリング後、T7 endonuclease を使用して、Cell1 アッセイを試みた。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。

次に、PCR-NGS 法の定量限界について解析を行った。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。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) を使用した。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。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。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。

平成 29 年度 :

1. LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の 1 粒からの検出について : ループプライマーは、通常の LAMP 法による遺伝子増幅をより迅速化する。そこで、本研究で設計した PLD 遺伝子を標的とする通常の LAMP プライマーセット (FIP, BIP, F3 & B3) の性能を評価するために、コメから抽出精製

したゲノム DNA (50 ng) を鋳型とした LAMP 反応をループプライマー (LF と LB) 存在下と非存在下で検討した。反応を 63°C で行ったところ、ループプライマー非存在下において、PLD 遺伝子の増幅曲線は反応開始から約 42 分以降に観察された。一方、ループプライマーを同反応液に添加すると、PLD 遺伝子の増幅曲線は約 20 分以降より観察され、PLD 遺伝子の増幅が顕著に加速した。

このループプライマーを利用した LAMP 法の特異性を検討するために、コメと他 24 品種の作物から抽出したゲノム DNA (50 ng) を鋳型とした LAMP 反応を上記と同様にして行った。その結果、PLD 遺伝子の増加はコメ由来のゲノム DNA に対してのみ観察され、他の作物に対する非特異的な増幅は観察されなかった。以上のことから、このループプライマー含有 LAMP 法はコメの特異的検出に有効であることが示唆され、以降、この方法を迅速 LAMP 法として PLD 遺伝子の検出に用いた。

リアルタイム PCR の場合とは異なり、LAMP 法による核酸の増幅では高度に精製された鋳型 DNA を必要としない。従って、LAMP 法においては、DNA 抽出工程を簡略化しやすい。そこで本研究では、LAMP 法に用いるゲノム DNA を簡便かつ迅速に抽出するために、試料の粉碎をすることなく、コメの最小単位である穀粒一粒から DNA を抽出した。この抽出は Hot SHOT 法を基盤とした。水洗した精米をアルカリ溶液に浸し、98°C で 5 分間熱した後、その溶液を中和することでゲノム DNA を粗抽出した。このゲノム DNA 溶液を LAMP 法の鋳型に用いると、PLD 遺伝子の増幅が観察された。この PLD 遺伝子の増幅は、様々な品種の精米、無洗米やもち米から簡易抽出されたゲノム DNA でも観察された。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い : ダイズは 20 本の異なる染色体を有する。各染色体上の DNA の分解度の違いを検討するために、まず、20 本の染色体それぞれで唯一存在する遺伝子、すなわちゲノム上に 1 コピーのみ保存される遺伝子を NCBI のデータベースを用いて検索した。マニュアル操作でランダムに遺伝子を検索した結果、8 つの遺伝子が標的候補として見出された。本研究では、標的 DNA の分解度はリアルタイム PCR で検討するため、各候補遺伝子を増幅・検出するプライマー対とプローブを設計した。設計したプライマー対が標的遺伝子の特異的に増幅可能かどうかは NCBI の primer-BLAST ツールを用いて予め検証した。4 番染色体の遺伝子を除くすべての遺伝子に対する特異性が推定されたため、本研究では、7 つの内、1 番染色体、2 番

染色体、3番染色体と8番染色体上の遺伝子を分解の指標遺伝子に決定し、以下ではそれぞれを ch1, ch2, ch3, ch8 と呼称した。

遺伝子 ch1, ch2, ch3 と ch8 の標的配列の PCR 増幅効率を検討するために、各 DNA 断片が挿入されたコントロールプラスミドを鋳型に用いたリアルタイム PCR を行った。設計した各プライマー対プローブは、ch1, ch2, ch3 と ch8 の標的配列をそれぞれ 0.94, 0.87, 0.96 と 0.96 の増幅効率で増幅した。遺伝子 ch1, ch3 と ch8 は、同様の効率で増幅することが示され、これら3遺伝子間においては、リアルタイム PCR による対等な DNA 分解度の比較が可能であることが示唆された。一方、遺伝子 ch2 はこれら3つよりもやや低い増幅効率だった。標的とする ch2 の lectin 遺伝子は、ダイズに特異的な内在性遺伝子としてその特定によく用いられるため、以下の DNA 分解の標的に含めることとした。

各標的遺伝子配列の潜在的な分解度の違いを観察するために、まず裸のゲノム DNA 水溶液を 100°C で 10 分間加熱した。そして、その加熱したゲノム DNA を鋳型としたリアルタイム PCR を行い、得られた Ct 値をもとにその試料中にどれだけ増幅可能な鋳型 DNA が残っているのかを相対的に数値化し、これを見かけ上の DNA 分解度として表した。4つの標的 DNA 配列は、いずれも加熱後 10 分までに初期鋳型量の 90% 以上が分解された。そこに至るまでに、遺伝子 ch1, ch2 と ch3 は、同程度の経時的な DNA 分解を示した。一方、遺伝子 ch8 においては、各タイムポイント (2, 4, 6, 8 分) で上3つよりやや分解されにくい傾向が観察された。これと同様の傾向は、コントロールプラスミド DNA を加熱した場合でも観察された。

次に、種子内の DNA を加熱処理した場合の DNA 分解度を観察するために、水でペースト状にしたダイズ粉砕物を 99°C の熱湯で 0 から 60 分間加熱した。そして、そこから抽出した DNA を鋳型に用いてリアルタイム PCR による DNA 分解度を検討した。その結果、4つの標的配列は加熱後 5 分以内に急激に分解し、その後は、緩やかに分解した。60 分間の加熱処理の間に、遺伝子 ch1, ch2 と ch3 は、各タイムポイントで同程度の分解度を示したが、遺伝子 ch8 はこれらよりもやや分解されやすい傾向が観察され、この分解パターンは、裸の DNA を加熱した場合とは真逆だった。一方、121°C、20 分間のオートクレーブで処理すると、それら分解度は同程度に収束した。

以上の結果から、ゲノム DNA の一部においては、その加熱による分解度が異なる可能性が示唆されるため、今度は 50°C から 100°C の様々な加熱温度にて種子内外のゲノム DNA を加熱し、その

標的遺伝子の分解度を再検討した。種子外に出た裸のゲノムは、加熱温度の増加に伴いその分解度も増加した。同様のことは種子内のゲノム DNA においても観察された。しかし、先の結果とは異なり、種子内の各標的遺伝子の分解度に差は観察されなかった。

3. 発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発：RNA-Seq 法を用いて、Jack 品種と Williams 品種で発現する発芽遺伝子を、網羅的に解析した。 edgeR プログラムを用いて、Williams 品種をリファレンスに 600 倍以上発現差のある遺伝子をリスト化した結果、660.36~21151.66 倍発現量の異なる発芽遺伝子は、16 遺伝子検出した。LC-MS/MS 法より、タンパク質計量値 [計 451 件] から変動の大きかった 20 種類のタンパク質を選択した。当該タンパク質に計量値を与えているペプチドの検出ピークは、それぞれ確認し、計量値の妥当性を検証した。その結果、RNA-Seq より得られた、発現量の違うトップ 16 遺伝子と LC-MS/MS 解析より得られた発現量差の違うトップ 20 タンパク質を比較した場合、GLYMA12G09400.1 遺伝子のみ一致し、その他の遺伝子は合致しない結果を得た。また、LC-MS/MS 解析より、GLYMA12G09400.1 遺伝子として認識したペプチドは、GLYMA11G14950.1 遺伝子と GLYMA18G52610.1 遺伝子がコードする共通ペプチドのアミノ酸配列であることが判った。

D. 考察

平成 28 年度：

新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AHASII[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シングエラー

500 bp以下の増幅断片長でPCR酵素は正確性の高いDNA polymerase (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シングエラーは、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PCR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、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。

平成 29 年度 :

1. LAMP 法によるコメ由来内在性遺伝子の 1 粒からの検出について : 本研究では、精米一粒をアルカリ溶液^リでボイルするだけで、LAMP 反応に必要な分量のゲノム DNA が抽出されることを示した。この方法は、粉碎や酵素処理等の前処理、DNA 精製の工程が省かれているため、簡便で短時間かつ安価な DNA 抽出法と考えられる。

コメ内在性の PLD 遺伝子は、コメにユニークな遺伝子であり、そのゲノム中に 1 コピーのみ存在する。今回の一粒抽出法で得られた DNA を鋳型とした LAMP 反応は、この PLD 遺伝子を効果的に増幅した。この観察から、この方法は GM コメのトランスジェニック配列の増幅にも応用できると考えられる。本実験では、うるち米のみを材料に用いたが、GM コメはタイ米に外来遺伝子を導入して作成されている。そのため、今後はタイ米一粒から PLD 遺伝子を検出できるか検討する

必要がある。また、GM コメの簡便な検出に発展させるために、CpTi 遺伝子などの GM コメを検知する LAMP プライマーセットを用いて、GM コメまたは GM コメが混入している試料から目的のトランスジェニック配列を検出できるかを検討する必要がある。

2. 加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の違い：核内の DNA は裸の状態ではなく、ヒストンタンパク質に巻きつきヌクレオソームを形成し、さらにこれらがいくつも凝集してクロマチン構造をとっている。クロマチンは、その凝集度の違いによって二種類に分けられ、低密度のほうはユークロマチン、高密度のほうはヘテロクロマチンと呼ばれる。したがって、ユークロマチンはヘテロクロマチンよりも DNA が露出された状態にあると考えられる。その DNA の構造の違いは転写制御、すなわち転写因子や化学反応の DNA へのアクセサビリティと関連するため、DNA の熱や圧力といった外部刺激に対する安定性とも関連すると予想した。そこで、本研究では、ダイズ種子内外のゲノム DNA を加熱し、そのゲノム上の特定の遺伝子の分解度を観察することでその仮説を検証した。

まず、ダイズ乾燥種子を沸騰した湯 (99°C) で加熱し、遺伝子 ch8 は遺伝子 ch1, ch2, ch3 よりもやや分解されやすいことを観察した。このことから、遺伝子 ch1, 2, 3 は核内で分解を受けにくい DNA 構造 (ヘテロクロマチン) 内に存在し、ch8 は分解されやすい構造 (ユークロマチン) 内に存在すると推察した。この分解の差がタンパク質 (ヒストン) と関係するならば、その失活具合を調節した場合、その分解度をより明確に観察できると考え、加熱の強度を変えながら同様の検討を行った。加熱温度 80~90°Cの間では 100°Cと比べて緩やかな DNA の分解が観察されたが、4 標的配列の分解度の差は観察されず、先の再現は得られなかった。前の結果は、加熱方法にガスコンロで沸かした湯を用いた場合に得られ、後の結果はヒートブロックを使用して得られた。これらのことから、DNA の分解は、加熱方法で変わるほど繊細であるかもしれない。または、インタクトな DNA 分解を遺伝子ごとで観察するにはその差が小さすぎるのかもしれない。上記の結果はすべて Williams82 で得られたが、他の品種 (Emerge, Jack, 珠美人) の場合でも各遺伝子の分解度の違いを見出すのは困難であった。

ダイズから抽出したゲノム DNA を様々な温度で加熱した場合、4 つの標的遺伝子は温度依存的に分解度が増加した。この実験では、プロテアーゼで処理した裸の DNA が用いられたことから、

観察された DNA 分解は、自身の塩基間の水素結合強度といった物理化学的性質、例えば GC 含量、に依存すると考えられる。遺伝子 ch1, ch2 と ch3 は、各加熱条件で同程度の分解度を示した一方、ch8 はこれらよりもやや分解されにくかった点について、標的とした各アンプリコン全体の GC 含量を比較したが、ch1 を除く他 3 つはほぼ同値で分解との相関性は見出せなかった。一方、分解度の指標とした各増幅領域に着目すると、それぞれのプライマー対において GC 含量や Tm 値に差はなかったが、ch8 遺伝子に対するプローブの GC 含量は他と比べて 10°C以上高かった。このことから、増幅領域 (指標) の塩基組成の違いが、直接、その分解度の違いに反映した可能性が示唆され、リアルタイム PCR による DNA の分解度の公平な評価には、標的増幅領域の塩基組成をできるだけ一致させる必要性が示された。

さらに、リアルタイム PCR による DNA 分解度の評価では、分解の標的とする遺伝子はゲノム上に 1 コピーのみ存在することが必須の条件であった。Lectin 遺伝子 (*Le1*) はダイズ特有の遺伝子で、かつそのゲノム上には 1 コピーのみ存在すると考えられる (Vodkin, et al., Cell, 34, 1023-1031, 1983; Jofuku, et al., Nature, 328, 734-737, 1987) ため、遺 GM 検査のリファレンス遺伝子として汎用されてきた。そのため、私たちも *Le1* を本研究の標的 (ch2) として使用した。しかし、4 遺伝子 ch1, 2, 3, 8 に対する PCR 増幅効率を比較すると、ch2 だけが他 3 つよりも低い値だった。再度、*Le1* の DNA 配列を BLAST 検索すると、その配列と相同性の高い配列 Lectin 2 (*Le2*; identity: 81%) が 10 番染色体にも存在することがわかり、PCR 増幅効率の低値は、*Le1* と *Le2* の DNA 配列の競合的な増幅が原因と推定された。従って、GM 食品検査におけるダイズのリファレンス遺伝子は *Le1* でなく、他の遺伝子、例えば、1 コピーでかつ検出個所によっては分解されにくい *HMGI* (ch8) の方が適切だと考えられた。

3. 発芽ダイズのトランスクリプトーム、及び、プロテオーム解析手法の開発：本研究結果より、発芽ダイズ 1 粒より、RNA-Seq 解析並びに LC-MS/MS 解析によって、トランスクリプトーム並びにプロテオーム解析が可能であることが示唆された。発芽ダイズをサンプルに RNA-Seq 並びに LC-MS/MS を行った結果、両解析法で得られた発芽ダイズ中に含有するであろう発現タンパク質リストは、完全に一致しなかった。この結果は、40°C 48 時間の発芽条件下における、発芽ダイズ中に含有するタンパク質は、発芽の際に新たに発現する遺伝子の種類と完全に一致しない

ことを示唆するデータを得た。

E. 結論

本研究結果から、Cell 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定量可能な方法であることが示唆された。

LAMP 反応に必要な十分なゲノム DNA は、精米一粒と HotSHOT 試薬を用いて簡便かつ迅速に抽出することが可能であることが判った。

加熱によるダイズ染色体 DNA の分解度の差は、細胞内外において観察されなかった。検出方法に用いたリアルタイム PCR は、高感度の DNA 検出法だが、DNA の分解度を観察するには、その解析手法の特徴、特にプライマー対とプローブの設計を厳密に考慮する必要性が示唆された。また、発芽ダイズのトランスクリプトーム解析、並びに、プロテオーム解析を行う開発し、非 GM 型ダイズと GM 型ダイズを比較する方法を確立した。本法は、ダイズ一粒単位で解析可能であった。40°C48 時間発芽させたダイズ中の転写もしくは翻訳レベルで解析した発芽遺伝子は、異な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) Nakanishi, K., Fujii, U., Ohtsuki, T., Kimata, S., Soga, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Ikeda, M., Nakamura, K., Kondo, K. Effect of sodium carboxymethyl cellulose in processed rice foods on detection of genetically modified rice-derived DNA. Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 2018 (Submitted)
- 2) Nakamura, K., Ishigaki, T., Kobayashi, T., Fujii, U., Soga, K., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kawakami, H., Nishimaki-Mogami, T., Kondo, K. Identification of chickpea (*Cicer arietinum*) in foods using a novel real-time polymerase chain reaction detection method. Journal of Food Composition and Analysis, 2018 (Submitted)
- 3) Kondo, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Sakata, K., Obitsu, S., Noguchi, A., Fukuda, N., Nagasawa, E., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. Scientific Reports, 7, 14942, 2017

- 4) Sugano, Y., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Nozomi, F., Suzuki, T., Kondo, K. Rapid identification method of *Omphalotus japonicas* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 58, 113-123, 2017
邦文 (菅野洋平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成 : PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法)
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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
- ##### 2. 学会発表
- 1) 中村公亮、石垣拓実、榎藤崇裕、菅野洋平、田中秀典、橋口正嗣、明石良、近藤一成 : ダイズ品種間における発芽遺伝子の発現プロファイルの違い—第 1 報—、第 113 回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017 年 11 月
 - 2) 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、佐藤恵美、瀧屋俊幸、田中智樹、布藤聡、曾我慶介、中村公亮、近藤一成、高島令王奈、橘田和美 : デジタル PCR による組換えトウモロコシ定量スクリーニング法のコーンスターチへの適用、第 113 回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017 年 11 月
 - 3) 菅野陽平、青塚圭二、坂田こずえ、中村公亮、

- 鈴木智宏、近藤一成：LAMP法を用いた有毒キノコの迅速判別法の構築—国内産クサウラベニタケ判別法の開発について—、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
- 4) 近藤一成、加藤怜子、中村公亮、坂田こずえ：Apoptosis inducing factor (AIF) 核内作用解明のためのミトコンドリア局在性 AIF 変異体細胞の構築、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
 - 5) 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、近藤一成：LAMP法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築、第54回全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017年11月
 - 6) 藤井宇希、中西希代子、中村公亮、大槻 崇、曾我慶介、岸根雅宏、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、穂山浩、池田恵、近藤一成：コメ加工食品中のカルボキシメチルセルロースナトリウムがDNA抽出精製効率、並びに、遺伝子組換え食品検査へ与える影響について、第54回全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017年11月
 - 7) 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、中村公亮、近藤一成、高畠令王奈、橘田和美：デジタルPCRを利用した遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の開発とその性能評価、AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第20回記念年次大会、東京、2017年7月
 - 8) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、加藤怜子、高崎一人、布藤聡、近藤一成：食品中のゲノムDNAの1塩基変異を検知する方法の開発と性能比較、日本食品化学学会 第23回総会・学術大会、2017年6月
 - 9) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成：遺伝子組換えサケ (AquAdvantage salmon) を対象とした系統特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第23回総会・学術大会、2017年6月
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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：アクリリ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
 - 13) 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
 - 14) 菅野陽平、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、近藤一成：Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を用いたツキヨタケの迅速判別法の検討、第112回日本食品衛生学会学術講演会、函館、2016年10月
 - 15) 高畠令王奈、大西真理、布藤聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2016年7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、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
 - 17) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、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ア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
 - 18) 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
 - 19) 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

20) 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、高嶋令王奈、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

なし
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