

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

平成28年度 総括・分担研究報告書

(H27-食品-一般-004)

研究代表者 五十君 静信

東京農業大学

平成29(2017)年5月

目 次

I. 平成 28 年度総括研究報告書	
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	1
研究代表者 五十君 静信	
II. 分担研究報告書	
1. バイオテクノロジー応用微生物の安全性	9
五十君 静信	
2. バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析	17
手島 玲子	
3. バイオテクノロジー応用食品の トランスクリプトーム解析 (1) (2)	23
小関 良宏	
4. バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析	31
太田 大策	
5. ニワトリのモデル組換え体の作出	39
堀内 浩幸	
6. バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション	43
今村 知明	
7. 新育種法を用いた作物の検出のための未知領域解析手法の検討と情報収集	93
近藤 一成	
8. 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	113
中村 公亮	
8. アレルゲンデータベースによるアレルゲン性評価に関する研究	133
安達 玲子	

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究

研究代表者 五十君 静信 東京農業大学 教授

研究要旨

種子植物を宿主にした遺伝子組換え (GM) 食品の安全性確保と安全性にかかわる評価法に関する研究に加え、バイオテクノロジー技術を用いて開発が進んでいる GM 微生物、GM 動物等を対象として研究を行った。多様な機能を有する GM が実用化に向けて開発され、バイオテクノロジー技術も多様化していることから、それらの安全性評価並びに規制のあり方、検知法、さらにはリスクコミュニケーションのあり方などについて検討することは急務である。多様化・複雑化するバイオテクノロジー応用食品の安全性評価に対応するためのオミクス手法の整備、定量解析手法並びに規格への反映化をめざすこと、消費者に受容されにくい状況が続いている GM 食品の本質的原因の究明並びに社会的受容の促進を大きな柱とし研究を進めた。加えて未承認 GM 食品の検知技術の開発及びスタック品種の検知法について検討を行った。

オミクス解析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積・整備では、バイオテクノロジー技術を用いて開発された GM 微生物、GM 動物等に関して、それらの安全性評価への網羅的技術（トランスクリプトーム、プロテオーム及びメタボローム）による解析結果を総合することで、モデル GM を対象として安全性評価法の検討を進めた。平成 28 年度は、分担研究者らにより新たに開発された GM ニワトリ、GM 微生物等のモデル GM について各種オミクス技術を用いる解析・検討を行った。さらに新開発食品の安全性評価で現在最も重要となっているアレルギー性に関するデータベース化、多様化するバイオテクノロジー技術並びに多様化する GM 食品の機能に関する情報収集を行い、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収集を進めた。

リスクコミュニケーション関連では、消費者に受容されにくい状況が続いているバイオテクノロジー応用食品の本質的原因の究明並びに社会的受容の促進を試みる。GM 食品が受容されない本質的原因の究明に取り組むとともに、動植物の育種や品種改良の現場における技術として、重要性が増す一方である GM 及び NBT 技術について、国民の正しい理解と判断を手助けするために必要なコミュニケーションツールおよび手法の開発に取り組んだ。

倫理規定並びにカルタヘナ法等各種法令遵守のうえ研究を行った。

研究分担者

手島玲子 徳島文理大学香川薬学部
特任教授
今村知明 奈良県立医科大学 教授
小関良宏 東京農工大学大学院工学研究院
教授
太田大策 大阪府立大学大学院 教授
堀内浩幸 広島大学大学院 教授
近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所 部長

安達玲子 国立医薬品食品衛生研究所 室長
中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所 室長
A. 研究目的

多様な機能を有する遺伝子組換え (GM) 食品が実用化に向けて開発され、バイオテクノロジー技術も多様化していることから、それらの安全性評価並びに規制のあり方、検知法について検討し、それらの方向性に必要な基礎的な知見と方法論を提供することを目的とする。また、

GM 食品に対する消費者の意識は、リスク認知と受容性のかい離が大きいため、食糧生産技術として重要な GM・NBT 技術について、消費者が正しく理解した上で判断するために有効なコミュニケーション手法を明らかにする。加えて未承認 GM 食品の検知技術の開発及びスタック品種の検知法についての検討、食品の安全性評価に必要なアレルギー情報のデータベース化を行うことを目的とした。

B. 研究方法

種子植物を宿主にした遺伝子組換え (GM) 食品の安全性確保と安全性にかかわる評価法に関する研究に加え、バイオテクノロジー技術を用いて開発が進んでいる GM 微生物 (遺伝子組換え乳酸菌、ランダムミュートーション法により得られた乳酸菌変異株)、GM 動物 (緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) 遺伝子を有する組換えニワトリ) 等を対象としてオミクス解析などによる網羅的技術 (トランスクリプトーム、プロテオーム及びメタボローム) による解析結果を総合することで、モデル GM 食品を対象として安全性評価としての有用性について具体的な知見を提供した。H28 年度は特に GM 動物として GFP 導入ニワトリについて網羅的技術による検討を行った。

トランスクリプトーム解析では、雌のニワトリの非組換え体である野生種および GFP ヘテロ導入遺伝子組換え体より血液を採取し、白血球を得て中に発現している遺伝子についてマイクロアレイにより解析した。マイクロアレイでの結果より明確にシグナルを検出できた遺伝子群 25,714 遺伝子を解析対象として、非組換え体と組換え体で発現変動遺伝子を有意水準 1% として抽出した結果、1,883 遺伝子が得られた。このうち組換え体で非組み換え体の発現量の半分以下であった遺伝子が 299 遺伝子、組換え体で 2 倍以上の発現量を示したものが 27 遺伝子得られた。GM 微生物については、ヒト腸管上皮細胞との相互作用についても、トランスクリプトーム解析を行った。

プロテオーム解析では、GFP タンパク質遺伝子組換え並びに非組換えにわたりを用いて、それぞれ雌 3 個体の血清よりタンパク質を抽出し、2D-DIGE を行い、GM, NGM 間で発現に有意差のみられた 7 スポットにつき、タンパク質の同定を nanoLC-MS/MS 分析で行った。

メタボローム解析では、平成 27 年度に整備したニワトリメタボロミクスプラットフォームを基にして代謝物一斉解析を実施した。分析には、GFP タンパク質遺伝子組換え並びに非組換えにわたりから採取した血液を用いた。血液は、改変体と非改変体のそれぞれ 4 個体 (1 ヶ月齢) の雌個体から採取した。血漿サンプルの分析前処理法の最適化後、親水性画分と疎水性画分に分画した。それぞれの画分に含まれる代謝物をガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析装置によって計測し、222 個の代謝物ピークを再現性良く観測した。このうち 121 個の代謝物を同定し、統計解析を行った。

新規育種技術を用いて得られた食品の新しい検知法と評価法の開発では、新規育種技術の一つである Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM) を用いて、セイヨウアブラナ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子に 1 塩基のみ変異させて得られたとされる除草剤耐性のセイヨウアブラナについて、検討した。①従来の方法 (Cel-1 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新しい方法 (PCR-NGS 法) の検出感度に関する検証を行った。

遺伝子組換え接ぎ木トマトについて、GUS 遺伝子を導入したマイクロトムを材料とし、組換えトマト台木に非組換えトマトの穂木を継いだ個体 (N/T) および非組換えトマト台木に組換えトマト台木を継いだ個体 (T/N) 各数個体を作成・栽培し、成熟したものを順次収穫し食品成分分析を進めている。

アレルギー性予測解析ツールの一つであるアレルギー・エピトープ情報データベース Allergen Database for Food Safety (ADFS) の更新・充実により、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルギー性評価系に関する研究を行った。2015 年 6 月から 2016 年 5 月までの 1 年間に NCBI PubMed に掲載された論文からエピトープ情報に関するものを選択し、8 種のアレルゲンタンパク質の linear epitope、及び 3 種のアレルゲンタンパク質の conformational epitope の新規情報を得た。

リスクコミュニケーションについては、①新たな説明ロジック及び説明ツールの開発として、平成 27 年度の研究成果を踏まえ、年代別の説明ロジックについて、ライフステージの変化に着目した消費者アンケートを設計し、実施した。また、食品安全に対する消費者意識の変

化について、過去と同じ質問でのアンケート調査を実施し、消費者の食品安全に対する感度の変化を調べた。②先進国や食品以外の分野における事例調査として、GMサーモンについて、定期的に海外の報道状況に対する調査を行った。ゲノム編集に関する欧州の政策および研究開発の最新動向については、2017年2月に開催される国際シンポジウムに参加して情報収集を実施する予定である。

研究方法の詳細については、各分担研究報告書を確認していただきたい。

倫理面への配慮

GM微生物ならびに動物において、いずれも閉鎖系での栽培・飼育になるので、各分担研究者の所属する研究所での遺伝子組換え生物安全管理委員会の許可を得て研究を行った。さらにそのGMの各研究所への配布については、カルタヘナ国内法に準拠するため、生殖不可能な状態にして配布することに配慮した。

動物実験については、分担研究者の所属する研究所での動物実験倫理規定に従って行った。

リスクコミュニケーションに関する研究での、意見聴取、インタビューにおいては不利益な個人情報が漏れないような配慮を講じた。また、人を対象とする疫学研究に関する倫理指針に該当する研究内容が含まれるため、奈良県立医科大学の倫理委員会に於いて承認を受けて研究を行った。

C. 研究結果 および D. 考察

バイオテクノロジー応用食品のオミクス手法を用いた網羅的解析

種子植物を宿主にした遺伝子組換え(GM)食品の安全性確保と安全性にかかわる評価法に関する研究に加え、バイオテクノロジー技術を用いて開発が進んでいるGM微生物(エルシニアの表層抗原を固定化した組換え乳酸菌)、GM動物(緑色蛍光タンパク質(green fluorescence protein: GFP)遺伝子を有する組換えニワトリ)等を対象としてオミクス解析などによる網羅的技術(トランスクリプトーム、プロテオーム及びメタボローム)による解析結果を総合することで、モデルGM食品を対象として安全性評価としての有用性について具体的な知見を提供した。H28年度は特にGM動物としてGFP導入ニワトリについて重点的に網羅的検討を行った。

トランスクリプトーム解析では、雌のニワトリの非組換え体である野生種およびGFPヘテロ導入遺伝子組換え体より血液を採取し、白血球を得て中に発現している遺伝子についてマイクロアレイにより解析した。マイクロアレイでの結果より明確にシグナルを検出できた遺伝子群25,714遺伝子を解析対象として、非組換え体と組換え体で発現変動遺伝子を有意水準1%として抽出した結果、1,883遺伝子が得られた。このうち組換え体で非組み換え体の発現量の半分以下であった遺伝子が299遺伝子、組換え体で2倍以上の発現量を示したものが27遺伝子得られた。GM微生物(エルシニアの表層抗原を固定化した組換え乳酸菌)については、細胞系を用いたGM微生物とヒト腸管上皮細胞の相互作用に関するトランスクリプトーム解析を行い、安全性評価法の具体的な実験系としての有用性を検討した。

プロテオーム解析では、GFPタンパク質遺伝子組換え並びに非組換えにわたりを用いて、それぞれ雌3個体の血清よりタンパク質を抽出し、2D-DIGEを行い、GM, NGM間で発現に有意差のみられた7スポットにつき、タンパク質の同定をnanoLC-MS/MS分析で行った。

メタボローム解析では、平成27年度に整備したニワトリメタボロミクスプラットフォームを基にして代謝物一斉解析を実施した。分析には、GFPタンパク質遺伝子組換え並びに非組換えにわたりから採取した血液を用いた。血液は、改変体と非改変体のそれぞれ4個体(1ヶ月齢)の雌個体から採取した。血漿サンプルの分析前処理法の最適化後、親水性画分と疎水性画分に分画した。それぞれの画分に含まれる代謝物をガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析装置によって計測し、222個の代謝物ピークを再現性良く観測した。このうち121個の代謝物を同定し、統計解析を行った。

新規育種技術を用いて得られた食品の新しい検知法と評価法の開発

新規育種技術の一つであるOligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM)を用いて、セイヨウアブラナ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子に1塩基のみ変異させて得られたとされる除草剤耐性のセイヨウアブラナについて、検討した。①従来の方法(Cel-1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新しい方法(PCR-NGS法)の検出

感度に関する検証を行った。

遺伝子組換え接ぎ木トマトについて、GUS 遺伝子を導入したマイクロトムを材料とし、組換えトマト台木に非組換えトマトの穂木を継いだ個体 (N/T) および非組換えトマト台木に組換えトマト台木を継いだ個体 (T/N) 各数個体を作成・栽培し、成熟したものを順次収穫し食品成分分析を進めている。

アレルギー性予測解析ツールの1つであるアレルギー・エピトープ情報データベース Allergen Database for Food Safety (ADFS) の更新・充実により、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルギー性評価系に関する研究を行った。2015年6月から2016年5月までの1年間にNCBI PubMedに掲載された論文からエピトープ情報に関するものを選択し、8種のアレルゲンタンパク質の linear epitope、及び3種のアレルゲンタンパク質の conformational epitope の新規情報を得た。

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション

GM (genetically modified) 食品に対する日本の消費者の受容は、その登場時から一貫して低く、改善の兆しは見られない。その一方で、GM 技術は発展してきており、従来の GM 技術とは異なる特徴を持った NBT (new breeding technologies) のような技術も登場している。このような状況下でリスクコミュニケーションの複雑性は増し、また、一層慎重な対応が求められるようになってきている。

GM 食品が受容されない本質的原因の究明として、消費者の年代別による生物の基礎的知識やリテラシーの違いを把握し、年代によるコミュニケーション手法の検討、および円滑なリスクコミュニケーションに必要な要因の抽出を実施した。

①新たな説明ロジック及び説明ツールの開発として、平成27年度の研究成果を踏まえ、年代別の説明ロジックについて、ライフステージの変化に着目した消費者アンケートを設計し、実施した。また、食品安全に対する消費者意識の変化について、過去と同じ質問でのアンケート調査を実施し、消費者の食品安全に対する感度の変化を調べた。②先進国や食品以外の分野における事例調査として、GM サーモンについて、定期的に海外の報道状況に対する調査を行った。ゲノム編集に関する欧州の政策および

研究開発の最新動向については、2017年2月に開催される国際シンポジウムに参加して情報収集を実施した。

E. 結論

GM 及び non-GM ニワトリのオミクス解析から、外来遺伝子が導入された TG ニワトリにおいて、代謝系、遺伝子の転写系及び翻訳されるタンパク質で non-TG ニワトリと比較して大きく変動する因子が特定された。これは組換え体由来の産物ベース (いわゆるプロダクトベース) での安全性評価項目として、GM の有無、食品としてヒトが摂取した際の安全性の基準として利用できることが予想される。

プロテオミクス解析は、遺伝子組換え食品の安全性評価において、非組換え食品との定量的比較解析により有用な情報を与えることが示された。また、ターゲットを絞ったオミクス解析の安全性評価への応用も可能と思われ、安全性評価に有用なバイオマーカーの探索にも道を開くものと思われる。さらに、遺伝子組換えにより宿主に引き起こされる現象の作用機作を知る観点からも有用であることが示された。GM 微生物とヒト腸管上皮細胞との相互作用の検討では、安全性評価に用いる実験系としての知見の集積を行うことができた。

次世代型育種技術 (NBT) によって作出された生物由来の食品材料の代謝物蓄積の評価法の整備にも寄与する。特に、ゲノム編集ターゲット遺伝子以外のオフターゲット変異によって起こりうる代謝生化学的な影響を網羅的に解析し、ゲノムワイドな配列変異情報、トランスクリプトーム情報、プロテオミクス情報と統合解析し、NBT によって作出される食品素材の評価方の整備に結びつけることができる。新育種技術、特にゲノム編集を用いた作物及び魚類の研究開発が活発に行われている。一方で、行政的取り扱い判断のための科学的知見及び利用する国民の意識の調査は十分でない。法律的解釈に加えて、主に科学的知見の収集を行い、科学的見解をまとめる。これらの成果は、厚生労働省がゲノム編集技術を用いた作物・動物の申請時の行政的判断を行うのに重要な材料となると期待される。

新規育種技術の一つである ODM を利用して開発され、海外では商業栽培が計画されている除草剤耐性セイヨウアブラナ 5722 系統の検知が可能かを検証すること、また、ゲノム編集部位

とその周辺の状態を評価する新しい方法の開発が期待できる。

遺伝子組換え食品は、多様化するバイオテクノロジー技術を用いて開発されるため、そのリスクの1つであるアレルゲン性を予測することが非常に重要となる。本研究は、アレルゲン性予測解析法の1つとして開発したアレルゲン・エピトープ情報データベース(ADFS)に関して、最新の知見を取り入れてその情報内容を継続的に更新し充実させるものであり、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルゲン性の評価に大きく貢献するものと考えられる。

リスクコミュニケーションについては、ゲノム編集およびGM関連の各技術の最新動向および各国の対応状況を調査し、世界的動向の最新状況を把握し、同時に、国内消費者の調査を実施し、消費者の受容性の状況、受容性が変化するポイント(ライフイベント、年代等)を把握し、リスクコミュニケーションにおける効果的な働きかけの内容、セグメントを明らかにし、リスクコミュニケーション手法を開発することが期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 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. 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。
4. Komoto K., Okamoto S., Hamada M., Obana N., Samori M., and Imamura T. Japanese consumer perceptions of genetically modified food: Findings from an international comparative study. *Interactive Journal of Medical Research*, 2016, vol. 5, iss. 3, e23, p.1-19.
5. Ogawa T., Sasaki T., Okazawa A., Teshima R., Misawa N., Ohta D.: Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. *Japanese J. Food Chem. Safety* 23, 9-19, 2016
6. Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, Kiyono H. "Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody". *Regul Toxicol Pharmacol*. 76, 128-136 (2016)
7. Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. "Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272" *Food Hyg.Saf.Sci.* 57, 1-6 (2016)
8. Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S, Poulsen LK, Privalle L, Ward JM, Doerr N, Rasclé JB. "Inter-laboratory optimization of protein extraction,

separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens” *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198-2207 (2016)

9. Mano J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome S., Hayashida S., Kawakami H., Kurimoto Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Takabatake R., Kitta K. “Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR” *Food Chemistry* 226, 149-155 (2017)
10. 高谷幸、山本茂貴、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、山口健太郎、池田佳代子、名倉 卓、南谷 怜、一蝶茂人. フードディフェンス食品防御対策ガイドライン準拠. 今村知明 [編] 2016年7月22日.
11. 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. 学会発表

1. 小川拓水, 鹿島光司, 幸義和, 岡澤敦司, 清野宏, 太田大策, コメ型経口ワクチン Mucorice-CTB のメタボローム解析, 第34回日本植物細胞分子生物学会大会 2016年9月(上田)
2. Ezaki R, Hirose F, Furusawa S, Horiuchi H. Stable and simple culture protocol for chicken primordial germ cells using apoptosis inhibitor. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22, 2016, Fukuoka
3. Nakagawa Y, Ezaki R, Sakuma T, Kuroiwa A, Yamamoto T, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken primordial germ cells using genome editing tools. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima
4. Kameyama F, Nakagawa Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken epiblast derived stem cells using CRISPR/Cas9. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima
5. 江崎僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 堀内浩幸. アポトーシス阻害剤を活用したニワトリ始原生殖細胞の新規培養方法. 第39回日本分子生物学会年会 2015年12月1日(横浜)
6. 平野朝子, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリエピブラスト幹細胞はナイーブ型かプライム型か. 第39回日本分子生物学会年会 2015年12月1日(横浜)
7. 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10月
8. 中村公亮, 石垣拓実, 野口秋雄, 坂田こずえ, 加藤怜子, 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10月
9. 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10月
10. 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
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
12. 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, 2016年度 AOAC 日本セクション年次大会, 東京, 2016年7月
13. 高畠令王奈, 増渕友子, 布藤聡, 峯岸恭孝, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子, 倉嶋たけ代, 真野潤一, 橘田和美: 遺伝子組換えトウモロコシ MIR162 の系統特異的定量検知法の開発および妥当性確認, 2016年度 AOAC 日本セク

ション年次大会，東京，2016年7月

14. 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，2016年度AOAC日本セクション年次大会，東京，2016年7月
15. 高畠令王奈，鍵屋ゆかり，峯岸恭孝，布藤聡，野口秋雄，近藤一成，最上（西巻）知子，真野潤一，橘田和美：LAMP法を用いた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スクリーニング的定性検知法開発，日本食品化学学会第22回総会・学術大会，高知，2016年6月
16. 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
17. 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

18. 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
19. 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

バイオテクノロジー応用微生物の安全性

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 教授

研究要旨

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物のヒトや動物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え細菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を行う。

平成27年度までに、モデル乳酸菌組換え体に関するオミクス(トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム)による網羅的の解析が終了したので、平成28年度は遺伝子組換え微生物の安全性評価に用いる為の組換え体とヒト腸管上皮細胞の相互作用に関する評価手法について検討を行った。

エルシニアの表層抗原を乳酸菌表層に固定発現したモデル組換え体を作成し、ヒト腸管上皮細胞である Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel1 細胞との相互作用について評価を試みた。培地、宿主乳酸菌、組換え乳酸菌の3者を細胞と反応させた後、

協力研究者

梶田 和彌 東京農業大学
梶川 揚申 東京農業大学
武田 昌之 東京農業大学
関根 侑 東京農業大学

ないことが示されており、用いた宿主乳酸菌と挿入遺伝子産物の組合せにより多様な免疫影響が起こることが示されており、挿入遺伝子産物単独の示す免疫影響とは異なった免疫影響が観察されることがある。

先行する研究成果により、サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現したモデル乳酸菌組換え体に対しオミクス解析を行い、組換え体と非組換え体の網羅的な比較を行った。その結果が、元株と GM 株のゲノムの一部が欠損しているのではないかという知見が得られてため、全ゲノム解析により比較検討を行い、遺伝子の状況を評価することにした。本年度は、モデル

A. 研究目的

モデル組換え体を作成し組換え微生物で特に重要と思われる安全性に関する知見を集積し、これらの検討により得られた有用な安全性評価手法を提供する。これまでの研究により、遺伝子組換え乳酸菌の免疫系への影響は、組み込む遺伝子産物単独の性質を必ずしも反映し

乳酸菌の作成及び、遺伝子組換え微生物の安全性評価に用いる為の組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価手法について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニアの表層抗原 Invasin を菌体表層に固定化発現させた乳酸菌を作出しモデル組換え体とした。乳酸菌は、*Lactobacillus casei* 394 を用いた。また、ノサシバエ由来の遺伝子を用いたランダムミュートーション法によりエリスロマイシン耐性を付与した同菌変異株を 100 株、作成した。

(2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価

ヒト腸管上皮細胞モデルとして Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞を用いた。情報にしたがい培養・継代し、以下の実験に用いた。C2BBel 細胞を培養・継代し、MOI: 100 となるように宿主乳酸菌、エルシニア抗原発現モデル組換え乳酸菌を接種し、37°C で 1 時間培養後、細胞から全 RNA を回収し、細胞のメッセンジャーRNA を次世代シーケンサー網羅的に解析した。培地コントロールに対し乳酸菌親株、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞の相互作用をトランスクリプトーム解析の手法にて評価した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニア表層抗原 Invasin を乳酸菌菌体表層に固定化発現させた組換え体を作成し、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用を評価するモデル組換え体とした。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミュートーション法で変異株を作成すると、ゲノムのレアレンジメントをおこし、導入遺伝子を単純

に挿入した変異株を作成することが困難であるため、新規のノサシバエ由来の遺伝子によるランダムミュートーション法を確立し、エリスロマイシン耐性を付与した変異株を 100 株ほど作成した。得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、ゲノム乗れアレンジメントらしき現象は観察されず、エリスロマイシン耐性遺伝子が挿入されていた。

(2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価 (トランスクリプトーム解析)

培地コントロール、宿主乳酸菌、モデル乳酸菌組換え体をヒト腸管由来細胞に 1 時間暴露させた後、細胞のメッセンジャーRNA について回収し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。シーケンス結果の概要(表 1)、マッピング統計データ(表 2)は、表の通りであった。

解析結果を、図 1, 図 2 に示した。図及び表の表記は、N: 培地、C: 宿主乳酸菌、IP: モデル組換え乳酸菌を示している。Log2 FC を、1.6 とした場合、培地コントロールに比べ、宿主乳酸菌では 53 遺伝子の発現が、モデル組換え乳酸菌では 94 遺伝子の発現が 3 倍以上に上昇していることがわかった。

D. 考察

(1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニア表層抗原 Invasin を乳酸菌菌体表層に固定化発現させた組換え乳酸菌では、乳酸菌菌体表層に固定化して発現している *invasin* が、ヒト腸管上皮細胞とどのような相互作用を示すのかが興味深い。エルシニアの当該抗原はヒト腸管細胞 M 細胞の腸管腔側に発現する β 1-integrin と相互作用することが知られている。モデル組換え

乳酸菌に、この抗原が加わることで、ヒト腸管上皮細胞との相互作用がどのように反応するのかについて評価するためにモデル組換え体の作成を行った。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミューテーション法で変異株を作成すると、ゲノムのレアレンジメントをおこし、導入遺伝子を単純に挿入した変異株を作成することが困難であった。そこで、新規のランダムミューテーション法として、ノサシバエ由来の遺伝子によるランダムミューテーション法の確立を試みた。エリスロマイシン耐性を付与した変異株を 100 株ほど作成し、得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、ゲノムのレアレンジメントらしき現象は観察されず、エリスロマイシン耐性遺伝子が単純に挿入されていることが確認された。これらの変異株は、今後の検討のモデル乳酸菌組換え体として用いることが可能と思われる。

(2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価 (トランスクリプトーム解析)

培地コントロール、宿主乳酸菌、モデル乳酸菌組換え体をヒト腸管由来細胞に 37°C 1 時間暴露させた後、細胞のメッセンジャーRNA について回収し、次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行った。培地コントロールに比べ、宿主乳酸菌では 53 遺伝子の発現が、モデル組換え乳酸菌では 94 遺伝子の発現が 3 倍以上に上昇していることから、エルシニアの抗原が乳酸菌に加わることにより、およそ 40 の遺伝子が有意にその発現が増強していることが示された。現在変化したそれぞれの遺伝子について解析を進めている。

E. 結論

遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出では、エルシ

ニアの表層抗原 Invasin を菌体表層に固定化発現させた乳酸菌を作出しモデル組換え体とした。また、ノサシバエ由来の遺伝子を用いたランダムミューテーション法によりエリスロマイシン耐性を付与した乳酸菌変異株 100 株を作成し、今後モデル組換え体として用いる菌株の準備が整った。

細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価系の開発では、ヒト腸管上皮細胞モデルとして Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞を用いた評価系を検討した。培地コントロールに対し乳酸菌親株、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞の相互作用をトランスクリプトーム解析の手法にて評価したところ、親株に比べモデル組換え体で、約 40 の遺伝子が有意に発現を増強していることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kajikawa A, Midorikawa E, Masuda K, Kondo K, Irisawa T, Igimi S, Okada S. Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. *BMC Microbiol.* 2016 Mar 22;16:49.

2. 学会発表

- ① 檜木真吾、永井貴久、佐々木泰子、五十君静信。
抗がん剤の宿主として利用するための酸素感受性 *Lactobacillus casei* IGM394 の作出。日本乳酸菌学会。2016.7.9-10。北里大学白金。
- ② 関根 侑、野口 実莉、石浜 峻、榊田 和彌、梶川 揚申、横田 健治、五十君 静信。
Lactobacillus casei が有する免疫誘導分子の探索系の

構築。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。
京都

- ③藤原公紀、横田健治、五十君静信、梶川揚申。
遺伝子検出法を用いた動物腸管由来運動性
Lactobacillus 属細菌の検索。日本農芸化学会 2017
年度大会。2017.3.18-20。京都
- ④近藤和穂、横田健治、五十君静信、梶川揚申。
Lactobacillus agilis BKN88 における走化性の解析。
日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京
都
- ⑤辻光倭、鈴木俊也、横田健治、五十君静信、梶
川揚申。IL-1 ファミリーサイトカイン分泌乳酸菌
の構築と評価。日本農芸化学会 2017 年度大会。
2017.3.18-20。京都
- ⑥五日市悠、柴崎泰基、横田健治、五十君静信、
梶川揚申。酢酸菌の免疫刺激作用に関与する菌体
構成成分の探索。日本農芸化学会 2017 年度大会。
2017.3.18-20。京都
- ⑦鈴木俊也、横田健治、五十君静信、梶川揚申。
乳酸菌由来 S-layer タンパク質の免疫学的特性。
日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京
都

3. その他発表

表 1 シーケンス結果の概要

General Information

Se-

q

u

e

n

c

e

Sequencing Results

Sample	Index	Reads	Called Bases (Mbp)	%Q30	Average Quality
N_1	ACTTGA	18,238,430	2,280	93.35	35.27
N_2	GATCAG	12,307,624	1,538	93.91	35.42
IP_1	TAGCTT	12,719,520	1,590	94.40	35.57
IP_2	GGCTAC	13,916,792	1,740	92.76	35.07
C_1	CTTGTA	12,942,068	1,618	91.80	34.74
C_2	AGTCAA	13,984,238	1,748	93.41	35.26

x

1

2

5

l

n

s

t

r

u

m

e

n

t

:

u

表 2. マッピング統計データ

Mapping Overview					
Sample	Total Reads	Cleaned Reads	Reads Mapped	Reads Unmapped	Mapping Rate
	(M)	(M)	(M)	(M)	(%)
N_1	18.2	15.2	12.7	2.4	84.05
N_2	12.3	9.8	8.3	1.5	84.66
IP_1	12.7	10.4	8.6	1.8	82.40
IP_2	13.9	10.8	9.3	1.5	86.46
C_1	12.9	9.5	8.1	1.4	84.98
C_2	14.0	11.1	9.5	1.7	84.99

Reference Bases Covered				
Sample	1x Depth	10x Depth	30x Depth	50x Depth
N_1	47.27%	14.06%	4.46%	2.36%
N_2	41.45%	9.80%	2.72%	1.35%
IP_1	40.90%	9.58%	2.68%	1.36%
IP_2	43.28%	10.77%	3.11%	1.61%
C_1	40.31%	9.14%	2.55%	1.29%
C_2	43.47%	11.05%	3.18%	1.62%

図 1. 正確検定による結果

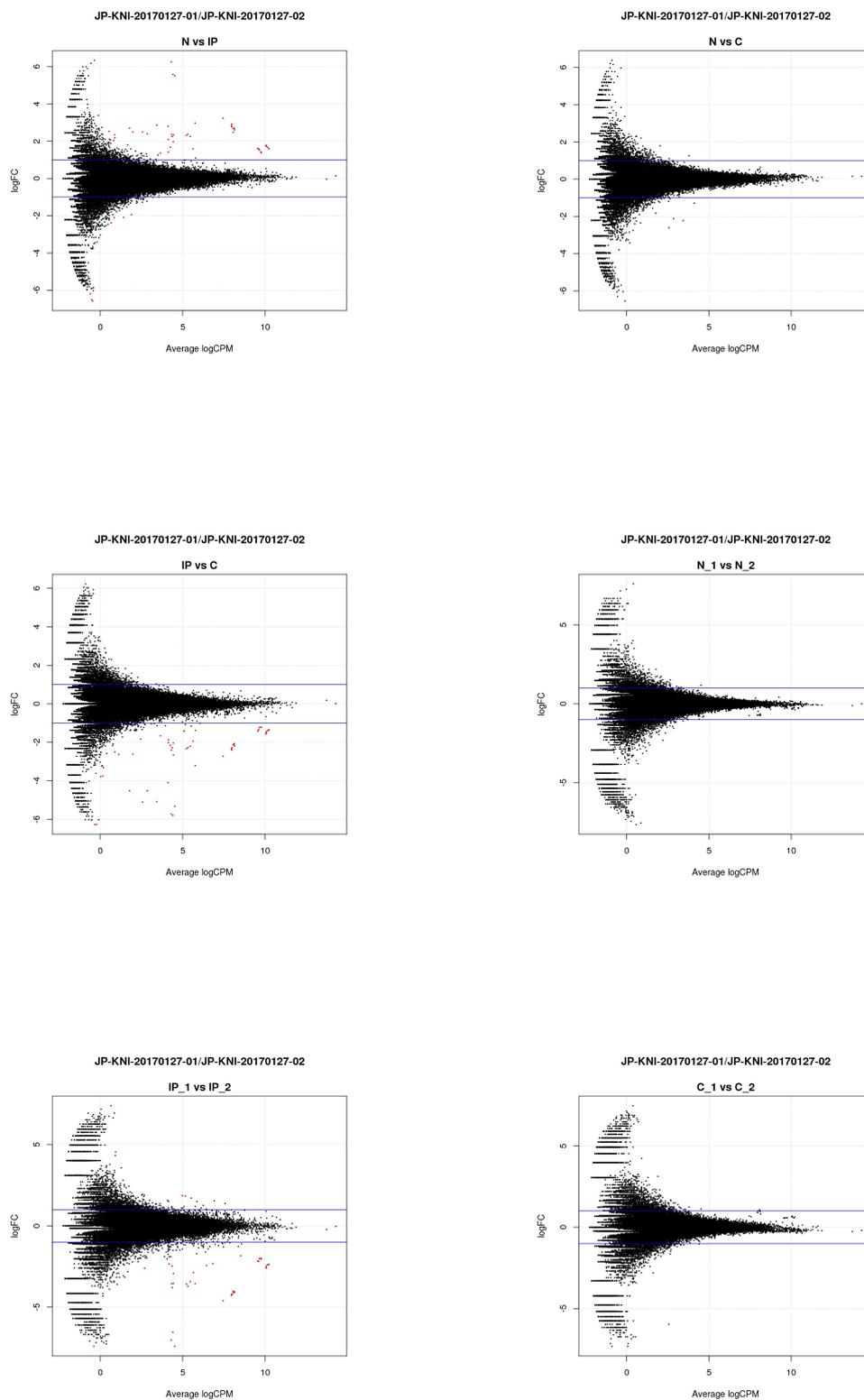
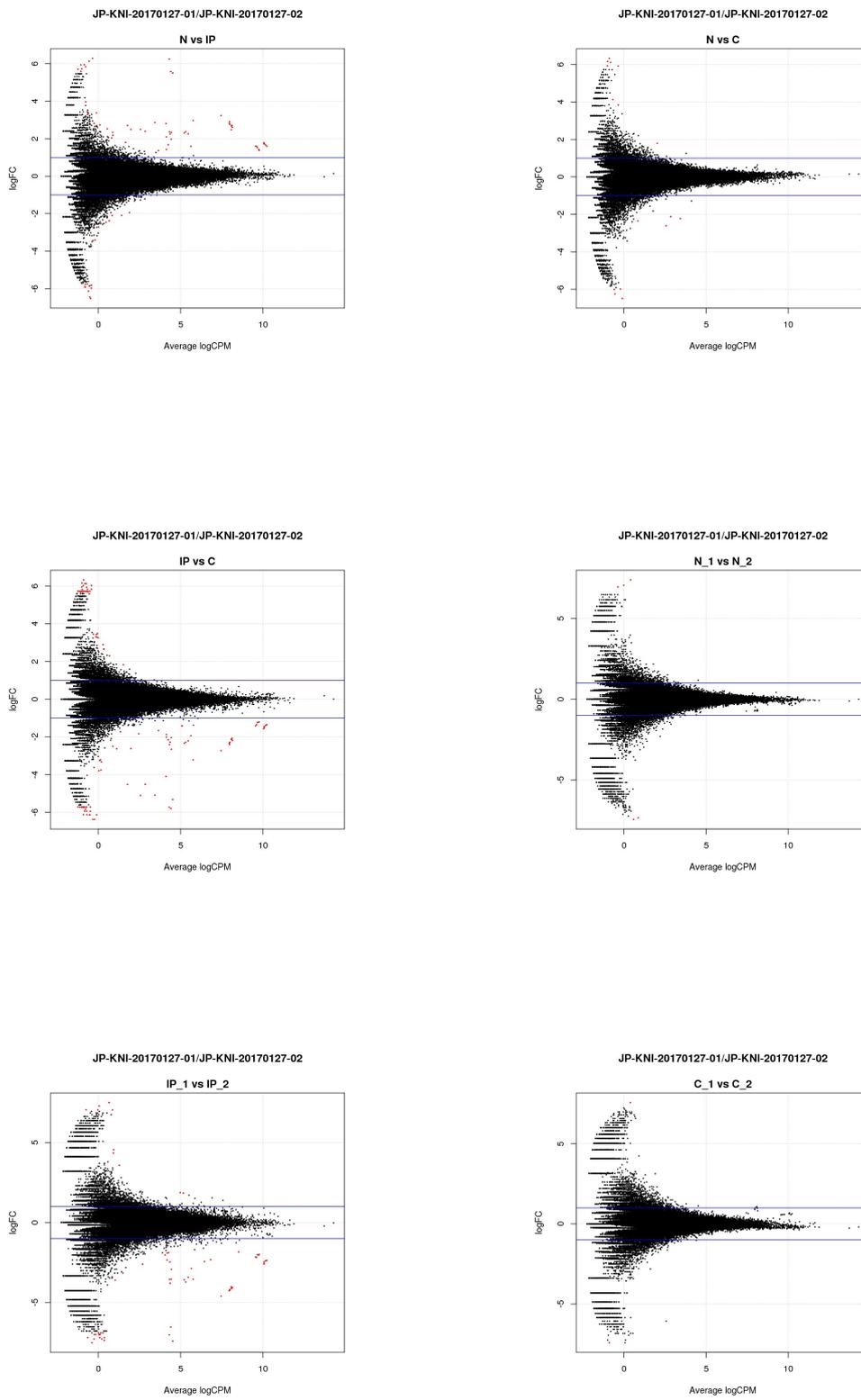


図 1. 正確検定による結果

図2. 尤度比検定による結果



平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・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」
分担研究報告書（平成 28 年度）

バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析

研究分担者 手島玲子 徳島文理大学香川薬学部 特任教授

研究要旨：平成 28 年度は、バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析に関する調査研究として、にわとり血清より抽出した各タンパク質溶液を Cy3 または Cy5 で標識し、さらに Cy2 で標識した内部標準サンプルを加えて 2D-DIGE (蛍光二次元電気泳動) を行った。蛍光画像は Typhoon に取り込み比較定量解析し、差のみられたスポットにつき、タンパク質の同定を nanoLC-MS/MS 分析で行った。具体的には、EGFP タンパク質遺伝子組換え (GM) 並びに非組換え (non-GM) 雌にわとりそれぞれ 3 匹ずつの血清について、タンパク質を抽出し、2D-DIGE を行った。約 2000 のスポットのうち、GM 群と non-GM 群の比較で、有意差 (p 値 < 0.05) があり、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 18 個観察され、それらのスポットのうち 6 個について、発現の差異が 1.3 程度であるが $P < 0.005$ の 4 スポットについて MS 解析にて同定を行った。その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

プロテオミクス解析は、作用機作を知る観点から有用であるとともに、安全性評価への応用に関しても、組換え動物においても non-GM 及び GM 生物の間の比較情報が蓄積されてきている現状に鑑みて、有用な手法になり得ると思われた。

研究協力者

西島正弘 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員

酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生
化学部

佐藤里絵 (独) 農研機構 食品総合研究所

秋山晴代 神奈川衛生研究所

A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物に限らず、遺伝子組換えニワトリやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実用化されつつある。これらはこれまで存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討しておく必要があると考えられる。遺伝子組換え技術による安全性を考えるうえで、遺伝子組換えによる非意図的な影響を明らかにすることが必要であり、プロテオミクス等の網羅的解析法も一つの有用な方法になると考えられる。そこで本分担研究では組換え体と非組換え体を用いて 2D-DIGE を用いてプロテオミクスによる網羅的解析を行い、両者の比較を行うこと及び発現に差違のあったタンパク質の同定を行って、Mode of action (MOA) を知る

こと、また安全性評価への応用について検討することを目的とする。以下、今年度の概要を記す。

今年度は、組換え体として、EGFP タンパク質組換え (GM) ニワトリのプロテオーム解析として、1 か月令の GM 雌ニワトリ 3 匹と非組換え (NGM) ニワトリ 3 匹ずつの血清について 2D-DIGE を行い、GM と NGM 群のタンパク質発現の網羅的差異について解析を行った。

B. 研究方法

(1) ニワトリ血清のプロテオーム解析

(i) 供与試料

1 か月令の雌 GM, NGM それぞれ 3 匹ずつの組換えニワトリ血清約 0.5ml を広島大学大学院堀内教授より供与いただいた (動物 No: GM; T45, T53, T54, Non-GM; W43, W51, W55)。供与いただいた血清は、 -80°C ディープフリーザー内に保管した。

(ii) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

ニワトリ血清試料各 32 μL に Buffer A (Equil load wash, Agilent cat No. 5185-5987) 368 μL を添加して攪拌し、Spin Filters (0.22

μm) でろ過した後、Multi Affinity Removal Spin Cartridge MARS Hu-6HC で試料中のアルブミン等を除去した。除去後の試料を Amicon Ultra-0.5 により濃縮した試料を評価用試料とした。

全評価用試料を等量ずつ混合したプール試料に対して200 pmol のCy2 (200 $\mu\text{mol/L}$ DMF 溶液、1 μL) を添加した。また、各評価用試料に対して表3 に従って200 pmol のCy3 及びCy5 (200 $\mu\text{mol/LDMF}$ 溶液、1 μL) を添加した。添加後氷上にて30 分間静置してラベリング反応を実施した。反応液に過剰量のリジン溶液 (10 mmol/L 溶液、1 μL) を添加して10 分間保持し反応を終了した。反応終了後に反応液総量と等量の2 \times サンプルバッファー (8 mol/L 尿素、4%(w/v) CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL) を添加してさらに10 分間氷上に保持したものを2D-DIGE 解析用の試料とした。

二次元電気泳動の操作、装置及び条件について以下に記す。

(a)一次元目電気泳動条件：一次元目電気泳動は、装置にMultiphoreII (GEヘルスケア) を、ゲルストリップにImmobiline™ DryStrip pH3-11 NL 24cmを用い、試料はカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで44.2 kWh (300 V; 4 hr, 300-3500 V; 5 hr, 3500 V; 10 hr) 行った。泳動後、平衡化溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.8、6 mol/L 尿素、30vol%グリセロール、2%(w/v) SDS) に0.25%(w/v) DTTを添加したA液及び同様に4.5%(w/v) IAAを添加したB液に対して各々10分間ずつ平衡化を行った。

(b)二次元目電気泳動条件：平衡化終了後、Ettan DALT IIシステム (GEヘルスケア バイオサイエンス) 及び12%(w/v) 均一ポリアクリルアミドゲル (自作) を用いて二次元目のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動は、3 W (15 $^{\circ}\text{C}$) 一定で泳動先端が完全に溶出するまで (約15時間) 行った。

ゲル画像取り込みは、Typhoon9400 (GE ヘルスケア社) を使用して行い、二次元電気泳動ゲルイメージは、Dycyber Ver7.0 (GE ヘルスケア社) を用い、画像品質確認及び定量比較解析を行った。

発現量の変動のみられたタンパク質については、質量分析用のRuby 染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析のゲルイ

メージをDecyder BVA ソフトを用いてマッチングして、個体間で発現変動の大きかった10 スポット (No. 279, 613, 646, 724, 1327, 1360, 1366, 1594, 1779, 1783) のうち、昨年同定の終わった3 スポット (No. 1366, 1360, 1594) を除いた7 スポットをスポットピッカー (GE ヘルスケア) を用いてピックアップした。ピックアップしたゲルプラグを50%メタノール溶液で洗浄した後に、100 μl の100 mM 炭酸水素アンモニウム及び還元処理液 (1.5 mg の DTT を1 ml の100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10 μL を添加して57 $^{\circ}\text{C}$ で30 分間静置した。さらに、アルキル化処理液 (10 mg のヨードアセトアミドを1 ml の100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10 μL を添加して室温で30 分間静置した。還元アルキル化処理後の試料に対してトリプシン消化液2 μL を加えた後に、50 mM 炭酸水素アンモニウム10 μL を加えた。チューブを30 $^{\circ}\text{C}$ に設定したドライバス上で一晩インキュベートして消化した。消化後の液を含むチューブを遠心乾燥機に入れて乾燥した。乾燥後に LC-MS/MS 測定用の溶媒 (1%蟻酸) 20 μL を加えた。チューブをVortex した後に MS 解析用 Total recovery tube (ウォーターズ社) に移した。

回収したペプチド溶液は、nanoLC-MS/MS 分析は、LC 部分に UltiMateR 3000 HPLC (ダイオネクス社)、質量分析装置に Q-Exactive Plus (サーモサイエンティフィック社) を用い Xcalibur (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で LC 及び MS を制御して測定を実施した。LC、MS の分析条件を以下に示した。データベースは検索は Mascot (マトリックスサイエンス社) を使用し NCBI Inr の最新版に対して、Gallus gallus を指定して検索を行った。

C. 研究結果

(1) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

GM, non-GM 雌にわとり6 個体ともに血清のアルブミン除去タンパク質としてそれぞれ約2000 のスポットが2D-DIGE で検出された。non-GM と GM 各3 匹につき、個体差を検出する目的で、n=3 で解析した。図1 に non-GM と GM の画像を重ね合わせて表示した例を示す。9 種の定量比較画像画像の各スポットの蛍光強度データについて変動の大きさにつき解析を行ったところ、GM 群と non-GM 群の比較で、有意差 (p 値 < 0.05) があり、1.5 以上の発現の差異のみられ

るスポットが 18 個観察された。結果を表 1 に示す。それらのスポットのうち 6 個について、MS 解析を実施することを計画した。なお、6 個のうち 3 個のスポットについては、昨年の non-GM のにわたりの雌雄の血清の個体差を調べる予備検討でタンパク質を同定済みであったので、今年度は残りの 3 個につき、新たに MS 解析を行った。また、発現の差異が 1.3 程度であるが $P < 0.005$ の 4 スポットについても MS 解析にて同定を行った。スポット解析したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置を図 2 に、MS 解析によるタンパク質の同定結果を表 2 に、また、MS 解析により今年度新たに同定したタンパク質の名前を記した同定結果を二次元電気泳動ゲルイメージ上に記したものを図 3 に示した。

GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、表 1 に示すように、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットとして、スポット 1778 が唯一該当したが、このスポットの appearance (出現率) が 6/29 と低く、再現性が低いスポットであった。従って、再現性の確認されたスポットの中で、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

また、今回有意差の見られた血清タンパク質は、前年度に雌雄も含めた個体間での変動があまり大きくないことが調べられており、遺伝子組換えによる非意図的影響を調べるためのよいマーカーにもなり得ると思われた。

なお、今回 EGFP タンパク質を遺伝子導入しているため、血清中で EGFP タンパク質の検出が可能ではないかと考え、EGFP タンパクの分子量及び等電点の近いスポットとして、スポット 1779, 1783 を選び、タンパク質の同定を行ったが、EGFP タンパク質を検出することはできなかった。これは、GM 動物の血清中の EGFP タンパク質の濃度上昇が他臓器に比べ低いことが一因と考えられた。

D. 考察

組換えニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

今年度は、組換え体として、EGFP タンパク質組換え (GM) ニワトリのプロテオーム解析をお行った。具体的には、1 か月令の GM 雌ニワトリ 3

匹と非組換え (NGM) ニワトリ 3 匹ずつの血清について 2D-DIGE を行い、GM と NGM 群の血清中タンパク質発現の網羅的差異について解析を行った。

その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

E. 結論

ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

1 か月令の雌の組換え個体、及び非組換え個体それぞれ 3 匹ずつから、血清を採取し、GM 及び non-GM 個体のタンパク質発現の差を網羅的に調べるために 2D-PAGE を行った。各個体血清タンパク質として約 2000 スポットが観察されたが、そのうち、GM, non-GM 間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは観察されなかった。変動の見られたタンパク質のうち、10 個のタンパク質を MS 解析から新たに同定した。全体として、血清タンパク質の発現量に GM, non-GM 群で差もほとんどみられなかったため、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

プロテオーム解析は、安全性評価ばかりでなく、組換え体の作用機作 (Mode of Action) を知るうえでも有用であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

なし

2. 論文発表

1) Ogawa T., Sasaki T., Okazawa A., Teshima R., Misawa N., Ohta D. "Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives" *Jap.J.Food Chem. Safety* 23, 9-19 (2016)

2) Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, Kiyono H. “Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody”. *Regul Toxicol Pharmacol.* 76, 128-136 (2016)

3) Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. “Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272” *Food Hyg.Saf.Sci.* 57, 1-6 (2016)

4) Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S, Poulsen LK, Privalle L, Ward JM, Doerrler N, Rasclé JB. “Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and

fluorescent detection of endogenous rice allergens” *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198–2207 (2016).

5) Mano J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome S., Hayashida S., Kawakami H., Kurimoto Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Takabatake R., Kitta K. “Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR” *Food Chemistry* 226, 149-155 (2017)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

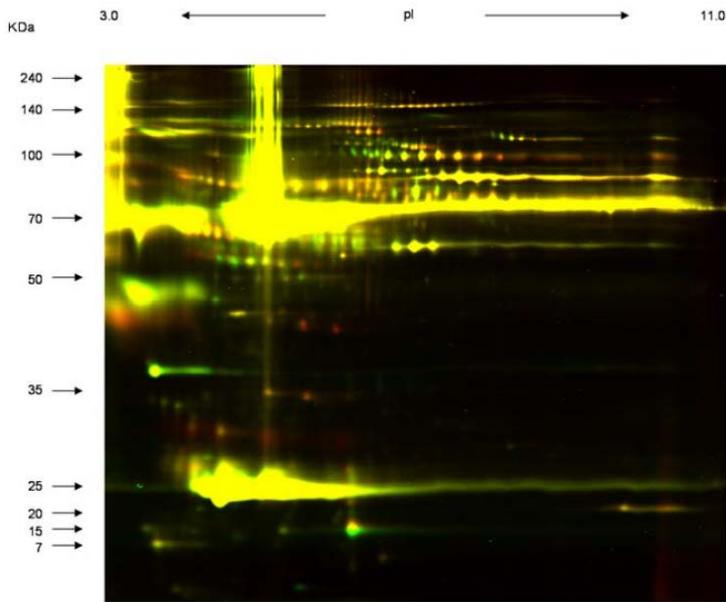


図1 Non-GMとGMの重ね合わせ2D-DIGE-gelイメージ
Cy3: 緑-non-GM, Cy5: 赤-GM (両サンプルに同程度含まれるスポットは黄色で表示される.)

表1 Non-GM 試料に対して GM 試料で、1.5 倍以上の上昇
並びに 1.5 倍以下の減少が検出されたスポット

No.	Master No.	Appearance	P-value	Av. Ratio ^{*1}
1	1778	6(29)	0.023	5.98
2	1783	28(29)	0.0012	2.85
3	1366	22(29)	0.0025	2.03
4	1589	18(29)	0.00079	1.96
5	1779	29(29)	0.0003	1.83
6	1768	29(29)	0.00088	1.82
7	1360	22(29)	0.0026	1.74
8	1575	18(29)	0.002	1.67
9	1514	18(29)	0.012	1.67
10	1599	24(29)	0.012	1.67
11	1327	25(29)	0.00025	1.66
12	1594	28(29)	0.01	1.64
13	1578	21(29)	0.0033	1.57
14	1362	12(29)	0.0059	1.57
15	726	18(29)	0.0076	1.57
16	1586	15(29)	0.013	1.56
17	665	18(29)	0.023	1.56
18	1208	12(29)	0.018	1.53
	646	29(29)	0.0012	1.31
	279	28(29)	0.0049	1.27
	724	29(29)	0.00031	1.24
	613	26(29)	0.0011	-1.36

* MS 解析を行ったスポットは、マスターNo. の部分を赤で示した。
また、昨年同定したものは、マスターNo. の部分を緑で示した。

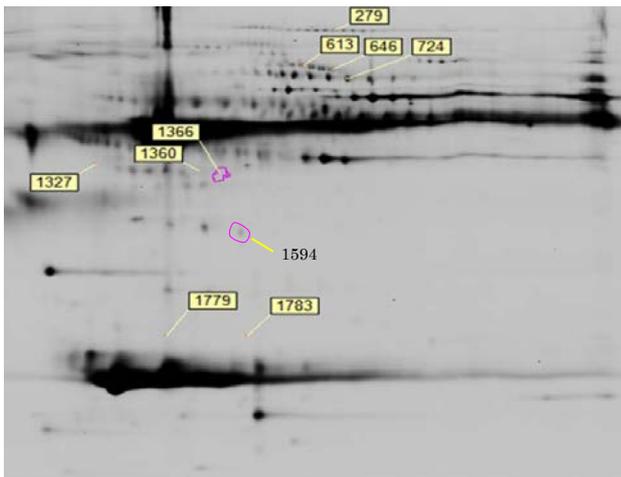


図 2 ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

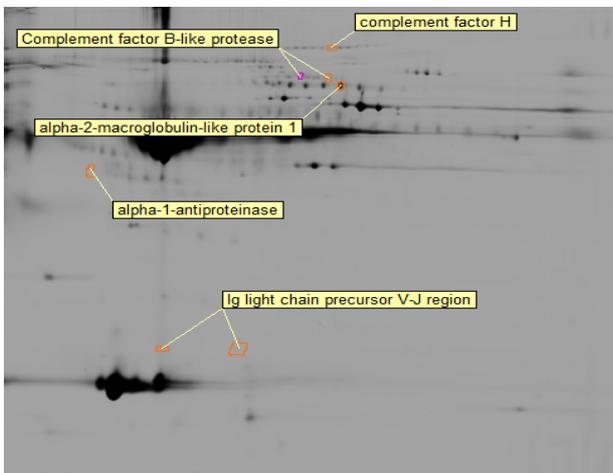


図 3. ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの同定結果並びに二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

表 2 ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの同定結果

Spot No.	Ac.No.	Protein Name	Score	MW
1327	gi 971400187	alpha-1-antiproteinase	339	48006
1779	gi 104728	Ig light chain precursor V-J region	456	22769
724	gi 971434955	alpha-2-macroglobulin-like protein 1	3204	164547
613	CFBL_CHICK	Complement factor B-like protease	310	27719
646	CFBL_CHICK	Complement factor B-like protease	314	27719
1783	gi 104728	Ig light chain precursor V-J region	291	22769
1366	gi 478246985	alpha-1-antiproteinase , antitrypsin	200	48854
1360	gi 478246985	alpha-1-antiproteinase , antitrypsin	297	48854
279	gi 363736454	complement factor H [Gallus gallus]	730	152721
1594	gi 922959946	C-reactive protein, pentraxin-related precursor [Gallus gallus]	148	35307

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

分担課題 バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析（1）

研究分担者 小関 良宏 （東京農工大学大学院工学研究院・教授）
研究協力者 宮原 平 （東京農工大学大学院工学研究院・助教）

研究要旨

近年の遺伝子組換え技術の発展により、ゲノム編集技術の開発が進められている。ゲノム編集技術では従来の外来遺伝子の導入による組換え生物の作出とは異なる技法で遺伝子改変が行われることから、これまでにない遺伝子改変がなされた生物由来の食品の安全性を評価する必要がある。

本研究では新規の遺伝子改変技術であるゲノム編集技術により作出された遺伝子改変ニワトリをモデルとし、遺伝子改変生物由来の食品の新たな安全性評価系の構築を目的としている。1 年目ではその基礎段階としてニワトリの雌雄の違いにおける白血球のトランスクリプトーム解析を行い、雌雄間での発現変動遺伝子を確認した。本年度は緑色蛍光タンパク質 (GFP) を従来の遺伝子組換え技術により導入した GFP ヘテロ導入ニワトリと非組換え体である野生種のトランスクリプトーム解析を行い、ニワトリでの遺伝子組換えによる遺伝子発現系への影響を調査した。

解析の結果、野生種と組換え体で発現変動のあった遺伝子群において、明確な遺伝子発現の差異を示す代謝系などのクラスターは確認されなかった。

A. 研究目的

従来の遺伝子組換え生物とは異なる、ゲノム編集技術と呼ばれる宿主生物体ゲノム内に外来遺伝子導入の痕跡がほとんど残らない遺伝子改変技術による遺伝子改変生物の開発が急速に進められている。この技術は近い将来に食品およびその加工原料としての使用が考えられることから、バイオテクノロジー応用食品としての安全性評価系の構築が必要とされている。これまでの研究から、遺伝子組換え生物では研究者が意図して導入した形質以外にも、研究者の意図しない遺伝子の発現や代謝フローの変化などの遺伝子組換えによる副次的な影響が起こっていることが示唆されている。このため、遺伝子改変生物においても同様に予期しない形質への影響が起こることが予想される。食品の安全性評価の点では、遺伝子改変生物の生体内での変化を網羅的に把握する必要があるが、遺伝子改変生物のオミクス解析を行った研究報告はまだ技術が新しいためほとんど見当たらない。

本研究ではゲノム編集技術による遺伝子改変生物のモデルとしてアレルゲンノックアウト

ニワトリを解析対象として、バイオテクノロジー応用食品の安全性評価基準のための基礎データの収集を目的に研究を行っている。平成 27 年度はニワトリの雌雄間でのトランスクリプトーム解析、平成 28 年度は遺伝子組換えニワトリと野生種でのトランスクリプトーム解析を行った。平成 29 年度には遺伝子改変ニワトリのトランスクリプトーム解析が予定されており、本研究においては本年度までの結果を元に遺伝子改変生物でのゲノム編集の影響を評価する基礎情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

広島大学の堀内教授より分与された 1-2 ヶ月齢のニワトリの白血球から抽出した total RNA をサンプルとしてトランスクリプトーム解析を行った。解析サンプルには、ウイルスベクター法により緑色蛍光タンパク質 (GFP) が導入された GFP ヘテロ導入ニワトリの雌を 3 個体、対照として雌の野生種を 3 個体使用した。

トランスクリプトーム解析は アジレント・テクノロジー社の Agilent Expression Array に

委託した。解析内容は、ラベリング方法 1 色法、DNA チップは Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color、Gene Expression Hybridization Kit、Gene Expression Wash Buffers Pack を使用し、方法はマニュアルに従い行われた。検出シグナルは専用解析ソフトウェア Agilent Feature Extraction により数値化された。

委託解析の結果により得られたデータにつき、正規化を行った各遺伝子の発現データから転写産物が検出されたことを示すシグナル強度 2 に該当する遺伝子を本研究での解析対象遺伝子とした。以降のデータ解析は、R 言語を使用し、Bioconductor および CRAN から提供されているパッケージを用いた。データ描写には R studio を使用した。

まず、データの全体像の把握および外れサンプルの有無を確認するため階層クラスター解析を行った。クラスタリングは (1-Pearson 相関係数) を距離として、平均連結法により行った。

散布図は、各遺伝子の発現量を対数変換後に野生種と組換え体それぞれの平均値を算出しプロットした。

解析対象遺伝子群から有意水準 1% ($p < 0.01$) としてサンプル間での発現変動遺伝子を抽出した。その後、同一サンプル内で共通して発現変動が 2 倍以上あった遺伝子について The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID: <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) によりクラスター解析を行った。

倫理面への配慮

該当しない

C. 研究結果

トランスクリプトーム解析に使用した Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver 2.0 には 43,803 個のプロンプが搭載されており、すべてのサンプルで 6 割程度で十分なシグナル強度が検出される結果となった。このため、すべてのサンプルで共通して十分なシグナル強度を得られた 25,714 遺伝子を解析対象とした。

階層クラスター解析では野生種 3 個体、組換え体 3 個体がそれぞれのクレードを形成したことから外れサンプルはないと判断し、発現変動遺伝子の抽出には野生種 3 個体、組換え体 3 個体の計 6 サンプルをすべて使用する

こととした (Fig. 1)。

解析対象遺伝子について各サンプル間で発現量の平均値を算出し、散布図を描写した結果、野生種において組換え体よりも発現が上昇する遺伝子が多いことが示されたが、ほとんどの遺伝子については発現量の差は 2 倍以下に収まる結果となった (Fig. 2)。発現変動遺伝子の抽出では、解析対象とした 25,714 遺伝子のうち有意水準 1% とした場合 1,883 遺伝子が発現変動遺伝子として抽出された。このうち各サンプル間で共通して発現量の差が 2 倍以上あった遺伝子数は 326 遺伝子であり、野生種で発現量が 2 倍以上高くなる遺伝子が 299 遺伝子、組換え体で発現量が 2 倍以上高くなる遺伝子が 27 遺伝子抽出された (Table 1 にその一部を示した)。さらに発現変動遺伝子群とした 1,883 遺伝子について The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID) で各遺伝子の機能同定および翻訳産物の推定機能からクラスター解析を行ったところ、Enrichment score (サンプル間での遺伝子の偏りを数値化したもの) が高いクラスターはアミノ酸配列のドメインによる分類であり、代謝経路や免疫系など特定の機能に共通するクラスターは確認されなかった。

D. 考察

昨年度のニワトリの雌雄間によるトランスクリプトーム解析に引き続き、本年度では遺伝子組換えニワトリと野生種のニワトリでのトランスクリプトーム解析を行った。昨年度の結果では、性決定遺伝子などいくつかの機能が共通する遺伝子において雌雄間で遺伝子発現の変動が見られたが、今回の組換え体での解析では遺伝子の明確な発現の差異は確認されなかった。これは、導入されている遺伝子が GFP であり、本来ニワトリには存在しない遺伝子および代謝経路に関わらないタンパク質であることから、ニワトリ由来の遺伝子発現系にはほとんど影響を与えなかった可能性が考えられた。また、ヘテロ導入体であることも影響が少ない一因として考えられる。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH は今回の結果においても野生種、組換え体ともに発現量に差がないことが確認されており、階層クラスター解析においては野生種のクレードと組換え体のクレードが明確に分離されたため、サンプルおよび解析方法については適切であると考えられた。

次年度はゲノム編集技術により作出された

遺伝子改変ニワトリのトランスクリプトーム解析を行う予定である。予定されているサンプルはアレルゲンノックアウトニワトリであり、ニワトリ由来の代謝経路に影響を与える改変であることから、前年度および今年度よりも発現変動が著しく起こる可能性が高い。膨大な発現変動遺伝子群から真に変動のある遺伝子群を抽出する際に、前回および今回の発現変動遺伝子群を基礎データとして参照し考察に役立てたい。

E. 結論

野生種とウイルスベクター法による GFP 遺伝子ヘテロ導入組換え体のニワトリの 1-2 ヶ月齢の白血球におけるトランスクリプトーム解析では、両者の間に明確な発現変動が起こる遺伝子群は確認されなかった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)なし

2)なし

2. 学会発表

1)なし

2)なし

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

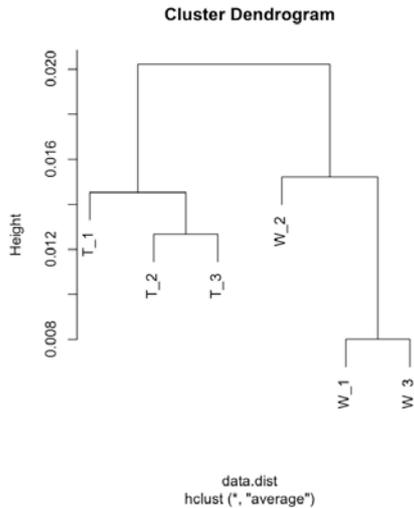


Fig. 1 階層クラスター解析結果
 野生種 W_1: W43、W_2: W51、W_3: W55、
 遺伝子組換え体 T_1: T45、T_2: T53、
 T_3: T54

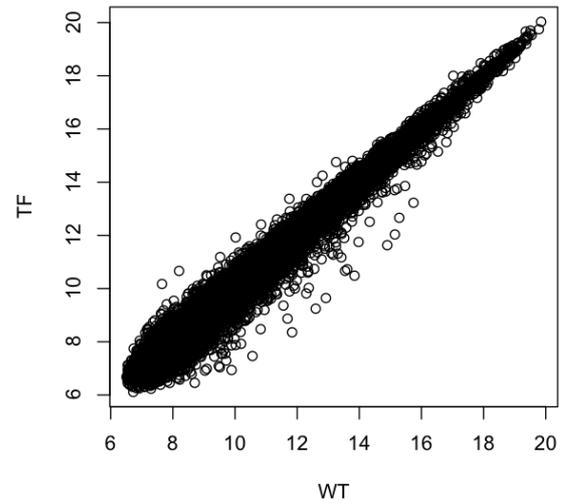


Fig. 2 散布図
 X 軸: 野生種の平均値、Y 軸: 遺伝子組換え体の平均値。

Gene Annotation		logFC
WT > TF		
Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1		3.48
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2		3.10
Adaptor related protein complex 2 mu 1 subunit		2.95
MHC class I glycoprotein		2.89
B-L beta chain mRNA		2.63
WT < TF		
Uncharacterized		-1.63
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor		-1.51
Lymphocyte antigen 6 complex		-1.50
Ankyrin repeat domain 42		-1.48
Uncharacterized		-1.38

Table 1 各サンプルにおいて 2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子について上位 5 位までのリスト

上: 野生種で遺伝子組換え体の発現を上回っていた遺伝子、下: 野生種で下回っていた遺伝子。

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

分担課題 バイオテクノロジー応用食品のトランスクリプトーム解析(2)

研究分担者 小関 良宏 (東京農工大学大学院工学研究院研究科・教授)
研究協力者 小口 太一 (筑波大学生命環境系/遺伝子実験センター・助教)

研究要旨

近年、新しい植物育種技術 (New Plant Breeding Techniques; NBT) の農作物育種への利用に注目が集まっている。遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体間の接ぎ木技術も NBT の 1 つである。今後、組換え台木に接いだ非組換え穂木の野菜・果樹等の育種が進み、それらに由来する農産物の食品としても利用も想定しなくてはならない。そこで、本研究では、トマトやジャガイモ等をモデルとし、組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析を実施し、食品としての利用に際する安全性評価基準や規制のあり方の議論を進めていく上での科学的知見の提供を目的とする。本年度は、*GUS* 遺伝子導入組換えトマトと非組換えトマト間で接ぎ木植物体を生育し、果実を得た。得られた果実の食品成分分析を実施し、組換えトマト、非組換えトマト及び組換え-非組換え接ぎトマトの間で比較したところ、いずれも有意な差は見出されないことを確認した。

A. 研究目的

地球規模の気候変動や地球人口の増大による食料需要の増大に対応するため、食料生産へのバイオテクノロジー利用の重要性は高まっている。新機能を付与した遺伝子組換え植物のみならず遺伝子組換え動物が開発され、さらに近年開発された New Plant Breeding Techniques (NBT) による新たな農作物の開発・研究が世界規模で進められている。NBT の一部は、最終産物には組換え遺伝子は含まないものの育種過程で遺伝子組換え操作を含む技術や組換え植物と非組換え植物を接ぎ木等、現在の法規制ではグレーゾーンにあたる技術が含まれる。NBT の技術開発が進めば、NBT 由来の農産物の食品としての利用も想定される。そこで、NBT 由来農作物を食品としての利用における安全性評価の基準や規制のあり方の議論を進めていく上で科学的エビデンスの蓄積不可欠である。そこで本研究では、NBT の 1 つである組換え体と非組換え体を接ぎ木した植物に関する生物学的・栄養学的知見創出を目的と

し、トマトやジャガイモ等をモデルとして組換え体-非組換え体間の接ぎ木を作成・生育、可食部におけるトランスクリプトーム解析や食品成分分析に基づく科学的知見を提示し、安全性評価手法の確立を目指す。

B. 研究方法

<植物材料>

植物材料は、実験用トマト品種であるマイクロトムを用いた。*GUS* 遺伝子導入マイクロトムは、筑波大学遺伝子実験センター野中助教より分与を受けた。播種後 5 週目の組換え (TG) 及び非組換え (NT) トマトを土面からおよそ 3 cm の箇所主茎を切断し、台木には切断面の中心に垂直にカミソリ刃で 2-3 mm 程度の切り込みを入れ、その間にカミソリで V 字型に削いだ穂木を挟み込み、内径 3 mm のビニル管で固定した。その後、1-2 週間、鉢を含む植物体全体をビニル袋で覆い、保湿状態で管理した。その後、1 週間程度をかけてビニル袋を外し、栽培室で

引き続き生育させた。結実後、成熟した果実を順次収穫・凍結保管した。

<食品成分分析>

組換え体4個体、非組換え体4個体（非組換え体同士の接ぎ木体3個体含む）、穂木組換え体/台木非組換え体となる接ぎ木体5個体、および穂木非組換え体/台木組換え体6個体より収穫した果実は、収穫後、分析に供するため凍結保管した。凍結保管した果実は、秤量後レトルトパウチ袋に封入、オートクレーブ処理した後に再度凍結し、日本食品分析センターに送付し、五成分（水分、たんぱく質、脂質、炭水化物、灰分）およびエネルギーの分析を依頼した。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質はケルダール法、脂質は酸分解法、灰分は灰化法により評価した。エネルギーと水分は下記の計算式により求めた。

$$\text{炭水化物} = 100 - (W + P + L + A)$$

W：水分、P：たんぱく質、L：脂質

C：炭水化物、A：灰分

倫理面への配慮

植物材料は組換え体を含むため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」及び関連省令や地方自治体の政令や指針、筑波大学遺伝子組換え実験安全管理規程等を十分に遵守して実施している。

C. 研究結果

非組換え体同士3例、穂木組換え体/台木非組換え体10例、穂木非組換え体/台木組換え体9例、合計22例のトマトの接ぎ木体を作成した。いずれの接ぎ木体の生育・結実性等には、個体間によるばらつきは認められるものの、接ぎ木していない植物及び穂木/台木の組み合わせの違いによって、生育・結実等に有意な違いはなかった（Tukey-HSD検定、 $\alpha=0.05$ ）（図1）。

作成した接ぎ木体及び対照植物（接ぎ木無施術の組換え体及び非組換え体）から、成熟した果実を順次収穫した。収穫した果実の食品成分分析の結果は図2に示す。五成分は、組換え体-非組換え体間、あるいは、組換え体-非組換

え体間の各接ぎ木体と組換え体、非組換え体の間に有意な違いはなかった（Tukey-HSD検定、 $\alpha=0.05$ ）（図2）。

D. 考察

材料としたマイクロトムは、接ぎ木も容易であることが確認された。また、非組換え体同士で接ぎ木を施術した個体は、接ぎ木施術直後は接ぎ木無施術の非組換え体と比べて、接ぎ木施術による成長への影響があったが、その後栽培を継続する過程で影響はほぼ見出されなくなった。さらに、果実の栄養分析にも差はなかった。

本研究で、モデルとした組換え体は、非組換え体と比較して果実の栄養成分に有意な差はない。組換え体/非組換え体間の接ぎ木体においても、非組換え体同士の接ぎ木体、接ぎ木無施術の非組換え体あるいは組換え体とも果実の栄養成分に有意な差はないことから、同種間の接ぎ木体と接ぎ木無施術の植物体間で新たな栄養成分の際は生じないことが確認された（図2）。

E. 結論

組換え/非組換えマイクロトムを用いた、組換え/非組換え間の接ぎ木における影響を評価するためのモデル系を構築した。また、本実験系を用いて、トマト可食部である果実の食品栄養成分は、接ぎ木による影響を受けないことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

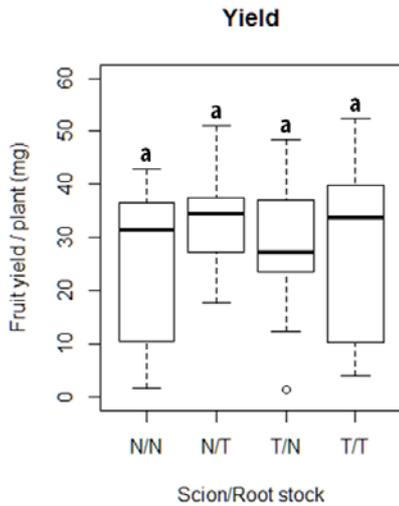


図1 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による果実収量の比較

N/N、N/T、T/N、T/T は、それぞれ非組換え体（一部は非組換え体同士の接ぎ木体）、穂木非組換え体/台木組換え体、穂木組換え体/台木非組換え体、組換え体の果実を示す。グラフ中の同ジアルファベットの付記は Tukey-HSD 検定により有意な違いが検出されなかったことを示す ($\alpha=0.05$)。

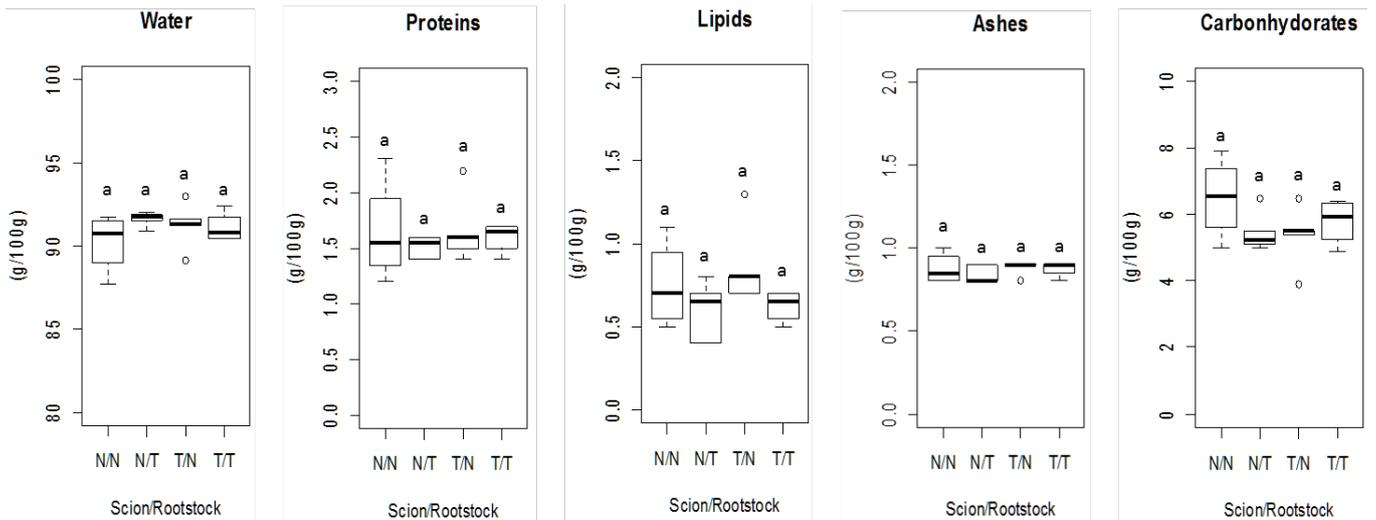


図2 組換え体-非組換え体間の接ぎ木による食品成分の比較

N/N、N/T、T/N、T/T は、それぞれ非組換え体（一部は非組換え体同士の接ぎ木体）、穂木非組換え体/台木組換え体、穂木組換え体/台木非組換え体、組換え体の果実を示す。グラフ中の同ジアルファベットの付記は Tukey-HSD 検定により有意な違いが検出されなかったことを示す ($\alpha=0.05$)。

厚生労働科学研究費補助金（食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

分担課題 バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析
研究分担者 太田 大策（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・教授）

研究要旨：

本研究では、バイオテクノロジーによって改変された生物のメタボローム解析を実施し、食品の安全性評価のための基礎データとすることを目的としている。平成 28 年度は、食品や医薬品への応用研究が進められているニワトリをモデルとし、外来遺伝子が導入されたニワトリの代謝プロファイル解析を実施した。分析には、緑色蛍光タンパク質（ZsGreen）遺伝子が導入された遺伝子組換えニワトリ（組換え体）、並びに非組換え体ニワトリ（非組換え体）から採取した血漿を用いた。組換え体、および非組換え体それぞれのグループから 4 個体ずつ（1 ヶ月齢の雌個体、採血前 1 日間絶食）を選び、各個体から 1 回ずつ採血した。採血後の血液を、抗凝固剤（エチレンジアミン四酢酸）存在下で遠心分離して得た血漿を分析に供した。血漿試料は、除タンパク処理後、極性画分と非極性画分に分画し、それぞれの画分に含まれる代謝物質は、ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計（GC-TOF/MS）により網羅的に測定した。質量分析データ（トータルイオンカレント）の解析によって、222 個の検出シグナルを代謝物質由来のピークとして特定した。各代謝物質ピークのマススペクトルおよびカラム保持指標情報を基にして、222 個の代謝物質由来ピークから 125 個の代謝物質名を同定した。

供試サンプルにおいて共通に検出された代謝物質由来ピーク（222 個）の相対蓄積量を基にして主成分分析を行った。第一主成分（寄与率 34.4%）と第二主成分（寄与率 11.7%）の主成分スコアの二次元プロットでは、組換え体と非組換え体を区別する明確なクラスター分離は認められなかった。組換え体と非組換え体において特定した代謝物質由来ピークの相対蓄積量を t 検定を用いて検定したが、何れの代謝物質ピークにおいても 2 倍以上の有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。本年度の実験では、組換え体と非組換え体でのグループ間の比較において、血漿中代謝物質含有量の差は認められないと結論した。

A. 研究目的

近年、遺伝子改変生物を利用した食品・医薬品の開発が進んでいる。穀物、野菜、家畜、家禽、微生物発酵食品などとして古くから人類に利用されてきた生物種は、高い生産性が保証されていることや、既存の飼育・栽培・培養設備や流通システムをそのまま利用することも可能であることなど、優れた点が挙げられる。一方、これらの生物種を遺伝子改変の対象として開発・利用する際には、安全性に関わる品質管理や生産段階での

環境保全など、多くの課題が残されている。

ニワトリの遺伝子組換えによって、鶏卵中に生理活性を持つ低分子化合物や経口ワクチンなどのタンパク質医薬品を蓄積させる試みが注目されている。鶏卵構成成分のほとんどが母体から供給される。卵細胞の貯蔵栄養物である卵黄は、約半分が水分であり、残りが脂質やタンパク質である。卵黄成分は、肝臓から血流によって卵細胞まで運ばれる。一方、卵白に大量に含まれるオボアルブミンは卵管細胞で特異的に産生され細胞外

に分泌される。このように、鶏卵成分は母体の代謝生理的な状態と密接な関係にある。すなわち、ニワトリ改変体そのものを食肉として利用する場合だけでなく、改変体から得られる鶏卵を食品（あるいは医薬品）として利用する場合には、鶏卵中の代謝物質の種類と含有量の包括的な情報が安全性評価における必須である。

本研究では、メタボロミクスを改変生物における代謝物質の網羅的解析に適用し、食品の安全性評価のための基礎データを取得することを目的としている。今年度は、外来遺伝子が導入されたニワトリ改変体の代謝プロファイル解析を実施した。

B. 研究方法

(i) 供与試料

緑色蛍光タンパク質 (ZsGreen) 遺伝子が導入された遺伝子組換えニワトリ (組換え体)、並びに非組換え体ニワトリ (非組換え体) から血漿を調製した (広島大学大学院堀内浩幸教授)。採血個体の性別は雌、月齢は 1 ヶ月とし、組換え体の 4 個体 (個体番号: T45, T53, T54, T75)、並びに非組換え体の 4 個体 (個体番号: W43, W51, W55, W76) を用いた。採血個体は採血前 1 日間絶食させた。血液の抗凝固剤は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-2Na) リン酸緩衝溶液を使用した。

(ii) 除タンパク質

血漿試料からの除タンパク質は、タンパク質変性沈殿法と除タンパク質フィルタを用いた方法を組み合わせて行った。新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに 1.8 mL のメタノール/超純水 (55/45, v/v) を加え、-40°C に設定したフリーザー内で十分に冷却した。ここに血漿試料を 0.2 mL 加え、ボルテックスミキサーを用いて混合し、-40°C で 30 分間静置した (メタノール終濃度 50%)。その後、4°C、14,000 xg、3 分間遠心し、上清全量を新しい 2 mL 容のサンプリングチューブに回収した。回収した上清は、除タンパク質用の Captiva フィルタ (Agilent Technologies 社) を通過させ、濾液を回収し、冷却遠心濃縮器を用いて乾固した。除タンパク後の乾固試料は温度を -

80°C で保存した。

(iii) 溶媒抽出・分画・誘導体化

溶媒抽出、分画、誘導体化の操作は、Furuhashi et al. (2015) の方法に従った。本方法では、試料中のエステル化脂肪酸と遊離脂肪酸を区別して検出可能である。グリセロ脂質などを構成するエステル化脂肪酸は脂肪酸メチルエステル (fatty acid methyl ester; FAME) 誘導体として、遊離脂肪酸はトリメチルシリル (TMS) 誘導体として検出される。溶媒抽出には、メタノール/クロロホルム/2% 酢酸の混合溶媒に、内部標準物質として、テストステロン (4 µg/ml) とリビトール (1 µg/mL) を加えたものを用いた。溶媒抽出後の抽出液は、液液分配によって分画し、水-メタノール相 (極性画分) とクロロホルム相 (非極性画分) を得た。非極性画分を乾固させた後、ナトリウムメトキシド存在下、55°C で 90 分間反応させ、試料中のエステル化脂肪酸をメチルエステル体へと変換した。各画分に含まれる化合物のトリメチルシリル化には、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた。誘導体化反応後の試料は、直ちに分析に供した。各サンプルに対して 2 反復で誘導体化を行い、それぞれを分析に供した。

(iv) GC-TOF/MS

誘導体化試料の計測には、ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析装置 (GC-TOF/MS) を用いた。注入口温度は 230°C (cold trap splitless mode) に設定した。GC の分離には HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) (Agilent Technologies 社) を用いた。キャリアガスはヘリウムを用い、ガス流量は 1.0 mL/min とした。GC の昇温条件は、70°C (1 min), 1°C/min, 76°C (0 min), 6°C/min, 350°C (1 min) とした。トランスファーライン温度は 250°C、イオン源温度は 250°C とした。イオン化は electron-ionization (EI) モード (70 eV) で行い、質量範囲は *m/z* 40-650 とした。試料注入量は 1 µL とした。

(v) ピーク抽出・同定

GC-TOF/MS を用いて取得したトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムからのイオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには

MetAlign²⁾を、ピークデコンボリューションとピーク同定には AIoutput³⁾ を使用した。ピーク同定には、標準品の実測データを格納したインハウスのマススペクトルライブラリを用いた。データ解析の手順は Fig. 3 に示した。

(vi) 統計解析

主成分分析および Student's *t*-test は、MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.Metaboanalyst.ca/>) を用いて行った。主成分分析のデータ標準化方法は auto scaling を選択した。Student's *t*-test は、危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。

- 1) Furuhashi et al., *Metabolomics*, **11**, 175-183 (2015)
- 2) De Vos et al., *Nat. Protoc.*, **2**, 778-791 (2007)
- 3) Tsugawa et al., *BMC Bioinformatics*, **12**, 131 (2011)

C. 研究結果

TIC クロマトグラムをグループ間で比較したところ、極性画分 (Fig. 1), 非極性画分 (Fig. 2) ともに顕著な違いは認められなかった。MetAlign を用いて質量分析データを解析し、極性画分からは 8167 種類、非極性画分からは 3006 種類のイオンピークを検出した。続いて、AIoutput を用いてこれらのイオンピークをデコンボリュートした。極性画分と非極性画分由来のイオンピークは、それぞれ、121 種類と 106 種類に統合された (代謝物質候補ピーク)。各代謝物質候補ピークのマススペクトルおよびカラム保持指標と、インハウスのマススペクトルライブラリに格納されている標準品の実測データ (マススペクトルおよびカラム保持指標) との類似性を基にして代謝物質由来ピークを特定した。内部標準物質として抽出溶媒に加えたリビトール, テストステロン, および、血液の抗凝固剤として使用した EDTA を代謝物質候補ピークのリストから除き、残りを代謝物質ピークとした。代謝物質ピーク数は、極性画分では 118 種類、非極性画分では 104 種類であった。これらのうち、極性画分では 77 種類 (Table 1), 非極性画分では 48 種類 (Table 2) の代謝物質を

同定できた。各代謝物質ピークのピーク面積値を同一の TIC クロマトグラム中の内部標準物質 (リビトールあるいはテストステロン) のピーク面積値で割り、相対面積値を算出した。

多変量データが持つ特徴を要約するために、主成分分析を行った。主成分分析は、Table 1 と Table 2 に示した同定ピークに対して実施した。分析前処理の 2 回の反復操作に由来する 2 種類の測定データは、平均化せずにそのまま用いた。第一主成分 (寄与率 34.4%) と第二主成分 (寄与率 11.7%) の主成分スコアの二次元プロットからは、組換え体、および非組換え体の明確なクラスター分離は認められなかった (Fig. 4)。

組換え体と非組換え体の間で、各代謝物質ピークのレベル差の有無を検定したところ、全ての代謝物質ピークにおいて 2 倍以上の有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。なお、非極性画分から検出された代謝物質ピークのうち 1 種類 (ピーク番号 N102, 未同定ピーク) については、レベル差が 2 倍以下 (fold-change = 0.74, 組換え体/非組換え体) ではあるものの、有意差が認められた (Table 3; $p = 0.012$, FDR = 0.98)。

D. 考察

緑色蛍光タンパク質 (ZsGreen) 遺伝子発現ニワトリ (組換え体), 並びに組換え体の母本ニワトリ (非組換え体) の血漿を用いて、含有代謝物質レベルの網羅的比較解析を行ったところ、主成分分析では両者を明確に区別するようなクラスター分離は見られず、また、グループ間で 2 倍以上の有意差を示す代謝物質ピークは認められなかった。これらの結果から、ニワトリ血漿中の代謝物質含有量は、ZsGreen 発現によって影響されることは無かったと考えられる。

E. 結論

血漿中代謝物質含有量については、組換え体と非組換え体のグループ間の比較において、今回の標本数 ($n=4$) で検出できる差は、認められなかった。今後、血漿に加え、ZsGreen 発現が認められる細胞を含む臓器や組織を材料とし、多検体の

プロファイリングによってさらに高い精度の代謝活性評価が可能である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takumi Ogawa, Takako Sasaki, Atsushi Okazawa, Reiko Teshima, Norihiko Misawa, Daisaku Ohta: Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. (2016) *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **23**, 9-19.

2. 学会発表

- 1) 小川拓水, 鹿島光司, 幸義和, 岡澤敦司, 清野宏, 太田大策, コメ型経口ワクチン MucoRice-CTB のメタボローム解析, 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会 2016 年 9 月 (上田)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

Table 1. 極性画分の同定ピーク一覧

Peak ID	RI	QuantMS	Compound name
P001	1100.2	73	Alanine
P002	1103.2	73	Alanine
P004	1183.9	75	7:0 FA
P008	1226.0	144	Valine
P009	1227.0	144	Valine
P010	1228.5	144	Valine
P011	1232.1	144	Valine
P014	1261.5	174	Beta-Alanine
P015	1265.1	174	Beta-Alanine
P016	1266.1	174	Beta-Alanine
P018	1276.8	299	Glucose-1-phosphate
P019	1277.8	174	Beta-Alanine
P020	1278.3	299	Phosphoric acid
P022	1279.9	174	Beta-Alanine
P023	1282.9	299	Glucose-1-phosphate
P024	1289.0	158	Leucine
P025	1289.5	299	Glucose-1-phosphate
P026	1294.1	299	Glucose-1-phosphate
P027	1297.1	73	Glycerol
P028	1297.6	147	Glycerol
P029	1298.6	158	Leucine
P030	1301.9	158	Isoleucine
P031	1302.5	73	Threonine
P032	1303.1	158	Isoleucine
P033	1306.5	158	Isoleucine
P034	1309.3	73	Threonine
P035	1309.9	158	Isoleucine
P036	1313.3	174	Glycine
P037	1315.0	73	Threonine
P038	1316.1	147	Succinate
P039	1319.6	174	Glycine
P040	1328.1	147	Succinate
P041	1353.8	147	Itaconate
P042	1361.1	245	Fumarate Acid
P045	1432.1	74	11:0 FAME
P054	1497.3	147	Malic Acid
P055	1499.8	73	Malic acid
P057	1512.1	73	Malic acid
P058	1514.1	156	5-Oxoproline
P059	1516.2	156	5-Oxoproline

Peak ID	RI	QuantMS	Compound name
P062	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid
P063	1528.4	156	5-Oxoproline
P066	1533.8	156	5-Oxoproline
P067	1534.5	232	Aspartic acid
P068	1542.7	232	Aspartic acid
P069	1550.2	232	Aspartic acid
P070	1576.0	73	Alpha-ketoglutaric acid
P071	1597.1	73	Alpha-ketoglutaric acid
P073	1621.0	218	Phenylalanine
P074	1630.5	218	Phenylalanine
P076	1639.3	218	Phenylalanine
P079	1771.3	147	Aconitic acid
P080	1793.6	156	Glutamine
P082	1830.7	142	Ornithine
P083	1834.7	142	Ornithine
P084	1840.5	142	Ornithine
P085	1851.9	273	Citric acid
P087	1930.4	73	Glucose
P088	1933.9	73	Glucose
P089	1936.3	319	Glucose
P091	1943.2	319	Glucose
P095	1959.3	73	Mannitol
P096	1980.5	73	Ascorbic acid
P097	1981.4	205	Ascorbic acid
P098	2040.2	313	Palmitic acid
P099	2044.7	313	Palmitic acid
P100	2051.0	117	16:0 FA
P104	2125.3	305	Myo-Inositol
P105	2130.0	73	Myo-Inositol
P106	2239.5	202	Tryptophan
P107	2249.1	117	18:0 FA
P114	2713.2	361	Sucrose
P115	2813.6	69	Squqlane
P116	2819.6	69	Squqlane
P117	2826.8	69	Squqlane
P118	2832.7	69	Squqlane
P119	2836.3	69	Squqlane

RI; リテンションインデックス, QuantMS; ピーク面積値の算出に使用したイオン, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

Table 2. 非極性画分の同定ピーク一覧

Peak ID	RI	QuantMS	Compound name	Peak ID	RI	QuantMS	Compound name
N001	1101.4	73	Alanine	N055	1941.4	319	Glucose
N006	1172.9	75	7:0 FA	N056	2000.0	71	Icosane
N012	1259.5	116	Serine	N058	2040.2	313	Palmitic acid
N013	1261.6	174	Beta-Alanine	N059	2051.9	117	16:0 FA
N014	1266.1	174	Beta-Alanine	N061	2095.6	81	18:2 FAME
N015	1270.2	174	Beta-Alanine	N062	2101.0	71	Henicosane
N018	1279.9	174	Ethanol amine	N063	2101.9	74	18:1 FAME
N019	1281.4	299	Glucose-1-phosphate	N064	2107.6	74	18:1 FAME
N021	1283.9	299	Glucose-1-phosphate	N065	2122.6	74	18:0 FAME
N022	1290.0	299	Glucose-1-phosphate	N066	2129.1	74	18:0 FAME
N023	1293.6	299	Phosphoric acid	N067	2150.7	327	17:0 FA
N024	1297.1	205	Glycerol	N068	2162.9	327	Margarate
N026	1316.2	174	Glycine	N069	2216.6	75	Linoleic acid
N027	1319.6	174	Glycine	N076	2250.9	341	18:0 FA
N031	1369.1	215	9:0 FA	N077	2260.5	79	20:4 FAME
N039	1497.3	85	Pentadecane	N078	2278.7	79	20:3 FAME
N041	1518.2	156	5-Oxoproline	N079	2347.3	117	19:0 FA
N043	1523.0	174	gamma-Aminobutyric acid	N083	2446.3	117	20:0 FA
N044	1533.8	156	5-Oxoproline	N084	2453.6	79	22:6 FAME
N046	1550.2	232	Aspartic acid	N085	2468.3	79	22:6 FAME
N049	1711.5	71	Heptadecane	N098	3156.2	502	α -tocopherol
N050	1799.8	71	Octadecane	N101	3164.2	329	Cholesterol
N051	1854.3	285	14:0 FA	N103	3266.0	129	Campesterol
N053	1927.0	74	16:0 FAME	N104	3355.4	129	Sitosterol

RI; リテンションインデックス, QuantMS; ピーク面積値の算出に使用したイオン, FA; fatty acid, FAME; fatty acid methyl ester

Table 3. 群間の比較において有意差が見られた代謝物

Peak ID	Compound_Name	<i>t</i> test		Fold-change (TG/WT)
		<i>p</i> value	FDR	
N102	Unknown	0.0120	0.98	0.74

FDR; false discovery ratio, TG; 組換え体, WT; 非組換え体

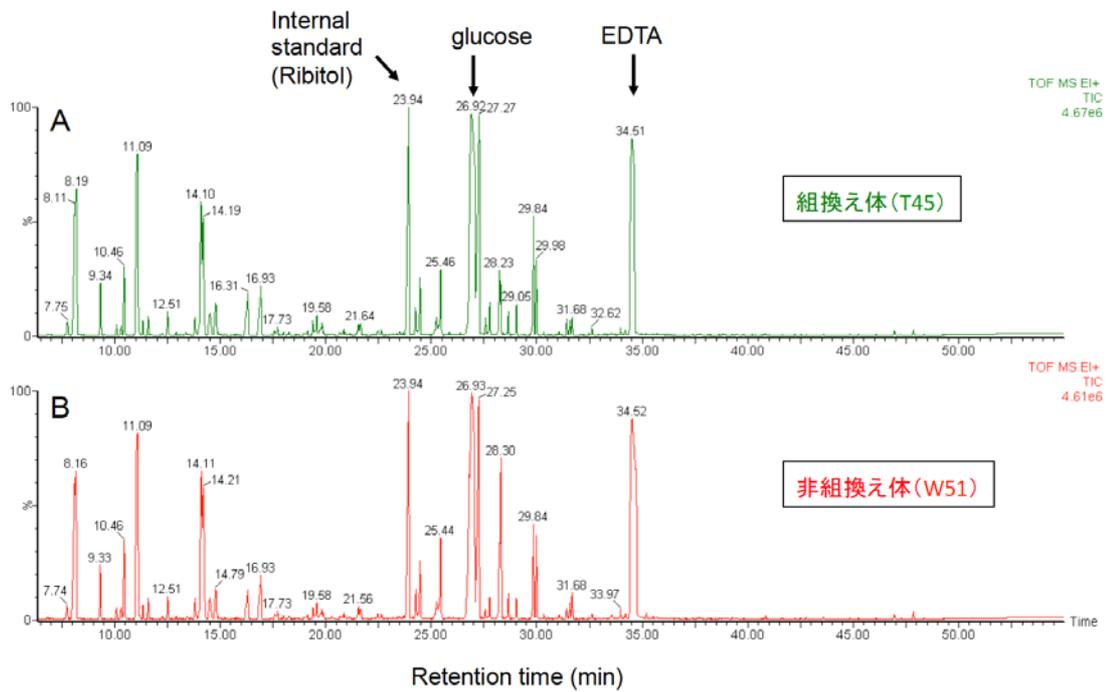


Fig. 1. ニワトリ血漿から調製した極性画分の GC-TOF/MS トータルイオンカレントクロマトグラム (A) 組換え体(個体番号 T45)。 (B) 非組換え体(個体番号 W51)。 EDTA; エチレンジアミン四酢酸。 EDTA は血液を採取するときに抗凝固剤として添加した。

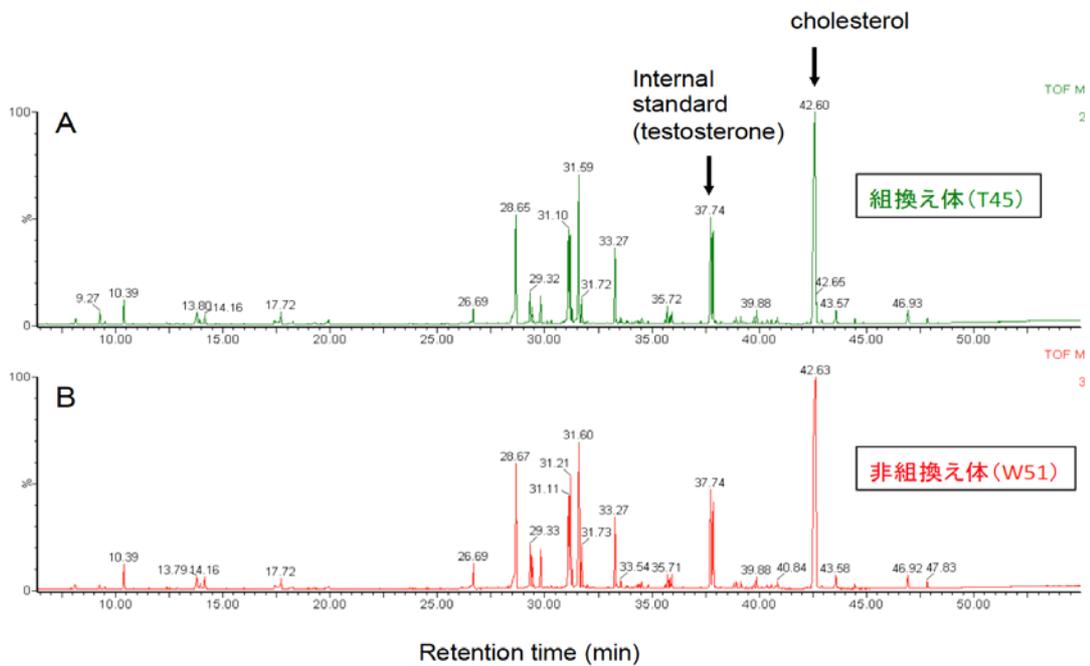


Fig. 2. ニワトリ血漿から調製した非極性画分の GC-TOF/MS トータルイオンカレントクロマトグラム (A) 組換え体(個体番号 T45)。 (B) 非組換え体(個体番号 W51)。

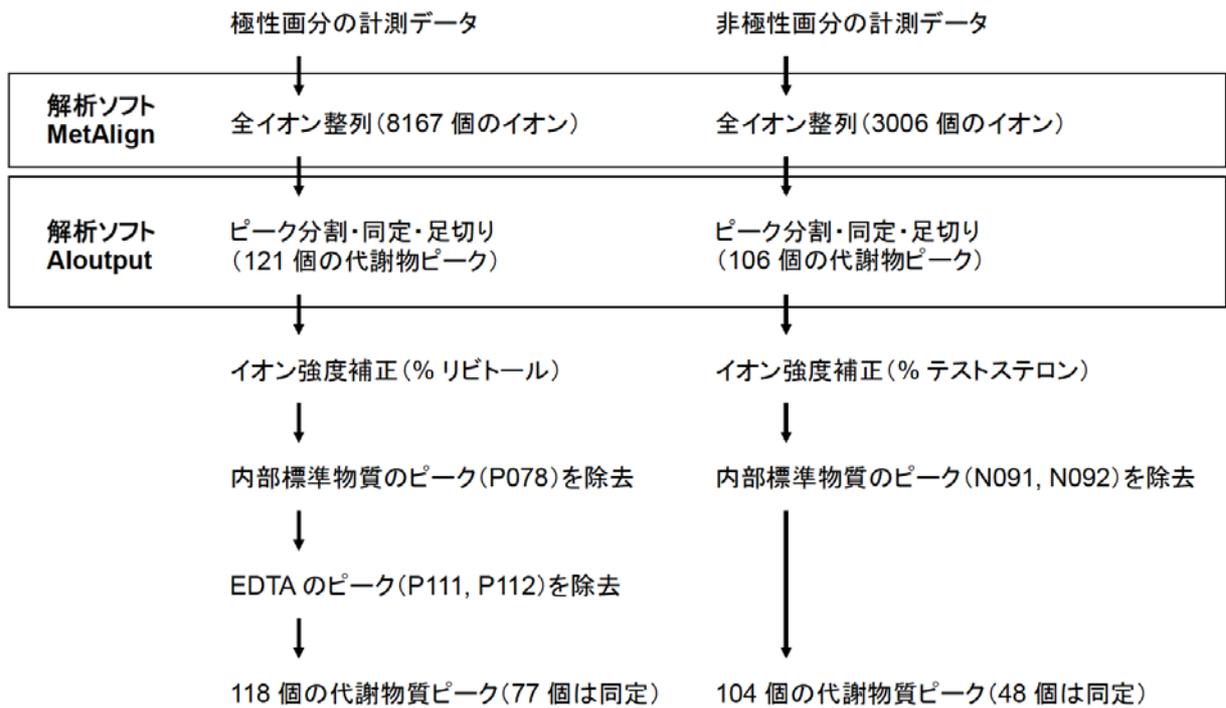


Fig. 3. 質量分析データ解析の手順

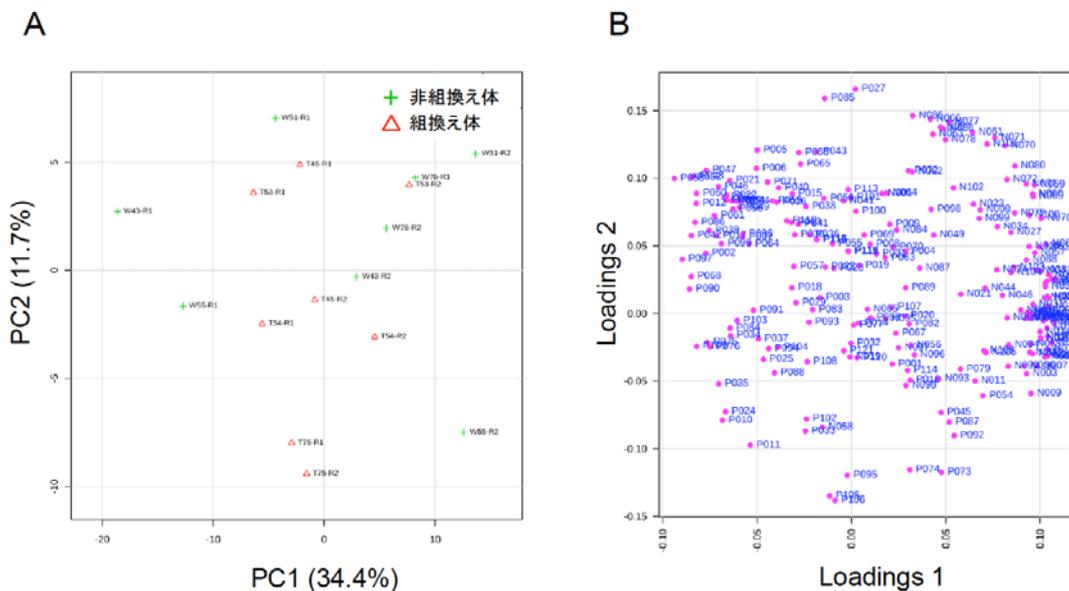


Fig. 4. 主成分分析

主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いて行った。データの標準化方法は auto scaling を選択した。組換え体の 4 個体 (T45, T53, T54, T75), 非組換え体の 4 個体 (W43, W51, W55, W76) を分析に供した。(A) 第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) の主成分スコアの二次元プロット図。括弧内は各主成分の寄与率を示す。各サンプルの 2 回繰り返し分析は R1, R2 として表示。PC1 と PC2 のローディングスコアの二次元プロット。各プロットにピーク ID を付記した ID は Table 1 (極性画分), および Table 2 (非極性画分) に対応。

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

分担課題 ニワトリのモデル組換え体の作出

研究分担者	堀内 浩幸	(広島大学生物圏科学研究科・教授)
研究協力者	小関 良宏	(東京農工大学工学研究院・教授)
	太田 大策	(大阪府立大学生命環境学研究科・教授)
	手島 玲子	(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員 徳島文理大学香川薬学部・特任教授)

研究要旨

本研究は、食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変 (TG) ニワトリをモデルに、オミクス解析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことが目的である。平成 28 年度は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が片アレルに組込まれた GFP ニワトリから 15 羽のヒナを孵化させた。孵化したヒナは、組換え体の有無と雌雄判定を PCR により行い、1-2 ヶ月齢まで飼育した。飼育した中から、雌の正常ニワトリと TG ニワトリを 3 羽ずつ選抜し、オミクス解析用に血漿と血清を分離した。また白血球由来 RNA の抽出を行い、それぞれ研究協力者に解析を依頼した。

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方、遺伝子組換え動物では、水域における魚類においてアメリカ食品医薬品局 (FDA) の認可がおり、いよいよ流通の段階までできている。陸域の遺伝子組換え動物は、既に医薬品において組換え動物由来の医薬品が複数 FDA により認可され、日本でも遺伝子組換えニワトリの鶏卵で製造された組換え酵素製剤の認可が了承されたところである。今後は、ゲノム編集技術を中心とした遺伝子改変動物由来の食品開発が加速することも予想され、その対策が急務であると思われる。

そこで本研究の目的は、食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変ニワトリをモデルにオミクス解析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことである。平成 28 年度は、遺伝子改変ニワトリ (GFP ニワトリ) の各オミ

クス解析 (メタボローム解析, トランスクリプトーム解析, プロテオーム解析) を行なうために、GFP 及び正常ニワトリの血漿, 血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者への試料提供を行なった。

B. 研究方法

(1) GFP 遺伝子導入ニワトリの選抜と育成

GFP ニワトリは、国立大学法人名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センターで維持されている LSi/ Δ AeGFP-TG ニワトリの受精卵を導入した。この GFP ニワトリは、片方のアレルに GFP 遺伝子が導入されたもので GFP^{+/+}で維持されている。導入した受精卵は、分担者の研究室で孵化させたのち、血液を試料に GFP 遺伝子の有無と雌雄判定を PCR によって行なった。雌雄判定には、chicken dead end homologue (CDH) 遺伝子を標的とした。CDH 遺伝子は、ニワトリの性染色体にコードされた遺伝子であり、Z 染色体と W 染色体上で塩基に違いがある。そのためこの領域を PCR で増幅すると、ZZ (雄) では 1 本、ZW (雌) では 2 本のバンドが増幅され、電気泳動により雌雄を判定することがで

きる。GFP 遺伝子が検出されたヒナは GFP ニワトリとして、また検出されなかったヒナは正常ニワトリとして、分担者が管理する TG ニワトリ飼育施設で育成した。

(2) GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出

1-2 ヶ月齢の雌の GFP 及び正常ニワトリそれぞれ 3 羽を選抜し、採血を行い、遠心分離によりそれぞれ血漿を回収した。また採血した血液は、37°C で一時間固化させた後、4°C で一昼夜静置し、その後、遠心分離により血清を回収し、-80°C で保存した。また白血球の分離では、採血した血液を PBS(-) で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque を用いた密度勾配遠心法 (740 G, 10 分) により白血球を回収した。回収した白血球は全 RNA 単離キット (RNeasy, QIAGEN) により全 RNA を単離した。単離した全 RNA は分光光度計により、230, 260, 280 nm の吸光度を測定し、全 RNA の量と純度を計算した。

倫理面への配慮

組換え DNA 実験に関しては、カルタヘナ法のもと、広島大学が定める組換え DNA 実験安全管理規則に従い、研究計画書を提出し、機関承認実験として広島大学長から承認を得て実施した (承認番号: 27-69, 27-99)。

動物使用実験に関しては、広島大学動物実験実施規則に従い研究計画を提出し、広島大学長からの承認 (承認番号: C11-29) を受け、この規則に従い研究を実施した。

研究倫理教育は、平成 27 年 12 月 21 日 (月) に広島大学において開催された理工農系の研究者を対象とした研究倫理教育 FD を受講するとともに、CITI JAPAN の基本コース B を e-learning により受講し、平成 28 年 10 月 29 日に全てのカリキュラムを修了した。

C. 研究結果

(1) GFP 遺伝子導入ニワトリの選抜と育成

導入した GFP ニワトリ受精卵 20 個を 3 週間孵卵し、15 羽 (#42-56) を孵化させた。孵化したヒナは、少量の採血を行い、血液細胞を用いた PCR 法に供試した。GFP 遺伝子の有無を判定する PCR から、9 羽が GFP ニワトリ、6 羽が正常ニワトリであることがわかった (図 1)。次に雌雄判定の PCR では、GFP ニワトリの 5 羽が ZZ (雄) であり、4 羽が ZW (雌)、また正

常ニワトリでは、2 羽が ZZ (雄) であり、4 羽が ZW (雌) であることがわかった。そこで、オミクス解析の試料は、それぞれ ZW の雌個体を育成して、調整した。

(2) GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出

分離した血漿は、メタボローム解析用とし、研究協力者へ分与した。また同様に、分離した血清はプロテオーム解析用とし、研究協力者へ送付した。白血球由来 RNA は、数回の実験でゲノム DNA の混入が認められたため、手法を一部変更して行なったところ、高純度で十分量の RNA が単離された (表 1) ことから、トランスクリプトーム解析用に研究協力者へ送付した。

D. 考察

平成 28 年度は、当初予定していた計画を全て完了することができた。モデルニワトリの作出試験では、国立大学法人名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センターから GFP 遺伝子が導入されたニワトリの受精卵から育成した。このニワトリは、GFP^{+/+}では胚性致死となるため、GFP^{+/+}で維持されている。そのためメンデルの法則に従うと、組換え体と正常ニワトリが 1:1 の割合で孵化する。本作出試験では、約 3:2 の割合で孵化しており、ほぼメンデルの法則に準じているものと思われる。

組換え動物をオミクス解析等により評価する際、個体差を如何にデータに反映させ補正するかは、極めて重要であり、データの変動が個体差によるものなのか、それとも遺伝子の改変によるものなのかを明らかにする必要がある。またこれは雌雄差によっても生じるものであり、このデータの蓄積は必須である。平成 27 年度には、既にこれらのデータの蓄積が済んでいることから、本実験結果から、外来遺伝子がランダムに発現する生体内での、代謝系、遺伝子発現、タンパク質の翻訳に与える影響が解析できるものと思われる。これらの点は、遺伝子改変生物を食品や医薬品として利用していく上で、安全性を評価する重要な視点である。本研究成果をもとに、今後は鶏卵や鶏肉など実際の可食部での解析も必要であろう。

E. 結論

平成 28 年度は、GFP^{+/+}ニワトリ受精卵 20 個から、15 羽のニワトリを孵化させ、選抜の結果、GFP^{+/+}ニワトリ 9 羽と正常ニワトリ 6 羽を育成

させた。この内、それぞれ雌3羽ずつからオミクス解析に使用する血漿，血清及び白血球由来RNAの調整を行い，各種解析に使用した。

F. 健康危険情報
異常なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1) Ezaki R, Hirose F, Furusawa S, Horiuchi H. Stable and simple culture protocol for chicken primordial germ cells using apoptosis inhibitor. The 17th Asian- Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22, 2016, Fukuoka, JAPAN.

2) Nakagawa Y, Ezaki R, Sakuma T, Kuroiwa A, Yamamoto T, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken primordial germ cells using genome editing tools. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima,

JAPAN.

3) Kameyama F, Nakagawa Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken epiblast derived stem cells using CRISPR/Cas9. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima, JAPAN.

4) 江崎僚，廣瀬文哉，古澤修一，堀内浩幸. アポトーシス阻害剤を活用したニワトリ始原生殖細胞の新規培養方法. 第39回日本分子生物学会年会2015年12月1日(横浜)

5) 平野朝子，江崎僚，古澤修一，堀内浩幸. ニワトリエピブラスト幹細胞はナイーブ型かプライム型か. 第39回日本分子生物学会年会2015年12月1日(横浜)

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。

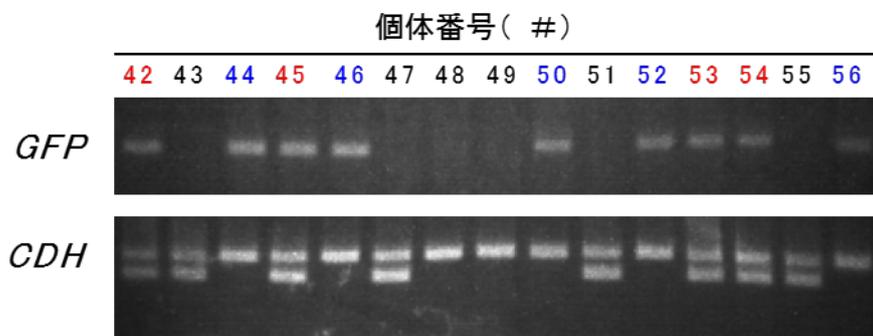


図1. ゲノムPCRによるTG・雌雄判定

GFP導入TGニワトリ	正常(non-TG) ニワトリ
♂: 44・46・50・52・56	♂: 48・49
♀: 42・45・53・54	♀: 43・47・51・55

表1 白血球RNAの量と純度

個体番号	RNA量(μg)	濃度(ng/mL)	容量(μL)	A _{260/280}	A _{260/230}
43	11	137	80	1.691	1.03
51	6.5	81	80	1.688	0.786
55	7.4	87	85	1.706	0.294
45	4.6	57	80	1.676	0.282
53	5.3	66	80	1.65	1.222
54	6.9	86	80	1.623	1.72

平成 28 年度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

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関するリスクコミュニケーション

研究分担者 今村 知明 奈良県立医科大学 教授
協力研究者 岡本 左和子 奈良県立医科大学 学内講師
宮本 麻央 神戸大学理学研究科生物学専攻 修士課程卒業予定

研究要旨

GM (genetically modified) 食品に対する日本の消費者の受容は、その登場時から一貫して低く、改善の兆しは見られない。その一方で、GM 技術は発展してきており、従来の GM 技術とは異なる特徴を持った NBT (new breeding technologies) のような技術も登場し、海外諸国ではすでに実用化が進んでいる。このような状況下において、リスクコミュニケーションの複雑性は増し、また、一層慎重な対応が求められるようになってきている。

本研究では、GM 食品が受容されない本質的原因の究明を目的として、消費者の年代別の受容性の差異について要因の解明のため、消費者のライフイベントによる受容性の変化と食品の安全性の感度の変化について調査を実施した。また、海外の最新動向として、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)による GM サーモンの承認を受けて、米国とカナダにおける GM サーモンに対する報道状況を整理し、消費者の反応の実態を把握した。

A. 研究目的

GM 食品に対する日本の消費者の意識の特徴として、実際のリスクは明確に認識していない一方で、摂食意向は低い。リスク認知と受容のかい離によって大きいねじれ現象が発生している。これは、これまでの当研究分担者による研究結果から、他の食品リスク（添加物、食中毒、放射能等）と比較しても特殊な状況である。昨年度の研究において、高校の教育で得た生物に対するリテラシーは食のリスクに関する意識にあまり影響しないことが確認されている。それよりも、結婚や出産、子育て期間とい

ったライフステージの変化の方が、食のリスクに対する消費者の感度や、GM 食品の受容性に影響するのではないかと考えられ、これらの消費者の感度が変わるライフイベントや理由などを明らかにすることで、コミュニケーションの一助となる可能性がある。

また、GM サーモンの登場により、実用化された GMO (genetically modified organism) がこれまでの植物から動物に拡大した。その結果、従来 GMO の表示義務が無かった米国においても GM サーモンに対しては表示が必要であるといった議論

が発生するなど、GM やゲノム編集をめぐる社会的状況が変化してきている。

これまで通用してきたことが通用しなくなるなど、リスクコミュニケーションにおいても、より一層の配慮と、新たなコミュニケーションロジックや手法の開発が求められている。

本研究では、GM 食品が受容されない本質的原因の究明に取り組むとともに、動植物の育種や品種改良の現場における技術として、重要性が増す一方である GM 技術やゲノム編集技術について、国民の正しい理解と判断を手助けするために必要なコミュニケーションツールおよび手法を開発する目的で、3 か年で以下の研究を実施することとした。(図 1)

B. 本研究の内容

I. 最先端の GM 技術の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出 (初年度)

- ・昨今の市場において「不分別」という表示の商品がでてきていることから、数年前に行った GM 食品に対する消費者の意識と本年の意識に変化があるのかを確認した。
- ・昨年度の研究成果より、生物に対するリテラシーよりも年代の方が GM への受容性に影響が高いことが明らかになった。
- ・それにより、年代による GM への受容性の違いの要因であると考えられるライフイベント (結婚、子育て、子どもの独立等) に着目し、GM 食品に対する受容性や食の安全性の感度の違いを明らかにする。

II. 新たな説明ロジック及び説明ツールの開発 (初年度～二年目)

- ・最先端の GM 技術動向に合わせた説明

ツールを開発する。

III. 先進国や食品以外の分野における事例調査 (初年度～最終年度)

- ・各国における GM 食品および NBT の安全性審査の状況等について、最新の状況を把握する。
- ・GM サーモンの最新動向について情報収集を行う。

IV. リスクコミュニケーション手法の開発 (最終年度)

- ・アンケート調査による GM 作物に対する消費者の最新の受容性や調査、開発した説明ツールの検証を行う。

I. 最先端の GM・NBT 技術の整理とコミュニケーション上の問題点の抽出

2016 年 3 月に実施したアンケート調査では、高校生物の履修内容 (リテラシー) や履修課程 (年代) の違いによる GM 技術と GM 食品への理解と受容の可能性について整理した。

その調査結果から、高校生物の履修内容 (リテラシー) よりも履修課程 (年代) によって、GM への受容に差が生じる可能性があることが明らかになった (詳細は、II. に記載する)。

そのため、今年度は年代やライフステージの変化 (結婚、子育て、子ども独立等) に伴い、食生活・食への意識がどのように変容し、GM への受容に影響を与えているかを調査した。

また、数年前と現在では、消費者の意識に変化があるかどうかについて確認をした。

I-1. 研究方法

一般消費者に対して、Web アンケートを実施した。Web アンケートの実施要領は、下記の通りである。

- 調査実施日：2017年2月
- 有効回答数：523人
- 回収率：48.8%
- 方法：Web アンケート
- 調査項目：
 - 結婚の有無・同居家族の有無
 - 幼少期・現在の食生活、理想とする食生活（自炊・惣菜購入・外食等の行動別にその頻度や重視する点等を把握）
 - ライフステージの変化に伴う食の安全に関する意識変化
 - 食品のラベル表示に関する知識（遺伝子組換え不分別等）
 - GM食品（作物）の受容性
 - GM食品の購買判断 等

なお、サンプルの構成は、性別・年齢構成（20代、30代、40代、50代、60代以上の5分類）で各50人になるように均等に割付を行った。

I-2. 研究結果

(1) GM食品への抵抗感及び購入意向

食品の安全性に関心があると75.5%が回答しており、食品の安全性に不安を感じると67.1%が回答した（図2）。

GM食品への抵抗感については、53.9%があると回答した（図3）。GM食品の購入意向については、6割前後が購入したくないと回答しており、特に遺伝子組換えサケは68.1%と他の品目と比べて高い値であ

った（図19）。

(2) 食生活におけるGMへの意識

平日の夕食で遺伝子組換えか否かを気にするかという設問に対して、自炊の場合は45.1%が気にすると回答した。農薬が少ないか、食品添加物を含まないかを気にするのは、それぞれ54.3%、53.7%であり、これと比較すると若干低い割合となった（図5）。

一方、外食の場合においても、42.9%が遺伝子組換えか否かを気にすると回答しており、必ずしも食品表示がされていないにも関わらず、自炊の場合と同等の割合で関心が示された。食材の産地を気にする割合は45.2%であり、これと近い値であった（図6）。

(3) ライフステージの変化と食の安全性への関心

ライフステージの変化に伴い、食の安全性への関心がどのように変容してきたかという設問では、結婚前後及び妊娠・授乳前後で変化が大きかった。食の安全性を気にするという回答は、結婚前後で23.0%増加しており、妊娠・授乳前後で20.7%増加していた（図7）。

また、食の安全性を気にかけるきっかけについて、食品に関する事件の発生を挙げたのは75.2%であり、もっとも高かった。子どもの誕生を挙げたのが67.8%、結婚を挙げたのが44.7%であった（図8）。

(4) 食品のラベル表示に関する知識等

食品を購入する際にラベル表示を確認するかという設問に対して、55.1%が確認すると回答した（図9）。豆腐・ポテトチップスのラベルのイメージ画像を提示し、重視する項目を3つ聞いたところ、それぞれ

3割程度が遺伝子組換えか否かを選択した（図 10、図 11）。

また、「遺伝子組換え不分別」の意味を知っていると回答したのは 11.9%に留まった（図 12）。意味を知っていると回答した層では、不分別の場合に遺伝子組換えの原材料が含まれる割合について、「10%以上 30%未満」という回答が 17.7%でもっとも多かった（図 13）。一方、意味を知らないと回答した層では、遺伝子組換えの原材料が含まれる割合について、「5%未満」という回答が 11.7%でもっとも多かった。「遺伝子組換え不分別」の意味を知らない層では、遺伝子組換えの原材料が含まれる割合をより低く回答する傾向にあった。

(5) 過去からの消費者意識の変化の比較

研究分担者は 2007 年以降、継続的に消費者意識について調査を実施してきており、本調査結果との比較を行い、消費者意識の変化を把握した。

食品の安全性に関心があるかという設問について、「大変関心がある」、「関心がある」という回答の合計は、2008 年 3 月より減少傾向にある（図 14）。また、食品の安全性に不安を感じるかという設問について、「大変不安を感じる」、「不安を感じる」という回答の合計も同様に、2008 年より減少傾向にある（図 15）。さらに、2008 年 1 月に発生した中国産冷凍ギョウザ食中毒事件の報道後、中国産の食品を買い控えたかという設問について、「現在も買い控えている」という回答も減少傾向にある（図 16）。

なお、本調査では、平日の夕食に自炊の準備をする場合に気にする点を聞いているが、2007 年調査においても、食品表示で確認する項目を聞いている。両者で設問の形式は異なるため、単純に比較はできない

が、回答の分布について確認した。

価格や産地については、両年ともに消費者に重視されている項目であった（図 17、図 18）。また、食品添加物の方が遺伝子組換えよりも、2007 年には確認される食品表示であり、本調査でも気にされる割合は高かった。参考として、2007 年に遺伝子組換えの食品表示を確認すると回答したのは 65.6%であり、本調査で自炊の準備をする際に遺伝子組換えか否か気にすると回答したのは 45.1%であった。

I-3. 考察

食品の安全に関心がある層、食品の安全に不安を感じる層はともに 7割程度であった。GM 食品への抵抗感は 5割程度であり、2016 年調査と同程度であった。

農薬や食品添加物と比べると低い値であったが、平日の夕食で、遺伝子組換えか否かを気にすると 4割以上が回答した。外食の場合に遺伝子組換えの食材か否かを確認することは困難であるが、自炊の場合と外食の場合でほとんど差はなかった。食生活の形態に関わらず、遺伝子組換えについて一定の関心が持たれていることが明らかとなった。

また、食の安全を気にかけるきっかけについては、食品に関する事件の発生が主な理由に挙げられたが、結婚や妊娠・授乳等、ライフステージの変化についても、関心が変容する重要な契機と考えられた。

そして、食品のラベル表示については、5割以上が購入の際に確認しており、遺伝子組換えか否かの表示にも約 3割が関心を示した。一方で、遺伝子組換え「不分別」の意味を知っていると回答したのは、1割程度に留まった。意味を知らない層では、意味を知っている層と比べて、不分別の場合に遺伝子組換えの原材料が含まれる割合

をより低く回答する傾向にあった。一方で、全体では、遺伝子組換えの原材料が含まれている割合について、分からないと回答したのが 52.8%であることから、一般消費者は正確な知識をもって、遺伝子組換えに関する食品表示を確認できているわけではないと考えられる。

さらに、過去からの消費者意識の変化については、2008年3月以降、食品の安全性への関心・不安ともに減少傾向にあった。2008年1月に発生した中国産冷凍ギョウザ食中毒事件の報道から時間が経過するにつれて、買い控えも減少していることが明らかとなった。食品を購入する際に確認する項目では、2007・2016年ともに、遺伝子組換えよりも食品添加物の方が少し重視される傾向にあった。

II. 新たな説明ロジックおよび説明ツールの開発

遺伝やバイオテクノロジーに関するリテラシーに対して、その基礎的な知識の有無が影響を与えると考えられる。現在の高校生物の教科書では、GM技術に関してかなり高度な内容が含まれており、高校レベルの生物の知識があれば、GM技術の基礎的な理解ができると考えられる。

一方で、生物は必修科目ではなく、すべての人が履修しているわけではないため、高校までの教育課程において、学習指導要領の変化や選択科目の違いにより、GM技術についての学習状況に差が生じ、GM食品の受容性に影響を与えている可能性がある。また、必要な知識があってもGM食品の理解のためには、複数の単元の知識を結び付けて考える必要がある内容もあり、個人の論理的思考能力も大きく影響する。

例えば、GM食品を摂取しても、消化吸収される過程で、DNAも含めてタンパク質や脂肪、糖、アミノ酸等に分解されるため、組み換えられたDNAはそのままの形で体内に残存しないことが理解できれば、non-GM食品とGM食品に安全性の差はほとんどないとの判断に結び付くが、これはDNAの構造に加え、消化吸収メカニズムの知識も結び付けないと、判断できない事項である。

以上を踏まえ、昨年度実施した、GM技術の学習状況、その内容の定着状況、およびGM技術および食品の受容性に関するアンケート調査について、分析を行った。

II-1 研究方法

(1) アンケート調査

一般消費者に対するWebアンケートを実施した。Webアンケートの実施要領は下記のとおりである。

- 調査実施日：2016年3～4月
- 有効回答数：1,273人
- 回収率：79.9%
- 方法：Webアンケート
- 調査項目：
 - 履修した学習指導要領の区分
 - 生物の学習状況
 - 学習内容の理解（覚えているか）【テスト形式】
 - GM食品の安全性の理解（リテラシーがあるか）
 - GM食品の情報源信頼性
 - GM食品（作物）の受容性/GM食品の利益・リスク認識に対する態度・判断
 - GM食品の購買判断 等

なお、サンプルの構成は、学習指導要領が現指導要領以前に3世代にわたって改定されていることから、対象者を旧々々・旧々・旧課程学習者に分け、各課程で履修状況（生物Ⅱ相当を学習、生物Ⅰ相当を学習、生物を学習していない）、年齢

（旧々々課程では40歳と45歳、旧々課程では30歳と35歳、旧課程では20・21歳¹と25歳）性別で均等割り付けした。各課程で400サンプルを目標に回収した結果、計1273サンプルの有効回答を得た。

Ⅱ-2. 研究結果

(1) 食品を購入する際に重視する項目 (図 19)

食品を購入する際、GMでないかを重視している人は、全体で52.1%である。新鮮かどうかを重視する人が最も多く

(86.5%)、ついで味の良さ(86.1%)、価格の安さ(83.3%)である。

GMで無いかどうか(52.1%)は、農薬が少ないか(54.0%)と食品添加物が含まれていないか(51.6%)の間に位置している。

(2) GM食品への抵抗感 (図 20、図 21)

高校生物の履修状況別では、生物Ⅱ・生物(発展的内容)学習者であっても、50%以上が、遺伝子組換え作物・食品を国内で生産することや、遺伝子組換え食品そのものに対して抵抗感を持っている。

履修課程ごとの分析では、年齢が上になる履修過程が古い人ほど遺伝子組換えに対する抵抗感が高く、旧々々課程(40代)

で60%以上が遺伝子組換えに対する抵抗感を持っているのに対し、旧課程(20代)では40%余りとどまる。

履修内容の難易度よりも、履修課程(世代)によって、抵抗感に差が出る結果となった。

(3) GM食品の摂食意向 (図 22、図 23、図 24)

摂食意向では、GM野菜、肉、魚での差はほとんど見られなかった。

高校生物の履修状況別では、ほとんど差は見られなかったが、生物Ⅱ・生物(発展的内容)学習者と生物を選択していない人で摂食意向が高めの結果であった。

履修課程別では、年齢が上になる履修状況が古い人ほど「食べない」「どちらかといえば食べない」と回答した人が多く、旧々々課程(40代)で70%以上が「食べない」「どちらかといえば食べない」と回答しているのに対し、旧課程(20代)では50%から60%の間にとどまる。

(4) 遺伝子組換え・消化に関する知識 (図 25、図 26、図 27)

DNAが4種類の塩基から構成されることについて、全体の正答率は51.8%であった。

タンパク質が消化酵素によりアミノ酸に分解されることについて、全体の正答率は56.6%であった。

遺伝子組換え食品が体内でどのように消化吸収されるかについては、全体の正答率は41.7%で、不正解者は、組換えられたDNAは、そのまま吸収されると認識している人が多かった。

¹ 若年層はアンケートモニターの登録数が少ないため、十分な有効回答を得るために、旧

課程の一番若い層のみ20歳と21歳を対象とした。

履修内容の難易度が高い程、正答率も高い傾向があるが、履修課程の違いによる意識の傾向はあまり見られなかった。

II-3. 考察

食品を購入する際に重視する事項として、GMかどうかは最も重視される事項ではないが、農薬や食品添加物といった、一般的にリスクとして認識されている内容と同程度に重視されている。価格や、新鮮さ、味等の品質情報と比較すると重視されていないが、品質が同程度の食品と比較した際に、できれば避けたいリスクとして認知されている可能性が高い。

また、履修別の傾向については、履修難易度（生物に対するリテラシー）での差はあまり見られず、課程別（年代）での差が大きかった。

単に年齢による影響のほか、年齢特有のライフイベント（結婚、出産、育児等）の影響等、年齢によるGMに対する受容性の差の要因が存在する可能性がある。

II-4. 説明ツールの開発について

昨年度までの調査結果を踏まえて、消費者にGM技術とその食品への応用、安全性の理解を促す説明ツールの開発も同時に試みてきた。しかし、昨年度までに試みた結果は、専門家および政策側の方々の様々な意向を踏まえながら修正を繰り返したことによって、本来、消費者に理解してほしいポイントがずれてしまった感がする。また、医療イラストの専門家とも検討してきたが、何を描いてほしいかをはっきりとさせる必要があるとの指摘であった。

例えば、「CRISPR Cas9という技術について、消費者に分かりやすく描いてもらいたい」では何をポイントとして描くのか、何を簡単にしたらいいのかを捕まえるべく描きづらい

とのことである。1)CRISPR Cas9のメカニズムだけを分かりやすくしたいのか、2)その技術の安全性を訴えたいのか、3)自然界で起こることと同じであることを説明するのか、環境への影響、どのように生活に入ってくるのか（入っているのか）等々はどうするのかを決め（ストーリー作り）、その上で、消費者の年代別などを考えたイラストの描き方が必要である。年代もティーンエイジャーから20代半ばならアニメーションの利用も考えられるが、40代以降にはアニメーションは不適切である。また20代後半から30代、40代前半までは子供の成長などとの兼ね合いを考えたアプローチが、消費者の興味をリスクコミュニケーションに向けることができる。そのためには、1つのテーマでも2~3種類のアプローチを用意する必要性が考えられた。

本年度の結果を踏まえ、イラストのストーリーの作成をし、いくつかの段階に分けた説明と、その対象者と各段階のポイントを絞った説明ツールの作成を引き続き検討する。

III. 先進国や食品以外の分野における事例調査(GMサーモンの報道調査)

過年度の研究より、昨今のGM食品に関する行政の注目すべき動向として、GM動物の評価・管理体制に関する欧米の動きが認められた。特に米国では、GMサーモンが及ぼす環境影響について、重大な影響はないと評価され、FDA（米国食品医薬品局）によって食品利用が承認されたと、2015年11月19日に発表された。今回承認されたGMサーモンは世界で食品として初めて承認されたGM動物であり、我が国においても早急に対応を検討する必要があるものと考えられる。

そこで、昨年度に引き続き、GM サーモンの食品利用に係る動向やその反響についてレビューを行った。

Ⅲ-1. 研究方法

(1) 米国・カナダの動向調査

AquaBounty 社による GM サーモン (AquAdvantage® Salmon) の食品利用の承認を受け、食品関連企業の動向を調べるために、企業各社の Web サイトを確認し、情報収集を行った。また、メディア各社の GM サーモンに関する報道を調べるために、海外の報道記事等の収集を行った。

(2) EU の動向調査

平成 29 年 2 月 2 日に農林水産省の研究班が開催した「ゲノム編集に関する米欧の現状に関する意見交換会」に参加し、NBT に関する欧州の最新動向について情報収集を実施した。

セミナーの開催概要は下記の通りである。

- 開催日時：平成 29 年 2 月 2 日（木 13:30～15:30
- 開催場所：農林水産省農林水産技術会議委員室
- 講師：
 - Jean-Christophe Pages 氏、フ

² An Act establishing the genetic engineering transparency food labeling act

³ People want GMO food labeled — which is pretty much all they know about GMOs https://www.washingtonpost.com/news/energy-environment/wp/2016/07/21/people-want-gmo-food-labeled-which-is-pretty-much-all-they-know-about-gmos/?utm_term=.8e4e7f84a912
Congress OKs bill requiring labels for

ランスバイオテクノロジー高等審議会科学委員会委員長

- Jennifer Kuzma 氏、ノースカロライナ大学教授、Genetic Engineering and Society Center 共同代表（体調不良のため欠席。コーディネーターより発表予定内容の概要が紹介された）

Ⅲ-2. 研究結果

(1) 米国・カナダの動向調査

①米国

2015 年 11 月 19 日に、FDA が GM サーモンの生産・販売を承認し、米国メディアでも大きく報道された。GM サーモンについて、FDA は栄養価が通常のサーモンと等しい等の理由から、遺伝子組換えの表示を義務付けていない。しかし、2016 年 3 月末～4 月、表示を義務付ける法案が米国マサチューセッツ州の議会等を通じた²。このように、GM 表示を巡る米国各州の動きが活発化したことを背景に、州毎に表示が異なることへの対応が必要となった。このことから、2016 年 7 月 29 日に、遺伝子組換え食品表示義務化法案（通称「GMO 表示義務法（S. 764）」）にオバマ大統領が署名したことを Boston Globe、NY Times、Washington Post 等各新聞社が報道している³。この法案によ

genetically modified foods

<https://www.bostonglobe.com/business/2016/07/14/congress-oks-bill-requiring-first-gmo-food-labels/qOglugWMxGwTaluSuo6gDL/story.html>

G.M.O. Labeling Bill Gains House Approval

<https://www.nytimes.com/2016/07/15/business/gmo-labeling-bill-gains-house->

り、米国全土で販売される食品に GM 表示が義務化され、メーカーは遺伝子組換え食品の パッケージに①「遺伝子組換え原料を含む」ことの表示、②遺伝子組換え作物が含まれていることが理解できるようなシンボルマークの表示、③スマートフォンで読み込める QR コードによるインターネット上での詳細の明記、これらのいずれかの義務を負うことになった。

食品関連企業の動向としては、FDA による GM サーモンの承認後、2 社 (Costco 及び Safeway) で自社ホームページ等において、GM サーモンを取り扱わない旨の表明がされている。具体的な表明内容については、以下の通りである。

- Costco⁴
 - ‘Although the FDA has approved the sale of GM salmon, Costco has not sold and does not intend to sell GM salmon at this time.’
 - 「FDA が GM サーモンの販売を承認したが、Costco は GM サーモンを販売しておらず、現時点では販売するつもりはない」
- Safeway⁵
 - ‘While the FDA approved GE salmon for human consumption in November of 2015, we are not considering nor do we have any plans to carry GE salmon.’
 - 「2015 年 11 月に FDA が GM

[approval.html? r=0](#)

⁴ http://webiva-downton.s3.amazonaws.com/877/4d/7/6857/Costco_GMO_salmon_statement.pdf

⁵ <http://csr.site.safeway.com/home/report-overview/position-statements/>

サーモンの消費を承認したが、我々は GM サーモンを提供するつもりはなく、その予定もない」

また、国際環境 NGO 「Friends of the Earth (FoE)」は、食料品店・海産物取引企業・レストランに対して、遺伝子組換え海産物を取り扱うか否か調査をしており、取り扱わない旨表明している企業のリストを公表している (図 28)。本リストには、Costco 及び Safeway の 2 社も記載されている。

そして、PRNewswire は、GM サーモンの開発を行った AquaBounty 社が 2017 年 1 月 19 日に NASDAQ に上場したことを報道している⁶。アメリカ市場への株式公開によって、さらに食料生産の戦略が広がるとしている。NASDAQ 上場の背景には 2016 年 11 月の親会社の Intrexon との会社分割の決定があり、AquaBounty 社の株の売却によって 2,500 万ドルの資金調達となされ、条件として NASDAQ 上場の書類手続きが行われた。この資金調達によって、少なくとも 2 年間は GM サーモン展開戦略を進めるための資金が賄われ、北米での新しい生産施設の建設等が検討されている。

②カナダの動向調査

AquaBounty 社のサーモンの卵の輸出期限に間に合うように、同社からカナダ食品検査庁は安全評価試験を急かされ、試験を急いで実施した可能性があることが、政府

⁶ AquaBounty Announces Completion of NASDAQ Listing and Equity Subscription from Intrexon
<http://money.cnn.com/news/newsfeeds/articles/prnewswire/NE91744.htm>

の書類から明らかになったと **Canadian Broadcast Corporation** (カナダ放送協会) が報道している (報道日: 2017年1月11日)⁷。カナダ食品検査庁はサーモンの卵に対して輸出前に4つの疾病の検査を実施したが、2016年3月の輸出期限が迫る中で **AquaBounty** 社の問い合わせに急かされ、試験の早急対応を迫られたようである。**AquaBounty** 社のコメントとしては、不当に圧力をかけたことは否定しており、卵の貯蔵寿命に応じてカナダ食品検査庁に適切な時期に仕事を完了してもらえよう要請しただけだと述べている。これに対し、カナダのGM反対運動団体「**Canadian Biotechnology Action Network**」は、政府の仕事は **AquaBounty** 社の商品が流通できるようにすることではなく、食品の安全な提供を保証することだと見解を述べている。

また、**AquaBounty** 社への販売認可に対して消費者保護団体の「**Ecojustice**」、「**Living Oceans Society**」、「**Ecology Action Centre**」がカナダ政府に対して上訴をしていたが、2016年10月21日にカナダの連邦裁判所で消費者保護団体側の訴えが棄却されたと **Radio Canada International (RCI)** によって報道されている (報道日: 2016年11月8日)⁸。消費者保護団体側の主張としては、政府の認可方法が政府の環境規則 (**Canadian Environmental Protection Act**) に則っていなかった点や、他種の動物にGMの可能性を広げる懸念を挙げていた。訴えが棄却されたため、今後の消費者保護団体の動

きとして、さらなる裁判所への提訴が可能かどうか注視され、もし不可能であれば一般家庭へのGM食品の周知方法や、ラベル表示の必要性について言及するだろうとの考えを述べている。

(2) EUの動向調査

EUの **New Technology Working Group (NTWG)** によるレポートでは、科学的には **European Commission (EC)** 指令 (2001/18/EC) において判断するのが適切との評価結果を提出している。その後、政治的な結論はまだ出ていない。

EUの大多数の専門家の意見は、**ZFN-1** と **ZFN-2** により作出された生物は **GMO** であるが、規制対象からは除外されるべきであるというものである。**ZFN-1** と **ZFN-2** による結果は、従来育種で発生する突然変異と区別できないためである。

NTWG によれば、以下は **GMO** として規制すべきでないとしている。

- オリゴヌクレオチドによる突然変異
- **ZFN-1**、**ZFN-2** (組換え遺伝子を含むものを除く)
- GMの台木に接木して **non-GM** の部分に生じた果実等
- アグロインフィルトレーション
- メチル化によるものでDNAに次世代に遺伝する変異が起きていないもの
- リバースブリーディング

フランスでは **Haut Conseil des Biotechnologies (HCB)** バイオテクノロジー

⁷ CFIA fast-tracked tests on genetically modified salmon eggs for exports, documents suggest <http://www.cbc.ca/news/politics/genetically-modified-salmon-cfia-aquabounty>

1.3929571

⁸ Radio Canada International <http://www.rcinet.ca/en/2016/11/08/another-setback-for-groups-opposed-to-gm-salmon/>

一のための高等委員会)で検討を行った。政府から HCB に以下の点が質問された。

- ゲノム編集による産物の検査ができるのか
- 使用された技術が特定できるのか
- 産物を区別するための特定方法
- ゲノム編集されていない作物との共存
- 技術のリスク
- 緩和策、改善策
- 商業化される前に可能な特定方法

また、以下のリスクについて議論した結果、実際に作出された植物の特徴でケースごとに判断すべきと考えている。

- オフターゲット操作について（頻繁に起こる可能性がある点、局所化する可能性がある点）
- ベクターの使用について（痕跡が残るか、影響があるか）
- SDN の容易性について（変異の加速化、予期せぬ新たな特質、新種の創出、新たな機能を多発的にもたらす）

III-3. 考察

(1) 米国・カナダの動向調査

マサチューセッツ州をはじめとする各州で GM 表示を義務付ける法案が作成されていることを受け、食品関連企業も対応が迫られていることが窺える。実際に、FDA による GM サーモンの承認後、2 社（Costco 及び Safeway）で GM サーモンを取り扱わない旨の表明がなされている。

今後注目すべき動向として、「GMO 表示義務法（S. 764）」の成立以降の小売業者の対応が挙げられる。この法律は各州の

法律で細かく定められた表示法に比べ、スマートフォンで読み込める QR コードの表示だけでも良いという点から消費者保護団体からの反発が強く、表示方法として主張が弱いという懸念が上がっている⁹。小売業者はこれを受けて GM 食品マークを自社販売製品に表示するか、バーコードで済ますかの選択を迫られることとなる。

また、AquaBounty 社が新興企業向け株式市場である NASDAQ に上場したことで、AquaBounty 社の資金調達はよりスムーズに進み、戦略の幅が広がると考えられる。それに加え、GM サーモンの生産源としての認知度が上がり、今後さらなる注目を浴びることが予想される。これによって、GM 食品の問題がさらに広く社会の関心を集め、取り上げられる可能性がある。

カナダ連邦裁判所での訴えの棄却により、今後の論点として GM 食品の表示方法が注目されると想定される。一方で、カナダ食品検査庁の安全評価試験のように、糾弾の対象となり得る事実が明らかになると、消費者の不安につながりかねないため、関係団体は慎重に GM 食品の生産販売の手続きを踏むことが予測される。

(2) EU の動向調査

NBT について科学的な検討結果についての結論は提出されており、それを受けてどのような枠組みで管理・規制を行っていくかという政治的な結論がまだ明確になっていない。これは、2015 年から変わっておらず EU 内でも GM は難しい問題でこの着状態であることが伺える。

一方で、米国では NBT については規制

⁹ President Signs Law That Overturns Vermont GMO Labeling Rules, Replaces Them With Barcodes
<https://consumerist.com/2016/07/29/preside>

nt-signs-law-that-outlaws-vermont-gmo-labeling-rules-replaces-them-with-barcodes/

対象とせず実用化が進み、NBT を用いた生物ですでに承認されているものもある。

ある国では規制対象外となり普及、環境放出が進んだ生物で、別の国では規制対象となるという自体が発生しうる可能性が高くなってきている。

今後国際的に足並みをそろえた対応を行うことが必要不可欠であり、対応を定めるために国民の理解を得る必要がある。そのために、リスクコミュニケーションが喫緊の課題である。

C. 結論

日本の消費者は、GM 食品に対して添加物、農薬と大体同じ程度で気にしており、添加物、農薬に対する一般的な消費者の対応を考えるとリスクとして捉えられていると考えられる。「遺伝子組換え不分別」という表示の意味なども内容は理解されず、避けられているというのが実態である。

食の安全性を気にかけるきっかけとしては、食品に関する事件の発生が主な理由であるが、結婚や妊娠、育児などのライフイベントも契機となっている。きっかけとなるライフイベントを対象として、それぞれの関心に応じた適切な情報提供を行っていくことが、有効な手段となる可能性がある。

GM の登場以来、消費者の受容性はあまり変化しておらず、それは EU でも NBT をめぐる対応を見ていると同様であることが伺える。しかし、育種に関する技術は近年めまぐるしく進歩しており、NBT や GM サーモンなど新しい技術や GMO が登場し、各国の規制の方向性が統一・確定されない状況で実用化は進んでいる。

新たな技術を用いた食品については、たとえ科学的な安全性の評価結果に問題は無くても、カナダの食品検査庁のように対応

に瑕疵があると、生物自体も忌避される存在となる。科学的な安全性評価の結果と相応な社会的合意、消費者判断を得られるようなリスクコミュニケーションが喫緊の課題である。

D. 健康危険情報

なし

F. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) 高谷幸、山本茂貴、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、山口健太郎、池田佳代子、名倉 卓、南谷 怜、一蝶茂人、フードディフェンス 食品防御対策ガイドライン 準拠。今村知明[編] 2016年7月22日。
- 2) K. Komoto, S. Okamoto, M. Hamada, N. Obana, M. Samori, & T. Imamura. Japanese consumer perceptions of genetically modified food: Findings from an international comparative study. *Interact J Med Res* 2016; 5(3), e23, p.1-19.

2. 学会発表・講演

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I 図表

A 研究目的

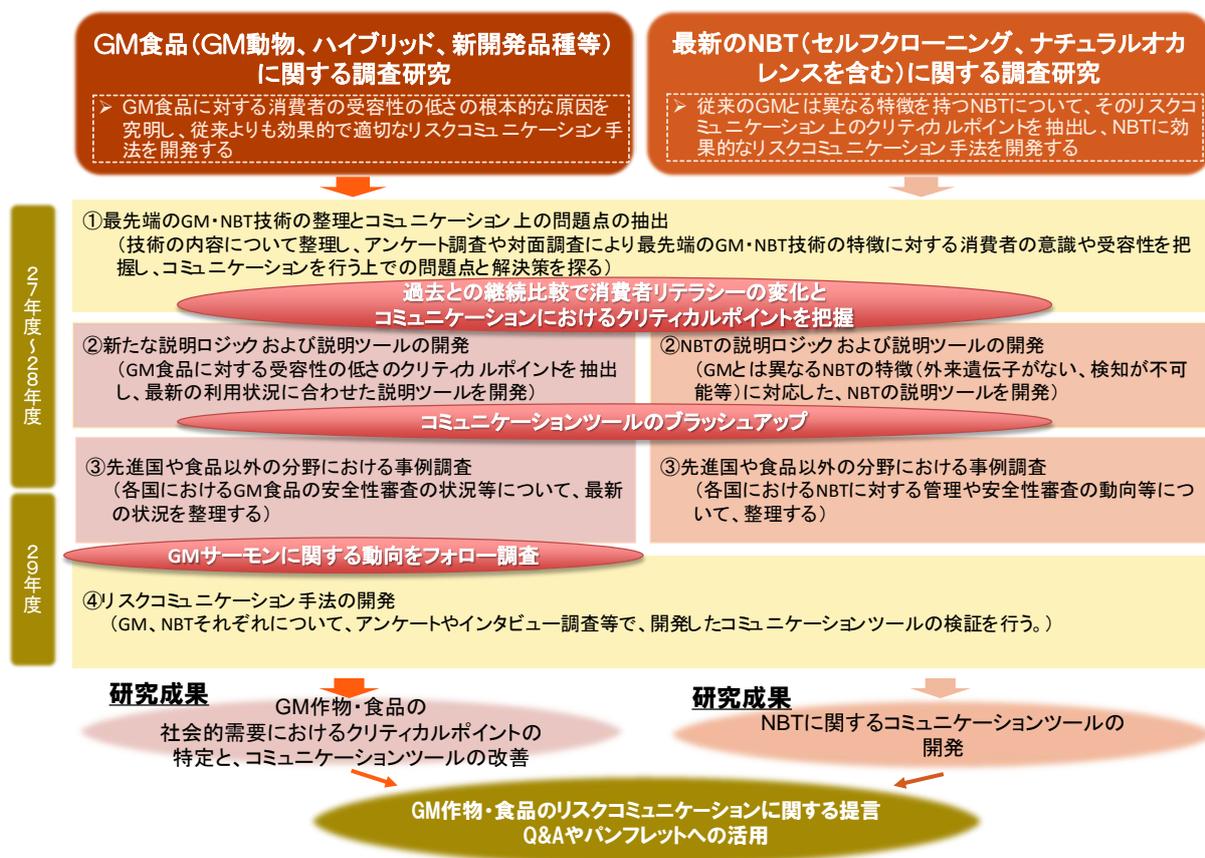


図 1 研究の全体像

B. 本研究の内容

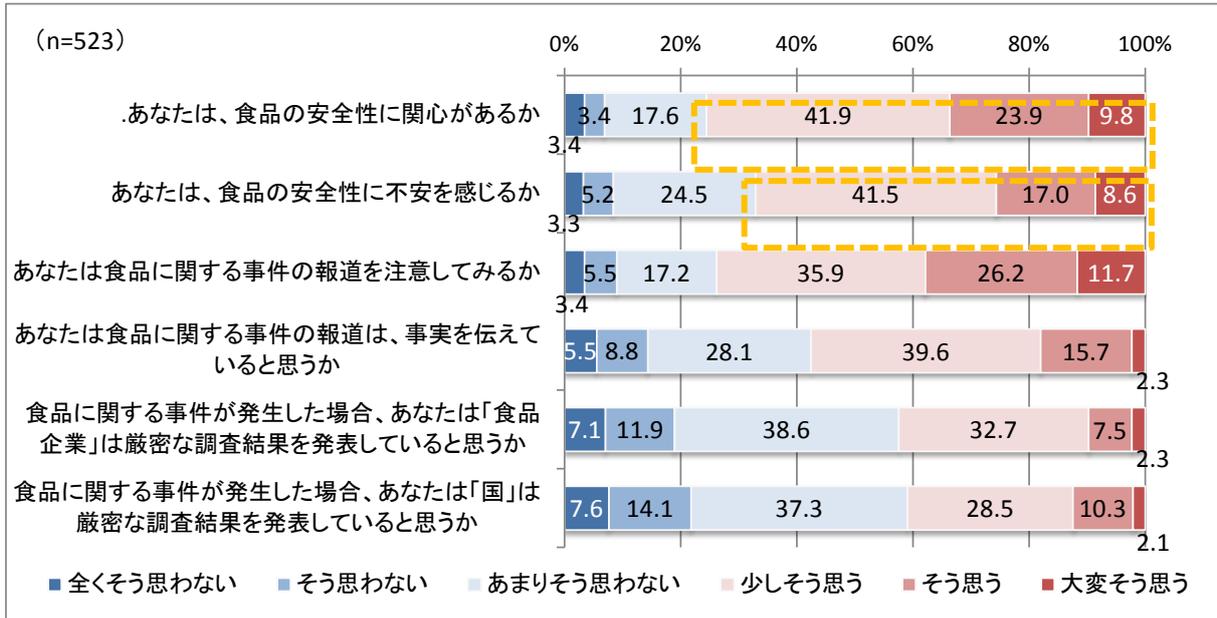


図 2 以下の設問に答えなさい

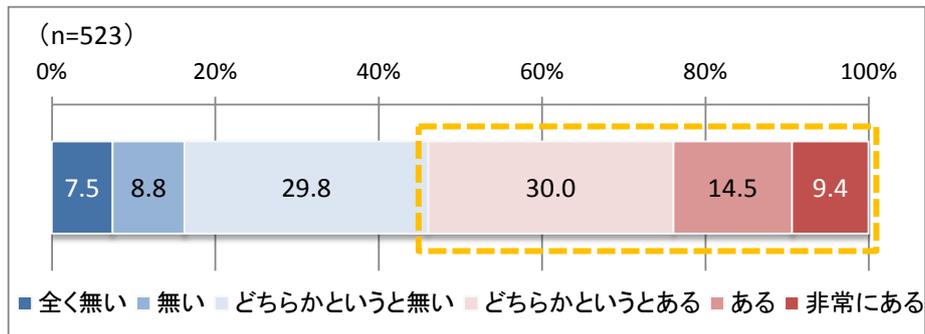


図 3 遺伝子組換え食品に抵抗がありますか

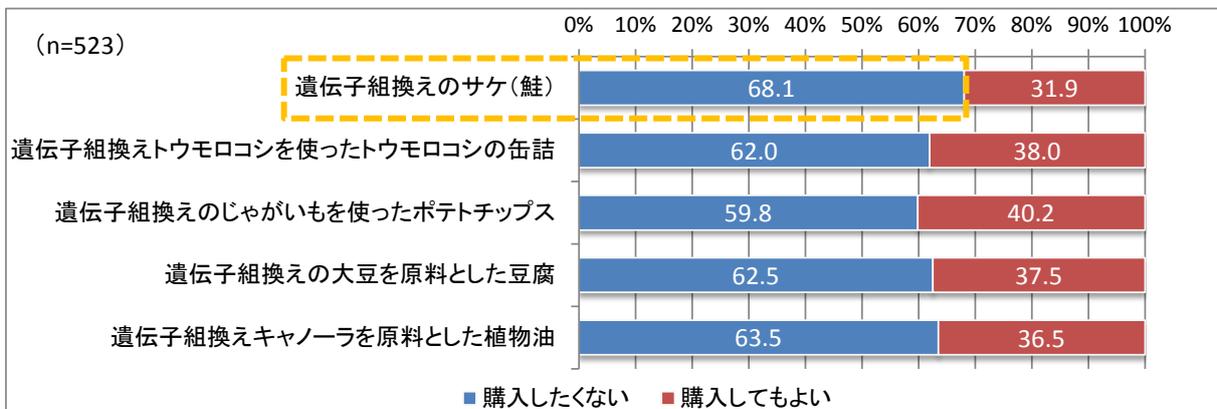


図 4 以下の製品について「購入してもよい」か「購入したくない」かお答えください

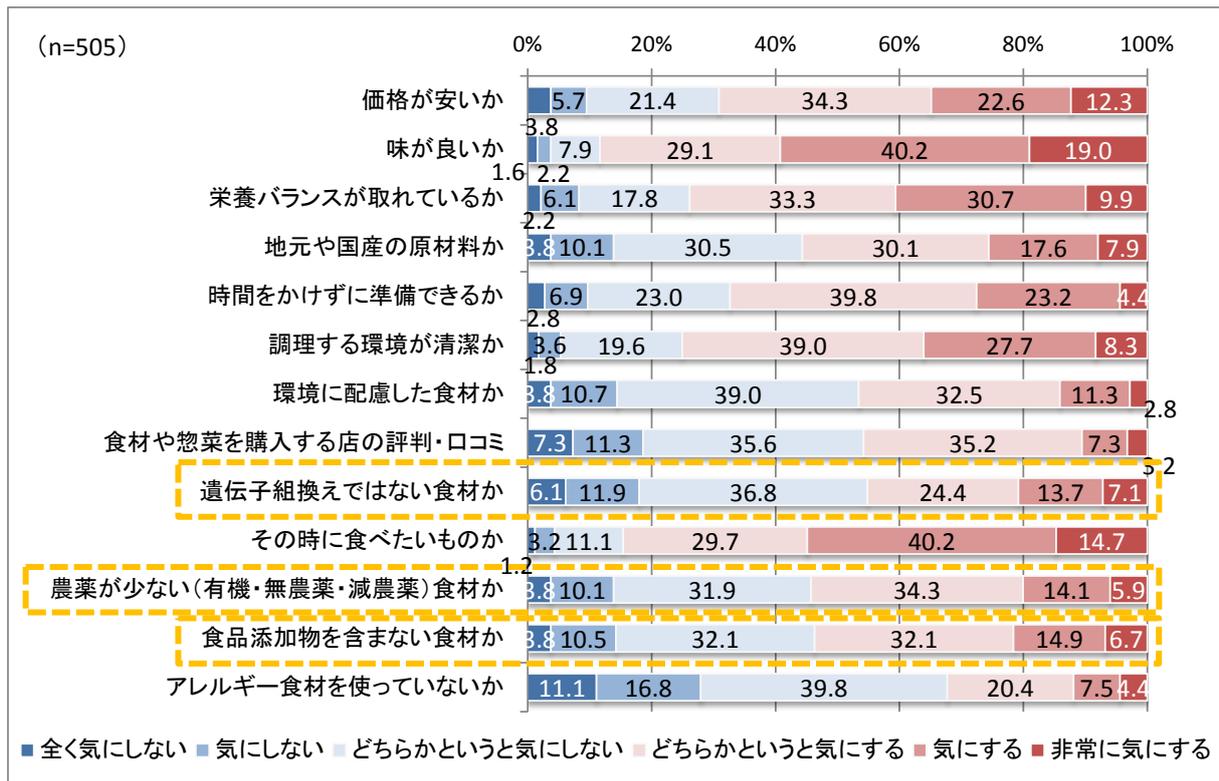


図 5 あなたは、平日の夕食に家で食べる食事を準備する際、以下の点をどの程度気にしていますか

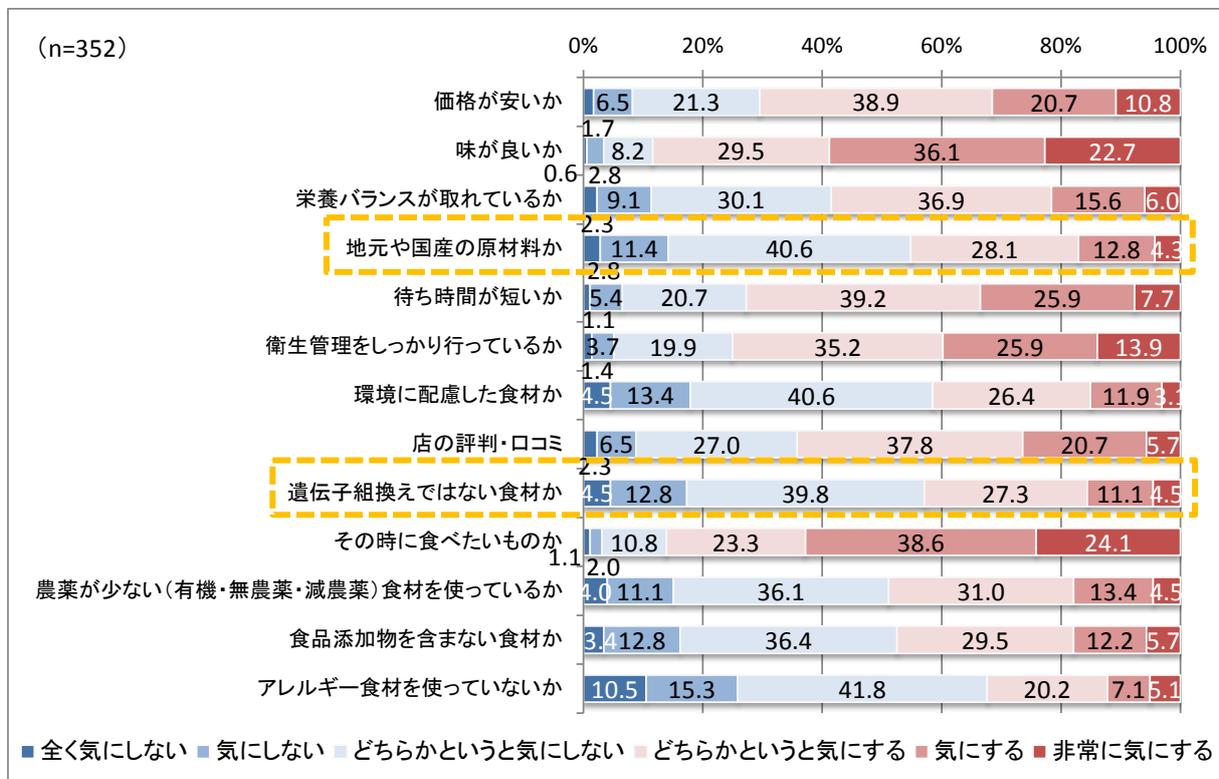


図 6 あなたは、平日の夕食に外食する際、以下の点をどの程度気にしていますか

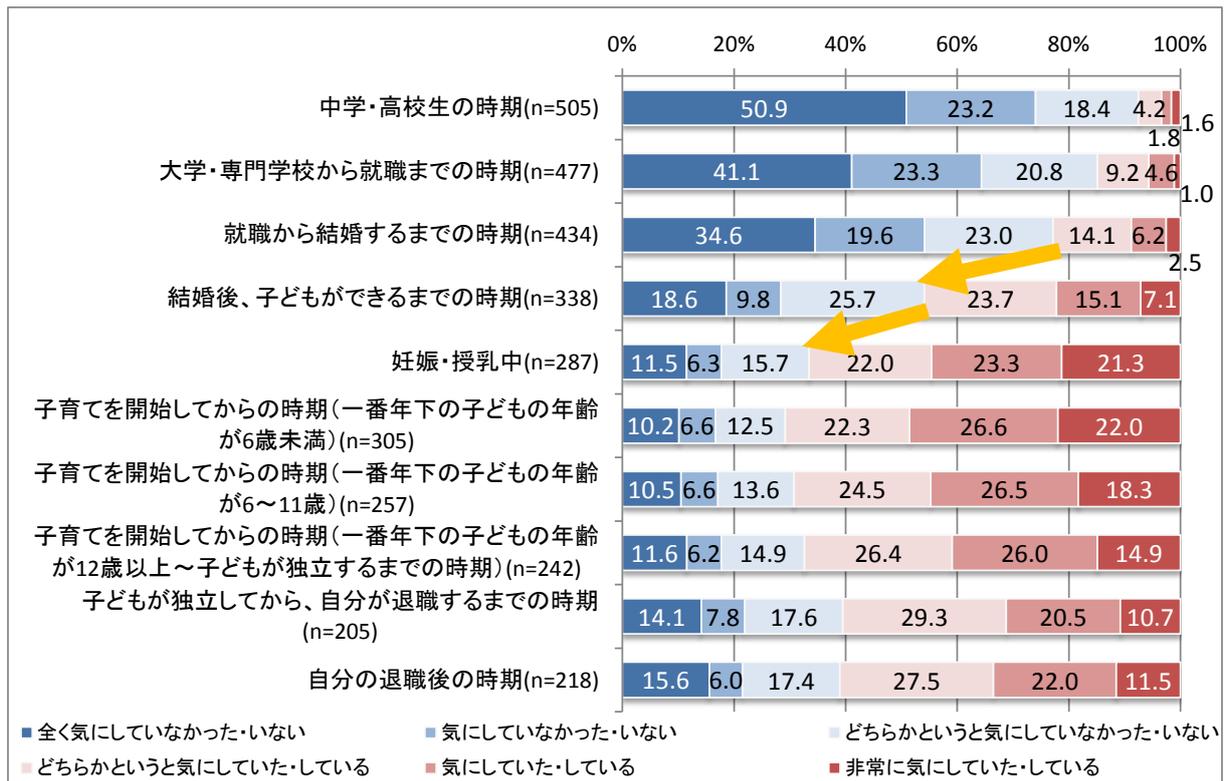


図 7 あなたが下記の年代において、自分が食べるものの安全性をどの程度気にかけてきましたか

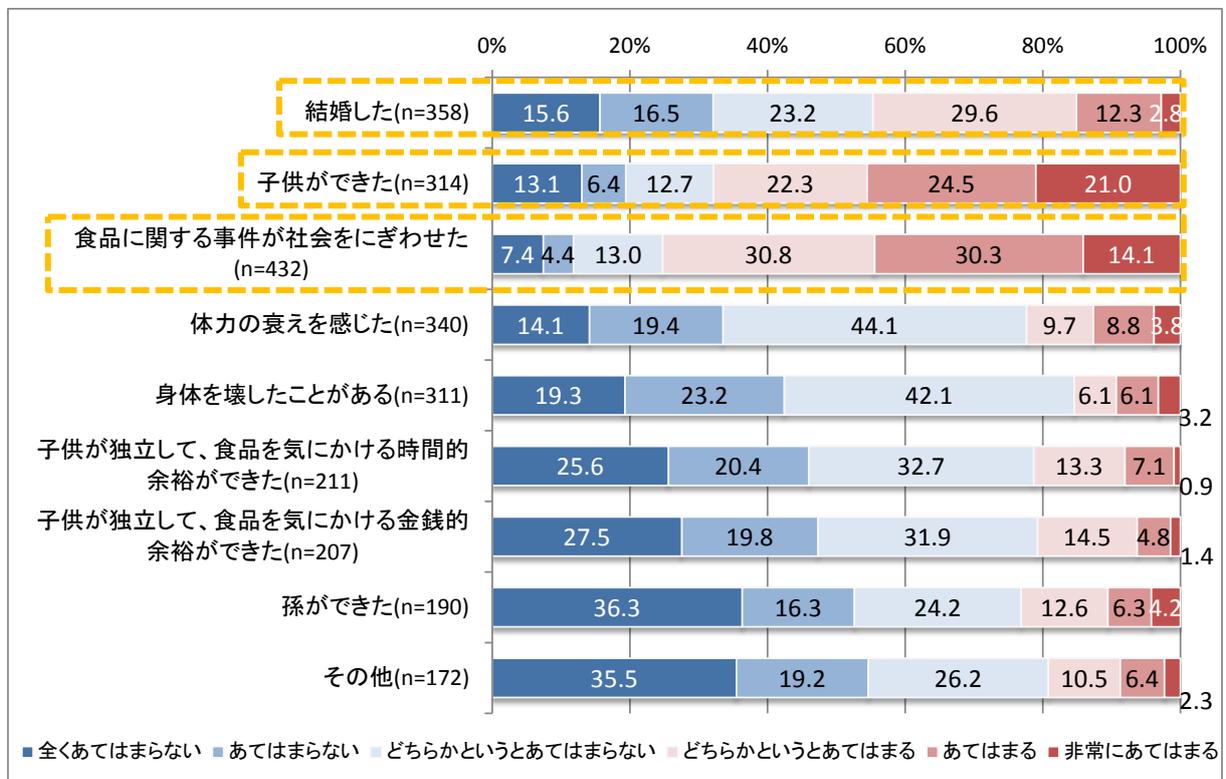


図 8 食品の安全性を気にかけるきっかけは何でしたか

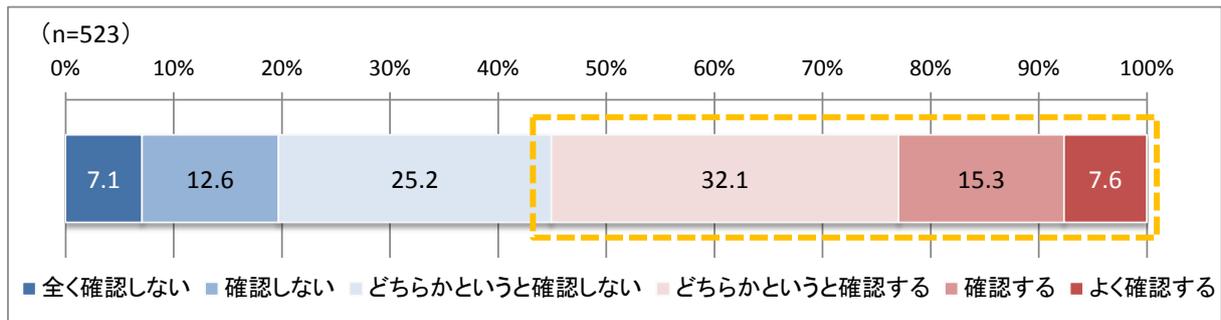


図 9 あなたは食品を購入する際、原材料や栄養成分が記載されたラベルを確認しますか

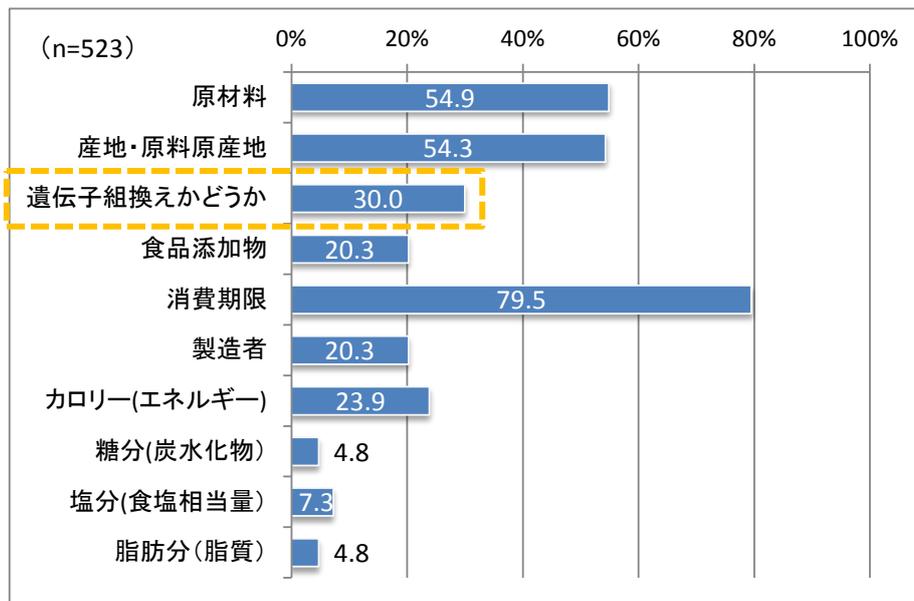


図 10 豆腐を想定して、食品ラベル表示でもっとも重視するものを3つお答えください

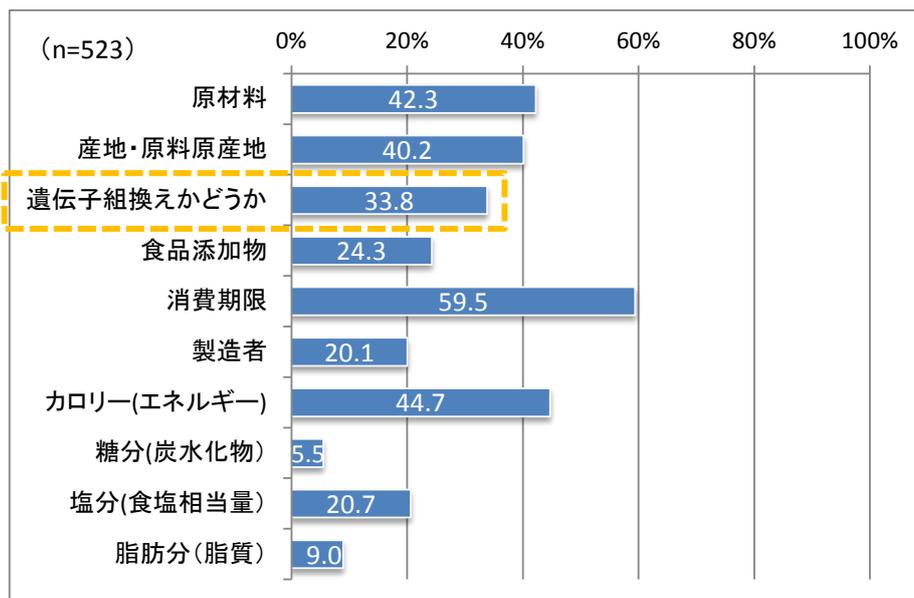


図 11 ポテトチップスを想定して、食品ラベル表示でもっとも重視するものを3つお答えください

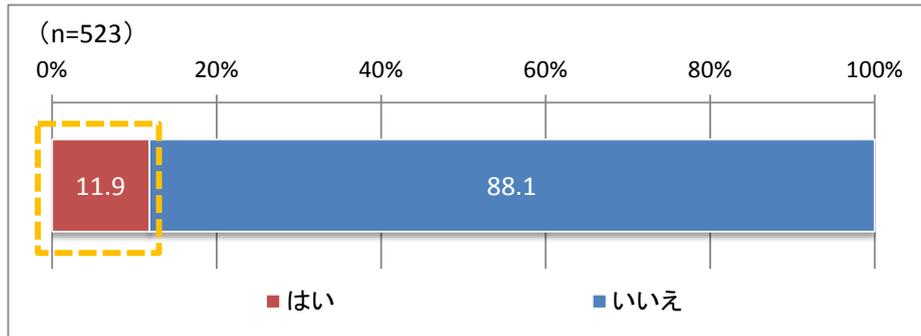


図 12 食品ラベルに「不分別」と表示されているものがあります。あなたは「不分別」がどういう意味かを知っていますか

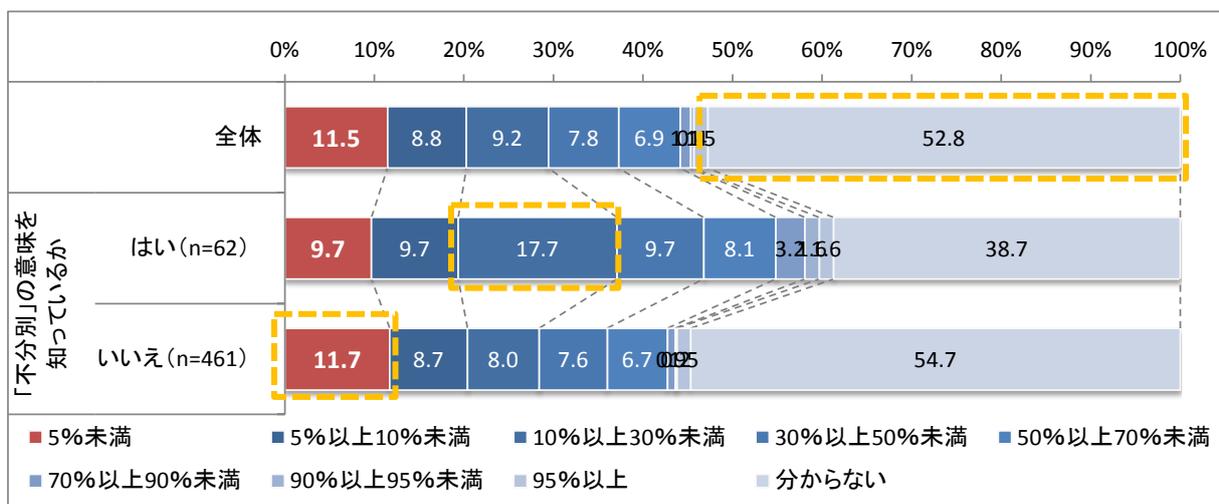


図 13 遺伝子組換え不分別の食品には、どの程度の割合で遺伝子組換えの原材料が含まれていると思いますか

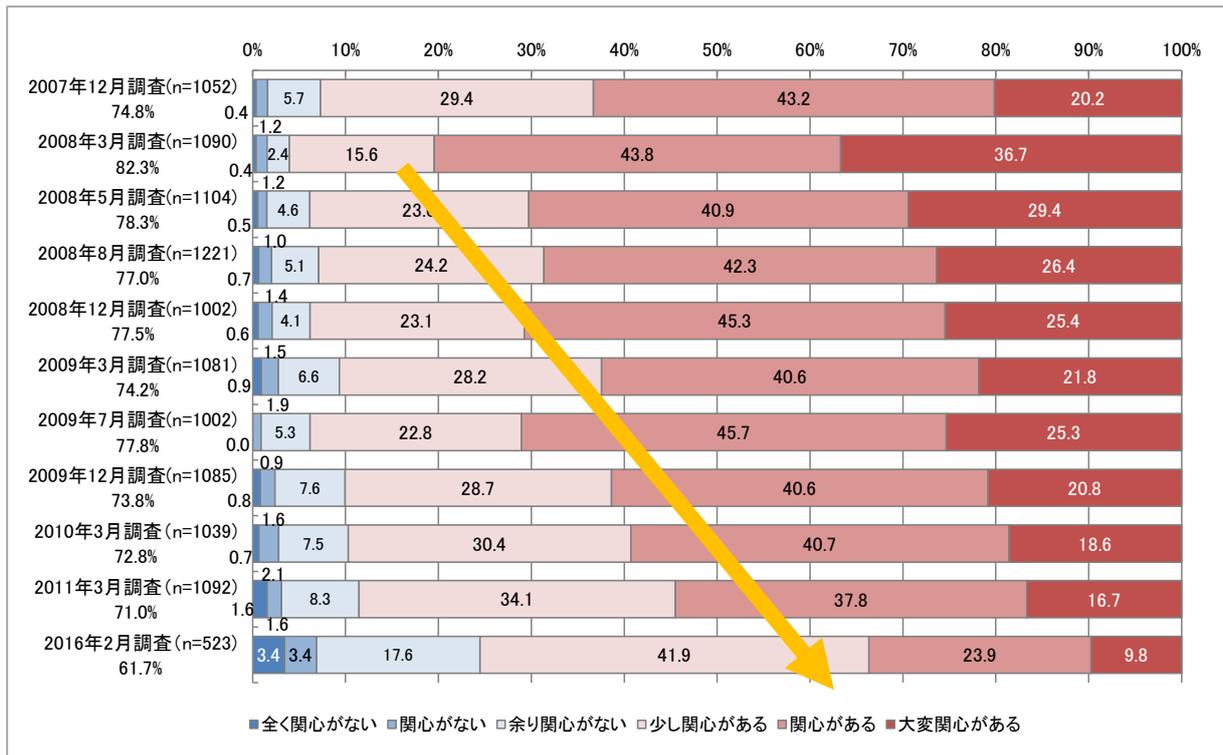


図 14 あなたは、食品の安全性に関心がありますか

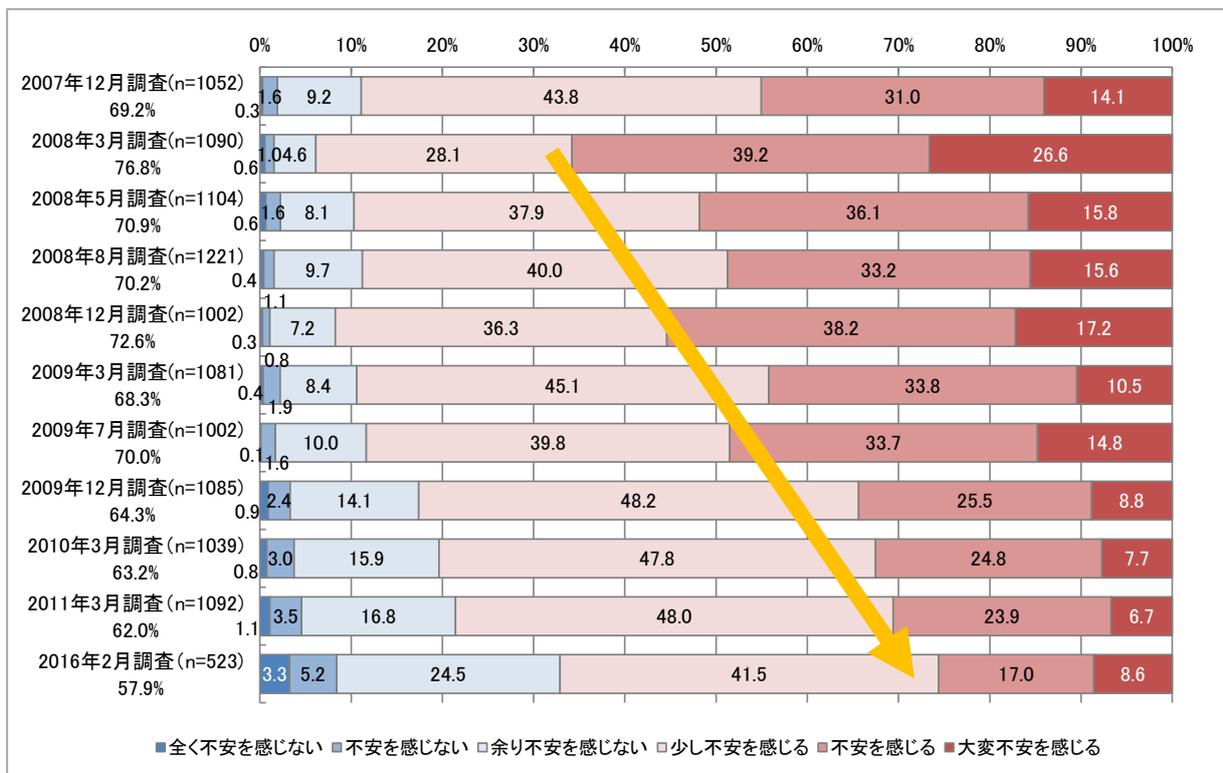


図 15 あなたは、食品の安全性に不安を感じますか

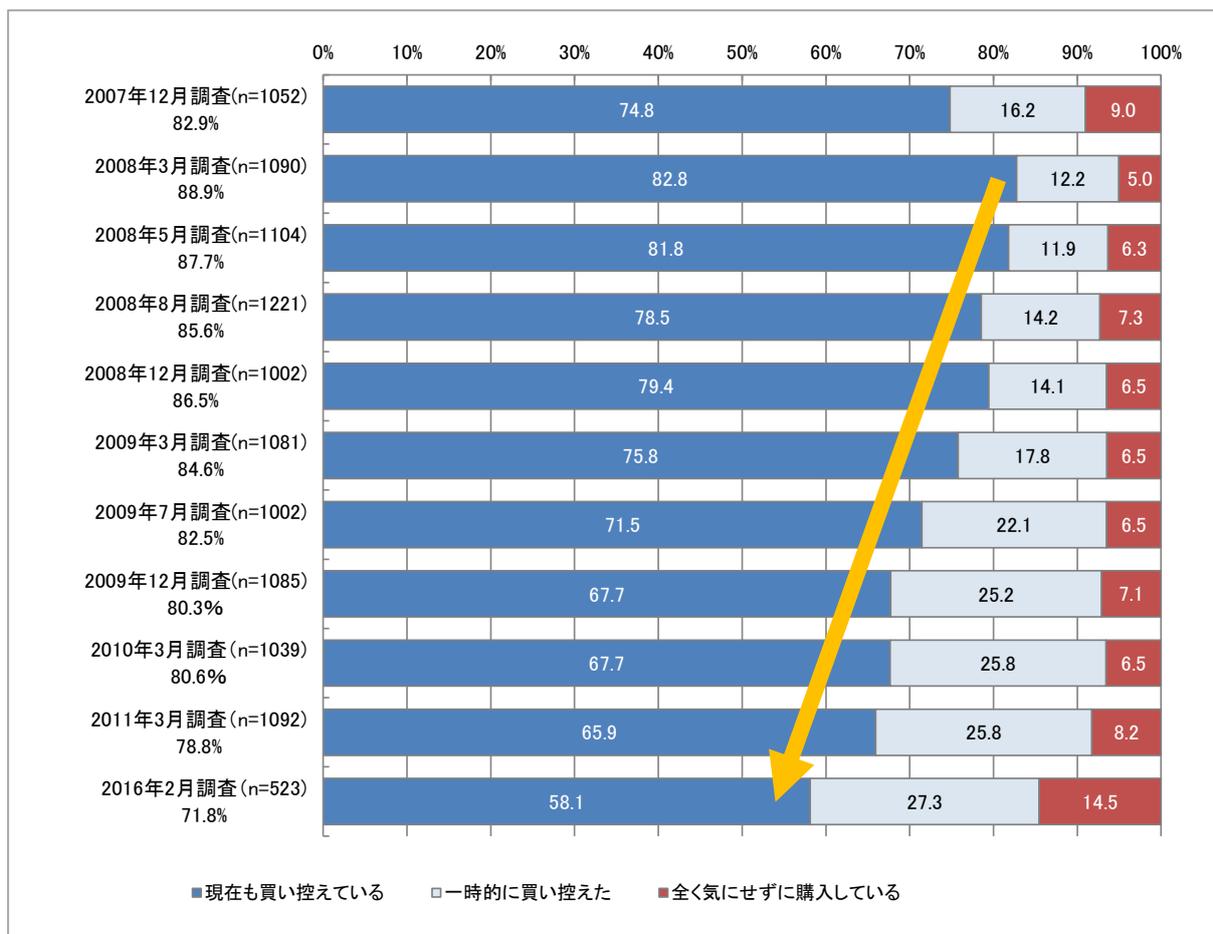


図 16 中国産の冷凍ギョウザによる食中毒事件の報道後、中国産の食品を買い控えましたか

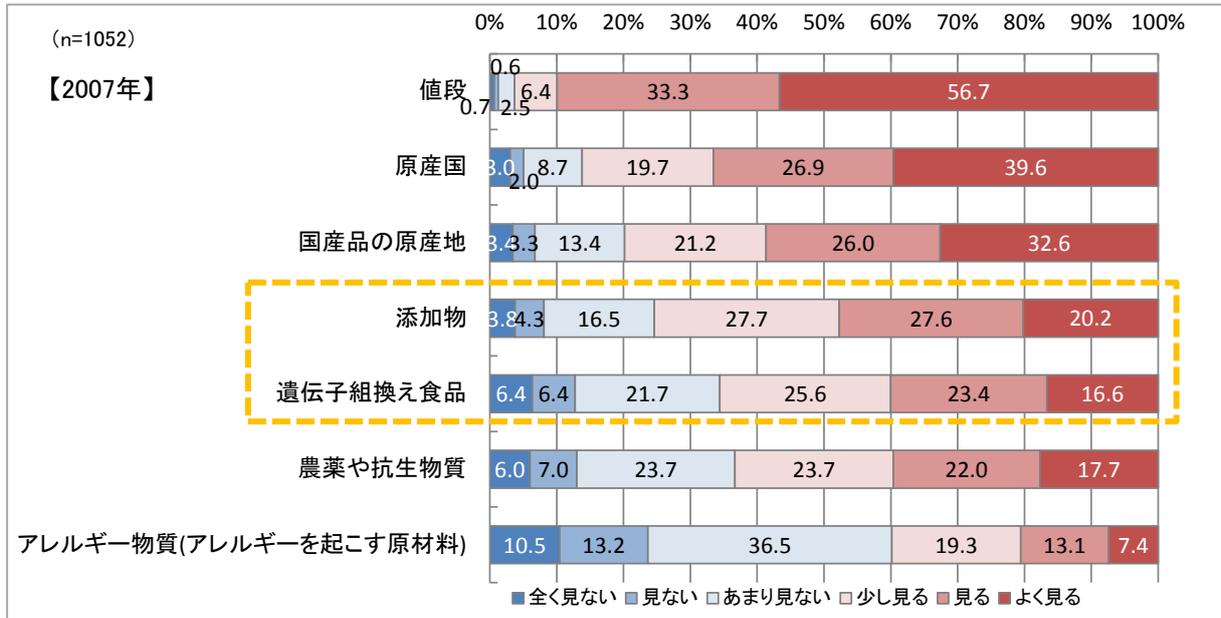


図 17 あなたは、食品の表示を見る場合には、どの項目を見ますか

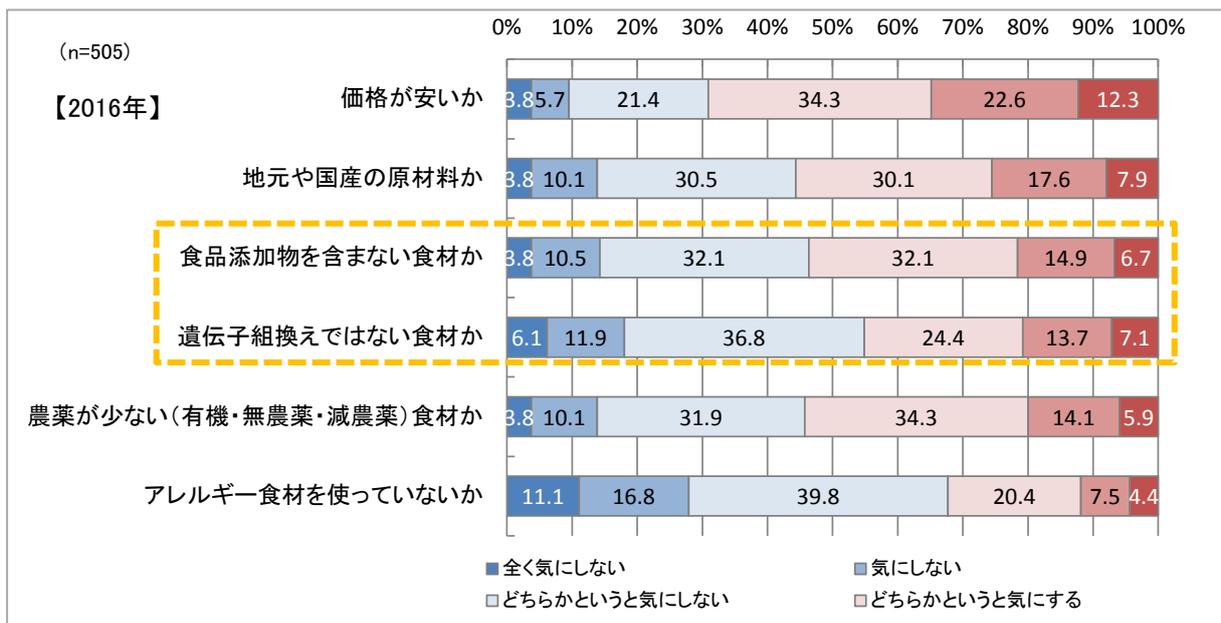


図 18 あなたは、平日の夕食に家で食べる食事を準備する際、以下の点をどの程度気にしていますか（一部抜粋）

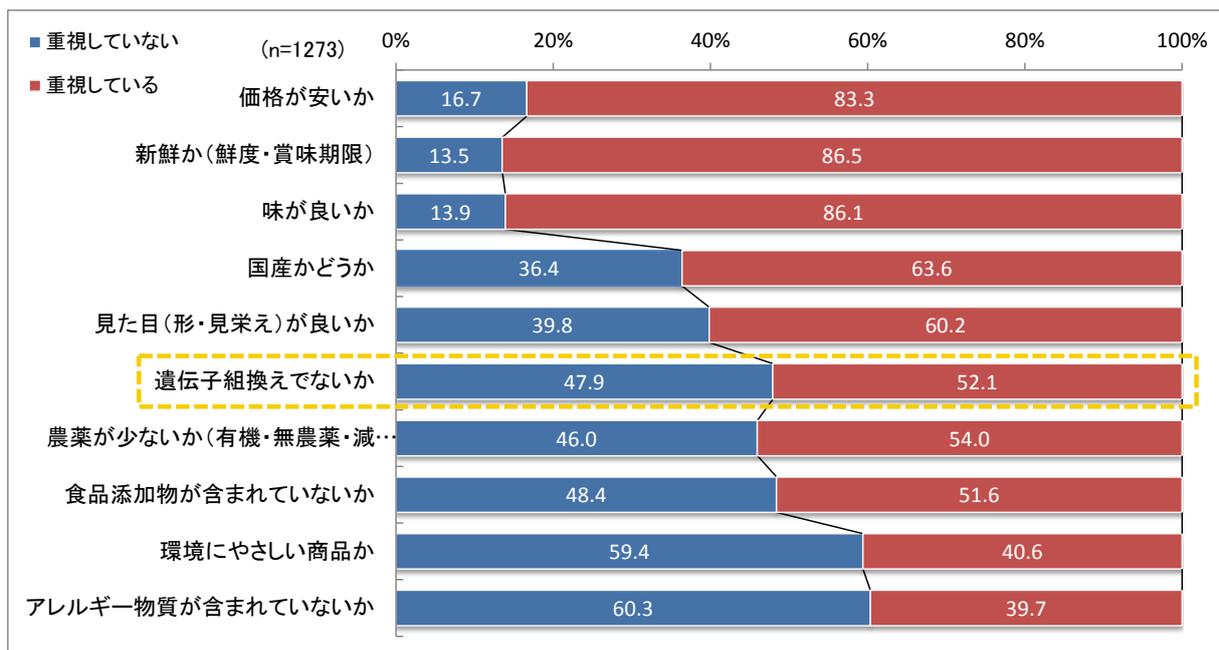


図 19 あなたは普段食品を購入する際、以下の点を重視していますか

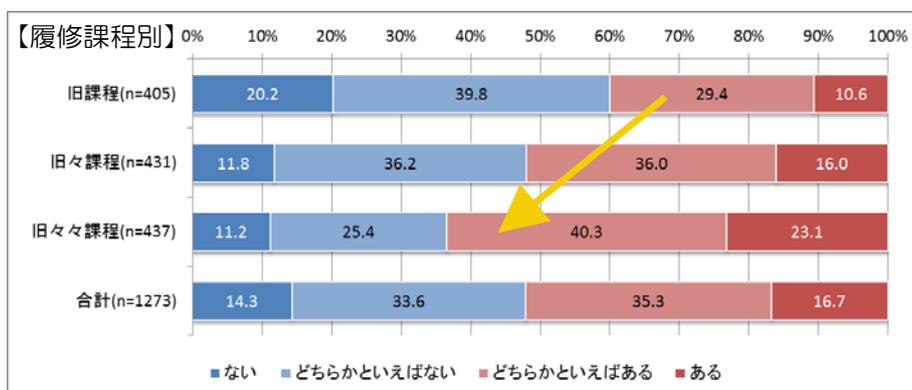
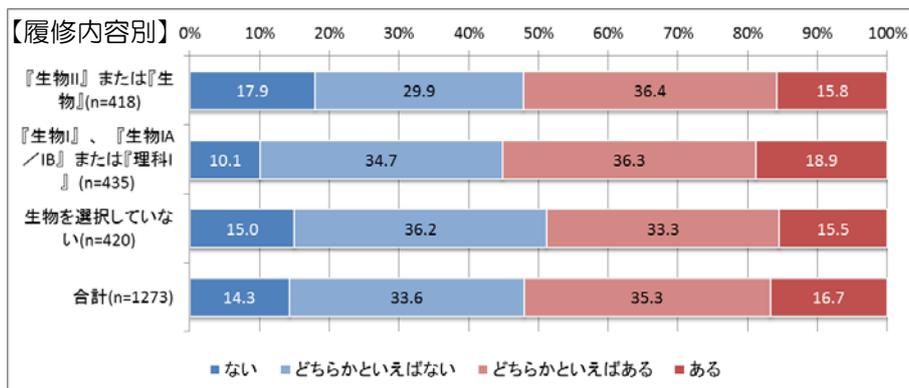


図 20 遺伝子組換え作物・食品を国内で生産することにあなたは抵抗がありますか

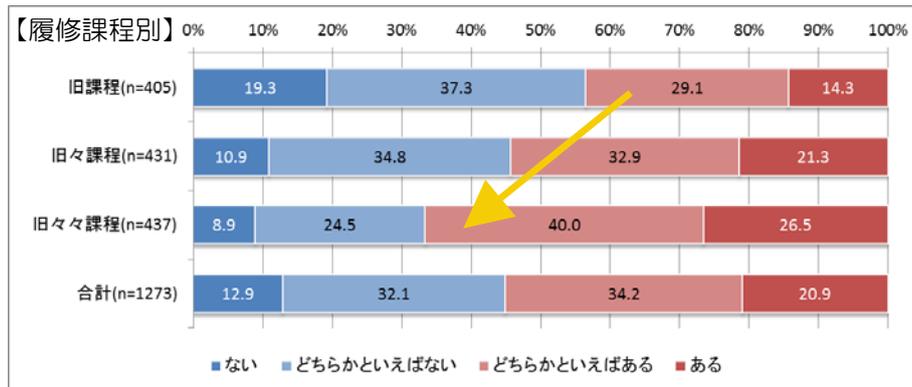
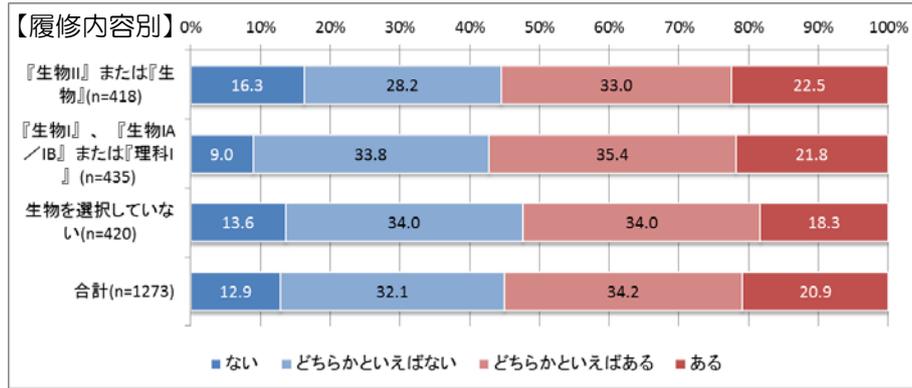


図 21 遺伝子組換え食品に抵抗がありますか

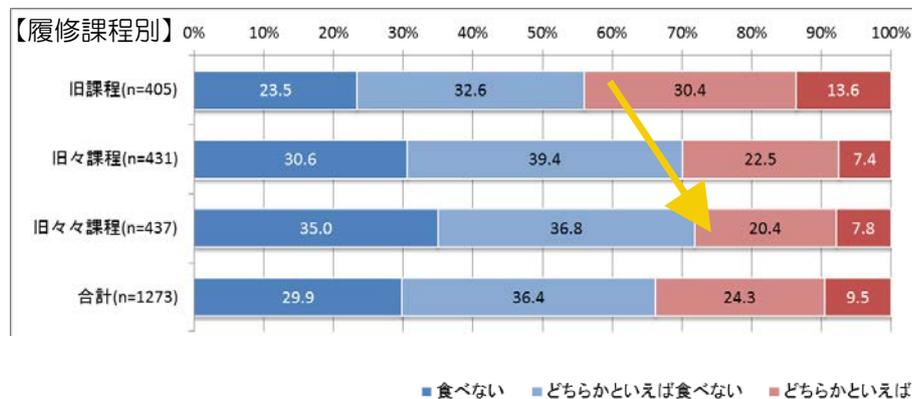
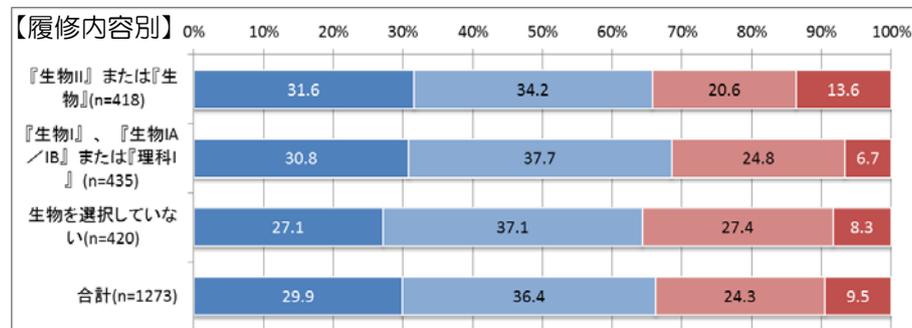


図 22 遺伝子組換えの野菜を食べますか

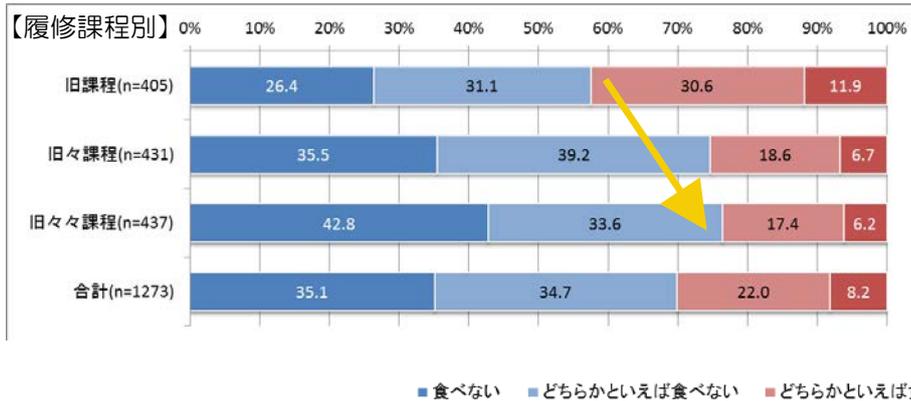
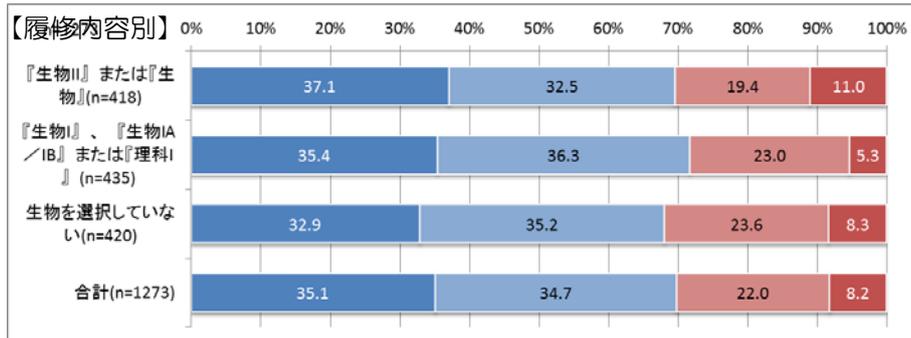


図 23 遺伝子組換えの肉を食べますか

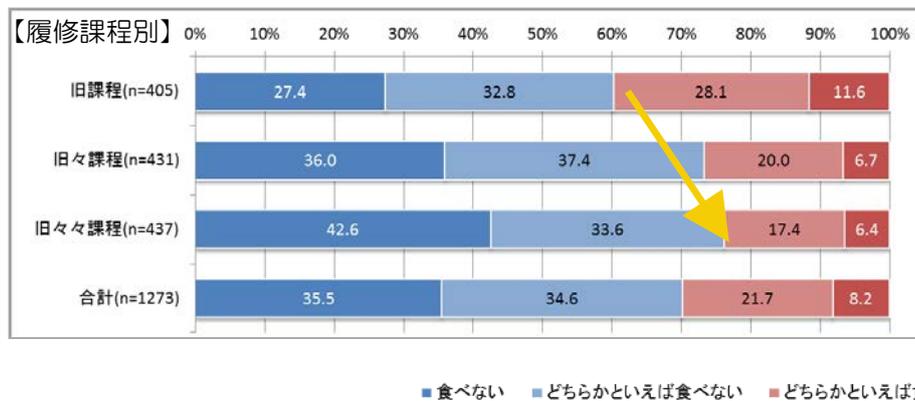
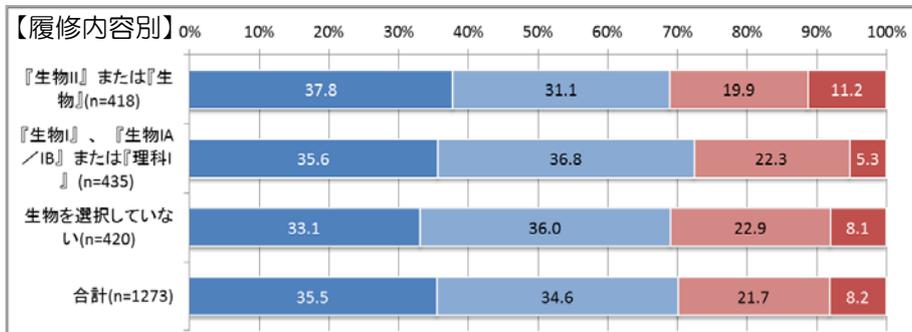
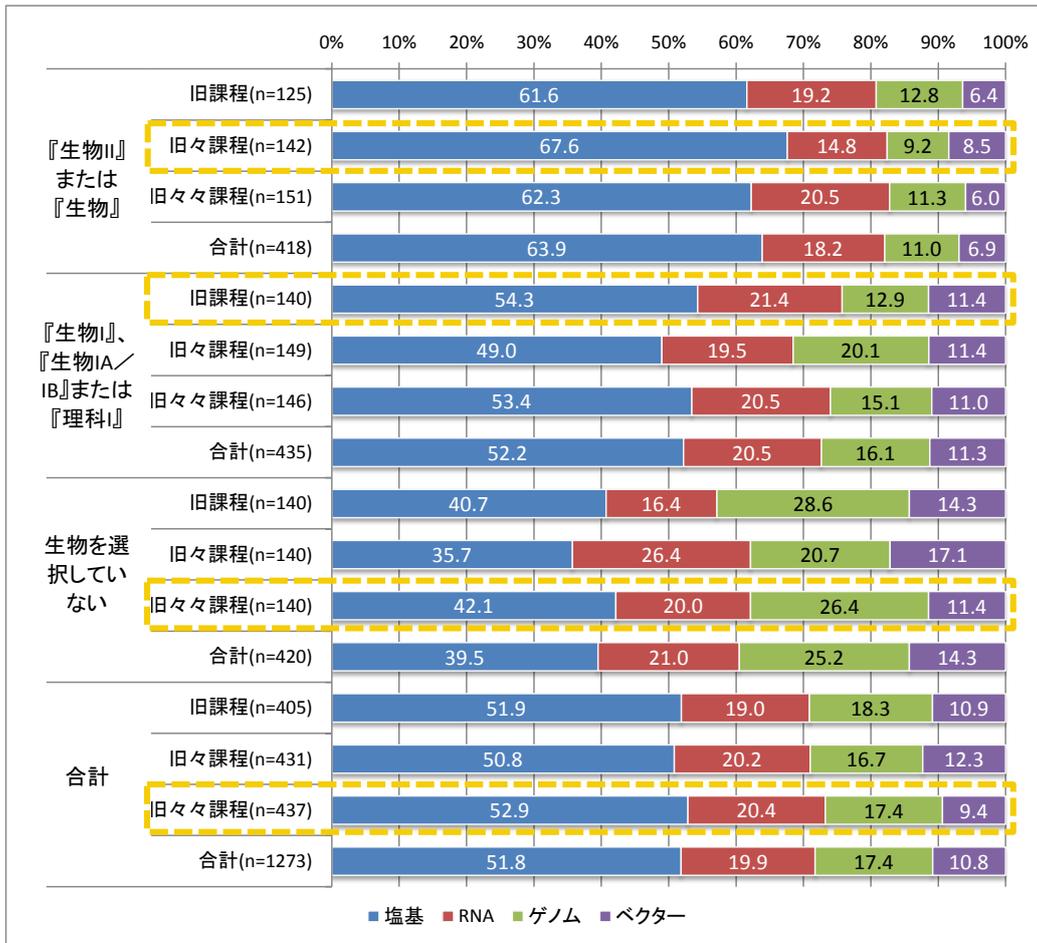


図 24 遺伝子組換えの魚を食べますか



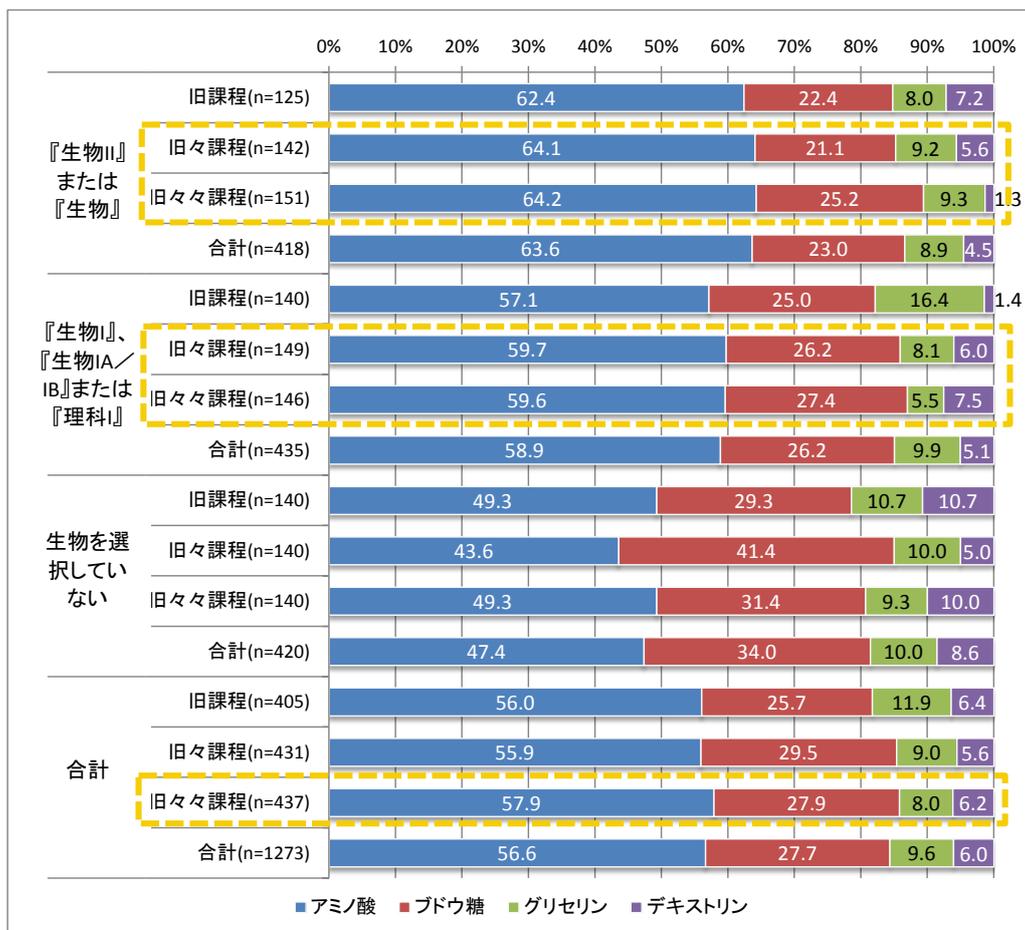
問) DNAは、4種類の(オ)で構成されており、(オ)の並び順によって遺伝子の性質が決まる。

必須 (オ)にあてはまると思うものを以下より選んでください。

- ベクター
 塩基
 RNA
 ゲノム

正解の選択肢

図 25 遺伝子組換えに関する次の文章を読んで、空欄に当てはまる言葉を選択肢の中から選んでください。



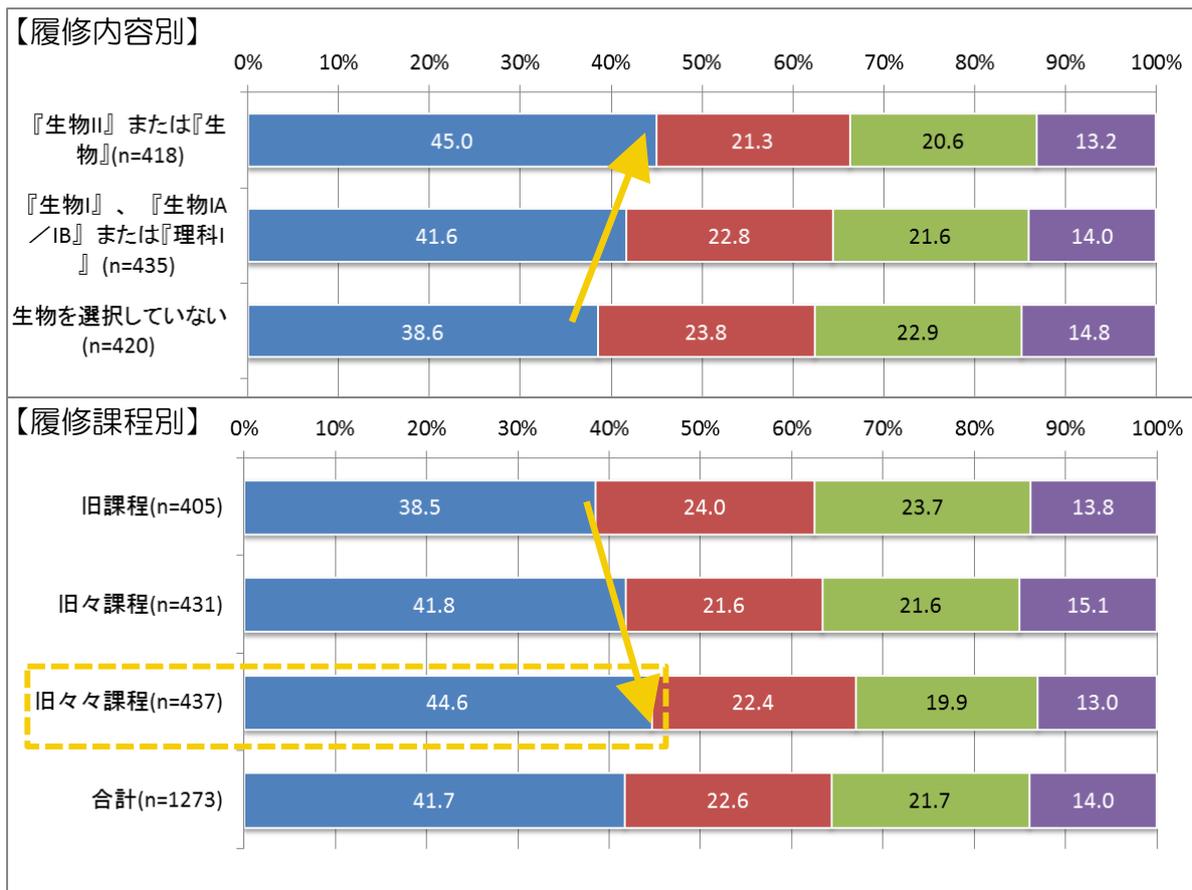
問) タンパク質は消化酵素によって
(ク) に分解され、吸収される。

■ 必須 (ク) にあてはまると思うものを以下より選んでください。

- ブドウ糖
 グリセリン
 デキストリン
 アミノ酸

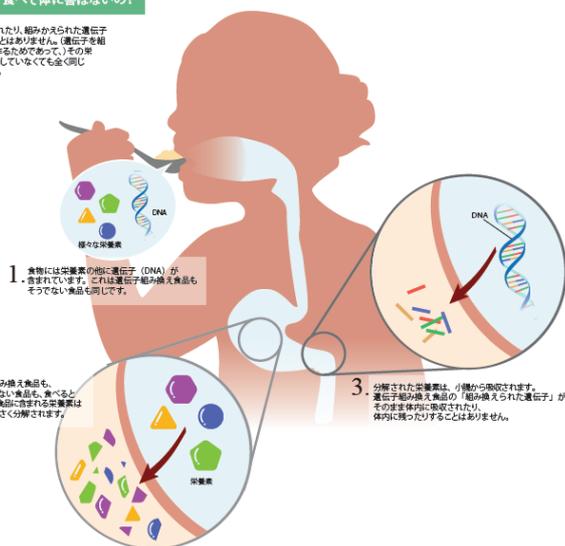
正解の選択肢

図 26 消化吸収に関する次の文章を読んで、
空欄に当てはまる言葉を選択肢の中から選んでください



遺伝子組み換え食品を食べて体に害はないの？

遺伝子がその産生体的に吸収されたら、組み換えられた遺伝子がその産生体内に残り続けることはありません。(遺伝子を組み換えるのは特定の食品を作るためであって、その産生体からは遺伝子組み換えをしてしまっても全く同じで、健康には影響を及ぼしません。)



- 選択肢**
1. 組換えられたDNAはそのまま吸収されてタンパク質等となり、体内に残存し、子どもにも受け継がれる
 2. 組換えられたDNAはそのまま吸収されてタンパク質等となり、体内に残存するが、子どもには受け継がれない
 3. 組換えられたDNAはそのまま吸収されてタンパク質等となるが、時間がたつと体外に排出される
 4. 組換えられたDNAは消化吸収される過程で分解され、タンパク質等となるため、そのままの形で体内に残存しない

正解の選択肢

図 27 遺伝子組換え食品を摂取した場合、体内でどのように消化・吸収されると思いますか

Companies with policies to not sell genetically engineered seafood	
GROCERY STORES	
21 Acres Farm Market	Jewel-Osco
Abundance Co-op Market	Kroger
ACME	Lassen's Natural Food & Vitamins
Albertsons	Life Source Natural Foods
Aldi	Linden Hills Co-Op
Alfalfa's Market	Marlene's Market & Deli
Alternative Food Cooperative	Marsh Supermarket
Amazing Grains Food Co-op	Medford Food Co-op
Amigos	Meijer
Belfast Cooperative	Merc Co-op
Berkshire Co-op Market	Mississippi Market Natural Foods Co-op
Bi-Rite Market	Mustard Seed Market & Café ²
Boise Consumer Co-op	New Leaf Community Market
Carrs	Oryana Natural Foods Market
Chautauqua Natural Foods	Pavilions
Common Market Co-op	PCC Natural Markets
Community Food Co-op	Rainbow Natural Foods (Georgia)
Coopertunity	Rainbow Natural Grocery Cooperative (California)
Costco	Raley's Family of Fine Foods
Davis Food Co-op	Randall's
Dawson's Market	Rebecca's Natural Foods
Eagle	Red Lobster
East End Food Co-op	Roundy's Supermarkets
Elm City Market	Sacramento Natural Foods Cooperative
Ellwood Thompson's Local Market	Safeway
Food & Thought	Santa Monica Coopportunity
First Alternative Natural Foods Co-op	Shaw's
The Food Co-op	Star Market
Follow Your Heart Natural Foods	Tacoma Food Co-op
Giant Eagle	Target
Good Earth Natural Foods	Three Rivers Market
Good Foods Market & Café	Tom Thumb
Green Bean Delivery	Trader Joe's
Hanover Co-op Food Stores	United
H-E-B ¹	Vashon Thriftway
Hendersonville Community Co-op	Vons
Honest Weight Food Co-op	Wedge Natural Foods Co-op
Hy-Vee	★ Whole Foods ³
Hungry Hollow Co-op	Whole Foods Co-op
Jimbo's...Naturally	Wise Women Care Associates
TOTAL NUMBER OF STORES: 11,105	
SEAFOOD COMPANIES	
Crown Prince, Inc	Marine Harvest USA
Ducktrap River of Maine	Onesta Organics ⁴
EcoFish	Vital Choice Wild Seafood & Organics, Inc. ⁵
RESTAURANTS/CHEFS	
Le Bernadine	Sundown at Granada
Restaurant Nora	Eataly
Waterbar Restaurant	Esca

*Companies listed on this website have stated their policies against the sale of genetically engineered seafood in at least one of the following ways: by signing and returning the **Pledge for GE-Free Seafood**, direct email communication with Friends of the Earth, or through public statements or public corporate policies.

*Companies with unknown policies are unlisted.

1 Policy expressed to media: <http://www.mysanantonio.com/business/article/H-E-B-other-grocery-chains-agree-not-to-sell-4383183.php>

2 Grocery store & café

★ 3 Whole Foods policy: www.wholefoodsmarket.com/sites/default/files/media/Global/PDFs/WholeFoodsMarket_FarmStandardsFinfishShrimp.pdf

Whole Foods has taken a big step further and ended its relationship with Lamasur Aquaculture, which used to supply Whole Foods' rainbow trout and which owns the aquaculture facility where genetically engineered salmon are raised Panama.

4 Pet food company, www.onestaorganics.com

5 Online seafood company

図 28 遺伝子組換え海産物を販売しない旨表明している企業リスト

出所)「GMO Animals」(Friends of the Earth ホームページ)

<http://www.foe.org/projects/food-and-technology/genetic-engineering/gmo-animals>

I. 参考資料

I-2. 研究結果

アンケート調査票

食生活に関するアンケート

モニターの皆様へのお願い

本アンケートには、一般に公開していない情報が含まれる場合があります。

アンケート内で知り得た情報について、決して第三者に口外しないよう、お願いします。

「第三者への口外」に含まれる例

- 口頭、電話、メール等で友人・知人に話す
- 掲示板やブログに書き込む
- その他、手段を問わず、情報を第三者に伝達する行為

注意事項

- 複数のアンケート画面を同時に開くと、正常に回答できません。
アンケートはひとつずつ、回答ください。
- アンケートへの回答は、「動作環境」に記載の環境からお願いします。
- 回答結果は、当社の「個人情報保護方針」に基づいて取り扱います。

上記の内容をご確認いただき、同意してご協力いただける場合のみ、「同意し、アンケート開始」を押してアンケートを開始してください。

同意し、アンケート開始

Q1
必須

あなたの生年月日をお答えください。

※1997年1月1日生まれの場合、下記の例に従ってご入力ください。

(入力例)

1997 年 (西暦でお答えください)
1 月 (1~12でお答えください)
1 日 (1~31でお答えください)

テキストボックス1

年 (西暦) 【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1937以上1997以内)

テキストボックス2

月 【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上12以内)

テキストボックス3

日 【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上31以内)

Q2
必須

あなたの職業をお答えください。

- 1.会社員（役員含む）
- 2.公務員
- 3.その他法人勤務
- 4.自営業
- 5.学生
- 6.専業主婦・主夫
- 7.無職
- 8.その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)

Q3
必須

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

- 1.農業
- 2.漁業・魚の養殖業
- 3.食品加工・製造
- 4.食品流通
- 5.研究・開発
- 6.食品関連行政
- 7.その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)
- 8.特に食品に専門的に関わるような仕事はしていない

Q4
必須

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

- 100万円未満
- 100万円台（100万円～200万円未満）
- 200万円台（200万円～300万円未満）
- 300万円台（300万円～400万円未満）
- 400万円台（400万円～500万円未満）
- 500万円台（500万円～600万円未満）
- 600万円台（600万円～700万円未満）
- 700万円台（700万円～800万円未満）
- 800万円台（800万円～900万円未満）
- 900万円台（900万円～1000万円未満）
- 1000万円以上

Q5
必須

あなたは現在結婚していますか。

- 1.結婚していない
- 2.結婚している

Q6
必須

あなたと同居している子ども（孫、甥姪等を含む）の状況について、当てはまるものをすべてお答えください。

	1. 同居している	2. 同居していない	3. 該当しない
6歳未満 →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6～12歳未満 →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
12～19歳 →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Q7
必須

あなたの**幼少期**（小中学生の頃）の平均的な食生活（**平日の夕食**）についてお答えください。

	食べていなかった （全くしていなかった）	週に1回未満 （月に1～3回）	週に1・2回 （月に4～8回）	週の半分ほど （月に9～16回）	ほぼ毎日
1. あなたとご家族は、どの程度ご家庭で料理した食事を食べていましたか	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. あなたとご家族は、どの程度調理済みの惣菜や弁当等を食べていましたか	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. あなたとご家族は、どの程度インスタントやレトルト食品を食べていましたか	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. あなたは、どの程度ご家族と平日の夕食に外食をされていましたか	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Q8
必須

あなたは**幼少期**（小中学生の頃）に、惣菜や弁当はどんなお店で購入することが多かったですか。
最も多いものをひとつお答えください。

- 1.スーパー
- 2.コンビニエンスストア
- 3.デパート・高級スーパー
- 4.惣菜専門店
- 5.持ち帰り弁当のチェーン店
- 6.調理済み食品の宅配
- 7.その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)

Q9
必須

あなたの**現在**の食生活（**平日の夕食**）についてお答えください。

	食べていない (全くしてない)	週に1回未満 (月に1~3回)	週に1・2回 (月に4~8回)	週の半分ほど (月に9~16回)	ほぼ毎日
1. あなたは、どの程度ご家庭で料理した食事を食べていますか →	<input type="radio"/>				
2. あなたは、どの程度調理済みの惣菜や弁当等を食べていますか →	<input type="radio"/>				
3. あなたは、どの程度インスタントやレトルト食品を食べていますか →	<input type="radio"/>				
4. あなたは、どの程度平日の夕食に外食をされていますか →	<input type="radio"/>				

Q10
必須

あなたは**現在**、惣菜や弁当はどんなお店で購入することが多いですか。最も多いものをひとつお答えください。

- 1.スーパー
- 2.コンビニエンスストア
- 3.デパート・高級スーパー
- 4.惣菜専門店
- 5.持ち帰り弁当のチェーン店
- 6.調理済み食品の宅配
- 7.その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)

Q11 あなたが**平日の夕食**で外食する理由を教えてください。
必須 最も当てはまるものをひとつお答えください。

- 1. 家族団らんのため
- 2. 家庭ではつくれない、おいしいものを食べたい
- 3. 友人と食事をするため
- 4. 仕事上の接待・会食が多い
- 5. 時々家事を休みたいため
- 6. お酒を飲みたいため
- 7. ストレス解消・憂さ晴らしのため
- 8. 忙しくて自炊の時間がないため
- 9. 自炊が嫌いなため
- 10. 自炊ができないため
- 11. 後片付けが面倒なため
- 12. 配偶者の希望
- 13. 子ども・孫の希望
- 14. 栄養のバランスが良いため
- 15. その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)

Q12 あなたが**平日の夕食**で、外食する際、平均して一人当たりいくら程度かけていますか。
必須

- 700円未満
- 700円以上1,500円未満
- 1,500円以上2,000円未満
- 2,000円以上

Q13 必須 あなたは、**平日の夕食**に家で食べる食事を準備する際、以下の点をどの程度気にしていますか。

	1. 全く気にしない	2. 気にしない	3. どちらかどちらか気にしない	4. どちらかどちらか	5. 気にする	6. 非常に気にする
1. 価格が安い	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
2. 味が良い	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
3. 栄養バランスが取れている	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
4. 地元や国産の原材料が	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
5. 時間をかけずに準備できる	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
6. 調理する環境が清潔	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
7. 環境に配慮した食材	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
8. 食材や惣菜を購入する店の評判・口コミ	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
9. 遺伝子組換えではない食材	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
10. その時に食べたいもの	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
11. 農薬が少ない（有機・無農薬・減農薬）食材	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
12. 食品添加物を含まない食材	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
13. アレルギー食材を使っていない	→ <input type="radio"/>	<input type="radio"/>				

Q14
必須

あなたは、**平日の夕食に外食する**際、以下の点をどの程度気にしていますか。

	1. 全く気にしない	2. 気にしない	3. やや気にする	4. やや気にする	5. 気にする	6. 非常に気にする
1. 価格が安いか →	<input type="radio"/>					
2. 味が良いか →	<input type="radio"/>					
3. 栄養バランスが取れているか →	<input type="radio"/>					
4. 地元や国産の原材料か →	<input type="radio"/>					
5. 待ち時間が短いか →	<input type="radio"/>					
6. 衛生管理をしっかり行っているか →	<input type="radio"/>					
7. 環境に配慮した食材か →	<input type="radio"/>					
8. 店の評判・口コミ →	<input type="radio"/>					
9. 遺伝子組換えではない食材か →	<input type="radio"/>					
10. その時に食べたいものか →	<input type="radio"/>					
11. 農薬が少ない（有機・無農薬・減農薬）食材を使っているか →	<input type="radio"/>					
12. 食品添加物を含まない食材か →	<input type="radio"/>					
13. アレルギー食材を使っていないか →	<input type="radio"/>					
	1. 全く気にしない	2. 気にしない	3. やや気にする	4. やや気にする	5. 気にする	6. 非常に気にする

Q15
必須

あなたの**理想の食生活（平日の夕食）**についてうかがいます。

	食べたくない	週に1回未満 (月に1〜3回)	週に1・2回 (月に4〜8回)	週の半分ほど (月に9〜16回)	ほぼ毎日
1. あなたは、家庭で作られた食事を食べる頻度をどの程度にしたいですか →	<input type="radio"/>				
2. あなたは、調理済みの惣菜や弁当を食べる頻度をどの程度にしたいですか →	<input type="radio"/>				
3. あなたは、インスタントやレトルト食品を食べる頻度をどの程度にしたいですか →	<input type="radio"/>				
4. あなたは、平日の夕食に外食をする頻度をどの程度にしたいですか →	<input type="radio"/>				

Q16
必須

あなたは外食に対してどのように思いますか。1つ選んでください。

- 1. しないようにしたい
- 2. 特別なとき（誕生日や記念日など）だけにしたい
- 3. 気がひける
- 4. やむを得ない
- 5. 気軽に行きたい
- 6. できるならば毎日でも行きたい

Q17
必須

惣菜や弁当はどのようなお店で購入したいですか。
最も希望する場所をひとつお答えください。

- 1. スーパー
- 2. コンビニエンスストア
- 3. デパート・高級スーパー
- 4. 惣菜専門店
- 5. 持ち帰り弁当のチェーン店
- 6. 調理済み食品の宅配
- 7. その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)
- 8. 購入しない

Q18
必須

平日の夕食について、現在の食生活を変えたいと思いますか。

- 1.全くそう思わない
- 2.そう思わない
- 3.どちらかというと思わない
- 4.どちらかというと思う
- 5.そう思う
- 6.非常にそう思う

Q19
必須

平日の夕食について、食生活を変えたいと思う場合、どのように変えたいと思いますか。

	1. 全く そう 思わ ない	2. そ う 思 わ な い	3. ど ち ら か と う と そ う 思 わ な い	4. ど ち ら か と う と そ う 思 う	5. そ う 思 う	6. 非 常 に そ う 思 う
1. 今より食事の準備に時間をかけたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. 今より食事を食べるのに時間をかけたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. 今より豪華な外食を増やしたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. 今より品質の良い食材を使いたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. 調理済み食品などを上手に使っていきたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6. なるべく食べるための時間を節約したい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. 食事のバランスを良くしたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. 規則正しい時間に食事をしたい ➡	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Q20 必須 あなたは、普段どの程度食品の買い物をされますか。
最も近いものをひとつお答えください。

- しない
- 週に1回未満（月に1～3回）
- 週に1・2回（月に4～8回）
- 週の半分ほど（月に9～16回）
- ほぼ毎日

Q21 必須 あなたはご家庭で料理を担当しますか。

- 1.はい
- 2.いいえ

Q22 必須 あなたは、食材（ご家庭で調理する材料）を購入する際、どこで購入していますか。
利用する機会が多いものを**3つ**選び、優先順位をお答えください。

	1. 利用する機会が多いもの（3つ） ↓	2. 優先順位 （1～3の数字を入力） ↓
1. スーパー（ネットスーパーを含む）	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上3以内)
2. コンビニエンスストア	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上3以内)
3. デパート・高級スーパー	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上3以内)
4. 生協の宅配サービス	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上3以内)
5. 有機農産物や無農薬野菜等を扱うスーパー等 または定期宅配サービス	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上3以内)
6. その他 <input type="text"/> (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上3以内)

食品の表示ラベルについて伺います。

Q23
必須

あなたは食品を購入する際、原材料や栄養成分が記載されたラベルを確認しますか。

- 1.全く確認しない
- 2.確認しない
- 3.どちらかという確認しない
- 4.どちらかという確認する
- 5.確認する
- 6.よく確認する

Q24
必須

豆腐を想定して、食品ラベル表示でもっとも重視するものを3つお答えください。

名称	きぬごし豆腐
原材料名 ⇒①原材料	丸大豆（**産） （遺伝子組換えでない）、 凝固剤
内容量	300 g
消費期限 ⇒⑤消費期限	**年**月**日
保存方法	要冷蔵（10℃以下）
製造者 ⇒⑥製造者	**豆腐（有限会社） **市**町**

⇒②産地・原料原産地
⇒③遺伝子組換えかどうか
⇒④食品添加物

栄養成分表示	
エネルギー ** kcal	炭水化物 ** g
タンパク質 ** g	食塩相当量 ** g
脂質 ** g	

⇒⑦カロリー（エネルギー）
⇒⑧糖分（炭水化物）
⇒⑨塩分（食塩相当量）
⇒⑩脂肪分（脂質）

- 1.原材料
- 2.産地・原料原産地
- 3.遺伝子組換えかどうか
- 4.食品添加物
- 5.消費期限
- 6.製造者
- 7.カロリー（エネルギー）
- 8.糖分（炭水化物）
- 9.塩分（食塩相当量）
- 10.脂肪分（脂質）

Q25
必須

ポテトチップスを想定して、食品ラベル表示でもっとも重視するものを3つお答えください。

名称	ポテトチップス
原材料名 ⇒①原材料	じゃがいも（遺伝子組換え不分別）、植物油、砂糖、食塩、こんぶパウダー、デキストリン、香料、酸化防止剤（ビタミンC）
内容量	60 g
消費期限 ⇒⑤消費期限	**年**月**日
保存方法	直射日光の当たる所、高温多湿のところでの保存は避けてください
製造者 ⇒⑥製造者	〇〇株式会社 **市**町**

⇒②産地・原料原産地
⇒③遺伝子組換えかどうか
⇒④食品添加物

栄養成分表示	
エネルギー**kcal	炭水化物**g
タンパク質**g	食塩相当量**g
脂質**g	

⇒⑦カロリー（エネルギー）
⇒⑧糖分（炭水化物）
⇒⑨塩分（食塩相当量）
⇒⑩脂肪分（脂質）

- 1.原材料
- 2.産地・原料原産地
- 3.遺伝子組換えかどうか
- 4.食品添加物
- 5.消費期限
- 6.製造者
- 7.カロリー(エネルギー)
- 8.糖分(炭水化物)
- 9.塩分(食塩相当量)
- 10.脂肪分（脂質）

Q26 食品ラベルに「不分別」と表示されているものがあります。あなたは「不分別」がどういう意味かを知っていますか。

- 1.はい
- 2.いいえ

「不分別」とは、非遺伝子組換えのものと遺伝子組換えのものを、流通過程で分けていないという意味です。

Q27 遺伝子組換え不分別の食品には、どの程度の割合で遺伝子組換えの原材料が含まれていると思いますか。

- 5%未満
- 5%以上10%未満
- 10%以上30%未満
- 30%以上50%未満
- 50%以上70%未満
- 70%以上90%未満
- 90%以上95%未満
- 95%以上
- 分からない

Q28
必須

あなたが下記の年代において、自分が**食べるものの安全性**をどの程度気にかけてきましたか。

	1. 全く気にしていなかった・いない	2. 気にしていなかった・いない	3. どちらかというや気にしてなかった・いない	4. どちらかというや気にしていた・している	5. 気にしていた・している	6. 非常に気にしていた・している	7. 該当しない
1. 中学・高校生の時期	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. 大学・専門学校から就職までの時期	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. 就職から結婚するまでの時期	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. 結婚後、子どもができるまでの時期	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. 妊娠・授乳中	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6. 子育てを開始してからの時期 (一番年下の子どもの年齢が6歳未満)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. 子育てを開始してからの時期 (一番年下の子どもの年齢が6～11歳)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. 子育てを開始してからの時期 (一番年下の子どもの年齢が12歳以上～子どもが独立するまでの時期)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. 子どもが独立してから、自分が退職するまでの時期	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
10. 自分の退職後の時期	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	1. 全く気にしていなかった・いない	2. 気にしていなかった・いない	3. どちらかというや気にしてなかった・いない	4. どちらかというや気にしていた・している	5. 気にしていた・している	6. 非常に気にしていた・している	7. 該当しない

Q29
必須

食品の安全性を気にかけるきっかけは何でしたか。

	1. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	2. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	3. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	4. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	5. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	6. 非常にご家族の健康への ご配慮がきっかけ	7. 該当しない
1. 結婚した	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. 子供ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. 食品に関する事件が社会をにぎわせた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. 体力の衰えを感じた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/> [] 歳ごろ (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内)	<input type="radio"/> [] 歳ごろ (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内)	<input type="radio"/> [] 歳ごろ (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内)	<input type="radio"/>
5. 身体を壊したことがある	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/> [] 歳ごろ (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内)	<input type="radio"/> [] 歳ごろ (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内)	<input type="radio"/> [] 歳ごろ (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内)	<input type="radio"/>
6. 子供が独立して、食品を気にかける時間的余裕ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. 子供が独立して、食品を気にかける金銭的余裕ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. 孫ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. その他	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	1. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	2. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	3. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	4. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	5. ご家族の健康への ご配慮がきっかけ	6. 非常にご家族の健康への ご配慮がきっかけ	7. 該当しない

Q29-1 食品の安全性を気にかけるきっかけとして、その他にあてはまる方に伺います。
必須 きっかけとなったことを具体的にお答えください。

(文字数制限なし)

Q30 Q29でご回答いただいた項目で、食品の安全性を気にかけるきっかけとして、最もあてはまるもの1つをお答えください。
必須

- 1.結婚した *
- 2.子供ができた *
- 3.食品に関する事件が社会をにぎわせた *
- 4.体力の衰えを感じた *
- 5.身体を壊したことがある *
- 6.子供が独立して、食品を気にかける時間的余裕ができた *
- 7.子供が独立して、食品を気にかける金銭的余裕ができた *
- 8.孫ができた *
- 9.その他 *

Q31 あなたは食生活において、健康に気を遣うようにしていますか。
必須

- 1.はい
- 2.いいえ

Q32 あなたは食生活において、どなたの健康に一番気を遣っていますか。
必須 同居者の中から最も当てはまるものをひとつお答えください。

- 1.自分 *
- 2.配偶者
- 3.子供（20歳未満） *
- 4.子供（20歳以上） *
- 5.孫 *
- 6.その他 * (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)

Q33
必須

健康を気にかけるきっかけは何でしたか。

	1. ご家族の健康に関心した	2. ご自身の健康に関心した	3. ご自身の健康に関心した人がいることに関心した	4. ご自身の健康に関心した人がいることに関心した	5. ご自身の健康に関心した	6. 非営利団体の健康に関心した	7. 該当しない
1. 結婚した	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. 子供ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. 食品に関する事件が社会をにぎわせた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. 体力の衰えを感じた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
				<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内) 歳ごろ	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内) 歳ごろ	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内) 歳ごろ	
5. 身体を壊したことがある	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
				<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内) 歳ごろ	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内) 歳ごろ	<input type="text"/> (回答必須)(数字のみ(小数不可))(制限あり:0以上79以内) 歳ごろ	
6. 子供が独立して、食品を気にかける時間的余裕ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. 子供が独立して、食品を気にかける金銭的余裕ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. 孫ができた	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. その他	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	1. ご家族の健康に関心した	2. ご自身の健康に関心した	3. ご自身の健康に関心した人がいることに関心した	4. ご自身の健康に関心した人がいることに関心した	5. ご自身の健康に関心した	6. 非営利団体の健康に関心した	7. 該当しない

Q33-1 健康を気にかけるきっかけとして、その他にあてはまる方に伺います。
必須 きっかけとなったことを具体的にお答えください。

(文字数制限なし)

Q34 Q33でご回答いただいた項目で、健康を気にかけるきっかけとして、最もあてはまるもの1つをお答えください。

- 1.結婚した *
- 2.子供ができた *
- 3.食品に関する事件が社会をにぎわせた *
- 4.体力の衰えを感じた *
- 5.身体を壊したことがある *
- 6.子供が独立して、食品を気にかける時間的余裕ができた *
- 7.子供が独立して、食品を気にかける金銭的余裕ができた *
- 8.孫ができた *
- 9.その他 *

Q35 健康を保つために気をつけていることはありますか？
必須 最もあてはまるもの1つをお答えください。

- 1.気をつけていることはない
- 2.毎日軽い運動をする（10分程度で日常気をつけていることで結構です。例えば、歩いて買い物に行くなど）
- 3.食事は腹八分目を気をつけている
- 4.国産食品しか食べない
- 5.カロリーが高い食品を避けている
- 6.塩分を控えている
- 7.遺伝子組換え食品を避けている
- 8.添加物を避けている
- 9.糖分を控えている
- 10.脂肪分を控えている
- 11.その他 (回答必須)(入力制限なし)(文字数制限なし)

Q36 必須 遺伝子組換え食品に抵抗がありますか。

- 1.全く無い
- 2.無い
- 3.どちらかという無い
- 4.どちらかというある
- 5.ある
- 6.非常にある

Q37 必須 遺伝子組換え作物・食品を国内で生産することにあなたは抵抗がありますか。

- 1.全く無い
- 2.無い
- 3.どちらかという無い
- 4.どちらかというある
- 5.ある
- 6.非常にある

Q38 必須 以下の設問にお答えください。

	1. 全くそう 思わない	2. そう 思わない	3. あまりそう 思わない	4. 少しそう 思う	5. そう 思う	6. 大変そう 思う
1. あなたは、食品の安全性に関心がありますか →	<input type="radio"/>					
2. あなたは、食品の安全性に不安を感じますか →	<input type="radio"/>					
3. あなたは食品に関する事件の報道を注意して みますか →	<input type="radio"/>					
4. あなたは食品に関する事件の報道は、事実を 伝えていると思いますか →	<input type="radio"/>					
食品に関する事件が発生した場合、 5. あなたは「食品企業」は厳密な調査結果を 発表していると思いますか →	<input type="radio"/>					
食品に関する事件が発生した場合、 6. あなたは「国」は厳密な調査結果を 発表していると思いますか →	<input type="radio"/>					

Q39 2008年1月に中国産の冷凍ギョウザによる食中毒事件が発生しました。
必須 あなたは、その事件の後、中国産の食品を買い控えましたか。

- 1.全く気にせず購入している
- 2.一時的に買い控えた
- 3.現在も買い控えている

Q40 2011年3月、福島第一原子力発電所事故が発生しました。
必須 あなたは、その事故の後福島県産の食品を買い控えましたか。

- 1.全く気にせず購入している
- 2.一時的に買い控えた
- 3.現在も買い控えている

Q41 下記の製品について「購入してもよい」か「購入したくない」かお答えください。
必須 (下記の製品が実際にあったとしてお答えください。また、好き嫌いやアレルギーなどは関係なくお答えください)

	1. 購入したくない	2. 購入してもよい
1. 遺伝子組換えのサケ(鮭) →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. 遺伝子組換えトウモロコシを使ったトウモロコシの缶詰 →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. 遺伝子組換えのじゃがいもを使ったポテトチップス →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. 遺伝子組換えの大豆を原料とした豆腐 →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. 遺伝子組換えキャノーラを原料とした植物油 →	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Q42 Q41で下記の製品について「購入してもよい」とした方はいくらなら支払ってもよいと思いま
必須 すか。自由に支払ってもいい金額をお答えください。

※かつこ内は従来から売られている「遺伝子組換えではない製品」の平均市場価格です。
※下記の製品が実際にあったとしてお答えください。また、好き嫌いやアレルギーなどは関係なくお答えください。

- 遺伝子組換えのサケ（鮭） **テキストボックス1**
(1切れ130円程度) 円 **【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上9999999以内)** 
- 遺伝子組換えのトウモロコシの缶詰 **テキストボックス2**
(200g1缶 130円程度) 円 **【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上9999999以内)** 
- 遺伝子組換えのじゃがいもを使ったポテトチップス **テキストボックス3**
(1袋60g 100円程度) 円 **【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上9999999以内)** 
- 遺伝子組換えの大豆を原料とした豆腐 **テキストボックス4**
(150g 120円程度) 円 **【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上9999999以内)** 
- 遺伝子組換えのキャノーラを原料とした植物油 **テキストボックス5**
(1kg 230円程度) 円 **【必須】(数字のみ(小数不可))(制限あり:1以上9999999以内)** 

アンケートにご回答いただき、ありがとうございました。

【食生活に関するアンケート】の獲得ポイント

〇〇ポイント

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究」
分担研究報告書（平成 28 年度）

新育種法を用いた作物の検出のための未知領域解析手法の検討と情報収集

研究分担者 近藤 一成（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 野口 秋雄、中島 治（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：バイオテクノロジー技術の更なる進歩により、これまで以上に多様な生物で遺伝子組換え（GM）体が開発され、それに合わせた検知手法の開発が必要である。メヤコムギなどの主要作物に対する対策は重要な課題である。検査の効率化という点でも、複数の作物に適用可能なスクリーニング法の開発は有用である。我が国における GM コメの食品への混入事例数はヨーロッパ（RASFF）に比べて少ない。これは、我が国では GM コメのスクリーニング検査を実施しておらず、我が国で検査対象外の未承認 GM コメを見逃している可能性が考えられる。そこで、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR による GM コメのスクリーニング検査法の検討を行った。その結果、GM コメに幅広く導入されている P35S, TNOS, cry1Ab/Ac を標的とした本検査法は良好な PCR 効率および直線性、ならびに十分な感度を有していた。本検査法は、現在見逃されている可能性のある未承認 GM コメを検出することが可能になると期待される。

近年、従来使用されてきた外来のプロモーターやターミネーターではなく内在性のもので使用した遺伝子組換え（GM）作物の開発が増加している。このような GM 作物は、従来のスクリーニング検査では遺伝子組換え体であることを迅速に確認することは極めて困難である。これらの問題を解決する手法の一つで、既知配列から導入遺伝子やゲノム上の導入位置を迅速に明らかにできる Linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR)法について、本研究では遺伝子組換え(GM)ジャガイモ Innate™ event-1 を対象に検討を行った。ジャガイモの内在性プロモーターpGBSS の配列をもとにプライマーを設計し、LAM-PCR を実施した結果、予想される断片長の増幅産物が得られた。シーケンス解析の結果、元々ジャガイモゲノム上に存在する配列と一致する配列、導入された PHL 遺伝子の一部と一致する配列および導入された ASN 遺伝子の一部と一致する配列が確認された。以上の結果から、LAM-PCR は内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。本方法は、スクリーニング検査などで陽性と判定された検体について迅速に GM 品種を特定することが可能になると期待される。

諸外国（特に、米国、EU、オーストラリア・ニュージーランド、カナダ）の GM 生物の規制に関する法律等について整理した。これまでに、親育種法を用いて作製された生物では、米国においてイントラジェネシスのジャガイモ、ゲノム編集のマッシュルーム、トウモロコシが承認されている。EU では、ゲノム編集を含む親育種法を用いた生物に対する規制上の取り扱いの判断はされていない。

A. 研究目的

(1)スクリーニング法開発 (コメの例)

害虫抵抗性の遺伝子組換え (GM) コメは、アメリカや中国を中心に開発されてきた。特に近年中国では数多くの種類の GM コメが開発されており、市場商品への混入が懸念されている。実際に、GM コメが承認されていないヨーロッパでは GM パパイヤとならび、GM コメの食品への混入事例が数多く報告されており、その大半が中国からの輸入品である。我が国においても GM コメは承認されていないが、GM コメの食品への混入事例が報告されている。しかし、その報告数はヨーロッパに比べて少ない。ヨーロッパにおける GM コメの検査は、cauliflower mosaic virus 由来 35S プロモーター (P35S)、*Agrobacterium tumefaciens* 由来 nopaline synthase ターミネーター (TNOS)、殺虫性タンパク質遺伝子 *cryIAb* および *cryIAc* (*cryIAb/Ac*) の配列をターゲットとしたスクリーニング検査法にて実施しているが、一方、我が国では主要な GM コメ 4 系統 (63Bt, NNBt, CpTI, LLRICE601) に対する検査法を実施している。このため、我が国では検査対象外の未承認 GM コメを見逃している可能性が考えられ、幅広く GM コメを検出できるスクリーニング検査法の開発が求められる。そこで、本研究では、我が国の GM 作物検査で主に用いられている TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR による GM コメのスクリーニング検査法の検討を行った。

(2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

2013 年以降、GM 作物の栽培面積はアジ

ア・アフリカなど発展途上国が先進国を上回っている。一方、アメリカを中心とする先進国では新たな GM 作物が次々と開発されている。遺伝子発現を制御するプロモーターについては、汎用されてきた P35S に代わり rice actin プロモーター、maize ubiquitin プロモーター、あるいは potato granule-bound starch synthase プロモーターなどの内在性プロモーターが使用される傾向にある。また、ターミネーターに関しても内在性のものを使用する傾向にある。このような GM 作物の場合、遺伝子組換え体 (GMO) であることをプロモーターやターミネーターを用いたスクリーニング検査で迅速に確認することが極めて困難である。この問題を解決するためには、小さな既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の種類やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにする分析手法が必要である。本研究ではそのために Linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR) 法の検討を行った。本年度は、対象作物に GM ジャガイモ Innate™ event-1 を用い、内在性プロモーターの配列情報から導入遺伝子の解明が可能であるかを検討した。

(3) GMO 規制と開発に関する情報収集

現在、新育種法 (NPBT) に関する規制上の取扱いの検討が EU など諸外国で行われている。一方で、GM に特化した規制上の法律がない米国では、独自の基準により幾つかの作物が USDA で承認されている現状がある。米国以外の国では、これらは未承認 GM 扱いとなる。このような現状から、日本国内においても NPBT に関する検討を進めておく必要があることから、情報収集を行う。

B. 研究方法

(1)スクリーニング法開発 (コメの例)

1. プライマー・プローブの設計

開発が報告されている GM コメに幅広く導入されている P35S, TNOS, cry1Ab/Ac を標的とした (表 1-1). また, コメ陽性対照試験用の内在性遺伝子としては phospholipase D (PLD) を用いた. これらの配列を検出するプライマー・プローブは既報の文献を参考にした (表 1-2) ²⁾⁴⁾.

2. リアルタイム PCR

【リアルタイム PCR 用反応液組成】PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した. 組成は以下のとおりである. FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics: Basel, Switzerland) 12.5 μ L, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50 μ mol/L) 各 0.25 μ L, 対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L を混合し, DNA 試料液 5 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ L に調製した.

【リアルタイム PCR 条件】リアルタイム PCR には, ABI PRISM™ 7900HT (Thermo Fisher Scientific) を使用した. PCR 条件は以下のとおりである. 50°C, 2 分間の条件で保持した後, 95°C 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, 45 サイクルの増幅反応を行った.

【測定結果の解析】結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と C_q 値の確認, および multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって

行った. ベースラインは 3 サイクルから 15 サイクルで設定し, ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で, 安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line として 0.2 に設定した.

3. 陽性コントロールプラスミドの作製

PLD, P35S, TNOS, cry1Ab/Ac の増幅配列を導入したプラスミドを作製した (図 1-1). 各増幅配列を連結した配列を eurofins (Kraainem, Belgium) の人工遺伝子合成サービスを利用して合成した. 合成した配列は, アンピシリン耐性遺伝子を含むベクター pEX-A2J1 に組み込んだ. リアルタイム PCR には, EcoO109I にて切断することで線状化し, フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) 抽出, クロロホルム抽出, エタノール沈殿により精製したものをを用いた. コピー数は, Qubit® dsDNA BR Assay Kit にて測定した DNA 濃度と分子量から算出した.

(2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

1. 試料

GM ジャガイモ Innate™ event-1 (J.R. Simplot Company) は, 開発企業から入手したものをを使用した.

2. プライマーの設計

GM ジャガイモ Innate™ event-1 に導入されている内在性プロモーター pGBSS の配列情報から, 下流領域を増幅するプライマーを設計した (図 2-1 および表 2-1). Linear PCR および 1st nested PCR には biotin 化プライマ

ーを用いた。

3. LAM-PCR

【Linear PCR】反応液組成は以下の通りである。10×ExTaq Buffer (TAKARA) 5 μL, 2.5 mM each dNTP Mixture (TAKARA) 4 μL, 50 μM primer pGbss-Rev2 0.5 μL, 5 U/μL ExTaq HS (TAKARA) 0.25 μL を混合し、non-GM ジャガイモまたは GM ジャガイモ Innate™ event-1 から抽出した DNA 試料液 (100 ng/μL) 5 μL を添加し、蒸留水で全量 50 μL に調製した。反応は GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用い、98°C で 5 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、98°C, 1 分, 60°C, 30 秒, 72°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。増幅産物は既報の方法²⁾に従って、磁気化 streptavidin ビーズ (Streptavidin Mag Sepharose, GE Healthcare) に補足させた。

【dsDNA 合成】反応液組成は以下の通りである。10×hexanucleotide mixture (Sigma-Aldrich) 2 μL, 200 μM each dNTPs 0.5 μL, 2 U/μL Klenow polymerase (New England Biolabs) 0.25 μL を混合し、蒸留水で全量 20 μL に調製した。増幅産物を補足させたビーズに反応液を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。反応後、既報の方法²⁾に従ってビーズを洗浄した。

【制限酵素処理】制限酵素 MseI の反応液組成は以下の通りである。10×CutSmart Buffer (New England Biolabs) 2 μL, 4 U/μL MseI (New England Biolabs) 1 μL を混合し、蒸留水で全量 20 μL に調製した。dsDNA 合成後のビーズに反応液を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。反応後、既報の方法²⁾に

従ってビーズを洗浄した。

【リンカーカセットの調整】リンカーカセット調整液の組成は以下の通りである。1 M Tris-HCl (pH7.2) 20 μL, 25 mM MgCl₂ 40 μL, 100 μM LC1 (5'-GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCACAGCAGTTAGG-3') 40 μL, 100 μM LC4 (5'-TACCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATC-3') 40 μL を混合し、蒸留水で全量 200 μL に調製した。GeneAmp® PCR System 9700 を用い、95°C で 5 分間加温し、13 時間かけて 20°C に冷却した。冷却後、Amicon® Ultra - 0.5 mL Ultracel® - 30K (Merck Millipore) を用いて脱塩・濃縮した(最終液量 80 μL)。

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

【一本鎖 DNA の遊離】リンカーライゲーション後のビーズに 0.1 M NaOH 5 μL を加え、室温で 30 分間インキュベートし、一本鎖 DNA を遊離させた。

【1st Nested PCR】反応液組成は以下の通りである。10×ExTaq Buffer 5 μL, 2.5 mM each dNTP Mixture 4 μL, 50 μM primer 1st nest pGbss-Rev2 0.5 μL, 50 μM primer LCI 0.5 μL, 5 U/μL ExTaq HS 0.25 μL を混合し、一本鎖 DNA 溶液 1 μL を添加し、蒸留水で全量 50 μL に調製した。反応は GeneAmp® PCR System 9700 を用い、98°C で 5 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その

後、98°C, 10 秒, 60°C, 30 秒, 72°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルの増幅反応を行い、その後 72°C, 10 分反応させた。増幅産物は既報の方法²⁾に従って、磁気化 streptavidin ビーズに補足させた。その後、0.1 M NaOH 5 µL を加え、室温で 30 分間インキュベートし、一本鎖 DNA を遊離させた。

【2nd Nested PCR】反応液組成は以下の通りである。10×ExTaq Buffer 5 µL, 2.5 mM each dNTP Mixture 4 µL, 50 µM primer 2nd nest pGbss-Rev2 0.5 µL, 50 µM primer LCII 0.5 µL, 5 U/µL ExTaq HS 0.25 µL を混合し、1st Nested PCR 産物 1 µL を添加し、蒸留水で全量 50 µL に調製した。反応は GeneAmp® PCR System 9700 を使い、98°C で 5 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、98°C, 10 秒, 60°C, 30 秒, 72°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルの増幅反応を行い、その後 72°C, 10 分反応させた。

4. シーケンス解析

LAM-PCR 増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動[アガロース, Agarose 21 (ニッポンジーン); 染色剤, Gel Red (Biotium)]に供し、検出された主要バンドを切り出し、精製した。pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を用いて、精製した LAM-PCR 増幅産物をクローニングし、プラスミド DNA をシーケンス解析した。解析した増幅産物の配列を BLAST 解析あるいは GM ジャガイモ Innate™ event-1 の導入配列とのアライメント解析を行った。

(3) GMO 規制と開発に関する情報収集

主要国における GM 規制上の法律等の調

査、および新育種法を用いた GM 生物の開発状況を調査した。主要国である、米国、EU、オーストラリア・ニュージーランド、カナダ) の GM 生物の規制に関する法律等について整理を行った。新育種法 (NPBT) を用いた生物の開発状況を調査した。

C. 研究結果

(1) スクリーニング法開発 (コメの例)

1. PCR 効率の算出

各検知試験の PCR 効率を調べるために、100, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000 copies/well の陽性コントロールプラスミドを鋳型にして 3 併行でリアルタイム PCR を実施した。その結果、PLD, P35S, TNOS および cry1Ab/Ac 全てにおいて、PCR 効率 ($E=92.6, 92.3, 92.5, 96.6\%$), 直線性 ($R^2=0.9997, 0.9993, 0.9999, 0.9998$) とともに良好であった (図 1-2)。

2. 検出限界 (LOD) の算出

検出限界 (LOD) を算出するために、2.5, 5, 10, 20 copies/well の陽性コントロールプラスミドを鋳型にして 21 併行でリアルタイム PCR を実施した。その結果、PLD, P35S および TNOS において 10 copies では 95% 以上の検出率を示したが、5 copies では 95% 以下の検出率を示した (表 1-3)。この結果から、これらの LOD を 5~10 copies の間とした。一方で、cry1Ab/Ac においては 5 copies では 95% 以上の検出率を示したが、2.5 copies では 95% 以下の検出率を示した (表 1-3)。この結果から、cry1Ab/Ac の LOD を 2.5~5 copies の間とした。

(2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

1. LAM-PCR による内在性プロモーター pGBSS 下流領域の増幅

GM ジャガイモ Innate™ event-1 の導入配列中にはジャガイモ内在性プロモーター pGBSS が 2 コピー存在している。そのため、LAM-PCR によって pGBSS 下流領域を増幅させた場合、元々ジャガイモゲノム中に存在する pGBSS 由来のものを含めて少なくとも 3 つの増幅断片が形成されると予想され (図 2-2), LAM-PCR の結果、非組換えジャガイモから抽出した DNA 溶液を鋳型にした場合に、2nd Nested PCR において、約 300 bp の 1 本のバンドが検出された (図 2-3)。一方で、GM ジャガイモ Innate™ event-1 から抽出した DNA 溶液を鋳型にした場合に、2nd Nested PCR において、約 300 bp と約 250 bp の 2 本のバンドが検出された (図 2-3)。元々の pGBSS 由来の配列は予想増幅断片長が 297 bp、GM ジャガイモ Innate™ event-1 に導入した pGBSS 由来の配列は予想増幅断片長が 254 bp と 297 bp であり、LAM-PCR の結果はこれに一致した。

2. pGBSS 下流領域のシーケンス解析

非組換えジャガイモおよび GM ジャガイモ Innate™ event-1 から抽出した DNA 溶液を鋳型に LAM-PCR にて増幅された主要バンドを精製し、クローニングした後、シーケンス解析を行った。非組換えジャガイモからの約 300 bp の増幅断片 7 クロウンをシーケンス解析した結果、全てでジャガイモの pGBSS および GBSS 遺伝子の一部とほぼ一致した (表 2-2, 図 2-4A-G)。GM ジャガイ

モ Innate™ event-1 からの約 300 bp の増幅断片 12 クロウンをシーケンス解析した結果、8 クロウンは pGBSS および GBSS 遺伝子の一部と、2 クロウンは pGBSS および導入した phosphorylase L (PHL) 遺伝子の一部と、1 クロウンは pGBSS および導入した asparagine synthetase (ASN) 遺伝子の一部と、1 クロウンは pGBSS の一部とほぼ一致した (表 2-2, 図 2-4H-S)。GM ジャガイモ Innate™ event-1 からの約 250 bp の増幅断片 8 クロウンをシーケンス解析した結果、4 クロウンは pGBSS および導入した ASN 遺伝子の一部と、4 クロウンは pGBSS の一部とほぼ一致した (表 2-2, 図 2-4T-α)。

(3) GMO 規制と開発に関する情報収集

NPBT 作物・動物の承認状況

2017.1 現在

1. 米国 USDA : (1) Dupont Pioneer's waxy gene knockout corn

USDA approved on April 2016

理由 : 7CFR340 に基づき、PPA (Plant Protection Act) に該当しないため。

(2) PPO knockout Mushroom to prevent browning (Pennsylvania Univ) on April 2016

理由 : 7CFR340 に基づき、PPA (Plant Protection Act) に該当しないため。

2. 欧州 : 承認したものはない。ゲノム編集 (小さな改変) 作物の GMO 規制からの除外に前向きな国は、英国、ドイツ、スウェーデン、イタリア、フランス、オランダ。ただし、ドイツは ZKBS、BVL が ODM とゲノム編集による小さな改変を GMO 規制外としたが、EU の現在の枠組みである Directive 2001/18/EC に基づいた NPBT 技術の判断について、多くの技術が GMO の規

制の枠内とされるのではないかとされている。フランスは、現在欧州司法裁判所にゲノム編集作物の扱いについて判断を求めており、その判断は2018年とされているため、それまではEUの正式な判断はない。ゲノム編集での数塩基の変異やODMについて、2015年EASAC(欧州科学アカデミー)は、技術ではなく形質(trait)やプロダクトで判断すべきと報告。一方、シスジェネシスは、cisgenic appleを開発しているオランダはGMO除外を主張しているが、UKなど他の国はGMO規制内との考えが主流である。意図的に改変したものは、全て組換え体として判断すべきとの主張である国民と、ゲノム編集などの小さな変異導入は自然に起きる変化と同等であるため組換え体と扱わないようにすべきとする開発側との間での意見の相違が極めて大きい。そのため、規制側の判断が遅れている。リスクコミュニケーションの重要性が痛感される。

3. オーストラリア・ニュージーランド：ニュージーランドのEPAは、ZFN and TALEN-based GM pine (Crown Research Institute Scion)を規制外としたが、High Courtは判断を覆してGMOと判断
理由：ゲノム編集を従来の自然界で起きる程度の変化と考えるだけの根拠や歴史がないため。

4. アルゼンチン：基本は外来遺伝子が残存しているかどうかの判断であるが、ゲノム編集作物はcase-by-caseで判断する

5. カナダ：
用いた技術に関係なく、新しい形質を持つものは審査の対象であるため、NPBTについても新規食品として審査される。ODMナタネが審査中

6. 日本：ゲノム編集生物は、京都大学と近畿大学による筋肉量増強マダイ(CRISPR)を始め、マグロ、ニワトリトマトなどで研究されている。接ぎ木を利用したジャガイモ(穂木としてGMタバコを非GMジャガイモ台木に接木してGBSS遺伝子抑制)は、産生したsiRNAは非GM体へ移行して機能する(もち性上昇)もので、ゲノム編集イネとともに国内での隔離圃場試験が承認される予定である。

主要国の規制上の法律とGMOの定義を一覧表(表2)に整理した。

D. 考察

(1)スクリーニング法開発(コメの例)

GMコメの検査において、我が国ではスクリーニング検査を実施しておらず、検査対象外の未承認GMコメを見逃している可能性が考えられ、幅広くGMコメを検出できるスクリーニング検査法の開発が求められている。そこで本研究では、開発が報告されているGMコメに幅広く導入されているP35S, TNOS, cry1Ab/Acを標的としたリアルタイムPCRを用いたスクリーニング検査法の検討を行った。本検査法は良好なPCR効率および直線性、ならびに十分な感度を有していた。また、標的配列を検出するプライマー・プローブは既報の文献を参考にしているため、特異性は高いと考えられる²⁴⁾。

今回標的とした配列は、ヨーロッパで実施されているGMコメスクリーニング検査法で用いられている配列と同じであるが⁹⁾、ヨーロッパの方法はSYBR Green Iを用いたリアルタイムPCRであるのに対し、本検査

法は TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR であるため、より高い特異性が期待される。また将来的には、マルチプレックスリアルタイム PCR への発展が期待できる。

(2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

内在性プロモーターやターミネーターを使用して開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では GMO であることを迅速に確認することは極めて困難である。これらの問題を解決する手法の一つである LAM-PCR 法について、本研究では GM ジャガイモ Innate™ event-1 を対象に検討を行った。GM ジャガイモ Innate™ event-1 の内在性プロモーター-pGBSS は元々存在している配列が少なくとも 1 コピー、導入配列由来の配列が 2 コピー存在するため、合計で少なくとも 3 コピー存在する。pGBSS の配列をもとにプライマーを設計し、LAM-PCR を実施した結果、検出された増幅産物は 2 本であった。これは、元々存在している配列と導入配列由来の内の 1 つの配列との増幅断片長が非常に近い（それぞれ 297 bp, 296 bp）ために、アガロースゲル電気泳動法ではこれらを分離できなかったためであり、シーケンス解析の結果、元々存在する配列と一致する配列、導入された PHL 遺伝子の一部と一致する配列および導入された ASN 遺伝子の一部と一致する配列が確認された。以上の結果から、LAM-PCR は内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。今回の実験系では、ゲノムとの境界領域の情報を得るには至らなかったが、増幅産物の伸長

方向を変えて LAM-PCR を実施することで、ゲノムとの境界領域の情報を得ることができると考えられる。

E. 結論

(1)スクリーニング法開発（コメの例）

TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR による GM コメのスクリーニング検査法の検討を行った。本検査法は、現在見逃されている可能性のある未承認 GM コメを検出することが可能になると期待される。

(2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

GM ジャガイモ Innate™ event-1 を対象に LAM-PCR の検討を行った結果、内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。本方法は、スクリーニング検査などで陽性と判定された検体について迅速に GM 品種を特定することが可能になると期待される。

(3) GMO 規制と開発に関する情報収集

親育種法 (NPBT) の EU のを含む各国の規制上の取扱は定まっていない。米国は独自の基準により判断し、いくつかの作物が既に USDA により承認されている。開発者、規制側、国民の間での考え方に大きな乖離がある。

【参考文献】

- 1) RASFF Portal, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>
- 2) Kuribara, H. et al., *J. AOAC Int.*, **85**, 1077–

- 1089 (2002).
- 3) Grohmann, L. et al., *Accred. Qual. Assur.*, **20**, 85-96 (2015).
- 4) 厚生労働省, 食安監発 0528 第 2 号 (2012).
- 5) Schmidt, M. et al., *Nat. Methods*, **4**, 1051-1057 (2007).
- 6) Kluga, L. et al., *Food Anal. Methods*, **6**, 361-369 (2013).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Sato-Fukuda, N., Ishigaki, T., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K. and Nishimaki-Mogami, T. (2016) Development and Interlaboratory Validation of a Simple Screening Method for Genetically Modified Maize using $\Delta\Delta\text{Cq}$ -based Multiplex Real-time PCR. *Anal. Chem.*, **88**, 4285-4293.
- (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. and Nishimaki-Mogami, T. (2016) Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method. *Food Chemistry*, **205**, 272-279.

- (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. and Nishimaki-Mogami, T. (2016) Interlaboratory validation study of real-time polymerase chain reaction detection method for unauthorized genetically modified papaya line PRSV-YK. *Data in Brief*, **7**, 1165-1170.

2. 学会発表

- (1) 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, 高島令王奈, 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 10 月
- (2) 中村公亮, 石垣拓実, 野口秋雄, 坂田こずえ, 加藤怜子, 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 10 月
- (3) 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 10 月
- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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，2016 年度 AOAC 日本セクション年次大会，東京，2016 年 7 月
- (7) 高畠令王奈，増渕友子，布藤聡，峯岸恭孝，野口秋雄，近藤一成，手島玲子，倉嶋たけ代，真野潤一，橘田和美：遺伝子組換えトウモロコシ MIR162 の系統特異的定量検知法の開発および妥当性確認，2016 年度 AOAC 日本セクション年次大会，東京，2016 年 7 月
- (8) 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，2016 年度 AOAC 日本セクション年次大会，東京，2016 年 7 月
- (9) 高畠令王奈，鍵屋ゆかり，峯岸恭孝，布藤聡，野口秋雄，近藤一成，最上（西巻）知子，真野潤一，橘田和美：LAMP 法を用いた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スクリーニング的定性検知法開発，日本食品化学学会 第 22 回総会・学術大会，高知，2016 年 6 月
- (10) 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

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

表 1-1 GM コメ系統と導入配列 (参考文献 6) を改変

	P35S	TNOS	Cry1Ab/Ac
Kefeng-6	✓	✓	✓
Ilyou Kefeng-6 (hybrid line)	✓	✓	
Huahui 1		✓	✓
Bt63		✓	✓
KMD1 (Kemingdao)	✓	✓	
LLRice 601	✓		
LLRice 62	✓		
Event T103-10 (Xa21-IR72)	✓		
Event 11586 (Golden Rice)		✓	
GM II-Youming 86	✓	✓	
Bt aizawai 7-29	✓		
Bt Xiushui 11			
Minghui 63a			
GM Minghui 63b			
IR72; Minghui 63c			✓
GM Minghui 86a			
Eyi 105; Ewan 5	✓		
Xiushui 11; Chunjiang 11	✓		
Jijing81; Jijing 88; Tong 887	✓		
Minghui86b			
Minghui63d, Zhenshan97A, MaxieA			✓
Zhuxian B			
Eyi105, Ewan5			
Zhongua91(a)			
Zhongua91(b)			
Xiushui110			

表 1-2 本検査法で用いたプライマー・プローブ

name	sequence (5'-3')	amplicon size (bp)	reference
<i>PLD</i>			
PLD3959F	GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT	80	4)
PLD4038R	CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA		
PLD-PB	FAM-TGAGTATGAACCTGCAGGTCGC-BHQ1		
<i>P35S</i>			
P35S 1-5'	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT	101	2)
P35S 1-3'	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT		
P35S-TaqB	FAM-CCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-BHQ1		
<i>TNOS</i>			
NOS ter 2-5'	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151	2)
NOS ter 2-3'	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT		
NOS-TaqB	FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1		
<i>cry1Ab/Ac</i>			
Bt-F1(mod)	GAGGAAATGCGTATTCAATTCAAC	74	3)
Bt-R	TTCTGGACTGCGAACAATGG		
Bt-P	FAM-ACATGAACAGCGCCTTGACCACAGC-BHQ1		

表 1-3 GM コメスクリーニング検査法の検出限界 (LOD)

target	PLD				P35S				TNOS				cry1Ab/Ac			
	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20
copy number	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20
positive /total	14 /21	19 /21	21 /21	21 /21	12 /21	18 /21	21 /21	21 /21	9 /21	19 /21	21 /21	21 /21	10 /21	20 /21	21 /21	21 /21
positive rate	66.7	90.5	100	100	57.1	85.7	100	100	42.9	90.5	100	100	47.6	95.2	100	100
LOD		✓					✓				✓				✓	

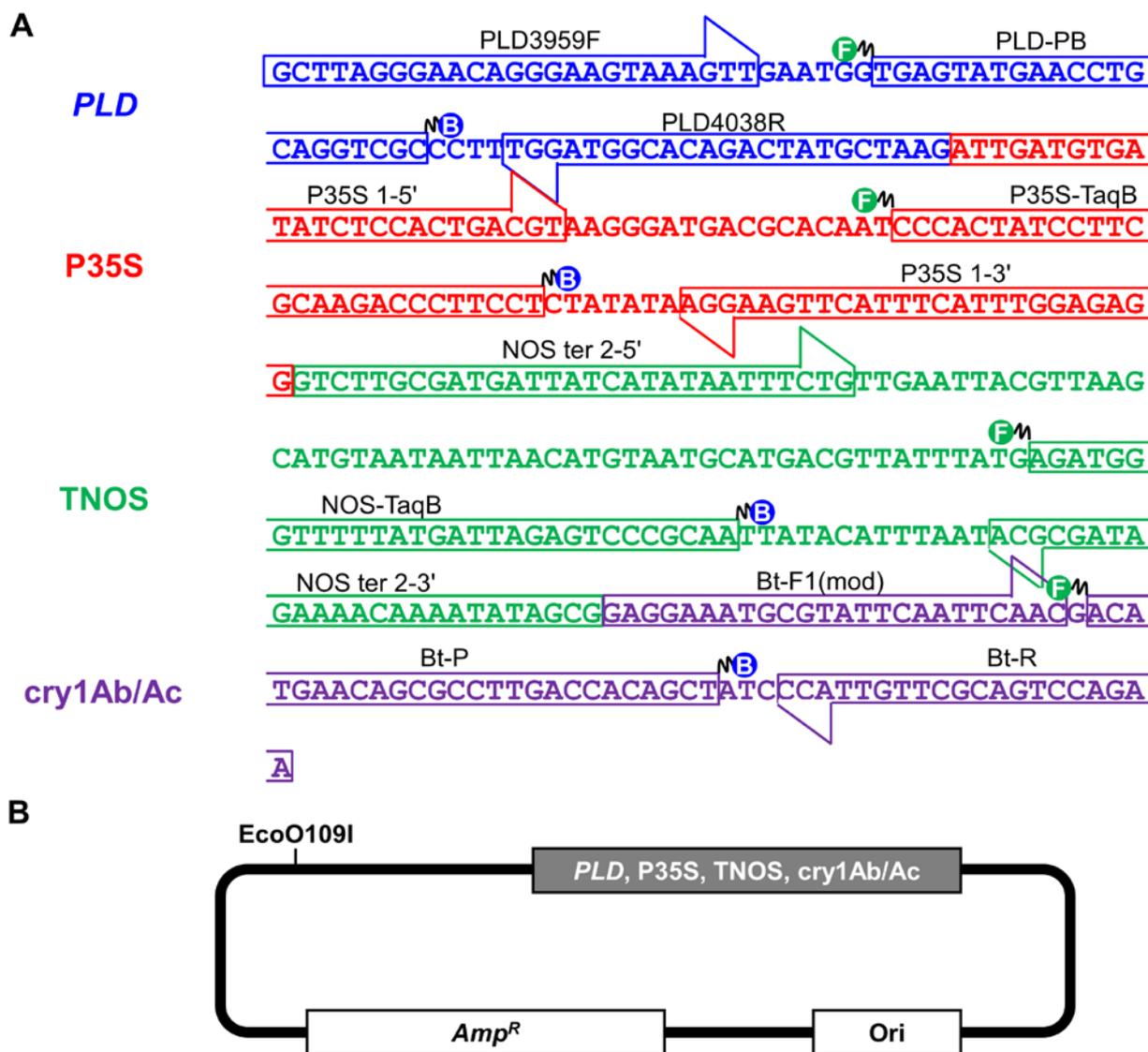


図 1-1 GM コメ陽性コントロールプラスミドのインサート配列 (A) および模式図 (B)
リアルタイム PCR に用いたプライマーを矢印ボックスで、プローブをボックスで示す。ⓕ, FAM. ⓑ, BHQ1. *Amp^R*, ampicillin resistance gene. Ori, origin of replication.

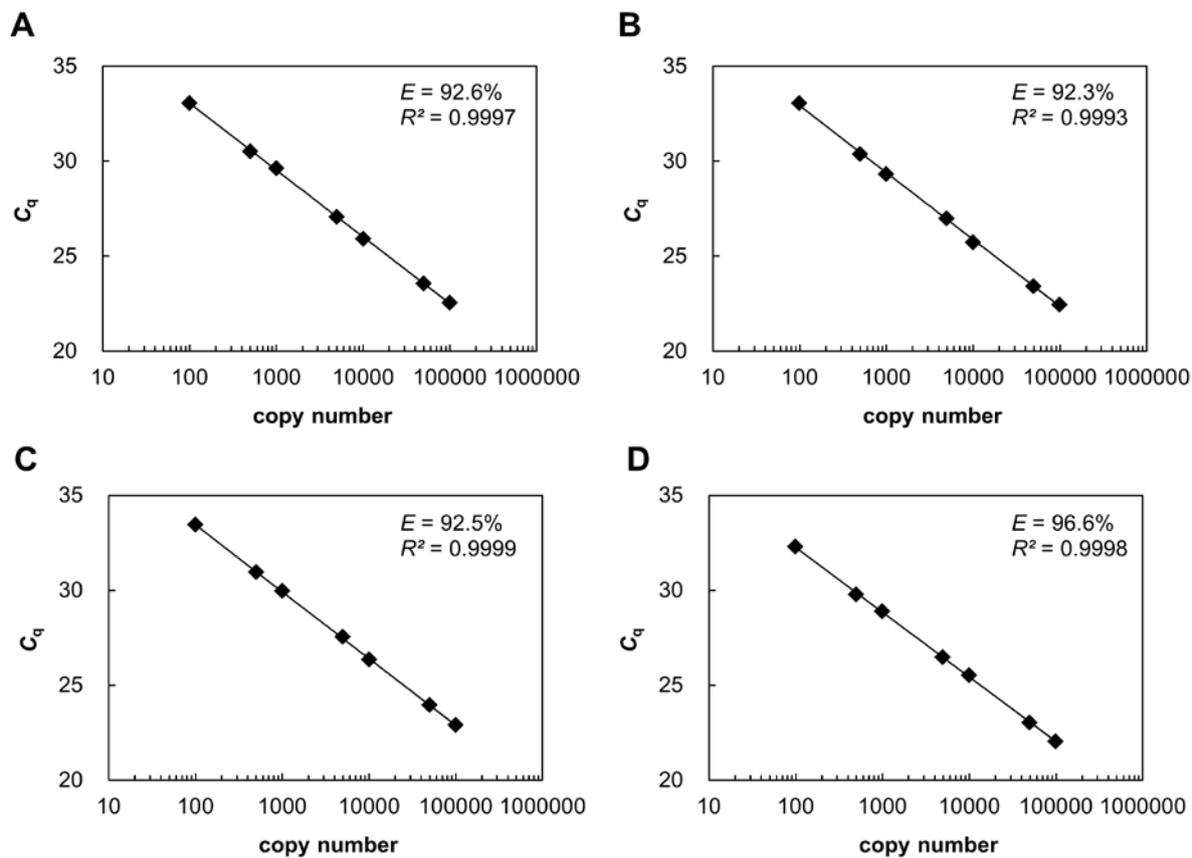


図 1-2 GM コメスクリーニング検査法の PCR 効率

横軸にプラスミド DNA のコピー数の対数值，縦軸に C_q 値をプロットした。(A) PLD, (B) P35S, (C) TNOS, (D) cry1Ab/Ac 反応系のプロット図。E, PCR 効率。

C

```

TAGTCCACCAAGAACATCACCTAGTCCACCAGTTTTGCTCCAAGGACCAACCTCAGTACCCACAAAGATCAAGTTCATTCCCTTTCCACAAACAATGGTA
GCTGAGCATCCAGGTCTCTTGGTCTCAGTTCTGGATGCCATCTTGGGTGTACCTTAGTATTAGTTCCTTGATTGGAGCCCATCAAGCTTGTTAACAGCCC
TTAAACCATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCCTATCTGTGACAAGTTGATTTGGTGTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGA
AGCTGTGATGCTTGCCATGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAAACAAAACAGAAATTGATTTCTGAGAAGAAG

AAGAAGAAGAGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAATAGATGAGATGAGATATGAAA

1st nest pGbss-Rev2 B pGbss-Rev2 B 2nd nest pGbss-Rev2
CAACGTTTATACACCATAACACGATTCATAATAGAATGTAGGGAAACATGCATGAAATCAGAAATAATTGGAGGAGATGAGTAAAAGTTACCACTTGTTC
AGCTGTGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGTGAGAATGAGGAGGTGCCTGCCTTATTTGTAGCAGGTTTCAGTGACACGTGTCAAGAGAATAGCGGGTGGCTATCCCTT
AGCGGAAGGCAACTGTGGACACTGTATTATAGGAAAATGCTCATCGACAGTATTATGGGCCCTCTCTTTGTTGATTACGGCTGGACTTCAACTTGGGCC
TTGCAATGGGCCCTCCGGTCTGTCTCCTAGTATCTAAAAAACTAAACCAACTCCCTCCTACCGCTACCACTTGACATTCCTATGTCTCGTGTAAATTA
AAATATTATTATA
  
```

図 2-1 LAM-PCR 増幅断片周辺の DNA 配列 (続き)

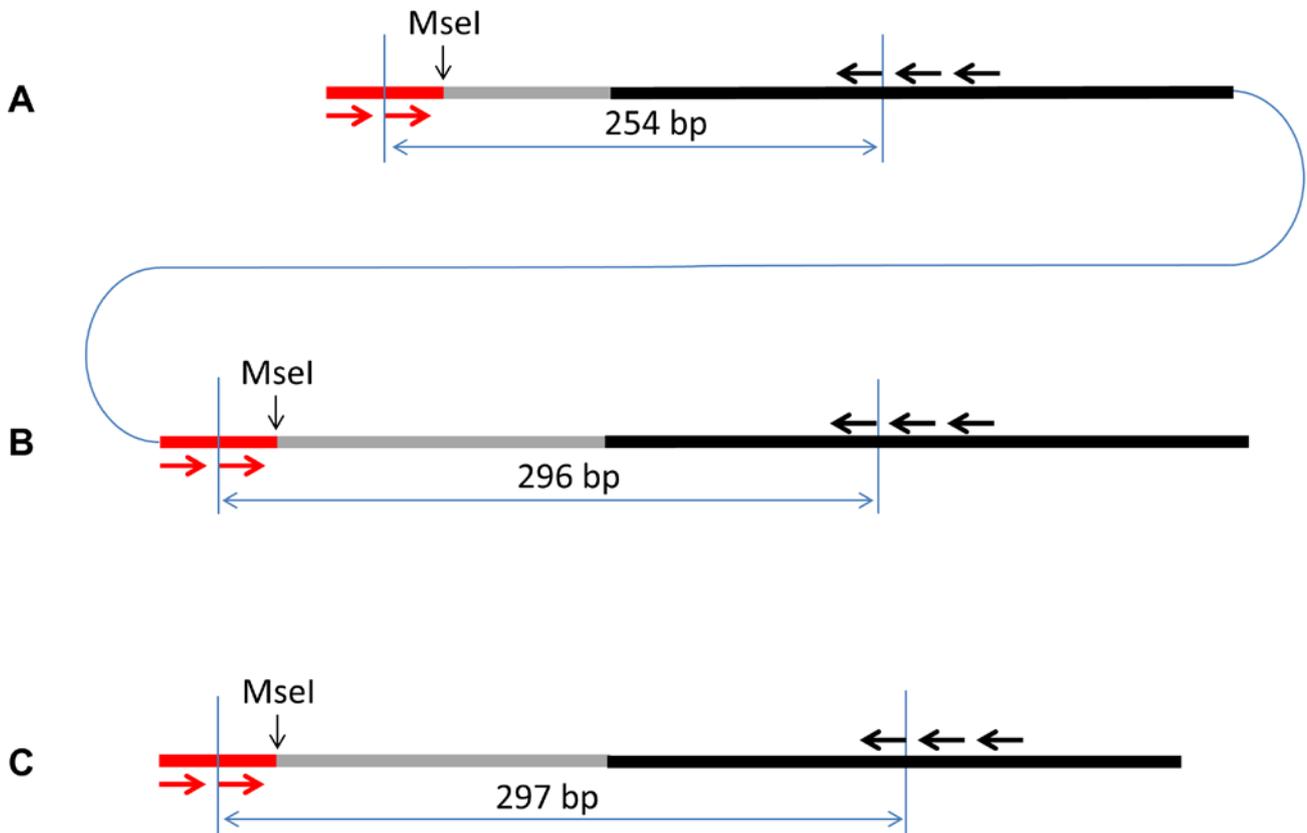


図 2-2 LAM-PCR 増幅断片の模式図

(A) GM ジャガイモ Innate™ event-1 に導入された遺伝子カセットの pGBSS-ASN 周辺配列. (B) GM ジャガイモ Innate™ event-1 に導入された遺伝子カセットの pGBSS-PHL 周辺配列. (C) ジャガイモに元々存在する pGBSS-GBSS 周辺配列. 黒ボックス, pGBSS. 灰ボックス, 各遺伝子. 赤ボックス, リンカーカセット. 黒矢印, ゲノム配列特異的プライマー (右から pGbss-Rev2, 1st nest pGbss-Rev2, 2nd nest pGbss-Rev2). 赤矢印, アダプター特異的プライマー (左から LCI, LCII).

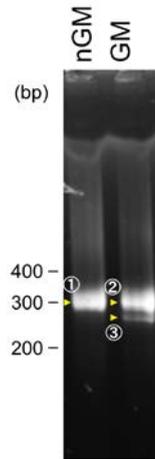


図 2-3 2nd Nested PCR 増幅断片のアガロース電気泳動解析

非組換えジャガイモ DNA から増幅された約 300 bp のバンド (①), GM ジャガイモ Innate™ event-1 DNA から増幅された約 300 bp のバンド (②) および約 250 bp のバンド (③) についてクローニングし, シーケンス解析を行った。

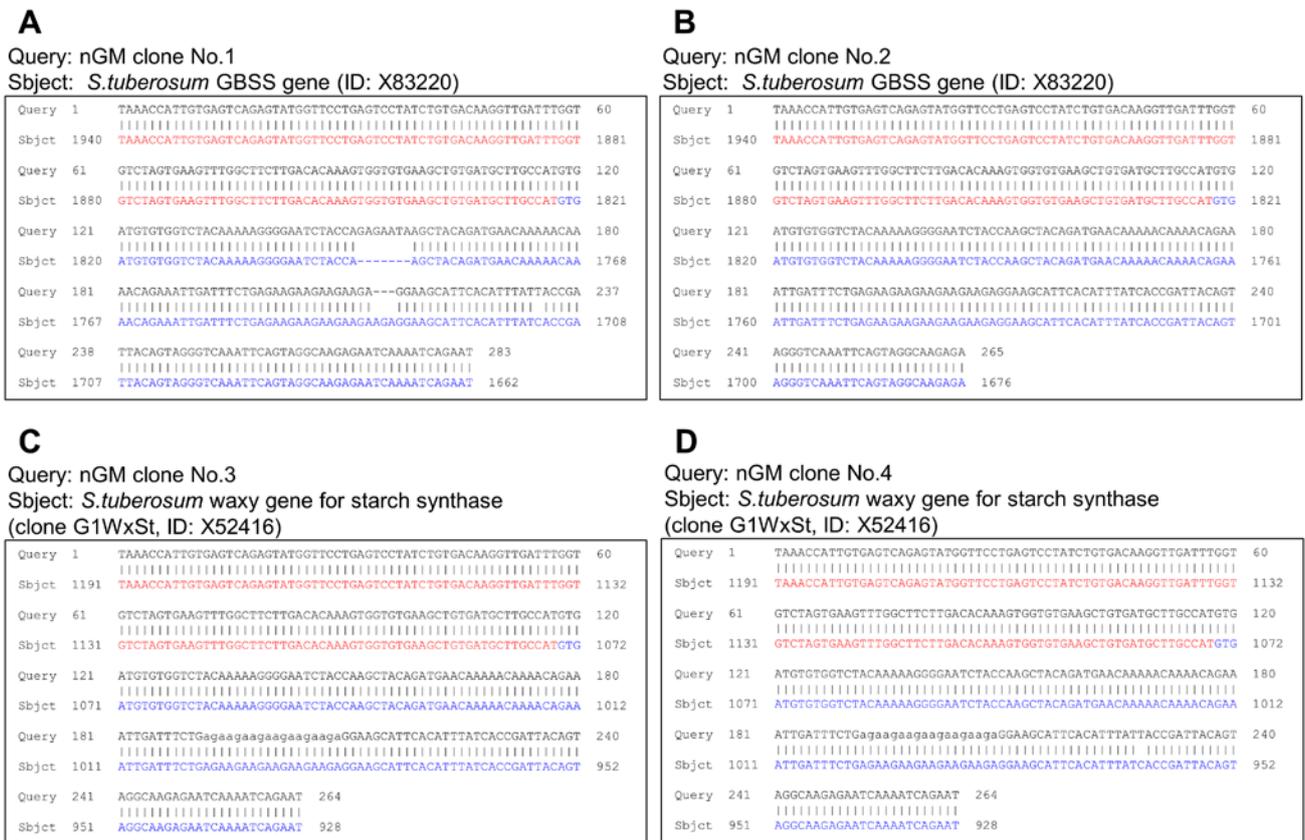


図 2-4 2nd Nested PCR 増幅断片のシーケンス解析結果とアライメント解析結果

(A-G) 非組換えジャガイモからの約 300 bp の増幅断片 7 クローンの解析結果. (H-S) GM ジャガイモ Innate™ event-1 からの約 300 bp の増幅断片 12 クローンの解析結果. (T-α) GM ジャガイモ Innate™ event-1 からの約 250 bp の増幅断片 8 クローンの解析結果. 黒字配列, Query 配列. 青字配列, pGBSS. 赤字配列, GBSS 遺伝子. 緑字配列, PHL 遺伝子. 橙字配列, ASN 遺伝子.

E

Query: nGM clone No.5
 Subject: *S.tuberosum* waxy gene for starch synthase
 (clone G1WxSt, ID: X52416)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTGGT	60
Sbjct	1191	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTGGT	1132
Query	61	GTCTAGTGAAGTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1131	GTCTAGTGAAGTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1072
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1071	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1012
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATTACCGATTACAGT	240
Sbjct	1011	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATTACCGATTACAGT	952
Query	241	AGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	264
Sbjct	951	AGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	928

F

Query: nGM clone No.6
 Subject: *S.tuberosum* GBSS gene (ID: X83220)

Query	5	AAGCT-TGATGCTTGCCATGTGATGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACA	63
Sbjct	1842	AAGCTGTGATGCTTGCCATGTGATGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACA	1783
Query	64	GATGAACAAAACAAAACAGAAATTTGATTTCTGAGAAGAAGAAGA---GGAAGCATT	120
Sbjct	1782	GATGAACAAAACAAAACAGAAATTTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAGGAGCATT	1723
Query	121	CACATTTATCACCATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAA	180
Sbjct	1722	CACATTTATCACCATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAA	1663
Query	181	T	181
Sbjct	1662	T	1662

G

Query: nGM clone No.7
 Subject: *S.tuberosum* waxy gene for starch synthase
 (clone G28WxSt, ID: X52417)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTGGT	60
Sbjct	1322	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTGGT	1263
Query	61	GTCTACTGAAGTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1262	GTCTACTGAAGTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1203
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAA	180
Sbjct	1202	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAA	1143
Query	181	AACAGAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATTACCGATTA	240
Sbjct	1142	AACAGAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATTACCGATTA	1083
Query	241	CAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	268
Sbjct	1082	CAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	1055

H

Query: GM(300 bp) clone No.1
 Subject: pGBSS-PHL

Query	1	TAATTCCTGTGTGATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAATAATTGAC	60
Sbjct	1	TAATTCCTGTGTGATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAATAATTGAC	60
Query	61	AATCCTCACTCTCTTATCACTCTCAATCGAAAAGCTAGATTGCTATAGAGAGCACCGTGA	120
Sbjct	61	AATCCTCACTCTCTTATCACTCTCAATCGAAAAGCTAGATTGCTATAGAGAGCACCGTGA	120
Query	121	TGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAA	180
Sbjct	121	TGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAA	180
Query	181	TTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATCACCAGATTACAGTA	240
Sbjct	181	TTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATCACCAGATTACAGTA	240
Query	241	GGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	278
Sbjct	241	GGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	278

I

Query: GM(300 bp) clone No.2
 Subject: pGBSS-PHL

Query	1	TAATTCCTGTGTGATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAATAATTGAC	60
Sbjct	1	TAATTCCTGTGTGATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAATAATTGAC	60
Query	61	AATCCTCACTCTCTTATCACTCTCAATCGAAAAGCTAGATTGCTATAGAGAGCACCGTGA	120
Sbjct	61	AATCCTCACTCTCTTATCACTCTCAATCGAAAAGCTAGATTGCTATAGAGAGCACCGTGA	120
Query	121	TGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAA	180
Sbjct	121	TGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAA	180
Query	181	TTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATCACCAGATTACAGTA	240
Sbjct	181	TTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATCACCAGATTACAGTA	240
Query	241	GGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	278
Sbjct	241	GGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	278

J

Query: GM(300 bp) clone No.3
 Subject: pGBSS-ASN

Query	1	TAAGACAAACAGGCTACATCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTCTGGATA	60
Sbjct	1	TAAGACAAACAGGCTACATCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTCTGGATA	60
Query	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Sbjct	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Query	121	ACAAAACAAAACAGAAATGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACAT	180
Sbjct	121	ACAAAACAAAACAGAAATGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACAT	180
Query	181	TTATCACCAGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236
Sbjct	181	TTATCACCAGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236

K

Query: GM(300 bp) clone No.4
 Subject: *S.tuberosum* GBSS gene (ID: X83220)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTGGT	60
Sbjct	1940	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTGGT	1881
Query	61	GTCTAGTGAAGTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1880	GTCTAGTGAAGTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1821
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1820	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1761
Query	181	ATTGATTTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCAGATTACAGT	240
Sbjct	1760	ATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAGCATTACATTTATCACCAGATTACAGT	1701
Query	241	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	279
Sbjct	1700	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	1662

図 2-4 2nd Nested PCR 増幅断片のシーケンス解析結果とアライメント解析結果 (続き)

L

Query: GM(300 bp) clone No.5
 Sbjct: *S.tuberosum* GBSS gene (ID: X83220)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1940	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1881
Query	61	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1880	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1821
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1820	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1761
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	240
Sbjct	1760	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	1701
Query	241	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	279
Sbjct	1700	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	1662

M

Query: GM(300 bp) clone No.6
 Sbjct: *S.tuberosum* GBSS gene (ID: X83220)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1940	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1881
Query	61	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1880	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1821
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1820	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1761
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	240
Sbjct	1760	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	1701
Query	241	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	279
Sbjct	1700	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	1662

N

Query: GM(300 bp) clone No.7
 Sbjct: *S.tuberosum* waxy gene for starch synthase
 (clone G1WxSt, ID: X52416)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1191	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1132
Query	61	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1131	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1072
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1071	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1012
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	240
Sbjct	1011	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	952
Query	241	AGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	264
Sbjct	951	AGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	928

O

Query: GM(300 bp) clone No.8
 Sbjct: *S.tuberosum* waxy gene for starch synthase
 (clone G1WxSt, ID: X52416)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1191	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1132
Query	61	GTTTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1131	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1072
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1071	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1012
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	240
Sbjct	1011	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	952
Query	241	AGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	264
Sbjct	951	AGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	928

P

Query: GM(300 bp) clone No.9
 Sbjct: *S.tuberosum* GBSS gene (ID: X83220)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1940	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1881
Query	61	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1880	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1821
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1820	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1761
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	240
Sbjct	1760	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	1701
Query	241	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	279
Sbjct	1700	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	1662

Q

Query: GM(300 bp) clone No.10
 Sbjct: *S.tuberosum* GBSS gene (ID: X83220)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1940	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1881
Query	61	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1880	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1821
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1820	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1761
Query	181	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAA---GGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	237
Sbjct	1760	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	1701
Query	238	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	276
Sbjct	1700	AGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	1662

R

Query: GM(300 bp) clone No.11
 Sbjct: *S.tuberosum* waxy gene for starch synthase
 (clone G1WxSt, ID: X52416)

Query	1	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	60
Sbjct	1191	TAAACCAATTGTGAGTCAGAGTATGGTTCCTGAGTCTATCTGTGACAAGGTTGATTTGGT	1132
Query	61	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	120
Sbjct	1131	GTCTAGTGAAGTTTGGCTTCTTGACACAAAGTGGTGTGAAGCTGTGATGCTTGCATGTG	1072
Query	121	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	180
Sbjct	1071	ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAA	1012
Query	181	ATTGATTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	240
Sbjct	1011	ATTGATTCTGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGT	952
Query	241	AGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	264
Sbjct	951	AGGCAAGAGAATCAAATCAGAAT	928

S

Query: GM(300 bp) clone No.12
 Sbjct: *Solanum tuberosum* granule bound starch synthase gene, promoter region and 5' UTR (ID: HM363755)

Query	4	AACCGAGA-AGGAATGAGGATATGAACGAACTACCTTACGAATGAGAAGAAGAAGA	62
Sbjct	653	AAGCTACAGATGAACAAAACA-AAACGAAATTTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGA	595
Query	63	GGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCA	122
Sbjct	594	GGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCA	535
Query	123	AAATCAGAAT	132
Sbjct	534	AAATCAGAAT	525

図 2-4 2nd Nested PCR 増幅断片のシーケンス解析結果とアライメント解析結果 (続き)

T

Query: GM(250 bp) clone No.1
 Sbjct: pGBSS-ASN

Query	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Sbjct	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Query	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Sbjct	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Query	121	ACAAAACAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Sbjct	121	ACAAAACAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Query	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236
Sbjct	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236

U

Query: GM(250 bp) clone No.2
 Sbjct: pGBSS-ASN

Query	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Sbjct	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Query	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Sbjct	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Query	121	ACAAAACAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Sbjct	121	ACAAAACAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Query	181	TTATCACTGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236
Sbjct	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236

V

Query: GM(250 bp) clone No.3
 Sbjct: pGBSS-ASN

Query	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Sbjct	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Query	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Sbjct	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Query	121	ACAAAACAGAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Sbjct	121	ACAAAACAGAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Query	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236
Sbjct	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236

W

Query: GM(250 bp) clone No.4
 Sbjct: pGBSS-ASN

Query	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Sbjct	1	TAAGAGCAAAACAGGCTACATCCCGCTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCATTTCGGATA	60
Query	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Sbjct	61	AAGAGTTCGAATTCGTGATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGA	120
Query	121	ACAAAACAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Sbjct	121	ACAAAACAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACAT	180
Query	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236
Sbjct	181	TTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	236

X

Query: GM(250 bp) clone No.5
 Sbjct: *S. tuberosum* clone GKCM-TU01 granule-bound starch synthase (*waxy*) gene, partial cds (ID: EU548081)

Query	34	TACTAAGGTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAAATTGATTTCTGagaagaagaagaaga	93
Sbjct	998	TACCAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGA	939
Query	94	agaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	151
Sbjct	938	AGAGGAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	881

Y

Query: GM(250 bp) clone No.6
 Sbjct: *S. tuberosum* granule bound starch synthase gene, promoter region and 5' UTR (ID: HM363755)

Query	24	CAAGAACTAACAGAAAATTGATTTCTGagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATT	83
Sbjct	639	CAAAAACAAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGAGGAAAGCATTACATT	580
Query	84	TATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	138
Sbjct	579	TATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCAAAATCAGAAT	525

Z

Query: GM(250 bp) clone No.7
 Sbjct: *S. tuberosum* granule bound starch synthase gene, promoter region and 5' UTR (ID: HM363755)

Query	4	CAAGTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAAATTGATTTCTGagaagaagaagaaga	63
Sbjct	654	CAAGCTACAGATGAACAAAACAAAACAGAAAATTGATTTCTGAGAAGAAGAAGAAGA	595
Query	64	GGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCA	123
Sbjct	594	GGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAATCA	535
Query	124	AAATCAGAAT 133	
Sbjct	534	AAATCAGAAT 525	

α

Query: GM(250 bp) clone No.8
 Sbjct: *S. tuberosum* clone GKCM-TU01 granule-bound starch synthase (*waxy*) gene, partial cds (ID: EU548081)

Query	39	TgagaagaagaagaagaGGAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGCAAGAG	98
Sbjct	955	TGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAAAGCATTACATTTATCACCGATTACAGTAGGCAAGAG	896
Query	99	AATCAAAATCAGAAT 113	
Sbjct	895	AATCAAAATCAGAAT 881	

図 2-4 2nd Nested PCR 増幅断片のシーケンス解析結果とアライメント解析結果 (続き)

Regulatory Framework to GMO

USA	EU member states	Australia/NewZealand	Canada
<p>USDA <u>Animal Health Protection Act (AHPA)</u>: protect livestock from animal pest and disease risk <u>Plant Protection Act (PPA)</u>: protect agricultural products from damage caused by organisms that pose or plant pest.</p> <p>FDA <u>Federal Food Drug and Cosmetics Act (FD&C)</u>: ensure human and animal food is safe, sanitary, and properly labeled, ensure human and animal drugs are safe and effective</p> <p>For GE animals, the genetic materials and recombinant DNA construct, that is integrated into the DNA of an animal and is intended to affect the animal's structure or function meets the definition of "a drug" under FD&C Act. Therefore, a premarket approval is required. CVM (Center for veterinary Medicine) is responsible for evaluating the safety and effectiveness of the rDNA construct. FDA review process has seven categories; product definition, molecular characterization of construct, molecular characterization of GE animal lineage, phenotype, durability, environmental food safety, claim validation.</p> <p>EPA <u>Federal Insecticide, fungicide, and rodenticide Act (FIFRA)</u>: For dietary or residential human health effects, the sole standard is the safety of all the combined exposures to the pesticide and related compounds <u>FD&C</u>: ensure that no harm will result from aggregate exposure to the pesticide chemical residue <u>Toxic Substance Control Act (TSCA)</u>: prevent manufacture, processing, distribution in commerce, use, disposal of chemical substances...</p> <p>If plant-incorporated protectant is produced by plant, EPA regulates the pesticide substance and related genetic material for human safety.</p>	<p>European commission GMO legislation <u>Directive 2001/18/EC</u> on the deliberate release of GMOs into the environment. In accordance with the precautionary principle, the objective of this Directive is to approximate the laws, regulations and administrative provisions of the Member States and to protect human health and the environment.</p> <p><u>Regulation (EC) 1829/2003</u> on genetically modified food and feed: (a) provide the basis for ensuring a high level of protection of human life and health, animal health and welfare, environment and consumer interests in relation to genetically modified food and feed, whilst ensuring the effective functioning of the internal market; (b) lay down Community procedures for the authorisation and supervision of genetically modified food and feed; (c) lay down provisions for the labelling of genetically modified food and feed.</p> <p><u>Directive (EU) 2015/412</u> amending Directive 2001/18/EC as regards the possibility for the Member States to restrict or prohibit the cultivation of GMOs in their territory. The following Articles are inserted: Article 26b, Cultivation 1. During the authorisation procedure of a given GMO or during the renewal of consent/authorisation, a Member State may demand that the geographical scope of the written consent or authorisation be adjusted to the effect that all or part of the territory of that Member State is to be excluded from cultivation. This is important.</p> <p><u>Regulation (EC) 1830/2003</u> concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms.</p> <p><u>Directive 2009/41/EC</u> on contained use of genetically modified micro-organisms. Regulation (EC) 1946/2003 on transboundary movements of GMOs.</p>	<p>FSANZ (Food Standard Australia/NewZealand) GM foods are regulated under <u>Standard 1.5.2 – Food produced using Gene Technology</u>, in the Food Standards Code. The standard has two provisions – mandatory pre-market approval (including a food safety assessment) and mandatory labelling requirements.</p> <p>GM foods are regulated under Standard 1.5.2 – Food produced using Gene Technology, in the Food Standards Code. The standard has two provisions – mandatory pre-market approval (including a food safety assessment) and mandatory labelling requirements. This standard ensures that only assessed and approved GM foods enter the food supply. Approved GM foods are listed in Schedule 26 of the Food Standards Code. Anyone seeking to amend the Code to include a new GM food should refer to the Application Handbook. Details on FSANZ's assessments of GM foods and current approvals can be found here. Not every approved GM food enters the marketplace. Many GM crops approved for use as food, are grown for animal feed and some GM approved plants don't make it to market because of a variety of reasons, for example if they are not commercially viable.</p> <p><u>In Australia</u>, the <u>Office of the Gene Technology Regulator (OGTR)</u> oversees the development and environmental release of GM organisms under <u>the Gene Technology Act 2000</u>. <u>In New Zealand</u>, similar functions are undertaken by the Environmental Protection Authority, under the <u>Hazardous Substances and New Organisms (HSNO) Act 1996</u>.</p>	<p>Health Canada Role: Health Canada assesses the safety of all genetically-modified and other novel foods proposed for sale in Canada. Companies are required to submit detailed scientific data for review and approval by Health Canada, before such foods can be sold.</p> <p>Food and Drug Regulations <u>C.R.C., c. 870. FOOD AND DRUGS ACT</u> What are Novel Foods and Genetically Modified (GM) Foods? Novel Foods are: Foods resulting from a process not previously used for food. Products that do not have a history of safe use as a food. Foods that have been modified by genetic manipulation, also known as genetically modified foods, GM foods, genetically engineered foods or biotechnology-derived foods.</p> <p><u>novel food means</u> (a) a substance, including a microorganism, that does not have a history of safe use as a food; (b) a food that has been manufactured, prepared, preserved or packaged by a process that (i) has not been previously applied to that food, and (ii) causes the food to undergo a major change; and (c) a food that is derived from a plant, animal or microorganism that has been genetically modified such that (i) the plant, animal or microorganism exhibits characteristics that were not previously observed in that plant, animal or microorganism, (ii) the plant, animal or microorganism no longer exhibits characteristics that were previously observed in that plant, animal or microorganism, or (iii) one or more characteristics of the plant, animal or microorganism no longer fall within the anticipated range for that plant, animal or microorganism.</p>
<p>There is no GMO definition.</p> <p>For GE plants, FDA established a <u>premarket consultation</u> process to help ensure that any safety or other regulatory issues associated with food from a new plant variety are resolved. FDA reviews description of biotech foods, ifunctions of introduced genetic materials, identity and function of expression products, toxicity and allergenicity, info comparing the composition of biotech and conventional foods, etc.</p> <p>GE organism is considered if the donor organism, recipient organism, vector or vector agent used in engineering the organisms belongs to one of the ataxa listed in 7C.F.R. section 340.2 and also considered a plant pest. Required data and info to conduct a plant pest risk assessment is provided in 7C.F.R.340.6 (c). GE organism is also regulated when APHIS has reason to believe that the GE organism may be a plant pest.</p>	<p>Directive 2001/18/EC Article 2 Definitions</p> <p>(2) "genetically modified organism (GMO)" means an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination; Within the terms of this definition: (a) genetic modification occurs at least through the use of the techniques listed in Annex I A, part 1; Techniques of genetic modification referred to in Article 2(2)(a) are inter alia: (1) recombinant nucleic acid techniques involving the formation of new combinations of genetic material by the insertion of nucleic acid molecules produced by whatever means outside an organism, into any virus, bacterial plasmid or other vector system and their incorporation into a host organism in which they do not naturally occur but in which they are capable of continued propagation; (2) techniques involving the direct introduction into an organism of heritable material prepared outside the organism including micro-injection, macro-injection and micro-encapsulation; (3) cell fusion (including protoplast fusion) or hybridisation techniques</p>	<p>Standard 1.5.2—2 Definitions</p> <p>food produced using gene technology means a food which has been derived or developed from an organism which has been modified by gene technology. Note This definition does not include food derived from an animal or other organism which has been fed food produced using gene technology, unless the animal or other organism is itself a product of gene technology. gene technology means recombinant DNA techniques that alter the heritable genetic material of living cells or organisms.</p> <p><u>OGTR's definition</u> Definition: The full definition of a GMO appears under section 10 of the Gene Technology Act 2000 (the Act). In essence, a GMO means: An organism that has been modified by gene technology; or An organism that has inherited traits from an organism, where the traits occurred in the initial organism because of gene technology.</p> <p><u>EPA's definition</u> all organisms developed through conventional and longstanding chemical and radiation treatments do not require HSNO Act approval as GMOs.</p>	<p>There is no regulation specific to GMO. Instead, GMO is treated as a novel food.</p> <p>DIVISION 28 Definition of Novel Foods B.28.001 The definitions in this section apply in this Division. genetically modify means to change the heritable traits of a plant, animal or microorganism by means of intentional manipulation.</p> <p>major change means, in respect of a food, a change in the food that, based on the manufacturer's experience or generally accepted nutritional or food science theory, places the modified food outside the accepted limits of natural variations for that food with regard to (a) the composition, structure or nutritional quality of the food or its generally recognized physiological effects; (b) the manner in which the food is metabolized in the body; or (c) the microbiological safety, the chemical safety or the safe use of the food. (changeament majeure)</p>
	<p>Article 3 Exemptions</p> <p>1. This Directive shall not apply to organisms obtained through the techniques of genetic modification listed in Annex I B. 2. This Directive shall not apply to the carriage of genetically modified organisms by rail, road, inland waterway, sea or air. Techniques/methods of genetic modification yielding organisms to be excluded from the Directive, on the condition that they do not involve the use of recombinant nucleic acid molecules or genetically modified organisms other than those produced by one or more of the techniques/methods listed below are: (1) mutagenesis, (2) cell fusion (including protoplast fusion) of plant cells of organisms which can exchange genetic material through traditional breeding methods.</p>		
<p>Intragenic Potato (Simplot Inc) and CRISPR/Cas9-based mushrooms (Univ.), intragenic GALA apple (Okanagan) and Maize (deleted a whole gene Waxy seq, Monsanto) have approved by USDA. ODM-based Rape seeds of Cibus Inc. approved.</p>	<p>UK, Germany, Sweden, Italy, France, Ireland, Netherland, Finland showed signs of welcome about genome-editing plants.</p> <p>France asked the judgement to European Court of Justice.</p>	<p>NewZealand has decided not to deregulate ZFN-TALEN-based biotech product.</p>	<p>ODM-based Cibus rapeseed will be approved</p>

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'-acactctttccctacacgacgctcttccgatctaacctgatgctgttg-3'

1st_target-R:

5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctcgcaagctcctgcaact-3'

1st_control-F: 5'-

acactctttccctacacgacgctcttccgatctcgaaaggaaggaattca-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'-aatgatacggcgaccaccgagatctacacagggcgaagacactcttccctacacgacgc-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) 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ので手袋をして 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

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、穰山浩、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

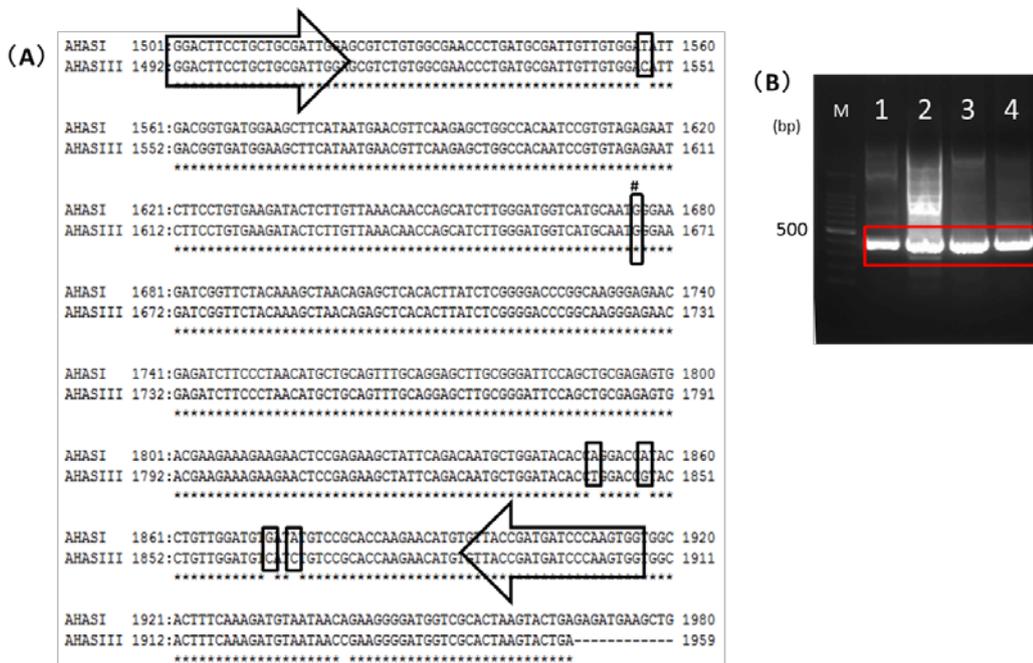


図 1. 除草剤耐性セイヨウアブラナ由来の AHASI/AHASIII 配列の確認

(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)

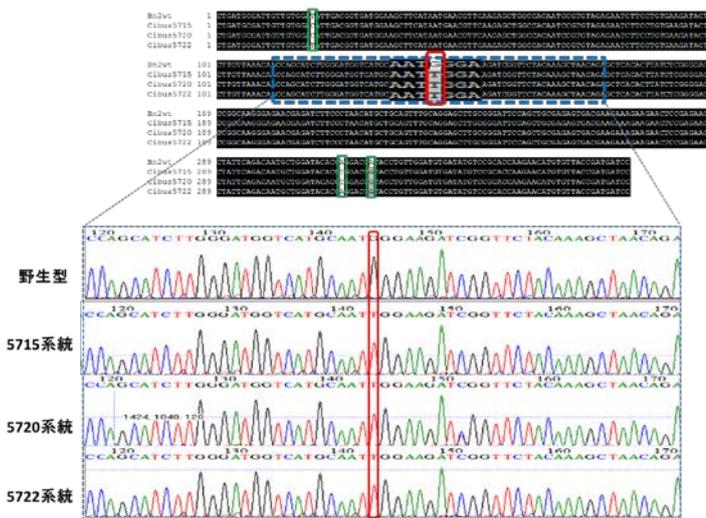


図 2. 変異型 AHASI/AHASIII のシーケンシング結果

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。

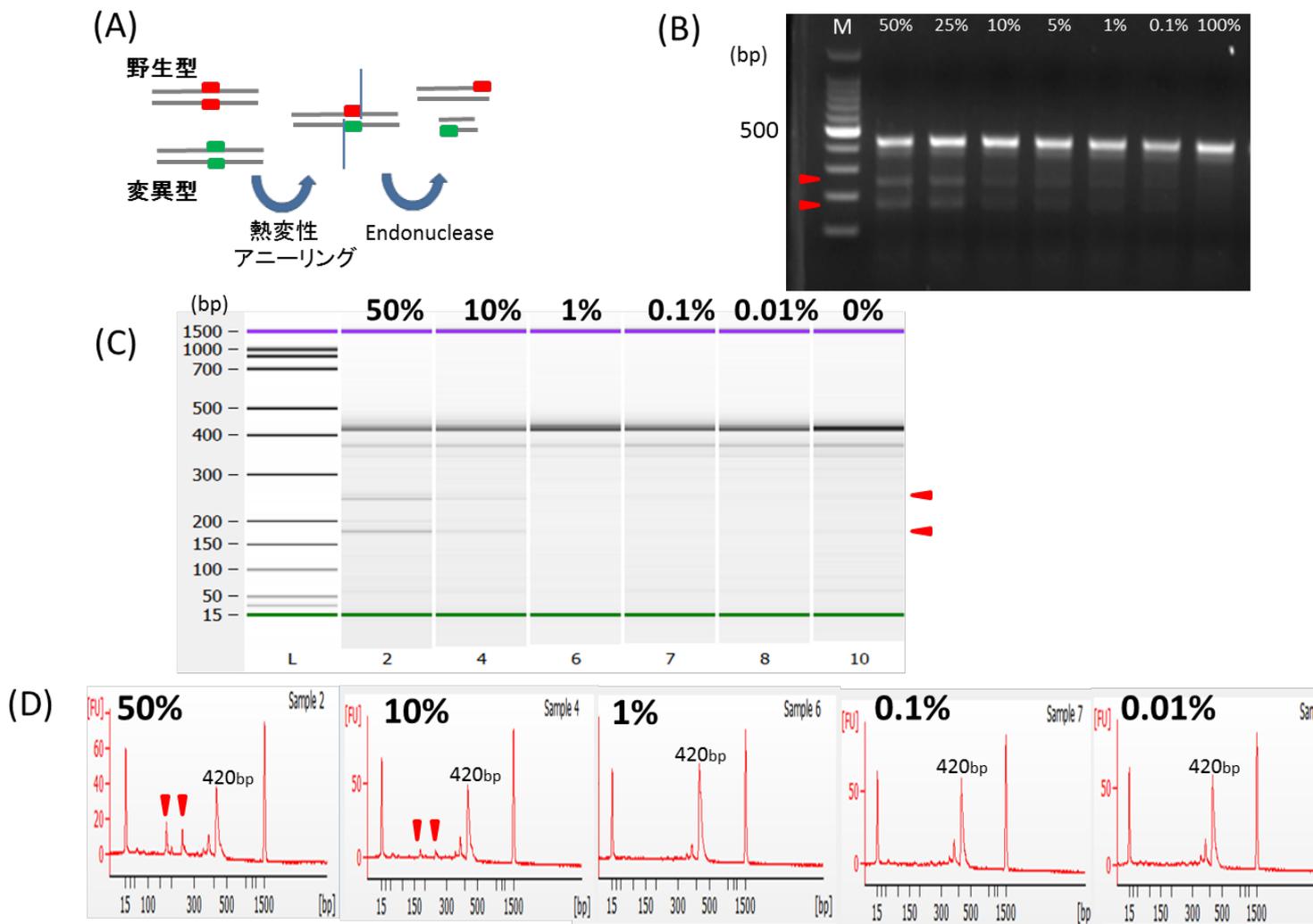


図 3. Cel1 アッセイ法を使用した際の 5722 系統検出感度の解析

(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。

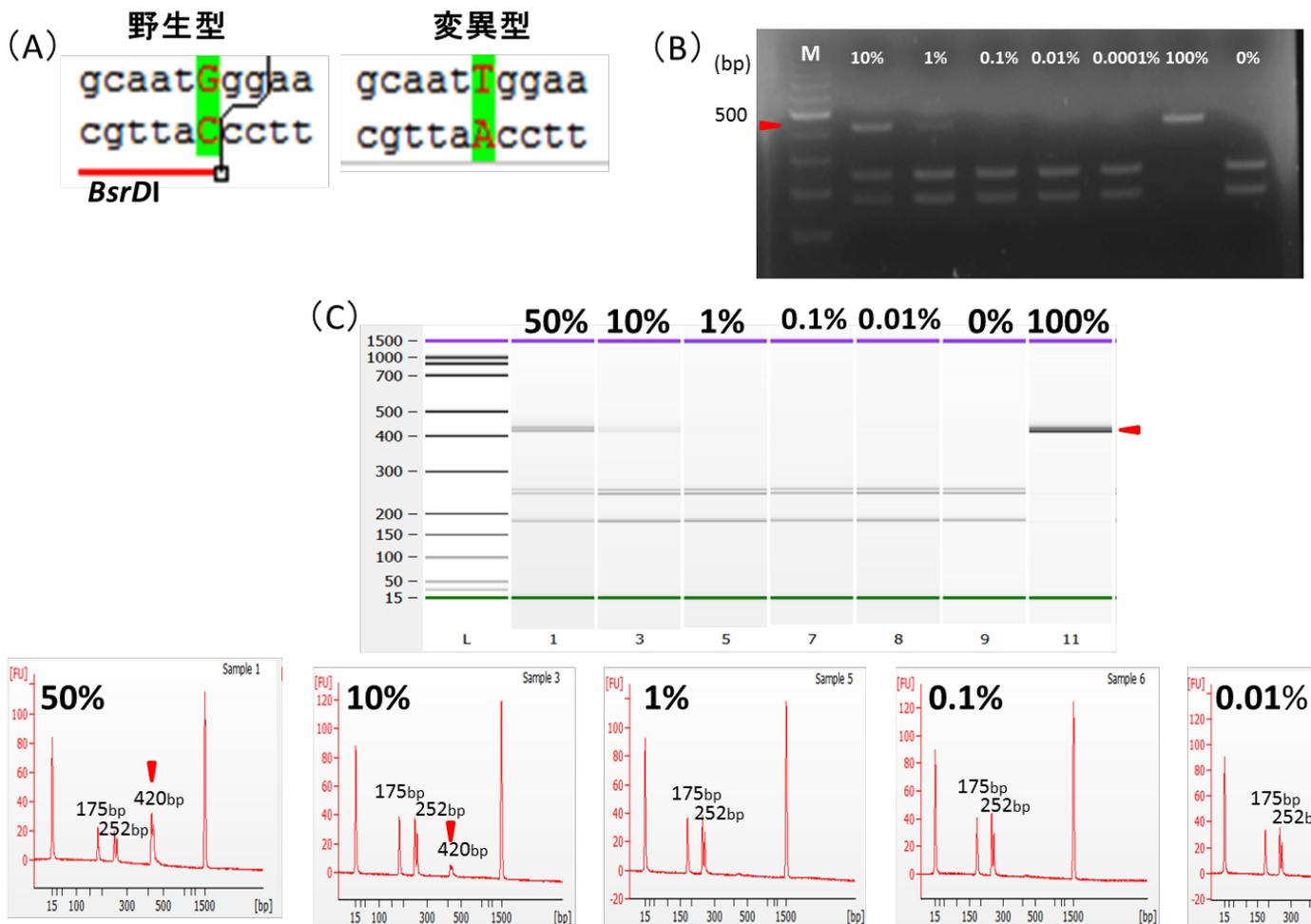
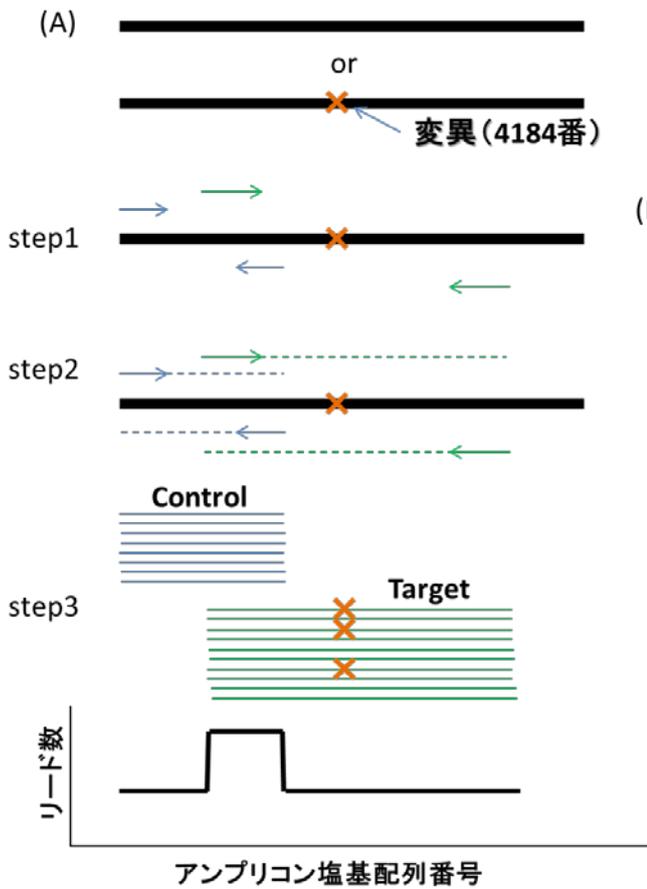


図 4. 制限酵素処理スクリーニング法を使用した際の 5722 系統検出感度の解析

(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。



(B)



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

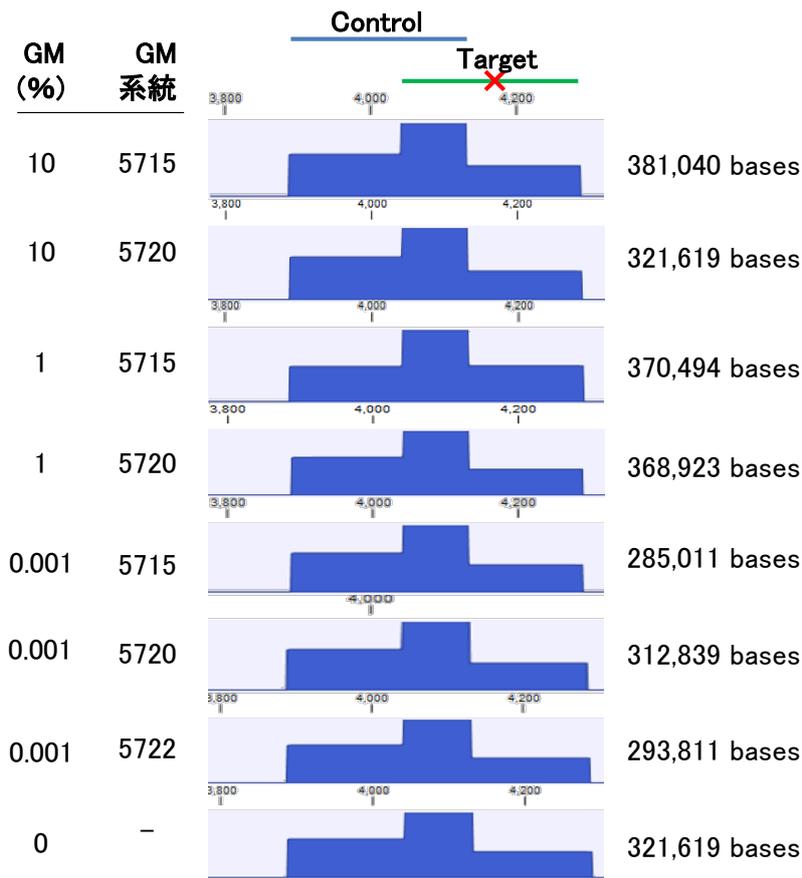


図 6. PCR-NGS 法による解析結果

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。

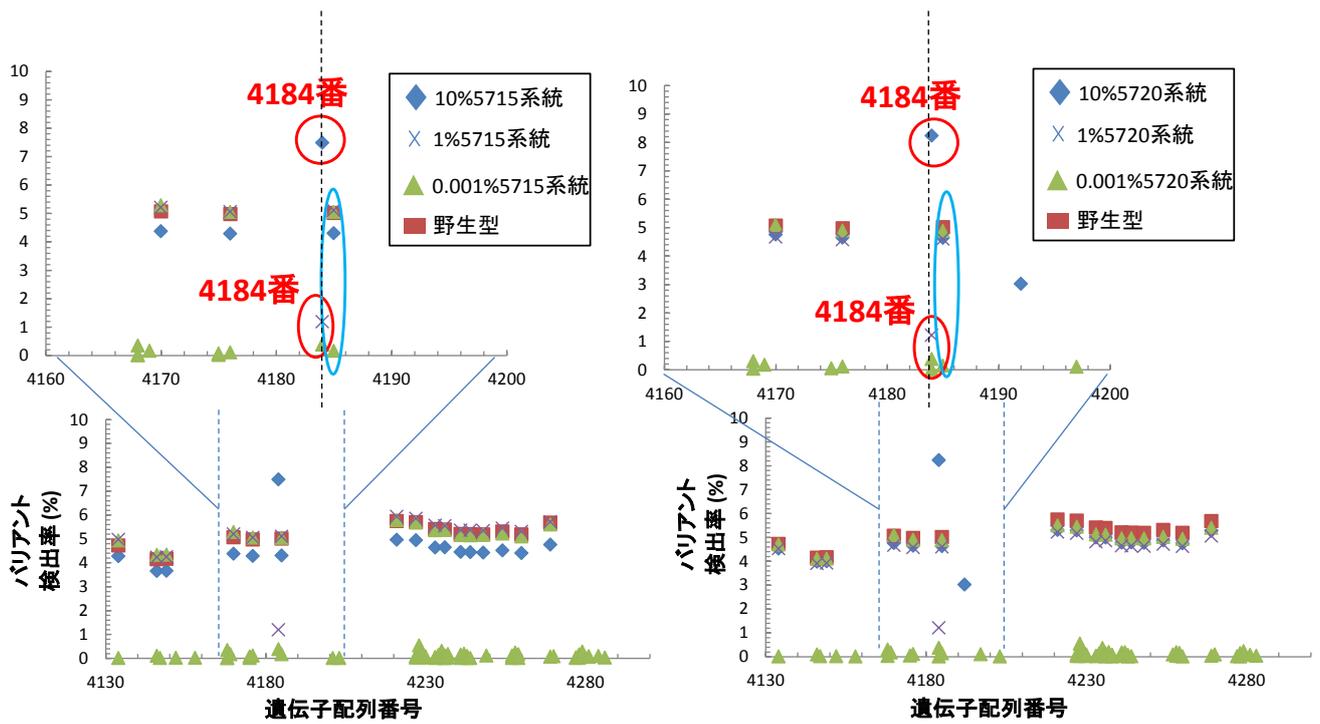


図 7. PCR-NGS 法のバリエント配列の検出

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

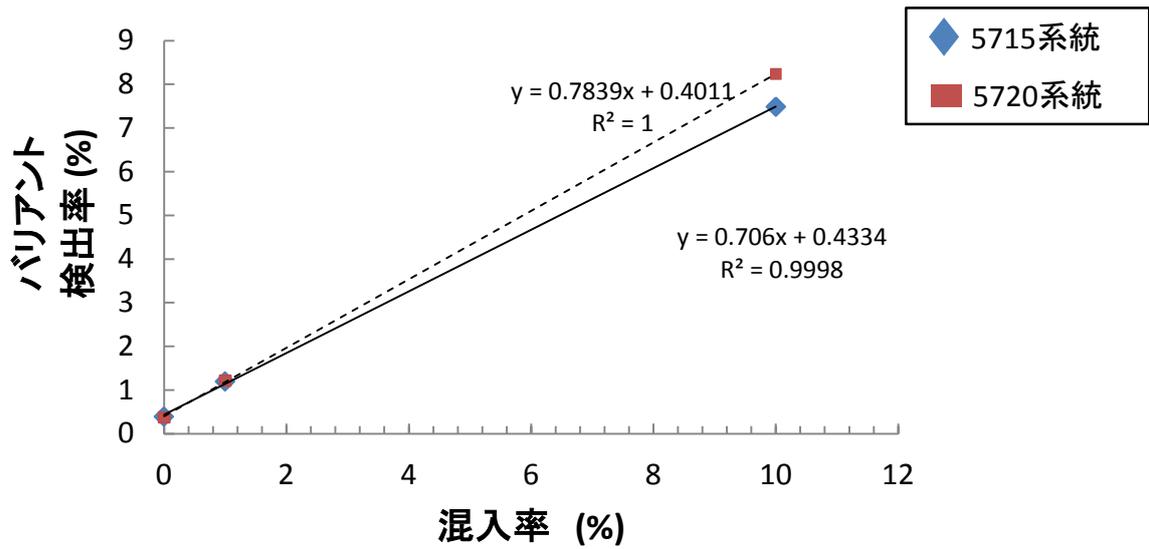


図 8. PCR-NGS 法によるバリエント検出率と除草剤耐性セイヨウアブラナの混入率の相関性
 0.001%、1%、10%濃度に希釈した (A) 5715 系統、及び、(B) 5720 系統 DNA を鋳型に PCR を行い、
 バリエント検出率を混入率に対してグラフ化

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

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

分担課題 アレルゲンデータベースによるアレルゲン性評価に関する研究

研究分担者 安達 玲子 （国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長）
研究協力者 為広 紀正 （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

本研究では、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に関する研究の一環として、アレルゲン性予測解析法の 1 つとして運用・公開しているアレルゲンデータベース (ADFS; Allergen Database for Food Safety) について、新たに発表されたアレルゲン情報及びエピトープ情報を追加し、データベースの更新を行った。その結果、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報 83、及び、10 種のアレルゲンについて総数 42 のエピトープ情報を追加した。本年度の更新作業により、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 2111 となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は 227 となった。

A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在、様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物だけでなく、遺伝子組換え動物も開発が進んでいる。また最近では、遺伝子組換え植物同士を交配して得られるスタック品種も開発されている。これは、遺伝子を組み換えて付与された機能をスタックすることにより、生産性の向上等を図っているものであるが、このような品種について形質にどのような変化が現れるかについて研究されている例は少ない。これらのようなこれまで存在していなかった遺伝子組換え生物については、非意図的な影響等を考慮し、安全性評価の方法等について検討する必要がある。

多様化するバイオテクノロジー技術を用いて開発される遺伝子組換え食品に関しては、そのリスクの 1 つとしてアレルゲン性

増大の可能性が考えられる。本研究では、アレルゲン性解析法の 1 つとして開発した、アレルゲン性の予測機能を装備したアレルゲン・エピトープ情報データベース (ADFS; Allergen Database for Food Safety) に関して、その情報内容を更新し充実させることにより、遺伝子組換え食品のリスク管理の上で必須であるアレルゲン性評価系に関する研究を行う。

B. 研究方法

登録アレルゲン（アミノ酸配列情報）のアップデート

米国ネブラスカ大学リンカーン校が運営しているアレルゲンデータベース (AllergenOnline) における登録アレルゲンのアップデート内容を、ADFS に反映させた。

エピトープ情報の追加

2015年6月から2016年5月までの1年間にNCBI PubMedに収載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。キーワードとしては、IgE、epitope、linear、conformational、sequence、recognition等々のワードを使用し、これらを複数組み合わせ合わせて6通りの検索式を作成して検索を行った。この検索により抽出されてきた論文についてピアレビューを行った。その結果エピトープ情報を報告していると判断された論文について、そのエピトープ情報を整理し、アレルゲンデータベース(ADFS)のデータに追加した。

C. 研究結果

登録アレルゲン（アミノ酸配列情報）のアップデート

米国ネブラスカ大学リンカーン校が運営しているアレルゲンデータベースであるAllergenOnlineは、登録アレルゲンの全てが国際的なアレルギーの専門家チームによるピアレビューを経ており、登録タンパク質がアレルゲンであるというエビデンスの信頼性が非常に高いデータベースである（但しエピトープ情報は含まない）。ADFSにおける登録アレルゲンは平成20年度にAllergenOnlineの登録アレルゲンと統合し、その後もAllergenOnlineのアップデートに伴ってADFS登録アレルゲンのアップデートを行っている。28年度においても引き続きこのアップデート作業を実施した。

エピトープ情報の追加

エピトープ配列に関しては、キーワード検索により抽出された論文は21報であった。その中からアレルゲン・エピトープ情報が記載されていると思われる10報を選択し、ピアレビューを行った。その結果、6報の論文(Table 1)から10種のアレルゲンについて、総数42のエピトープ情報を新たに追加した(Table 2)。

上記のアレルゲン及びエピトープ情報更新作業により、ADFSのアレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は2111、エピトープ既知のアレルゲン数は227、構造既知のアレルゲン数は128、糖鎖付加アレルゲン数は129となった。

D. 考察

28年度においては、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報を83種追加、また、10種のアレルゲンについて総数42のエピトープ情報をADFSに追加した。本研究により、遺伝子組換え食品のアレルゲン性に関する評価・予測系を充実させることができ、現在までに既に開発されている遺伝子組み換え食品、及び多様化するバイオテクノロジー技術により今後作製されるであろう新規遺伝子組換え食品のアレルゲン性を、より高い精度で評価・予測することが可能となった。

E. 結論

2015年6月から2016年5月までの1年間にNCBI PubMedに収載された論文から、キーワード検索により、エピトープ配列決定に関するものを抽出した。これらの論文についてピアレビューを行い、6報の論文から10種のアレルゲンについて、総数42のエピトープ情報を新たにADFSに追加した。また、AllergenOnlineの登録アレルゲン（アミノ酸配列情報）に関するアップデートをADFSに反映させた。この情報更新により遺伝子組換え食品のアレルゲン性評価・予測方法であるADFSをより充実させることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 28年度ピアレビューによりエピトープ情報を収集した論文

-
1. Mameri H, Brossard C, Gaudin JC, Gohon Y, Paty E, Beaudouin E, Moneret-Vautrin DA, Drouet M, Solé V, Wien F, Lupi R, Larré C, Snégaroff J, Denery-Papini S..
Structural Basis of IgE Binding to α - and γ -Gliadins: Contribution of Disulfide Bonds and Repetitive and Nonrepetitive Domains.
Agric Food Chem. 2015 Jul 29;63(29):6546-54..
PMID:26186140
 2. Bublín M, Kostadinova M, Fuchs JE, Ackerbauer D, Moraes AH, Almeida FC, Lengger N, Hafner C, Ebner C, Radauer C, Liedl KR, Valente AP, Breiteneder H
A Cross-Reactive Human Single-Chain Antibody for Detection of Major Fish Allergens, Parvalbumins, and Identification of a Major IgE-Binding Epitope..
PLoS One. 2015 Nov 18;10(11):e0142625.
PMID:26579717
 3. Saeed H, Gagnon C, Cober E, Gleddie S.
Using patient serum to epitope map soybean glycinins reveals common epitopes shared with many legumes and tree nuts.
Mol Immunol. 2016 Feb;70:125-33..
PMID:26766775
 4. Han Y, Lin J, Bardina L, Grishina GA, Lee C, Seo WH, Sampson HA..
What Characteristics Confer Proteins the Ability to Induce Allergic Responses? IgE Epitope Mapping and Comparison of the Structure of Soybean 2S Albumins and Ara h 2..
Molecules. 2016 May 12;21(5)
PMID:27187334
 5. Zhang Y, Zhu L, Li S, Zhang J, She T, Yan J, Bian Y, Li H
Identification of the major allergenic epitopes of Eriocheir sinensis roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses.
Mol Immunol. 2016 May 18;74:125-132.
PMID:27208437
 6. Chen X, Negi SS, Liao S, Gao V, Braun W, Dreskin SC.
Conformational IgE epitopes of peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6.
Clin Exp Allergy. 2016 May 30.
PMID:27238146
-

Table 2 28年度新たに ADFS に追加したエピトープ情報

	Name	start	end	Sequence	Method	CTYPE	Reference	UniProt acc.No
001	Tri a 21	21	31	VRVPVPLQLP	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	45	52	VQQQQFPG	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	75	84	YLQLQFPQP	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	102	107	QSFPPQQPYPPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
	Tri a 21	239	250	QQQSSQVSFQQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P04725
002	Tri a ?	144	152	PQQPFPQQPQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P08453
	Tri a ?	44	54	LSQQPQQTFFQ	F-ELISA/Pepscan	L	PMID 26186140	P08453
003	Gad m 1				Phage library/NMR	C	PMID 26579717	Q90YK9
004	Gly m 6.0501.	214	222	KQQQHQQQE	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
	Gly m 6.0501.	226	236	GSVLSGFSKHFL	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
	Gly m 6.0501.	313	324	EEEDQPRPDHPP	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	Q7GC77
005	Gly m 6.0201.	121	129	QRPQDRHVK	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	130	141	VHRFREGDLIAV	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	136	153	GDLIAVPTGVAWWMYNN	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	214	225	GSNILSGFAPEF	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	256	261	KGGLRV	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
	Gly m 6.0201.	283	291	QCVETDKGC	peptide array/ 2D western	L	PMID 26766775	P04405
006	Ara h 2	22	30	RQQWELQGD	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	31	39	RRCQSQLER	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	43	51	RPCEQHLMQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	61	69	ERDPYSPSQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	70	78	DPYSPSPYD	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	88	99	QERCCNELNEFE	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	94	105	ELNEFENNQRDM	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	115	123	NQSDRLQGR	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	121	132	QGRQQEQQFKRE	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	130	138	KRELRLNPQ	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
	Ara h 2	139	150	QCGLRAPQRCDL	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2
Ara h 2	145	156	PQRCDLDVESGG	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q6PSU2-2	
007	Gly m ?	39	50	NINPCEHIMEKI	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZNZ4
	Gly m ?	69	80	TMPGRINYIRKK	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZNZ4
	Gly m ?	84	94	EEEEEGHMQKC	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZNZ4
	Gly m ?	99	110	SELKSPICQCKA	peptide microarray	L	PMID 27187334	Q9ZNZ4
008	Gly m 8	31	42	CRKQLQGVLNTP	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8	67	78	ILRTMRGRINYI	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8	102	113	SELRSPKCQCKA	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
	Gly m 8	127	138	EKQKKKMEKELI	peptide microarray	L	PMID 27187334	P19594
009	Eri s ?	181	208	NSEVIQEAYTAQMTQTPSKIHSFTGS	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
	Eri s ?	237	255	FWWDDSHENHHIERKGENF	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
	Eri s ?	360	378	GDVIESSTYSPNPQYYGAL	dotblot assay	L	PMID 27208437	K4EJG5
010	Ara h 2				Phage Display Peptide Library	C	PMID 27238146	Q6PSU2
011	Ara h 6				Phage Display Peptide Library	C	PMID 27238146	Q647G9

注) start, end: エピトープ配列の始点及び終点アミノ酸の番号
Ctype: エピトープのタイプ. L: linear, C: conformational

研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

1. 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. 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. 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。
4. Komoto K., Okamoto S., Hamada M., Obana N., Samori M., and Imamura T. Japanese consumer perceptions of genetically modified food: Findings from an international comparative study. *Interactive Journal of Medical Research*, 2016, vol. 5, iss. 3, e23, p.1-19.
5. Ogawa T., Sasaki T., Okazawa A., Teshima R., Misawa N., Ohta D.: Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. *Japanese J. Food Chem. Safety* 23, 9-19, 2016
6. Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki- Mogami T, Teshima R, Kiyono H. “Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody” .*Regul Toxicol Pharmacol*.76, 128-136 (2016)
7. Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. “Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272” *Food Hyg.Saf.Sci.* 57, 1-6 (2016)
8. Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S,

- Poulsen LK, Privalle L, Ward JM, Doerrner N, Rascle JB. "Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens" *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198–2207 (2016)
9. Mano J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome S., Hayashida S., Kawakami H., Kurimoto Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Takabatake R., Kitta K. "Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR" *Food Chemistry* 226, 149-155 (2017)
10. 高谷幸、山本茂貴、赤羽学、神奈川芳行、鬼武一夫、山口健太郎、池田佳代子、名倉 卓、南谷 怜、一蝶茂人. フードディフェンス 食品防御対策ガイドライン準拠. 今村知明[編] 2016年7月22日.
11. 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.