

遺伝子組換えダイズ・トウモロコシからの
組換え DNA 配列の検知法の開発

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（生物工学）学位論文

松 岡 猛

目次

第 I 章 序論

I - 1	遺伝子組換え技術の概要 -----	1
I - 2	遺伝子組換え技術の安全性 -----	2
I - 3	GM 農作物の商業栽培の現状 -----	3
I - 4	GM 食品等に対する日本の施策と必要とされる検知技術 -	4
	1) GM 食品の表示制度 -----	5
	2) 食品としての安全性審査未了の GM 食品に対する規制 -	6
	3) GM 作物の環境影響とカルタヘナ法 -----	7
	4) 必要とされる検知技術 -----	8
I - 5	遺伝子組換え体の検知技術 -----	9
	1) 導入された組換え DNA 配列から合成されるタンパク質を 検知する方法 -----	9
	2) 新しく導入された DNA 配列を検知する方法 -----	10
I - 6	本研究の目的 -----	11
	図・表 -----	14 ~ 16

第 II 章 ダイズおよびダイズ加工食品からの GM ダイズ 40-3-2 系統の定性検知 技術の開発

II - 1	緒言 -----	17
II - 2	実験方法 -----	18
II - 2 - 1	材料および試薬 -----	18
	1) 材料 -----	18
	2) 試薬 -----	19
	3) 試薬の調製 -----	20

4)	装置	21
II - 2 - 2	方法	21
1)	DNA の抽出方法	21
2)	抽出した DNA の純度の検定法	23
3)	抽出した DNA 量の定量法	23
4)	PCR プライマーの設計	23
5)	PCR 条件	24
6)	シーケンス方法	25
7)	PCR 産物の制限酵素消化の方法	26
8)	アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法	26
II - 3	結果	27
1)	ダイズ種子からの DNA 抽出における CTAB 法と市販キットを用いた方法の比較	27
2)	DNA シーケンスの結果と組換え DNA 配列検知用プライマーの設計	28
3)	ダイズ種子における組換え DNA 配列検知の特異性と感度	28
4)	豆腐からの RRS の検知感度	29
5)	丸大豆納豆, 挽割り納豆とそれらの蒸煮ダイズにおけるダイズ内在性遺伝子 <i>Le1</i> および組換え DNA 配列検知	29
6)	市販豆腐からの RRS の検知	30
II - 4	考察	31
1)	CTAB 法により可能なダイズ種子からの PCR に適した DNA 抽出	31
2)	RRS と P-35S に特異的なプライマーと明らかになった検知感度	31
3)	高度に加工された食品からは困難な RRS の検知	32

4) 開発した RRS 検知技術の実際の検査における実用性	--	33
5) 今後の検知技術の開発において考慮すべき点	-----	33
図・表	-----	35 ~ 48

第Ⅲ章 4 系統の GM トウモロコシ(Bt11, Event176, MON810, T25) の定性

検知技術の開発

Ⅲ-1	緒言	-----	49
Ⅲ-2	実験方法	-----	51
Ⅲ-2-1	材料および試薬	-----	51
	1) 材料	-----	51
	2) 試薬	-----	51
	3) 試薬の調製	-----	52
	4) 装置	-----	52
Ⅲ-2-2	方法	-----	52
	1) DNA の抽出方法	-----	52
	2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法	-----	53
	3) PCR プライマーの設計	-----	53
	4) PCR 条件	-----	53
	5) シークエンス方法	-----	54
	6) PCR 産物の制限酵素消化の方法	-----	54
	7) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法	---	54
Ⅲ-3	結果	-----	55
	1) トウモロコシ種子からの CTAB 法による DNA 抽出の検討		55
	2) DNA シークエンスの解析と各系統に特異的なプライマーの設計	-----	55
	3) 系統特異的プライマーの特異性と検知感度	-----	57

4)	CMV 由来 P-35S 検知用プライマー対の特異性の確認	58
5)	Multiplex PCR 法による Bt11, Event176, MON810 の検知とその検知感度	58
III-4	考察	59
1)	CTAB 法により可能なトウモロコシ種子からの PCR に適した DNA 抽出	59
2)	各 GM トウモロコシ系統に特異的なプライマーと明らかになった検知感度	59
3)	P-35S を検知するスクリーニング法と, Bt11, Event176, MON810 を鑑別する Multiplex PCR 法により可能な GM トウモロコシの簡便な検知	61
4)	今後の検知技術の開発において考慮すべき点	62
図・表		63 ~ 72

第IV章 5 系統の GM トウモロコシ(Bt11, Event176, MON810, T25, GA21) の Multiplex PCR による簡便な鑑別技術の開発

IV-1	緒言	73
IV-2	実験方法	75
IV-2-1	材料および試薬	75
1)	材料	75
2)	試薬	76
3)	試薬の調製	76
4)	装置	77
IV-2-2	方法	77
1)	DNA の抽出方法	77
2)	抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法	77

3) PCR プライマーの設計 -----	78
4) PCR 条件 -----	78
5) シークエンス方法 -----	79
6) PCR 産物の制限酵素消化の方法 -----	79
7) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法 ---	80
IV-3 結果 -----	80
1) DNA 抽出における CTAB 法とシリカスピнкаラム法の比較 -----	80
2) DNA シークエンスの解析および系統特異的プライマーの設計 -----	81
3) 系統特異的プライマー対の個別の評価 -----	82
4) Multiplex PCR の特異性と検知感度 -----	83
IV-4 考察 -----	84
1) シリカスピнкаラム法により可能なトウモロコシ種子からの PCR に適した DNA 抽出 -----	84
2) 5 系統 GM トウモロコシに特異的なプライマーと明らかになった検知感度 -----	84
3) Multiplex PCR による 5 系統 GM トウモロコシの簡便な鑑別技術の開発 -----	86
図・表 -----	87 ~ 96

第V章 GM 作物に導入されている DNA 構造を推定するための DNA セグメントの検知技術の開発

V-1 緒言 -----	97
V-2 実験方法 -----	99
V-2-1 材料および試薬 -----	99
1) 材料 -----	99

2) 試薬	100
3) 試薬の調製	100
4) 装置	101
V-2-2 方法	101
1) DNA の抽出方法	101
2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量 の定量法	101
3) PCR プライマーの設計	101
4) PCR 条件	104
5) シークエンス方法	105
6) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法	105
V-3 結果	105
1) DNA シークエンスの解析と DNA セグメント検知用プライ マーの設計	105
2) DNA セグメント検知用プライマーの特異性	110
3) DNA セグメント検知用プライマーの検知感度	115
V-4 考察	115
1) GM 作物に導入されている組換え DNA 構造が推定可能 な DNA セグメント検知のプロファイル	115
2) 今後の DNA セグメント検知技術の課題	117
図・表	118 ~ 128

第VI章 食品としての安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統の定性

検知技術の開発

VI-1 緒言	129
VI-2 実験方法	131
VI-2-1 材料および試薬	131

1) 材料	-----	131	
2) 試薬	-----	132	
3) 試薬の調製	-----	132	
4) 装置	-----	132	
VI-2-2 方法	-----	132	
1) DNA の抽出方法	-----	132	
2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法	-----	133	
3) PCR プライマーの設計	-----	133	
4) PCR 条件	-----	134	
5) シークエンス方法	-----	134	
6) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法	---	134	
VI-3 結果	-----	135	
1) DNA シークエンスの解析と CBH351 検知用プライマーの設計	-----	135	
2) CBH351 検知用プライマーの特異性と検知感度	-----	135	
VI-4 考察	-----	136	
1) CBH351 系統を高感度に検知する方法の開発	-----	136	
2) 厚生労働省検疫所および地方自治体衛生部局のモニタリングでの利用	-----	137	
図・表	-----	138 ~ 142	
第VII章 結論			
VII-1	遺伝子組換え体の検知技術	-----	143
VII-2	本研究において解決した問題	-----	143
1)	食品としての安全性審査の終了している GM 農作物を対象にした検知技術の開発	-----	143

2)	GM 作物に導入されている DNA 構造の推定法の開発 --	145
3)	食品として安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 システムの検知技術の開発 -----	145
4)	今後の GM 農作物の検知技術開発において考慮する点	146
VII-3	本研究後の検知技術の進展 -----	147
VII-4	GM 検知技術の国際的な検討 -----	148
VII-5	今後の GM 農作物の検知技術 -----	149
図	-----	151 ~ 152
参考文献	-----	153 ~ 163
謝辞	-----	165 ~ 166
和文摘要	-----	167 ~ 168
英文摘要	-----	169 ~ 173

第 I 章 序論

I - 1 遺伝子組換え技術の概要

遺伝子組換え技術は、1973 年米国の S. N. Cohen と H. W. Boyer により大腸菌の形質転換¹⁾が成功して以来急速に進展し、現在までに多種多様な遺伝子組換え生物が育成されている。この技術は植物育種にも利用され、細胞融合技術とともにニューバイオテクノロジーといわれている。オールドバイオテクノロジーに分類される胚培養、蒴培養・花粉培養、プロトプラスト培養および細胞選抜・ソマクローナル変異選抜とともに重要な技術となっている²⁾。高等植物への DNA の導入技術としては、主として(1) アグロバクテリウム法、(2) プロトプラスト法、(3) パーティクルガン法があり、これらの方法により農作物の細胞の核内に有用遺伝子が導入される³⁾。

(1) アグロバクテリウム法

Rhizobium radiobacter (*Agrobacterium tumefaciens*)は土壤中にいる細菌で、これに感染した植物は根元に腫瘍であるこぶ状の塊(クラウンゴール)や無数の根などが生じ、*A. tumefaciens* の生存に必要なアミノ酸であるオパインを作る。このとき、*A. tumefaciens* の持つ T-DNA 領域が切り離され、植物ゲノムのなかに組み込まれるという現象が起こっている。この T-DNA 領域にある腫瘍などを形成させる遺伝子を除去後、目的とした遺伝子を導入して植物に感染させ、形質転換が行われる方法である。当初は双子葉植物のみに適用可能であったが、最近では主要穀物であるイネ・トウモロコシ・コムギといった単子葉植物においても可能になっている。

(2) プロトプラスト法

植物体の細胞壁を溶解させ遺伝子を入れやすいように細胞をバラバラにしたプロトプラストとした後、有用遺伝子を電気パルス・薬剤処理等を用いて植物細胞に導入し植物体に再生させることで組換え体を作成する方法である。

(3) パーティクルガン法

金やタンゲステンなどの微粒子に有用遺伝子を組み込んだ DNA を付着させ、高圧ガスや火薬などを使って植物細胞に打ち込むことによって遺伝子を細胞に導入する方法である。

このように外部から有用遺伝子を導入することにより、これまで 10 年以上もかかっていた植物の品種改良が、半分以下の期間で確実にできるようになった。

I - 2 遺伝子組換え技術の安全性

遺伝子組換え技術に対する安全性に関する懸念は、既にこの技術の開発・研究当初から研究者によって出され、安全性に関する議論が始まった⁴⁻⁵⁾。懸念は、遺伝子組換え技術の利用によって予想もつかない危険な性質を示す生物が生まれるのではないかというものであり、1974 年には米国スタンフォード大の P. Berg らにより組換え DNA 研究の一時中止が呼びかけられた。これに応えるため、1975 年には、米国カリフォルニアにあるアシロマで遺伝子操作をめぐる規則問題に関する会議が開かれ、米国、英国、日本を含む世界の主要な研究者等が集まり、遺伝子操作の潜在的な危険性について論議された。この会議において、生物学的大体物理的に封じ込めて実験を行うことが合意され、翌年には米国立衛生研究所(National Institute of Health; NIH)⁶⁾が、組換え DNA 実験を危険度により分類し、想定されるリスクに応じた封じ込めを規定した実験指針を制定した。その後、1976 ~ 1979 年にかけて先進諸国で NIH 指針にならった同様の自主管理型指針が策定された。NIH の指針は、組換え DNA 実験の科学的知見が十分でなかった時のものであるため慎重なものであったが、知見の蓄積とともに順次緩和された。一方で、組換え DNA 技術の進展に伴い、組換え体を産業利用するための国際的な規制の検討が、経済協力開発機構(OECD)⁷⁾を中心に開始され、重要な勧告がなされた。その後、食品としての安全性評価は、食糧農業機構(FAO)⁸⁾と世界保健機構(WHO)⁹⁾による専門家会合での検討を通して、CODEX 委員会¹⁰⁾の特別会合による国際規格の策定に進み、環境安全性については、生物多様性条約の下で検討が進んだ。国際的に広く用いられている主な

概念は、(1) 実質的同等性(Substantial Equivalence)、(2) ファミリアリティの原則(The Principle of Familiarity)である。

(1) 実質的同等性¹¹⁾

組換え体の食品としての安全性を評価する場合、食品あるいは食品の原料として用いられている既存の生物を比較の基準として使用できるという考え方である。導入された遺伝子の特性がよく分かっていて、元の食品と実質的に同程度に無害であるという科学的な確信が持てる場合には、その組換え体の安全性については、元の食品と同等と考えられる。

(2) ファミリアリティの原則¹²⁾

組換え体の環境に対する安全性評価を行う上で、元の作物や導入される遺伝子についての既往の科学的情報やこれまでの育種に関する情報等、作物に対する過去の経験に関する十分な情報(ファミリアリティ)に応じて、適切な安全確保を図るという考え方である。

これらの概念において、重要な点は、プロセスではなくプロダクトによる評価であり、遺伝子組換え技術が使われたかで判断するのではなく、作られた組換え体の性質により判断することである。そして、これらに基づく安全性評価が各国の政府によって実施されている。以上のように、遺伝子組換え技術の安全性は、当初から慎重なアプローチがなされ、安全性を巡る議論は、技術自体の安全性から組換え体の食品としての安全性評価や環境に対する安全性評価と多岐にわたるようになり、現在も続けられている。

I - 3 GM 農作物の商業栽培の現状

遺伝子組換え技術を利用した (Genetically Modified; GM) 農作物の食品としての商品化は、米カルジーン社が開発した日持ち延長の形質を導入したトマト「Flavr SavrTM」が 1994 年に FDA の承認を得て市場に初めて出荷されて以降行われ、その後 1996 年からダイズ、トウモロコシ、ワタ、ナタネ等の GM 農作物の商業栽培が、本

格的に行われるようになった。2004年における世界のGM農作物の栽培面積は、米国、アルゼンチン、カナダ等17カ国で、8,100万haとなっている。これは、1996年の170万haに比べ47倍以上の伸びである¹³⁾。これらのGM農作物の栽培、流通、加工利用については、各国がその安全性を審査し、従来品種と同様に利用することを判断したものである。2005年12月15日現在、日本において食品としての安全性審査が終了したGM農作物は、73件(Table I-1)となっており¹⁴⁾、食品としての商品化が可能となっている。この73件は、57系統のGM農作物と、16種のGM系統同士の掛け合わせ交配種からなっている。ここでいう「系統」とは、最初に遺伝子組換え体として作出された際に付けられる個体番号である。先に示した高等植物へのDNAの導入法において、いずれの方法を用いても、DNAが導入される宿主植物のゲノム上での位置はランダムに決定される。そのため、同じ組換え遺伝子を同じ植物培養組織に導入しても、染色体のどの部位に何カ所挿入されるか(コピー数)は特定できないため、多くの組換え体(クローン)が分離取得される。特性評価、安全性評価は、その個体(系統)毎に増殖・実施される。そして、安全性が確認されたGM農作物は、一般に系統名(Event176, Bt11, MON810等)または商品名で呼ばれている。一度安全性が確認された系統の後代は、改めて安全性確認の必要はなく、開発者は様々な気候で栽培するため、この系統を片親として従来品種との交雑を行って実際に栽培する品種を育成し商品化している。これにより一系統のGM農作物から多数の品種が開発されることとなり、現実には、GMダイズ40-3-2系統(商品名: Roundup Ready Soy; RRS)には、米国内で1,000品種以上の種子が販売され、広く栽培されている。

I-4 GM食品等に対する日本の施策と必要とされる検知技術

我が国では、GMO (Genetically Modified Organism) の利用に際して、事前に環境に対する安全性評価や、食品または飼料としての安全性の確認など、利用目的や利用形態によって様々な制度・法律が定められ、規制が行われている。

1) GM 食品の表示制度^{15, 16)}

米国, カナダ, オーストラリア等において GM 農作物の商業栽培が進み, また, 日本は, ダイズ, トウモロコシ等をこれらの国々からの輸入に依存しているため, すでに 1996 年頃から我が国において安全性審査の終了した GM 農作物も食品として利用されている. しかし, 消費者は, 偏ったイメージ先行の情報が原因と思われる遺伝子組換え技術の実用化に対する不安を示し, GM 食品の安全性の厳密な確認や選択できる表示などを求め, 百万人を超える署名や 1,000 件を超える日本の地方議会からの意見書の議決が, 農林水産省, 厚生労働省に寄せられ, 政治的な問題となった. そのため 1997 年から 1999 年にかけて, 農林水産省は, 消費者, 生産・流通関係者, 学識経験者からなる「食品表示問題懇談会」を開催し, 遺伝子組換え食品のあり方が検討された. その報告をふまえ, 社会的混乱を解決する一つ的手段として, 安全性審査の終了した GM 農作物とそれを原料にした食品(GM 食品)に対する表示制度が, 「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律(JAS 法)」の下で, 消費者の商品選択に資するために 2001 年 4 月から実施されることとなった¹⁷⁾. 当初, 「既存の食品以上のリスクはないものと判断されたもののみが流通を許可されることから, GM 食品であることを表示することは食品安全性の観点からは不要である」とした厚生労働省においても, 「食品衛生法」の下で同じ内容の表示制度が, 安全性に関わる情報提供として 2001 年 4 月から実施されることとなった^{18, 19)}. 表示は, 遺伝子組換え体を使用しているもの, 使用していないもの, 使用/不使用の有無を確認していない不分別のもの 3 種類に分類し, 使用と不分別については義務表示, 不使用については任意となっている. 義務表示の対象食品は, 安全性が確認されたダイズ, トウモロコシ, ジャガイモ, ナタネ, ワタ, アルファルファの GM 農作物 6 種とダイズ, トウモロコシ, ジャガイモ, アルファルファの加工食品 31 品目が指定されている(Table I-2). 安全性が確認された GM テンサイについては, テンサイ自体が植物防疫上の理由から輸入されないことと, GM テンサイの加工食品の流通実体がないため, 義務表示対象外になっている. 指定食品の判断基準は, 組換え体由来の DNA やタンパク質が食品中から検知できるかにあるため, 植物油や醤油, 糖類などは義務表示の

対象外となっている。また、高オレイン酸ダイズといった栄養素や用途などを変更した GM 食品については、表示義務の対象となっている。GM 食品の表示制度の概要が明らかになると、消費者の関心の高さから小売業者が組換え体を原料とする食品の販売に消極的になり、その結果、国内の食品企業の多くは、非組換え(non-GM)原料の調達を行っている。non-GM であることの検証は、分別生産流通管理(IP ハンドリング; Identity Preserved Handling)により行われる。IP ハンドリングとは、生産、流通、加工の各段階において GM と non-GM を分けて管理し、それを書類によって証明することである。しかし、IP ハンドリングを行っても、non-GM への GM の意図せざる混入は避けられない。米国の農家は、一軒で一作物を百ヘクタール規模で栽培しているが、使用する品種はリスク分散のために複数採用している。商品化が認可された GM 系統由来の後代品種の種子は、安全性評価が終了し、他の品種と同様のルートで販売されているので、畑では多くの場合、GM 品種と non-GM 品種が混在して栽培されている。ダイズ、トウモロコシといった穀物は品種ごとではなく、食用油、飼料等の目的別に流通されるため、IP ハンドリングを行わない場合は、農作物は既に収穫段階から GM と non-GM が混在している。IP ハンドリングを行う場合、non-GM 品種のみを流通するシステムを新しく構築することはコスト的に困難であるため、IP ハンドリングを行わない場合と同じ設備を掃除して使用することになる。しかし、いくら掃除をしても絶対に GM が混ざらないようにすることは困難である。そのため農林水産省、厚生労働省では、IP ハンドリングを行った non-GM 農作物への GM 農産物の非意図的な混入許容値を、ダイズおよびトウモロコシについては、最大 5 %としている^{19, 20)}。IP ハンドリングを行えば、科学的な検証は必要とされていないが、行政は、偽装表示の横行を防止し、適切な表示を監視するための検知技術を必要とし、また食品企業においても品質保証のために、検知技術の開発が求められた。

2) 食品としての安全性審査未了の GM 食品に対する規制

GM 食品の食品としての安全性の確保については、1991 年より旧厚生省(現 厚生労働省)が、法律に基づかない任意の仕組みである「安全性評価指針」により個別

に行っていた。しかし、GM 食品の開発や実用化が、国際的に急速に広がっており、また今後さらに新しい食品の開発が進むことも予想されるため、2001 年 4 月から食品衛生法において安全性審査が義務化された。これにより、Table I -1 に示す安全性審査が終了し食品用として商品化が可能な 73 件の GM 農作物以外の GM 農作物を由来とする GM 食品が、日本国内で流通することのないように輸入、販売などが法的に禁止されることとなった^{21, 22)}。そのため海外において安全性審査が終了し栽培されていても、日本で審査中の GM 農作物を含む食品が市場に出回らないようにするための検査法が必要とされた。

3) GM 作物の環境影響とカルタヘナ法

GM 作物の環境影響も、社会、消費者にとって関心の高い事項となっている。GM 作物を栽培することによる環境への影響は、1989 年より任意のシステムである農林水産省の定めるガイドライン「農林水産分野等における組換え体利用のための指針²³⁾」に基づいて、農林水産省が評価を実施してきた。一方で、GM 農作物を含む遺伝子組換え生物と分類学上の科を超えた細胞融合により作出される生物であるモダンバイオテクノロジーを用いて改変された生物(Living Modified Organism; LMO)の利用が、生物多様性への保全とその持続可能な利用に及ぼす悪影響を防止するため、LMO に関する国際的枠組みとして「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書^{24, 25)}」が、2000 年に生物多様性条約の臨時締約国会議において採択された。日本は、2003 年 11 月に加盟し、その国内法である「遺伝子組換え生物等の使用等による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)²⁶⁾」が 2004 年 2 月から施行されている。これにより、GM 作物を栽培することによる環境への影響評価は、農林水産省・環境省で審査されることが義務化され、「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」は廃止された。カルタヘナ法には、次の(1)から(3)が規定されている^{25, 27)}。

- (1) 主務大臣(環境大臣、財務大臣、文部科学大臣、厚生労働大臣、農林水産大臣、経済産業大臣)が、GM 生物等の使用等による生物多様性影響を防止

するための施策の実施に関する基本的な事項等を定め、公表すること。

- (2) GM 生物等の使用等に先立ち使用形態に応じた措置を実施すること。これには、栽培や輸入・流通等、環境中への拡散を防止しないで行う使用等である第一種使用等と、施設・設備内での使用等、環境中への拡散を防止しつつ行う使用等である第二種使用等がある。第一種使用等では、新規の組み換えた生物等を使用する者は、事前に第一種使用規定(その遺伝子組換え農作物の種類やその使用方法等を記載したもの)を定め、生物多様性影響評価書を添付し、主務大臣の承認を受けること。第二種使用等では、拡散防止措置が主務省令で定められている場合は当該措置をとり、定められていない場合は、あらかじめ主務大臣の確認を受け、その指示に基づく拡散防止措置をとること。
- (3) 未承認の GM 生物等の輸入の有無を検査するための仕組み、輸出の際の相手国への情報提供、科学的知見の充実のための措置、国民の意見の聴取、違反者への措置命令、罰則等所用の規定の整備をすること。

本法により、海外において環境への安全性が確認され栽培が行われている GM 農作物についても、我が国での自然環境下で生育した場合の生物多様性影響が明らかでない場合には、我が国で隔離ほ場試験等を行い、生物多様性影響評価に必要なデータを収集することが必要とされている。これにより、食品目的で輸入された種子が運搬中にこぼれ落ちて発芽したような場合であっても、生物多様性影響が明らかでない場合には、監視が必要とされることとなり、導入されている DNA 構造が未知の場合であっても GM 作物の有無を検査するための検知技術が必要となる。

4) 必要とされる検知技術

以上のように、食品としての安全性審査の終了した GM 食品に対しては、GM の表示制度を施行し、食品としての安全性審査未了のものに対しては、その輸入や流通の禁止を行い、環境に対して悪影響を及ぼす可能性のある GM 作物に対しては、環境への拡散を防止している。これらの施策は、遺伝子組換え技術の実用化に対する不安・懸念を払拭し、社会的受容を進めることにある。これらの施策が適切・的確に

行われることの検証には、IP ハンドリングといった書類、また資料や記録類を一つ一つ検証していく方法(社会的検証法という)と科学的な検証法がある。遺伝子組換え体の検知技術の開発は、科学的な検証を可能とするものである。

I-5 遺伝子組換え体の検知技術

遺伝子組換え体の検知は、新しく導入された組換え DNA 配列を検知する方法と、それから合成されたタンパク質を検知する方法があり、それらが検知されると、試料中に組換え体を含むと判断される。

1) 導入された組換え DNA 配列から合成されるタンパク質を検知する方法

タンパク質の検知法としては、対象となるタンパク質に特異的に反応する抗体を用いる (1) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)法, (2) Western blotting 法, (3) ラテラルフロー(イムノクロマト)法がある。

(1) ELISA 法は、抗原抗体反応と酵素基質反応を利用した検知法である。組換え体の検知にはサンドイッチ式 ELISA 法が利用されており、これは測定対象のタンパク質と反応する抗体が固定されているプレートにタンパク質を反応後、タンパク質と特異的に反応し、かつペルオキシダーゼなどの酵素を化学的に結合させた二次抗体で定量的に検知する方法である。

(2) Western blotting 法は、SDS 電気泳動や等電点電気泳動、二次元電気泳動後のゲルからタンパク質を電氣的にメンブランに移動・固定化後、目的タンパク質に対する抗体と反応させて検知する方法である。

(3) ラテラルフロー法は、抗体を含ませた試験紙に作物の抽出液をつけて定性的に検知する方法である。

ラテラルフロー法は簡便な操作であるので、原料ダイズ・トウモロコシと一部のダイズ加工食品からの組換え体の定性的検知に既に使用されている。ELISA 法についても、原料ダイズ・トウモロコシと一部のダイズ加工食品からの組換え体の定性・定量的

検知に使用されている。しかしながら、検知対象のタンパク質自体が高温、酸等により変質して高次構造が変化すると、抗体との特異性がなくなるため、多くの加工食品において組換え遺伝子由来のタンパク質を検知することができなくなると考えられる。また、同じタンパク質を発現する害虫抵抗性トウモロコシなどでは、組換え系統によりタンパク質の発現量が異なるうえ、可食部においては組換え遺伝子由来のタンパク質の発現が抑えられている系統も開発されている。

2) 新しく導入された DNA 配列を検知する方法

新しく導入された DNA 配列を検知する方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction; PCR)法を利用するのが一般的である。DNA は比較的熱に安定であるため、組換えタンパクを検知するよりも適応範囲が広いと考えられ、世界的に DNA を用いた分析法が主流となっている。導入 DNA 配列の検知部位による PCR 法の特異性の違いは、近年、Holst-Jensen らによりまとめられ²⁸⁻³⁰⁾、(1) スクリーニング検知法、(2) 構造遺伝子検知法、(3) コンストラクト(遺伝子構成)特異的検知法、(4) 系統特異的検知法、の 4 つに分類されている。

(1) スクリーニング検知法は、cauliflower mosaic virus 35S プロモーター(P-35S)

のような多くの GMO に導入されているプロモーター、ターミネーター領域を標的とした PCR による検知である。広範な GMO を一度に検知でき、汎用に優れる。

(2) 構造遺伝子検知法は、GMO に導入された構造遺伝子を標的とした PCR に

よる検知である。構造遺伝子は GM 作物中でのタンパク質発現量を向上させるために、供与生物が本来もつ DNA 配列を改変している場合がある。そのため、適当な領域を標的とすることで供与生物と GM 作物の区別が期待でき、また、標的とした構造遺伝子をもつ GMO をスクリーニング的に検知することが可能となる。

(3) コンストラクト特異的検知法は、宿主植物に導入された発現カセットのうち、プ

ライマー、エンハンサー、構造遺伝子、ターミネーター領域等が連結している部

分を標的とした PCR 法である。そのため標的としたコンストラクトが、複数の系統の GMO に導入されていなければ、対象とした系統のみを検知することが可能となる。

- (4) 系統特異的検知法は、宿主植物のゲノム DNA と発現カセットとの境界領域を標的とした PCR 法である。先に述べたように高等植物への DNA の導入技術において、発現カセットが導入される宿主植物のゲノム上での位置は、ランダムに決定される。そのため、ゲノムサイズを考慮したとき宿主植物のゲノム DNA と発現カセットとの境界領域は GMO の系統に特異的であるため、この領域を標的とした場合、対象とした系統の GMO のみを検知することが可能である。系統特異的検知法について、宿主植物のゲノム DNA と発現カセットとの境界領域の DNA 情報については、安全性審査に諮られる際に必要とされていないため、この領域を標的とした検知技術を開発するためには、独自に解析を行う必要がある。

I - 6 本研究の目的

本研究では、PCR による GM 農作物の検知技術の開発を行った。これまでに記述した消費者の遺伝子組換え技術の実用化に対する不安・懸念・要望と、行政の GM 食品等に関する施策および必要とされる GMO 検知技術の関係を Fig. I - 1 に示す。消費者の遺伝子組換え技術の実用化に対する不安等が、行政に届けられ、行政は GMO の実用化に理解を促すための施策を行っている。GM 食品の選択できる表示の要望には、JAS 法および食品衛生法により、食品としての安全性審査の終了した GM 食品に対する表示制度が施行されている。GM 食品の安全性に対する不安には、食品衛生法により、食品としての安全性の確認と審査未了の GM 食品に対する流通等の禁止が行われている。環境影響に対する懸念には、生物多様性に悪影響を及ぼす可能性のある GM 作物の環境への拡散防止が策定されている。これらの施策に対して、食品としての安全性審査の終了した GM 食品に対する表示

制度に対しては、IP ハンドリングが適切に行われていることを確認するため、農産物および食品からの GMO 定量技術の開発が必要とされる。また、未承認 GM 食品に対する流通等の禁止については、GMO の高感度定性技術の開発が必要とされ、カルタヘナ法に対しては、導入 DNA 構造の推定法の開発が必要とされる。本研究において、第 II 章から第 IV 章では、食品としての安全性審査が終了している GM 農作物について検討を行い、農産物・食品からの GM ダイズ・GM トウモロコシの定性検知技術の開発を行うことを目標とした。第 II 章では、GM ダイズ 40-3-2 系統(商品名: Roundup Ready Soy®, RRS)を検知対象にした。RRS は、GM 農作物の中で最も広く栽培されており、また多くのダイズ加工食品が GM 表示対象品目となっている。特に、我が国にはダイズを原料とする加工食品が多いことから、RRS の検知技術開発は、行政・食品企業からの要請の高いものであった。それ故、ダイズ種子およびダイズ加工食品からの RRS の検知技術の開発を目的とした。第 III 章では、食品としての安全性審査が終了している GM トウモロコシ 4 系統(Syngenta Seeds 社が開発した Bt11 系統および Event176 系統, Monsanto 社が開発した MON810 系統, Bayer CropScience 社が開発した T25 系統)を対象とした。GM トウモロコシは、世界では GM ダイズに次いで広く栽培されており、2005 年のアメリカ合衆国においては、全トウモロコシ栽培面積の約 52 %が GM 品種となっている³¹⁾。国内で消費するトウモロコシの大部分をアメリカ合衆国からの輸入に頼っている我が国において、GM トウモロコシの検知技術の開発の要望は、行政・食品企業にとってダイズに次いで高く、多くの加工食品が GM 表示の対象品目となっている。それ故、GM トウモロコシを検知する技術の開発を行うことを目的とした。さらに、GM トウモロコシの簡便な検知をめざし、スクリーニング法と 1 本のチューブで 3 系統の組換えトウモロコシ(Bt11, Event176, MON810)を判別する Multiplex PCR 法の検討を行った。加えて第 IV 章では、新しく食品としての安全性審査が終了した GM トウモロコシ GA21 系統を対象に加え、第 III 章で検知を行った 4 系統の GM トウモロコシとともに、Multiplex PCR 法を用いた 5 系統 GM トウモロコシの簡便な検知・鑑別法の開発を目的とした。GM トウモロコシの定量は、各 GM トウモロコシ系統の定量値を合算することにより算出され

る。そのため、GM トウモロコシ系統の検知・鑑別技術は必要であり、簡便化を検討した。第V章では、カルタヘナ法に対応するための検討を行った。GM ダイズ・トウモロコシに導入されている組換え DNA の部品(プロモーター、構造遺伝子、ターミネーター領域等、以下「DNA セグメント」という)が多くの組換え体の形質転換に使用されている点に注目し、DNA セグメントを検知することにより、導入 DNA 構造の推定を可能にする技術開発を目的とした。第VI章では、食品としての安全性審査が未了のGM 農作物について検討を行った。安全性審査未了のGM トウモロコシ CBH351 系統(商品名:スターリンクTM)の流通が危惧されたため、この定性検知法の開発を行うことを目的とした。

Table I-1 我が国で食品用として商品化が可能な GM 農作物の現状¹⁴⁾ 2005. 12.15.現在

GM 農作物の種類計 73 件	開発者・申請者等(国)	他の商品化可能な国
除草剤の影響を受けないダイズ (1 種)	Monsanto (USA)	米国, EU 等
除草剤の影響を受けないダイズ (2 種)	Bayer CropScience (ドイツ)	米国, カナダ等
オレイン酸高生産ダイズ (1 種)	Dupont (USA)	米国, カナダ
除草剤の影響を受けないトウモロコシ(5 種)	Bayer CropScience (ドイツ)	米国, カナダ,
害虫(ガの仲間又は甲虫類のいずれか一方, またはその両方)に強いトウモロコシ(4 種) ^{a)}	Monsanto (USA)	EU (一部) 等
害虫(ガの仲間又は甲虫類のいずれか一方, またはその両方)に強いトウモロコシ(4 種) ^{a)}	Syngenta Seeds AG (スイス)	米国, カナダ,
害虫(ガの仲間又は甲虫類のいずれか一方, またはその両方)に強いトウモロコシ(4 種) ^{a)}	Monsanto (USA)	EU (一部) 等
害虫(ガの仲間又は甲虫類のいずれか一方, またはその両方)に強いトウモロコシ(16 種) ^{b)}	Syngenta Seeds AG (スイス)	米国, カナダ等
	Monsanto (USA)	
	Dow AgroSciences LLC (USA)	
	Optimum Quality Grains LLC (USA)	
	Dupont (USA)	
害虫(甲虫類)に強いジャガイモ (2 種)	Monsanto (USA)	米国, カナダ等
害虫(甲虫類)に強いトウモロコシに強いジャガイモ (6 種)	Monsanto (USA)	米国, カナダ等
除草剤の影響を受けないテンサイ (3 種)	Bayer CropScience (ドイツ)	米国, EU (一部)等
除草剤の影響を受けないナタネ (13 種)	Monsanto (USA)	米国, カナダ等
	Bayer CropScience (ドイツ)	
除草剤の影響を受けない雄性不稔ナタネ (1 種)	Bayer CropScience (ドイツ)	カナダ, 米国, EU 等
除草剤の影響を受けない稔性回復ナタネ (1 種)	Bayer CropScience (ドイツ)	カナダ, 米国, EU 等
除草剤の影響を受けないワタ (6 種)	Monsanto (USA)	米国, オーストラリア等
	Stoneville Pedigreed Seed (USA)	
	Bayer CropScience (ドイツ)	
害虫(ガの仲間)に強いワタ (3 種)	Monsanto (USA)	米国, オーストラリア等
害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないワタ (6 種) ^{c)}	Dow AgroSciences LLC (USA)	米国等
	Monsanto (USA)	米国, オーストラリア等
除草剤の影響を受けないアルファルファ (3 種) ^{d)}	Monsanto (USA)	米国, カナダ

- a) 1 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと害虫(甲虫類)に強いトウモロコシの交配種
- b) 3 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(甲虫類)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(甲虫類)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシと害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシと害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと害虫(甲虫類)に強いトウモロコシおよび除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと害虫(甲虫類)に強いトウモロコシおよび除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(甲虫類)に強いトウモロコシおよび除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(甲虫類)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(甲虫類)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(甲虫類)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種, 1 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種
- c) 4 種は既に安全性審査済みの害虫(ガの仲間)に強いワタと除草剤の影響を受けないワタの交配種
- d) 1 種は既に安全性審査済みの除草剤の影響を受けないアルファルファの交配種

Table I-2 GM 食品の表示内容と実施方法¹⁷⁾

食品の分類	品 目	表示方法 (ダイズの例)
<p>従来のもとの組成、栄養、用途等が同等である遺伝子組換え農産物が存在する作目(大豆、トウモロコシ、ジャガイモ、菜種、綿実)に係る農産物およびこれを原材料とする加工食品であって、加工工程後も組み換えられた DNA 又はこれによって生じたタンパク質が存在するもの</p>	<p><指定加工食品> (1) 豆腐類及び油揚げ類 (2) 凍豆腐、おから及びゆば (3) 納豆 (4) 豆乳類 (5) みそ (6) 大豆煮豆 (7) 大豆缶詰及び大豆瓶詰 (8) きな粉 (9) 大豆いり豆 (10) (1)から(9)までに掲げるものを主な原材料とするもの (11) 大豆(調理用)を主な原材料とするもの (12) 大豆粉を主な原材料とするもの (13) 大豆たんぱくを主な原材料とするもの (14) 枝豆を主な原材料とするもの (15) 大豆もやしを主な原材料とするもの (16) コーンスナック菓子 (17) コーンスターチ (18) ポップコーン (19) 冷凍とうもろこし (20) とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰 (21) コーンフラワーを主な原材料とするもの (22) コーングリッツを主な原材料とするもの(コーンフレークを除く.) (23) とうもろこし(調理用)を主な原材料とするもの (24) (16)から(20)までに掲げるものを主な原材料とするもの (25) ポテトスナック菓子 (26) 乾燥ばれいしょ (27) 冷凍ばれいしょ (28) ばれいしょでん粉 (29) (25)から(28)までに掲げるものを主な原材料とするもの (30) ばれいしょ(調理用)を主な原材料とするもの (31) アルファルファを主な原材料とするもの</p>	<p>・遺伝子組換え農産物を原材料とする場合 →「大豆(遺伝子組換え)」,「大豆(遺伝子組換えのものを分別)」等の<u>義務表示</u></p> <p>・遺伝子組換えが不分別の農産物を原材料とする場合 →「大豆(遺伝子組換え不分別)」等の<u>義務表示</u></p> <p>・生産・流通段階を通じて分別された非組換え農産物を原材料とする場合 →「大豆(遺伝子組換えでない)」,「大豆(遺伝子組換えでないものを分別)」等の<u>任意表示又は表示不要</u></p>
<p>組換え DNA 技術を用いて生産されたことにより組成、栄養素価等が通常の農産物と著しく異なる農産物</p>	<p>高オレイン酸生産大豆を主な原材料とする食品(脱脂されたものをのぞく)</p>	

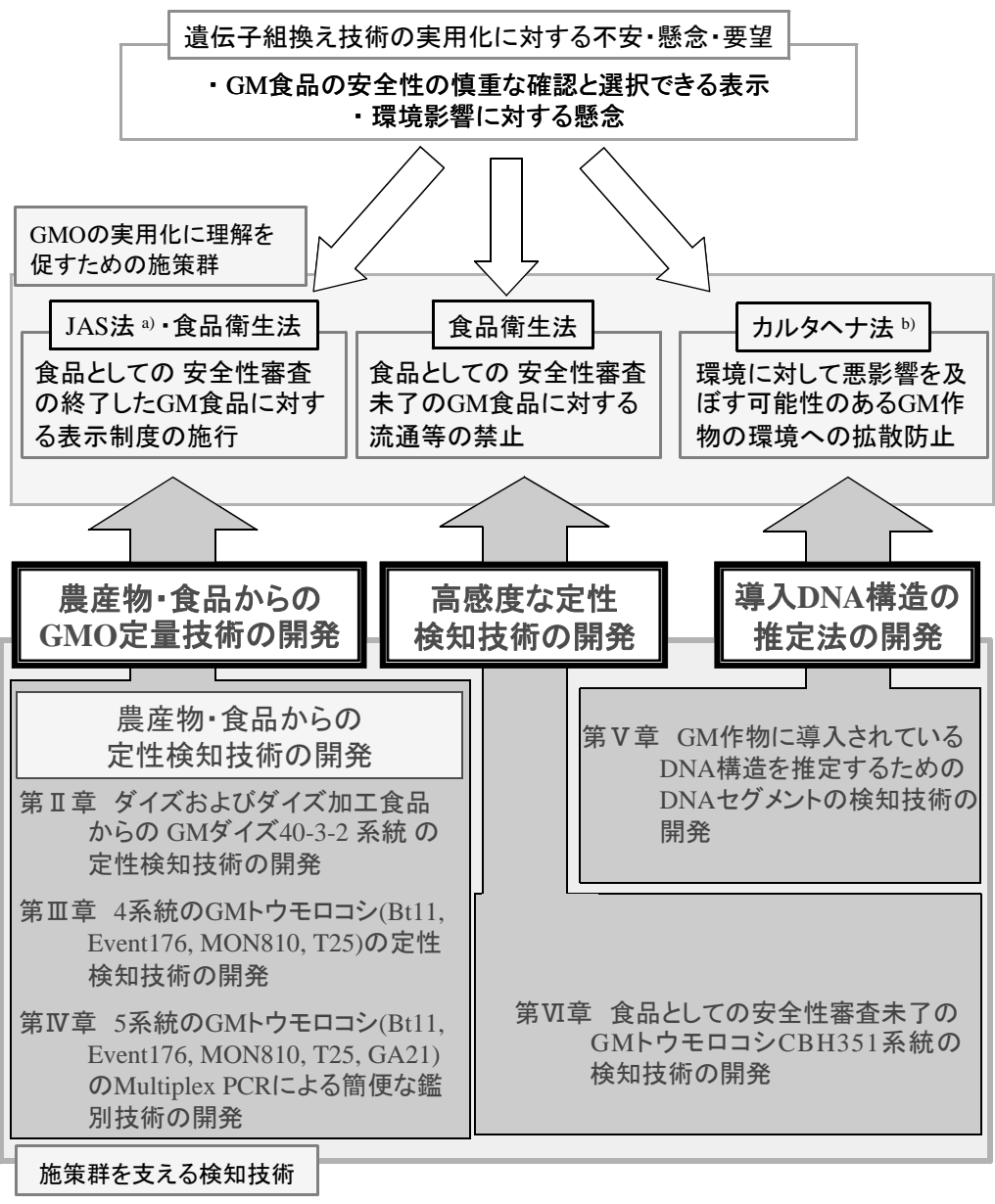


Fig. I -1 遺伝子組換え技術の実用化に対する消費者の不安・懸念・要望と、行政のGM食品等に関する施策、および必要とされるGMO検知技術の関係

a) 農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律

b) 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

第Ⅱ章 ダイズおよびダイズ加工食品からの GM ダイズ 40-3-2 系統の定性検知技術の開発³²⁾

Ⅱ-1 緒言

現在、我が国において食品としての安全性が確認されている GM ダイズは 4 系統あるが、除草剤 glyphosate 耐性ダイズ 40-3-2 系統(商品名: Roundup Ready Soy, RRS)の 1 系統が最も広く流通している。除草剤 glyphosate は選択性の低い農薬であり、植物の芳香族アミノ酸合成経路であるシキミ酸経路に関与する酵素の一つ、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)と特異的に結合することで活性を阻害する。これにより植物は、芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯死する。RRS には、反応速度論的に glyphosate から阻害を受けない *Agrobacterium* sp. CP4 由来の *cp4-epsps* 遺伝子が導入されている。そのため glyphosate により不活化されるダイズの EPSPS の代わりに CP4 EPSPS が働き、芳香族アミノ酸が合成され生育が可能となる³³⁾。RRS は、生産者にとって雑草の管理が容易であり、商業栽培されている GM 農作物のなかでも代表的なものの一つとなっている。食品としての安全性審査については、アメリカ合衆国、EU、日本、韓国、アルゼンチン、ブラジル等多くの国で終了し、日本にも輸入されている。

RRS の検知技術は、早くから検討されており、本章での研究を開始するまでにダイズの種子³³⁾、葉³⁴⁾を対象とした組換え DNA 配列の検知法が報告されていた。しかしながら、ダイズを原料とした加工食品が多い我が国において、より幅広い食品を対象とした検知技術の開発が必要であった。

本章は、まずダイズ種子から PCR に適した DNA の抽出法の検討を行った。その後、ダイズから RRS を検知する PCR プライマーおよび PCR 条件を検討し、プライマーの特異性および検知感度を調べた。さらに、ダイズの加工食品として豆腐および納豆について検知に及ぼす加工工程の影響を調べることにした。

II-2 実験方法

II-2-1 材料および試薬

1) 材料

ダイズ(*Glycine max*): 次の 2 品種の乾燥種子を米国より直接入手し, 使用まで-20℃で保存した.

- ・モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 40-3-2 系統ダイズ Roundup Ready Soy (RRS) Variety63639-58RR Stein3264
- ・非組換えダイズ品種(non-GM ダイズ) オハイオ州の非組換え品種保証書付き

豆腐: RRS, non-GM ダイズ, および non-GM ダイズに RRS を 0, 0.01, 0.1, 0.5, 5 % (w/w)含むよう混合したダイズより作製した. 作製法を次に示すとともに, Fig. II-1 に示す. ダイズ 25 g を, 4℃で 17 時間水に浸漬した. 水 50 mL を加え, 家庭用ミキサー(三洋電気(株)製 SM-KM30)で 30 秒間粉碎し, 500 mL 容ビーカーに入れた. ミキサーに残ったダイズは, 100 mL の水で洗浄し, 先のダイズ粉碎液の入ったビーカーに加えた. これを, 95℃で 5 分加熱した後, 粉碎液をテトロン®PO-20 (東レ社製)で圧搾ろ過した. ろ液を豆乳濃度計(アタゴ社製 SM-20E)でダイズ固形分 10 %になるように水を加えた後, 10℃以下に冷却した. 得られた豆乳 100 mL につき 0.15 g/mL 硫酸カルシウム懸濁水溶液を 2 mL 加え, スターラーで 15 分間攪拌した. 80℃の水浴上で 40 分間保温し, 凝固した豆腐を冷水にさらした. 作製後, DNA を抽出するまで, -20℃で保存した.

丸大豆納豆, 丸大豆用蒸煮ダイズ, 挽割り納豆, 挽割り納豆用蒸煮ダイズ: タカノフーズ(株)において作製した. 作製法を次に示すとともに, Fig. II-2 に示す. 丸大豆納豆および丸大豆用蒸煮ダイズは, RRS, non-GM ダイズを使用し, 挽割り納豆および挽割り納豆用蒸煮ダイズは, non-GM ダイズを使用した. 丸大豆納豆は, ダイ

ズ種子をそのまま使用し、挽割り納豆は、2 ～ 4 分割して使用した。このダイズを丸大豆納豆は室温で 17 時間、挽割り納豆は室温で 4 時間水に浸漬した。そして、丸大豆納豆は 131 °C で 25 分、挽割り納豆は 115 °C で 17 分蒸煮した。この一部を蒸煮ダイズとしてサンプリングし、残りに納豆菌を接種して発酵させた。発酵条件は、丸大豆納豆、挽割り納豆ともに 38 °C、湿度 85 % で 16 時間とした。作製後、DNA を抽出するまで、-20 °C で保存した。

市販豆腐：茨城県(7 件)、千葉県(6 件)、東京都(9 件)、神奈川県(2 件)、新潟県(3 件)、広島県(7 件)、愛媛県(1 件)、山口県(1 件)、福岡県(3 件)内の食料品店、または生協(2 件)から、計 41 件を購入した。

2) 試薬

- ・リボヌクレアーゼ A (RNase A): Sigma 社製クロマトグラフ精製品
- ・トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) : Sigma 社製試薬
- ・セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) : Sigma 社製試薬
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩(EDTA): 同仁化学社製試薬
- ・アガロース: 宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」
- ・DNA マーカー: 宝酒造(株)製、またはニューイングランドバイオラブ社製 λ DNA HindIII Digest, 1 kbp ラダー, 100 bp ラダー
- ・DNA ポリメラーゼ: 宝酒造(株)製 Takara Taq ポリメラーゼ
- ・PCR 緩衝液: DNA ポリメラーゼ添付品
- ・制限酵素: 宝酒造(株)製 SphI, EcoRV および HincII
- ・制限酵素反応緩衝液: 制限酵素添付の H buffer
- ・PicoGreen® : Molecular Probes 社製試薬
- ・サケ精子 DNA : Sigma 社製試薬
- ・硫酸カルシウム: 赤穂化成(株)製豆腐用凝固剤「パール」
- ・オリゴヌクレオチドプライマー: 北海道システム・サイエンス(株)に合成委託したゲル

ろ過精製品

- ・水: Milli-Q® 超純水製造装置(ミリポア社製)により精製したもの
- 他の試薬は, すべて特級品を用いた.

3) 試薬の調製

- ・フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液 (PCI)
- ・クロロホルム/イソアミルアルコール混液 (CIA)
- ・CTAB 緩衝液
- ・TE 緩衝液
- ・TAE 緩衝液
- ・LB/ Amp 平板培地
- ・LB/ Amp 液体培地
- ・SOC 培地

以上の調製法を次に示す.

- ・フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液 (PCI): 1 mol/L Tris/ HCl (pH 8.0)を飽和させたフェノール, クロロホルムおよびイソアミルアルコールをそれぞれ 25 : 24 : 1 の比率で混合した.
- ・クロロホルム/イソアミルアルコール混液 (CIA): クロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 の比率で混合した.
- ・CTAB 緩衝液: CTAB 4 g , 1 mol/L Tris/ HCl (pH 8.0) 20 mL , 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 8 mL , 5 mol/L NaCl 水溶液 56 mL を水で 200 mL に定容し, オートクレーブした.
- ・TE 緩衝液: 終濃度 10 mmol/L Tris , 1 mmol/L EDTA になるように調製し, HCl で pH 8.0 に調製した.
- ・TAE 緩衝液: Tris 4.84 g , 氷酢酸 1.14 mL および 0.5 mol/L EDTA 2 mL を水で 1 L に定容した.

- LB/ Amp 平板培地および LB/ Amp 液体培地: 終濃度 10 g/L バクトトリプトン, 5 g/L バクト酵母エキストラクト, 5 g/L NaCl になるように調製し, NaOH で pH 7.0 に調整した. LB/ Amp 平板培地作製時は Agar を 15 g/L になるように添加し, LB/ Amp 液体培地作製時はそのままオートクレーブした. 冷却後, 最終濃度 100 µg/mL となるようにアンピシリンを添加した.
- SOC 培地: 20 g バクトトリプトン, 5 g バクト酵母エキストラクト, 0.5 g NaCl を適当量の水に溶解後, 250 mmol/L KCl 溶液 10 mL 添加し, pH 7.0 に調整して水で 1 L に定容した. オートクレーブし, 冷却後, ろ過滅菌した 1 mol/L Glucose を 20 mL 加えた. その後, オートクレーブした 2 mol/L MgCl₂ を 5 mL 添加した.

4) 装置

使用した機器および装置を Table II-1 に示した.

II-2-2 方法

1) DNA の抽出方法

(1) CTAB を用いる DNA 溶液の調製法 (CTAB 法)

(前処理)

乾燥ダイズは, 家庭用ミルで目視により粒径 1 mm 程度に粉碎して 50 mg 計るか, 17 時間水に浸漬したのち 1.5 mL 容チューブに 100 mg 計量した.

豆腐は, 1.5 mL 容チューブに 300 mg 計り, 3,400 × g で 5 分間遠心し, 上清みを捨てた.

丸大豆納豆および挽割り納豆は, 滅菌水で粘りが取れるまで洗浄したものと, 洗浄しないものを, それぞれ 1.5 mL 容チューブに 100 mg 計量した.

丸大豆用蒸煮ダイズおよび挽割り納豆用蒸煮ダイズは, 1.5 mL 容チューブに 100 mg 計量した.

(DNA 抽出)

Murray と Thompson³⁵⁾の CTAB を用いる方法をもとに、Pietsch ら³⁶⁾の報告を参考にして、改変して行った。抽出法を次に示すとともに、Fig. II-3 に示す。

試料を計り採った 1.5 mL 容チューブに CTAB 緩衝液を 600 μ L 入れ、マイクロチューブミキサー(KONTES 社製 PELLET PESTLE)でホモゲナイズし、55 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。500 μ L の PCI を加え、試験管ミキサーで懸濁し、13,500 $\times g$ で 15 分間遠心した後、上層を新しいチューブに取り、500 μ L の CIA を加え、試験管ミキサーで懸濁し、13,500 $\times g$ で 15 分間遠心した。上層を新しいチューブに取り、等容のイソプロパノールを加え、混和して 13,500 $\times g$ で 10 分間遠心した。上清を捨てた後、500 μ L の 70 %エタノールを加え、13,500 $\times g$ で 1 分間遠心後、再度上清を捨て、沈殿を乾燥した。沈殿に 50 μ L の TE 緩衝液を加えて試験管ミキサーで溶解し、RNase A (5 mg/mL)を 5 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。200 μ L の CTAB 緩衝液を加え混合した後、250 μ L のクロロホルムを加え、試験管ミキサーで懸濁し、13,500 $\times g$ で 15 分間遠心した。上層を新しいチューブに取り、200 μ L のイソプロパノールを加え、13,500 $\times g$ で 10 分間遠心し、上清を捨てた後、真空乾燥した。沈殿に 50 μ L の TE 緩衝液を加え溶解したものを DNA 溶液とした。

(2) 市販のゲノム DNA 抽出キットによる DNA 溶液の調製法

(前処理)

乾燥ダイズは、家庭用ミルで目視により粒径 1 mm 程度に粉碎し、抽出に供した。

(DNA 抽出)

ISOGEN[®] および ISOPLANT[®] (ニッポンジーン社製)、Wizard[®] DNA Clean up System (Promega 社製)、Wizard[®] genomic DNA Purification System (Promega 社製)、GNOME[®](BIO101 社製)、Nucleon Phytopure[®] (Amersham 社製)を用いて、キット添付のプロトコールに従って DNA を抽出した。

2) 抽出した DNA の純度の検定法

抽出した DNA の純度は、アガロースゲル電気泳動結果ならびに、230 , 260 および 280 nm の吸光度測定結果より検定した。吸光度の測定は、分光光度計(Beckman 社製 DU-70)を用いた。260 nm/ 230 nm 吸光度比から夾雑物、260 nm/ 280 nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定した。また、ゲル電気泳動から、抽出した DNA の低分子化および RNA の残存がないことを確認した。

3) 抽出した DNA 量の定量法

(1) 260 nm 吸光度からの抽出した DNA 量の定量法

抽出した DNA の 260 nm 吸光度から、 $1 \text{ O.D.}_{260} = 50 \text{ mg/mL}$ として算出し、PCR 用 DNA 溶液は $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の濃度に調製し、 -20°C で保存した。

(2) PicoGreen[®]を用いた抽出した DNA 量の定量法

DNA 溶液、TE 緩衝液および PicoGreen 溶液を混合し、励起波長 485 nm , 蛍光波長 520 nm により DNA 量を測定した。検量線は、サケ精子 DNA を TE 緩衝液に溶解し、DNA の終濃度が 0.1 , 0.3 , 0.5 , $1.0 \text{ }\mu\text{g/mL}$ となるように調製した溶液から作成した。

4) PCR プライマーの設計

RRS 検知用プライマーを設計するため、まず公開されている安全性評価資料から、RRS に導入されている DNA の構造を調べた。RRS には、cauliflower mosaic virus 35S promoter (P-35S) 由来の DNA 断片を、高発現のため 2 回反復して含む 35S promoter (E-35S), *Petunia hybrida* 由来プラスチド移行配列 (CTP4 配列), *Agrobacterium* sp. CP4 由来 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase 遺伝子 (*cp4-epsps*), *A. tumefaciens* 由来 nopaline synthase terminator (NOS ter) が導入されている³⁷⁾。P-35S³⁸⁾, *cp4-epsps* の塩基配列情報³⁹⁾と、スイスの公定法で使用されているプライマーの情報³³⁾および、Meyer ら⁴⁰⁾の報告から 1 組のプライマー対 (Table II-2 の CaM03-5' と EPS01-3') を設計した。PCR により増幅した DNA 分子の塩基配列

を DNA シーケンサーにより決定した。そのシーケンス結果と前述の情報から、RRS 検知用として E-35S から 5'側 3 種類(Table II-2 の CaM01-5', CaM02-5', CaM03-5'), 3'側 2 種類(同 CaM01-3', CaM02-3'), CTP 配列から 5'側 2 種類(同 CTP01-5', CTP n-5'), *cp4-epsps* から 3'側 2 種類(同 EPSPS01-3', EPSPS n-3')のプライマーを設計した。また、調製したダイズ DNA が PCR に十分な程度に精製されておりかつ、分解を受けていないことを確認するために、ダイズゲノムに内在的に含まれるレクチン遺伝子(*Le1*)検知用の 4 種類のプライマー(Table II-2 の Le1 01-5', Le1 n-5', Le1 01-3', Le1 n-3')を、*Le1* の塩基配列情報^{41, 42}および Meyer ら⁴⁰の報告から設計した。作製したプライマーのリストを Table II-2 に、各プライマー対の増幅部位と予想される DNA 断片長を Fig. II-4 に示した。

5) PCR 条件

PCR は、サーマルサイクラー(ASTEC 社製 PC701 または Applied Biosystems 社製 GeneAmp PCR System 9700)を用いて行った。

(1) 通常の PCR 条件

PCR 反応液の組成は、1 × PCR 緩衝液、230 μmol/L dNTP、1.75 mmol/L MgCl₂、各 1.0 μmol/L 5'-, 3'-プライマー、1.25 units DNA ポリメラーゼおよび 250 ng 鋳型 DNA を含み、全量を 25 μL とした。ただし、丸大豆納豆およびその蒸煮ダイズ、市販豆腐から抽出した DNA を鋳型とした場合のプライマーは、プライマー対 No.3 と No.6 を各 1.0 μmol/L、1 本のチューブに同時に加えた条件で行った。PCR 温度条件は、プレインキュベーション 94 °C で 3 分の後、熱変成 96 °C で 30 秒、アニーリング 62 °C で 1 分、伸長反応 74 °C で 30 秒を 1 サイクルとして、45 サイクル行った。

(2) nested PCR 条件

最初の PCR 反応液の組成は、1 × PCR 緩衝液、230 μmol/L dNTP、1.75 mmol/L MgCl₂、各 1.0 μmol/L 5'-, 3'-プライマー、1.25 units DNA ポリメラーゼおよび 250 ng 鋳型 DNA を含み、全量を 25 μL とした。プライマー対は、*Le1* 検

知のためには No.6 , 組換え DNA 配列検知のためには No.3 を用いた. 最初の PCR の温度条件は, プレインキュベーション 94 °C で 3 分の後, 熱変成 96 °C で 30 秒, アニーリング 62 °C で 1 分, 伸長反応 74 °C で 30 秒を 1 サイクルとして, 20 サイクル行った. nested PCR 溶液の組成は, 1 × PCR 緩衝液, 230 μmol/L dNTP , 1.75 mmol/L MgCl₂ , 各 1.0 μmol/L 5'-, 3'-プライマー, 0.675 units DNA ポリメラーゼおよび 1st PCR 後の溶液 0.5 μL を含み, 全量を 25 μL とした. プライマー対は, *Le1* 検知のためには No.7 を用い, 組換え DNA 配列検知のためには No.5 を用いた. PCR 温度条件は, プレインキュベーション 94 °C で 3 分の後, 熱変成 97 °C で 5 秒, アニーリングおよび伸長反応 65 °C で 1 分を 1 サイクルとして, 35 サイクル行った後, 最後の伸長反応として 74 °C で 3 分を行った.

6) シークエンス方法

プライマー対 No.3 を用いた PCR 産物のシークエンスを行った. 反応後の PCR 溶液を電気泳動し, アガロースゲルから PCR 産物を回収した. 回収には, RECOCHIP (宝酒造(株)製)を用いた. 回収した産物は, エタノール沈殿を行い, 水に溶解した. 次に, ライゲーションを行った. ベクタープラスミドには, pGEM-T ベクター(プロメガ社製)を用い, ライゲーションは, DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造(株)製)をプロトコールどおりに用いた. 静置時間は, 16 °C で, 2 時間とした. 大腸菌への形質転換は, ヒートショック法にて行った. JM109 (DH5α) High Efficiency コンピテントセル(プロメガ社製)に, ライゲーション反応後の DNA 溶液を加え, 氷上で 40 分間インキュベートした. その後, 42 °C で 45 秒間インキュベートし, ヒートショックを与えた. これを氷上に戻し 1.5 分間静置した. SOC 培地を添加し, 37 °C , 1 時間程度, 振とう培養した. これを, 100 mg/mL X-gal を 100 μL および 200 mmol/L IPTG を 50 μL を塗布した LB/ Amp 平板培地に撒き, 37 °C で一晩培養した. インサート確認およびコロニーの単離を行った. インサートの有無は, インサートの挿入された白色コロニーと, 挿入されなかった青色コロニーにより識別できる. そのため, 白色コロニーを選択し, PCR を行った. PCR 産物をゲル電気泳動して, インサートのサイズを確認した. 同時に,

選択コロニーを LB/ Amp 培地に撒くことにより単離した。PCR の反応液の組成は、1 × PCR 緩衝液、230 μmol/L dNTP、1.75 mmol/L MgCl₂、各 1.0 μmol/L 5'-, 3'-プライマー、0.5 units DNA ポリメラーゼを含み、全量 10 μL とした。この液に選択コロニーを少量懸濁した。PCR 温度条件は、プレインキュベーション 94 °C、2 分の後、熱変成 94 °C、30 秒、アニーリング 60 °C、1 分、伸長反応 72 °C、1 分を1サイクルとして、45 サイクル行った。目的の断片長を持つクローンを、LB/ Amp 液体培地 2 mL 中で、37 °Cで一晩振とう培養した。培養した大腸菌からのプラスミド DNA の調製は、アルカリ-SDS 法によった⁴³⁾。抽出したプラスミド DNA は、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Reaction Standards (Applied Biosystems 社製)をプロトコールどおりに使用し、サイクルシーケンスを行った。プライマーは、M13 (-21) または M13 Reverse を用い、両端からシーケンス反応を行った。PCR 温度条件は、プレインキュベーション 94 °Cで 2 分の後、熱変成 96 °Cで 10 秒、アニーリング 50 °Cで 20 秒、伸長反応 60 °Cで 4 分を1サイクルとして 25 サイクル行った。過剰なダイターミネータの除去は、Centri-sep スピнкаラム(Applied Biosystems 社製)をプロトコールどおりに使用し行った。調製したサンプルの DNA 塩基配列は、DNA シーケンサー(Applied Biosystems 社製 ABI Prism 310)により解析した。

7) PCR 産物の制限酵素消化の方法

制限酵素 *SphI*、*EcoRV* および *EcoT14I* は High バッファー要求性であるため、PCR 溶液の持ち越しの塩を除くことなく制限酵素消化を行った。PCR 溶液は、5 μL を制限酵素処理に使用し、37 °Cで 30 分間消化した。消化後、反応液全量を電気泳動し、写真撮影を行った。

8) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法

電気泳動は、ゲル電気泳動装置(株アドバンス製 Mupid® II)を使用した。100 mL 当たり 50 μg のエチジウムブロマイドを含むアガロースゲルを使用し、TAE 緩衝液中で 100 V 定電圧により行った。アガロースゲルの濃度は、抽出したゲノム DNA 溶液

を泳動する場合には 0.8 %，PCR 溶液または PCR 産物の制限酵素消化後の反応液を泳動する場合には 3 %とした。電気泳動後のゲルに，UV 照射装置(VILBER LOURMAT 社製 Fluo-Link)により 312 nm の紫外線照射し，高感度モノクロ CCD カメラ(アトー(株)製 type DX)，画像撮影装置(アトー(株)製 AE6915)およびビデオプリンター(三菱電気(株)製 SCT-CP1000)を用いて，DNA を可視化，ゲル写真撮影を行った。

II-3 結果

1) ダイズ種子からの DNA 抽出における CTAB 法と市販キットを用いた方法の比較

CTAB 法および主な DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA のゲル電気泳動写真を Fig. II-5 に示す。CTAB 法により抽出した DNA は，23 kbp 付近にバンドが見られ，スメアーが見られるものの RNA の残存は見られなかった。Wizard DNA Clean up System では，0.5 kbp 付近を中心としたスメアーが見られた。また，Nucleon Phytopure[®] では，0.5 kbp 以下の低分子にバンドが見られ，かつ抽出された DNA 量が少量であった。ISOPLANT では CTAB 法を用いて抽出した DNA 溶液と同様に，低分子側にスメアーは見られず，抽出 DNA の大きさからみると，良好な DNA が抽出されているものと考えられたが，PCR によるダイズ内在性遺伝子 *Le1* の検知ができなかった。本章において使用した DNA 抽出キットにおいて，ダイズ種子から PCR により *Le1* の検知が可能な DNA 溶液が調製できるキットはなかった。また，同一のキットを使用して DNA を抽出した場合において，260 nm に吸収極大のある DNA 溶液が得られる場合と得られない場合があり，再現性に問題があるキットがあった。PCR に適した DNA 溶液を得るためには，プロトコルを改変する必要がある，十分な純度の DNA が調製できない場合は，エタノールまたはイソプロパノール処理の前に PCI 処理を行うか，全体の抽出作業を繰り返し行うことにより，PCR に適した DNA 溶液が得られる場合があった。CTAB を用いる方法で調製した DNA 溶液は，吸光度比が， $260 \text{ nm} / 230 \text{ nm} > 2$ および $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm} = 1.8 \sim 2.0$ であれば，PCR による *Le1* の検知に支障がなかった。そのため，以降の DNA の抽出は，CTAB 法

で行うこととした。しかし、CTAB 法を用いて抽出した DNA 溶液は、同一試料から調製を行った場合においても、その吸光度、吸光度比にはばらつきがみられ、吸光度から DNA の厳密な定量と純度検定を行うことは困難であった。また、二本鎖 DNA に特異的な蛍光色素である PicoGreen[®] を用いて、ダイズ種子から抽出した DNA 溶液の定量を行ったところ、PicoGreen[®] により測定した結果は、同一 DNA 溶液を吸光度から算出した DNA 濃度より、2-3 倍高い値となった(DATA not shown)。このため、ダイズ種子から抽出した DNA の PicoGreen[®] による定量は困難と判断した。

2) DNA シークエンスの結果と組換え DNA 配列検知用プライマーの設計

Fig. II-4 に RRS に導入されている遺伝子構造を示した。プライマー対 No.3 を用いた PCR 産物のシークエンス結果を、Fig. II-6 に示す。P-35S³⁸⁾、CTP4⁴⁴⁾および *cp4-epsps*³⁹⁾に関する情報との相同性からシークエンスを解析し、*cp4-epsps* の開始コドンのアデニンを1として番号付けした。E-35S: -304 ~ -245 bp, CTP4: -225 ~ -5 bp, *cp4-epsps*: 6 ~ 209 bp と判断した。また、この結果と安全性評価資料と矛盾はなかった。この結果と Meyer ら⁴⁰⁾の報告を基に CaM01-3', CaM02-3', CTP01-5', CTP n-5' および EPSPS n-3'のプライマーの設計を行った。

3) ダイズ種子における組換え DNA 配列検知の特異性と感度

non-GM ダイズから抽出した DNA 溶液に RRS から抽出した DNA 溶液を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 %となるように加え、プライマー対 No.1 から No.4 を用いて PCR を行い、組換え DNA 配列検知の特異性と感度を検討した。各プライマーによる PCR 産物の電気泳動写真を Fig. II-7 に示す。プライマー対 No.2 および No.3 では予想されたバンドのみが増幅され、0.05 %まで検知可能であった。プライマー対 No.1 と No.4 を使用した場合は、非特異的バンドが増幅され、0.1 %程度まで検知可能であった。プライマー対 No.1 は、RRS 混合率に関係なく非特異的バンドが見られ、プライマー対 No.4 では、RRS 混合率に高いもののみに非特異的バンドが見られたため、低い混合率での RRS の検知を目的とする場合には、プライマー対 No.4 の利

用は可能であると判断した。なお、全ての DNA 溶液から *Le1* がプライマー対 No.6 を用いて検知された。プライマー対 No.2 , No.3 , No.4 および No.6 を用いた PCR 産物を、制限酵素 *EcoRV* (No.2), *SphI* (No.3 および No.4), *EcoT22I* (No.6) で処理したところ、特異的な断片長の DNA に切断された (DATA not shown)。さらに、non-GM ダイズに RRS を 0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1 , 5 % となるように混合したダイズ粉末試料から DNA を抽出し、PCR を行った。非特異的バンドが多く増幅されたプライマー対 No.1 は用いず、プライマー対 No.2 , No.3 および No.4 を用いて検討した (DATA not shown)。この場合の検知感度は、non-GM ダイズから抽出した DNA 溶液に RRS から抽出した DNA 溶液を混合した場合と同様に、プライマー対 No.2 と No.3 では、予想されたバンドのみが増幅され、0.05 % まで検知可能であった。また、プライマー対 No.4 では、RRS において非特異的バンドが認められたが 0.05 % まで検知可能であった。

4) 豆腐からの RRS の検知感度

non-GM ダイズに RRS を 0.01 , 0.1 , 0.5 , 5 % 含むダイズ試料から作製した豆腐から DNA を抽出した。豆腐から抽出した DNA を電気泳動した結果、すべて 1 kbp 付近を中心にスメアーとなっていた (DATA not shown)。この DNA 溶液からプライマー対 No.3 を用いて組換え DNA 配列の検知を行った。結果を Fig. II-8 に示す。RRS を 0.5 % 含む豆腐まで、組換え DNA 配列を検知することが可能であった。なお、プライマー対 No.6 を用いて *Le1* の検知を行ったところ、全てのサンプルから検知され、豆腐において、PCR を行える長さのダイズゲノム DNA が残存していることが示された。

5) 丸大豆納豆、挽割り納豆とそれらの蒸煮ダイズにおけるダイズ内在性遺伝子

Le1 および組換え DNA 配列検知

丸大豆納豆用の蒸煮処理したダイズおよび丸大豆納豆から抽出した DNA の電気泳動写真を Fig. II-9A に示す。蒸煮処理した段階で 100 bp 以下の位置に不鮮明な

バンドが見られ、豆腐よりもさらに分解を受けていた。水で洗浄処理しなかった納豆から抽出した DNA は、大きな分子量まで広がっていた。一方、水で洗浄処理した納豆から抽出した DNA は、蒸煮処理したダイズと同じ位置に不鮮明なバンドが見られた。これらの DNA 溶液から、*Le1* および組換え DNA 配列の検知を行ったところ、Fig. II-10A に示すように、*Le1* と組換え DNA 配列ともに検知できなかった。

一方、挽割り納豆用の蒸煮処理したダイズおよび挽割り納豆から抽出した DNA の電気泳動写真を Fig. II-9B に示す。挽割り納豆用の蒸煮処理したダイズから抽出した DNA は、100 bp から 1 kbp 付近まで広がるスメアーとなった。水で洗浄処理していない挽割り納豆から抽出した DNA は、丸大豆納豆から抽出した DNA と同様に、大きな分子量まで広がっていた。水で洗浄処理した挽割り納豆から抽出した DNA は、挽割り納豆用に蒸煮処理したダイズと同様であった。*Le1* 検知のためのプライマー対 No.6 を用いて PCR を行ったところ、蒸煮処理したダイズから調製した DNA 溶液については *Le1* の検知が可能であった。しかしながら、発酵後の挽割り納豆から調製した DNA 溶液については、*Le1* を検知することができなかった(Fig. II-10B)。

さらに、丸大豆納豆および挽割り納豆とそれらの蒸煮ダイズから抽出した DNA を鋳型 DNA として、nested PCR を行った。丸大豆納豆およびその蒸煮ダイズからは、*Le1* および組換え DNA 配列ともに検知できなかった。しかし、挽割り納豆およびその蒸煮ダイズから *Le1* の検知を行ったところ、挽割り納豆およびその蒸煮ダイズともに検知可能であった(DATA not shown)。

6) 市販豆腐からの RRS の検知

市販されている豆腐 41 件から抽出した DNA 溶液から、*Le1* および組換え DNA 配列の検知を行った。結果を Table II-3 に示す。これら市販豆腐の中には、*Le1* および組換え DNA 配列ともに検知できないものが 3 件あった。しかしながら nested PCR を行うことにより、これらの 3 件すべてから *Le1* が検知でき、そのうちの 1 件から組換え DNA 配列が検知された。Fig. II-11 に、通常の PCR により検知できなかった市販豆腐 1 および 2 の nested PCR による結果を示す。市販豆腐 1 および 2 から

Le1 を検知し、市販豆腐 2 からはさらに組換え DNA 配列を検知している。nested PCR により、本章において購入した全ての豆腐から *Le1* を検知することができた。また、商品に特別の表示がない豆腐においては 28 件中 24 件から、また、国産ダイズ使用等の表示がある豆腐からも 13 件中 3 件から組換え DNA 配列が検知された。これらの組換え DNA 配列を検知した豆腐に、RRS が入っていると考えられた。

II-4 考察

1) CTAB 法により可能なダイズ種子からの PCR に適した DNA 抽出

植物体は、その種類や部位によりポリフェノール類、多糖類といった PCR を阻害する物質を含むため、PCR に適した DNA 抽出法の検討はきわめて重要である。CTAB 法による DNA の抽出は、本検討を行った 1998 年当時の市販 DNA 抽出キットに比べ手順が多いものの植物体からの一般的な抽出法である。一方の市販の抽出キットは、一般に茎葉から DNA を抽出するように設計されている。そのため、使用した DNA 抽出キットの中には、ダイズ種子から PCR に適した DNA 溶液が調製できるものはなかったと考えられた。これは、茎葉に比べダイズ種子中には、タンパク質、多糖類等が多く含まれ、それらが抽出 DNA 溶液中に残存するため PCR が阻害されたと推察された。以上から、ダイズ種子からの PCR 用の DNA 溶液の調製には、RNA の残存していない長鎖 DNA が多量に抽出でき、PCR による *Le1* の検知が可能な DNA の抽出が可能である CTAB を用いる方法が適していると考えられる。しかし、CTAB 法はクロロホルム、フェノールといった環境や、実験従事者に対し有害な有機溶媒を使用すること、実験操作に熟練が必要とされることから、これらを解決する抽出法の探索が必要になる。

2) RRS と P-35S に特異的なプライマーと明らかになった検知感度

RRS に特異的なプライマーおよび P-35S に特異的なプライマーの設計に成功し、その検知感度を明らかにした。このプライマーを用いて得られた PCR 産物の DNA

シーケンスには、制限酵素サイトがある。そのため、制限酵素処理により組換え体の検知を確実にすることが可能であり、信頼性の高い検知結果を得ることができると考えられる。RRS に特異的なプライマーの設計の成功の一つには、2 生物種由来の DNA 配列の連結部分を含むように RRS 検知用プライマーを設計したことによる。GMO には、様々な生物由来の DNA が連結されて導入されている。1 生物由来の DNA 配列部分のみを検知するプライマーを用いて組換え体の検知を行った場合、当該生物が混入すると偽陽性となる。これを防止するために、増幅される DNA 配列が検知対象 GM 農作物に特異的となるようにプライマーの設計をする必要がある。このため、2 生物種由来の DNA 配列の連結部分を含むようにプライマーを設計した。また、現在多くの組換え体において、P-35S が導入されているため、この部分を検知することは、今後の組換え体のスクリーニング検知を考える上で、有用であると考えられた。これらの検知感度は 0.05 % 程度であり、この DNA 量は、ダイズのゲノム DNA として 125 pg/ tube に相当する。これは、我が国における non-GM ダイズに RRS が非意図的に混入する際の許容値となる 5 % に比べ、十分な検知感度となっている。

3) 高度に加工された食品からは困難な RRS の検知

ダイズ、豆腐、丸大豆納豆とその蒸煮ダイズおよび、挽割り納豆とその蒸煮ダイズから抽出した DNA の電気泳動結果から、ダイズ、豆腐、挽割り納豆とその蒸煮ダイズ、丸大豆納豆とその蒸煮ダイズの順にダイズ DNA は高温処理により低分子量まで分解されたものと考えられた。この DNA を用いた PCR では、ダイズ、豆腐からは1回の PCR で *Le1* の検知は可能であり、挽割り納豆とその蒸煮ダイズからは nested PCR で *Le1* の検知は可能であった。しかし、丸大豆納豆とその蒸煮ダイズからは、nested PCR を行っても、*Le1* の検知はできなかった。このことから DNA の分解程度は加工温度に影響を受け、高温処理される食品については DNA が分解されるため、組換え DNA 配列の検知は難しくなると考えられた。ダイズにおける検知感度と豆腐における検知感度を比較したところ、豆腐の検知感度はダイズの検知感度に比べて一桁低く、豆腐に含まれている DNA が加工工程で分解していることを反映している。さら

に、納豆の場合では、発酵工程でさらに DNA の分解が進み、検知がきわめて難しくなると考えられた。他の食品においても、加熱、発酵といった加工工程によって、組換え DNA 配列の検知が困難になる場合が少なくないことを示している。

4) 開発した RRS 検知技術の実際の検査における実用性

市販豆腐からの組換え DNA 配列の検知を行った結果、本法は、実際の検査において十分に実用的であった。充填豆腐は、絹・木綿豆腐に比べて加熱工程が苛酷である⁴⁹ため充填豆腐からの *Le1* および組換え DNA 配列の検知は困難であると想定されたが、充填豆腐については、すべてのサンプルから *Le1* の検知が可能であった。絹・木綿豆腐については、1回の PCR で検知ができなかったものがあつたが、nested PCR を行うことにより *Le1* の検知が可能となった。製造工程が不明のためその原因を特定することはできないものの、このように市販の豆腐間で PCR による遺伝子の検知に差が認められたのは、製造業者の豆腐製造工程の違いによる DNA の分解程度の差や調製した DNA 溶液中に残った夾雑物の差が原因と推察された。通常の PCR および nested PCR を行うことにより、すべての豆腐サンプルから *Le1* の検知が可能となり、これは市販品の調査を行うのに十分な検知法であると考えられた。当該市販豆腐は、GM 食品の表示の義務化前のサンプルであるが、現在 non-GM ダイズの表示は、IP ハンドリングされたものに限られており、良好な IP ハンドリングにおける non-GM ダイズへの GM ダイズの意図せざる混入は 5 %以下とされている。よって本法は、non-GM ダイズ表示品の検査を行うのに十分な検知感度であると考えられた。

5) 今後の検知技術の開発において考慮すべき点

今後、様々な農作物において遺伝子組換え技術の利用が見込まれている。新規の農産物を対象とした検知技術の開発において考慮すべき点として、次のことが明らかになった。まず、PCR に適した DNA 抽出法の検討は、検知技術の開発において重要である。DNA 抽出法の採用に関しては、RNA の残存していない長鎖 DNA が抽出できる、比較的多量の DNA が抽出できる、PCR による対象農作物の内在性遺

伝子の検知が可能である、の 3 点を満たすことが必要である。また、本章での研究から、特異性と検知感度はプライマー配列に依存することが明らかであり、組換え DNA 配列検知には、プライマーの設計が最も重要であるといえる。そのため、今後プライマーの設計を行う際には、序論に表したように、スクリーニング検知法やコンストラクト特異的検知法といった、PCR の増幅部位について検討するとともに、実際にプライマーを作製し、その検知感度、特異性について検討し、最も検知に適したものを選択する必要がある。さらに、PCR 産物の制限酵素処理により組換え体の検知を確実にするため、PCR 産物内に制限酵素サイトがあることが望ましいと考えられる。また、nested PCR において、100 ～ 200 bp の増幅産物の PCR により、高度に加工された挽割り納豆等からでも *Le1* および組換え DNA 配列の検知が可能であったことから、検知対象を加工食品とする場合には、短い PCR 増幅長であることが望ましいと考えられる。但し、70 bp 程度にプライマーダイマーが出現する可能性があることを考慮し、PCR 増幅産物の長さは、100 ～ 200 bp 程度であることが望ましいと考えられる。同時に、良好な結果を得るための DNA ポリメラーゼの選択と PCR 条件の設定が必要であることが示唆される。さらに、洗浄しない丸大豆納豆および挽割り納豆から抽出された DNA に見られる大きい分子量のバンドは納豆菌に由来すると考えられるため、実際の検査においては、納豆の粘りがとれるまで十分に水洗したのち DNA を抽出する必要があると考えられる。このことは、加工食品からの組換え体の検知は、加工食品の特性に応じた前処理方法の検討が必要であることを示している。

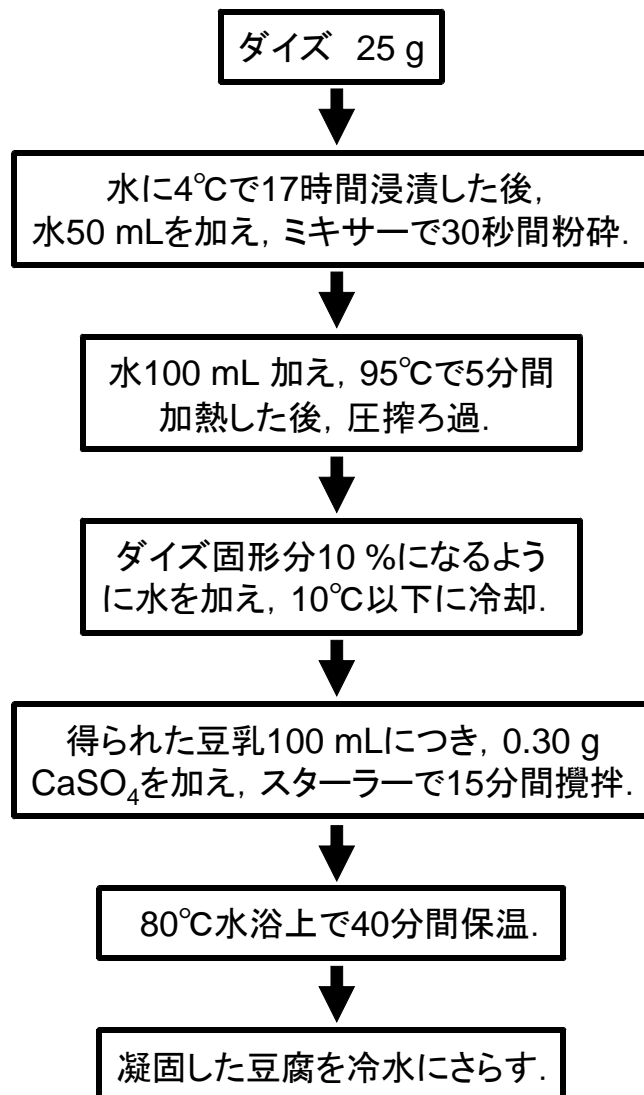


Fig. II-1 豆腐の作製フロー図

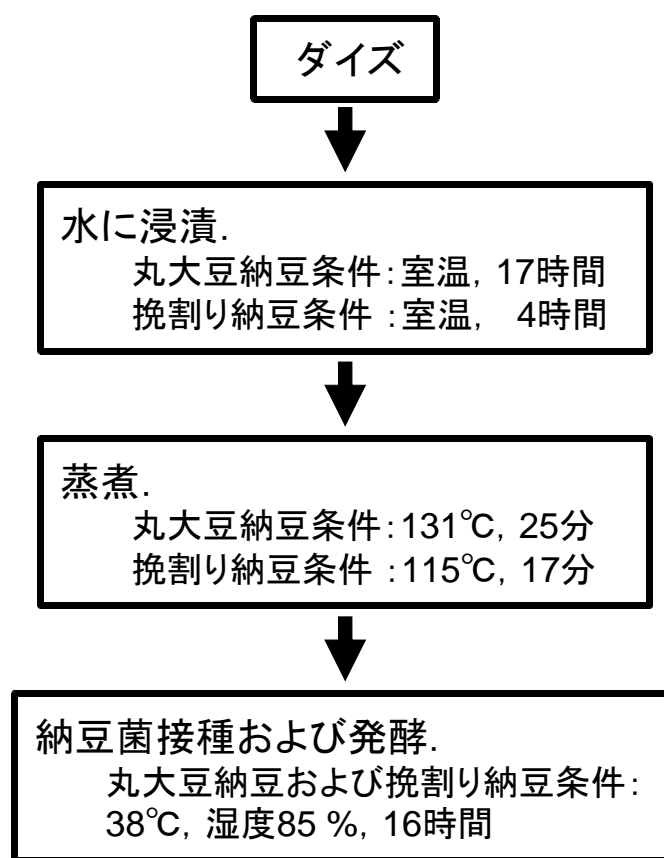


Fig. II-2 丸大豆納豆および挽割り納豆の作製フロー図

Table II-1 使用した機器および装置

機器・装置	製造元および型式
家庭用ミル付きミキサー	三洋電気(株)製 SM-KM30
豆乳濃度計	アタゴ社製 SM-20E
マイクロチューブミキサー	KONTES 社製 PELLET PESTLE
試験管ミキサー	大洋科学工業(株)社製 S-5N
インキュベーター	アトー(株)製 ZYMOSTAT AB1750
遠心機	日立製作所(株)製 himac CT13
ゲル電気泳動装置	(株)アドバンス製 Mupid [®] II
画像撮影装置	アトー社製 AE6915
ビデオプリンター	三菱電気(株)製 SCT-CP1000
高感度モノクロ CCD カメラ	アトー(株)製 type DX
UV 照射装置	VILBER LOURMAT 社製 Fluo-Link
サーマルサイクラー	ASTEC 社製 PC701 または Applied Biosystems 社 GeneAmp PCR System 9700
分光光度計	Beckman 社製 DU-70
DNA シーケンサー	Applied Biosystems 社製 ABI Prism 310
蛍光測定装置	ミリポアリミテッド(株)製 Cyto Fluor 2300

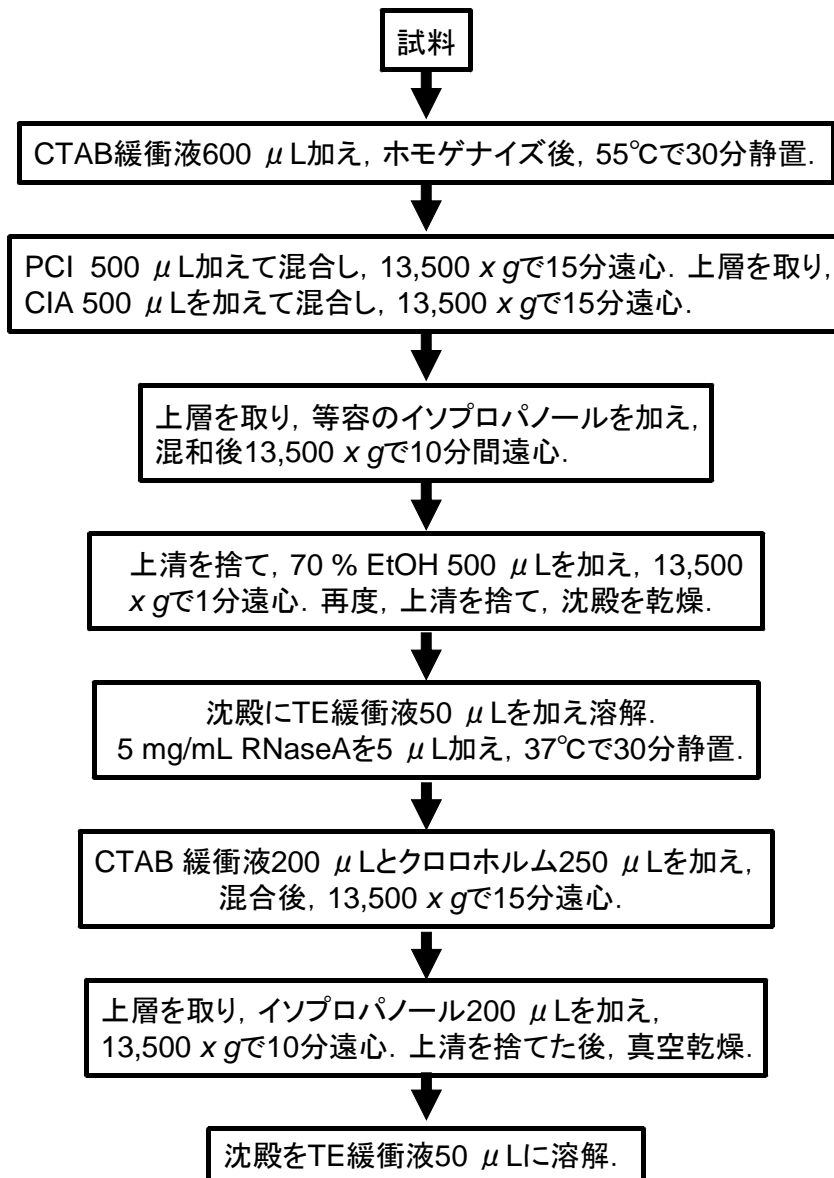
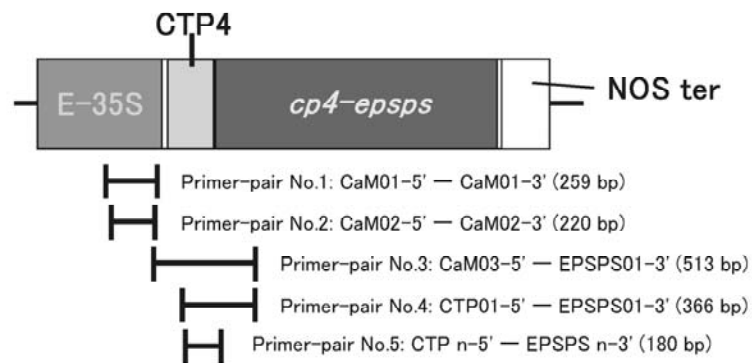


Fig. II-3 CTAB を用いたダイズ種子およびダイズ加工食品からの DNA 抽出フロー図

Table II-2 作製したプライマーの一覧

No.	Name	Sequence	specificity		
1:	CaM01-5'	5'-GAAAAAGGAAGGTGGCACTACAAAATG-3'	sense	P-35S	259 bp
	CaM01-3'	5'-GTCCCTCTCCAAATGAAATGAACTTC-3'	anti-sense		
2:	CaM02-5'	5'-CACTACAAAATGCCATCATTGGGATA-3'	sense	P-35S	220 bp
	CaM02-3'	5'-CTTATATAGAGGAAGGTCTTCCGA-3'	anti-sense		
3:	CaM03-5'	5'-CCTTCGCAAGACCCCTTCCTCTATA-3'	sense	RRS	513 bp
	EPSPS01-3'	5'-ATCCTGGCGCCCATGGCCTGCATG-3'	anti-sense		
4:	CTP01-5'	5'-CCATAAACCCCAAGTTCCTAAATC-3'	sense	RRS	366 bp
	EPSPS01-3'	5'-ATCCTGGCGCCCATGGCCTGCATG-3'	anti-sense		
5:	CTP n-5'	5'-CCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGT-3'	sense	RRS	180 bp
	EPSPS n-3'	5'-TGCGGGCCGGCTGCTTGCA-3'	anti-sense		
6:	Le1 01-5'	5'-GGCTGATAACACACTCTATTATTGT-3'	sense	<i>Le1</i>	818 bp
	Le1 01-3'	5'-TGATGGATCTGATAGAAATTGACGTT-3'	anti-sense		
7:	Le1 n-5'	5'-GCCCCTCTACTCCACCCCCCATCC-3'	sense	<i>Le1</i>	118 bp
	Le1 n-3'	5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG-3'	anti-sense		

A: RRS



B: ダイズ内在性遺伝子

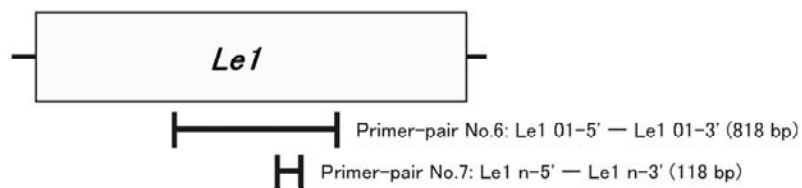


Fig. II-4 RRS に導入されている DNA 配列(A)およびダイズ内在性遺伝子 *Le1* (B)における PCR 増幅部位の模式図

()内は増幅長を示す.

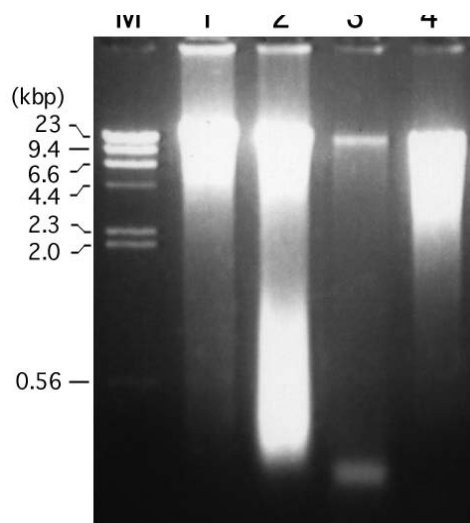


Fig. II-5 異なる DNA 抽出法によりダイズ種子から抽出したゲノム DNA の電気泳動写真

1: ISOPLANT, 2: Wizard DNA Clean up System,
 3: Nucleon Phytopure, 4: CTAB extraction method,
 M: λ DNA *Hind*III digest standard

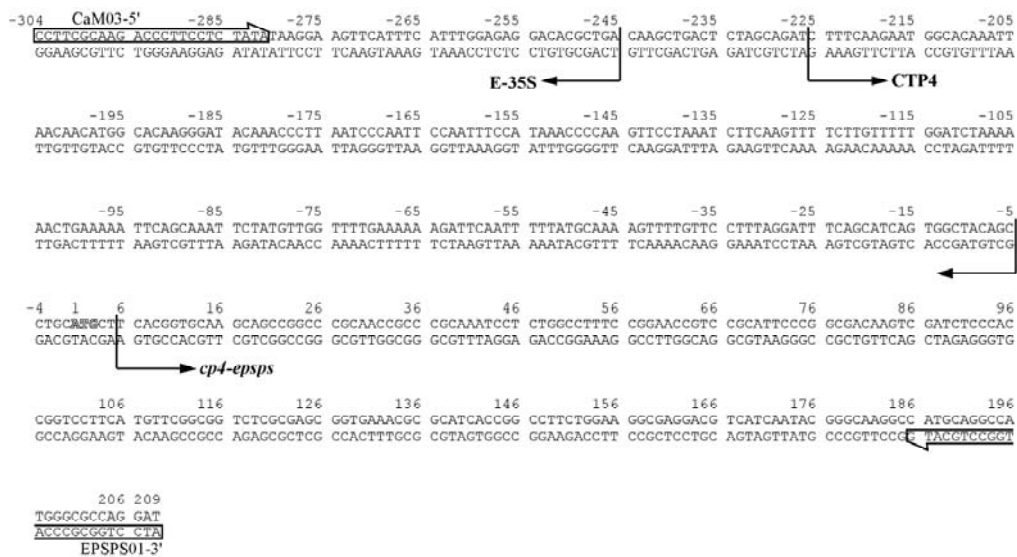


Fig. II-6 RRS のシーケンス結果

矢印 (←, →) は、DNA 配列の由来および位置を示す。

cp4-epsps の開始コドン(ATG)は白抜き文字で示し、そのアデニンを1として番号を付けた。

プライマー位置を中抜き矢印(⇨⇩)で示した。

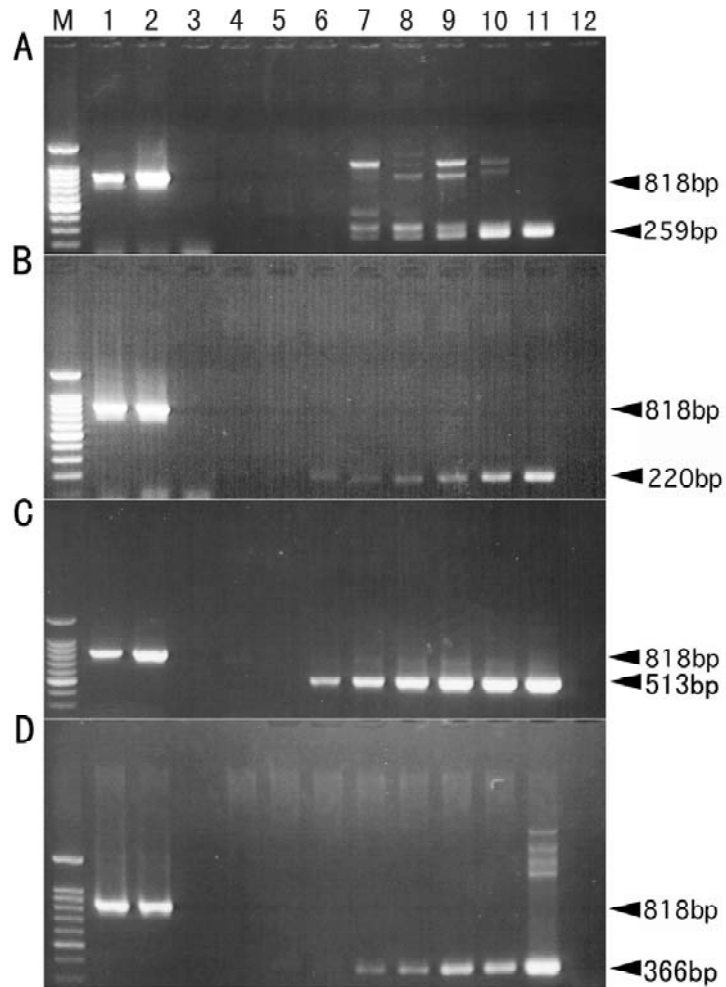


Fig. II-7 プライマー対による組換え DNA 配列の検知感度の違い

non-GM ダイズおよび RRS からそれぞれ抽出した DNA 溶液を混合して鑄型とした。

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

A: プライマー対 No.1(レーン 4 ~ 12)およびプライマー対 No.6(レーン 1 ~ 3)を使用

B: プライマー対 No.2(レーン 4 ~ 12)およびプライマー対 No.6(レーン 1 ~ 3)を使用

C: プライマー対 No.3(レーン 4 ~ 12)およびプライマー対 No.6(レーン 1 ~ 3)を使用

D: プライマー対 No.4(レーン 4 ~ 12)およびプライマー対 No.6(レーン 1 ~ 3)を使用

1: non-GM ダイズ, 2: RRS, 3: ネガティブコントロール(DNA なし), 4: non-GM ダイズ, 5: 0.01 % RRS 含有ダイズ DNA, 6: 0.05 % RRS 含有ダイズ DNA, 7: 0.1 % RRS 含有ダイズ DNA, 8: 0.5 % RRS 含有ダイズ DNA, 9: 1 % RRS 含有ダイズ DNA, 10: 5 % RRS 含有ダイズ DNA, 11: RRS, 12: ネガティブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

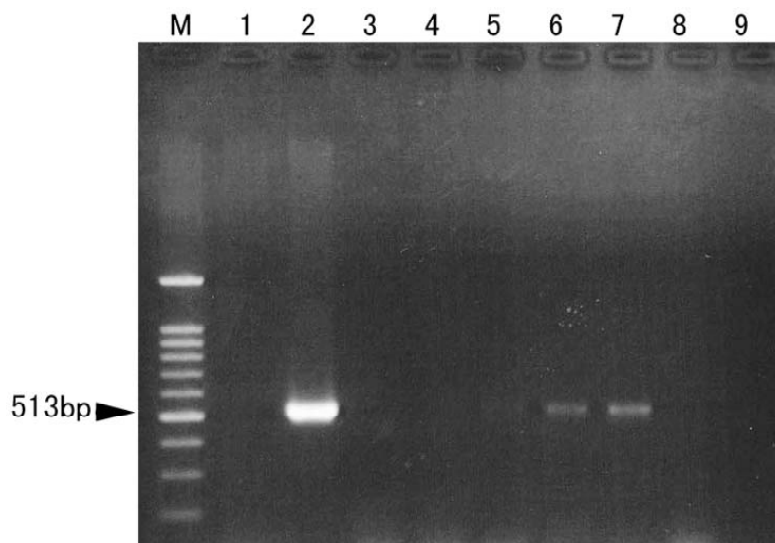


Fig. II-8 豆腐における組換え DNA 配列の検知感度

▶ は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

プライマー対は、No.3を使用した。

1: non-GM ダイズ, 2: RRS, 3: non-GM ダイズ使用豆腐, 4: 0.01 % RRS 含有豆腐, 5: 0.1 % RRS 含有豆腐, 6: 0.5 % RRS 含有豆腐, 7: 5 % RRS 含有豆腐, 8: ネガティブコントロール(DNA なし), 9: ネガティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

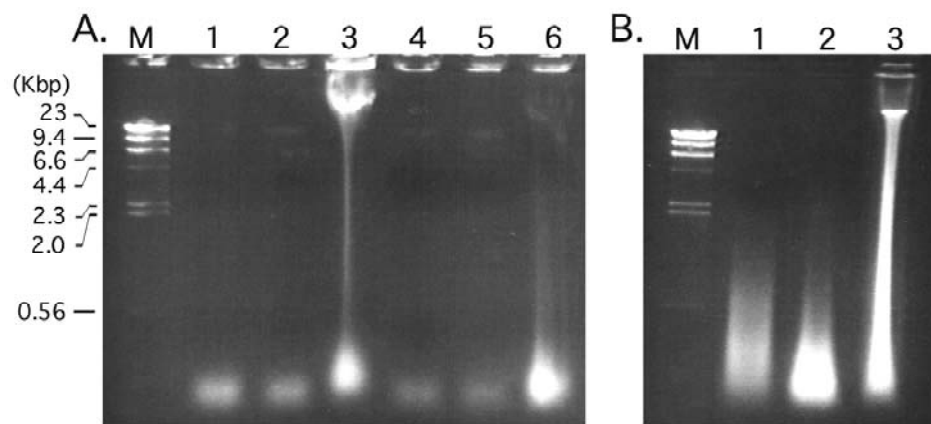


Fig. II-9 丸大豆納豆用蒸煮ダイズおよびそれから作製した丸大豆納豆(A), 挽割り納豆用蒸煮ダイズおよびそれから作製した挽割り納豆(B)から抽出した DNA の電気泳動写真

- A: 丸大豆納豆用蒸煮ダイズ(蒸煮温度 131 °C)およびそれから作製した丸大豆納豆
 1: non-GM ダイズの蒸煮ダイズ, 2: non-GM ダイズの丸大豆納豆(抽出時に水洗あり),
 3: non-GM ダイズの丸大豆納豆(抽出時に水洗なし), 4: RRS の蒸煮ダイズ, 5: RRS の丸大豆納豆(抽出時に水洗あり), 6: RRS の丸大豆納豆(抽出時に水洗なし), M: λ DNA *Hind*III digest standard
- B: 挽割り納豆用蒸煮ダイズ(蒸煮温度 115 °C)およびそれから作製した挽割り納豆
 1: non-GM ダイズの蒸煮ダイズ, 2: non-GM ダイズの挽割り納豆(抽出時に水洗あり),
 3: non-GM ダイズの挽割り納豆(抽出時に水洗なし), M: λ DNA *Hind*III digest standard

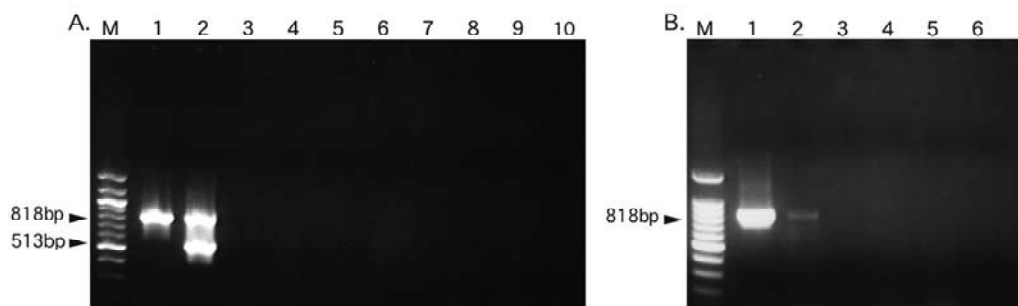


Fig. II-10 丸大豆納豆用蒸煮ダイズおよびそれから作製した丸大豆納豆(A), 挽割り納豆用蒸煮ダイズおよびそれから作製した挽割り納豆(B)からのダイズ内在性遺伝子 *Le1* および組換え DNA 配列の検知

▶ は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

A: 丸大豆納豆用蒸煮ダイズ(蒸煮温度 131 °C)およびそれから作製した丸大豆納豆
プライマー対は、No.3 および No.6 を混合して使用した。

1: non-GM ダイズ, 2: RRS, 3: non-GM ダイズの蒸煮ダイズ, 4: non-GM ダイズの丸大豆納豆(抽出時に水洗あり), 5: non-GM ダイズの丸大豆納豆(抽出時に水洗なし), 6: RRS の蒸煮ダイズ, 7: RRS の丸大豆納豆(抽出時に水洗あり), 8: RRS の丸大豆納豆(抽出時に水洗なし), 9: ネガティブコントロール(DNA なし), 10: ネガティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

B: 挽割り納豆用蒸煮ダイズ(蒸煮温度 115 °C)およびそれから作製した挽割り納豆
プライマー対は、No.6 を使用した。

1: non-GM ダイズ, 2: non-GM ダイズの蒸煮ダイズ, 3: non-GM ダイズの挽割り納豆(抽出時に水洗あり), 4: non-GM ダイズの挽割り納豆(抽出時に水洗なし), 5: ネガティブコントロール(DNA なし), 6: ネガティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

Table II-3 市販豆腐からの組換え DNA 配列の検知

品名	特記表示	サンプル数	<i>Le1</i> 検知数 ^{c)}	組換え DNA 配列検知数 ^{c)}
豆腐(木綿・絹)	あり ^{a)}	11	9 (2)	1 (1)
	なし	15	14 (1)	13 (0)
充填豆腐	あり ^{b)}	2	2 (0)	1 (0)
	なし	13	13 (0)	11 (0)
計		41	38 (3)	26 (1)

a) 国産減農薬大豆 100% 使用, 有機無農薬大豆 100% 使用,
100% 国産大豆使用, 県産大豆使用等

b) 有機無農薬大豆使用

c) ()内は nested PCR により検知した件数

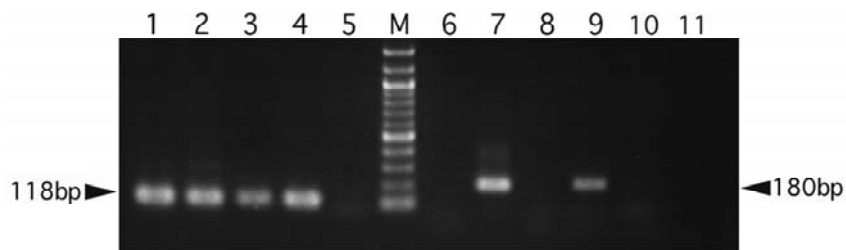


Fig. II-11 nested PCR による市販豆腐からの組換え DNA 配列の検知

▶, ◀ は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

プライマー対は、*Le1* 検知用 No.6 および No.7 (レーン 1 ~ 5) または組換え DNA 配列検知用 No.3 および No.5 (レーン 6 ~ 10)を使用した。

1 および 6: non-GM ダイズ, 2 および 7: 5 %RRS を含有したダイズ, 3 および 8: 市販豆腐 1, 4 および 9:市販豆腐 2, 5 および 10: ネガティブコントロール(DNA なし), 11: ネガティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

第三章 4 系統の GM トウモロコシ(Bt11, Event176, MON810, T25) の定性検知 技術の開発⁴⁶⁾

III-1 緒言

現在 GM ダイズ・トウモロコシは、GM 農作物の中でも広く栽培され、成功しているものである¹³⁾。我が国においては、ダイズ、トウモロコシおよびこれらの加工食品は GM 表示対象品目となっている。

我が国において食品としての安全性が確認されている GM トウモロコシは 25 系統ある。これから、安全性審査済みの系統同士を掛け合わせ育成した 11 系統を除き、さらに導入されている DNA の発現カセットが同一である Bt11 と Bt スイート、および T14 と T25 をそれぞれ 1 種類と考えると、12 種となる。この 12 種の GM トウモロコシには、害虫抵抗性形質または除草剤耐性形質もしくは両方の形質が導入されている。

そのうちの 8 種は、害虫抵抗性形質を持ち、Bt トウモロコシとも呼ばれ広く栽培されている。Bt は、土壌微生物 *Bacillus thuringiensis* の頭文字に由来し、*B. thuringiensis* は殺虫性のタンパク質(Bt タンパク質)を生産する。Bt タンパク質の殺虫力は選択性が高く、その菌株により殺虫性のタンパクが異なるため、殺虫スペクトルが異なる⁴⁷⁾。現在、Bt トウモロコシには、鱗翅目害虫(ガの仲間)を対象としたものと鞘翅目害虫(甲虫類)を対象としたものがある。アメリカ合衆国におけるトウモロコシ栽培において甚大な被害を与える害虫はアワノメイガであり、これはトウモロコシの生育期間中に二回のサイクルで発生する。アワノメイガは鱗翅目に属し、Bt トウモロコシ 5 種には、これに対して殺虫性のある Bt タンパク質を発現するように遺伝子が導入されている。Bt タンパク質は、鱗翅目害虫に摂取された後アルカリ性の消化管内で完全に消化されず限定分解を受け、毒性を示す特定のペプチドが残る。鱗翅目害虫には、このペプチドの受容体が小腸の粘膜にあり、ペプチドと受容体の結合により粘膜組織細胞が破壊され、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す⁴⁸⁻⁵⁰⁾。ヒトを含めたほ乳類では、酸性の胃液により Bt タンパク質は完全に消化され、さらに、消化器系に

毒性ペプチドの受容体がないため、影響を受けない⁵⁰⁻⁵²⁾。

除草剤耐性形質を持つトウモロコシは 9 種あり、除草剤 glufosinate 耐性のものと、glyphosate 耐性のものが開発されている。glufosinate は、植物のアンモニア代謝経路のグルタミン合成酵素を阻害する⁵³⁾が、glufosinate 耐性トウモロコシには、微生物由来の phosphinothricin-*N*-acetyltransferase 遺伝子が導入されており、glufosinate をアセチル化することにより影響を受けずに生育が可能となる。glyphosate は、II-1 緒言で述べたように、シキミ酸経路に関与する酵素 EPSPS に結合し、その活性を阻害する。glyphosate 耐性トウモロコシには、速度論的に glyphosate の阻害を受けない *epsps* 遺伝子が導入されている。その *epsps* 遺伝子は、RRS と同様に *Agrobacterium* sp. CP4 由来の *cp4-epsps* と、トウモロコシ自体の *epsps* 遺伝子を改変したトウモロコシ由来の *m-epsps* がある。

本章の研究開始時において、我が国では 4 系統の GM トウモロコシ(Bt11 , Event176 , MON810 および T14/T25)の安全性審査が終了していた。GM 農作物の検知技術としては、ジャガイモ⁵⁴⁾、トマト⁵⁵⁾、トウモロコシ^{56, 57)}、ダイズ^{32-34, 58)}からの PCR を利用した検知が報告されており、また、加工工程が PCR を利用した検知技術に与える影響についても、いくつか報告がなされていた^{32, 58-60)}。しかしながら、GM トウモロコシの検知技術としては、cauliflower mosaic virus 35S プロモーター領域、*B. thuringiensis* 由来の *cryIA(b)* 遺伝子または、*A. tumefaciens* 由来の nopaline synthase terminator 領域内を検知しており、各系統を特異的に検知可能なものの報告は多くなかった^{56, 57)}。そのため、4 系統の GM トウモロコシ(Bt11 , Event176 , MON810 および T14/T25)を対象に、信頼性のおける検知法の開発を目標とした。なお、T14 には、T25 と同一の DNA 構造が導入されているが、T25 には 1 コピーであるのに対し、T14 には 3 コピー導入されている。また、T14 の流通実績はないので、T25 を対象とした。

III-2 実験方法

III-2-1 材料および試薬

1) 材料

トウモロコシ(*Zea mays*): 次の 5 品種の乾燥種子を米国より直接入手し, 使用まで -20 °C で保存した.

- ・シンジェンタシード社(旧 ノースラップキング社)が開発した害虫抵抗性および除草剤 glufosinate 耐性 Bt11 の後代品種(Bt11)
- ・シンジェンタシード社(旧 チバシード社)が開発した害虫抵抗性 Event176 の後代品種(Event176)
- ・モンサント社が開発した害虫抵抗性 MON810 の後代品種(MON810)
- ・バイエルクロップサイエンス社(旧 ヘキストシェーリングアグレボ社)が開発した除草剤 glufosinate 耐性 T25 の後代品種(T25)
- ・パイオニアハイブレッド社の非組換えトウモロコシ品種(non-GM トウモロコシ) Hybrid3491

2) 試薬

- ・リボヌクレアーゼ A (RNase A): Sigma 社製クロマトグラフ精製品
- ・トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) : Sigma 社製試薬
- ・セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) : Sigma 社製試薬
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩(EDTA): 同仁化学社製試薬
- ・アガロース: 宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」
- ・DNA マーカー: ニューイングランドバイオラブ社製 λ DNA HindIII Digest , 1 kbp ラダー, 100 bp ラダー
- ・DNA ポリメラーゼ: 宝酒造(株)製 TAKARA Taq ポリメラーゼ
- ・PCR 緩衝液: DNA ポリメラーゼ添付品
- ・制限酵素: 宝酒造(株)製 EcoT14I , EcoRV , HincII

- ・制限酵素反応緩衝液:制限酵素添付の M buffer または H buffer
 - ・オリゴヌクレオチドプライマー:北海道システム・サイエンス(株)に合成委託したゲルろ過精製品
 - ・水: Milli-Q® 超純水製造装置(ミリポア社製)により精製したもの
- 他の試薬は,すべて特級品を用いた.

3) 試薬の調製

- ・フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液(PCI)
- ・クロロホルム/イソアミルアルコール混液(CIA)
- ・CTAB 緩衝液
- ・TE 緩衝液
- ・TAE 緩衝液

以上は, II-2-1 3) 試薬の調製に同じ.

4) 装置

使用した機器および装置は, Table II-1 と同じ.

III-2-2 方法

1) DNA の抽出方法

II-2-2 1)の (1) CTAB を用いる DNA 溶液の調製法 (CTAB 法)に同じ. ただし,次に示す改変を行った.

(前処理)

乾燥トウモロコシは,家庭用ミルで目視により粒径 1 mm 程度またはそれ以下に粉砕して 100 mg を抽出に供した.

(DNA 抽出)

最初の CTAB 抽出に用いる CTAB 緩衝液の添加量を 650 μ L とした. また,遠

心は、等容のイソプロパノールを加えて混和した後では $8,000 \times g$, そのほかでは $12,000 \times g$ で行った.

2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法

II-2-2 2) 抽出した DNA の純度の検定法および, II-2-2 3)の(1) 260 nm 吸光度からの抽出した DNA 量の定量法と同様に操作し, 抽出した DNA の純度の検定および抽出した DNA 量の定量を行った. PCR 用 DNA 溶液は 100 ng/ μ L の濃度にして -20°C で保存した.

3) PCR プライマーの設計

公開されている安全性評価資料から, Bt11 , Event176 , MON810 および T25 に導入されている DNA の構造を調べた. これらに導入された DNA 配列を解析するために, DNA データベースの情報⁶¹⁾および PEPC pro⁶²⁾, CDPK pro⁶³⁾, cauliflower mosaic virus (CMV)³⁸⁾, PAT⁶⁴⁾に関する論文を基に, 4 組のプライマー対を設計した. すなわち, Bt11 , MON810 シークエンス用に CM01 - CR02 プライマー対, Bt11 および T25 シークエンス用に CM03 - PA01 プライマー対, Event176 シークエンス用に PE01 - CR02 プライマー対および CD01 - CR02 プライマー対を設計した. シークエンス結果を基に, 各 GM 系統に特異的なプライマー対を設計することとした. また, GM 農作物に広く導入されている CMV 由来 35S promoter 領域(P-35S)検知用プライマー対として前章に示した CM01-CM02 を設計した. 抽出した DNA が PCR に十分な程度に精製されていることを確認するために, トウモロコシ内在性遺伝子から zein 遺伝子(*Ze1*)を選択し, 論文^{56, 65)}を基に, *Ze1* 検知用プライマー対として ZE01 - ZE02 を設計した.

4) PCR 条件

PCR は, サーマルサイクラー(ASTEC 社製 PC701 または Applied Biosystems 社製 GeneAmp PCR System 9700)を用いて行った.

(1) PCR 条件

PCR 反応液の組成は、1 × PCR 緩衝液、230 μmol/L dNTP、1.75 mmol/L MgCl₂、CM01 および CM02 プライマーにおいては各 0.2 μmol/L、それ以外の 5'-, 3'-プライマーにおいては各 1.0 μmol/L、1.25 units DNA ポリメラーゼおよび 250 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は、プレインキュベーション 94 °C で 3 分の後、熱変成 94 °C で 1 分、アニーリング 60 °C で 1 分、伸長反応 74 °C で 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクル行い、最後に 72 °C で 7 分伸長反応を行った。

(2) Multiplex PCR 条件

Multiplex PCR 反応液の組成は、1 × PCR 緩衝液、230 μmol/L dNTP、1.75 mmol/L MgCl₂、各 0.125 μmol/L ZE01 および ZE プライマー、各 0.25 μmol/L IV01、PE01、HS01、CR01 プライマー、1.25 units DNA ポリメラーゼおよび 250 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は、上記(1) PCR 条件に同じ。

5) シークエンス方法

シークエンス用プライマー対を用いた PCR 産物のシークエンスを行った。II-2-

2 6) シークエンス方法に従って、シークエンスした。

6) PCR 産物の制限酵素消化の方法

制限酵素 *HincII* は M buffer 要求性であり、*EcoRV* および *EcoT14I* は、H buffer 要求性であるため、PCR 溶液の持ち越しの塩を除くことなく制限酵素消化を行った。PCR 溶液は、5 μL を制限酵素処理に使用し、37 °C で 30 分間消化した。消化後、反応液全量を電気泳動し、写真撮影を行った。

7) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法

II-2-2 8) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法に同じ。

III-3 結果

1) トウモロコシ種子からの CTAB 法による DNA 抽出の検討

トウモロコシ種子からの DNA 抽出は、ダイズ種子から PCR に適した DNA 抽出が可能であった CTAB 法を検討した。CTAB 法により抽出した DNA のゲル電気泳動写真では、低分子化および RNA の残存のない単一のバンドが見られた。また、この DNA 溶液を用いた PCR により、トウモロコシ内在性遺伝子 *Zel* の検知が可能であった。抽出した DNA 溶液の吸光度比から純度を検定したところ、 $260 \text{ nm} / 230 \text{ nm} > 1.8$ 、および $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm} = 1.8 \sim 2.0$ となった。さらに、DNA 溶液の 260 nm 吸光度から定量した DNA 量は、PCR を行うのに十分な量であった。しかし、同一試料から調製した DNA 溶液でも、吸光度、吸光度比にはばらつきがみられ、ダイズ種子と同様にトウモロコシ種子においても、DNA の厳密な定量と純度検定を行うことは困難であった。

2) DNA シークエンスの解析と各系統に特異的なプライマーの設計

第 V 章においてシークエンスの解析を示す。また、次に 4 系統 GM トウモロコシの DNA 構造を示すとともに、Fig. III-1 に導入されている遺伝子構造の模式図を示した。

(1) Bt11

Bt11 に導入されている発現カセットは次の 2 カセットである。

- ・害虫抵抗性形質: [CMV 由来 35S promoter (P-35S)]-[トウモロコシ alcohol dehydrogenase 1 gene (*adh1-S*)の No.6 intron を含む DNA 断片 (IVS6)]-[*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* の HD-1 株由来 synthetic *cryIA* (*b*)]- [*Agrobacterium tumefaciens* 由来 nopaline synthase terminator (NOS-ter)]
- ・選択マーカーとして導入されている除草剤 glufosinate 耐性形質: [P-35S]-[*adh1-S* の No.2 intron を含む DNA 断片 (IVS2)]-[*Streptomyces*

viridochromogenes 由来 synthetic phosphinothricin *N*-acetyltransferase (*pat*)
gene]-[NOS-ter]

本章でシーケンスを行った部分は, [P-35S]-[synthetic *cryIA(b)*]間の 1,226 bp ,
[P-35S]-[*pat*]間の 692 bp であり, Fig. III-1 A の破線部である.

(2) Event176

Event176 に導入されている発現カセットは次の 3 カセットである.

- ・害虫抵抗性形質: [トウモロコシ由来 phosphoenol pyruvate carboxylase promoter (PEPC pro)]-[synthetic *cryIA(b)* gene]-[トウモロコシ由来 phosphoenol pyruvate carboxylase の No.9 intron を含む DNA 断片(PEPC#9 int.)]-[CMV 由来 35S terminator (T-35S)]
- ・害虫抵抗性形質: [トウモロコシ由来カルシウム依存 protein kinase promoter (CDPK pro)]-[synthetic *cryIA(b)*]-[PEPC#9 int.]-[T-35S]
- ・選択マーカーとして導入されている除草剤 glufosinate 耐性形質: [P-35S]-[*Streptomyces hygroscopicus* 由来 phosphinothricin *N*-acetyltransferase (*bar*) gene]-[T-35S]

本章でシーケンスを行った部分は, [PEPC pro]-[synthetic *cryIA(b)*]間の 936 bp
および[CDPKpro]-[synthetic *cryIA(b)*]間の 886 bp であり, Fig. III-1 B の破線部
である.

(3) MON810

MON810 に導入されている発現カセットは次の 1 カセットである.

- ・害虫抵抗性形質: [CMV 由来の DNA 断片を 2 回反復した領域含む 35S promoter (E-35S)]-[トウモロコシ *hsp70* gene (heat-shock protein) の No.1 intron を含む DNA 断片(*hsp70* int.)]-[synthetic *cryIA(b)*]

本章でシーケンスを行った部分は, [E-35S]-[synthetic *cryIA(b)*]間の 1,416 bp
であり, Fig. III-1 C の破線部である.

(4) T25

T25 に導入されている発現カセットは次の 1 カセットである.

・除草剤 glufosinate 耐性形質: [P-35S]-[pat]-[T-35S].

本章でシーケンスを行った部分は, [P-35S]-[pat]間の 601 bp であり, Fig. III-1 D の破線部である.

これらのシーケンス結果から, 4 系統の GM トウモロコシに導入されている構造遺伝子 *cryIA(b)* または *pat* と, プロモーターまたはイントロンとの間を増幅するようにプライマー対 IV01 - CR01, PE01 - CR01, HS01 - CR01 および CM03 - PA01 の設計を行った(Table III-1, Fig. III-1 および Fig. III-2). これらは, それぞれ Bt11, Event176, MON810 および T25 の検知用である. Bt11, Event176 および MON810 には, *cryIA(b)* が導入されている. Fig. III-2 に, Bt11, Event176 および MON810 に導入されている *cryIA(b)* の開始コドン(ATG)から 108 bp とそれから予想される 36 アミノ酸残基を比較した. Bt11, Event176 および MON810 に導入されている *cryIA(b)* は, コードされている CryIA(b)タンパクは同一であるが, DNA 配列は改変されていたため, CR01 プライマーは, 各 *cryIA(b)* の相同性の高い部分から設計した.

3) 系統特異的プライマーの特異性と検知感度

作製したプライマー対の特異性を確認するため, トウモロコシから抽出した DNA を鋳型として PCR を行った. Fig. III-3 に示すように, IV01 - CR01, PE01 - CR01 および HS01 - CR01 プライマー対については, 対象とした GM トウモロコシからのみ予想された長さの増幅産物を検知することができた. CM03-PA01 プライマー対については, 対象とした T25 のほか Bt11 から増幅産物が見られた. T25 の増幅産物については, 予想された長さであった. Bt11 の増幅産物は, Bt11 のシーケンスの結果から 522 bp と考えられた. これは, T25 プライマー対の検知対象部分が [P-35S]-[pat] であるのに対し, Bt11 は [P-35S]-[adh1-1S IVS2]-[pat] 部分を検知していることによる. T25 と Bt11 の判別は, その増幅産物の長さから容易である. 増幅バンドが, 組換え体由来であることを確認するために制限酵素処理を行った. Bt11, Event176, MON810 および T25 の増幅部分のシーケンス情報より, Bt11 増幅バ

ンド確認用に *Eco*T14I , Event176 増幅バンド確認用に *Eco*T14I , MON810 増幅バンド確認用に *Hinc*II , T25 増幅バンド確認用に *Eco*RV を選択し, 予想されたとおり, Bt11 増幅バンド 437 bp は 207 bp と 151 bp , Event176 増幅バンド 619 bp は 392 bp と 227 bp , MON810 増幅バンド 193 bp は 113 bp と 80 bp , T25 増幅バンド 231 bp は 151 bp と 80 bp の断片となった. なお, Bt11 増幅バンドの *Eco*T14I 消化の 57 bp および 22 bp の断片は, 短いために確認できなかった. これにより, 増幅したバンドは確実に組換え体由来であることが確認できた.

さらに, 検知感度を調べるために non-GM トウモロコシに各系統の GM トウモロコシを 0.005 , 0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1 % 含むように混合し, DNA を抽出後各 GM 検知用プライマーを用いて, Bt11 , Event176 , MON810 および T25 の検知をそれぞれ行った. 結果を Fig. III-4 ~ Fig. III-7 にそれぞれ示す. Bt11 において 0.01 % まで(Fig. III-4), また Event176 , MON810 および T25 においては 0.05 % まで(Fig. III-5 ~ Fig. III-7), 増幅バンドより組換え体の存在を明確に検知することが可能であった.

4) CMV 由来 P-35S 検知用プライマー対の特異性の確認

GM 農産物に広く導入されている CMV 由来 P-35S の検知は, スクリーニング法として利用が期待される. そのため, P-35S を検知する CM01 - CM02 プライマー対を用いて, 各トウモロコシから抽出した DNA を鋳型として PCR を行った. Fig. III-8 に示す. 予想される 220 bp の増幅産物が得られた.

5) Multiplex PCR 法による Bt11 , Event176 , MON810 の検知とその検知感度

Bt11 , Event176 および MON810 検知用プライマー対およびトウモロコシ内在性遺伝子検知用プライマー対を混合し, 1 本のチューブ中で組換え DNA 配列の検知を行う Multiplex PCR について検討した. その結果を Fig. III-9 に示す. 鋳型 DNA として non-GM トウモロコシから抽出した DNA を用いて Multiplex PCR を行ったところ, *Zel*1 にのみ予想される長さの増幅バンドが見られ, 偽陽性の増幅バンドは見られな

った(Fig. III-9 Lane 1). さらに, 検知感度を調べるために, non-GMトウモロコシに各系統の GM トウモロコシを 1 , 5 , 33 %ずつ含むように混合し, DNA を抽出後 Multiplex PCR を行った. ゲル電気泳動写真より, 各系統の GM トウモロコシを 5 % ずつ含む場合では, 増幅バンドより組換え体の存在を明確に検知することができ, 各系統を鑑別することが可能であった. また, non-GM トウモロコシに Bt11 , Event176 または MON810 のいずれか一つの GM トウモロコシを 1 %含むように混合後 DNA を抽出し, Multiplex PCR を行ったところ, トウモロコシ内在性遺伝子と検知対象の GM トウモロコシにのみ予想される長さの増幅バンドが見られた. これより単一の GM 系統が, non-GM トウモロコシに入っている場合は, 1 %まで検知することが可能となった.

III-4 考察

1) CTAB 法により可能なトウモロコシ種子からの PCR に適した DNA 抽出

PCR を用いた技術は, 分子生物学分野において確立され, 一般的に行われるようになった. そして食品分析の分野においても, 重要な技術の一つとなっている. PCR を食品分析に使用する場合, まず, PCR に適した DNA 抽出法の検討が不可欠である. 前章において, ダイズ種子から PCR に適した DNA 抽出が可能であった CTAB 法を, トウモロコシ種子に適用し DNA を抽出した. ダイズから抽出した DNA とトウモロコシから抽出した DNA とを比較すると, 260 nm/ 230 nm の吸光度比が低い. しかし, PCR を行うのに十分な量の DNA が抽出でき, また, ゲル電気泳動結果から, RNA の残存していない長鎖の DNA が抽出できた. さらに, PCR による内在性遺伝子 *Zel* の検知が可能であった. そのため, CTAB 法はトウモロコシ種子からの DNA の抽出に適していることが明らかとなった.

2) 各 GM トウモロコシ系統に特異的なプライマーと明らかになった検知感度

本章では, GM トウモロコシを個別に検知するプライマー対の設計を行い, Bt11 ,

Event176 および MON810 については、特異的なプライマーの設計に成功し、T25 については、Bt11 から PCR の増幅産物が確認されたが、T25 と Bt11 はその増幅産物の長さから容易に判別ができるプライマーの設計に成功した。Bt11、Event176 および MON810 のシーケンス結果の解析により、*cryIA(b)* の DNA 配列が異なっていることが明らかとなった。微生物由来の有用な遺伝子を植物体に導入する場合、植物体中でそのタンパクを高発現させるため、アミノ酸配列を変えずに GC % を上げることが一般に行われている⁶⁶⁾。*cryIA(b)* は、複数の企業において検討され、その植物体への導入には開発企業により異なる改変を行っていた。本章では、Bt11、Event176、MON810 検知用の 3'-プライマーは、同一となるように設計したが、これにより、多くのプライマーが存在することによる分析現場での混乱を避けることができると考えられる。特異性は高く、これは 5'側をイントロンまたはプロモーターと異なるの DNA 配列から設計したことによる。*phosphinothricin-N-acetyltransferase* をコードしている *pat* と *bar* については、DNA 配列の相同性は約 65 % である。T25 の検知のため、[P-35S]-[*pat*]領域を増幅しているが、一方、Event176 には、[P-35S]-[*bar*]が導入されている。プライマー設計には、導入されている DNA 配列の情報が重要であり、*pat* および *bar* の場合、DNA 配列の相同性が低い部分で設計することが重要である。

それぞれのプライマー対の検知感度は、Bt11 においては 0.01 %、また Event176、MON810 および T25 においては 0.05 % 程度と判断されたが、これは、GM 由来の DNA 量として Bt11 では 25 pg/ tube、Event176 と MON810 および T25 では 125 pg/ tube に相当する。トウモロコシのゲノムサイズ 3.9×10^9 bp/ haploid⁶⁷⁾ から換算したときの GM トウモロコシ由来のゲノム数は、Bt11 において 2.8 diploid/ tube、Event176、MON810 および T25 では 14.2 diploid/ tube である。トウモロコシ種子は、F1 ハイブリッド種子として販売されているため、GM 系統由来は diploid の一方である。PCR の検知領域がゲノム DNA に 1 コピー存在する場合、diploid のゲノム数が PCR のターゲット数となる。PCR は理論的に、ターゲットが 1 コピーあれば増幅は可能であるので、PCR 条件、PCR に適した DNA の抽出法の検討を行い、最適化することにより検知感度は、さらに向上させることが可能と考えられる。しかし、GM の表示制度に

における non-GM トウモロコシへの GM トウモロコシの意図せざる混入の許容値である 5 %^{19, 20)}に比べ十分な検知感度であると考えられた。この各 GM トウモロコシ由来の PCR 増幅産物は、制限酵素処理を行うことにより、バンドの由来を確実に検証することが可能である。実際の検査において、非特異的なバンドが見られた場合に簡便にその由来を検定することができ、実用性が高い。

3) P-35S を検知するスクリーニング法と、 Bt11 , Event176 , MON810 を鑑別する Multiplex PCR 法により可能な GM トウモロコシの簡便な検知

P-35S を検知するスクリーニング法と、 Bt11 , Event176 , MON810 を鑑別する Multiplex PCR により、 GM トウモロコシを簡便に検知することが可能である。 GM トウモロコシは、今後増加が見込まれており、より簡便な検知法の開発が不可欠である。 GM 農作物に広く利用されている P-35S の検知は、原料または製品に GM 農産物が存在しているかを簡便に把握する方法として有用であると考えられる。 Bt11 , Event176 , MON810 および T25 から、 P-35S を検知することが可能となり、 non-GM トウモロコシと GM トウモロコシのスクリーニングが可能となった。しかし、 Fig. III-8 のゲル電気泳動写真では、得られるバンド強度は一定ではないため、今後プライマーの再設計を含めた PCR 条件の再設定が必要であることが示唆された。

一方で Multiplex PCR 法は、 GM トウモロコシの系統を容易に判別する方法として有用であると考えられる。食品中に GM トウモロコシを含むか否かのみならず、最終的には、どの程度含むかを明らかにする定量法の開発が必要とされている。 GM トウモロコシの定量は、各 GM 系統の定量値の合算として算出されるため、定量対象となる GM トウモロコシの簡便な検知が必要とされる。害虫抵抗性形質を持つ 3 系統の GM トウモロコシ Bt11 , Event176 および MON810 の Multiplex PCR 法による検知を検討したところ、1 本のチューブ内で簡便な鑑別が可能となった。検知感度は、各系統が複数混合して存在する場合 5 % , 1 系統のみ存在する場合 1 %であった。プライマー対を個々で用いたときに比べ、この検知感度は大きく低下しているが、これは1つのチューブ内で複数の増幅を行うためと考えられた。また、 PCR 増幅産物の

バンド強度について、Event176由来のバンドが他のトウモロコシ由来バンドより弱い
が、これはEvent176のPCR増幅産物の長さが、他の産物と比べ長いことが原因と考
えられた。このMultiplex PCR法の検知感度は、実際の検査においても十分に適応
可能であると考えられた。従来、GMトウモロコシの系統を判別するのは、1本のチ
ューブで1系統ずつ行われていた。本Multiplex PCRは、多系統のGMトウモロコシ
を1本のチューブで簡便に鑑別する方法として特願平 11-249816 にて特許を出願し、
第IV章の結果を加えて、特許 3502906 (2003/12/9)「遺伝子組換えトウモロコシ及びこ
れを含む加工食品からの組換え遺伝子検知法」として成立している。

4) 今後の検知技術の開発において考慮すべき点

本章で示した検知技術は、4系統のGMトウモロコシの検知に対し基礎的な技術
であり、我が国において初めてGMトウモロコシ4系統の検知技術を開発して検知
感度を明らかにしたものである。しかし、DNAの抽出については、前章同様、CTAB
法は、クロロホルム、フェノールといった環境や実験従事者に対し有害な有機溶媒を
使用すること、実験操作に熟練が必要とされることから、これらを解決する抽出法の
探索が今後の検査法の開発において必要である。また、プライマーの設計について
は、T25 および Bt11 に導入されているDNA配列の解析のうち、特に、T25 に導入
されている[par]-[T-35S]の解析を進めることにより、T25のみを検知するプライマー対
の設計が望ましい。さらに、Multiplex PCRを進展させ検査対象GM系統を増加さ
せることは、今後も増加の予想されるGM系統に対して、簡便迅速に系統を鑑別し、
定量分析の必要なGM系統をスクリーニングする技術として重要であると考えられる。
加工食品への対応については、本章で設計したプライマーをそのまま加工食品に適
用すべきではないと考えられる。ゲノムDNAは、加熱や物理的加工により分解さ
れるため、加工食品からの検知は、PCR増幅産物の長さの短いプライマー対の設計
が必要であると考えられる。

Table III-1 作製したプライマーの一覧

Name	Sequence	specificity
シーケンス用		
CM01	5'-CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A-3'	CMV/ sense
CR02	5'-CTC TCG GCG TAG ATT TGG TAC A-3'	<i>cryIA(b)</i> / anti-sense
CM03	5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'	CMV/ sense
PA02	5'-AGG AGC TGG CAA CTC AAA ATC CCT-3'	<i>pat</i> / anti-sense
PE01	5'-AGA TTC ACT CCG ATG CAG CCT A-3'	PEPC-pro/ sense
CR02	5'-CTC TCG GCG TAG ATT TGG TAC A-3'	<i>cryIA(b)</i> / anti-sense
CD01	5'-CGG ATG GTC CTT ATG CAA TTT TGT C-3'	CDPK-pro/ sense
CR02	5'-CTC TCG GCG TAG ATT TGG TAC A-3'	<i>cryIA(b)</i> / anti-sense
GMトウモロコシ検知用		
CM01	5'-CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A-3'	CMV/ sense
CM02	5'-CTT ATA TAG AGG AAG GGT CTT GCG A-3'	CMV/ anti-sense
IV01	5'-GGT ACA GTA CAC ACA CAT GTA T-3'	<i>adh1-1S</i> / sense
CR01	5'-GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT-3'	<i>cryIA(b)</i> / anti-sense
CM03	5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'	CaMV/ sense
PA01	5'-AGA TCA TCA ATC CAC TCT TGT GGT G-3'	<i>pat</i> / anti-sense
PE01	5'-AGA TTC ACT CCG ATG CAG CCT A-3'	PEPC-pro/ sense
CR01	5'-GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT-3'	<i>cryIA(b)</i> / anti-sense
HS01	5'-AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT-3'	<i>hsp70</i> / sense
CR01	5'-GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT-3'	<i>cryIA(b)</i> / anti-sense
トウモロコシ内在性遺伝子検知用		
ZE01	5'-TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG-3'	<i>Zei1</i> sense
ZE02	5'-GTC GCA GTC ACA TTG TGG CAT-3'	<i>Zei1</i> / anti-sense
		Maize: 329 bp

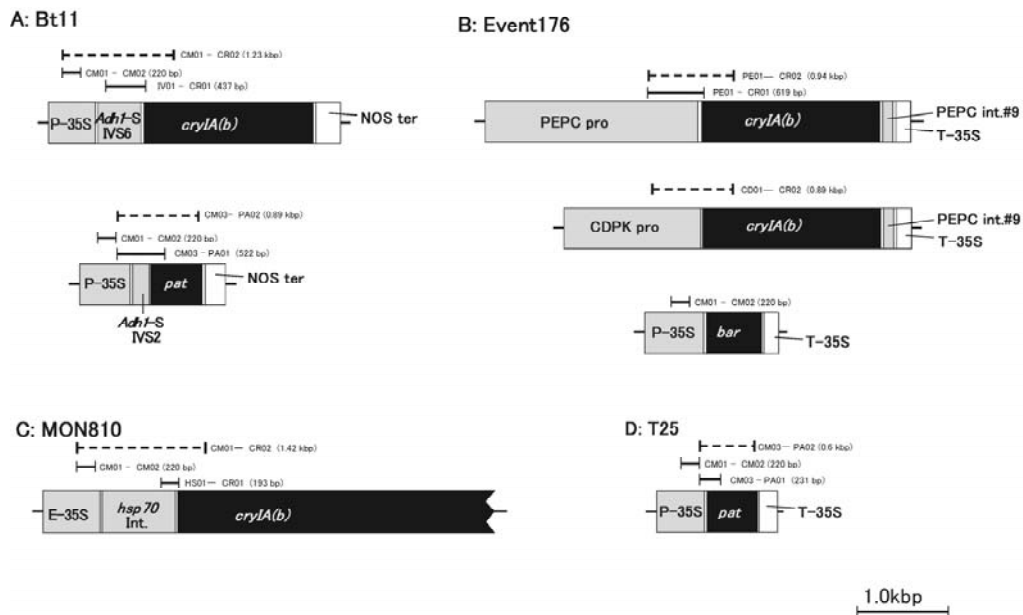


Fig. III-1 4系統 GMトウモロコシに導入されている DNA 配列および PCR 増幅部位の模式図

破線(┆-┆)は、シーケンスした部分を示す。

実線(┆-┆)は、検知用に設計した PCR 増幅部位を示す。

()内は、増幅長を示す。

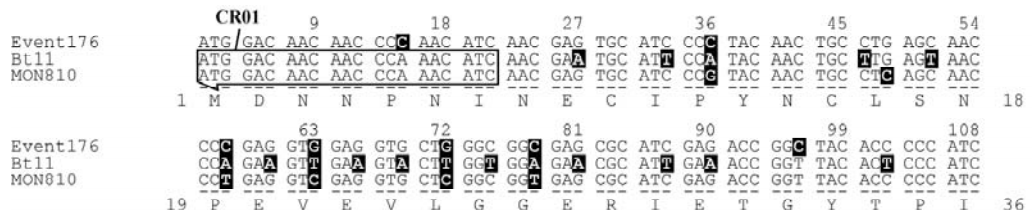


Fig. III-2 Event176, Bt11 および MON810 系統に導入されている[*cryIA(b)*]の一部とそれから予想されるアミノ酸配列の比較

*cryIA(b)*の開始コドン(ATG)のアデニンを1として番号を付け、最初から108 bp、36アミノ酸残基を比較した。

DNA配列の異なっている部分は、白抜き文字で示した。

*cryIA(b)*の相同性の高い部分から設計したCR01プライマーの位置を中抜き矢印(□)で示した。

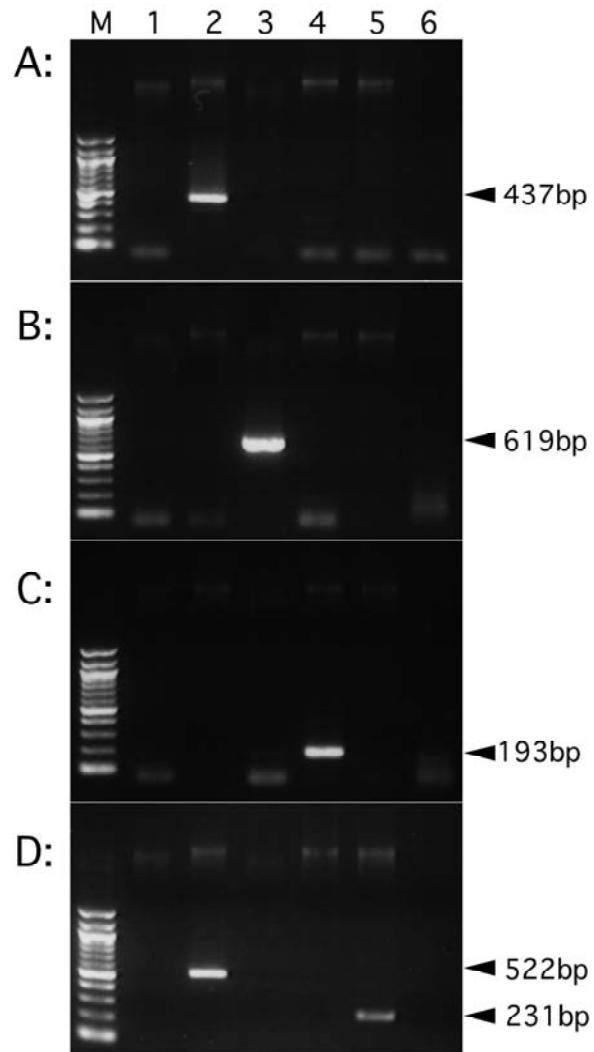


Fig. III-3 各 GM トウモロコシ検知用プライマーの特異性確認

GM トウモロコシ (Bt11, Event176, MON810 および T25) から抽出した DNA 溶液を混合して鑄型とした。

◀ は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

A: プライマー対 IV01-CR01 を使用した

B: プライマー対 PE01-CR01 を使用した

C: プライマー対 HS01-CR01 を使用した

D: プライマー対 CM03-PA01 を使用した

1: Bt11, 2: Event176, 3: MON810, 4: T25,

5: ネガティブコントロール (DNA なし), 6: ネ

ガティブコントロール (プライマーなし), M:

100 bp ラダー

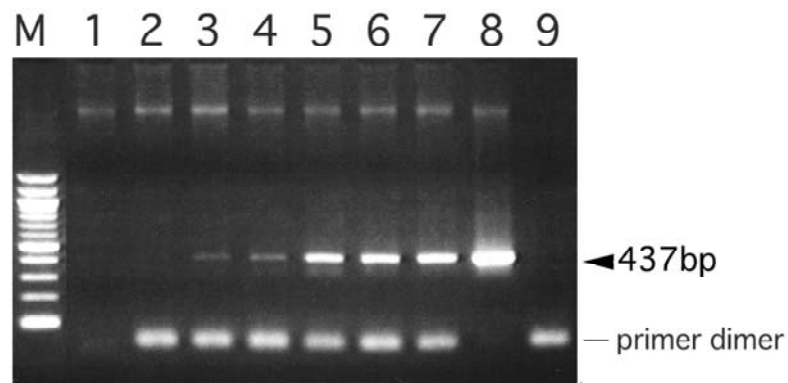


Fig. III-4 Bt11 検知用プライマー対の検知感度

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

鋳型 DNA は、non-GM トウモロコシと Bt11 の混合物から抽出した DNA を用いた。

1: non-GMトウモロコシ, 2: 0.005 % Bt11 含有トウモロコシ,
 3: 0.01 % Bt11 含有トウモロコシ, 4: 0.05 % Bt11 含有トウモロコシ,
 5: 0.1 % Bt11 含有トウモロコシ, 6: 0.5 % Bt11 含有トウモロコシ,
 7: 1 % Bt11 含有トウモロコシ, 8: Bt11, 9: ネガティブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

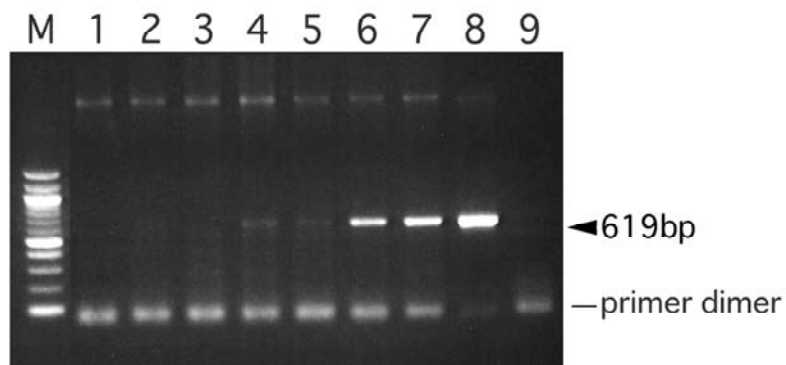


Fig. III-5 Event176 検知用プライマー対の検知感度

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

鑄型 DNA は、non-GM トウモロコシと Event176 の混合物から抽出した DNA を用いた。

1: non-GM トウモロコシ, 2: 0.005 % Event176 含有トウモロコシ, 3: 0.01 % Event176 含有トウモロコシ, 4: 0.05 % Event176 含有トウモロコシ, 5: 0.1 % Event176 含有トウモロコシ, 6: 0.5 % Event176 含有トウモロコシ, 7: 1 % Event176 含有トウモロコシ, 8: Event176, 9: ネガティブコントロール (DNA なし), M: 100 bp ラダー

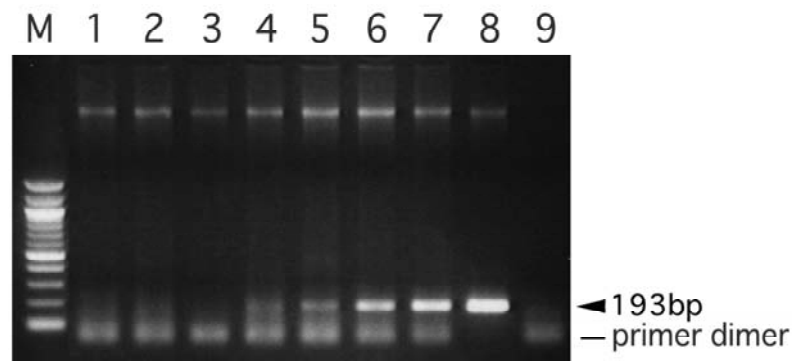


Fig. III-6 MON810 検知用プライマー対の検知感度

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

鋳型 DNA は、non-GM トウモロコシと MON810 の混合物から抽出した DNA を用いた。

1: non-GM トウモロコシ, 2: 0.005 % MON810 含有トウモロコシ, 3: 0.01 % MON810 含有トウモロコシ, 4: 0.05 % MON810 含有トウモロコシ, 5: 0.1 % MON810 含有トウモロコシ, 6: 0.5 % MON810 含有トウモロコシ, 7: 1 % MON810 含有トウモロコシ, 8: MON810, 9: ネガティブコントロール (DNA なし), M: 100 bp ラダー

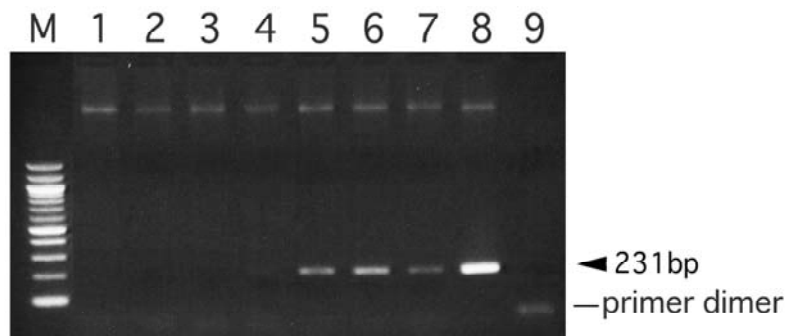


Fig. III-7 T25 検知用プライマー対の検知感度

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

鑄型 DNA は、non-GM トウモロコシと T25 の混合物から抽出した DNA を用いた。

1: non-GM トウモロコシ, 2: 0.005 % T25 含有トウモロコシ,
3: 0.01 % T25 含有トウモロコシ, 4: 0.05 % T25 含有トウモ
ロコシ, 5: 0.1 % T25 含有トウモロコシ, 6: 0.5 % T25 含有ト
ウモロコシ, 7: 1 % T25 含有トウモロコシ, 8: T25, 9: ネガテ
ィブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

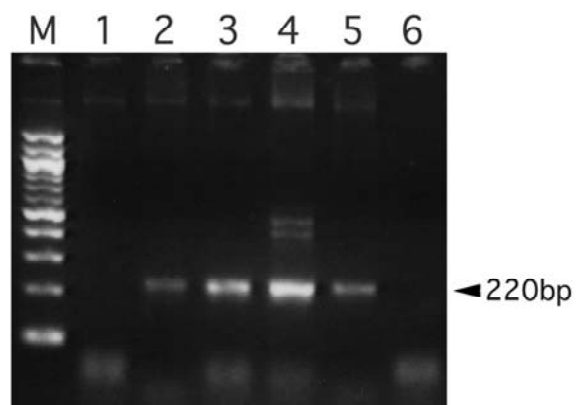


Fig. III-8 P-35S 検知用プライマー対 CM01-CM02 の特異性確認

GMトウモロコシ(Bt11, Event176, MON810 および T25)からそれぞれ抽出した DNA 溶液を鋳型とした。

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

1: Bt11, 2: Event176, 3: MON810, 4: T25, 5: ネガティブコントロール(DNA なし), 6: ネガティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

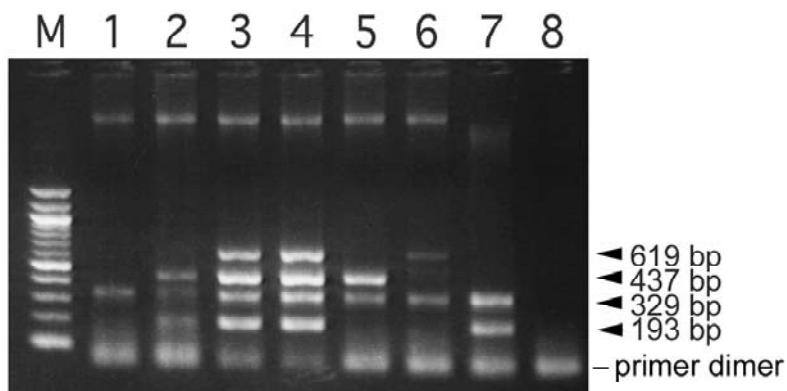


Fig. III-9 Multiplex PCR による Bt11, Event176 および MON810 の検知

▲ は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

レーン 2 ~4の鑄型 DNA は、non-GM トウモロコシと各 GM トウモロコシの等量混合物とを混合したものから抽出した DNA を用いた。

1: non-GM トウモロコシ, 2: 各 1 % の Bt11, Event176 および MON810 を含有したトウモロコシ, 3: 各 5 % の Bt11, Event176 および MON810 を含有したトウモロコシ, 4: 各 33 % の Bt11, Event176 および MON810 を含有したトウモロコシ, 5: 1 % Bt11 含有トウモロコシ, 6: 1 % Event176 含有トウモロコシ, 7: 1 % MON810 含有トウモロコシ, 8: ネガティブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

第 5 章 5 系統の GM トウモロコシ(Bt11 , Event176 , MON810 , T25 , GA21) の Multiplex PCR による簡便な鑑別技術の開発⁶⁸⁾

- 1 緒言

1996 年に米国において GM 農作物の本格的な商業栽培が行われて以降、世界における GM 農作物の耕作面積は年々増加し¹³⁾、また、各国での食品としての安全性審査の終了した GM 系統数も増加している。日本では、いまだ本格的な GM 農作物の商業栽培は行われていないものの、食品としての安全性審査の終了した GM 農作物の系統数は、1996 年の 7 系統から 2005 年 12 月 15 日現在 73 系統となっている。今後増加の予想される GM 系統に対して、如何に簡便に検査を行うかが課題となってくると考えられる。

本章では、Event176 , Bt11 , MON810 , T25 , GA21 の 5 系統の GM トウモロコシを対象にし、簡便に各系統を検知・判別する技術の開発を行うことを目標とした。GA21 系統は、モンサント社が開発した GM トウモロコシである。第 4 章で示した研究から本章の研究を開始するまでに我が国において食品としての安全性審査が終了したが、当時 EU 等では GA21 系統の安全性審査が終了しておらず、日本から EU 等に輸出した加工食品等に GA21 系統が存在していた場合、重大な食品危害と受け取られると考えられた。また、MON810⁶⁹⁾および Event176⁵⁷⁾についての特異的検知法の報告はされていたが、GA21 系統については報告がなかった。そのため、GA21 系統の特異的な検知技術の開発が必要であった。さらに、前章において T25 検知用プライマーを用いて Bt11 から増幅バンドが見られたため、T25 特異的検知法の開発が必要であった。これら 5 系統の GM トウモロコシの鑑別には、第 4 章で示した Multiplex PCR による 3 系統 GM トウモロコシの鑑別法をさらに進展させ、1 本のチューブ中で特異的に行うことを目標とした。第 4 章に示すまで 3 系統の GM トウモロコシを特異的に鑑別する方法はなく、さらに鑑別できる系統数を増やした 5 系統 GM トウモロコシの Multiplex PCR は新しい試みである。本章では Multiplex PCR に加え

て、トウモロコシからの DNA の抽出法としてシリカスピンカラムを用いる市販の DNA 抽出キットの検討を行い、第 4 章に示した CTAB 法よりもさらに簡便な方法の探索も目標とした。

- 2 実験方法

- 2 - 1 材料および試薬

1) 材料

トウモロコシ(*Zea mays*): 次の 6 品種の乾燥種子を米国より直接入手し, 使用まで -20 で保存した.

- ・シンジェンタシード社(旧 ノースラップキング社)が開発した害虫抵抗性および除草剤 glufosinate 耐性 Bt11 の後代品種(Bt11)
- ・シンジェンタシード社(旧 チバシード社)が開発した害虫抵抗性 Event176 の後代品種(Event176)
- ・モンサント社が開発した害虫抵抗性 MON810 の後代品種(MON810)
- ・モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 GA21 の後代品種(GA21)
- ・バイエルクロップサイエンス社(旧 ヘキストシェーリングアグレボ社)が開発した除草剤 glufosinate 耐性 T25 の後代品種(T25)
- ・デイリーランド社の非組換えトウモロコシ品種(non-GMトウモロコシ) Hybrid1412

ダイズ(*Glycine max*): 次の 2 品種の乾燥種子を米国より直接入手し, 使用まで -20 で保存した.

- ・モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 40-3-2 Roundup Ready® Soy の後代品種(RRS)
- ・非組換えダイズ品種(non-GM soy)として 1998 年米国オハイオ州産種子

その他の穀類: 次の 3 農作物を入手し, 使用まで -20 で保存した.

- ・コメ(*Oryza sativa*)は, 1998 年産キヌヒカリ品種を中国農業試験場から入手した.
- ・コムギ(*Triticum aestivum*)は, ハルユタカ品種を用いた.
- ・オオムギ(*Hordeum vulgare*)は, Harrington 品種を用いた.

2) 試薬

- ・リボヌクレアーゼ A (RNase A): Sigma 社製クロマトグラフ精製品
- ・トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) : Sigma 社製試薬
- ・セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) : Sigma 社製試薬
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩(EDTA): 同仁化学社製試薬
- ・アガロース: 宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」
- ・DNA マーカー: ニューイングランドバイオラブ社製 λ DNA *Hind*III Digest , 1 kbp ラダー , 100 bp ラダー
- ・DNA ポリメラーゼ: 宝酒造(株)製 Takara Taq ポリメラーゼ又は , Applied Biosystems 社製 AmpliTaq™ Gold
- ・PCR 緩衝液: Takara Taq ポリメラーゼ使用時は添付品 , AmpliTaq™ Gold 使用時は Applied Biosystems 社製 PCR buffer II
- ・制限酵素: 宝酒造(株)製 *Sse*8387I , *Sfi*I , およびニューイングランドバイオラブ社製 *Bsa*AI , *Bst*EII , *Xba*I
- ・制限酵素反応緩衝液: 各制限酵素添付品
- ・オリゴヌクレオチドプライマー: グライナー・ジャパンに合成委託した逆相カートリッジ精製品
- ・水: CPW-200 超純水装置(アドバンテック(株)製)により精製したもの
他の試薬は , すべて特級品を用いた .

3) 試薬の調製

- ・フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液(PCI)
- ・クロロホルム/イソアミルアルコール混液(CIA)
- ・CTAB 緩衝液
- ・TE 緩衝液
- ・TAE 緩衝液

以上は、 - 2 - 1 3) 試薬の調製に同じ。

4) 装置

使用した機器および装置は、Table -1 に示した。

- 2 - 2 方法

1) DNA の抽出方法

(1) CTAB を用いる DNA 溶液の調製法 (CTAB 法)

- 2 - 2 1)の DNA の抽出方法に同じ。ただし、前処理について次に示す改変を行った。

(前処理)

乾燥トウモロコシは、粉砕器(佑崎有限公司製 model DM-6)で目視により粒径 0.5 mm 程度に粉砕して 100 mg を抽出に供した。

(2) シリカスピンカラムを用いるキット(QIAGEN 社製 DNeasy Plant Maxi Kit)による DNA 溶液の調製法(シリカスピンカラム法)

(前処理)

乾燥種子は、粉砕器で目視により粒径 0.5 mm 程度に粉砕して、500 mg を抽出に供した。

(DNA 抽出)

DNA の抽出は、最後の DNA の溶出を水で行った点を除いて、キット添付のプロトコールに従って、DNA を抽出した。

2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法

- 2 - 2 2) 抽出した DNA の純度の検定法および、 - 2 - 2 3)の(1) 260 nm 吸光度からの抽出した DNA 量の定量法と同様に操作し、抽出した DNA の純度の検定および抽出した DNA 量の定量を行った。PCR 用 DNA 溶液は 10 ng/μL

の濃度にして-20 で保存した。

3) PCR プライマーの設計

公開されている安全性評価資料から, Bt11, Event176, MON810, T25 および GA21 に導入されている DNA の構造を調べた。まず, T25 および GA21 に導入された DNA 配列をシーケンスするために, DNA データベースの情報(GenBank Accession Nos.V00141, S44221 および V00087)および Cauliflower mosaic virus (CMV)由来 35S promoter (P-35S)⁷⁰⁾, CMV 由来 35S terminator (T-35S)^{71, 72)}, rice actin 1 gene promoter^{72, 73)} および NOS terminator (NOS ter)⁷⁴⁾に関する論文を基に, 2組のプライマー対を設計した。このプライマーを用いたシーケンスの結果を基に, T25 および GA21 を特異的に検知するプライマー対の設計を行った。Bt11, Event176 および MON810 については, 第 4 章に示した DNA シーケンスの結果から, それぞれを特異的に検知するプライマー対の再設計を行った。さらに, 抽出された DNA が PCR に十分な程度に精製されておりかつ分解を受けていないことを確認するために, 各農作物に内在的に含まれる遺伝子を検知するプライマーを設計した。トウモロコシについては, DNA データベースの情報(GenBank Accession No. M23537)を基に zein 遺伝子(*Zel*)を検知するプライマー⁶⁵⁾を設計した。ダイズ, コメ, コムギおよびオオムギのゲノムについては, Allmann らの報告⁶⁰⁾を基に真核生物の共通 DNA 配列を検知するプライマーを設計した。

作製したプライマーのリストを Table 2 に, Bt11, Event176, MON810, T25 および GA21 に導入されている DNA の構造および各プライマー対の増幅部位と予想される DNA 断片長を Fig. 1 に示した。

4) PCR 条件

PCR は, サーマルサイクラー(Applied Biosystems 社 GeneAmp PCR System 9700)を用いて行った。

(1) PCR 条件

PCR 反応液の組成は、1 × PCR buffer II、200 μmol/L dNTP、1.5 mmol/L MgCl₂、各 0.2 μmol/L 5'-、3'-プライマー、1.25 units AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼおよび 25 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は昇温スピードを MAX モードで行い、プレインキュベーション 95 で 10 分の後、熱変成 95 で 0.5 分、アニーリング 63 で 1 分、伸長反応 72 で 1 分を 1 サイクルとして 10 サイクル行い、さらに熱変成 95 で 0.5 分、アニーリング 60 で 1 分、伸長反応 72 で 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。そして、最後に 72 で 7 分の伸長反応を行った。

(2) Multiplex PCR 条件

Multiplex PCR 反応液の組成は、1 × PCR buffer II、200 μmol/L dNTP、1.5 mmol/L MgCl₂、各 0.2 μmol/L プライマー (cryIA1-3'プライマーを除く)、0.6 μmol/L cryIA1-3'プライマー、1.25 units AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼおよび 25 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は、上記(1) PCR 条件に同じ。

5) シークエンス方法

DNA シークエンスは、PCR 産物のダイレクトシークエンスを日本製粉(株)に委託した。シークエンスする DNA 断片を得るための PCR は、次の条件で行った。

PCR 溶液の組成は、1 × PCR 緩衝液、230 μmol/L dNTP、1.75 mmol/L MgCl₂、各 0.5 μmol/L 5'-、3'-プライマー、1.25 units Takara Taq ポリメラーゼおよび 25 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は昇温スピードを MAX モードで行い、プレインキュベーション 94 で 3 分の後、熱変成 94 で 1 分、アニーリング 60 で 1 分、伸長反応 72 で 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクル行い、最後に 72 で 7 分の伸長反応を行った。

6) PCR 産物の制限酵素消化の方法

制限酵素 *Sse8387I*、*SfiI* および *XbaI* は M buffer 要求性であり、制限酵素 *BsaAI*、

BstEII は、H buffer 要求性であるため、PCR 溶液の持ち越しの塩を除くことなく制限酵素消化を行った。PCR 溶液は、5 μ L を制限酵素処理に使用し、製品添付のプロトコールに従い消化した。すなわち、*Sse8387I* および *XbaI* の場合は、bovine serum albumin (BSA) を添加後、37 $^{\circ}$ C で 30 分間消化した。*SfiI* は 50 $^{\circ}$ C、*BstEII* は 60 $^{\circ}$ C、*BsaAI* は 37 $^{\circ}$ C で 30 分間消化した。消化後、反応液全量を電気泳動し、写真撮影を行った。

7) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法

電気泳動は、ゲル電気泳動装置(株)アドバンス製 Mupid[®] II) を使用した。100 mL 当たり 50 μ g のエチジウムブロマイドを含むアガロースゲルを使用し、TAE 緩衝液中で 100 V 定電圧により行った。アガロースゲルの濃度は、抽出したゲノム DNA 溶液を泳動する場合には 0.8 %、PCR 溶液または PCR 産物の制限酵素消化後の反応液を泳動する場合には 3 % とした。電気泳動後のゲルは、イメージスキャナー(バイオ・ラッドラボラトリーズ社製モレキュラーイメジャー FX System)により撮影・解析した。条件は、DNA Stain Gel - Ethidium bromide - Low intensity とした。

- 3 結果

1) DNA 抽出における CTAB 法とシリカスピнкаラム法の比較

Fig. -2 に non-GM トウモロコシと MON810 から、CTAB 法で抽出した DNA とシリカスピнкаラム法で抽出した DNA のゲル電気泳動写真を示す。両抽出法ともに、DNA の低分子化および RNA の残存がなく、23 kbp 以上の長さの DNA が 1 本のバンドとしてみられた。抽出した DNA の純度の検定をしたところ、シリカスピнкаラム法で DNA を抽出した場合、多くの場合 DNA 溶液の吸光度比が、260 nm/ 230 nm > 1.7、および 260 nm/ 280 nm = 1.7 ~ 2.0 となった。CTAB 法で抽出した DNA 溶液の場合、前章のとおり、多くの場合 DNA 溶液の吸光度比が、260 nm/ 230 nm > 1.8、および 260 nm/ 280 nm = 1.8 ~ 2.0 となった。シリカスピнкаラム法により抽出し

た DNA 溶液および CTAB を用いて抽出した DNA 溶液を用いて, *Zel* の検知を行ったところ, 共に予想した 508 bp のバンドが確認でき, これらの抽出法は, ともに PCR を行うのに十分な純度の DNA が抽出できた. また, ダイズ種子においても, CTAB 法とシリカスピンカラム法を比較したところ, PCR によりダイズ内在性遺伝子 *Le1* を検知可能であった. さらに, コメ, コムギ, オオムギについて, シリカスピンカラム法により DNA 抽出したところ, 真核生物の共通 DNA 配列が検知可能であった.

2) DNA シークエンスの解析および系統特異的プライマーの設計

第 3 章においてシークエンスの解析を示す. また, Fig. 2-1 に 5 系統 GM トウモロコシに導入されている DNA 構造を示した.

(1) Event176, Bt11 および MON810

第 3 章において行った Event176, Bt11 および MON810 の DNA シークエンス結果を基に, Event176 に導入されている PEPC pro 部分から E176 1-5', MON810 に導入されている *hsp70 int.* 部分から M810 1-5', Bt11 に導入されている *adh1-S* IVS6 部分から Bt11 1-5' を再設計した. さらに, Event176, Bt11, MON810 に導入されている各 *cryIA(b)* の DNA シークエンスから相同性の高い部分を選択して *cryIA* 1-3' を設計した (Table 2-2 および Fig. 2-1). プライマーの設計には, Primer Express software (Applied Biosystems 社製) を使用し, 増幅産物の長いものは, T_m 値を高く設定した.

(2) T25

T25 に導入されている除草剤 glufosinate 耐性形質の発現カセットは, [P-35S]-[*pat*]-[T-35S] である. 本章でシークエンスを行った部分は, [P-35S]-[T-35S] 間の 820 bp である. Fig. 2-1 C の実線に示す. 第 3 章においてシークエンスした結果および, (社) 日本食品衛生協会において公開されている食品としての安全性審査資料と矛盾はなかった. シークエンス結果の詳しい解析は, 第 3 章に示す. 本章において T25 に特異的なプライマーとして, *pat* 部分から T25 1-5', 35S ter 部分から T25 1-3' を設計した (Table 2-2 および Fig.

-1).

(3) GA21

GA21 に導入されている除草剤 glyphosate 耐性形質の発現カセットは, [No.1 intron を含む rice actin promoter (*Pr-act*)]-[トウモロコシおよびヒマワリ由来 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase 領域上流の葉緑体移行タンパク DNA 配列情報から合成され, 最適化された DNA 配列(OTP)]-[トウモロコシ由来 point mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene (*m-epsps*)]-[NOS-ter]である. 本章でシーケンスを行った部分は, [*Pr-act*]-[NOS-ter]間の 2,318 bp である. Fig. -1 E の実線に示す. Fig. -3 に, DNA シーケンスおよびそれから予想される *m-epsps* のアミノ酸配列の一部と, トウモロコシの EPSPS の mRNA (native *epsps*; GenBank Accession No. X63374)とそのアミノ酸配列の比較した結果を示す. GA21 に導入された *m-epsps* 遺伝子は, native *epsps* と比べて 8 塩基が一致しなかった. またアミノ酸配列では, 2 残基が一致していない. 安全性資料中には, GA21 に導入された m-EPSPS は, 445 アミノ酸残基からなり, トウモロコシの EPSPS (native EPSPS)とアミノ酸配列で 99.3 % 以上の相同性があるとの記載があり, 本結果と矛盾しない. この一致しなかったアミノ酸 2 残基の変更により, 除草剤 glyphosate へ耐性を示すようになったと考えられた. 本シーケンス結果を基に, GA21 検知用プライマーとして, OTP 部分から GA21 1-5', *m-epsps* 部分から GA21 1-3'を設計した(Table -2, Fig. -1 および Fig. -3).

3) 系統特異的プライマー対の個別の評価

Event176, Bt11, MON810, T25 および GA21 検知用にそれぞれ設計した E176 1-5' - cryIA1-3', Bt11 1-5' - cryIA1-3', T25 1-5' - T25 1-3', M810 1-5' - cryIA1-3', GA21 1-5' - GA21 1-3'プライマー対の特異性を, 系統別特異的検知のための PCR 条件で個別に検討した. 結果を Fig. -4 に示す. 鑄型 DNA は, non-GM トウモロコシおよび 5 系統のトウモロコシのほか, non-GM ダイズ, RRS と主要穀物としてコムギ, コムギ, オオムギを用いた. 検知対象である鑄型 DNA のみから, 予想される長さの

増幅バンドが見られ、作製したプライマー対は系統特異的であった。

4) Multiplex PCR の特異性と検知感度

5 系統検知用プライマー対およびトウモロコシ内在性遺伝子検知用プライマー対を混合し、1本のチューブ中で組換え DNA 配列の検知を行う Multiplex PCR について検討した。特異性は、鋳型 DNA として non-GM トウモロコシおよび 5 系統のトウモロコシのほか non-GM ダイズ、RRS と主要穀物としてコメ、コムギ、オオムギから抽出した DNA を用い Multiplex PCR を行った。PCR 温度条件は、5 系統の GM トウモロコシを混合した試料から抽出した DNA を鋳型としたときの 6 本の PCR 増幅バンドが、同程度のバンド強度となるように検討した。検討後の温度条件は、実験方法に示し、その条件による結果を Fig. 5 に示す。ダイズ、コメ、コムギおよびオオムギにおいては PCR による増幅は見られず、トウモロコシ内在性遺伝子および検知対象とした 5 系統の組換えトウモロコシにのみ、予想される長さの増幅バンドが見られ、偽陽性の増幅バンドは見られなかった。増幅バンドが、組換え体由来であることを確認するために制限酵素処理を行った。Zel , Event176 , Bt11 , T25 , MON810 および GA21 の増幅部分のシーケンス情報より、Event176 増幅バンド確認用に BstEII , Bt11 増幅バンド確認用に SfiI , T25 増幅バンド確認用に Sse8387I , MON810 増幅バンド確認用に BsaAI , GA21 増幅バンド確認用に XbaI を選択した。制限酵素消化の結果は、Fig. 6 に示すように、各系統に特異的であった。

検知感度を調べるために、non-GM トウモロコシに各系統の GM トウモロコシを 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1 , 5 , 20 % 含むように混合し、DNA を抽出後 Multiplex PCR を行った。Fig. 7 に示すように、各 0.1 % ~ 0.5 % GM トウモロコシを含むサンプルから検知可能である。明確に検知する場合は、0.5 % GM トウモロコシを含む場合であった。また、Zel の検知は、PCR に適した DNA が抽出できているかどうかを調べている。そのため、Zel 由来のバンド強度は、弱くて良い。Zel 用プライマー対の濃度を 0.2 $\mu\text{mol/L}$ から、0.1 , 0.05 または 0.025 $\mu\text{mol/L}$ に調製し、Multiplex PCR を行い、検知感度に及ぼす影響を調べた。その結果を、Fig. 8 に示す。Zel 検知用

プライマー対の濃度が 0.1 , 0.05 または 0.025 $\mu\text{mol/L}$ の場合 , 各 0.1 % GM トウモロコシを含むサンプルから明瞭なバンドが得られ , この場合の検知感度は 0.1 % 程度と考えられた . しかし , *Ze1* 検知用プライマー対 0.1 $\mu\text{mol/L}$ の場合は , 各 20 % GM トウモロコシを含むサンプルから , 0.05 $\mu\text{mol/L}$ の場合は , 各 0.1 , 0.5 , 1 , 5 , 20 % GM トウモロコシを含むサンプルから , 0.025 $\mu\text{mol/L}$ の場合は全てのサンプルから , *Ze1* の検知ができなかった . このことから , 0.5 % 以下の GM トウモロコシを含むサンプルにおいては , *Ze1* 検知用プライマー対の濃度を 0.1 または 0.05 $\mu\text{mol/L}$ に調製することが有効であった .

- 4 考察

1) シリカスピンカラム法により可能なトウモロコシ種子からの PCR に適した DNA 抽出

市販 DNA 抽出キットを用いる場合 , 植物体やその組織部位によってそのキットが DNA 抽出に適しているかどうかを検討する必要がある . シリカスピンカラム法で抽出した DNA 溶液の 260 nm/ 230 nm 吸光度比は , CTAB 法で抽出したものに比べて劣っていたが , 両抽出法ともに DNA 溶液のゲル電気泳動からは DNA の低分子化は見られず , *Ze1* の PCR による検知が可能であった . また , 抽出される DNA 量も PCR を行うのに十分であった . シリカスピンカラム法は , CTAB 法に比べ抽出時間の短縮化が可能であり , また , 特別な技能を必要としない . さらに , 有機溶媒を使用しないことから , 環境および作業従事者に対する安全性の面で優れていた .

2) 5 系統 GM トウモロコシに特異的なプライマーと明らかになった検知感度

Multiplex PCR による多系統 GM トウモロコシの検知法の開発には , 個々のプライマー対を用いた場合に特異的であるとともに , プライマー対を混合した場合においても偽陽性がなく特異的であることが必要である . 特異性は , 対象とした GM トウモロコシおよび non-GM トウモロコシのみならず , 輸入されるトウモロコシ中へ混ざってくる

場合や、加工時にトウモロコシとともに使用される場合を考慮し、主要穀物であるコメ、コムギ、オオムギおよび non-GM ダイズ、RRS に対して調べた。この特異性は、実際に検査に使用する技術として必要である。本章で対象とした 5 系統 GM トウモロコシのみに特異的なプライマーの設計に成功した。これは、各 GM トウモロコシに導入された DNA 構造の異なる生物種由来の DNA 配列の連結部分を増幅するためと考えられる。また、プライマー対の一方は構造遺伝子にアニールするように設定しているため、GM トウモロコシ系統が持つ発現カセットを的確に検知することが可能となったと考えられる。さらに、Multiplex PCR の開発を行う場合、増幅バンドの強度が同程度となるように、プライマーおよび PCR 条件を設定する必要がある。これには、プライマーの T_m 値が重要であると考えられる。特に、Event176、Bt11、MON810 検知用の 3'-プライマーが同一であるが、このように一方のプライマーが同一である場合、長い PCR 増幅産物を得るためのプライマーの T_m 値を高く設定することが有効と考えられる。PCR のアニーリング温度をまず高く設定して数サイクル行い、長い増幅産物を増幅した後に、アニーリング温度を低く設定して短い増幅産物を増幅させることで、短い増幅産物のみが増幅するのを防ぎ、バンド強度が同程度とすることが可能となった。しかし、5 系統の GM トウモロコシ由来のバンド強度を同一にすることは困難であった。バンド強度の違いは、PCR 温度条件、プライマー濃度、PCR 産物の長さのほか、ターゲットとしている DNA 配列が、ゲノム DNA 中に何コピー存在するかに由来するものと考えられる。開発した検知感度は 0.1 % ~ 0.5 % 程度であり、これは、1 チューブ中に GM トウモロコシ由来のゲノム DNA 量が 25 ~ 125 pg/ tube 存在することに相当する。トウモロコシゲノムサイズ 3.9×10^9 bp⁶⁷⁾ から計算したところ、GM トウモロコシ由来ゲノムは、2.8 ~ 14.2 diploid/ tube 程度となる。トウモロコシ種子は F1 ハイブリッドとして供給されるため、GM トウモロコシに導入されている DNA は 1 チューブ中に 2.8 ~ 14.2 コピーと計算できる。PCR は理論上 1 コピーからでも増幅が見られるが、Multiplex PCR を行うため、明瞭に増幅を見るためには、0.5 % 程度の検知感度になったと考えられる。増幅バンドは制限酵素処理により、その由来を確実に検証することが可能である。これらは、実際の検査の場面において、偽陽性が疑われたバン

トを検知した場合に検査結果を確実にすることができる。我が国において non-GM トウモロコシを分別流通した場合のトウモロコシ中に、意図せざる混入として許容される GM トウモロコシは 5 % 以下とされている^{19, 20)}。そのためこの Multiplex PCR の検知感度は、十分に利用可能であると考えられる。

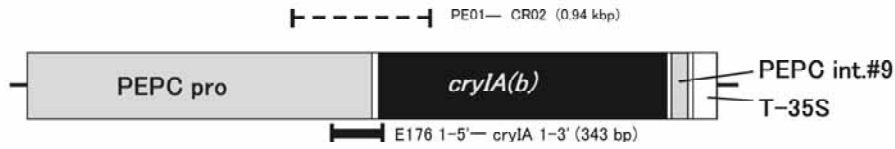
3) Multiplex PCR による 5 系統 GM トウモロコシの簡便な鑑別技術の開発

本章では、第 2 章において示した Multiplex PCR をさらに進展させ、PCR による 5 系統 GM トウモロコシの簡便な鑑別検知法を開発したとして、第 2 章において出願したものに加え特許を出願し、特許 3502906 (2003/12/19)「遺伝子組換えトウモロコシ及びこれを含む加工食品からの組換え遺伝子検知法」として成立している。本技術は、GM トウモロコシの定量をする場合に、分析試料に含まれる GM トウモロコシのスクリーニング検査に利用することが可能である。GM トウモロコシの定量は、各 GM トウモロコシ系統の定量値の合算で表される。そのため、分析試料中にどの系統の GM トウモロコシが含まれているかを素早く簡便に検知し、定量分析対象となる GM トウモロコシを鑑別することは、省力化に寄与する。また、本分析法の加工食品への適用性については、Zel が検知可能な加工品であれば系統の判別は可能と考えられる。加熱等により DNA が分解されている場合であっても、PCR 産物が最も長い Zel を検知するのであれば、GM トウモロコシ由来の DNA 配列も鋳型 DNA として抽出 DNA 溶液に残存してくると考えられるためである。Multiplex PCR のほか、環境負荷の低減に向けた抽出法の検討も行い、シリカスピンカラム法により実際の検査における実用性の向上が可能であることを明らかにした。

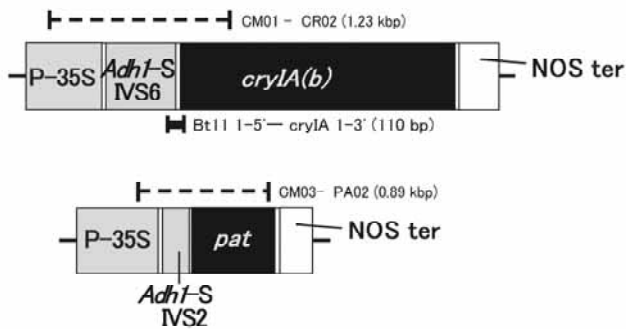
Table -1 使用した機器および装置

機器・装置	製造元および型式
粉碎器	佑崎有限公司製 model DM-6
遠心器	ベックマンコールター(株)社製 Allegra 6KR
マイクロチューブミキサー	KONTES 社製 PELLET PESTLE
試験管ミキサー	大洋科学工業(株)社製 S-5N
インキュベーター	アトー(株)製 ZYMOSTAT AB1750
ゲル電気泳動装置	アドバンス製 Mupid [®] II
イメージスキャナー	バイオラッドラボラトリーズ社製モレキュラーイメージャー FX System
サーマルサイクラー	Applied Biosystems 社 GeneAmp PCR System 9700
分光光度計	Beckman 社製 DU-7400

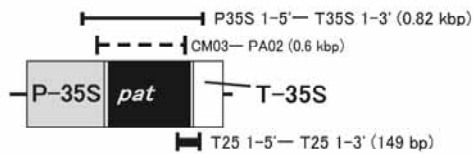
A: Event176



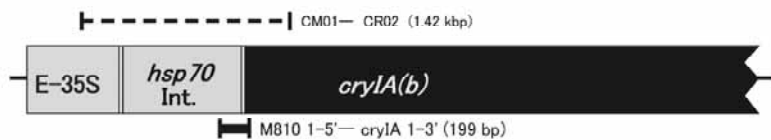
B: Bt11



C: T25



D: MON810



E: GA21

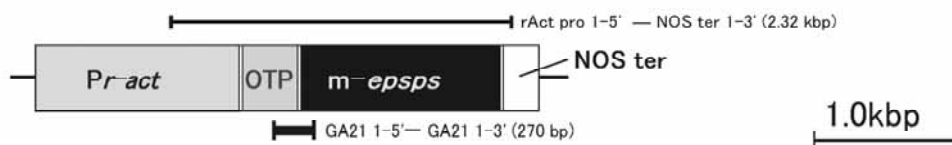


Fig. IV-1 5系統のGMトウモロコシに導入されているDNA配列およびPCR増幅部位の模式図

()内に増幅長を示す。

太線(■)は、各GMトウモロコシ検知のためのターゲット領域を示す。

破線(---)は、第III章でシーケンスした部分を示す。

実線(—)は、第IV章でシーケンスした部分を示す。

Table IV-2 作製したプライマーの一覧

Name	Sequence (5' → 3')	T _m (値 ^{a)}	specificity	Amplicon
シーケンス用				
PE01	AGA TTC ACT OCG ATG CAG CCT A	63.3	PEPC pro/sense	Event176 0.9 kbp
CR02	CTC TCG GCG TAG ATT TGG TAC A	58.0	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
CM01	CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A	61.8	P-35S/sense	Bt11 MON810 1.2 kbp 1.4 kbp
CR02	CTC TCG GCG TAG ATT TGG TAC A	58.0	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
P35S 1-5'	ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T	57.6	P-35S/sense	T25 0.8 kbp
T35S 1-3'	ACT AAG GGT TTC TTA TAT GCT CAA CA	55.8	T-35S/anti-sense	
rAct pro 1-5'	ATC TTT GGC CTT GGT AGT TTG	54.8	<i>Pr-act</i> /sense	GA21 2.3 kbp
NOS ter 1-3'	ATT GCG GGA CTC TAA TCA TAA	52.9	NOS ter/anti-sense	
ダイズ, コメ, コムギ, オオムギ内性遺伝子検知用				
TR03	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A	61.8	Eukaryote/sense	Eukaryote 137 bp
TR04	AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T	73.0	Eukaryote/anti-sense	
Multiplex PCR用				
Zel 1-5'	CCT CAG TCG CAC ATA TCT ACT ATA CT	54.2	<i>Zel</i> /sense	maize 508 bp
Zel 1-3'	CTA GAA TGC AGC ACC AAC AAA	55.3	<i>Zel</i> /anti-sense	
E176 1-5'	GTA GCA GAC ACC CCT CTC CAC A	60.1	PEPC pro/sense	Event 176 343 bp
<i>cryIA</i> 1-3'	TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC	63.3	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
Bt11 1-5'	CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C	53.8	<i>adh1-1S</i> IVS6/sense	Bt11 110 bp
<i>cryIA</i> 1-3'	TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC	63.3	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
T25 1-5'	GCC AGT TAG GCC AGT TAC CCA	60.0	<i>pat</i> /sense	T25 149 bp
T25 1-3'	TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CCT	60.3	T-35S/anti-sense	
M810 1-5'	GAG TTT CCT TTT TGT TGC TCT C	53.8	<i>hsp70</i> int./sense	MON810 199 bp
<i>cryIA</i> 1-3'	TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC	63.3	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
GA21 1-5'	ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG	56.8	OIP/sense	GA21 270 bp
GA21 1-3'	TCT CCT TGA TGG GCT GCA	57.3	<i>m-epsps</i> /anti-sense	

^{a)} T_m (melting temperature) 値: Primer Express software (Applied Biosystems社製)より算出

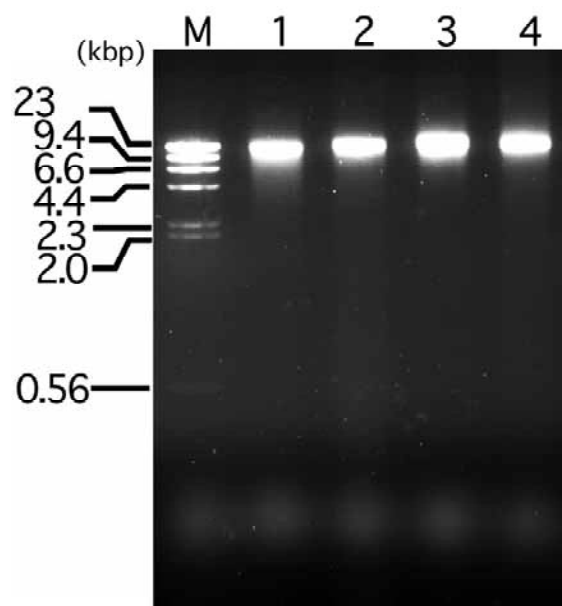


Fig. IV-2 CTAB 法およびシリカスピнкаラム法によるトウモロコシ種子から抽出した DNA の電気泳動写真

1: non-GM トウモロコシ(CTAB 法), 2: MON810 (CTAB 法), 3: non-GM トウモロコシ(シリカスピнкаラム法), 4: MON810 シリカスピнкаラム法),
M: λ DNA *Hind*III digest standard



GA21	-227										acggtg	aagagttcaa	tgtatg	gagg	tgtggccggc	ctacggcaac	-181		
GA21	-180	aagaagtteg	agacgetgtc	gtacetgceg	ccgetgteta	tggegcccaac	cgatgatgatg	-121											
GA21	-120	gcctcgtcgg	ccaccgccgt	cgctccgttc	caggggctca	agtccaccgc	cagcctcccc	-61											
GA21	-60	gtcgcgccgc	gctcctccag	aagcctcgcc	aacqtcagca	acggcggaaq	gatccggtgc	-1											
GA21	1	ATG	GC	GC	GCC	GAG	GAG	ATC	GTG	CTG	CAG	CCC	ATC	AAG	GAG	ATC	TCC	GGC	ACC
native	1	M	A	C	A	E	E	I	V	L	Q	P	I	K	E	I	S	G	T
			GC	GC	GCC	GAG	GAG	ATC	GTG	CTG	CAG	CCC	ATC	AAG	GAG	ATC	TCC	GGC	ACC
GA21	55	GTC	AAG	CTG	CCG	GGG	TCC	AAG	TCG	CTT	TCC	AAC	CGG	ATC	CTC	CTA	CTC	GCC	GCC
native	19	V	K	L	P	G	S	K	S	L	S	N	R	I	L	L	L	A	A
		V	K	L	P	G	S	K	S	L	S	N	R	I	L	L	L	A	A
		GTC	AAG	CTG	CCG	GGG	TCC	AAG	TCG	CTT	TCC	AAC	CGG	ATC	CTC	CTA	CTC	GCC	GCC
GA21	109	CTG	TCC	GAG	GGG	ACA	ACA	GTG	GTT	GAT	AAC	CTG	CTG	AAC	AGT	GAG	GAT	GTC	CAC
native	37	L	S	E	G	T	T	V	V	D	N	L	L	N	S	E	D	V	H
		L	S	E	G	T	T	V	V	D	N	L	L	N	S	E	D	V	H
		CTG	TCC	GAG	GGG	ACA	ACA	GTG	GTT	GAT	AAC	CTG	CTG	AAC	AGT	GAG	GAT	GTC	CAC
GA21	163	TAC	ATG	CTC	GGG	GCC	TTG	AGG	ACT	CTT	GGT	CTC	TCT	GTC	GAA	GCG	GAC	AAA	GCT
native	55	Y	M	L	G	A	L	R	T	L	G	L	S	V	E	A	D	K	A
		Y	M	L	G	A	L	R	T	L	G	L	S	V	E	A	D	K	A
		TAC	ATG	CTC	GGG	GCC	TTG	AGG	ACT	CTT	GGT	CTC	TCT	GTC	GAA	GCG	GAC	AAA	GCT
GA21	217	GCC	AAA	AGA	GCT	GTA	GTT	GTT	GGC	TGT	GGT	GGA	AAG	TTC	CCA	GTT	GAG	GAT	GCT
native	73	A	K	R	A	V	V	V	G	C	G	G	K	F	P	V	E	D	A
		A	K	R	A	V	V	V	G	C	G	G	K	F	P	V	E	D	A
		GCC	AAA	AGA	GCT	GTA	GTT	GTT	GGC	TGT	GGT	GGA	AAG	TTC	CCA	GTT	GAG	GAT	GCT
GA21	271	AAA	GAG	GAA	GTG	CAG	CTC	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ATC	GCA	ATG	CGG	TCC	TTG
native	91	K	E	E	V	Q	L	F	L	G	N	A	G	I	A	M	R	S	L
		K	E	E	V	Q	L	F	L	G	N	A	G	T	A	M	R	P	L
		AAA	GAG	GAA	GTG	CAG	CTC	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ACT	GCA	ATG	CGG	CCA	TTG
.....																			
GA21	1189	GCG	ATC	GAC	ACG	TAC	GAC	GAC	CAC	AGG	ATG	GC	ATG	GC	TTC	TCC	CTT	GCC	GCC
native	397	A	I	D	T	Y	D	D	H	R	M	A	M	A	F	S	L	A	A
		A	I	D	T	Y	D	D	H	R	M	A	M	A	F	S	L	A	A
		GCG	ATC	GAC	ACG	TAC	GAC	GAC	CAC	AGG	ATG	GC	ATG	GC	TTC	TCC	CTT	GCC	GCC
GA21	1243	TGT	GCC	GAG	GTC	CCC	GTC	ACC	ATC	CGG	GAC	CCT	GGG	TGC	ACC	CGG	AAG	ACC	TTC
native	415	C	A	E	V	P	V	T	I	R	D	F	G	C	T	R	K	T	F
		C	A	E	V	P	V	T	I	R	D	F	G	C	T	R	K	T	F
		TGT	GCC	GAG	GTC	CCC	GTC	ACC	ATC	CGG	GAC	CCT	GGG	TGC	ACC	CGG	AAG	ACC	TTC
GA21	1297	CCC	GAC	TAC	TTC	GAT	GTG	CTG	AGC	ACT	TTC	GTC	AAG	AAT	TAA	3'			
native	433	P	D	Y	F	D	V	L	S	T	F	V	K	N	*				
		P	D	Y	F	D	V	L	S	T	F	V	K	N	*				
		CCC	GAC	TAC	TTC	GAT	GTG	CTG	AGC	ACT	TTC	GTC	AAG	AAT	TAA	3'			

Fig. IV-3 GA21 に導入されている DNA 配列とそれから予想されるアミノ酸配列, およびトウモロコシ由来 *epsps* (GenBank Accession No. X63374) とそれから予想されるアミノ酸配列の比較

GA21: GA21 に導入されている DNA 配列とそれから予想されるアミノ酸配列

native: トウモロコシ由来 *epsps* (GenBank Accession No. X63374) とそれから予想されるアミノ酸配列

DNA 配列およびアミノ酸配列の異なっている部分は、白抜き文字で示した。

中抜き矢印 ( ) は、GA21 検知用プライマーの DNA 領域を示す。

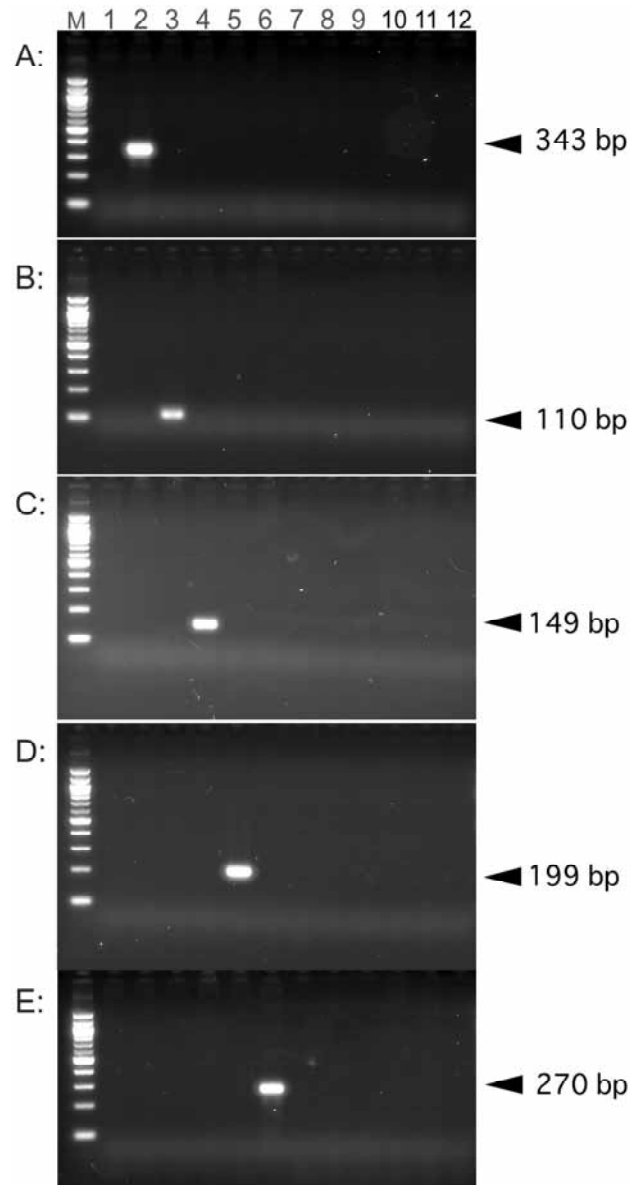


Fig. IV-4 トウモロコシおよびその他の農産物に対する GM トウモロコシ検知用プライマー対の特異性

A: Event176 検知用プライマーを使用 .

B: Bt11 検知用プライマーを使用 .

C: T25 検知用プライマーを使用 .

D: MON810 検知用プライマーを使用 .

E: GA21 検知用プライマーを使用 .

◀ は、プライマー対により予想される増幅長を示す .

1: non-GM トウモロコシ, 2: Event176, 3: Bt11,
 4: T25, 5: MON810, 6: GA21, 7: non-GM ダイズ,
 8: RRS, 9: コメ, 10: コムギ, 11: オオムギ, 12: ネガ
 ティブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

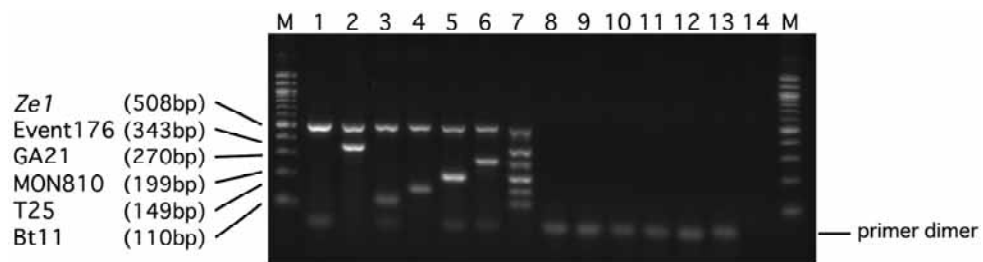


Fig. IV-5 トウモロコシおよびその他の農産物に対する Multiplex PCR の特異性

— は、検知のターゲットを示す。

() は、予想される増幅産物の長さを示す。

- 1: non-GM トウモロコシ, 2: Event176, 3: Bt11, 4: T25, 5: MON810,
6: GA21, 7: 5 系統 GM トウモロコシ(Event176, Bt11, T25, MON810 および GA21)の等重量混合物(各 20 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ), 8: non-GM ダイズ, 9: RRS, 10: コメ,
11: コムギ, 12: オオムギ, 13: ネガティブコントロール(DNA なし),
14: ネガティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

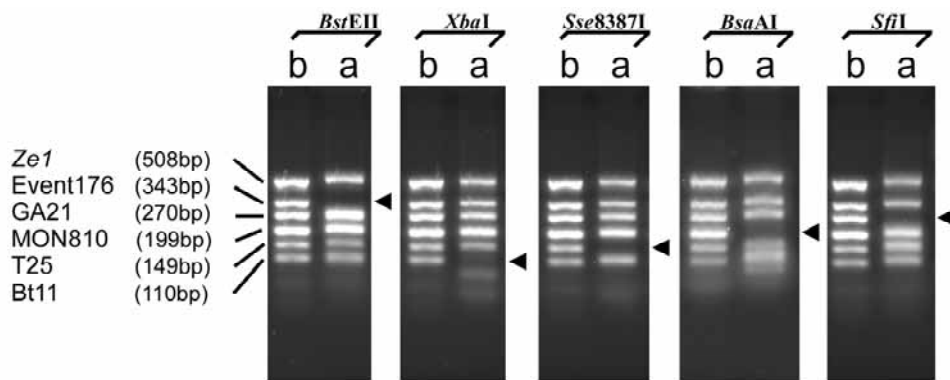


Fig. IV-6 Multiplex PCR 産物の制限酵素消化

使用した制限酵素は、写真上端に示した。

— は、増幅産物の由来を示す。

() は、増幅産物の長さを示す。

◀ は、消化される増幅産物を示す。

b: 消化前, a: 消化後

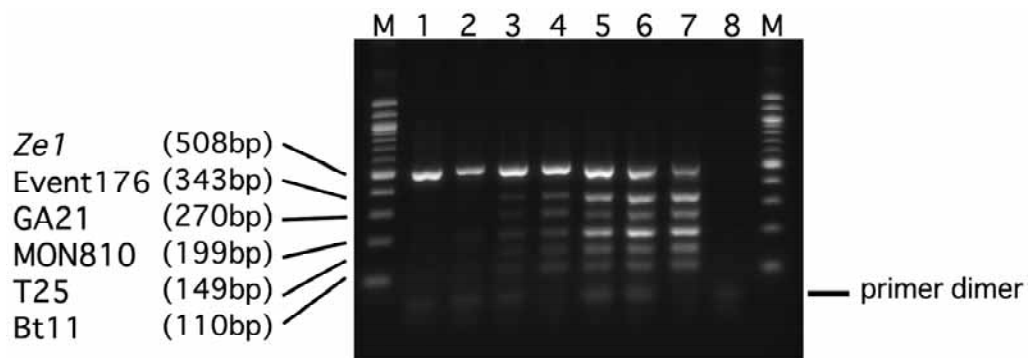


Fig. IV-7 Multiplex PCR による 5 系統 GM トウモロコシ(Event176, Bt11, T25, MON810 および GA21)の検知感度

— は、検知のターゲットを示す。

() は、予想される増幅産物の長さを示す。

鋳型 DNA は、5 系統 GM トウモロコシ(Event176, Bt11, T25, MON810 および GA21)の等重量混合物と non-GM トウモロコシとを混ぜたものから抽出した DNA を用いた。

1: non-GM トウモロコシ, 2: 各 0.05 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 3: 各 0.1 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 4: 各 0.5 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 5: 各 1 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 6: 各 5 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 7: 各 20 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ), 8: ネガティブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

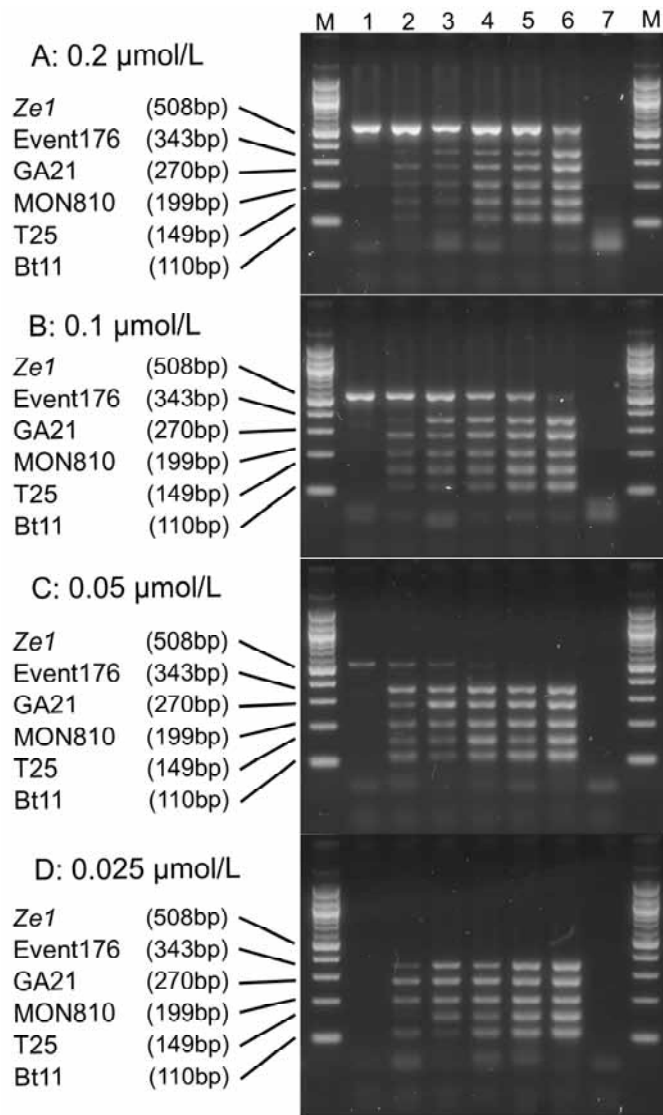


Fig. IV-8 Multiplex PCRにおける5系統GMトウモロコシの検知感度に対する *Ze1* 検知用プライマー濃度の影響

— は、検知のターゲットを示す。

() は、予想される増幅産物の長さを示す。

A ~ D は、*Ze1* 検知用プライマーの濃度を示す。

鑄型 DNA は、5 系統 GM トウモロコシ (Event176, Bt11, T25, MON810 および GA21) の等重量混合物と non-GM トウモロコシとを混ぜたものから抽出した DNA を用いた。

1: non-GM トウモロコシ, 2: 各 0.05 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 3: 各 0.1 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 4: 各 0.5 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 5: 各 1 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 6: 各 5 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, 7: 各 20 % GM トウモロコシ含有トウモロコシ, M: 100 bp ラダー

第V章 GM 作物に導入されている DNA 構造を推定するための DNA セグメントの 検知技術の開発⁷⁵⁾

V-1 緒言

2004 年 2 月に遺伝子組換え実験について生物多様性に影響を与える可能性のある GM 生物等の環境への拡散を防止することを目的とした「遺伝子組換え生物等の使用等による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)²⁶⁾」が施行された。これに伴い、食品目的で輸入された種子が運搬中にこぼれ落ちて発芽したような場合であっても、生物多様性影響の明らかでない場合は、検査が必要とされた。しかし、検査には、GM 農作物に導入されている遺伝子構造の情報が不可欠であり、実質的に検査は不可能となる。

一方で、遺伝子組換え技術を用いた育種のメリットの一つは、有用な遺伝子を一度取り出せば、様々な農作物に導入することで改良の範囲を大幅に拡大することが可能になることである。例えば、我が国において食品としての安全性審査が終了した 73 系統の農作物のうち除草剤耐性形質をもつものは 57 系統ある¹⁴⁾。耐性を示す除草剤は、glyphosate、glufosinate または bromoxynil の 3 除草剤のいずれかとなっている。導入されている遺伝子で見ると、glyphosate 耐性のためには、*Agrobacterium* sp. CP4 由来 *cp4-epsps*、トウモロコシ由来 *m-epsps*、*Ochrobactrum anthropi* LBAA 株由来 *gox* の 3 遺伝子、glufosinate 耐性のためには、*Streptomyces viridochromogenes* 由来 *pat* または *Streptomyces hygroscopicus* 由来 *bar* の 2 遺伝子、bromoxynil 耐性のためには、*Klebsiella pneumoniae* 由来 *bxn* の 1 遺伝子が導入されている。このように 57 系統の除草剤耐性農作物が、6 遺伝子に集約される。同じ遺伝子がいろいろな農作物の形質転換に用いられているため、現在までに安全性審査の終了または審査中の GM 農作物に導入されている組換え DNA 配列の部品 (DNA セグメント)であるプロモーター、構造遺伝子、ターミネーター領域等を個別に検知する方法を開発し、それらが検知できる／検知できないをプロファイルすること

により、GM 作物に導入されている DNA 構造のセグメント情報を得ることができると考えられる。このセグメント情報と、これまでに報告されている GM ダイズ 40-3-2 系統 RRS³²⁾、5 系統 GM トウモロコシ⁶⁸⁾ および GM パパイア Sunup papaya⁷⁶⁾ の特異的な検知技術による結果を組み合わせることで、未承認 GM 作物が存在するか否かを検証することが可能であると考えられる。

本章では、食品としての安全性審査の終了した GM トウモロコシ 6 系統(Event176, Bt11, T25, MON810, GA21, DLL25) および食品としての安全性審査未了の GM トウモロコシ 1 系統(MON802)に導入されている DNA 配列を調べ、構造遺伝子、プロモーター、ターミネーターおよびその他の DNA 配列から、phosphinothricin acetyl transferase のコード領域(*pat* または *bar*)、*Agrobacterium* sp. CP4 由来 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase のコード領域 (*cp4-epsps*)、maize enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase のコード領域 (*m-epsps*)、glyphosate oxidoreductase のコード領域(*gox*)、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来殺虫タンパク質 CryIA(b)のコード領域(*cryIA(b)*)、neomycin phosphotransferase II のコード領域 (*nptII*)、rice actin のプロモータ領域(*Pr-act*)、cauliflower mosaic virus 由来の 35S プロモータ領域(P-35S)およびターミネーター領域(T-35S)および *A. tumefaciens* 由来の nopaline synthase ターミネーター領域(NOS ter)の 11 セグメントを選択し、これらを検知するための 14 組のプライマー対を設計した。あわせて、それらの特異性について評価した。

V-2 実験方法

V-2-1 試料および試薬

1) 材料

トウモロコシ(*Zea mays*):

次の 6 品種の乾燥種子を米国より直接入手し、使用まで-20 °Cで保存した.

- シンジエンタシード社(旧 ノースラップキング社)が開発した害虫抵抗性および除草剤 glufosinate 耐性 Bt11 の後代品種(Bt11)
- シンジエンタシード社(旧 チバシード社)が開発した害虫抵抗性 Event176 の後代品種(Event176)
- モンサント社が開発した害虫抵抗性 MON810 の後代品種(MON810)
- モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 GA21 の後代品種(GA21)
- バイエルクロップサイエンス社(旧 ヘキストシェーリングアグレボ社)が開発した除草剤 glufosinate 耐性 T25 の後代品種(T25)
- デイリーランド社の非組換えトウモロコシ品種(non-GMトウモロコシ) Hybrid1412

次の 1 品種の乾燥種子粉砕物は、モンサント社から供与された. 使用まで-20 °Cで保存した.

- モンサント社が開発した害虫抵抗性および除草剤 glyphosate 耐性 MON802 の後代品種(MON802)

次の 1 品種のゲノム DNA は、モンサント社から供与された. 使用まで-20 °Cで保存した.

- モンサント社(旧 デカルブ・ジェネティックス社)が開発した除草剤 glufosinate 耐性 DLL25)

ダイズ(*Glycine max*):

次の2品種の乾燥種子を米国より直接入手し、使用まで-20℃で保存した。

- ・モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 40-3-2 Roundup Ready® Soy の後代品種(RRS)
- ・非組換えダイズ品種(non-GM ダイズ)として1998年米国オハイオ州産種子

その他の穀類:

次の3農作物を入手し、使用まで-20℃で保存した。

- ・コメ(*Oryza sativa*)は、1998年産キヌヒカリ品種を中国農業試験場から入手した。
- ・コムギ(*Triticum aestivum*)は、ハルユタカ品種を用いた。
- ・オオムギ(*Hordeum vulgare*)は、Harrington品種を用いた。

2) 試薬

- ・アガロース:宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」
 - ・DNA マーカー:ニューイングランドバイオラブ社製 λDNA *Hind*III Digest , 1 kbp ラダー, 100 bp ラダー
 - ・DNA ポリメラーゼ:アプライドバイオシステムズ社製 AmpliTaq™ Gold
 - ・PCR 緩衝液:アプライドバイオシステムズ社製 PCR buffer II
 - ・オリゴヌクレオチドプライマー:グライナー・ジャパンに合成委託した逆相カートリッジ精製品
 - ・水: CPW-200 超純水装置(アドバンテック(株)製)により精製したもの
- 他の試薬は、すべて特級品を用いた。

3) 試薬の調製

- ・TE 緩衝液
- ・TAE 緩衝液

以上は、II-2-1 3) 試薬の調製に同じ。

4) 装置

使用した機器および装置は、Table IV-1 に同じ。ただし、サーマルサイクラーは、MJリサーチ社 PTC-200 を用いた。

V-2-2 方法

1) DNA の抽出方法

DNA の抽出は、シリカスピнкаラムを用いるキット(QIAGEN 社製 DNeasy Plant Maxi Kit)を用いて行った(シリカスピнкаラム法)。

(前処理)

乾燥種子は、粉砕器で目視により粒径 0.5 mm 程度に粉砕して、500 mg を抽出に供した。

(DNA 抽出)

DNA の抽出は、キット添付のプロトコールを改変して行った。すなわち、最初の AP1 緩衝液による抽出を 15 分から1時間に延ばし、最後の DNA の抽出を水で行った点を除いて、プロトコールどおりに DNA を抽出した。

2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法

II-2-2 2) 抽出した DNA の純度の検定法および、II-2-2 3)の(1) 260 nm 吸光度からの抽出した DNA 量の定量法と同様に操作し、抽出した DNA の純度の検定および抽出した DNA 量の定量を行った。PCR 用 DNA 溶液は 100 ng/ μ L の濃度にして-20 °C で保存した。

3) PCR プライマーの設計

(1) 内在性遺伝子検知用プライマーの設計

抽出された DNA が、PCR に十分な程度に精製されておりかつ分解を受けて

いないことを確認するために、トウモロコシ、ダイズ、コメ、コムギおよびオオムギに内在的に含まれる遺伝子を検知するプライマーを設計した。Table V-1 に設計したプライマーの一覧を示す。トウモロコシおよびダイズの内在性遺伝子検知用のプライマーについては、前章までに示した ZE01/ ZE02⁴⁶⁾および Le1 01-5'/ Le1 01-3'³²⁾を用いた。コメ内在性遺伝子検知用のプライマーについては、McElroy らの報告⁷³⁾および GenBank Accession No. S44221 を基に、Pr-act を検知する rAct pro 2-5'/ rAct pro 1-3' プライマー対を設計した。コムギについては、GenBank Accession No. U51303 を参考にして、alpha-gliadin storage protein gene を検知する Gli1-5'/ Gli1-3' プライマー対を設計した。オオムギについては、GenBank Accession No. AF022725 を参考にして、dextrinase gene を検知する HvLD1-5'/ HvLD1-3' プライマー対を設計した。

(2) シークエンス用プライマーの設計

(社)日本食品衛生協会において公開されている食品における安全性評価資料および農林水産省農林水産技術会議事務局技術安全課において公開されている飼料と環境に対する安全性評価資料から、Event176 , Bt11 , T25 , MON810 , GA21 , DLL25 および MON802 に導入されている DNA の構造を調べた。その模式図を Fig. V-1 に示す。本章では、DLL25 および MON802 のシークエンスと、前章までの情報に加えて、さらにシークエンス情報の必要となった Event176 , Bt11 , T25 のシークエンスを行った。本章においてシークエンス用に設計したプライマーと、前章までに GM トウモロコシのシークエンスに使用したプライマーの一覧を Table V-2 に示し、その増幅部分を Fig. V-1 に示す。本章では、シークエンス用の 5'-プライマーとして 10 プライマー(cryIA 2-5' , CM01 , adh1 1-5' , P35S 1-5' , T25 1-5' , cTr7 ter 1-5' , HS01 , cryIA 3-5' , CTP2 1-5' および gox 1-5')、3'-プライマーとして 11 プライマー(T35S 3-3' , bar 1-3' , NOS ter 2-3' , PA01 , NOS-3 , T35S 4-3' , P35S 2-3' , Tr7 ter 1-3' , cryIA 2-3' , epsps 2-3' および gox 1-3') を設計または使用した。その詳細を、次に示す。

• Event176

cryIA 2-5' は、前章までの Bt11 および MON810 のシーケンス結果を基に設計した。T35S 3-3' は、GenBank Accession No. V00141 および Cauliflower mosaic virus (CMV)由来 35S promoter (P-35S)⁷⁰⁾ と CMV 由来 35S terminator (T-35S)^{70, 71, 77, 78)}の文献を基に設計した。CM01 は、第Ⅲ章において設計したプライマーを使用した。bar 1-3' は、GenBank Accession No. X50822 を基に設計した。

• Bt11

adh1 1-5' は、前章までのシーケンス結果を基に設計した。NOS ter 2-3' は、文献^{36, 74)}および GenBank Accession No. V00087 を基に設計した。CM01 および PA01 は、第Ⅲ章において設計したプライマーを使用した。P35S 1-5' は、第Ⅳ章において設計したプライマーを使用した。NOS-3 は、Pietsch らの論文³⁶⁾を基に設計した。

• T25

T25 1-5' は、第Ⅳ章において設計した。T35S 4-3' は、GenBank Accession No. V00141 および P-35S⁷⁰⁾ と T-35S^{70, 71, 77, 78)}の文献を基に設計した。

• DLL25

cTr7 ter 1-5' および Tr7 ter 1-3' は、Dhaese らの論文⁷⁹⁾ , DLL25 の食品としての安全性資料中の DNA 配列情報および GenBank Accession No. V00090 を基に設計した。P35S 2-3' は、GenBank Accession No. V00141 および P-35S⁷⁰⁾ と T-35S^{70, 71, 77, 78)}の文献を基に設計した。P35S 1-5' は、第Ⅳ章において設計したプライマーを使用した。

• MON802

HS01 は、第Ⅲ章において設計したプライマーを使用した。cryIA 2-3' は、U.S. Patent 5,625,136⁶¹⁾における Sequence 10 (GenBank Accession No. I41424) および文献⁴⁹⁾を参考に設計した。cryIA 3-5' は、HS01 - cryIA 2-3' プライマー対による MON802 のシーケンス結果を基に設計した。NOS-3 は、

Pietschらの論文³⁶⁾を基に設計した。epsps 2-3' は、第II章におけるCaM03-5' - EPSPS01-3' プライマー対によるRRSのシーケンス結果およびU.S. Patent 5,804,425⁸⁰⁾を参考に設計した。CTP2 1-5' は、HS01 - epsps 2-3' プライマー対によるMON802のシーケンス結果を基に設計した。gox 1-5' および gox 1-3' は、gox 遺伝子の導入されているMON809の飼料と環境に対する安全性評価資料中のDNA配列情報、およびU.S. Patent 5,776,760⁸¹⁾におけるSequence 8 (GenBank Accession No. AR016595)を基に設計した。

(3) DNA セグメント検知用プライマーの設計

シーケンス結果を基に、外来生物由来の構造遺伝子、プロモーター、ターミネーターおよびその他のDNA配列検知用として *pat*, *bar*, *cryIA(b)*, *m-epsps*, *P-35S*, *T-35S*, *NOS ter*, *cp4-epsps*, *gox*, *Pr-act* 検知用プライマーを設計した。さらに、neomycin phosphotransferase II (*npII*)検知用として pCR 2.1 (Invitrogen 社製)のDNA配列情報から、設計した。設計には、アプライドバイオシステムズ社のPrimer Express softwareを使用し、アニーリング温度 60 ± 1 °Cとした。DNAセグメント検知用プライマーのリストをTable V-3に、GMトウモロコシおよびRRSに導入されているDNAの構造および各プライマー対の増幅部位と予想されるDNA断片長をFig. V-2に示した。

4) PCR 条件

PCR反応液の組成は、 $1 \times$ PCR buffer II, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 各 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 5'-, 3'-プライマー, 0.625 units DNAポリメラーゼおよび25 ng 鋳型DNAを含み、全量25 μL とした。ただし、T-35S検知には MgCl_2 濃度を3.0 mmol/L とした。PCRはサーマルサイクラー(MJリサーチ社製PTC-200)を用い、PCR温度条件は、プレインキュベーション95°Cで10分の後、熱変成95°Cで0.5分、アニーリング60°Cで0.5分、伸長反応72°Cで0.5分を1サイクルとして40サイクル行い、最後に72°Cで7分の伸長反応を行った。ただし、T-35S検知にはアニーリングを55°Cで0.5分とした。

5) シークエンス方法

DNA シークエンスは、PCR 産物のダイレクトシークエンスを日本製粉(株)に委託した。シークエンスする DNA 断片を得るための PCR は、次の条件で行った。

PCR 溶液の組成は、1 × PCR buffer II , 200 μmol/L dNTP , 1.5 mmol/L MgCl₂ , 各 0.5 μmol/L 5'-, 3'-プライマー, 0.625 units DNA ポリメラーゼおよび 25 ng 鑄型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は、プレインキュベーション 95 °C で 10 分の後、熱変成 95 °C で 1 分、アニーリング 55 °C で 2 分、伸長反応 72 °C で 2 分を 1 サイクルとして、45 サイクル行い、最後に 72 °C で 7 分の伸長反応を行った。

6) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法

IV-2-2 7) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法に同じ。

V-3 結果

1) DNA シークエンスの解析と DNA セグメント検知用プライマーの設計

次に 7 系統 GM トウモロコシのシークエンスの解析を示し、Fig. V-1 に導入されている DNA 構造を示す。

(1) Event176

Event176 に導入されている発現カセットを次に示す。

- ・害虫抵抗性形質: [トウモロコシ由来 phosphoenol pyruvate carboxylase promoter (PEPC pro)]-[*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 株由来 synthetic *cryIA(b)* gene]-[トウモロコシ由来 phosphoenol pyruvate carboxylase の No.9 intron を含む DNA 断片(PEPC#9 int.)]-[T-35S].
- ・害虫抵抗性形質: [トウモロコシ由来カルシウム依存性 protein kinase promoter (CDPK pro)]-[synthetic *cryIA(b)*]-[PEPC#9 int.]-[T-35S].

食品の安全性資料には、上記の 2 つの害虫抵抗性発現カセットの[synthetic

cryIA(b)]-[PEPC#9 int.]-[T-35S]部分は同一、との記載がある。

- ・選択マーカーとして導入されている除草剤 glufosinate 耐性形質：
[P-35S]-[*Streptomyces hygrosopicus* 由来 phosphinothricin N-acetyltransferase
(*bar*) gene]-[T-35S].

本章でシークエンスした[PEPC pro]-[synthetic *cryIA(b)*]カセットおよび[CDPK pro]-[synthetic *cryIA(b)*]カセットにおいて、これまでシークエンスした部分および Maize PEPC1 gene for phosphoenolpyruvate carboxylase (GenBank Accession No. X15239), Zea mays calcium-dependent protein kinase (CDPK), gene exons 1-7 and partial cds. (同 No. L27484), U.S. Patent 5,625,136⁶¹⁾における Sequence 3 (同 No. I41419)および Cauliflower mosaic virus genome (同 No. V00141)との相同性を調べた。また、[*bar*]カセットのシークエンス結果と、Cauliflower mosaic virus genome (同 No. V00141)および *Streptomyces hygrosopicus bar* gene conferring resistance to herbicide bialaphos (同 No. X05822)との相同性を調べた。これらの比較から、シークエンスした DNA 配列の由来を推定した。また、食品の安全性資料との矛盾はなかった。

(2) Bt11

Bt11 に導入されている発現カセットを次に示す。

- ・害虫抵抗性形質: [P-35S]-[トウモロコシ alcohol dehydrogenase 1 gene(*adh1-S*)の No.6 intron を含む DNA 断片 (IVS6)]-[synthetic *cryIA(b)*]-[*A. tumefaciens* 由来 nopaline synthase terminator (NOS ter)].
- ・選択マーカーとして導入されている除草剤 glufosinate 耐性形質：
[P-35S]-[*adh1-S* の No.2 intron を含む DNA 断片 (IVS2)]-[*Streptomyces viridochromogenes* 由来 synthetic phosphinothricin N-acetyltransferase (*pat*) gene]-[NOS ter].

本章でシークエンスした[synthetic *cryIA(b)*]カセットにおいて、これまでシークエンスした部分および Cauliflower mosaic virus genome (GenBank Accession No. J02040), Maize alcohol dehydrogenase 1 gene (*Adh1-1S*)⁸²⁾ (同 No. X04049),

U.S. Patent 5,880,275⁸³⁾の Sequence 22 , *Agrobacterium tumefaciens* gene encoding nopaline synthase (同 No. V00087)との相同性を調べた。また, [pat]カセットのシーケンス結果と, これまでシーケンスした部分および Cauliflower mosaic virus genome (同 No. V00141), *Streptomyces viridochromogenes* phosphinothricin N-acetyltransferase (*pat*) gene, complete cds. (同 No. M22827), No. V00087 との相同性を調べた。これらの比較から, シーケンスした DNA 配列の由来を推定した。また, 食品の安全性資料との矛盾はなかった。

(3) T25

T25 に導入されている発現カセットを次に示す。

- ・除草剤 glufosinate 耐性形質: [P-35S]-[pat]-[T-35S].

本章でシーケンスした [pat]カセットにおいて, これまでシーケンスした部分および Cauliflower mosaic virus genome (GenBank Accession No. V00141), *Streptomyces viridochromogenes* phosphinothricin N-acetyltransferase (*pat*) gene, complete cds. (同 No. M22827)との相同性を調べた。これらの比較から, シーケンスした DNA 配列の由来を推定した。また, 食品の安全性資料との矛盾はなかった。

(4) MON810

MON810 に導入されている発現カセットを次に示す。

- ・害虫抵抗性形質: [CMV 由来の DNA 断片を, 高発現のため2回反復して含む 35S promoter (E-35S)]-[トウモロコシ *hsp70* gene (heat-shock protein) の No.1 intron を含む DNA 断片(*hsp70* int.)]-[synthetic *cryIA(b)*].

食品としての安全性資料には, MON810 の作製に, [E-35S]-[*hsp70* int.]-[synthetic *cryIA(b)*]-[NOS ter]の構造を持つプラスミドの導入を図ったが, [E-35S]-[*hsp70* int.]-[synthetic *cryIA(b)*の前半]が植物体に導入されたとある。第三章において得られたシーケンス結果と, Cauliflower mosaic virus genome (GenBank Accession No. V00141), Maize gene for heat shock protein 70 exon 1 (*hsp70*; clone pMON9502)⁸⁴⁾ (同 No. X03658), Maize gene for heat shock protein

70 exon 2 and 3'-UT (hsp70; clone pMON9502)⁸⁴⁾ (同 No. X03697), および同じ発現カセットを有する MON809 に関する飼料と環境に対する安全性資料との相同性を調べた。これらの比較から、シークエンスした DNA 配列の由来を推定した。また、食品の安全性資料および MON809 に関する飼料と環境に対する安全性資料との矛盾はなかった。さらに、本シークエンスから予想される CryIA(b)タンパクと *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* の HD-1 株由来 natural CryIA(b)タンパク(PIR Accession No. A29125)との相同性を調べたところ同一であった。また、後に示す MON802 に導入されている[E-35S]-[hsp70 int.]-[synthetic cryIA(b) gene]-[NOS ter]カセットのシークエンスと、増幅に使用したプライマー部分の 2 bp を除き同一であった。

(5) GA21

GA21 に導入されている発現カセットを次に示す。

- ・除草剤 glyphosate 耐性形質: [No.1 intron を含む rice actin promoter (Pr-act)]-[トウモロコシおよびヒマワリ由来 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase 領域上流の葉緑体移行タンパク DNA 配列情報から合成され、最適化された DNA 配列 (OTP)]-[トウモロコシ由来 point mutated 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase gene (*m-epsps*)]-[NOS ter].

第IV章において得られたシークエンス結果と, *O. sativa* Act1 gene (GenBank Accession No. X63830), Act1 = actin 1 {5' region, promoter} [rice, Genomic, 4599 nt] (同 No. S44221), Sunflower mRNA for ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase RuBisCO SSU (同 No. X05079), *Z. mays* rubisco small subunit gene (同 No. Y09214), *Z. mays* mRNA for EPSP-synthase (同 No. X63374)および *A. tumefaciens* gene encoding nopaline synthase (同 No. V00087)との相同性を調べた。これらの比較から、シークエンスした DNA 配列の由来を推定した。また、食品の安全性資料との矛盾はなかった。

(6) DLL25

DLL25 に導入されている発現カセットを次に示す。

・除草剤 glufosinate 耐性形質: [P-35S]-[*bar*]-[*A. tumefaciens* 由来 T-DNA transcript number 7 terminator (Tr7)].

なお、この発現カセットの 5' 側に、Tr7 の相補 DNA の一部(Tr7 comp.) が導入されている。

本章でシークエンスした結果と *A. tumefaciens* gene encoding 'transcript 7' mRNA for a protein with unknown function (GenBank Accession No. V00090), *A. tumefaciens* Ti plasmid pTi15955 T-DNA region (同 No. X00493), Cauliflower mosaic virus genome (同 No. V00141), 同 No. X05822 との相同性を調べた。これらの比較から、シークエンスした DNA 配列の由来を推定した。また、食品の安全性資料との矛盾はなかった。

(7) MON802

MON802 に導入されている発現カセットを次に示す。

・害虫抵抗性形質: [E-35S]-[*hsp70* int.]-[synthetic *cryIA(b)* gene]-[NOS ter]

・除草剤 glyphosate 耐性形質: [E-35S]-[*hsp70* int.]-[*Arabidopsis thaliana* 由来葉緑体移行タンパクの DNA 配列(CTP2)]-[*Agrobacterium* sp. strain CP4 由来 synthetic 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase gene (*cp4-epsps*)]-[NOS ter]

・除草剤 glyphosate 分解形質: [E-35S]-[*hsp70* int.]-[*A. thaliana* 由来 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene の small subunit gene から単離された葉緑体移行タンパクの DNA 配列(CTP1)]-[*Ochrobactrum anthropi* strain LBAA 由来 glyphosate oxidoreductase gene (*gox*)]-[NOS ter]

本章でシークエンスした[synthetic *cryIA(b)*]カセットのシークエンス結果および Maize gene for heat shock protein 70 exon 1 (*hsp70*; clone pMON9502)⁸⁴⁾ (GenBank Accession No. X03658), Maize gene for heat shock protein 70 exon 2 and 3'-UT (*hsp70*; clone pMON9502)⁸⁴⁾ (同 No. X03697), *A. tumefaciens* gene encoding nopaline synthase (同 No. V00087), および同じ発現カセットを有する MON809 に関する飼料と環境に対する安全性資料との相同性を調べた。本シ

ークエンスから予想される CryIA(b)タンパクと *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* の HD-1 株由来 natural CryIA(b)タンパク(PIR Accession No. A29125)との相同性を調べたところ、1,156 アミノ酸配列が同一であった。また、[*cp4-epsps*]カセットのシーケンス結果と、No. X03658, No. X03697, No. V00087, U.S. Patent 5,804,425⁸⁰⁾における Sequence 2 および 8 (GenBank Accession No. AR038168 および同 No. AR038180)の DNA 配列情報、同じ発現カセットを有する MON809 に関する飼料と環境に対する安全性資料との相同性を調べた。さらに、[*gox*]カセットのシーケンス結果と No. X03658, No. X03697, No. V00087, U.S. Patent 5,776,760⁸¹⁾における Sequence 8 (GenBank Accession No. AR016595)および同じ発現カセットを有する MON809 に関する飼料と環境に対する安全性資料との相同性を調べた。これらの比較から、シーケンスした DNA 配列の由来を推定した。また、食品の安全性資料および MON809 に関する飼料と環境に対する安全性資料との矛盾はなかった。

以上のシーケンス解析結果を基に、DNA セグメント検知用プライマーとして、*pat*, *bar*, *cryIA(b)*, *m-epsps*, P-35S, T-35S, NOS ter *cp4-epsps*, *gox*, *Pr-act* 検知用プライマーを設計した。さらに、pCR 2.1 (Invitrogen 社製)の DNA 配列情報から、*nptII* 検知用プライマーを設計した。

2) DNA セグメント検知用プライマーの特異性

設計したプライマーの特異性を調べるために、non-GM トウモロコシ, Event176, Bt11, MON810, T25, GA21, MON802, non-GM soy, RRS, コメ, コムギ, オオムギから抽出した DNA を鋳型として PCR を行った。結果を Fig. V-3 に示し、次に詳述する。この結果は、食品の安全性資料および飼料と環境に対する安全性資料に導入が記述されている DNA セグメントと矛盾がなかった。DLL25 については、入手した DNA 量が少量であったため、全てのプライマー対の DLL25 に対する特異性の確認を行うことができなかった。しかし、DLL25 に導入されている *bar* および T-35S を検知するプライマー対(b)および(c), (g)については、DLL25 の DNA 溶液を用いて

PCR を行い、予想される増幅長の産物のみが得られた。

(1) *pat* および *bar*

食品の安全性資料によると、*pat* は Bt11 と T25 に導入されており、183 アミノ酸残基(終止コドンを含めて 552b)であることが記述されている。T25 の *pat* の DNA 配列は、Bt11 に導入されている *pat* の DNA 配列と同一であった。また、Bt11 の *pat* (549 b)を、*S. viridochromogenes* の original *pat* gene (GenBank Accession No. M22827)と比較すると、DNA 配列から予想されるアミノ酸配列に変更はないが、DNA 配列の相同性は 70 %であった。*bar* は Event176 と DLL25 に導入されている。シーケンスを行った範囲において、Event176 の *bar* の DNA 配列は、DLL25 の *bar* の DNA 配列と同一であった。DLL25 の *bar* は、開始コドンのため GTG を ATG に改変している点を除いて、*S. hygroscopicus* 由来 original *bar* gene (GenBank Accession No. X05822)と同一である。*pat* と *bar* は共に除草剤 glufosinate 耐性のために、同じアミノ酸配列の phosphinothricin acetyltransferase protein をコードしているが、Bt11-*pat* と DLL25-*bar* の DNA 配列は、約 65 %の相同性である。Fig. V-3 (a)~(c)に示すように、*pat* 検知用プライマー対による PCR では Bt11 と T25 に、*bar* 検知用プライマー対による PCR では Event176 に予想される長さのバンドが見られた。

(2) *cryIA(b)*

*cryIA(b)*は Bt11 , Event176 , MON810 および MON802 に導入されている。シーケンスを行った範囲において、MON810 と MON802 の *cryIA(b)*の DNA 配列は、同一であった。Bt11 , Event176 および MON802 の *cryIA(b)*は、導入されている長さ(それぞれ 1,848 , 1,947 および 3,471bp)と使用されているコドンには変更が加えられている。アミノ酸配列については natural *CryIA(b)*の N-末端から全 1,156 残基(PIR Accession No. A29125)を比べて、それぞれ 648 , 615 , および 1,156 残基が同一であった。Fig. V-4 に、Bt11 , Event176 , MON810 および MON802 に導入された *cryIA(b)*の開始コドン ATG から 216 bp の比較を示した。*cryIA(b)*検知用プライマー対としてプライマー対 (d) と(e)の 2 対を設計

した(Fig. V-2 (d) と(e), Table V-3 および Fig. V-4 の中抜き矢印). これは, Bt11, Event176, MON810/ MON802 の *cryIA(b)* で最も相同性の高い部分から選択している. *cryIA* 4-5' の 13 番目の塩基については M (A および C), *cryIA* 4-3' の 14 番目の塩基については S (G および C) にして, 合成を行っている. Fig. V-3 (d) と(e) に示すように, プライマー対(d)と(e)を使用したときの PCR では, *cryIA(b)* から予想される長さの 107 bp および 152 bp の増幅産物が得られた. さらに, 他の農産物から偽陽性は見られず, *cryIA(b)* に特異的であった. *cryIA* 3-3' については, MON810/ MON802 の塩基配列から設計したため, Bt11 と Event176 において, それぞれ 8 および 14 番目の塩基が異なっているが, 良好な増幅を示している.

(3) *m-epsps*

m-epsps は GA21 に導入されている. これは, トウモロコシ由来 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene であり *Z. mays* mRNA for EPSP-synthase (No. X63374) と 8 塩基, アミノ酸配列では 2 残基異なっている. この変異により, 除草剤 glyphosate 耐性形質となっていると考えられる. Fig. V-2 (f) および Table. V-3 (f) に示すように *m-epsps* 検知用として, プライマー対(f) を設計した. *m-epsps* はトウモロコシ由来であるため, トウモロコシを鋳型とした PCR においても, 予想される 193 bp の PCR 産物が得られると考えられた. しかし, プライマー対(f) による PCR 後, ゲル電気泳動を行ったところ, Fig. V-3 (f) に示すように GA21 のみから 193 bp の産物が得られ, 他のトウモロコシでは 100 bp 程度長い産物が得られた. この産物は, GA21 からも不明瞭なバンドとして得られた. そのため non-GM トウモロコシの PCR 産物と GA21 の 193 bp の PCR 産物のシーケンスを行い DNA 配列を確認したところ, non-GM トウモロコシの PCR 産物は, プライマー対(f) のアニーリングする部位の間に 97 bp のイントロンを含んでいた. また, その増幅長は 290 bp であった. 290 bp の PCR 産物は, トウモロコシが内在的に持っている *m-epsps* であると考えられた. これを native *m-epsps* gene と表し, GA21 に導入されている *m-epsps* との DNA 配列の比較を

Fig. V-5 に示す. 以上から, プライマー対(f) を使用することにより, point mutated *m-epsps* gene と native *m-epsps* gene を区別することが可能となった.

(4) P-35S および T-35S

P-35S は, 構造遺伝子を発現させるプロモーターとして, 多くの組換え体に導入されている. Fig. V-6 に, cauliflower mosaic virus (CMV) genome (GenBank Accession No. V00141 および No. J02046) と Event176, Bt11, T25, MON810 および DLL25 の P-35S 領域, さらに, Event176 の *cryIA(b)* と T25 の T-35S 領域の DNA の比較を行った. これより, プロモーターとして導入されている部分とターミネーターとして導入されている DNA 領域は, 系統によって異なり, 重なっている部分があることが明らかとなった. 特に, Event176 の *bar*, Bt11 の *cryIA(b)* および Bt11 の *pat* に対するプロモーターと, T25 の *pat* に対するターミネーターでは, GenBank Accession No. V00141 における 7,443 ~ 7,563 部分が重なっており, T-35S 検知用にプライマーを設計しても, 設計するプライマー対によっては P-35S を検知する可能性があることが示されている. さらに CMV E-35S の特許情報^{85, 86)}によると, E-35S は, GenBank Accession No. V00141 における 7,092 ~ 7,344 の 253 bp が 10 bp を挟んでタンデムに連結された構造をしている. MON810 において 2 本のバンドとならないように, P-35S 領域の比較データおよび CMV E-35S の特許情報に基づき, P-35S 検知用プライマーを設計した (Fig. V-6 の中抜き矢印). Fig. V-3 (g) に示すように, P-35S および E-35S が導入されている Event176, Bt11, T25, MON810 および DLL25 から, 偽陽性が見られず, 予想される 101 bp の増幅が見られた. さらに, E-35S が導入されている RRS からもバンドが見られた.

T-35S は, Event176 および T25 に導入されている. T-35S 検知用プライマーは, T25 の *pat* および Event176 の *cryIA(b)* のカセットに導入されている T-35S シークエンスを比較し, Fig. V-6 に示すようにポリアデニレーションシグナルを増幅するように設計した. T25 の食品としての安全性資料によると, T25 に導入されている T-35S 領域は 200 bp 程度である. そのため, Fig. V-6 より Event176

および T25 に導入されている T-35S で同一の DNA 配列領域は、80 bp 程度であると推察され、本研究で増幅している 84 bp よりも長い DNA 断片を増幅することは困難であった。通常の PCR 条件では増幅バンドの強度が弱かったため、PCR 条件の再設定を行い、最適な条件として、マグネシウム濃度を 3.0 mmol/L、アニーリング温度を 55 °C とした。Fig. V-3 (h) には、PCR 条件の最適化後に PCR およびゲル電気泳動を行った結果を示しており、非特異的な増幅が見られず、T25 および Event176 のみに予想される 84 bp の増幅産物が得られた。

(5) NOS ter

Bt11, GA21 および MON802 に導入されている NOS ter と、GenBank Accession No. V00087 との比較を行った。Fig. V-7 に示す。T-35S と異なり NOS ter 部分は、どの系統もほぼ同じ部分が導入されている。プライマー対 (i) および(j)を設計し、その特異性を Fig. V-3 (i)および V-3 (j)に示す。Bt11, GA21 および MON802 に予想される長さの増幅が見られたほか、NOS ter の導入されている RRS からも増幅が見られた。MON810 については NOS ter が検知できず、MON810 に NOS ter 部分は導入されていないことを示し、これは食品としての安全性資料の情報と一致する。

(6) その他の DNA セグメント

cp4-epsps, *gox* および *nptII* は、MON802 に導入されている。*cp4-epsps* および *gox* のシーケンスについては、MON809 の安全性資料および特許情報⁸⁷⁾と一致している。これらの DNA 領域を検知するためのプライマー対(k)および(l)は、Fig. V-2 (k)および(l), Table V-3 に示しているように設計した。PCR 産物のゲル電気泳動結果を、Fig. V-3 (k)および(l)に示す。*cp4-epsps* は、MON802 と RRS に導入されており、Fig. V-3 (k)において増幅バンドが見られた。*nptII* 検知用プライマーは、pCR 2.1 を鋳型 DNA とした PCR において、特異的であった。さらに、Fig. V-3 (m)に示すように、実際の農作物を鋳型とした PCR において、*nptII* の導入されている MON802 より *nptII* を特異的に検知し、他系統のトウモロコシおよび他の農作物から偽陽性のバンドは見られなかった。

Pr-act 検知用プライマーはコメ由来 *actin* 遺伝子のプロモータから設計している。Fig. V-3 (n)に示すように、*Pr-act* の導入されている GA21 から *Pr-act* を特異的に検知した。同時に、*Pr-act* はコメ内在性遺伝子であるため、コメから抽出した DNA を鋳型にしたときの PCR により PCR 産物が得られた。

3) DNA セグメント検知用プライマーの検知感度

non-GM トウモロコシに 5 系統の GM トウモロコシ(Event176 , Bt11 , T25 , GA21 および MON810)を 0.1 % および 0.5 % ずつ含むトウモロコシ粉砕物と non-GM ダイズに RRS を 0.1 % 含むダイズ粉砕物を作製した。この粉砕物から抽出した DNA を鋳型 DNA として、設計したプライマー対の検知感度を調べた。トウモロコシ粉砕物からは、*pat* , *bar* , *cryIA(b)* , P-35S , NOS ter , *m-epsps* , T-35S , *Pr-act* の検知を行い、ダイズ粉砕物からは、*cp4-epsps* , P-35S , NOS ter の検知を行った。*pat* , *bar* , *cryIA(b)* , P-35S , NOS ter については、0.1 % GM トウモロコシ粉砕物から検知することが可能であった。*m-epsps* (193 bp 増幅産物) , T-35S , *Pr-act* については、0.1 % GM トウモロコシ粉砕物から検知できなかったが、0.5 % GM トウモロコシ粉砕物からは検知した。0.1 % RRS 粉砕物からは、*cp4-epsps* , P-35S , NOS ter を検知した。

V-4 考察

1) GM 作物に導入されている組換え DNA 構造が推定可能な DNA セグメント検知のプロファイル

2004 年よりカルタヘナ法²⁹が施行され、導入されている DNA 配列が未知の場合であっても GM 作物の有無を検査するための検知技術が必要とされる。そのため、GM 作物に導入されている DNA セグメントを個別に検知し、結果を統合することで組換え DNA 構造を推定する方法を開発した。本章で設計した DNA セグメント検知用プライマー対による PCR 結果と農作物と関係性をプロファイルすると、Table V-4 のようになる。このプロファイルから、導入されている組換え DNA の構造を推定すること

が可能となる。さらに、現在のところ導入されている DNA セグメントの組み合わせが同一のものは存在しないため、これらの組換え体の系統も判別できることが明らかとなった。しかしながら、プロファイルは、1 系統の GM 作物に導入されている DNA セグメントとして解析される。そのため、次の 3 つの場合には、導入された DNA 構造の推定や GMO 系統の判別が困難であるか、判断を誤る場合があると考えられる。

- ・ 多系統の GMO 混合物としてサンプルが供される場合
- ・ Pr-act が GM イネに導入される場合のように、導入されている DNA 構造が農作物由来でありかつ、サンプルが当該農作物である場合
- ・ 組換え体に導入されている DNA 配列を持つ生物(例えば CMV や *A. tumefaciens*)が、サンプル中にコンタミネーションとして存在する場合

これらのほか、サンプルが加工品の場合は、DNA の分解に起因する PCR 増幅の成否やプライマー対の検知感度が違いが影響し、良好なプロファイルが得られないと考えられる。これらのことから、プロファイルによる組換え体に導入された DNA 構造の推定は、サンプルとして一個体の植物体を対象とすることが有効である。そして、以上により得たプロファイルによる遺伝子構造の情報と、系統特異的な検知技術を開発し、その結果を組み合わせることで、未承認 GM 作物が存在するか否かを検証することが可能である。

また、本法は、導入されている DNA 構造が既知の GM 農作物に対するスクリーニング法としても、有効な検査技術であると考えられる。現在、新規 GM 作物の野外試験申請数や新規に安全性審査の終了した GM 農作物系統数が増加しているため、それら全てを個々の系統特異的な検知を行うことは、コスト・時間的に困難である。一方、P-35S, NOS ter の検知といった広く GM 農作物に導入されている DNA 配列を検知するスクリーニングを行った後、系統特異的な検知を行うことも、GM 農作物系統数が増加しているために、コスト・時間的に困難であると考えられる。そのため検査対象の GM 農作物を、導入されているセグメントごとに分類・検知を行い、その結果に応じて個々の系統特異的な検知を行うことが有効である。本章で作製したプライマー対は、トウモロコシ、ダイズ、コメ、コムギ、オオムギといった、主要穀物から抽出した

DNA を用いた場合において偽陽性が見られず特異的であったことから、実際の使用に適用できる。また、検知感度は、日本における IP ハンドリングを行った non-GM トウモロコシに対する GM トウモロコシの意図せざる混入の目安となる 5 %^{19, 20}、EU における 0.9 %⁸⁷と比較しても十分であると考えられる。

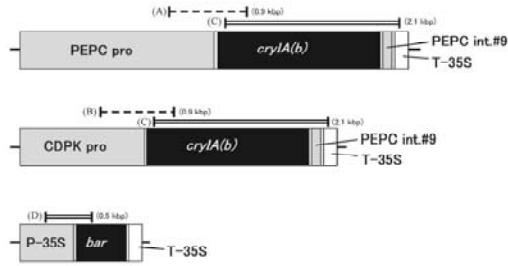
2) 今後の DNA セグメント検知技術の課題

本章で開発した方法により、GM 作物に導入されている DNA 構造を推定が可能となった。しかし、現在増加している GM 作物の野外実験申請数や安全性審査の終了した GM 農作物数に対応するためには、検知対象の DNA セグメント数を増やしていくことが必要である。しかし、検知対象の DNA セグメントを増やすと、検査に長時間を要し、個別の PCR による検知では現実的ではないと考えられる。そのため、DNA アレイ技術を用いてセグメントおよび系統特異的検知を効率よく行う方法を開発することが、今後の課題になる。

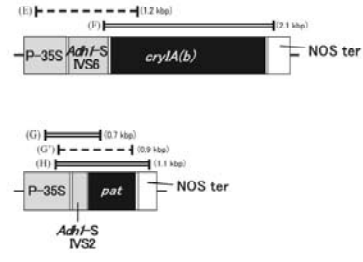
Table V-1 トウモロコシ, ダイズ, コメ, コムギ, オオムギ内に性遺伝子検知用プライマーの一覧

Name	Sequence		specificity		Length
ZE01	TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG		sense		161 bp
ZE02	GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT		anti-sense	Maize	
Le101-5'	GGC TGA TAA CAC ACT CTA TTA TTG T		sense		818 bp
Le101-3'	TGA TGG ATC TGA TAG AAT TGA CGT T		anti-sense	Soy	
rAct pro 2-5'	CGT TGC AGC GAT GGG TAT		sense		121 bp
rAct pro 1-3'	GGG CTT GCT ATG GAT CGT G		anti-sense	Rice	
Gli1-5'	GCC ACA AGA GCA AGT TCC ATT GGT A		sense		403 bp
Gli1-3'	AAC TTG TGA GCT TGC ATG CGC TAT		anti-sense	Wheat	
HvLD1-5'	GTG TGC TTC TTT GAT GGT CCA G		sense		149 bp
HvLD1-3'	TGC GCC TTA GTT GGA TGA TAC A		anti-sense	Barley	

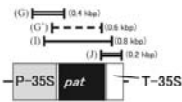
A: Event176



B: Bt11



C: T25



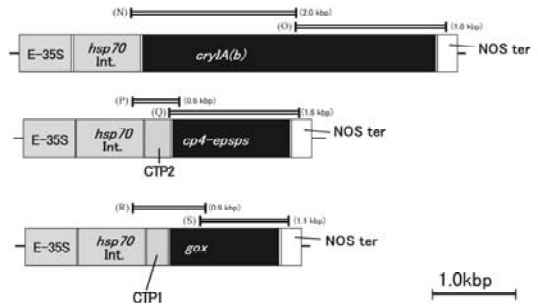
D: MON810



E: GA21



G: MON802



F: DLL25

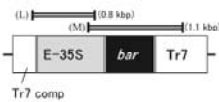


Fig. V-1 GMトウモロコシ(A-G)に導入されている DNA 配列の模式図およびシーケンス部位

()内に増幅長を示す。

破線(---)は、第 III 章においてシーケンスを行った部分を示す。

実線(—)は、第 IV 章においてシーケンスを行った部分を示す。

二重線(==)は、第 V 章においてシーケンスを行った部分で示す。

Table V-2 GMTウモロコシに導入されたDNA配列シークエンス用プライマーの一覧

Name of Primer Pair	Name	Sequence (5'→3')	specificity	Length
A	PE01	AGA TTC TTC ACT CCG ATG CAG CCT A	PEPC pro /sense	0.9 kbp
	CR02	CTC TGG GCG TAG ATT TGG TAC A	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
B	CD01	CGG ATG GTC CTT ATG CAA TTT TGT C	CDPK-pro /anti-sense	0.9 kbp
	CR02	CTC TGG GCG TAG ATT TGG TAC A	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
C	<i>cryIA</i> 2-5'	TGG ACA ACA ACC ACA TCA A	<i>cryIA(b)</i> / sense	2.1 kbp
	T35S 3-3'	TGG ATT TTG GTT TTA GGA ATT AGA AA	CMV /anti-sense	
D	CM01	CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A	CMV /sense	0.6 kbp
	bar 1-3'	GAT AGC GCT CCC GCA GAC	<i>bar</i> /anti-sense	
E	CM01	CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A	CMV /sense	1.2 kbp (Bt1) 1.4 kbp (MON810)
	CR02	CTC TGG GCG TAG ATT TGG TAC A	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
F	adh1 1-5'	GCA CTG AAT TTG TGA ACC C	<i>adh1-S</i> /sense	2.1 kbp
	NOS ter 2-3'	CAT TAT TTT GTT TAT CAG C	NOS ter /anti-sense	
G	CM01	CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A	CMV /sense	0.7 kbp (Bt1) 0.4 kbp (T25)
	PA01	AGA TCA TCA AIC CAC TCT TGT GGT G	<i>pat</i> /anti-sense	
G'	CM03	CCT TCG CAA GAC CCT TCG TCT ATA	CMV /sense	0.9 kbp (Bt1) 0.6 kbp (T25)
	PA02	AGG AGC TGG CAA CTC AAA AIC CCT	<i>pat</i> /anti-sense	
H	P35S 1-5'	ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T	CMV /sense	1.1 kbp
	NOS-3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	NOS ter /anti-sense	
I	P35S 1-5'	ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T	CMV /sense	0.8 kbp
	T35S 1-3'	ACT AAG GGT TTC TTA TAT GCT CAA CA	CMV /anti-sense	
J	T25 1-5'	GCC AGT TAG GCC AGT TAC CCA	<i>pat</i> /sense	0.2 kbp
	T35S 4-3'	TTT TAG TAC TGG ATT TTG GTT TTA GGA ATT AG	CMV /anti-sense	
K	rActpro 1-5'	AIC TTT GGC CTT GGT AGT TTG	Pract/sense	2.3 kbp
	NOS ter 1-3'	ATT GCG GGA CTC TAA TCA TAA	NOS ter /anti-sense	
L	clT7 ler 1-5'	TGG TAC ATT GCC GTA GAT GAA AG	complement T7 /sense	0.8 kbp
	P35S 2-3'	CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T	CMV /anti-sense	
M	P35S 1-5'	ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T	CMV /sense	1.1 kbp
	Tr7 ter 1-3'	GGT TCG ATC CTA CGT AAG GAT A	Tr7 /anti-sense	
N	HS01	AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT	<i>hsp70</i> / sense	2.0 kbp
	<i>cryIA</i> 2-3'	GAC GTG AAG AGC TCA TTG ACA G	<i>cryIA(b)</i> /anti-sense	
O	<i>cryIA</i> 3-5'	TGT ACA TCG ACC GCA TCG AGT	<i>cryIA(b)</i> / sense	1.8 kbp
	NOS-3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	NOS ter /anti-sense	
P	HS01	AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT	<i>hsp70</i> / sense	0.6 kbp
	<i>spss</i> 2-3'	GAC TTG TCG CCG GGA ATG	<i>cp4-eps</i> /anti-sense	
Q	CIP2 1-5'	CIT CGT CCT CTT AAG GTC AIG TCT TCT	CIP2 from <i>A. thaliana</i> /sense	1.6 kbp
	NOS-3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	NOS ter /anti-sense	
R	HS01	AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT	<i>hsp70</i> / sense	0.9 kbp
	<i>box</i> 1-3'	GTT GAG ACG ACG AAG TTC CCA	<i>gox</i> /anti-sense	
S	<i>box</i> 1-5'	ATG CTA GCC ACC TTA TCC GTC A	<i>gox</i> /sense	1.1 kbp
	NOS-3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	NOS ter /anti-sense	

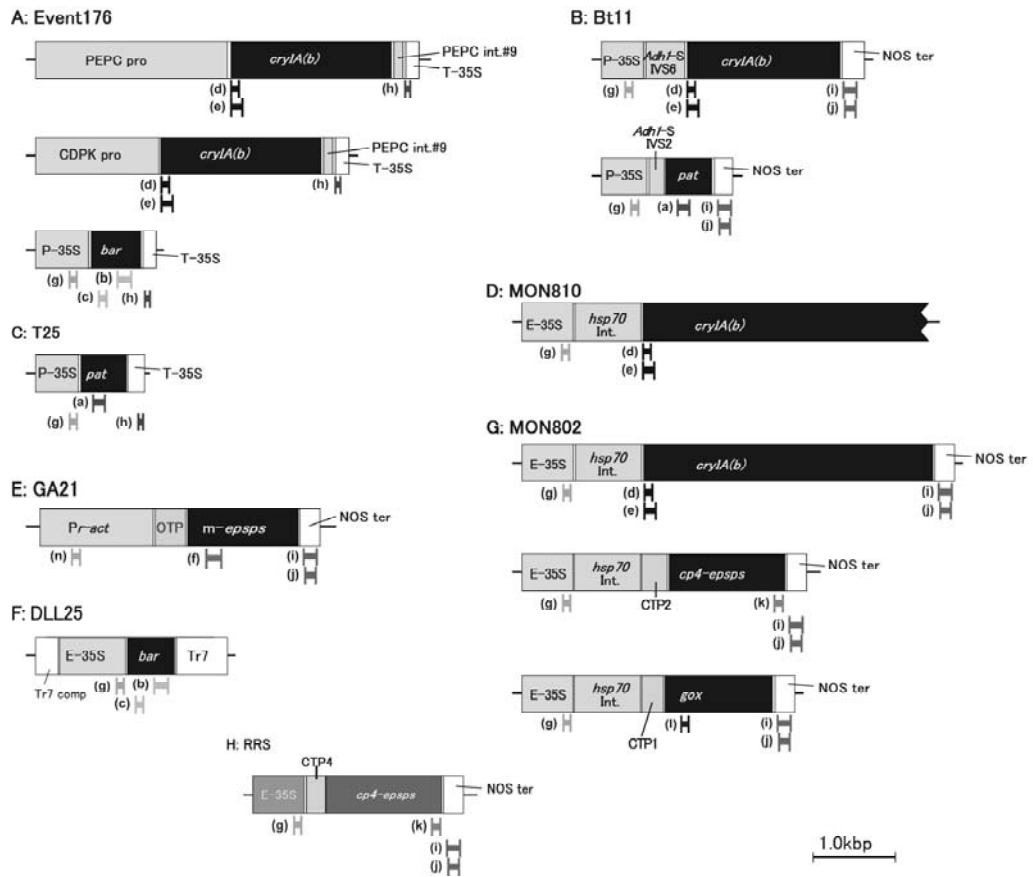


Fig. V-2 GMトウモロコシ(A-G)および GM ダイズ(H)に導入されている DNA 配列の模式図および検知対象部位

検知対象部分を実線(■)で示した.

Table V-3 DNA セグメント検知用プライマーの一覧

Name	Sequence	specificity		Length
		sense	anti-sense	
(a) pat1-5'	AAG AGT GGA TTG ATG ATC TAG AGA GGT	sense		161 bp
pat1-3'	ATG CCT ATG TGA CAC GTA AAC AGT ACT	anti-sense	<i>pat</i>	
(b) bar 2-5'	ACT GGG CTC CAC GCT CTA CA	sense		186 bp
bar 2-3'	AAA CCC ACG TCA TGC CAG TTC	anti-sense	<i>bar</i>	
(c) bar 3-5'	CAT CGT CAA CCA CTA CAT CGA GA	sense		104 bp
bar 1-3'	GAT AGC GCT CCC GCA GAC	anti-sense	<i>bar</i>	
(d) cryIA 4-5'	GGA CAA CAA CCC MAA CAT CAA C	sense		107 bp
cryIA 3-3'	CGA TGG GGG TGT AAC CGG T	anti-sense	<i>cryIA(b)</i>	
(e) cryIA 4-5'	GGA CAA CAA CCC MAA CAT CAA C	sense		152 bp
cryIA 4-3'	GCA CGA ACT CGC TSA GCA G	anti-sense	<i>cryIA(b)</i>	
(f) m-eps 1-5'	GTC GAA GCG GAC AAA GCT G	sense		193 bp
m-eps 1-3'	CCC TCA TTC TTG GTA CTC CAT CA	anti-sense	point mutated <i>m-epsps</i> native <i>m-epsps</i>	
(g) P35S 1-5'	ATT GAT GTG ATA TCT OCA CTG ACG T	sense		101 bp
P35S 2-3'	CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T	anti-sense	P-35S	
(h) T35S 1-5'	GAA ACC CTT AGT ATG TAT TTG TAT TTA AAT ACT TC	sense		84 bp
T35S 4-3'	TTT TAG TAC TGG ATT TTG GTT TTA GGA ATT AG	anti-sense	T-35S	
(i) NOS-1	GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG	sense		180 bp
NOS-3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	anti-sense	NOS ter	
(j) NOS ter 3-5'	GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG	sense		151 bp
NOS ter 3-3'	CGC TAT ATT TTG TTT TCT AIC GCG T	anti-sense	NOS ter	
(k) epsps 1-5'	GCC TCG TGT CGG AAA ACC CT	sense		118 bp
epsps 3-3'	TTC GTA TCG GAG AGT TCG AIC TTC	anti-sense	<i>cp4-epsps</i>	
(l) gox 2-5'	TGC CAG GAA ACT TGA CTA GCG	sense		103 bp
gox 2-3'	CGA ATC AAC CAA GGC ATG ATG	anti-sense	<i>gox</i>	
(m) npt 1-5'	GAC AGG TCG GTC TTG ACA AAA AG	sense		155 bp
npt 1-3'	GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC	anti-sense	<i>nptII</i>	
(n) rActpro 2-5'	CGT TGC AGC GAT GGG TAT	sense		121 bp
rActpro 1-3'	GGG CTT GCT ATG GAT CGT G	anti-sense	<i>Pr-act</i>	

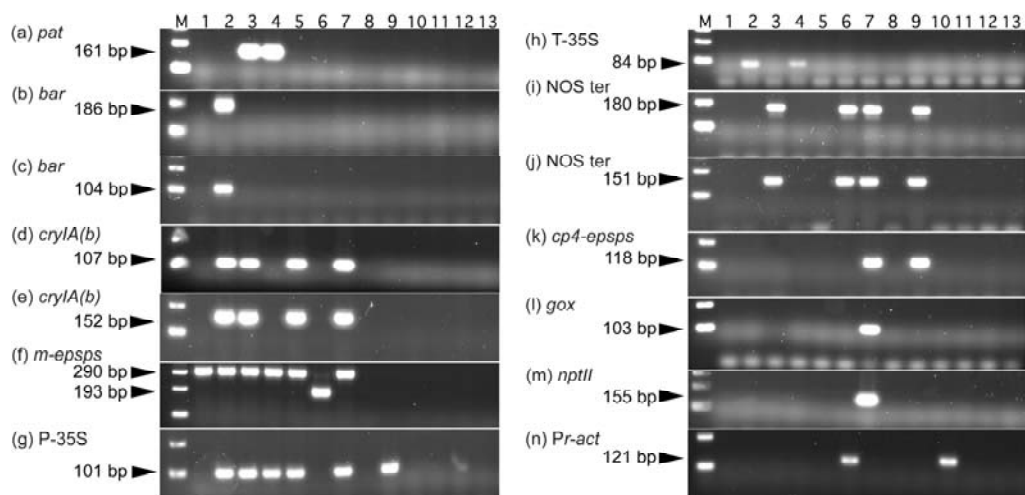


Fig. V-3 DNA セグメント検知用プライマーのトウモロコシ、ダイズ、その他の穀物に対する特異性

(a)~(n)は検知のターゲットを示し、Fig. V-2 および Table V-3 に示すプライマーと同一である。

▶は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

1: non-GMトウモロコシ, 2: Event176, 3: Bt11, 4: T25, 5: MON810, 6: GA21, 7: MON802, 8: non-GMダイズ, 9: RRS, 10: コメ, 11: コムギ, 12: オオムギ, 13: ネガティブコントロール(DNAなし), M: 100 bp ラダー

		200	m-eps 1-5'					249	
GA21	1	GTCGAAGCGG ACAAAGCTGC				CAAAAGAGCT	GTAGTTGTTG	GCTGTGGTGG	50
non-GM Maize	1	GTCGAAGCGG ACAAAGCTGC				CAAAAGAGCT	GTAGTTGTTG	GCTGTGGTGG	50
		250						299	
GA21	51	AAAGTTCCCA	GTTGAGGATG	CTAAAGAGGA	AGTGCAGCTC	TTCTTGGGGA		100	
non-GM Maize	51	AAAGTTCCCA	GTTGAGGATG	CTAAAGAGGA	AGTGCAGCTC	TTCTTGGGGA		100	
		300						349	
GA21	101	ATGCTGGAAT	CGCAATGCGG	TCCTTGACAG	CAGCTGTTAC	TGCTGCTGGT		150	
non-GM Maize	101	ATGCTGGAAT	CGCAATGCGG	CCATTGACAG	CAGCTGTTAC	TGCTGCTGGT		150	
		350		364					
GA21	151	GGAAATGCAA	CTTAC-----	-----	-----	-----		165	
non-GM Maize	151	GGAAATGCAA	CGTATGTTTC	CTCTCTCTCT	CTACAATACT	TGTTGGAGTT		200	
GA21		-----	-----	-----	-----	-----			
non-GM Maize	201	AGTATGAAAC	CCATGTGTAT	GTCTAGTGGC	TTATGGTGTA	TTGGTTTTTG		250	
			365		392				
GA21	166	-----	--GTGCTTGA	TGGAGTACCA	AGAATGAGGG		193		
non-GM Maize	251	AACCTCAGTT	ACGTGCTTGA	TGGAGTACCA	AGAATGAGGG		290		
				m-eps 1-3'					

Fig. V-5 *m-epsps* 検知用プライマーで増幅された PCR 産物の DNA 配列の比較

鋳型 DNA は、GA21(上)と non-GM トウモロコシ(下)を用いた。

DNA 配列の上部の数字は、GA21 に導入された *m-epsps* の開始コドン(ATG)のアデニンを1として番号を付けた。

DNA 配列の異なっている部分は、白抜き文字で示した。

m-epsps 検知用に設計したプライマーを中抜き矢印(⇨ ⇩)で示した。

NOS V00087	1841	GAAGCAGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	1890	
Bt11/ <i>cryIA(b)</i>	1850	gatcagGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	1899	
Bt11/ <i>pat</i>	558	cctGCGAGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	607	
GA21/ <i>m-epsps</i>	1294	llcccccGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	1343	
MON802/ <i>cryIA(b)</i>	3473	attccccGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	3522	
MON802/ <i>cp4-epsps</i>	1378	attccccGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	1427	
MON802/ <i>gox</i>	1303	attccccGATC	GTTCAAACAT	TTGGCAATAA	AGTTTCTTAA	GATTGAATCC	1352	
		NOS-1		NOS ter 3-5'				
NOS V00087	1891	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	1940	
Bt11/ <i>cryIA(b)</i>	1900	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	1949	
Bt11/ <i>pat</i>	608	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	657	
GA21/ <i>m-epsps</i>	1344	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	1393	
MON802/ <i>cryIA(b)</i>	3523	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	3572	
MON802/ <i>cp4-epsps</i>	1428	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	1477	
MON802/ <i>gox</i>	1353	TGTTGCCCGGT	CTTGCGATGA	TTATCATATA	ATTTCTGTTG	AATTACGTTA	1402	
NOS V00087	1941	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	1990	
Bt11/ <i>cryIA(b)</i>	1950	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	1999	
Bt11/ <i>pat</i>	658	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	707	
GA21/ <i>m-epsps</i>	1394	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	1443	
MON802/ <i>cryIA(b)</i>	3573	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	3622	
MON802/ <i>cp4-epsps</i>	1478	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	1527	
MON802/ <i>gox</i>	1403	AGCATGTAAT	AATTAACATG	TAATGCATGA	CGTTATTTAT	GAGATGGGTT	1452	
				NOS ter 3-3'				
NOS V00087	1991	TTTATGATTA	GAGTCCC	GCA ATTATACATT	TAATACGCGA	TAGAAAACAA	2040	
Bt11/ <i>cryIA(b)</i>	2000	TTTATGATTA	GAGTCCC	GCA ATTATACATT	TAATACGCGA	TAGAAAACAA	2028	
Bt11/ <i>pat</i>	708	TTTATGATTA	GAGTCCC	GCA ATTATACATT	TAATACGCGA	T//	748	
GA21/ <i>m-epsps</i>	1444	T//					1444	
MON802/ <i>cryIA(b)</i>	3623	TTTATGATTA	GAGTCCC	GCA ATTATACATT	T//		3653	
MON802/ <i>cp4-epsps</i>	1528	TTTATGATTA	GAGTCCC	GCA ATTATACATT	TAATACGCGA	T//	1568	
MON802/ <i>gox</i>	1453	TTTATGATTA	GAGTCCC	GCA ATTATACATT	TAATACGCGA	TAA//	1495	
		NOS-3						
NOS V00087	2041	AATTAGCGC	GCAA	ACTAGG ATAA	AATTATC	GCGCGGGTG	TCATCTATGT	2080
Bt11/ <i>cryIA(b)</i>								
Bt11/ <i>pat</i>								
GA21/ <i>m-epsps</i>								
MON802/ <i>cryIA(b)</i>								
MON802/ <i>cp4-epsps</i>								
MON802/ <i>gox</i>								

Fig. V-7 GMトウモロコシに導入されている NOS ter の DNA 配列と, *A. tumefaciens* の NOS ter (GenBank Accession No. V00087) の DNA 配列との比較

各 GM トウモロコシに導入されている DNA 構造の構造遺伝子の開始コドン (ATG) のアデニンを1として番号を付けた。

NOS ter 以外の DNA 配列と判断される部分を小文字で表し、|で境界を示した。

DNA 配列の異なる部分は、白抜き文字で示した。

シーケンスは二重スラッシュ(//)まで行った。

NOS ter 検知用に設計したプライマーを中抜き矢印(⇨ ⇩)示した。

Table V-4 鋳型DNAの農作物とDNAセグメント検知結果の一覧

target	pat		bar		cryIA(b)		m-epsps		P-35S		T-35S		NOS ter		cp4-epsps		gox		npII		Pr-actin	
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n								
primer pair amplicon	161 bp	186 bp	104 bp	107 bp	152 bp	193 bp	290 bp	101 bp	84 bp	180 bp	151 bp	118 bp	103 bp	155 bp	121 bp							
non-GM maize	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Event176	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bt11	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T25	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MON810	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GA21	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MON802	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
non-GM soy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RRS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rice	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
barley	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, 予想される長さの増幅産物が得られたことを示す
 -, 予想される長さの増幅産物が得られなかったことを示す
 +/-, 予想される長さの増幅産物が得られる場合と得られない場合があることを示す.

第VI章 食品としての安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統の定性 検知技術の開発⁸⁸⁾

VI-1 緒言

GM トウモロコシ CBH351 系統(商品名:スターリンクTM)は, プラント・ジェネティック・システムズ(PGS)社が開発した害虫抵抗性および除草剤 glufosinate 耐性トウモロコシである. その後 PGS 社は, 1996 年へキストシェーリングアグレボ社に買収された. ヘキストシェーリングアグレボ社は, 改組によりアベンティスクロップサイエンス社となった後バイエル社に買収され, 2002 年バイエルクロップサイエンス社となっている⁸⁹⁾. しかし, スターリンクに関しては, アベンティスクロップサイエンス社からバイエル社に引き継がれず, 現在 StarLINK Logistics 社が有している.

CBH351 系統には, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* 由来の殺虫性のタンパク質 Cry9C を合成する遺伝子が導入されている. このタンパク質は, pH 2.0 の人工胃液消化試験および 90 °C, 10 分間の加熱試験において比較的安定であった. これらのことから 1998 年に米国環境保護庁はヒトに対して食物アレルギーを誘発する可能性を否定できないとして追加試験を求め, 飼料用に限って栽培を許可していた⁹⁰⁾. しかし, 2000 年 9 月以降, アメリカ合衆国において, CBH351 系統が食品への混入していることが明らかとなり, 2001 年度以降作付けを行うことが禁じられている.

我が国における食品としての遺伝子組換え体の安全性評価は, 1991 年 12 月に厚生省(当時)が策定した, 組換え DNA 技術などを用いたバイオ食品などの安全性を確保するための「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」からはじまった. この指針の対象は, 組換え DNA 技術を応用して製造された食品のうち組換え体そのものを摂取することのない食品・食品添加物で生産物が既知のものと同ーまたは同一とみなしえるものに限られていた. 1996 年 2 月には, 組換え体そのものを摂取する場合に対応するため安全性指針の改正が行われた. その後, 遺伝子組換え食品の開発や実用化が, 国際的にも急速に広がってきており, さらに新し

い食品の開発が進むことも予想されたため、食品衛生調査会の審議結果を踏まえ、安全性審査未了の GM 食品が国内で流通しないように安全性審査を義務づける制度を法的に確立することとなった。そして、組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全基準が設定された^{18) 19)}。これにより、CBH351 系統 GM トウモロコシを含む食品としての安全性審査未了の GM 農作物について、2001 年 4 月より、日本国内での流通が法的に禁止されている。

本章における研究は、CBH351 系統 GM トウモロコシが国内で流通することがないように、高感度に CBH351 系統を検知する方法の開発を目標とした。そのために、CBH351 系統に導入されている DNA 配列を特異的に検知するプライマーの開発、PCR 条件の検討を行った。

VI-2 実験方法

VI-2-1 試料および試薬

1) 材料

トウモロコシ(*Zea mays*): 次の 7 品種の乾燥種子を米国より直接入手し, 使用まで -20 °C で保存した.

- 旧アベンティス作物サイエンス社が開発した害虫抵抗性および除草剤 glufosinate 耐性トウモロコシ CBH351 の後代品種スターリンク™ (CBH351)
- シンジェンタシード社(旧 ノースラップキング社)が開発した害虫抵抗性および除草剤 glufosinate 耐性 Bt11 の後代品種(Bt11)
- シンジェンタシード社(旧 チバシード社)が開発した害虫抵抗性 Event176 の後代品種(Event176)
- モンサント社が開発した害虫抵抗性 MON810 の後代品種(MON810)
- モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 GA21 の後代品種(GA21)
- バイエル作物サイエンス社(旧 ヘキストシェーリングアグレボ社)が開発した除草剤 glufosinate 耐性 T25 の後代品種(T25)
- デイリーランド社の非組換えトウモロコシ品種(non-GMトウモロコシ) Hybrid1412

ダイズ(*Glycine max*): 次の 2 品種の乾燥種子を米国より直接入手し, 使用まで -20 °C で保存した.

- モンサント社が開発した除草剤 glyphosate 耐性 40-3-2 Roundup Ready® Soy の後代品種 Variety AG3301 (RRS)
- 非組換えダイズ品種(non-GM soy)として米国オハイオ州産種子

その他の穀類: 次の 3 農作物を入手し, 使用まで -20 °C で保存した.

- コメ(*Oryza sativa*)は, 1998 年産キヌヒカリ品種を中国農業試験場から入手した.

- ・コムギ(*Triticum aestivum*)は、ハルユタカ品種を用いた。
- ・オオムギ(*Hordeum vulgare*)は、Harrington 品種を用いた。

2) 試薬

- ・アガロース:宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」
 - ・DNA マーカー:ニューイングランドバイオラブ社製 λ DNA *HindIII* Digest , 1 kbp ラダー, 100 bp ラダー
 - ・DNA ポリメラーゼ: Applied Biosystems 社製 AmpliTaq™ Gold
 - ・PCR 緩衝液: Applied Biosystems 社製 PCR buffer II
 - ・オリゴヌクレオチドプライマー:グライナー(株)に合成委託した逆相カートリッジ精製品
 - ・水: CPW-200 超純水装置(アドバンテック(株)製)により精製したもの
- 他の試薬は、すべて特級品を用いた。

3) 試薬の調製

- ・TE 緩衝液
- ・TAE 緩衝液

以上は、II-2-1 3) 試薬の調製と同じ。

4) 装置

使用した機器および装置は、Table IV-1 に同じ。ただし、サーマルサイクラーは、MJリサーチ社製 PTC-200 を用いた。

VI-2-2 方法

1) DNA の抽出方法

シリカスピンカラムを用いるキット(QIAGEN 社製 DNeasy Plant Maxi Kit)を用い、V

ー2ー2 1) DNA の抽出方法と同様に操作した.

2) 抽出した DNA の純度の検定法および抽出した DNA 量の定量法

II-2-2 2) 抽出した DNA の純度の検定法および, II-2-2 3)の(1) 260 nm 吸光度からの抽出した DNA 量の定量法と同様に操作し, 抽出した DNA の純度の検定および抽出した DNA 量の定量を行った. PCR 用 DNA 溶液は 10 ng/ μ L の濃度にして-20 °Cで保存した.

3) PCR プライマーの設計

(1) 内在性遺伝子検知用プライマーの設計

抽出された DNA が, PCR に十分な程度に精製されておりかつ分解を受けていないことを確認するために, トウモロコシについては第三章に示した ZE01/ ZE02 プライマー, ダイズについては第二章に示した Le1 01-5'/ Le1 01-3'プライマー, コメ, コムギおよびオオムギについては, 第四章に示した Allmann らの報告⁶⁰⁾をもとに真核生物の共通 DNA 配列を検知する TR03/ TR04 プライマーを, それぞれ設計した. Table VI-1 にプライマー配列および PCR 産物の長さを示す.

(2) シークエンス用プライマーの設計

AGBIOS 社の提供している GM database より, CBH351 系統に導入された DNA 配列構造を調べた⁹¹⁾. CBH351 系統に導入された遺伝子は *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* 由来の *cry9C* 遺伝子であり, これは cauliflower mosaic virus (CMV)由来の 35S プロモーター(P-35S)と CMV 由来 35S ターミネーター(T-35S)に制御されている. また, *cry9C* 遺伝子の 5'末端には *Petunia hybrida* 由来の photosynthetic 22L chlorophyll a/b binding protein (*cab22L*)のリーダー配列が導入されている. シークエンス用のプライマーとして, P-35S 部分から第二章で報告した CM01 を選択するとともに, GenBank Accession No. J02046 および文献⁷¹⁾をもとに T-35S 領域から T35S2-3'プライマーを設計した. 導入され

た DNA 構造とシーケンスした部分の模式図を Fig. VI-1 に、プライマー配列を Table VI-1 に示す。

(3) CBH351 検知用プライマーの設計

シーケンス結果を基に、Applied Biosystems 社 Primer Express software を使用し、 T_m 値は 60 ± 1 °C で CBH351 検知用プライマーの設計を行った。設計したプライマーの位置を Fig. VI-1 に、プライマー配列を Table VI-1 に示す。

4) PCR 条件

PCR 反応液の組成は、 $1 \times$ PCR buffer II, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 各 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 5'-, 3'-プライマー, 0.625 units DNA ポリメラーゼおよび 25 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR はサーマルサイクラー(MJ リサーチ社製 PTC-200)を用い、PCR 温度条件は、プレインキュベーション 95 °C で 10 分の後、熱変成 95 °C で 0.5 分、アニーリング 60 °C で 0.5 分、伸長反応 72 °C で 0.5 分を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、最後に 72 °C で 7 分の伸長反応を行った。

5) シーケンス方法

DNA シーケンスは、PCR 産物のダイレクトシーケンスを日本製粉㈱に委託した。シーケンスする DNA 断片を得るための PCR は、次の条件で行った。

PCR 溶液の組成は、 $1 \times$ PCR buffer II, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 各 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 5'-, 3'-プライマー, 1.25 units DNA ポリメラーゼおよび 25 ng 鋳型 DNA を含み、全量 25 μL とした。PCR 温度条件は、プレインキュベーション 95 °C で 10 分の後、熱変成 95 °C で 1 分、アニーリング 60 °C で 2 分、伸長反応 72 °C で 2 分を 1 サイクルとして、40 サイクル行い、最後に 72 °C で 7 分の伸長反応を行った。

6) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法

IV-2-2 7) アガロースゲル電気泳動法および泳動像の撮影方法に同じ。

VI-3 結果

1) DNA シークエンスの解析と CBH351 検知用プライマーの設計

CBH351 より抽出された DNA を鋳型にして、シークエンス用プライマー対により PCR を行いシークエンスしたところ、2,414 bp の DNA 配列の情報を得た。この配列情報と、cauliflower mosaic virus genome (GenBank Accession No. J02046) , petunia gene for chlorophyll a/b binding protein *cab22L* (同 X02359)および De Roeck らの特許文書⁹⁾中の SEQ ID No.3 の improved *cry9C* coding region と比較した。*cry9C* 遺伝子は長さが 1,878 bp と予想され、SEQ ID No.3 の improved *cry9C* coding region と DNA 塩基配列が一致した。また、*cry9C* 遺伝子の N 末端側には No. X02359 の DNA 塩基配列の第 171-231 塩基と同一な領域があった。この結果をもとに、CBH351 検知用 5'側プライマーとして、P-35S 領域から第 III 章で報告した CM03 を選択するとともに、*cab22L* のリーダー配列領域より CBH1-5'を設計した。また、*cry9C* 遺伝子より 3'側プライマーとして CBH1-3'を設計した。Fig. VI-1 および Table VI-1 に示すとともに、CBH351 検知用プライマーを用いた PCR 増幅産物の DNA 塩基配列を Fig. VI-2 に示す。

2) CBH351 検知用プライマーの特異性と検知感度

設計したプライマーの特異性は、トウモロコシ(non-GM , Event176 , Bt11 , T25 , MON810 および GA21)とダイズ(non-GM ダイズおよび GM ダイズ), コメ, コムギ, オオムギの各種子から抽出した DNA を鋳型として PCR を行った。CM03 - CBH1-3' プライマー対および CBH1-5' - CBH1-3'プライマー対を用いた場合ともに、偽陽性が見られない CBH351 より抽出した試料にのみに予想される長さの増幅産物が得られた。電気泳動写真を Fig. VI-3 に示す。また、これらの増幅産物についてシークエンスを行ったところ、Fig. VI-2 に示した DNA 塩基配列と一致した。検知下限を調べるために CBH351 粉末と non-GM トウモロコシ粉末を混合し、CBH351 を 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1 , 5 % 含有したトウモロコシ試料を調製し、DNA を抽出後 PCR を行った。そ

の結果 CM03 - CBH1-3'プライマー対を用いた場合には 0.05 %， CBH1-5'-CBH1-3'プライマー対を用いた場合には 0.1 % 混合したものまで検知可能であった。 Fig. VI-4 に示す。

VI-4 考察

1) CBH351 系統を高感度に検知する方法の開発

2001 年 4 月より、我が国において食品としての安全性審査が終了していない GM 農産物およびそれを原料とする食品の流通が禁止されている。CBH351 系統は、現在我が国で食品および飼料としての安全性審査が未了のため、CBH351 系統を検知した場合は、直ちに当該食品の回収等の措置がとられる。そのため、CBH351 系統の検知には高い特異性を有している必要がある。高い特異性を有するか否かは、主にプライマー対の設計にあり、導入 DNA 構造を特異的に検知するプライマー対として、一方を目的遺伝子の *cry9C* から、他方を *cry9C* とは異なる DNA 領域である P-35S または *cab22L* リーダー配列から設計していることが、偽陽性のない、CBH351 系統に特異的な検知を可能にしている。このプライマーの検知領域である [P-35S]-[*cab22L* リーダー配列]-[*cry9C*]の DNA 構造は、CBH351 系統のみがもつ DNA 構造である。特異性の高い検知に加え、検査では、実用性も重要な点である。本章において DNA の抽出には、有害な有機溶媒を使用しないシリカスピンカラムを用いるキットを使用し、環境および分析従事者に対する負荷を低減している。さらに、増幅産物の長さを 100 ~ 200 bp 程度にすることにより、加工食品を対象とした検査が可能である。本法の感度は、0.05 % 程度まで検知可能であり、これは CBH351 由来のゲノム DNA 量は約 0.0125 ng/ tube に相当する。CBH351 系統には *cry9C* の発現カセットが 1カ所のみ挿入されていることと、トウモロコシのゲノムサイズが 3.9×10^9 bp/ haploid genome⁶⁷⁾ であることから計算すると、ターゲットのコピー数は 1 チューブ中に 1.4 コピー程度存在することになる。理論的に鋳型が 1 チューブ中に 1 コピー存在すれば PCR は進行する。本結果は 1 コピーに近いので、理想的な DNA の抽

出法, プライマーの設計および PCR 条件が選択できていると考えられる. 以上から CBH351 系統を高感度で検知する方法の開発に成功したと結論した.

2) 厚生労働省検疫所および地方自治体衛生部局のモニタリングでの利用

本法で作製したプライマー対 CM03 - CBH1-3'は, 厚生労働省において 17 研究室による Validation 試験が行われ⁹³⁾, すでに厚生労働省の「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」⁹⁴⁾に CBH351 検知用プライマーとして採用され, 厚生労働省の検疫所および地方自治体の衛生部局によりモニタリングされている. 本法は, PCR 産物の由来を確実にするための制限酵素サイトは調べられていない. しかし, 「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」では, CM03 - CBH1-3'とともに[cry9C]-[T-35S]の検知を同時に行い, 確実に CBH351 系統を検知することを可能としている.

Table VI-1 作製したプライマーの一覧

Name	Sequence (5' → 3')	specificity	Amplicon
A: CM01	5'-CAC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT A-3'	CMV/ sense	CMV
T35S2-3'	5'-GGA TTT TAG TACT GGA TTT TGG T-3'	CMV/ anti-sense	
B: ZE01	5'-TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG-3'	10KDa <i>Zel</i> / sense	maize
ZE02	5'-GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT-3'	10KDa <i>Zel</i> / anti-sense	
TR03	5'-TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A-3'	Eukaryote/ sense	Eukaryote
TR04	5'-AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T-3'	Eukaryote/ anti-sense	
C: CM03	5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'	CMV/ sense	CBH351
CBH1-3'	5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'	<i>ery9C</i> / anti-sense	
CBH1-5'	5'-CTA TTA CTT CAG CCA TAA CAA AAG AAC TCT-3'	<i>cab22L</i> / sense	CBH351
CBH1-3'	5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'	<i>ery9C</i> / anti-sense	

A, シークエンス用プライマー
 B, トウモロコシ, およびダイズ, コメ, コムギ, オオムギの内在性遺伝子検知用プライマー
 C, CBH351 検知用プライマー

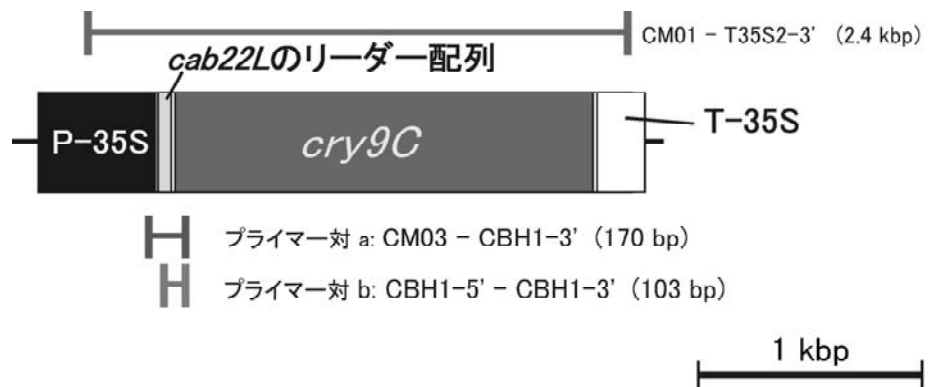


Fig.VI-1 CBH351 系統に導入されている DNA 配列の模式図および PCR 増幅部位

CM01 - T35S2-3'プライマー対は、シーケンス用に作製した。

プライマー対 a および b は、CBH351 検知用に作製した。

()内に予想される増幅長を示す。

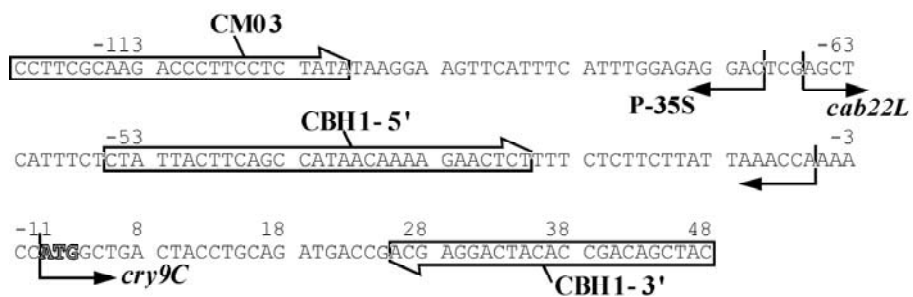


Fig. VI-2 CBH351 系統のシーケンス結果

矢印 (←, →) は、DNA 配列の由来および位置を示す。

cry9C の開始コドン(ATG)は白抜き文字で示し、そのアデニンを1として番号を付けた。

検知用に設計したプライマー位置を中抜き矢印(⇐, ⇒)で示した。

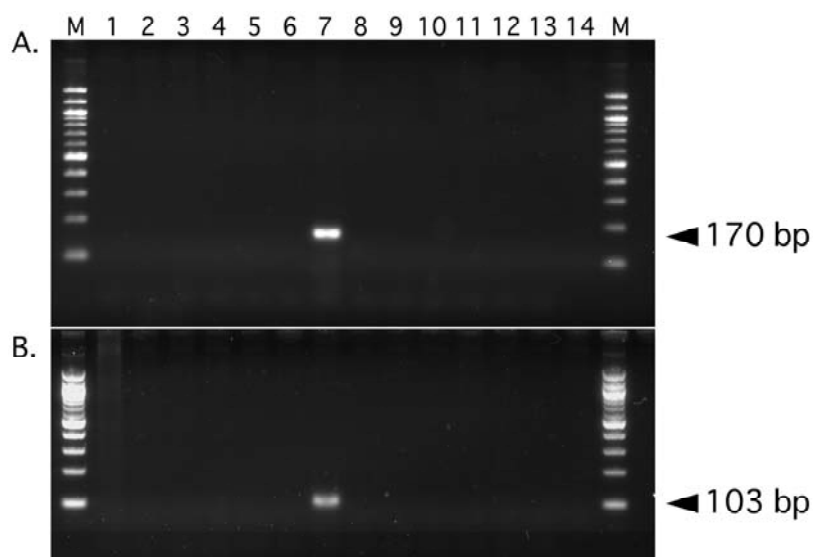


Fig. VI-3 CBH351 系統検知用プライマー対の特異性

◀ は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

A: プライマー対 a を使用

B: プライマー対 b を使用

1: non-GM トウモロコシ, 2: Event176, 3: Bt11, 4: T25, 5: MON810,
 6: GA21, 7: CBH351 8: non-GM ダイズ, 9: RRS, 10: コメ, 11: コム
 ギ, 12: オオムギ, 13: ネガティブコントロール(DNA なし), 14: ネガ
 ティブコントロール(プライマーなし), M: 100 bp ラダー

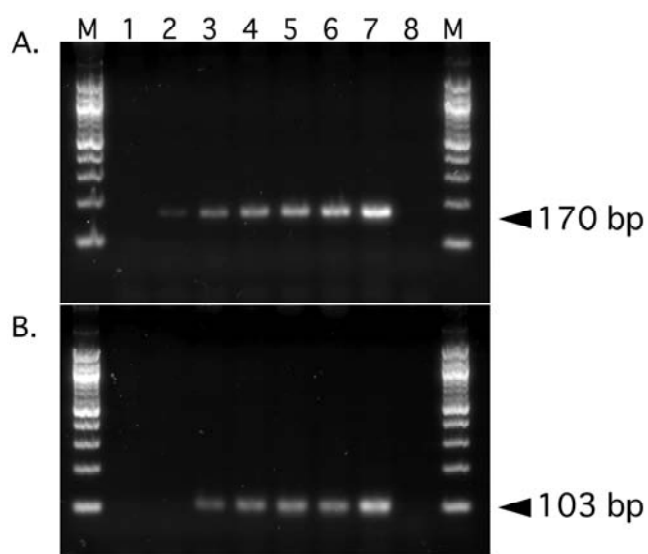


Fig. VI-4 CBH351 系統検知用プライマーの検知感度の確認

◀は、プライマー対により予想される増幅長を示す。

A: プライマー対 a を使用

B: プライマー対 b を使用

1: non-GM トウモロコシ, 2: 0.05% CBH351 含有トウモロコシ, 3: 0.1% CBH351 含有トウモロコシ, 4: 0.5% CBH351 含有トウモロコシ, 5: 1% CBH351 含有トウモロコシ, 6: 5% CBH351 含有トウモロコシ, 7: 20% CBH351 含有トウモロコシ, 8: ネガティブコントロール(DNA なし), M: 100 bp ラダー

第VII章 結論

VII-1 遺伝子組換え体の検知技術

遺伝子組換え体の検知技術は、多くの農作物を海外に依存せざるを得ず、都市中心の分業的社会が進み、生産者と消費者の距離が離れつつある中で、消費者の「何を食べているか」という疑問に答える一つの技術として重要である。同時に、食品企業にとって原料の品質管理のため、また、行政にとって食品として安全性審査の終了した GM 食品の表示制度や、安全性審査未了の GM 作物・食品の輸入、流通等を防ぐための施策を科学的に支え、補強するための技術として必要である。

VII-2 本研究において解決した問題

本研究の課題は、第II章から第IV章は、食品としての安全性審査の終了している GM 農作物・食品を対象とした検知技術の開発であり、第V章は導入されている DNA 構造が未知の GM 作物であっても、その構造の推定する方法の開発、第VI章は食品として安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統を高感度に検知する技術の開発である。Fig. VII-1 に内容を示し、次に詳述する。

1) 食品としての安全性審査の終了している GM 農作物を対象にした検知技術の開発

本技術は、食品としての安全性審査の終了している食品に対する表示制度を支えるためのものである。最終的な課題としては、IP ハンドリングの確認を科学的に行うため、農産物・食品からの PCR による GMO 定量技術の開発をめざしているが、本研究では、農産物・食品からの GMO 定性検知技術の開発を行うことを目標とし、GM ダイズ 1 系統、GM トウモロコシ 5 系統の定性検知技術の開発を行った。

(1) GM ダイズ 40-3-2 系統の検知技術の開発

第Ⅱ章では、世界で最も栽培・流通している GM ダイズ 40-3-2 系統 RRS を対象にして、ダイズ種子およびその加工食品からの RRS の定性的な検知技術の開発を行った。DNA 抽出は、セチルトリメチルアンモニウムブロミドを用いる方法(CTAB 法)が有効であることを明らかにした。RRS に特異的なプライマー、PCR 条件を設定し、ダイズ種子においては 0.05 % RRS、豆腐においては 0.5 % RRS を含有したのまで検知が可能となった。また、丸大豆納豆・挽割り納豆では、加熱・発酵過程により DNA が分解し、RRS の検知は困難であることを明らかにし、広く加工食品に対応するためには、100 ~ 200 bp 程度の短い増幅断片長になるプライマーを設計する必要があることを示した。これは、ダイズおよびダイズ加工食品からの組換え DNA 配列の定性検知について、我が国において最初に、検知感度に言及した報告を行ったものである。

(2) GM トウモロコシ(Bt11 , Event176 , MON810 , T25 , GA21)の検知技術の開発

第Ⅲ章および第Ⅳ章では、RRS、GM ワタと共に世界で成功している GMO であるトウモロコシを対象にした。第Ⅲ章では、当時流通していた 4 系統の GM トウモロコシ(Bt11 , Event176 , MON810 , T25)を対象に検知技術の開発を行った。トウモロコシ種子からの DNA の調製は、ダイズと同様に CTAB 法が有効であることを明らかにした。4 系統 GM トウモロコシを検知する特異性の高いプライマーおよび PCR 条件の設定を行い、Bt11 においては 0.01 %、その他の GM 系統では 0.05 % GM トウモロコシを含有したのまで個別に検知することが可能になった。さらに、Bt11 , Event176 , MON810 を簡便に検知する Multiplex PCR を検討し、1 %程度まで GM トウモロコシを含有したのまで検知可能となった。第Ⅳ章では、新しく GA21 系統の安全性審査が終了したため、5 系統の GM トウモロコシ(Bt11 , Event176 , MON810 , T25 , GA21)の検知技術の迅速・簡便な開発を行った。また、DNA 抽出法についても再検討し、シリカスピンカラムキットを用いる抽出法(シリカスピンカラム法)は、ダイズ種子およびトウモロコシ種子から CTAB 法と同程度の DNA が抽出が可能であることを明

らかにした。シリカスピнкаラム法は、クロロホルム等の有害な有機溶媒を使用しないため、環境および作業者に対して安全性の向上が図られた。5 系統 GM トウモロコシは、各 GM トウモロコシに特異的なプライマーと PCR 条件の設定を行うことにより、Multiplex PCR で 0.1 ~ 0.5 % 程度まで検知および判別が可能な技術の開発に成功した。従来は、各 GM トウモロコシの鑑別は、個別に検査する必要があったが、本技術により1本のチューブ内で 5 系統 GM トウモロコシを特異的に鑑別できるようになり、特許 3502906 (2003/12/19)「遺伝子組換えトウモロコシ及びこれを含む加工食品からの組換え遺伝子の検知方法」を取得した。Multiplex PCR の適用には、GM トウモロコシの定量に先行して行うことにより、定量対象となる GM トウモロコシを簡便にスクリーニングすることが想定される。

2) GM 作物に導入されている DNA 構造の推定法の開発

検知技術の開発には、non-GMO と GMO , そして GMO に導入されている DNA 配列の解析が不可欠である。そのため、未知の GM 作物に対しては、それらが入手できないため分析法の開発および分析は不可能になる。しかし、同じ供与 DNA 配列が複数の農作物の形質転換に用いられていることに注目し、構造遺伝子、プロモーター、ターミネーターおよびその他の DNA 配列(DNA セグメント)の計 11 セグメントの検知を特異的に行い、各セグメントが検知できるか、できないかをプロファイルすることにより、導入されている DNA 配列の構造の推定が可能となった。今後は、増加の予想される GM 作物に対しても、より正確な構造の推定を行うために、検知可能な DNA セグメントの数を増やすことが課題となる。また、検査には長時間を要するため、DNA アレイ技術を用いてセグメントおよび GM 系統特異的検知を効率よく行う方法を開発する必要があると考えられる。

3) 食品として安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統の検知技術の開発

第VI章は、食品として安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統の検知技術を開発した。CBH351 系統を入手し、Fig. VII-2 に従い検知技術を開発した。プラ

イマーの一方を構造遺伝子，他方をその他の配列から設計し，その増幅長が 100 ～ 200 bp になるように設計を行い，非特異的なバンドのでない DNA ポリメラーゼの選択，PCR 条件の設定を行った．これにより，0.05 ～ 0.1 %程度 CBH351 系統が含まれるものまで確実に検知する技術を開発した．本技術は，既に厚生労働省「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」⁹⁴⁾に採用され，検疫所および地方自治体の衛生部局により，現在利用されている．

4) 今後の GM 農作物の検知技術開発において考慮する点

今後も開発が予想される新しい GM 農作物の定性検知技術の開発においては，第 II 章から第 IV 章に示した GM ダイズ・トウモロコシの定性検知技術の開発の手順をそのまま適用することが可能である．そのアプローチ法を Fig. VII-2 に示す．まず，GMO と non-GMO の入手が検知技術の開発の前提となる．そして，対象がダイズ，トウモロコシ，コメ，コムギ，オオムギの種子である場合は，第 IV 章に示したシリカスピニング法がそのまま利用でき，その他の農作物である場合は，DNA 抽出法の検討および評価を行う必要がある．評価の点は，RNA の残存していない長鎖の DNA が抽出できること，夾雑物のない PCR に適した DNA であること，PCR を行うのに十分な量が抽出できることである．さらに，抽出に有害な有機溶媒を使用しないものであることが望ましい．また，この時点で，PCR に適した DNA であることを検討するために当該農作物の内在性遺伝子の探索と内在性遺伝子検知用プライマーの設計を行う必要がある．その後，GM 農作物に導入されている DNA 配列の調査・解析を行った後，組換え体検知用プライマーの設計と，必要に応じて当該農作物のもつ内在性遺伝子用プライマーの再設計を行い，PCR 条件の設定を行う．最後に，特異性検知感度の確認を行い，不十分であればプライマーの再設計や PCR 条件の再設定を繰り返す．十分であれば GM 農作物の検知技術の開発が終了となる．現在，我が国においては，IP ハンドリングを行った時の non-GM ダイズ・トウモロコシ中に意図せざる混入として GM ダイズ・トウモロコシは混入許容値 5 %以下^{19, 20)}とされている．また，EU，韓国においても GMO の表示制度が定められており^{85, 95)}，non-GMO への GMO

の混入許容値は、それぞれ 0.9 % および 3 % である。この許容値が、当面開発の際に必要な検知感度と考えられる。組換え体検知用プライマーについては、「I - 5 2) 新しく導入された DNA 配列を検知する方法」に示す検知部位による PCR 法の特異性の違いを考慮する必要がある。さらに、広く加工食品に対応するために、100 ~ 200 bp 程度の増幅断片長となるように設計することが望ましいと考えられる。内在性遺伝子検知用プライマーについては、対象が農作物である場合には特異的な内在性遺伝子である必要はなく、真核生物がもつ共通配列なども使用可能である。しかし広く加工食品から検査する場合には、増幅断片長や感度にばらつきが生じないように検査対象農作物に特異的な内在性遺伝子を探索する必要がある。そのため、農作物の加工・流通実態にあわせた品種、近縁種や他の種についてプライマーの特異性を検討する必要があると考えられる。本アプローチは、第 V 章および第 VI 章において用いられ、検知技術の開発に成功した。さらに、定量 PCR 法に必要な系統特異的プライマーを設計する際にも、本アプローチに寄った。なお、GM ダイズ・トウモロコシの定性検知技術の開発後の重要な課題である農産物・食品からの PCR による GMO 定量技術の開発には、スピнкаラムを用いた DNA の抽出法および各 GMO に導入されている組換え DNA 配列の情報も、定量技術の開発の際に利用された。定量法は、既に農産物⁹⁶⁾、一部の加工食品^{97) 98)}において実用化されている。次に、本研究後の検知技術の進展を示す。

VII - 3 本研究後の検知技術の進展

本研究の後、GM ダイズ 1 系統(RRS)および GM トウモロコシ 5 系統(Bt11, Event176, MON810, T25, GA21)を対象とした定量検知技術の開発に、成功している⁹⁶⁾。Fig. VII-2 に示すアプローチ法をもとに、RRS および GM トウモロコシ 5 系統を特異的に検知するプライマー、および GM 農作物に幅広く利用されている P-35S, NOS ter を検知するプライマーを設計した。さらに、ダイズ内在性遺伝子として *Le1*, トウモロコシ内在性遺伝子としてスターチシンターゼ IIb (*zSSIb*) を選択し、内在性遺

伝子検知用プライマーを設計した。これらのプライマーは加工食品の定性検知にも使用可能とするため、100～150bp程度に設計されている。このPCR増幅産物をプラスミド上につなぎ、RRSまたはGMトウモロコシ5系統を定量するための標準分子とした。様々なコピー数の標準分子溶液を鋳型DNA溶液とし、Roche社のTaqMan® chemistryを利用したリアルタイムPCRにより、組換えDNA配列の数および内在性遺伝子の数を定量するための検量線をそれぞれ作成した。まず、純粋なGMダイズまたはトウモロコシから抽出したDNA溶液を用い、系統ごとの(組換えDNA配列の数)/(内在性遺伝子の数)の比率を求めた(式1)。

$$\text{内標比} = \frac{\text{純粋な GM 系統から抽出した DNA 中の組換え DNA 配列の数}}{\text{純粋な GM 系統から抽出した DNA 中の内在性遺伝子の数}} \quad \dots(\text{式 1})$$

この比率は、各GM系統種子中で一定の値であり、以降これを「内標比」と呼ぶ。定量値が未知の試料について、その試料から抽出したDNA中の(組換えDNA配列の数)/(内在性遺伝子の数)の比率を測定し、その値を内標比で除すれば、未知試料中の混入率が算出される(式2)。

$$\text{GM 定量値} (\%) = \frac{\text{未知試料から抽出した DNA 中の組換え DNA 配列の数}}{\text{未知試料から抽出した DNA 中の内在性遺伝子の数}} \times \frac{1}{\text{内標比}} \times 100 \quad \dots(\text{式 2})$$

この定量法は、日本、韓国、米国の15ヶ所の研究室の協力により妥当性確認試験が行われ⁹⁹⁾、定量法として確立しており、我が国の標準分析法として、独立行政法人農林水産消費技術センター発行の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品の検査・分析マニュアル(JASハンドブック)¹⁰⁰⁾」および、厚生労働省「組換えDNA技術応用食品の検査方法⁹⁴⁾」に採用・公開されている。これには、DNA抽出法として、スピнкаラムを用いたDNAの抽出法が、一部改変されて採用されている。

VII-4 GM検知技術の国際的な検討

現在，EU，韓国等多くの国々で GM 食品の表示制度が決められており，同時にその監視に必要な検知技術の標準化が検討されている．また，前述した定量法については，韓国においても標準分析法として利用されている⁹⁵⁾．GMO の検知技術の国際的な検討としては，CODEX 委員会¹⁰⁾と国際標準化機構(ISO)¹⁰¹⁾において進められている．CODEX 委員会は，FAO⁸⁾/WHO⁹⁾合同食品規格計画の実施機関として，1962 年に設立した国際政府間組織である．GM 食品の世界的な流通が拡大する一方で，その安全性に関する国際的な関心が高まり，GM 食品を含むバイオテクノロジー応用食品について国際的な基準や指針あるいは勧告を策定することを目的として，「バイオテクノロジー応用食品特別部会」が，2000 年に設置された．この特別部会に設けられた GM 食品の分析方法に関するワーキンググループにおいて，加盟国・関係機関が採用または開発中の検査方法に関する情報収集が行われた．本研究において開発した組換え体の検知法も，当ワーキンググループに報告された¹⁰²⁾．一方 ISO は，物質およびサービスの国際交換を容易にし，知的，科学的，技術的および経済活動分野における国際間の協力を助長するために，世界的な標準化およびその関連活動の発展活動を計ることを目的とする非政府組織である．その中で，遺伝子組換え体及びその由来製品の標準化は，食品専門委員会である TC34 の作業グループ(WG7)において進められている．我が国では，独立行政法人農林水産消費技術センターを中心に，本研究をもとに開発された PCR 法を用いた遺伝子組換え体の定量法^{96,99)}の国際標準化を目指している．

VII-5 今後の GM 農作物の検知技術

今後の GM 農作物の検知技術は，加工食品からの定量技術の開発と，安全性審査が終了してますます商品化される系統数の増えてくる GM 農産物への対応が重要になっている．また，カルタヘナ法への対応として，安全性審査未了の GM 作物が国内に入らないように水際で検査する方法も求められる．さらに，GM トウモロコ

シでは、GM 系統同士を掛け合わせた品種(スタック品種)の定量の問題がある。スタック品種は、1ゲノムあたりで各系統をそれぞれに定量してしまうため、正確に定量するためには穀粒を1粒ずつ数多く検知することになる。しかし、1粒ずつの定量は、手間とコスト面から現実的には困難である。加えて、加工食品からの定量も難しくなる。このように、GM 農作物を巡る検知技術には、難しい問題が山積しており、現在、独立行政法人食品総合研究所を中心にこれらの問題の解決に向けて、開発が行われている。

本研究が、世界的な検知技術の標準化と適切な表示制度の維持に役立ち、消費者が遺伝子組換え技術をどのように受け入れるかを考える一助になることを願ってやまないものである。

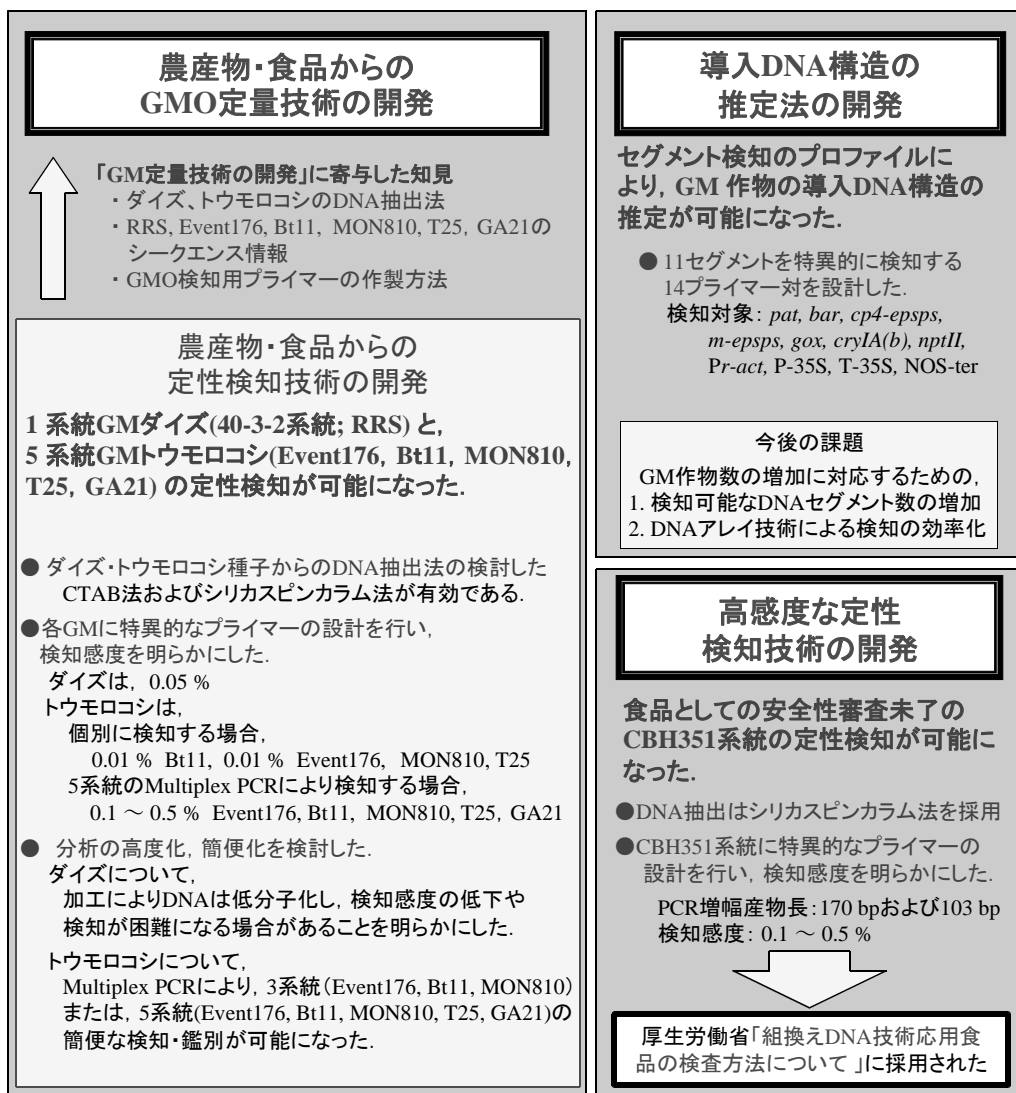


Fig.VII-1 本研究において開発したGMO検知技術と今後の課題

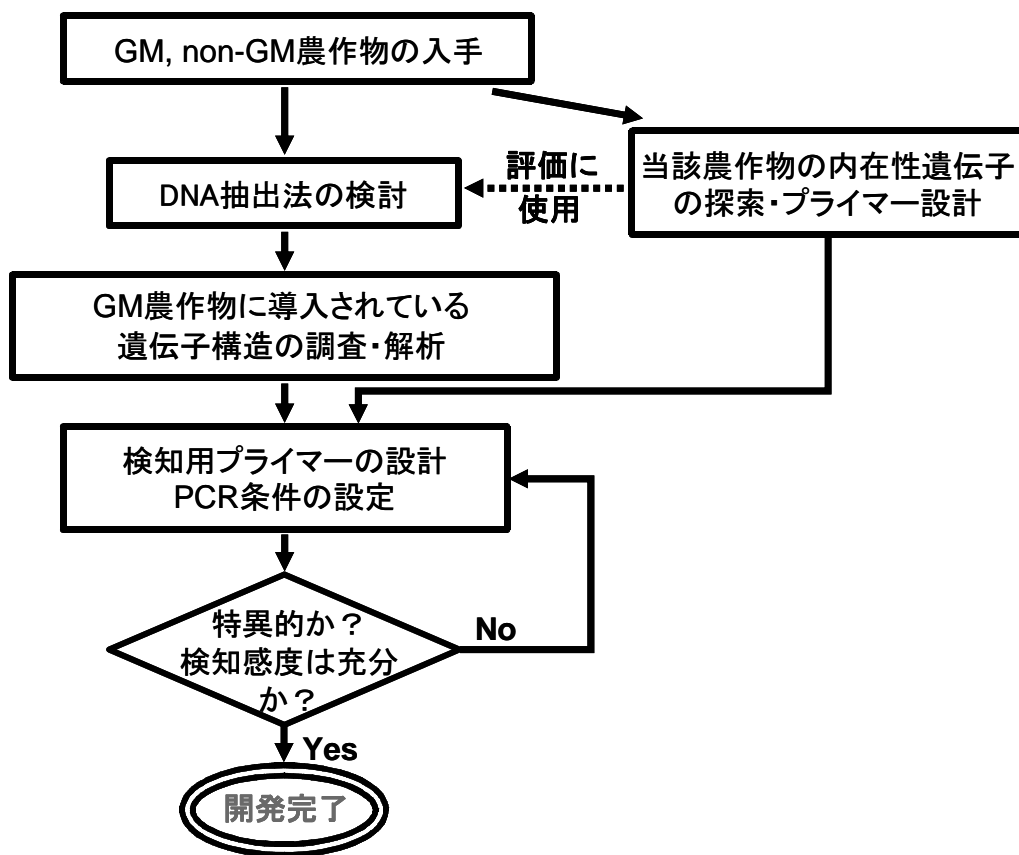


Fig.VII-2 PCR法によるGMOからの組換えDNA配列の定性検知技術の開発アプローチ図

参考文献

- 1) Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., Helling, R. B.: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**(11), 3240-44 (1973).
- 2) 大澤勝次: 図集・植物バイオテックの基礎知識, 社団法人農山漁村文化協会, 1994, p. 17-20.
- 3) 日野明寛: ぜひ知っておきたい遺伝子組換え農作物, (株)幸書房, 1999, p. 55-62.
- 4) 田部井豊, 日野明寛, 矢木修身編集委員: 新しい遺伝子組換え体(GMO)の安全性評価システムガイドブック 食品・医薬品・微生物・動植物, (株)エヌ・ティー・エス, 2005, p. 23-50.
- 5) 日野明寛: 「遺伝子組換え作物」の状況と将来 安全性の評価はどのように行われているか?, *食の科学*, No.312, 16-24 (2004).
- 6) 米国立衛生研究所(The National Institutes of Health; NIH)ホームページ: <http://www.nih.gov/>
- 7) 経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD)本部ホームページ: <http://www.oecd.org/home/>
- 8) 食糧農業機構(Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO)ホームページ: <http://www.fao.org/>
- 9) 世界保健機構(World Health Organization; WHO)ホームページ: <http://www.who.int/en/>
- 10) CODEX 委員会(The Codex Alimentarius Commission)ホームページ: http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp
- 11) OECD: Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology - Concepts and Principles, OECD, 1993, p. 10-13.
(<http://www.oecd.org/dataoecd/57/3/1946129.pdf>)
- 12) OECD: Safety Considerations for Biotechnology Scale-up of Crop Plants, OECD,

1993, p. 28-31.

(<http://www.oecd.org/dataoecd/26/26/1958527.pdf>)

13) James, C.: "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, No. 32-2004", ISAAA (2004).

14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部: “安全性審査の手続を経た遺伝子組換え食品及び添加物一覧”平成17年10月31日(2005).

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/dl/list.pdf>)

15) Matsuoka, T.: GMO Labeling and Detection Methods in Japan, Asia-Pacific Economic Cooperation (APEC) and Japan International Research Center for Agricultural Science (JIRCAS) Joint Symposium and Workshop on Agricultural Biotechnology in Bangkok, Thailand (Sep. 6, 2001).

(<http://apec.biotec.or.th/pdf/MrTakeshiMatsuoka.pdf>)

16) Hino, A.: Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience., *Toxicol. Pathol.*, **30**(1), 126-28 (2002).

17) 農林水産省告示第517号(2000): “遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準”平成12年3月31日.

(<http://www.maff.go.jp/soshiki/syokuhin/heyahinnpyou-idennsikumikae.pdf>)

18) 厚生労働省令第23号(2001): “食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令”平成13年3月15日.

19) 厚生労働省医薬食品局食品保健部長通知: “食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について”平成13年3月15日, 食発第79号(2001).

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/0103/tp0329-2a.html>)

20) 農林水産省食品流通局長通知: “遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について(一部改正)”平成13年3月19日, 12総合第1115号(2001).

(<http://www.maff.go.jp/soshiki/syokuhin/heyaidensituuti.pdf>)

- 21) 厚生省告示第 232 号 (2000): “食品, 添加物の規格基準の一部改正” 平成 12 年 5 月 1 日.
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsnshi/anzen/kokuji.html>)
- 22) 厚生省告示第 233 号 (2000): “組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手續に関する告示” 平成 12 年 5 月 1 日.
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsnshi/anzen/kokuji0.html>)
- 23) 農林水産事務次官依命通達: “農林水産分野等における組換え体の利用のための指針” 平成元年 4 月 20 日, 元農会第 747 号 (1989).
(<http://www.s.affrc.go.jp/docs/sentan/guide/guide.htm>)
- 24) Secretariat of the Convention on Biological Diversity: Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000.
(<http://www.biodiv.org/doc/legal/cartagena-protocol-en.pdf>)
- 25) 日本版バイオセーフティクリアリングハウス(J-BCH).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/>)
- 26) 平成 15 年法律第 97 号(2003): “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” 平成 15 年 6 月 18 日.
- 27) 渡邊紳一郎: 遺伝子組換え農作物の現状, *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **210**(7), 625-33 (2005).
- 28) Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Lovseth, A., Berdal, K. G.: PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)., *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**(8), 985-93 (2003).
- 29) Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D., Song, P.: Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology, *J. AOAC Int.*, **88**(1), 136-55 (2005).
- 30) 渡邊敬浩: 未承認遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)の検知技術について, *食品衛生学雑誌*, **46**(4), J-223-27 (2005).

- 31) National Agricultural Statistics Service (NASS), Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture: Acreage, NASS, 2005.
(<http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/field/pcp-bba/acrg0605.pdf>)
- 32) 松岡猛, 川島よしみ, 穂山浩, 三浦裕仁, 合田幸広, 瀬畑環, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 大豆及び大豆加工食品からの組換え遺伝子の検知法(第1報), *食品衛生学雑誌*, **40**, 149-57 (1999).
- 33) Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hübner, P.: Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne <<Roundup Ready™>>., *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **88**, 164-75 (1997).
- 34) Shirai, N., Momma, K., Ozawa, S., Hashimoto, W., Kito, M., Utsumi, S., Murata, K.: Safety assessment of genetically engineered food: detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1461-64 (1998).
- 35) Murray, M. G., Thompson, W. F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA., *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321-25 (1980).
- 36) Pietsch, K., Waiblinger, H. U., Brodmann, P., Wurz, A.: Screeningverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel., *Deutsche Lebensmittel Rundsch.*, **93**, 35-38 (1997).
- 37) Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., LaVallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B., Kishore, G. M.: Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line., *Crop Sci.*, **35**, 1451-61 (1995).
- 38) Sanders, P. R., Winter, J. A., Barnason, A. R., Rogers, S. G., Fraley, R. T.: Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1543-58 (1987).
- 39) Barry, G. F., Kishore, G. M., Padgett, S. R., Stallings, W.C., U.S. Patent 5633435 (May 27, 1997).

- 40) Meyer, R., Chardonnens, F., Hübner, P., Lüthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products., *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, **203**, 339-44 (1996).
- 41) Vodkin, L. O., Rhodes, P. R., Goldberg, R. B.: cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element., *Cell*, **34**, 1023-31 (1983).
- 42) Jofuku, K. D., Okamuro, J. K., Goldberg, R. B.: Interaction of an embryo DNA binding protein with a soybean lectin gene upstream region., *Nature*, **328**, 734-37 (1987).
- 43) 中山広樹, 西方敬人: バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎, 秀潤社, 1997, p. 19-23.
- 44) Gasser, C. S., Winter, J. A., Hironaka, C. M., Shah, D. M.: Structure, expression, and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato., *J. Biol. Chem.*, **263**(9), 4280-87 (1988).
- 45) 渡辺篤二, 齋尾恭子, 橋詰和宗: 最新食品加工講座 大豆とその加工 I, 建帛社, 1987, p. 54-77.
- 46) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Miura, H., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A.: A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 137-43 (2000).
- 47) 独立行政法人農業環境技術研究所: 遺伝子組換え作物の生態系への影響, 養賢堂, p. 20-33 (2003).
- 48) Van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J. L., Milne, R. E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R., Masson, L.: Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest Lepidoptera., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(6), 1650-55 (1991).
- 49) Denolf, P., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J.: Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border

- membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(6), 1828-37 (1993).
- 50) 宮本純之：新しい農薬の科学－食と環境の安全をめざして－，廣川書店，1993，
p. 66-68.
- 51) 田部井豊，日野明寛，矢木修身編集委員：新しい遺伝子組換え体〈GMO〉の
安全性評価システムガイドブック 食品・医薬品・微生物・動植物，㈱エヌ・ティー
・エス，2005，p. 65.
- 52) U.S. Environmental Protection Agency: Biopesticides Registration Action Document
- *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants, EPA, 2001, p. IIB4-IIB10
(http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/bt_brad2/2-id_health.pdf)
- 53) 宮本純之：新しい農薬の科学－食と環境の安全をめざして－，廣川書店，1993，
p. 110.
- 54) Jongedijk, E., de Schutter, A. A. J. M., Stolte, T., van den Elzen, P. J. M.,
Cornelissen, B. J. C.: Increased resistance to potato virus X and preservation of
cultivar properties in transgenic potato under field conditions., *Bio/Technology*, **10**,
422-29 (1992).
- 55) Meyer, R.: Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction
(PCR) using the FLAVR SAVR™ tomato as an example., *Z. Lebensm. Unters.
Forsch. A.*, **201**, 583-86 (1995).
- 56) Studer, E., Dahinden, I., Lüthy, J., Hübner, P.: Nachweis des gentechnisch
veränderten <<Maximizer™>> - Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).,
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., **88**, 515-24 (1997).
- 57) Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K. H.: Detection of genetically modified
insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction., *Z. Lebensm.
Unters. Forsch. A.*, **205**, 442-45 (1997).
- 58) Van Hoef, A. M. A., Kok, E. J., Bouw, E., Kuiper, H. A., Keijer, J.: Development
and application of a selective detection method for genetically modified soy and

- soy-derived products., *Food Additives and Contaminants*, **15**(7), 767-74 (1998).
- 59) Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K. D.: Is there any possibility of detecting the use of genetic engineering in processed foods?, *Z. Ernährungswiss.*, **36**, 155-60 (1997).
- 60) Allmann, M., Candrian, U., Höfelein, C., Lüthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products., *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, **196**, 248-51 (1993).
- 61) Koziel, M. G., Desai, N. M., Lewis, K. S., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. V., Crossland, L. D., Wright, M. S., Merlin, E. J., Launis, K. L., Rothstein, S. J., Bowman, C. G., Dawson, J. L., Dunder, E. M., Pace, G. M., Suttie, J. L., U.S. Patent 5625136 (Apr. 29, 1997).
- 62) Hudspeth, R. L., Gula, J. W.: Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis., *Plant Mol. Biol.*, **12**, 579-89 (1989).
- 63) Estruch, J. J., Kadwell, S., Merlin, E., Crossland, L.: Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8837-41 (1994).
- 64) Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., Pühler, A.: Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*., *Gene*, **70**, 25-37 (1988).
- 65) Kiriwara, J. A., Petri, J. B., Messing, J.: Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize., *Gene*, **71**, 359-70 (1988).
- 66) Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., Fischhoff, D. A.: Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3324-28 (1991).
- 67) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, E. R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J.

- A., Struhl, K. eds.: Current Protocol in Molecular Biology. V.3, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1987, Appendix 1B.
- 68) Matsuoka, T., Kuribara, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A.: A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**(1), 24-32 (2001).
- 69) Zimmermann, A., Hemmer, W., Liniger, M., Lüthy, J., Pauli, U.: A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system., *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **31**, 664-67 (1998).
- 70) Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., Hirth, L.: Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA., *Cell*, **21**, 285-94 (1980).
- 71) Pietrzak, M., Shillito, R. D., Hohn, T., Potrykus, I.: Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector., *Nucleic Acids Res.*, **14**(14), 5857-68 (1986).
- 72) McElroy, D., Blowers, A. D., Jenes, B., Wu, R.: Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation., *Mol. Gen. Genet.*, **231**, 150-60 (1991).
- 73) McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., Wu, R.: Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation., *Plant Cell*, **2**(2), 163-71 (1990).
- 74) Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H. M.: Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence., *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 561-73 (1982).
- 75) Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A.: Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*)., *J. Agric. Food Chem.*, **50**(7), 2100-09 (2002).
- 76) Goda, Y., Asano, Y., Shibuya, M., Hino, A., Toyoda, M.: A detection of

- recombinant DNAs from genetically modified papaya., *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **42** (4), 231-36 (2001).
- 77) Fuchs, R. L., Kishore, G. M., Macintosh, S. C., U.S. Patent 5250515 (Oct. 5, 1993).
- 78) Sanfacon, H., Broadmann, P., Hohn, T.: A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal., *Genes & Developments*, **5**(2), 141-49 (1991).
- 79) Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, J., Van Montagu, M. M., Schell, J.: Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models., *EMBO J.*, **2**(3), 419-26 (1983).
- 80) Barry, W. C., Kishore, G. M., Padgett, S. R., Stallings, G. F., U.S. Patent 5804425 (Sep. 8, 1998).
- 81) Barry, G. F., Kishore, G. M., U.S. Patent 5776760 (Jul. 7, 1998).
- 82) Freeling, M., Bennett, D. C.: Maize *Adh1*., *Ann. Rev. Genet.*, **19**, 297-323 (1985).
- 83) Fischhoff, D. A., Perlak, F. J., U.S. Patent 5880275 (Mar. 9, 1999).
- 84) Rochester, D. E., Winer, J. A., Shah, D. M.: The structure and expression of maize gene encoding the major heat shock protein, *hsp70*., *EMBO J.*, **5**(3), 451-58 (1986).
- 85) Moseley, B. E. B.: Safety assessment and public concern for genetically modified food products: The european view., *Toxicologic Pathology*, **30**(1), 129-31 (2002).
- 86) McPherson, J. C., Kay, R., U.S. Patent 5424200 (Jun. 13, 1995).
- 87) Fischhoff, D. A., Fuchs, R. L., Lavrik, P. B., McPherson, S. A., Perlak, F. J., U.S. Patent 5763241 (Jun. 9, 1998).
- 88) 松岡猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 三浦裕仁, 日下部裕子, 穂山浩, 合田幸広, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統からの組換え遺伝子の検知法, *食品衛生学雑誌*, **42**(3), 197-201 (2001).
- 89) 日本興業銀行産業調査部: 植物バイオの「現流」を探る—岐路に立つ遺伝子組換え農作物—, *興銀調査*, **306**(1), 109-19 (2002).
- (http://www.mizuhocbk.co.jp/fin_info/industry/ibj/data1020.html)

- 90) U.S. Environmental Protection Agency: *Bacillus thuringiensis* subspecies *tolworthi* Cry9C protein and the genetic material necessary for its production in corn; exemption from the requirement of a tolerance., *EPA Federal Register Environmental Documents*, **63**(99), 28258-61 (1998).
(<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1998/May/Day-22/p13604.htm>)
- 91) AGBIOS, Database Product Description: ACS-ZMØØ4-3 (CBH-351).
(<http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=CBH-351&format=LONG>)
- 92) De Roeck, S., Van Rie, J., WIPO/ PCT Patent 9900407 (Jan. 7, 1999).
- 93) The Codex Alimentarius Commission: CODEX *ad hoc* intergovernmental task force on foods derived from biotechnology, methods validated by interlaboratorystudies., Joint FAO/WHO food standards programme CODEX commetee on methods of analysis and sampling 24th Session in Budapest, Hungary (Nov. 18-22, 2002).
(ftp://ftp.fao.org/codex/ccmas24/ma02_08e.pdf)
- 94) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知: “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について”平成 13 年 3 月 27 日, 食発第 110 号 (2001).
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/kensa/dl/050517a.pdf>)
- 95) Park, S. H.: Current status of regulation on GM food in Korea., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**(1), J-4-7 (2005).
- 96) Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirao, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A.: Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean., *J. AOAC Int.*, **85**(5), 1077-89 (2002).
- 97) Yoshimura, T., Kuribara, H., Matsuoka, T., Kodama, T., Iida, M., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Furui, S., Hino, A.: Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy., *J. Agric. Food Chem.*, **53**(6), 2052-59 (2005).
- 98) Yoshimura, T., Kuribara, H., Kodama, T., Yamata, S., Futo, S., Watanabe, S., Aoki,

- N., Iizuka, T., Akiyama, H., Maitani, T., Naito, S., Hino, A.: Comparative studies of the quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using real-time PCR, *J. Agric. Food Chem.*, **53**(6), 2060-69 (2005).
- 99) Shindo, Y., Kuribara, H., Matsuoka, T., Futo, S., Sawada, C., Shono, J., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A.: Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules., *J. AOAC Int.*, **85**(5), 1119-26 (2002).
- 100) 独立行政法人農林水産消費技術センター: “JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル<改訂第2版> ” 平成 14 年 6 月 20 日, 2002.
(http://www.cfqlcs.go.jp/technical_information/jashandbook/index.htm)
- 101) 国際標準化機構(International Organization for Standardization; ISO) ホームページ: <http://www.iso.org/iso/en/ISOOnline.frontpage>
- 102) 田部井豊, 日野明寛, 矢木修身編集委員: 新しい遺伝子組換え体(GMO)の安全性評価システムガイドブック 食品・医薬品・微生物・動植物, (株)エヌ・ティー・エス, 2005, p. 110-18.

謝辞

本研究をまとめるに際し、終始ご指導とご高配を賜りました筑波大学大学院・生命環境科学研究科 渡邊和男教授、有益なご助言、ご教示を賜りました筑波大学大学院・生命環境科学研究科 佐竹隆顕教授、同 王 碧昭教授、同 山口智治教授、同 鎌田 博教授 に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当たり、研究の場を与えてくださり、ご指導とご鞭撻をいただきました(独)食品総合研究所・企画調整部 GMO 検知解析チーム長 日野明寛博士に深甚なる感謝の意を表します。また、多大な助言をいただきましたチーム員の方々に深謝致します。

本研究を遂行するに当たり、(独)肥飼料検査所、韓国食品医薬品安全庁、韓国農林部農業科学技術院、韓国農林部国立農産物品質管理院、東京都立食品技術センター、広島県立食品工業技術センター、(財)日本穀物検定協会、(財)食品環境検査協会、(財)日本食品分析センター、(財)日本油脂検査協会、(財)日本冷凍食品検査協会、日本生活協同組合連合会、アサヒビール(株)、アプライドバイオシステムズジャパン(株)、OMIC ユー・エス・エー インク、海外貨物検査(株)、(株)エス・アール・エル、(株)日清製粉グループ本社、(株)ニッポンジーン、(株)ビー・エム・エル、(株)ファスマック、(株)ホーネンコーポレーション、カルビー(株)、サントリー(株)、タカノフーズ(株)、昭和産業(株)、日本製粉(株)、ハウス食品(株)、森永製菓(株)、リョーコクシヨウジ(株)および和光堂(株)のご協力をいただきました。関係者の方々には深く感謝します。また、原料種子の調達に協力していただくとともに、豆腐の製造について助言いただいたリョーコクシヨウジ(株)中岡素子氏、納豆の製造にご協力いただいた、タカノフーズ(株)川島 健氏に深く感謝します。

本研究を遂行するに当たり、多大な助言をいただきました(独)食品総合研究所味覚機能研究室の室員の方々に深謝致します。

研究の機会を与えてくださった(独)農林水産消費技術センター 元技術調査部長(現在は(社)日本植物蛋白食品協会に勤務)篠 照雄氏をはじめ(独)農林水産消費技術センター及び関係者の方々、また、本研究をまとめるにあたり様々なご支援、ご

配慮を賜った(独)農林水産消費技術センター神戸センターの方々に深謝致します.

和文摘要

題目

遺伝子組換えダイズ・トウモロコシからの組換え DNA 配列の検知法の開発

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国においても食品としての安全性審査の終了したダイズ、トウモロコシ等 73 系統(2005 年 12 月 15 日現在)の商品化が可能になっている。一方で、消費者の不安は拭いきれずにいる。そのため、この技術の食品への応用について社会的合意を得る一つの手段として、2001 年 4 月から厚生労働省により遺伝子組換え(GM)食品の安全性審査が義務化され、審査未了の GM 食品の輸入・販売等が法的に禁止された。同時に、農林水産省・厚生労働省により GM 食品の表示制度が実施されることになった。これらの施行には、信頼性と実用性の高い遺伝子組換え体の検知技術の開発が必要である。本研究は、PCR 法を用いて、GM ダイズ・トウモロコシから組換え DNA 配列の検知法を開発したものである。

I 章では、本研究の目的および、遺伝子組換え技術や GM 農作物・食品をめぐる状況を記述した。II 章から IV 章までは、安全性審査の終了した GM ダイズ・トウモロコシを対象とした。II 章では、GM ダイズ(40-3-2 系統)およびその加工食品から組換え DNA 配列の検知を行った。DNA 抽出は、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)を用いる方法が有効であることを示した。種子、豆腐からは組換え DNA 配列の検知が可能であり、種子は 0.05 %、豆腐は 0.5 % GM ダイズを含有したのまで検知可能であった。丸大豆納豆・挽割り納豆では、通常の PCR 条件では組換え DNA 配列の検知は困難であった。しかし、挽割り納豆では、nested PCR 法によりダイズ内在性レクチン遺伝子の検知が可能であるため組換え DNA 配列の検知が可能であると考えられた。さらに、市販豆腐 41 検体について本法を適用し、27 検体から組換え DNA 配列を検知した。III 章では、GM トウモロコシ 4 系統(Bt11, Event176, MON810, T25) から組換え DNA 配列の検知を行った。DNA 抽出は、ダイズと同様に CTAB を用いる方法が有効であった。4 系統の GM トウモロコシを検知する特異性の高いプライマーおよび PCR 条件の設定を行い、Bt11 では 0.01 %、その他の

GM 系統では 0.05 % GM トウモロコシを含有したもので検知可能であった。また、Bt11, Event176, MON810 を簡便に検知する Multiplex PCR 法を検討し、各 1 % GM トウモロコシを含有したもので 1 回の PCR で検知可能であった。IV 章では、III 章で検討した GM トウモロコシ 4 系統に、新たに安全性が認められた GA21 を対象に、Multiplex PCR 法により 5 系統 GM トウモロコシの簡便な検知法の開発を行った。DNA 抽出は、シリカスピニング法を用いる方法が、CTAB を用いる方法と同様に有効であった。本法により、各 GM 系統とトウモロコシ内在性ツェイン遺伝子を特異的かつ確実に特定でき、各 0.5 % GM トウモロコシを含有したもので検知可能であった。我が国において、non-GM ダイズまたは non-GM トウモロコシを分別流通した場合に意図せざる混入として許容される組換え体は 5 % 以下であり、II 章から IV 章に示した検知感度は十分に利用可能であると考えられた。V 章では、同じ有用遺伝子が様々な農作物の形質転換に用いられていることに注目し、有用遺伝子、プロモータ、ターミネータ領域 11 領域を特異的に検知するプライマー対の設計および PCR 条件の設定を行った。GM トウモロコシ 7 系統 (Event176, Bt11, T25, MON810, GA21, DLL25, MON802) に導入されている組換え DNA 配列を解析し、その結果からプライマーを設計し、14 組の特異的なプライマー対を選択した。本プライマーを用いた PCR 結果をプロファイルすることにより、導入 DNA 配列の構造が未知の GM 農作物においても、その構造の推定が可能となり、安全性審査未了のものを含めた GM 農作物の検知法として有用であると考えられた。VI 章において、我が国において食品および飼料として安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統の検知法の開発を行った。CBH351 系統に導入されている DNA 配列を解析し、特異的なプライマーの設計および PCR 条件の設定を行った。その検知感度は 0.05~0.1 % 程度であることを示した。VII 章には、本研究によって得られた結論および本研究後の検知技術の進展・課題を記述した。

ABSTRACT

Method development for the detection of recombinant DNAs from genetically engineered soy and maize

In recent years there have been significant advances in food biotechnology, including transgenic crop breeding and transgenic manipulation of organisms used in food production. Crops developed by genetic engineering are grown in the US, Canada and other major crop-producing countries. The estimated global area of approved genetically modified (GM) crops has grown rapidly. From 1.7 million hectares in 1996, which was the first year for commercial production of GM crops, to 81.0 million hectares in 2004, which is an increase of more than 47-fold. The safety of genetically modified organisms (GMOs) currently in production for food use has been confirmed by the appropriate government authorities according to rigorous scientific tests in each country. In December 15, 2005, seventy-three GM crops, including soy, maize, potato, rapeseed, cotton, sugar beet, and alfalfa, had been authorized for commercial use in Japan.

The general public, however, has shown concern over the use of GMOs. Protests from consumer groups and public demands have led to the requirement of the labeling of the presence of GMOs in food products. Hence, the labeling system for GM foods has been mandatory from April 1, 2001, in Japan. This system relates only to foods derived from GM crops. The purpose of this system is to provide information regarding the use of GMOs and ensure the right of the choice of options regarding food selection for consumers. In this system, foods are classified into three groups (those using GMOs, those using non-GMOs and those for which GMO use is not segregated during their production/distribution). Labeling is compulsory for GMOs and non-segregated foods, while it is optional for non-GMOs. The foods requiring compulsory labeling are defined as “designated foods”, and the six main crops used as food materials (soybeans, corn, potatoes, rapeseed, cotton, and alfalfa) and 31 processed foods such as tofu, natto and corn confectioneries, are specified in the Quality Labeling Standards. These thirty-one types of processed foods are designated as those in which recombinant DNA (rDNA) or the resulting protein still exists even after processing. Agricultural products can be regarded as "non-GMO" when it is confirmed that they are treated under

"Identity Preserved Handling (IP-handling)" in their production/distribution processes. Even if such measures are adopted, unintentional commingling is inevitable. In Japan, the threshold level of unintended commingling of GMO is 5 % in the cases of soy and maize. As for the safety assessment of GM foods, mandatory requirements were introduced on April 1, 2001. Thus any GM food that hasn't had a safety assessment cannot be imported or sold in Japan.

There is another concern about the environmental impact of GM crops. An environmental safety assessment of GM plants has been conducted by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (MAFF) in accordance with "the Guidelines for Application of Recombinant DNA Organisms in Agriculture, Forestry and Fisheries" since 1989. Meanwhile, in January 2000, the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity adopted the Cartagena Protocol on Biosafety, which seeks to protect biological diversity from the potential risks posed by living modified organisms resulting from modern biotechnology. After Japan acceded to the Cartagena Protocol in November 2003, the Protocol and the "Law Concerning the Conservation and Sustainable Use of Biological Diversity through Regulations on the Use of Living Modified Organisms (Cartagena Protocol Domestic Law)", which aims to secure precise and smooth implementation of the Cartagena Protocol, entered into force in February 2004 in Japan. The environmental safety assessment of GM plants was then mandatory under the Cartagena Protocol Domestic Law. Therefore, it is required that the method to obtain the information for the existence of unapproved GM plants.

As mentioned above, the labeling system of GM foods has been regulated, and mandatory requirements for safety assessment of GM foods and for environmental safety assessment of GM plants have been introduced. The main purpose of these policies is to facilitate the acceptance of the utilization of GMOs. To ensure steady implementation of these policies, development of GMO detection methods was needed. Simultaneously, there was a need for food industries to guarantee the quality of raw materials. The goals of these methods are the following: 1) to develop methods for detection of authorized GMOs for the items which require compulsory labeling and for quantitation of GMOs contained, 2) to develop a method for detection of unauthorized GMOs in foods, and 3) to develop a method that provides information about the existence of GMOs, including unapproved ones, and allows the prediction of

the construction of rDNA introduced into GMO.

With this background, there is a strong need for technical and methodological elaboration on the GM crop identification. This study is a method development for the detection of rDNAs from GM soy and maize by using polymerase chain reaction (PCR). GM soy and maize are widely grown in the world and many processed foods using them require compulsory labeling in Japan. The presence of GMOs in test samples is determined when the rDNA sequence introduced into GMOs is detected from the test sample DNA.

This thesis consists of seven chapters. Chapter I shows the background information about GMO and the regulations for GMO in Japan. Chapters II to IV show a method development for the detection of GM soy and GM maize where safety assessments for food were completed.

Chapter II focuses on a line of GM soy, such as Roundup Ready® Soy (RRS), and its processed food, and shows: (1) DNA extraction method using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was suitable for extraction from soy and soy products. (2) PCR primers were designed from the introduced DNA sequence, and it was revealed that sensitivity and specificity of PCR detection depended on primers. By using appropriate PCR primers, the rDNA could be detected in dry soy containing 0.05 % RRS and in tofu made from soy containing 0.5 % RRS. The detection of rDNA from natto was difficult. This result indicates that the detection of rDNA from heated and/or fermented foods might be difficult and suggests that the amplification length of 100 to 200 bp might be suitable for the GMO detection from processed foods.

Chapter III is an examination of four lines of GM maize, such as Bt11, Event 176, MON810, and T25, and shows: (1) CTAB method was also suitable for extraction from maize. (2) The specific PCR primers were designed from each line of GM Maize and their detection sensitivity was about 0.01 % for Bt11, and about 0.05 % for Event176, MON810 and T25. (3) A multiplex PCR method for three lines of GM maize, such as Bt11, Event176 and MON810, was also developed and this enabled these 3 lines of GM maize in one tube to be distinguished according to the difference of their amplification lengths. This sensitivity was about 1 %.

Chapter IV focuses on GA21 GM maize, which was authorized for food use after the study shown in Chapter III, and shows: (1) DNA extraction method using a silica spin column kit was as competent as CTAB method in the quality of extracted DNA. DNA extraction method using a silica spin

column kit is superior to CTAB method as a toxic organic solvent-free method. (2) After primers for Bt11, Event176, MON810 and T25 were re-designed, 5 lines of GM maize were distinguishable by the multiplex PCR method. The sensitivity was 0.5 to 0.1 % of each of the 5 lines of GM maize.

Chapter V provides the method development for the prediction of the construction of rDNA introduced into unapproved GMO. The rDNA segments such as promoter, terminator, enhancer, and trait gene are introduced into GMO, even though their selection and combination are different. The rDNAs introduced into Event176, Bt11, MON810, T25, GA21, DLL25, and MON802 were sequenced, and fourteen primer pairs were designed to detect eleven different rDNA segments specifically. The detection profiles of PCR amplifications by using these primer pairs suggest the combination of rDNA segments for GM crops. Therefore, the construct of rDNA was predicted. This method could also be a fast and effective screening method by selecting the appropriate primer pairs in Chapter V.

Chapter VI focuses on CBH351 GM maize (StarLink®), which is not authorized in Japan and accidentally contaminated corn grains imported from the US, and shows: (1) The rDNA introduced into CBH351 was sequenced and the specific primer pairs were designed to detect the specific rDNA regions for CBH351. (2) This detection sensitivity was about 0.05 % to 0.1 %. After the detection method for CBH351 was validated by MHLW, primer pairs in Chapter VI were adopted as the standardized method in Japan. Chapter VII shows the results of this study and describes suggestions for the future development of a detection method for GMO. The future development of a detection method for GMO could be performed by the same approach as this study, that is: (1) procurement of GMO and non-GMO, (2) choice of DNA extraction method, (3) analysis of introduced rDNA sequence, (4) design of primer pairs for detection, (5) evaluation of primer and optimization of PCR condition. In the cases of nonspecific and/or low sensitive detection for GMO, re-design of primer pairs is needed.

After the overall study, a quantitative PCR method for RRS, Event176, Bt11, MON810, T25 and GA21 was developed. Referring to sequence results of each line of GMO in Chapters II to IV, the primers for quantitative PCR were designed, based on the above-mentioned approach. After a method validation was performed by collaboration with fifteen laboratories in Japan, Korea, and the US, the quantitation method was adopted as the standardized

method in Japan. The extraction method by using the silica spin column kit in Chapter IV was also adopted as the standardized method in Japan.

GM technologies have developed rapidly and many kinds of GMOs are utilized in our daily life. This study will contribute to the sound maintenance of the GMO labeling system and the regulations concerning GMOs. In addition, this study will also contribute to the model of the development of the detection method for GM crops for future applications, in order to serve the demands of consumers.