

氏名(本籍)	真 <sup>ま</sup> 野 <sup>の</sup> 潤 <sup>じゆん</sup> 一 <sup>いち</sup> (京都府)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第5379号		
学位授与年月日	平成22年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Development and Evaluation of Comprehensive Detection Methods for Genetically Modified Crops</b> (遺伝子組換え農作物網羅的検知法の開発と評価)		
主査	筑波大学教授	工学博士	中嶋光敏
副査	筑波大学教授	理学博士	藤村達人
副査	筑波大学教授	博士(農学)	磯田博子
副査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(農学)	五十部誠一郎
副査	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構	食品総合研究所 GMO 検知解析ユニット長	博士(農学) 橋田和美

### 論文の内容の要旨

1974年のコーヘン、ボイヤーらによる初の遺伝子組換え実験の成功以来、微生物、動植物にわたる多様な遺伝子組換え生物 (genetically modified organism, GMO) が作出されてきた。GMOの作出、利用については当初より種々の科学的議論がなされ、これまでに安全性評価や食品表示に関する規制が確立されてきている。近年では、こうした規制に基づいて多数の遺伝子組換え (GM) 農作物が食品や飼料として使用を承認されており、その使用量及び種類は年々増加している状況にある。こうしたことを背景として、GM農作物が規制に合致した適切な使用がなされていることを科学的に検証するために GM 農作物検知法の開発が行われてきた。特に最近では、より効率的かつ網羅的に GM 農作物を検知する手法が強く求められている。そこで、本研究では GM 農作物を一斉に検出するための新規な方法論を考案し、それに基づいて実用性の高い網羅的検知法を開発することを試みた。

また、安全性評価制度の下で安全性が承認されていない未承認 GM 農作物の管理は、GM 農作物検知法開発の重要な目的の一つである。しかし、未承認 GM 農作物に共通して存在する生物学的、化学的な特徴はないことから、未承認 GM 農作物を包括的に検出する手法は開発されていない。そこで、本研究では網羅的検知法を活用し、未承認 GM 農作物の混入を推定する手法の開発も試みた。

まず、GM 農作物の効率的なスクリーニング検知法の開発に取り組んだ。リガーゼ連鎖反応 (LCR) 法は、既に GM 農作物検知に広く利用されているポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法に比べ、より配列特異性が高い DNA 増幅法であり、正確な DNA 分析手法として注目を集めている。本研究ではスクリーニング検知に適した方策として PCR 法と LCR 法を組み合わせた Multiplex PCR-Multiplex LCR (MPCR-MLCR) 法を新たに考案した。MPCR-MLCR 法は、標的となる複数の DNA 領域をマルチプレックス PCR であらかじめ増幅した後、マルチプレックス LCR によりさらに増幅及び蛍光標識を行い、その増幅産物を電気泳動で分離後に蛍光検出を行うという一連の分析操作による分析法である。この方法は PCR と LCR の特徴により、複数の標的

DNA を高感度かつ正確に検知可能であると予想された。この方法論に基づき、多くの GM 農作物に共通して導入されている組換え DNA 領域（組換え DNA セグメント）の一斉検出系と検査において対照試験となる内在性遺伝子の一斉検出系の 2 つを構築した。いずれの検出系もそれぞれの標的に対する高い特異性及び検出感度が確認された。これら 2 つの検出系により、承認・未承認を問わず GM 農作物のハイスループットなスクリーニング検知が可能となった。

続いて、GM 農作物について、より包括的に情報を得ることができる網羅的かつ汎用的な検知法の開発を試みた。個別の GM 系統、組換え DNA セグメント、内在性遺伝子等を特異的に検出可能な TaqMan PCR のプライマー・プローブ溶液をあらかじめ PCR プレート上の各ウェルに添加したものをリアルタイム PCR アレイとし、これを検知法の基盤とした。30 種の TaqMan PCR を開発し、性能を評価した結果、いずれも高い特異性と検出感度が確認され、このリアルタイム PCR アレイが GM 農作物の正確で網羅的な検知を可能とすることが示された。続いて、このリアルタイム PCR アレイを利用した未承認 GM 農作物の管理手法の開発を検討した。未承認 GM 農作物は、全ての GM 農作物から承認 GM 農作物を除いたものと定義される。このため、幅広い GM 農作物の検出が可能なスクリーニング検知の結果と、承認 GM 系統を特異的に検出した結果を比較することで、未承認 GM 農作物の混入が推定可能である。この推定プロセスを簡易に実施するために、市販の表計算ソフトウェアを利用した未承認 GM 農作物推定プログラム Unapproved GMO Checker ver. 2.01 の開発を行った。リアルタイム PCR アレイは、個別の反応間で相互作用は存在しない。このため、検出の特異性、ダイナミックレンジ、分析の迅速性、操作性、拡張性、柔軟性において非常に高い性能を発揮するものであった。

本研究で新規に開発された MPCR-MLCR 法及びリアルタイム PCR アレイ法はともに多様な GM 農作物に適用可能であり、また高い拡張性を有している。今回開発した検知法をさらに拡張し、検査の目的に応じて検知対象を変更することで、行政面及び産業面で必要とされる適切な検知法が継続的に供給可能である。このような GM 農作物の継続的な管理体制を作り出すことによって人類が遺伝子組換え技術の恩恵を享受する可能性を拡大できるという点で、本研究は応用的側面においても非常に有意義である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では遺伝子組換え農作物の網羅的検知法として MPCR-MLCR 法及びリアルタイム PCR アレイ法という 2 つの検知法が開発された。両検知法はいずれも多様な GM 農作物を精確かつ高感度に検知可能な手法であり、新規かつ高度な検知技術として学術的にその開発は意義が大きい。加えて、両検知法は拡張性にも富んでいることから、現在の検査に利用可能であるにとどまらず、これらの技術を応用して今後も状況に即した検査法の供給が期待される。網羅的検知のみならず未承認組換え系統の混入を推定する手法など、行政面及び産業面で強く求められている GM 農作物の管理手法に関して将来にわたって継続的に使用可能な技術基盤を構築したことは、応用的側面でも有用性が極めて高い。このため、本論文の価値を審査員が一致して認めた。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。