

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05901

研究課題名(和文) 農作物特異的新規マルチコピーDNAマーカーのバイオインフォマティクスの探索と応用

研究課題名(英文) Study on exploration of new crop-specific and multi-copied DNA markers using bioinformatic approach

研究代表者

曽我 慶介 (Soga, KEISUKE)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号：50746336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食品表示偽装対策での微量検出や、及びDNAの断片化が進んだ加工食品や嘔吐物等から特定作物の混入を高感度で検知するには、種特異的かつマルチコピーのDNAマーカーを標的とした遺伝子検査法が有用である。

本研究では、バイオインフォマティクスを活用し、とうもろこし及びイネをモデルに高感度マーカーの開発を検討し、探索パイプラインを構築した。それぞれのマーカー候補の領域を標的とし、高感度なリアルタイムPCRを開発することに成功した。一方で、特定の作物で非特異的な増幅が完全には解消されなかったことから、検査として適用するには今後の検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された高感度リアルタイムPCR法を用いることで、加工食品中のとうもろこしおよびイネの混入の確認が可能と考えられる。この場合は、食品偽装食品中のアレルゲン性の確認等の検査への要用が期待できる。また、高感度かつ特異的マーカー探索パイプラインは、今回検討した作物以外の作物への応用も期待でき、食品遺伝子検査の高感度化に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genetic testing methods such as PCR targeting species-specific and multi-copy DNA markers are useful for detecting adulteration, contamination in processed foods and crops in vomit.

In this study, we investigated the maize-specific and multi copied markers targeting ribosomal RNA. We also investigated the rice-specific and multi copied markers using bioinformatics approaches, and a search pipeline was developed. Highly sensitive real-time PCRs were successfully developed by targeting the respective candidate marker regions. On the other hand, non-specific and trace amplification could not be completely eliminated in certain crops, and further studies are required when applying them to tests.

研究分野：食品科学

キーワード：バイオインフォマティクス 遺伝子検査 リアルタイムPCR コメ とうもろこし マルチコピー DNA マーカー 食品分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品成分の原料の同定にはゲノム DNA を標的とするポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) やタンパク質を標的とする酵素結合免疫吸着法 (ELISA) により行われることが一般的である。特に、タンパク質より安定な DNA を標的とするリアルタイム PCR は感度が高く、世界各国において様々な食品中の遺伝子組換え作物または食物アレルギー検査等に応用されている。近年は食の多様化が進み、多くの加工食品が開発され、原料も様々な作物が利用されているため、食品表示は消費者にとって、重篤な症状を引き起こすアレルギーや遺伝子組換え作物の有無等を示す唯一無二の手がかりとなる。しかし、高度に加工された食品製品ではその原材料に由来するタンパク質、核酸ですら大部分が分解・断片化されており、リアルタイム PCR をもってしても原材料由来の DNA の検出が困難な場合がある。近年の検証において、しょうゆ、コーンフレーク、植物油、水飴などは使用原材料の特異的 DNA の検出が不可能なことから科学的検証は困難とされたが、18S リボソーム RNA (18S rRNA) の DNA 配列は全ての加工食品で検出されている (Soga et al, 国立医薬品食品衛生研究所報告 2018; 136: 31)。この原因として、リアルタイム PCR 法はゲノム中に数コピーだけ含む配列を標的としているが、18S rRNA は半数体ゲノム中に数千コピー含まれることが理由と考えられる。しかし、18S rRNA は作物種間で高度に配列が保存されているため特異性が低く、作物の同定には利用できない。そこで、検査の高感度化を目的として新たにマルチコピーでかつ作物種に特異的な DNA マーカー配列の開発が求められる。

2. 研究の目的

食品表示偽装対策での微量検出や、及び DNA の断片化が進んだ加工食品や嘔吐物等から特定作物の混入を高感度で検知するには、種特異的かつマルチコピーの DNA マーカーを標的とした PCR 等の遺伝子検査法が有用である。近年、各遺伝子等データベース、バイオインフォマティクスツール及びスーパーコンピュータを始めとしたハイスペック計算機の普及により、大容量データの利用、かつその計算が高速化し、従来よりもデータに基づいたマーカーの探索が容易になったと考えられる。そこで本研究では、バイオインフォマティクスの解析を駆使し、特定の農作物の高感度かつ特異的 DNA マーカーを探索するための方法論の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 既知配列を標的とした探索

本研究ではトウモロコシをモデルに、rRNA を標的とした探索を行った。真核生物の rRNA は主に 18S、5.8S、28S のサブユニットから構成されるが、その各サブユニットのスペーサー領域: Internal Transcribed Spacers (ITS) は進化速度が速く、種間でも多様性に富む配列であることが知られている。その ITS 領域において、NCBI データベースに登録されている 20 種類以上の作物を対象とした作物間マルチプルアライメントおよび Blast プログラムによる相同性検索により、各作物に特異的な配列を探索し、候補とした。トウモロコシ品種 10 種の ITS 領域におけるシーケンス解析を行い、作物間では多様な反面、候補配列はトウモロコシ間では保存されている箇所を確認した。リアルタイム PCR の増幅に適した箇所をプライマー及びプローブを設計し、LightCycler480 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて 30 種以上の作物 DNA を用いて特異性試験を行った。市販コーンフレークを 3 種類 (三温糖、チョコ、ブルーベリー) 購入し、加工食品からの検出評価に利用した。

(2) 新しい探索パイプラインの開発

各データベース Ensemble、RefSeq のゲノム配列、Sequence Read Archive のシーケンスリードデータを用い、PCR による増幅領域を約 200 bp と想定し、計算によって特異的かつマルチコピーな配列を迅速に探索するパイプラインを検討した。モデル作物としてイネ (*Oryza sativa*) を用い、特異的な配列を増幅する PCR のプライマー配列を探索した。Primer3 プログラムによる Tm 値の考慮、Blast による相同性検索 (考慮すべき種での特異性確認) のアルゴリズムを検討した。扱うフォーマットや計算速度を加味し、検討すべきパラメータやマルチコピーを計算する閾値を検討した。

4. 研究成果

(1) 高感度トウモロコシリアルタイム PCR

設計したプライマー及びプローブはリアルタイム PCR で特異性試験を行ったところ、トウモロコシでは Cq 値 13 台で検出された (図 1)。今回調べた作物では他にインゲン、玉葱、あま等でも検出され、Cq 値 35 ~ 40 で検出された。Cq 値の差が 22 以上あることから、PCR 効率が同等と仮定した場合、同じゲノム質量あたり $2^{22} \times 4 \times 10^6$ 以上のコピー数差が想定されることから、超高感度であった。しかし、実際には 10^6 以上のオーダーでマルチコピーの標的がゲノム中に存在すると考えるのは難しく、PCR 効率が悪い配列が非特異的に増幅していると考えられる。ゲノム中に多い標的として rRNA が知られ、ゲノム中のコピー数は数千以上に及ぶことが報告されている (Li et al, Genome Res, 2018)。トウモロコシの半数体ゲノム中に 1 コピーだけ含まれるスターチンターゼ b (SS b) 遺伝子座のリアルタイム PCR では、Cq 値約 24 であり、 $2^{10} \times 1 \times 10^3$ 以上のコピー数差になる事から、rRNA を標的とした場合の高感度化は理論値に近い結果と考えられた。一方で、数種類の作物において、検出限界付近で検出されたことから、微量検査を想定すると特異性に関しては改善が必要であった。コーンフレーク中のトウモロコシ遺伝子検出を試みたところ、SS b では Cq 値 38 ~ 不検出であったが、今回開発したリアルタイム PCR では Cq 値 32 ~ 40 で検出された。コーンフレークは高度加工食品といわれ、主原材料の DNA は分解されてほとんど検出されないが、感度を向上させた本法を利用することで検出可能なことが示唆された。

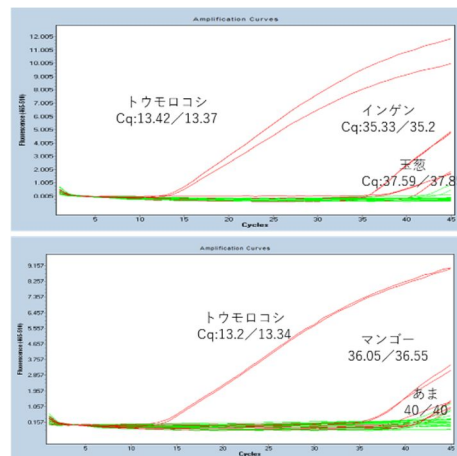


図 1 トウモロコシ特異的リアルタイム PCR による特異性試験

(2) 高感度イネのリアルタイム PCR

公共データベースにアップされているデータ (シークエンスリードデータ、アセンブリデータ等) を用いて、作物特異的のマーカ探索パイプラインの検討を行い、ゲノム中に数千コピー以上が期待されるマルチコピーでイネ特異的な配列を増幅する PCR のプライマーペアを数ペア得ることができた。PCR 及びリアルタイム PCR で検証を行うと、イネでは Cq 値 12.5 で検出された。一方で、大豆でも 30 半ばの Cq 値で検出された。(1) と同様に Cq 値の差が 22 以上あることから、開発したパイプラインによる種特異的なマルチコピー領域の同定と特異性選別が適切に機能していることが確認され、DNA マーカー探索に有用なパイプラインを開発することができたと考えられる。しかし、非特異的な増幅が完全にはなくならなかったことから、特異性を担保する条件の微修正や、コピー数カウント時のパラメータ等を検討し、目的に応じてより適切なパイプラインへと設定していくことが重要と考えられた。

(1)(2) の結果より、トウモロコシ及びイネの高感度な PCR 系を開発することができたが、ごく微量で非特異的な増幅が完全には無視できないことが課題として挙げられた。実際の遺伝子検査の場合では、非特異的な増幅を加味し、検査目的にどうか考慮したうえで適用性を検討する必要がある。本研究では、TaqMan リアルタイム PCR までしか検討できなかったが、遺伝子検査ではプライマーを 6 種用いる迅速な検出系である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法等の適用性を確認していくことも今後の検討項である。

< 引用文献 >

- Soga, K., Nakamura, K., Kishine, M., Takashima, Y., Miyahara, T., Kimata, S., Mano, L., Takabatake, R., Ozeki, Y., Kitta, K., Kondo, K.: Studies on detection of maize genomic DNAs in cornflakes using real-time PCR. (in Japanese) *Bull. Natl Inst. Health Sci*, 136, 31-39 (2018)
- Li B, Kremling KAG, Wu P, Bukowski R, Romay MC, Xie E, Buckler ES, Chen M. Coregulation of ribosomal RNA with hundreds of genes contributes to phenotypic variation. *Genome Res*. 2018 Oct;28(10):1555-1565.

< 謝辞 >

本研究課題の一部は、先進ゲノム支援プロジェクト「21H06279 (PAGS)」の支援を受け、東京大学新領域創成科学研究科笠原雅弘博士の援助を受け実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 NAKAYAMA TATSUYA, SOGA KEISUKE	4. 巻 28
2. 論文標題 Simple and quick detection of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-encoding genes using isothermal nucleic acid amplification techniques	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Microorganism Control	6. 最初と最後の頁 145 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4265/jmc.28.4_145	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi Chie, Shibata Norihito, Soga Keisuke, Yoshiba Satoko, Narushima Jumpei, Sugino Miyu, Kondo Kazunari	4. 巻 14
2. 論文標題 Providing appropriate information to consumers boosts the acceptability of genome-edited foods in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 GM Crops & Food	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21645698.2023.2239539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Soga Keisuke, Taguchi Chie, Sugino Miyu, Egi Tomohiro, Narushima Jumpei, Yoshiba Satoko, Takabatake Reona, Kondo Kazunari, Shibata Norihito	4. 巻 64
2. 論文標題 国内流通遺伝子組換えとうもろこしの実態 (2021年度産) および現行法の適用性に関する調査 (調査・資料, 英文)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)	6. 最初と最後の頁 218 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3358/shokueishi.64.218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shibata Norihito, Soga Keisuke, Sugino Miyu, Narushima Jumpei, Yoshiba Satoko, Egi Tomohiro, Takabatake Reona, Kondo Kazunari	4. 巻 5
2. 論文標題 Evaluation of Conversion Factor for Rapid Quantification of Authorized Genetically Modified Maize and Soybean in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 115 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.5.5_115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Narushima Jumpei, Kimata Shinya, Shiwa Yuh, Gondo Takahiro, Akimoto Satoshi, Soga Keisuke, Yoshiba Satoko, Nakamura Kosuke, Shibata Norihito, Kondo Kazunari	4. 巻 27
2. 論文標題 Unbiased prediction of off target sites in genome edited rice using <sc>SITE</sc> Seq</sc> analysis on a web based platform	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 706 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soga Keisuke, Nakamura Kosuke, Egi Tomohiro, Narushima Jumpei, Yoshiba Satoko, Kishine Masahiro, Mano Junichi, Kitta Kazumi, Takabatake Reona, Shibata Norihito, Kondo Kazunari	4. 巻 94
2. 論文標題 Development and Validation of a New Robust Detection Method for Low-Content DNA Using Cq- Based Real-Time PCR with Optimized Standard Plasmids as a Control Sample	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14475 ~ 14483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c03680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Reona, Egi Tomohiro, Soga Keisuke, Narushima Jumpei, Yoshiba Satoko, Shibata Norihito, Nakamura Kosuke, Kondo Kazunari, Kishine Masahiro, Mano Junichi, Kitta Kazumi	4. 巻 94
2. 論文標題 Development and Interlaboratory Validation of a Novel Reproducible Qualitative Method for GM Soybeans Using Comparative Cq-Based Analysis for the Revised Non-GMO Labeling System in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13447 ~ 13454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c02447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jumpei Narushima, Shinya Kimata, Yuh Shiwa, Takahiro Gondo, Satoru Akimoto, Keisuke Soga, Satoko Yoshiba, Kosuke Nakamura, Norihito Shibata, Kazunari Kondo	4. 巻 446070
2. 論文標題 Strategy for detecting off-target sites in genome-edited rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.05.28.446070	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Reona, Onishi Mari, Mano Junichi, Kishine Masahiro, Soga Keisuke, Nakamura Kosuke, Kondo Kazunari, Kitta Kazumi	4. 巻 61
2. 論文標題 Evaluation of Conversion Factors for Genetically Modified Maize Quantification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)	6. 最初と最後の頁 235 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3358/shokueishi.61.235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Reona, Onishi Mari, Minegishi Yasutaka, Futo Satoshi, Soga Keisuke, Nakamura Kosuke, Kondo Kazunari, Mano Junichi, Kitta Kazumi	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of a Novel Detection Method Targeting an Ultrashort 25 bp Sequence Found in Agrobacterium-Mediated Transformed GM Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 15327 ~ 15334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c03864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soga Keisuke, Kimata Shinya, Narushima Jumpei, Sato Sakiko, Sato Emi, Mano Junichi, Takabatake Reona, Kitta Kazumi, Kawakami Hiroshi, Akiyama Hiroshi, Kondo Kazunari, Nakamura Kosuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Development and Testing of an Individual Kernel Detection System for Genetically Modified Soybean Events in Non-identity-preserved Soybean Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1259 ~ 1266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Soga K, Egi T, Narushima J, Yoshida S, Kishine M, Mano J, Kitta K, Takabatake R, Adachi R, Nakamura K, Kondo K, Shibata N.
2. 発表標題 Development and validation of a new robust qualitative method for GM maize using comparative Cq-based real-time PCR for the revised non-GM labeling system in Japan.
3. 学会等名 AOAC 137th Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 成島純平, 杉野御祐, 曾我慶介, 吉場聡子, 近藤一成, 柴田識人
2. 発表標題 ゲノム編集イネにおけるin vitroオフターゲット予測法SITE-Seqを用いたオフターゲット予測性能の評価
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 高畠令王奈, 江木智宏, 曾我慶介, 峯岸恭孝, 大西真理, 成島純平, 吉場聡子, 柴田識人, 中村公亮, 近藤一成, 岸根雅宏, 真野潤一, 橘田和美
2. 発表標題 ダイズ穀粒における遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法 (Cq法) の開発と妥当性確認
3. 学会等名 日本食品化学会第29回総会・学術大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 成島純平, 吉場聡子, 細川葵, 曾我慶介, 杉野御祐, 田口千恵, 安達玲子, 近藤一成, 柴田識人
2. 発表標題 Cas9 targeted long-read sequencingによる食品中の外来性遺伝子配列の同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 曾我慶介, 田口千恵, 杉野御祐, 江木智宏, 成島純平, 吉場聡子, 高畠令王奈, 安達玲子, 近藤一成, 柴田識人
2. 発表標題 遺伝子組換えとうもろこし系統の国内流通実態調査 (2021年度産)
3. 学会等名 日本食品衛生学会第119回学術講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 杉野御祐、成島純平、曾我慶介、吉場聡子、田口千恵、安達玲子、柴田識人
2. 発表標題 パイオインフォマティクスツールを活用した種特異的遺伝子配列探索法の開発
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 杉野御祐、成島純平、曾我慶介、吉場聡子、田口千恵、安達玲子、柴田識人
2. 発表標題 遺伝子検査法における種特異的遺伝子探索のためのパイオインフォマティクスの活用
3. 学会等名 第9回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yoritaka Harazono, Keisuke Soga, Masahiro Kasahara.
2. 発表標題 For the development of a PCR primer design pipeline for detection of contamination in foods.
3. 学会等名 Genome Informatics (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 曾我慶介、中村公亮、成島純平、吉場聡子、木俣真弥、江木智宏、岸根雅宏、真野潤一、橘田和美、高畠令王奈、柴田識人、近藤一成
2. 発表標題 改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えとうもろこし混入の判定に係る定性PCR検査法の開発
3. 学会等名 日本食品衛生学会第117会学術講演会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高島令王奈, 江木智宏, 曾我慶介, 峯岸恭孝, 成島純平, 吉場聡子, 柴田識人, 中村公亮, 近藤一成, 岸根雅宏, 真野潤一, 橘田和美
2. 発表標題 改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えダイズ混入の判定に係る定性PCR検査法の開発
3. 学会等名 日本食品衛生学会第117会学術講演会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 成島純平, 木俣真弥, 志波優, 権藤崇裕, 秋元智, 曾我慶介, 吉場聡子, 中村公亮, 柴田識人, 近藤一成
2. 発表標題 ゲノム編集作物におけるオフターゲット予測法の検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 曾我慶介, 成島純平, 吉場聡子, 柴田識人, 近藤一成
2. 発表標題 全ゲノム配列を用いた遺伝子変異検出におけるツール間比較
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 曾我慶介, 吉田光範, 坂田こずえ, 近藤一成
2. 発表標題 ナノポアシーケンス技術を用いた致死性有毒キノコ <i>Amanita virosa</i> のゲノムアセンブリの検討
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 光範 (Yoshida Mitsunori) (70772630)	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官 (82603)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	笠原 雅弘 (Kasahara Masahiro) (60376605)	東京大学・准教授 (12601)	先進ゲノム支援プロジェクト「21H06279 (PAGS)」 情報解析支援

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------