

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780151

研究課題名(和文) DNA IDタグを利用したGM植物の一斉検知新技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel simultaneous detection and identification method for genetically modified plants using DNA ID tag

研究代表者

高島 令王奈 (TAKABATAKE, Reona)

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・食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号：20463466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え(GM; Genetically Modified)農産物の種類は増加を続けており、その全てを網羅的に検知することは事実上不可能となっている。本研究では、GM品種の系統名や開発企業の名称等の情報を塩基配列に置き換えた“一種のIDタグ”を導入したい遺伝子と共に植物のゲノムDNAに導入することによって、簡便かつ正確に、組換え植物の検出、同定を可能とする新技術の開発を試みた。DNA IDタグを導入したGMイネを三種類作出し、抽出ゲノムDNAを解析した結果、本システムが有効に機能することが確認された。

研究成果の概要(英文)：The number of GM crops has been continuously increasing, and it is virtually impossible to detect comprehensively all of these crops. As a pilot study, we generated GM plants which was introduced several DNA ID tags, and several rice transgenic lines were obtained. We evaluated the system using extracted rice genomic DNA and designed common primers and specific probes. It was confirmed that the introduced ID tags were detectable with conventional PCR analysis using the common primer pair and the three DNA ID tags were identified with real-time PCR analysis using specific DNA probes which were designed in the ID tag regions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品分析

1. 研究開始当初の背景

食糧の安定供給や農家の負担軽減のため、優れた形質を有する GM 農産物の商業栽培が開始されてから、既に 10 年以上が経過した。我が国では、消費者の選択の自由に資するため、GM 食品は、原材料の総重量の上位 3 位以内で、かつ 5% を超えるものに関して“GM 使用”の表示が義務づけられている。GM 検知技術としては PCR 法が最も一般的であるが、検査対象となる GM 品種が増えてきたため、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター(P35S)のような多くの GM 農産物に共通に導入されている配列を用いたスクリーニング法も広く利用されつつある。しかしながら、導入遺伝子の発現量や植物個体中の発現部位を制御するために P35S 以外のプロモーターが選択される GM 品種も急激に増えてきており、このような GM 品種に関しては、特異的な配列を利用した検知法をそれぞれ構築しているのが現状である。我が国で、安全性が確認された承認 GM 品種は現時点で約 120 種類にのぼり、さらに国産の GM 農産物の開発気運も高まってきていることから、検査対象となる GM 農産物の種類は今後も増加し続けることが確実である。

また、GM アマ FP967 (CDC Triffid) は、1996-1998 年にかけてカナダおよびアメリカで認可されたが、実際に販売されることはなく 2001 年に登録抹消され種子は全て処分された。それにも関わらず、2009 年になってドイツで食品中に検出され、さらには、我が国においても輸入アマニ中に混入が検出されるなど、既に GM 農産物は全く予想不可能な規模で世界中に広がっており、未承認及び登録抹消された GM 品種も含めると、膨大な数の検査が必要となる。したがって、近い将来、あらゆる GM 作物を検査することが、検査現場では許容量を超えた事実上不可能な作業となり、GM 検査そのものが破綻してしまう可能性が危惧されている。

2. 研究の目的

本研究は、開発された GM 品種において、検知に適した領域を後から探索するのではなく、GM 品種の情報等が塩基配列の状態で書き込まれた領域を、保存されたプライマー配列で挟んだ塩基配列を GM 植物に導入し、一種の ID タグとして利用するものである。簡便かつ正確な GM 農産物の検出・同定さらに定量までを可能になると期待される。共通プライマー（以下、Common プライマーと記述）を用いることから、GM 品種の種類や数に影響されずに検出ができ、さらに、GM 系統固有の DNA プローブを利用することによって同定も同時に行うことが可能である。従来法に比べて、大幅な作業量および作業コストの削減が見込まれる。情報を植物のゲノム DNA に直接書き込むことによって、上記に示したような問題を克服し得る新技術で

ある。

EU 諸国では、従来型の農業と GM 農産物を利用した農業の共存に向けたルール作りが進んでおり、我が国においても、従来の農産物と GM 農産物を区別しながら共存させる方向性が模索されている。そのために、GM 農産物に目印となる共通のタグを予めつけておくことは極めて自然な発想といえる。増え続ける GM 農産物の多様化に対応し、GM と非 GM を区別し続けていくためには、今後、このような技術は必ず必要になるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) DNA ID タグおよびその Common プライマー塩基配列の検討 DNA ID タグに関しては、文字情報・数字情報および特殊記号を塩基配列によって表現する必要があることから、A~Z までのアルファベット、0~9 までの数字、さらに、ハイフン(-)やピリオド(.)、カンマ(,)といったものを 3 塩基連鎖を 1 情報として対応させた暗号表を作成した。アルファベットは、コドン表におけるアミノ酸の一文字表記をそのまま踏襲して使用した。アミノ酸の一文字表記に使用されていないアルファベット (J, O, U 等) には、適当な 3 塩基連鎖を対応させた。それ以外の数字および特殊記号についても同様に 3 塩基連鎖を 1 情報として対応させた。増幅用 Common プライマー配列に関してはそれぞれ 2 種類ずつ特異的プライマーを設計した。設計の際には、非特異的な増幅をできるだけ抑えるために、既知の植物ゲノム中に類似した配列が無いようデータベース等を参照し、GC 含量や Tm 値を考慮した。

	T	C	A	G
T	TTT TTC F TTA <input type="checkbox"/> TTG 1	TCT 5 TCC 4 TCA hyphen TCG <input type="checkbox"/>	TAT Y TAC 7 TAA <input type="checkbox"/> TAG <input type="checkbox"/>	TGT C TGC X TGA <input type="checkbox"/> TGG W
C	CTT L CTC <input type="checkbox"/> CTA period CTG 2	CCT P CCC <input type="checkbox"/> CCA O CCG <input type="checkbox"/>	CAT H CAC <input type="checkbox"/> CAA Q CAG Z	CGT R CGC <input type="checkbox"/> CGA underscore CGG <input type="checkbox"/>
A	ATT I ATC J ATA <input type="checkbox"/> ATG M	ACT T ACC U ACA <input type="checkbox"/> ACG S	AAT B AAC N AAA <input type="checkbox"/> AAG K	AGT <input type="checkbox"/> AGC atmark AGA comma AGG 9
G	GTT V GTC 3 GTA 8 GTG colon	GCT A GCC <input type="checkbox"/> GCA 6 GCG semicolon	GAT D GAC slash GAA E GAG <input type="checkbox"/>	GGT G GGC <input type="checkbox"/> GGA 0 GGG <input type="checkbox"/>

使用せず

図 1 本研究で設計した DNA ID タグ用遺伝暗号表

(2) (1) で合成した DNA ID タグ配列を植物形質転換用ベクターに組み込み、アグロバクテリウム法により、イネ (日本晴) に遺伝子導入を行った。

3. 研究成果

使用する DNA ID タグに関しては、試験的試みとして、3 種類の DNA ID タグ(NFRI, NIAS, Web)を設計し、用いた。導入した塩基配列は以下の通り、

```

1,tttttAACTTCCGTATTTCACTGAGGTCA
GTAGTCGTATCATAACAGGTAAGTGGGCCCC
2, tttttAACATTGCTACGTCAGTCACTGAGGTCA
GTAGTCGTATCATACTCCGGAGCAACCCCC
3, tttttCATACTACTCCTGTGGACGACAA
CTTCCGTATTCTAAACGCTCGTCCACTAGC
TTTCTTCCGTTGTCTAGGTCCACTAATCCC
TGACgggggg
  
```

三回以上の繰り返し塩基は、暗号の開始及び終了を意味するように設計した。暗号が T 以外で始まる場合には連続した T、T で始まる場合には連続した A を開始シグナルに、一方、暗号が C 以外で終了する場合には連続した C、C で終了する場合には、連続した G を終了シグナルとした。したがって、1, 2, 3 の暗号領域は、アルファベットの大文字部分に相当し、図 1 の暗号表を用いて解読すると、それぞれ

- 1, NFRI-29-838 -7971
- 2, NIAS-29-838-7406
- 3, [HTTP://NFRI.NARO.AFFRC.GO.JP/](http://NFRI.NARO.AFFRC.GO.JP/)

となる。

また、DNA ID タグの上流に、スペーサー領域として、全てのアミノ酸の読み取り枠に終始コドンが現れるような塩基配列を配置した。さらに、これら DNA ID タグおよびスペーサーの両側に、共通プライマー (Common プライマー) を配置した形でイネ (日本晴) に導入し、3 種類の DNA ID タグに関して、それぞれ複数種類の形質転換個体を得た。

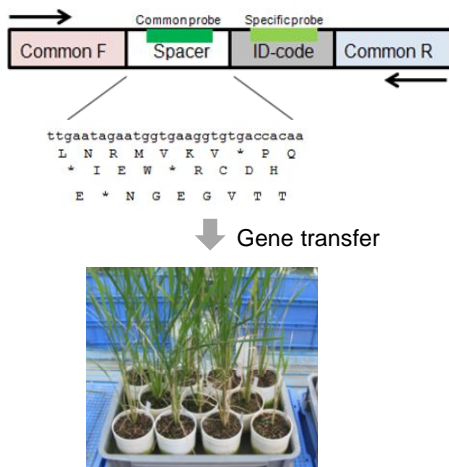


図 2 本研究で用いた遺伝子構造図

得られた形質転換体イネからゲノム DNA を抽出し、設計した Common プライマー及び特異的プローブ等を用いて、本システムを評価した。その結果、ID タグ導入イネは、全て Common プライマーによって検出が可能であった (図 3)。

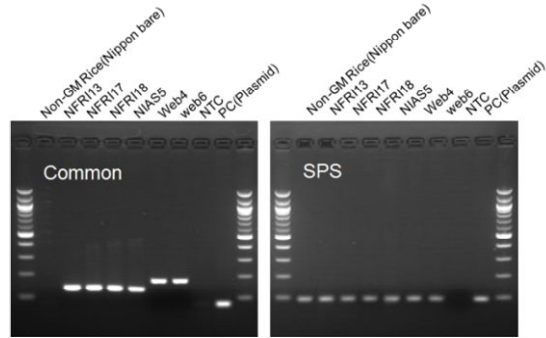


図 3 通常 PCR 法による Common プライマーによる PCR 産物確認結果。SPS はイネ種特異的内在性配列

さらに、ID タグ領域内に特異的 DNA プローブを設計することにより、リアルタイム PCR、TaqMan 法によって、各 ID タグ間の判別が可能であることが示された (図 4)。

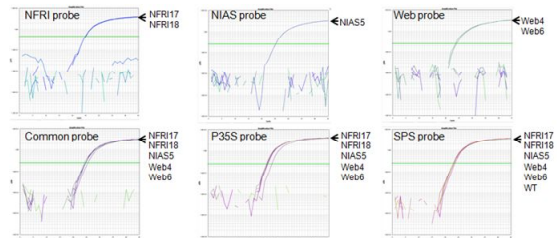


図 4 リアルタイム PCR 法による、各種プローブを用いた特異性の確認

これらの結果から、本技術は想定通りに機能することが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

- 1, 高皇令王奈、橘田和美、前田美紀、光原 一朗

「Development of a novel simultaneous detection and identification method for genetically modified plants using DNA ID tag」
第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド、(兵庫県)

- 2, 高皇令王奈、橘田和美、前田美紀、光原 一朗

「DNAID タグを利用した遺伝子組換え植物の一斉検知技術の開発」

第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月
21 日、岡山大学、(岡山県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高畠 令王奈 (Reona Takabatake)

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・食品分析研究領
域・主任研究員

研究者番号：20463466