

| | |
|-----------|--|
| 氏 名 | みね かし やす たか 峯 岸 恭 孝 |
| 学 位 の 種 類 | 博士（工学） |
| 学 位 記 番 号 | 博生第 20 号 |
| 学 位 授 与 日 | 平成 26 年 6 月 30 日 |
| 論 文 題 目 | Studies on Novel Detection Methods of Genetically Modified Crops Using Genetic Engineering Techniques (遺伝子工学的手法を用いた遺伝子組換え作物の新規検知法に関する研究) |
| 論文審査委員 | (主査) 富山県立大学 教 授 加 藤 康 夫 教 授 伊 藤 伸 哉 教 授 榊 利 之 准教授 荻 田 信二郎 国立医薬品食品衛生研究所 部 長 穂 山 浩 |

内 容 の 要 旨

遺伝子組換え（Genetically Modified: GM）技術は、DNA を細胞から取り出し、遺伝子の構成や並び方を変え、元の生物や別の種類の生物の細胞に入れて発現、機能させる技術である。GM 作物はこれらの技術を用いて作出された作物及びその子孫のことを示す。GM 作物の作付面積は近年急速に増加し、2012 年には本格的な商業栽培が始まった 1996 年の 100 倍にあたる 1 億 7,030 万ヘクタールに達している。

GM 作物の安全性については、遺伝子組換え体の産業利用に安全性評価を求める指針が CODEX 委員会で国際的に決定されたことを受け、我が国においても各種法令の下で遺伝子組換え農産物の安全性審査制度が開始された。この制度によって安全性未審査の GM 作物はたとえ微量な混入であっても国内の流通は認められず、混入が認められた場合は廃棄等の処分をすることとなった。また、GM 作物の流通に伴って、消費者に選択肢を提供することを目的として品質表示制度の策定が検討され、2001 年 4 月に「食品衛生法」等において表示制度が定められた。これらの制度では、遺伝子組換えでないものの使用に関しては任意表示とされているが、この任意表示を付すためには、適切に分別流通された原料を使用しており、栽培・集荷・保管・輸送・加工等の全ての段階での証明書が揃っていることが必要とされている。従って、国内の食品企業は市場においてより消費者が好む傾向にあるこの任意表示を食品に付するため、適切に分別流通管理された非 GM 作物の調達を積極的に行うようになった。しかしながら、分別流通管理の現場では、経済的な理由から非 GM 作物専用のサイロやタンカー等を用意せず、GM 作物と非 GM 作物で共通のものを清掃して使用する場合が多い。そのため、サイロやタンカー内に以前保管

及び輸送した GM 作物が残っている場合があり、米国等の GM 栽培大国での分別流通管理においては、GM 作物が意図せず混入する可能性を否定できない。従って、穀物や種苗を扱う企業側においては法令遵守や品質管理の観点から、証明書による事務的な保証に加え、科学的な方法による自主的な検査を行っている。近年、食品偽装問題が複数発生したこともあり、消費者の食品表示に対する関心は高く、万が一誤表示が判明した場合は、企業のブランドイメージを大きく損ねることになり、その経済的損失は計り知れない。このような背景から、GM 作物の簡便な検知技術が行政機関及び企業から必要とされ、様々な手法が開発、検討されることとなった。なお、これまでに開発された GM 作物の検知技術には、組換えタンパク質を検知する方法と組換え DNA を検知する方法の二種類の方法があるが、我が国や European Union (EU) で採用されている GM 検知法は、その殆どが組換え DNA を検知する方法で、技術的にも普及している PCR 法が用いられている。

本研究では、PCR 法を用いた GM 作物の検知において、以下に示す 1) 遺伝子組換えコメの定性検知に適した陽性コントロールの開発、2) 加工食品に適した新規 DNA 抽出法、3) 遺伝子組換えナタネ (*Brassica rapa*) RT73 系統の新規検知法、4) 粒単位検出システムによる遺伝子組換えトウモロコシ試料中の品種の定量と同定、に焦点を当てその問題点を遺伝子工学的手法にて解決することで、GM 作物検知技術の更なる正確性の向上を目指した。

第一章 遺伝子組換えコメの定性検知に用いる陽性コントロールプラスミド (pBT63) の開発

科学的な検査法においては、判定結果に問題がないことを保証するため、陽性コントロール反応や陰性コントロール反応を同時に行う必要があり、GM 作物の PCR 検査では標的配列を保持する DNA が陽性コントロールとして広く用いられている。PCR 法は 10^7 程度まで DNA を増幅するため、様々な理由で生じる DNA の汚染 (コンタミネーション) に十分留意する必要がある。コンタミネーションによる誤判定のリスクを避けるため、PCR 法をルーチンで実施する検査現場においては、敢えて陽性コントロールを用いずに検査を実施することがあり、その結果、陰性であることを完全に証明出来ないといった問題が生じる。そこで本研究では、コントロール反応の活用推進と検知法の精度向上を目的として、ゲノム DNA 由来の真陽性とコンタミネーションによる偽陽性とを簡便な方法で識別するために、標的配列中に制限酵素 *Bam*H I 認識部位を含むように設計した GM コメの定性 PCR 検知用陽性コントロールプラスミド (pBT63) の開発を行い、その有用性を確認した。他の PCR 検査においても、pBT63 と同様の構造を有するプラスミドを陽性コントロールとして用いることで偽陽性を容易に識別することが可能となり、定性 PCR 法による検知法の判定に対する信頼性の向上に貢献出来ることが示された。

第二章 加工食品に適した新規 DNA 抽出法の開発と評価

加工食品からの組換え DNA の検知においては検査対象からの DNA 抽出及び精製法は非常に重要であり、抽出が不十分な場合は GM 検知に必要な DNA 量を確保することが出来ず、また、精製が不十分な場合は検査対象由来の夾雑物等が混在することにより PCR が阻害され、正確な結果を得ることが出来ないといった問題点がある。加えて、加工食品では加工により化学的、物理的、生物学的に DNA が切断され断片化していることが多いため、通常の DNA 抽出条件では効率的に検査対象 DNA を回収することは出来ない。そこで、本研究では、穀物を対象とするシリカスピンカラムを用いた DNA 抽出キット GM quicker 2 をベースに、代表的な GM 作物であるダイズやトウモロコシの加工食品からの DNA 抽出及び精製条件の最適化を行うことで、新規 DNA 抽出法の開発を行った。6 種類の加工食品 (きな粉、豆乳、

味噌、トウモロコシ缶詰、スナック菓子、粉末コーンスープ）を用い、既存の4種類のDNA抽出法（陰イオン交換法、CTAB法、シリカスピニング法及び、CTAB法とシリカスピニング法の併用法）と今回開発した方法の比較を行った結果、DNA収量に関しては、本手法と陰イオン交換法が他の方法よりも多くのDNAを回収出来ていた。また、本手法と陰イオン交換法の操作性を比較すると、前者は後者の約1/4の工程数でDNAを抽出できる上、その操作時間も半分以下であった。これらのことから、今回開発したDNA抽出法は、実際の検査現場に最も適した方法であることが示された。今後、本研究で開発したDNA抽出法は、GM作物の検知のみならず、アレルゲン、食中毒菌等を対象とする加工食品の遺伝子検査にも幅広く活用されることが期待出来る。

第三章 遺伝子組換えナタネ RT73 系統の新規検知法

研究段階での種子の管理や種子生産における人為的なミスによる安全性未承認GM作物の市場への流出がしばしば発生しており、食品の安全性が担保されないという問題を引き起こしている。GMナタネ（RT73 *Brassica rapa*）は、安全性承認済みのGMナタネ（RT73 *B. napus*）と非GMナタネ（*B. rapa*）の種間交雑により派生した品種であり、我が国では安全性未承認である。RT73 *B. rapa*を検知するためには、一粒の種子において *B. rapa* と *B. napus* の識別検査とGMナタネ特異的領域の検知の両方を実施する必要がある。また、検査の信頼性を担保するためには、一ロットから数十粒の種子を個別に検査する必要がある、システム化された検知法を確立する必要があった。更にナタネの種子は非常に小さく、油分を多く含む等の特徴からDNA抽出法の開発においてはこれらの点に十分留意する必要があった。そこで本研究では、ナタネ種子の粒単位での多検体処理を可能とする96ウェルシリカメンブレンプレートを使用したDNA抽出法、エンドポイント解析の散布図を用いて *B. napus* と *B. rapa* を識別するためのDuplexリアルタイムPCR法、RT73系統の特異的配列と内在性の *FatA* 遺伝子を同時に検知するためのDuplexリアルタイムPCR法を開発し、これらを組み合わせてRT73 *B. rapa* の検知法を構築した。これらにより、ナタネにおけるRT73 *B. rapa* のコンタミネーションの正確で信頼できるモニタリングが可能となった。

第四章 粒単位検出システムによる2009年度産不分別トウモロコシ試料の品種同定と定量

我が国のGM作物表示制度において、意図しないGM作物の混入の許容値は重量混合比で5%以下とされているが、これまでの定量検知法では、GM作物同士を交配したような外来遺伝子を複数有するスタック品種、例えば、除草剤耐性のGMトウモロコシと害虫抵抗性のGMトウモロコシを交配した品種の混入があった場合は、スクリーニング検査で使用している共通配列（CaMV 35Sプロモーター領域等）を用いた定量法では実際のGM混入率よりも大きな値が算出されることになり、その正確性に問題があった。そこで本研究では、「第3章 遺伝子組換えナタネ RT73 系統の新規検知法」で開発したナタネ種子一粒からDNAを抽出する方法をトウモロコシ種子一粒に適応できる方法に改良し、リアルタイムPCR法やマルチプレックスPCR法と組合せることで、スタック品種を含むGMトウモロコシ種子集団の系統の特定や定量を可能とする方法を開発した。本手法を用いて2009年度米国産不分別トウモロコシ5検体のGM混入率を算出したところ、5検体の平均GM混入率は81.9%で、その内訳として単一系統遺伝子組換えトウモロコシ粒が46.9%、スタック品種が35.0%であることが初めて明らかになった。

以上のように、本論文では一貫して、PCR 法による GM 作物検知技術の各工程（GM 試料からの DNA 抽出、PCR 及び real-time PCR による検知反応とその結果の分析）における課題について遺伝子工学的手法を用いて解決し、GM 検知技術の正確性の向上に貢献した。

審査の結果の要旨

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い GM 作物の作付面積は急激に増加し、多くの GM 作物が世界中で流通している。そのような状況で、GM 作物やそれらを原料とした食品が、輸入国の安全性審査において承認が得られる前に混入し、流通したという報告は後を絶たない。また、食品の偽装表示事例が度々摘発され問題となっていることもあり、食品の安全・安心を担保するための科学的な検証技術の重要性が高まっている。これまで食品分野における検査では、微生物の培養検査や残留農薬等に対する化学分析等が主に実施されてきたが、これらの技術に加え、PCR 法等の遺伝子工学的手法を用いた検査法が国際的にも採用され始めており、今後様々な用途の検査に利用されることが考えられる。

本研究では、PCR 法による GM 作物の検知における問題点として、PCR 検査に必要な陽性コントロールの構築、加工食品からの DNA 抽出法の改良、ナタネ種子の多検体検知技術の開発、トウモロコシ種子の多検体検知技術の開発について検討を行い、遺伝子工学的手法にて解決することで GM 検知技術の更なる正確性の向上を目指した。

本論文は、「Studies on Novel Detection Methods of Genetically Modified Crops Using Genetic Engineering Techniques」と題し、序論と全四章から構成されている。主な内容は以下の通りである。

第一章 遺伝子組換えコメの定性検知法に用いる陽性コントロールプラスミド (pBT63) を構築するとともに、その構築過程において、ゲノム DNA 由来の真陽性とコンタミネーションによる偽陽性とを簡便な方法で識別するため、標的配列中に制限酵素認識部位を含む方法を開発し、その有用性を示した。また、開発方法そのものが、他分野での利用も含めた他の PCR 検査にも応用できる手法であることから、PCR 法による検知法の判定に対する信頼性の向上に広く貢献できる技術である点についても、評価できると判断した。

第二章 従来法では問題点の多かった加工食品からの DNA 抽出において、穀物を対象とするシリカスピンカラムを用いた DNA 抽出キット「GM quicker 2」をベースに改良を行い、加工食品に適した新規 DNA 抽出法を開発し、従来法との比較を行って、開発した方法が実際の検査現場に最も適した方法であることを示した。本成果をまとめた論文は、第 9 回 (2014 年度) 日本食品化学学会論文賞を受賞したことから、特に学術的な高さが評価されるものである。

第三章 我が国で安全性未承認の遺伝子組換えナタネ RT73 *B. rapa* を検知のための粒単位検査を実施するため、96 ウェルシリカメンブレンプレートを使用したナタネ種子の多検体 DNA 抽出法、エンドポイント解析の散布図を用いて *B. napus* と *B. rapa* を識別する Duplex リアルタイム PCR 法、RT73 系統の特異的配列と内在性の *FatA* 遺伝子を同時に検知する Duplex リアルタイム PCR 法を開発し、これらを組み合わせた RT73 *B. rapa* の検知法を構築した。これにより、ナタネにおける RT73 *B. rapa* のコンタミネーションの正確で信頼できるモニタリングが可能となった。本成果は、穀物種子の多検体処理及び安全性未承認作物の検知だけでなくその実態を簡便に把握することを可能としたことから、その社会的意義は大きい。

第四章 第三章で開発したナタネ種子一粒の多検体処理法を改良して、トウモロコシ種子一粒に適応できる方法を開発し、リアルタイム PCR 法やマルチプレックス PCR 法と組合せて、スタック品種を含む GM トウモロコシ種子集団の系統の特定や定量を可能とする方法を開発した。その方法を用いて、2009 年度米国産不分別トウモロコシ 5 検体の GM 混入率を算出した。本成果により、トウモロコシ種子の多検体処理法及びスタック品種の検知法開発だけでなく、栽培状況の現状を把握する上で重要である不分別

別トウモロコシの実態を把握できたため、その社会的意義は大きいと考えられる。

なお、本論文の研究成果については以下の通り実用化され、実際にGM検知の現場で利用されている。第一章で構築した pBT63 は、厚生労働省通知法、食安監発（医薬食品局食品安全部監視安全課長通知）第 0126005-8 号「安全性未審査の中国米加工品の検知法」に対応した陽性コントロールプラスミド「GM Rice Detection Bt Rice Positive Control Plasmid」として、判定結果の正確性の向上に貢献している。第二章で開発した加工食品からの DNA 抽出法は、「GM quicker 4」として製品化されており、研究から検査まで幅広い分野で利用されている。第三章で開発した GM ナタネ RT73 *B. rapa* の検知法については、食安監発第 0626008 号「安全性未審査の遺伝子組換えナタネ（RT73 *B. rapa*）の暫定検査法について」に、第四章で開発したスタック品種を含む GM トウモロコシ種子集団の系統の特定や定量を可能とする方法については、消食表（消費者庁次長通知）第 201 号「安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法」に収載されている。加えて、第三章及び第四章で開発した多検体 DNA 抽出については、「GM quicker 96」として製品化されている。

本論文にまとめられた研究手法、得られた結果とその解釈は適切であり、的確な文章表現によって記されている。また、その研究内容は高い実効性と実用性が認められ、既に我が国の GM 検知の現場で成果が利用されているなど、生物工学分野において高い工学的価値を有している。なお、本論文に関連する発表論文は、四報であり、うち三報は申請者が筆頭著者（うち二報は *equally contributed*）である。

平成 26 年 5 月 26 日に博士論文の審査及び最終試験を行った結果、申請者は学術研究にふさわしい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、本論文は博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。