

遺伝子組換えダイズ及びトウモロコシの定性PCR用プライマー対の検知感度

森内理江*, 門間公夫*, 鷺直樹*, 鎌田国広**, 広門雅子*

Detection Sensitivity of the Primer Pairs Used for Genetically Modified Soybean and Maize in Qualitative PCR

Rie MORIUCHI*, Kimio MONMA*, Naoki SAGI*, Kunihiro KAMATA** and Masako HIROKADO*

Keywords : 遺伝子組換え体 *genetically modified organism*, ラウンドアップレディーダイズ *Roundup ready soybean*, 遺伝子組換えトウモロコシ *genetically modified maize*, 定性PCR *qualitative PCR*, プライマー対 *primer pair*, 検知感度 *detection sensitivity*

はじめに

農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律及び食品衛生法の一部改正により遺伝子組換え食品について表示制度が施行された^{1, 2)}。これを受けて厚生労働省通知「組換えDNA技術応用食品の検査法について」³⁾(以下、厚労省通知法とする)及び農林水産省農林水産消費技術センターが作成した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」⁴⁾(以下、JAS試験法とする)が示された。東京都ではこれらの公定法を用いて平成13年度より遺伝子組換え(GM)食品の行政検査を実施している⁵⁾。

一方、遺伝子組換え体(GMO)を検知する定性PCR法は通常、作物の品種に特異的な配列を標的とするプライマー対や、GM作物に広く導入されている共通領域であるcau-liflower mosaic virus (CaMV)由来の35S promoter及びagrobacterium由来のNOS terminatorを標的とするプライマー対を用いて行われている^{4, 6)}。定性PCRに使用するプライマー対の検知感度や特性についての情報は十分明らかとなっていないが、検査を実施する上で、これらを把握しておくことは重要である。

そこで我々は、ラウンドアップレディーダイズ(RRS)及びGMトウモロコシ(Bt11, Event176)を対象に、厚労省通知法及びJAS試験法に基づく条件で定性PCRを行い、これらのGMOを検知する各プライマー対の検知感度を比較したので以下に報告する。

材料及び方法

1. 標準試料

RRS, Bt11及びEvent176の標準試料にはEUROPEAN COMMISSION, JOINT RESERCH CENTRE, Institute for Reference Materials and Measurements製CRMs (Certified Reference Materials) IRMM-410 SB-2.0 (2%), MA-2 (2%)及び

MZ-2 (2%)をそれぞれ用いた。

2. 試薬

陽性対照はGMダイズ(RRS)陽性コントロールプラスミド, GMトウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いた。プライマー対は, CaMV 35S promoter検知用 (P35S-1-5'-P35S-1-3'), NOS terminator検知用 (NOS ter2-5'-NOS ter2-3'), RRS検知用 (RRS 01-5'-RRS 01-3'), Bt11検知用 (Bt11 3-5'-Bt11 3-3'), Event176検知用 (Event176 2-5'-Event176 2-3')を用いた。これらの試薬は(株)ニッポンジーン社製を使用した。その他の試薬は遺伝子工学用または特級品を用いた。

3. 検知感度の検討

標準試料からのDNA抽出は厚労省通知法のうち「ジャガイモからのDNAの抽出精製」の方法を採用し, QIAGEN社製 DNeasy Plant Mini Kitを用いて行った。

得られたDNAをGMO絶対量として, H₂O 2.5 µLあたり0.0625, 0.0250, 0.0125, 0.00625, 0.00250, 0.00125 ngとなるように滅菌水で希釈調製した後, 各プライマー対を用いて厚労省通知法及びJAS試験法のPCR条件で定性PCRを行った。PCR反応溶液の組成を表1に, 温度サイクルを表2に示した。なお, PCRは3点または6点並行で実施した。

結果及び考察

1. 厚労省通知法とJAS試験法のPCR条件におけるプライマー対の検知感度の比較

各プライマー対の検知感度の比較結果を表3に示した。なお, 検知感度の比較は, 各GMO絶対量における100%検知率(検知数/検査数)において行った。GMO絶対量が少なくなると検知率も比例して低くなると想定され, 概ねそのような結果が得られた。しかし, P35Sプライマー対におい

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター精度管理室

表1. PCR反応液の組成

溶液	厚労省通知法 液量 (μL)	JAS試験法 液量 (μL)
滅菌水	14.175	15.375
Amplitaq™ Gold	0.125	0.125
10×PCR buffer II	2.5	2.5
dNTP(2 mmol/L each)	2.5	2.5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	3.0	1.5
プライマー対 (25 μmol/L each)	0.2	0.5
鋳型DNA	2.5	2.5
全量	25 μL	25 μL

表2. 温度サイクル

95°C	10 min	1サイクル
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	40サイクル
72°C	30 sec	
72°C	7 min	1サイクル
4°C	—	—

表3. 厚労省通知法及びJAS試験法のPCR条件におけるプライマー対の検知感度の比較

GMO	プライマー対	厚労省通知法						JAS試験法					
		0.0625※1	0.0250	0.0125	0.00625	0.00250	0.00125	0.0625	0.0250	0.0125	0.00625	0.00250	0.00125
RRS													
	A	3/3※2	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	6/6	6/6	6/6	5/6	1/6	3/6
	B	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	0/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3
	C	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3
Bt11													
	A	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	6/6	5/6	6/6	0/6	3/6	1/6
	B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3
	D	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3
Event176													
	A	6/6	6/6	4/6	3/6	2/6	2/6	6/6	4/6	4/6	3/6	2/6	0/6
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	1/3

※1: GMO絶対量(単位はng)

※2: (検知数/検査数)

A: P35S-1-5'-P35S-1-3', B: NOS ter2-5'-NOS ter2-3', C: RRS 01-5'-RRS 01-3',

D: Bt11 3-5'-Bt11 3-3', E: Event176 2-5'-Event176 2-3'

では出現傾向が異なりばらつきが見られた。そのためPCRは3点並行で行っていたが、P35Sプライマー対については、さらに3点を追加してPCRを行った(表3, 図1)。

PCR反応液の組成の違いによる検知感度の差に着目すると、全てのプライマー対で厚労省通知法の方がJAS試験法の条件と同等か、もしくはより感度が高いことが認められた。この理由としてPCR反応液中のマグネシウム濃度がJAS試験法より厚労省通知法の方が高いことによる影響のためではないかと考えられる。

2. 各GMOにおけるプライマー対の検知感度と電気泳動でのバンドの出現傾向

1) RRS

厚労省通知法の条件でPCRを行う場合、P35Sプライマー対が最も感度が高く、0.00250 ngまで検知できた。RRSプライマー対は0.00625 ngまで、NOSプライマー対は0.0125 ngまでであった。JAS試験法では特異的プライマー対であるRRS

プライマー対は0.00625 ngまで検知でき、P35SとNOSプライマー対より感度が高かった。またRRSプライマー対において厚労省通知法の条件で、0.0250 ng以下に非特異バンドが目立ち判定が下しにくい傾向があったが、JAS試験法では非特異バンドは見られなかった(図2)。マグネシウム濃度を上げると増幅率がよくなる代わりに、非特異な反応が起こるといわれる⁷⁾ように、今回の非特異バンドもマグネシウム濃度の影響と考えられる。

定量試験を行う前にスクリーニングとして定性試験を実施することはコスト削減になり効率的である。RRSは安全性審査済みのGMOであるため、この場合の定性試験は微量のGMOを検知するPCR条件より判定を明確に下すことができるJAS試験法のPCR条件で行う方が適しているといえる。

2) Bt11 トウモロコシ

厚労省通知法の条件ではP35Sプライマー対の感度が最も

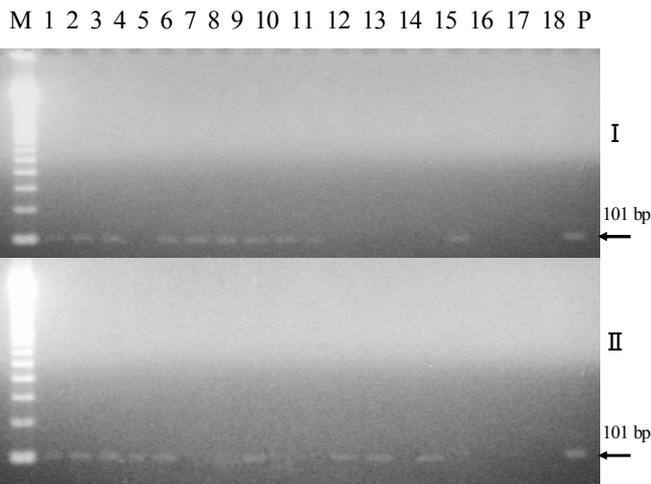


図 1. P35S検出用プライマー対の検知感度

矢印は予想される増幅長. 対象GMOはEvent176トウモロコシ.
条件はJAS試験法. 使用したプライマー対(P35S 1-5', P35S 1-3')
I : 1回目, II : 2回目
M : 100 bpラダーマーカー, レーン1-3 : 0.0625 ng, レーン4-6 :
0.0250 ng, レーン7-9 : 0.0125 ng, レーン10-12 : 0.00625 ng, レーン
13-15 : 0.00250 ng, レーン16-18 : 0.00125 ng, P : 陽性対照

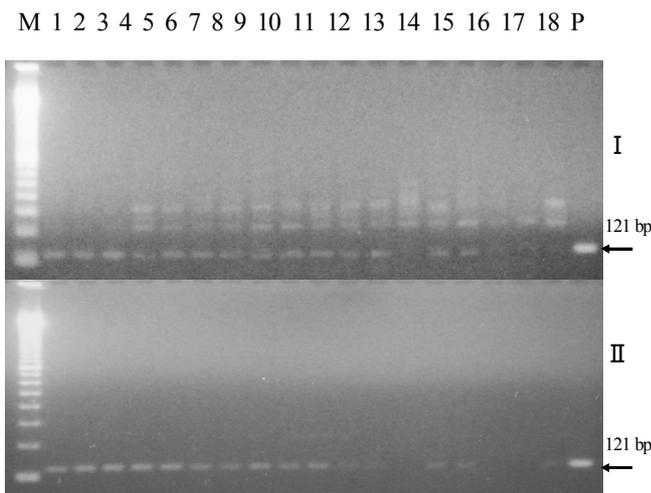


図 2. RRS検出用プライマー対の検知感度

矢印は予想される増幅長.
使用したプライマー対(RRS 01-5', RRS 01-3')
I : 厚労省通知法, II : JAS試験法
M : 100 bpラダーマーカー, レーン1-3 : 0.0625 ng, レーン4-6 :
0.0250 ng, レーン7-9 : 0.0125 ng, レーン10-12 : 0.00625 ng, レーン
13-15 : 0.00250 ng, レーン16-18 : 0.00125 ng, P : 陽性対照

高く, GMO絶対量として0.00625 ngまで検知でき, NOSプライマー対と特異的プライマー対は共に0.0125 ngまで検知可能であった. JAS試験法の条件ではNOSプライマー対の感度が最も高く, 0.0250 ngまで検知でき, P35Sプライマー対と特異的プライマー対は共に0.0625 ngまで検知可能であった. 通常, まずGM作物に広く導入されている領域を標的としたP35Sプライマー対を用いてスクリーニング定性PCRを行い, 陽性が確認されたものについて特異的プライマー対を用いて再度PCRを行うのが効率的である. そのため, スクリーニング用と確認用のプライマー対は同程度の感度で

あることが望ましいが, Bt11の場合P35Sプライマー対と特異的プライマー対の感度は同程度であることが分かった.

3) Event176 トウモロコシ

厚労省通知法の条件ではP35Sプライマー対はGMO絶対量として0.0250 ngまで, 特異的プライマー対は0.00250 ngまで検知可能であった. JAS試験法の条件ではP35Sプライマー対は0.0625 ngまで, 特異的プライマー対は0.00625 ngまで検知可能であった. 両条件ともに特異的プライマー対がP35Sプライマー対より感度が高かった. Event176の場合もP35Sプライマー対を用いてスクリーニング定性PCRを行う方が効率的であるが, この場合P35Sプライマー対の方が10倍感度が低いことが分かり, これを考慮に入れて試験を行う必要がある. Event176も安全性審査済みのGMOであり, 分別生産流通管理が行われている前提で混入率が5%以下である場合は表示義務が無いため問題とはならないが, 今後, 感度が同程度であるプライマー対の開発が望まれる.

まとめ

RRS, Bt11及びEvent176を対象とした遺伝子組換え体検知プライマー対について検知感度の比較検討を行った. 定性PCRは厚労省通知法及びJAS試験法の反応条件で行い, 100%検知率において比較したところ, JAS試験法より厚労省通知法の条件の方が全体で感度が高かった. また, 使用するプライマー対によりGMOの検知感度に差があることも認められた. P35Sプライマー対はバンドの出現傾向にばらつきがあった. RRSプライマー対において厚労省通知法ではGMO絶対量が0.0250 ng以下で非特異バンドが目立ったが, JAS試験法の条件では見られなかった.

(本研究の概要は第42回全国衛生化学技術協議会年会平成17年11月で発表した.)

文 献

- 1) 農林水産省食品流通局長通知“加工食品品質表示基準等の設定について”平成12年4月4日, 12食流第599号(2000).
- 2) 厚生労働省医薬局食品保険部長通知“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に施行について”平成13年3月15日, 食発第79号(2001).
- 3) 厚生労働省医薬局食品保険部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について”平成13年5月25日, 13食発第158号(2001).
- 4) 独立行政法人農林水産技術センター, 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”2001, http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual_00.htm
- 5) 門間公夫, 荒木理江, 市川久次, 他: 食衛誌, 45, 184-190, 2004.
- 6) Swiss Food Manual 2002. Chapter 52B: Molekular

-biologische Methoden

149-152, 2002, 羊土社, 東京.

7) 大藤道衛: バイオ実験トラブル解決超基本Q&A,