

資料

遺伝子組換えダイズに関する
リアルタイム PCR を用いた
定性 PCR 法の検討

垣田雅史, 内山陽介, 田中由紀子, 野田貴代美,
長谷川一夫, 熊坂謙一

Study on qualitative PCR method using
real-time PCR for genetically modified
soybeans

Masashi KAKITA, Yosuke UCHIYAMA,
Yukiko TANAKA, Kiyomi NODA,
Kazuo HASEGAWA and Kenichi KUMASAKA

2021 年 9 月に消費者庁の通知が改正され¹⁾, 安全性審査済みの遺伝子組換え食品に関するダイズ穀粒の検査法に遺伝子組換え農産物 (GM 農産物) 混入の判定に係る検査法 (リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法) が新設された。これにより, 検体陽性と判定された場合は, GM 農産物混入の可能性があるもの, 検体陰性と判定された場合は, GM 農産物混入の可能性がないものとして取扱うこととなった。また, ダイズでは, 遺伝子組換えに関する任意表示制度が改正され, 食品表示基準として 2023 年 4 月に施行された²⁾。旧制度では, 分別生産流通管理をして意図せざる混入を 5%以下に抑えていれば, 「遺伝子組換えでない」等の表示が可能であったが, 新制度では, 分別生産流通管理をして遺伝子組換えの混入がないと認められる場合にのみ, 「遺伝子組換えでない」等の表示が可能となった³⁾。

神奈川県では, 2002 年度からダイズの分別生産流通管理の判定に係る試験 (以下, 定量試験) を行政検査で実施している。今回, 定量試験にて GM 農産物の含有率が算出された試料を用いて, リアルタイム PCR を用いた GM 農産物混入の判定に係る試験 (以下, 定性試験) を実施し, 定量試験による GM 農産物含有率と定性試験による判定結果について比較検討

表 1 定量試験による試料の組換え遺伝子含有率 (%)

試料		RRS	RRS2	LLS*	GM農産物 含有率(%)
No.	原料産地	平均含有率(%)			
1	国内	0.000	0.000	0.000	0.000
2	米国	0.145	0.000	0.000	0.145
3	米国	0.096	0.035	0.000	0.131
4	米国	0.065	0.111	0.000	0.176
5	米国	0.000	0.053	0.000	0.053
6	米国	0.000	0.014**	0.000	0.014
7	中国	0.025**	0.000	0.000	0.025

* 全ての試料のウェルで Cq 値が得られず, 含有率が 0%であった
** 検量線の範囲外のコピー数のウェルを含む

したので報告する。

試料は 2015 年度～2021 年度に定量試験を実施した検体のうち, 計 7 検体を用いた。定量試験による 7 検体の RoundupReady Soybean 遺伝子 (以下, RRS), Roundup Ready 2 Yield 遺伝子 (Event MON89788) (以下, RRS2) 及び Liberty Link Soybean 遺伝子 (以下, LLS) の平均含有率は, RRS では 0～0.145%, RRS2 では 0～0.111%, LLS では全て 0%であった。なお, No.6 の RRS2 及び No.7 の RRS では, 検量線の範囲外となるコピー数のウェルが含まれていたが, 他のウェルと同様に, リアルタイム PCR 装置の自動解析機能を用いて, コピー数を算出した (表 1)。

試薬等として DNA 抽出精製キットは GM quicker (ニッポンジーン) を用い, プライマー及びプローブはダイズ内在性 DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット (ニッポンジーン), 組換え DNA P35S-1 オリゴヌクレオチド・プローブ及び組換え DNA RRS2 オリゴヌクレオチド・プローブ (ファスマック) を用いた。GM ダイズの混入判定には GM ダイズ混入判定用プラスミドセット (ニッポンジーン), マスターミックスは TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

試験方法は通知¹⁾ 及び JAS 分析試験ハンドブック⁴⁾ に従い, DNA 抽出精製法に NIPPON GENE GM quicker 法を用いた。内在性遺伝子に Le1, RRS 及び LLS に共通して存在する組換え配列として *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter 遺伝子 (以下, P35S) 並びに RRS2 を検知する検知試験を行った¹⁾。リアルタイム PCR 装置に Roche LightCycler480 II を用いて, 解析は $\Delta\Delta Cq$ 法により行い, 結果を判定した。

$\Delta\Delta Cq$ 値は以下の数式により算出した。

[ΔCq 値 = 組換え遺伝子 (P35S 又は RRS2) の Cq 値 - Le1 遺伝子の Cq 値]

表2 定量試験及び定性試験の試験方法

	定量試験	定性試験
DNA抽出精製法	NIPPON GENE GM quicker法	
抽出数	3	2
ウェル数/1抽出	3	2
DNA試料液の調製濃度 (ng/ μ L)	20	10
DNA容量/1ウェル(μ L)	2.5	5
DNA量/1ウェル (ng)	50	
組換え遺伝子	RRS, LLS, RRS2	P35S (RRS, LLSを含む), RRS2
リアルタイムPCR装置	Roche LightCycler480 II	
リアルタイムPCR 反応条件	50°C, 2min→95°C, 10min→ (95°C, 30 s →59°C, 1min) ×50cycles→40°C, 30s	
リアルタイムPCR 解析条件	2nd Derivative Maximum法 High Confidenceモード	
結果判定	GM農産物含有率	$\Delta\Delta$ Cq法により結果判定

[$\Delta\Delta$ Cq 値 =DNA 試料液の Δ Cq 値－標準プラスミド DNA 溶液の Δ Cq 値]

$\Delta\Delta$ Cq 値が 0 以下の場合, そのウェルは「+」, 0 より大きい場合, そのウェルは「-」と判定した。

定量試験及び定性試験の試験方法を表2に示した。定性試験では, 1 ウェル当たりの DNA 量が定量試験と同量であることから, DNA 濃度が定量試験と同濃度の PCR 用反応液を用いて, PCR 増幅反応を行った。リアルタイム PCR 反応条件及び解析条件についても, 定量試験と同条件で行った。

標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液の定性試験結果を表3に示した。ブランク試料液 (NTC) の Cq 値は, 全ての遺伝子で得られず, 標準プラスミド DNA 溶液の Δ Cq 値は, P35S 及び RRS2 共に, 11 程度であった。

DNA 試料液の定性試験結果及び判定結果を表4に示した。定量試験による RRS の平均含有率が 0% の No.1, No.5 及び No.6 では, 定性試験による P35S の全てのウェルで Cq 値が得られず, Δ Cq 値及び $\Delta\Delta$ Cq 値が算出できなかったため, P35S 陰性と判定された。RRS の平均含有率が 0.025% の No.7 及び 0.065% の No.4 では, P35S の Cq 値が得られ, $\Delta\Delta$ Cq 値を算出できたが, $\Delta\Delta$ Cq 値が全てのウェルで 0 より大きく「-」になったため, P35S 陰性と判定された。RRS の平均含有率が 0.096% の No.3 では, P35S の

ウェルが「+」又は「-」にばらついたことから, 最終判定を保留とした。通知¹⁾に従い再測定したところ, $\Delta\Delta$ Cq 値が再度, 「+」又は「-」にばらついたため, P35S 陰性と判定された。RRS の平均含有率が 0.145% の No.2 では, P35S の $\Delta\Delta$ Cq 値が全てのウェルで 0 以下の「+」となったため, P35S 陽性と判定された。今回, P35S の $\Delta\Delta$ Cq 値が 0 以下となり, ウェルの判定が「+」となった検体については, LLS の含有率が 0%であったため, RRS の含有率を反映した結果と考えられた。

一方, 定量試験による RRS2 の平均含有率が 0% の No.1, No.2 及び No.7 では, 定性試験による RRS2 の全てのウェルで Cq 値が得られず, Δ Cq 値及び $\Delta\Delta$ Cq 値が算出できなかったため, RRS2 陰性と判定された。RRS2 の平均含有率が 0.014 ~ 0.053% の No.3, No.5 及び No.6 では, RRS2 のウェルが「+」又は「-」にばらついたことから, 最終判定を保留とした。通知¹⁾に従い再測定したところ, 全てのウェルで「+」となる試料はなかったため, RRS2 陰性と判定された。また, No.5 の RRS2 において, 初回測定では 2 ウェルで「+」であったが, 再測定では全てのウェルで「-」であった。原因として, 今回, 検証したデータ数が少ないため断定はできないが, 平均含有率が 0.05%程度の検体では, ウェルの判定でのばらつきが大きいことが推測された。RRS2 の平均含有率が 0.111% の No.4 では, RRS2 の $\Delta\Delta$ Cq 値が全てのウェルで 0 以下の「+」となったため, RRS2 陽性と判定された。

以上のことから, 定性試験による P35S 及び RRS2 が陽性となる RRS 及び RRS2 の含有率を踏まえると, 「遺伝子組換えでない」等の表示が可能である GM 農産物含有率は, 旧制度での 5%から大幅に引き下げられたことが示唆された。

次に, RRS 及び RRS2 の平均含有率, 並びに P35S 及び RRS2 の判定結果について比較した。RRS では, 平均含有率が 0.096%及び 0.145%の試料 (No.2 及び No.3) においてのみ, P35S が「+」判定のウェル

表3 標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液の定性試験結果

(Cq 値)

測定回	ウェル No.	標準プラスミドDNA溶液								ブランク試料液 (NTC)		
		Le1*		P35S		RRS2		P35S	RRS2	Le1*	P35S	RRS2
		Cq	平均	Cq	平均	Cq	平均	Δ Cq		Cq		
初回 測定	1	20.47		31.56		31.09				UD	UD	UD
	2	20.41	20.44	31.28	31.42	31.22	31.16	10.98	10.72	UD	UD	UD
再測定	1	20.54		31.67		31.19				UD	UD	UD
	2	20.58	20.56	31.61	31.64	31.51	31.35	11.08	10.79	UD	UD	UD

*: 内在性遺伝子 UD: Cq 値得られず

図 4 DNA 試料液の定性試験結果及び判定結果

DNA試料液						P35S					RRS2				
No.	抽出 (測定回)	ウェル No.	Le1	P35S	RRS2	P35S					RRS2				
			Cq			Δ Cq	標準プラスミド DNA溶液	Δ Δ Cq	ウェル 判定	最終 判定	Δ Cq	標準プラスミド DNA溶液	Δ Δ Cq	ウェル 判定	最終 判定
1 (初回 測定)	1	1	23.82	UD	UD	10.98			—	陰性	10.72		—	—	陰性
		2	23.82	UD	UD										
	2	1	23.87	UD	UD										
		2	23.89	UD	UD										
2 (初回 測定)	1	1	23.81	34.22	UD	10.41	10.98	-0.57	+	陽性	10.72		—	—	陰性
		2	23.85	34.65	UD	10.80		-0.18	+						
	2	1	23.73	34.33	UD	10.60		-0.38	+						
		2	23.72	34.60	UD	10.88		-0.10	+						
3 (初回 測定)	1	1	23.73	34.96	33.82	11.23	10.98	0.25	—	保留	10.09	10.72	-0.63	+	保留
		2	23.69	35.24	34.70	11.55		0.57	—		11.01		0.29	—	
	2	1	23.74	36.49	34.09	12.75		1.77	—		10.35		-0.37	+	
		2	23.75	34.62	34.77	10.87		-0.11	+		11.02		0.30	—	
3 (再測定)	1	1	23.81	/	35.09	/	11.08	/	/	陰性	11.28	10.79	0.49	—	陰性
		2	23.78	/	34.34	/		/	/		10.56		-0.23	+	
	2	1	23.79	34.92	34.09	11.13		0.05	—		10.30		-0.49	+	
		2	23.77	34.85	34.76	11.08		0.00	+		10.99		0.20	—	
4 (初回 測定)	1	1	23.89	35.25	34.15	11.36	10.98	0.38	—	陰性	10.26	10.72	-0.46	+	陽性
		2	23.86	35.57	34.10	11.71		0.73	—		10.24		-0.48	+	
	2	1	23.72	35.47	34.10	11.75		0.77	—		10.38		-0.34	+	
		2	23.77	35.22	34.23	11.45		0.47	—		10.46		-0.26	+	
5 (初回 測定)	1	1	24.33	UD	34.80	10.98			—	陰性	10.47	10.72	-0.25	+	保留
		2	23.84	UD	34.71						10.87		0.15	—	
	2	1	23.70	UD	34.14						10.44		-0.28	+	
		2	23.69	UD	35.14						11.45		0.73	—	
5 (再測定)	1	1	23.99	/	36.32	/	11.08	/	/	陰性	12.33	10.79	1.54	—	陰性
		2	23.98	/	34.95	/		/	/		10.97		0.18	—	
	2	1	23.84	/	35.05	/		/	/		11.21		0.42	—	
		2	23.82	/	35.14	/		/	/		11.32		0.53	—	
6 (初回 測定)	1	1	23.69	UD	35.18	10.98			—	陰性	11.49	10.72	0.77	—	保留
		2	23.70	UD	34.84						11.14		0.42	—	
	2	1	23.68	UD	34.22						10.54		-0.18	+	
		2	23.69	UD	34.74						11.05		0.33	—	
6 (再測定)	1	1	/	/	/	/	11.08	/	/	陰性	/	10.79	/	/	陰性
		2	/	/	/	/		/	/		/		/	/	
	2	1	23.67	/	35.22	/		/	/		11.55		0.76	—	
		2	23.75	/	34.22	/		/	/		10.47		-0.32	+	
7 (初回 測定)	1	1	23.77	37.02	UD	13.25	10.98	2.27	—	陰性	10.72		—	—	陰性
		2	23.80	36.62	UD	12.82		1.84	—						
	2	1	23.86	37.39	UD	13.53		2.55	—						
		2	23.89	37.49	UD	13.60		2.62	—						

UD:Cq 値得られず /: 初回測定で2ウェル共に「—」だったため実施せず

が認められたが、RRS2 では、平均含有率が 0.014% ~ 0.111% の範囲で算出された全ての試料 (No.3 ~ No.6) において、RRS2 が「+」判定のウェルが認められた。細川らの報告⁵⁾では、RRS と LLS との合計含有率が 0.2% 以上で P35S が陽性となり、RRS2 の含有率が 0.1% 以上で RRS2 が陽性となると考えられた。今回の定性試験の結果においても、RRS よりも RRS2 の方が、各ウェルでの検出感度が高い傾向にあることが推測された。

今回の検討の結果では、RRS の含有率が 0.15% 程度の試料では、P35S が陽性となり、RRS2 の含有率が 0.11% 程度の試料では、RRS2 が陽性となることを確認した。

(令和 6 年 9 月 4 日受理)

参考文献

- 1) 消費者庁次長通知「食品表示基準について」(消費表第 139 号, 平成 27 年 3 月 30 日)(別添)「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」, 一部改正(消費表第 389 号, 令和 3 年 9 月 15 日)
- 2) 食品表示基準の一部を改正する内閣府令「食品表示基準」(平成 27 年内閣府令第 10 号), 一部改正(平成 31 年 4 月 25 日)
- 3) 消費者庁: 知っていますか? 遺伝子組換え表示制度 <https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/quality/genetically_modified/assets/food_labeling_cms202_230724_01.pdf> (2024/4/18 アクセス)
- 4) 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター: JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル第 3 版, (平成 24 年 9 月 24 日)
- 5) 細川葵, 菅野陽平: 新規遺伝子組換え大豆検査の導入に関する検討, 第 59 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 94-95, (2022)