

リアルタイム PCR を用いた遺伝子組換えダイズ定性試験法の検討

首藤広樹 滝川香織^{*1} 駒井美賀子 東田恭明 伊藤 智

1. 緒 言

当所では遺伝子組換えダイズ定量試験法 (RRS、LLS、RRS2 各遺伝子) の製品検査実施標準作業書 (最終改定:平成 30 年 3 月 30 日) を制定し、収去検査を行っている。

平成 31 年 4 月 25 日に食品表示基準の一部を改正する内閣府令 (平成 31 年内閣府令第 24 号) が公布され、新たな遺伝子組換え表示制度が令和 5 年 4 月 1 日から施行された。

それに伴い、現行の制度では意図しない混入を 5%以下に抑えている大豆に対し、「遺伝子組換えでない」の表示が可能であったが、新たに、分別生産流通管理の結果、遺伝子組換えの混入が無いと認められる大豆に対してのみ、「遺伝子組換えでない」等の表示が可能となった¹⁾。

これに伴い、遺伝子組換え農産物の混入の判定に係る検査法として、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (以下「 $\Delta \Delta Cq$ 法」という。) が新設された。本試験法では組み換え遺伝子である P35S 遺伝子と RRS2 遺伝子の定性が可能である。

本研究では、 $\Delta \Delta Cq$ 法が当所で導入可能か調査し、試験法の検討を行った。

2. 方 法

令和 4 年 8 月 8 日に収去検体として持ち込まれた大豆 2 検体を使用した。QIAGEN DNeasy plant Mini kit により抽出した大豆 DNA を用いて PCR 反応を行い、 $\Delta \Delta Cq$ 法により解析を行った²⁾。検討では各検体について 2 並行の試験を行い、各並行

試験では 2 回ずつ 3 つの遺伝子について解析を行った。

また、適用性の検討を行うにあたり、陽性及び陰性コントロール検体を用いて本試験を行い、検体の陰性及び陽性判定が一致することを確認するのが望ましいが、P35S 遺伝子、RRS2 遺伝子陽性検体の入手は困難である。このため、リファレンス遺伝子である Le1 遺伝子が全ての検体で検出されること、遺伝子組換え表記のない検体の結果が陰性であること、各遺伝子のポジティブコントロールで遺伝子の増幅が確認されることをもって妥当性評価に代えることとした。

3. 結 果

$\Delta \Delta Cq$ 法を用いた解析における Cq 値とは、遺伝子の増幅により増加する蛍光強度が閾値に達するまでに必要なサイクル数のことである。また、組換え遺伝子の Cq 値から Le1 遺伝子の Cq 値を引いて求められる値が ΔCq 値である。さらに、各サンプルの ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差が $\Delta \Delta Cq$ 値であり、 $\Delta \Delta Cq$ 値がマイナスの場合は陽性、 $\Delta \Delta Cq$ 値がプラスの場合は陰性と判定する。

検体 1 については、Le1 遺伝子は 2 並行のサンプルで共に増幅が確認され、P35S 遺伝子についても 2 並行のサンプルで共に増幅が確認された。一方、RRS2 遺伝子は 2 並行のサンプルで共に増幅が確認されず、ネガティブコントロール (以下「NTC」と表記する。) については 3 つの遺伝子全てで増幅が確認されなかった。また、標準試料液は 3 つの

*1 現 下水道河川局事業推進部新川水処理センター

遺伝子全てについて増幅が確認された。本検体で増幅が見られた P35S 遺伝子は、解析の結果陰性と判定された (表 1)。

表 1 : 検体 1 の解析結果

Cq	1-1		1-2		標準試料液	
	1	2	1	2	1	2
Le1	25.432	25.505	25.428	25.657	23.515	23.696
P35S	34.249	35.114	34.598	34.532	32.133	32.303
RRS2	/	/	/	/	32.763	33.167

ΔCq	1-1		1-2		標準試料液	
	1	2	1	2	1	2
P35S	8.817	9.609	9.170	8.875	8.618	8.607
RRS2	/	/	/	/	9.248	9.471

$\Delta \Delta Cq$	1-1		1-2	
	1	2	1	2
P35S	0.202	0.994	0.555	0.260
RRS2	/	/	/	/
P35S 判定	陰性	陰性	陰性	陰性
RRS2 判定	陰性	陰性	陰性	陰性

(斜線は遺伝子の増幅がなかったことを示す)

検体 2 については、Le1 遺伝子は 2 並行のサンプルで共に増幅が確認された。一方、P35S 遺伝子、RRS2 遺伝子は 2 並行のサンプルで共に増幅が確認されず、NTC については 3 つの遺伝子全てで増幅が確認されなかった。また、標準試料液は 3 つの遺伝子全てについて増幅が確認された (表 2)。

表 2 : 検体 2 の解析結果

Cq	1-1		1-2		標準試料液	
	1	2	1	2	1	2
Le1	26.039	25.932	24.797	24.847	21.829	21.957
P35S	/	/	/	/	31.263	31.018
RRS2	/	/	/	/	33.485	33.593

ΔCq	1-1		1-2		標準試料液	
	1	2	1	2	1	2
P35S	/	/	/	/	9.434	9.061
RRS2	/	/	/	/	11.656	11.636

$\Delta \Delta Cq$	1-1		1-2	
	1	2	1	2
P35S	/	/	/	/
RRS2	/	/	/	/
P35S 判定	陰性	陰性	陰性	陰性
RRS2 判定	陰性	陰性	陰性	陰性

(斜線は遺伝子の増幅がなかったことを示す)

4. 結 語

検体 1 では P35S 遺伝子の増幅がみられたものの、検体 1、2 共にどちらの組換え遺伝子においても陰性と判定された。また、どちらの検体についても Le1 遺伝子及び標準試料液は増幅がみられ、NTC では増幅がみられなかった。

検体 1 で P35S 遺伝子の増幅がみられたのは、P35S 遺伝子が LLS 遺伝子と RRS 遺伝子に共通する配列であり、検体 1 に RRS 遺伝子が定量試験における下限である 0.2%未満の割合で含まれていたためと考えられる。今回検討した試験法の検出限界は 0.1%程度と報告があり³⁾、増幅対象は認められたものの陰性と判定されたと考えられる。

以上のことから、目的遺伝子は正常に増幅していると考えられ、さらに試験精度の確認を経た上で、この新試験法の導入が可能となる。今後は組換え率が検出限界付近の検体を使用し、試験法の精

度確認を行っていく。

5. 文 献

- 1) 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_220329_01.pdf (令和5年10月16日閲覧)
- 2) 厚生労働省：令和3年9月15日消食表初第389号「食品表示基準について」の一部改正について
- 3) 地方衛生研究所全国協議会主催：令和4年度衛生理化学分野研修会（令和5年2月2日開催）
演題5 新たな遺伝子組み換え食品（ダイズ、トウモロコシ）の表示に関わる新公定法について