

遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 および Bt10 系統の 検査法の技術検討と評価

佐藤 眞耶 鳥居 潤 宇野 玲子

Technical Examination and Evaluation of a Detection Method for Genetically Modified Maize CBH351 and Bt10 Strains

Maya SATO Jun TORII Reiko UNO

要 旨

現在、当研究所では「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」（厚生労働省健康・生活衛生局長通知、令和 6 年 3 月 28 日、健生発 0328 第 1 号、以下「通知法」という。）に基づき、遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 および Bt10 系統の検査をコンベンショナル PCR および電気泳動で実施している。本検査法について作業効率の改善を目的に、インターカレーターを用いたリアルタイム PCR による検出方法を検討した。通知法に規定されたプライマー対を使用して特性の異なる 4 種類の蛍光色素含有 PCR 試薬を比較したところ、TB Green Premix Ex Taq II（タカラバイオ（株））を用いた際に最も感度が高いことが確認された。リアルタイム PCR 条件は各試薬メーカーの推奨条件を参考に検討を行い、伸長反応温度は 62℃、DNA 試料液の添加量は 2 μ L を採用した。異なる 3 日間の試験において再現性は良好であることを確認し、今回検討した方法は通知法のスクリーニング検査として有用であり検査時間の短縮と効率化が期待できることが示唆された。

キーワード：リアルタイム PCR、インターカレーター法、遺伝子組換えトウモロコシ、CBH351、Bt10

Keywords: Real-time PCR, Intercalator method, Genetically modified maize, CBH351, Bt10

はじめに

食料自給率がカロリーベースで 4 割ほどの日本は食品の多くを海外からの輸入に依存している。他方で海外では植物病害虫の被害や人口増加等を背景に食品の安定的な供給が求められており、農業面積当たりの収穫量の増加が見込める遺伝子組換え農作物の需要が高まっている¹⁾。害虫抵抗性や除草剤耐性など様々な特性を持つ遺伝子組換え農作物の開発が世界各国で進められており、なかでも害虫抵抗性の遺伝子組換えトウモロコシは収穫量の増加をもたらしている²⁾。遺伝子組換え農作物の栽培が世界的に拡大し国内への流通等が予想されるなか、日本では食品衛生法に基づき内閣総理大臣が定める安全性審査の手続を経た旨の公表がなされたものでなければ流通等が認められていないことが「食品、添加物等の規格基準」（厚生省告示、昭和 34 年 12 月 28 日、第 370 号）に規定されている。害虫抵抗性と除草剤耐性を獲得した遺伝子組換えトウモロコシのうち CBH351 および Bt10 系統は、安全性審査が行われていないことから流通等が認められておらず、発見時には回収等迅速な対応が必要となる。検査法は厚生労働省が定める方法（厚生労働省健康・生活衛生局長通知、令和 6 年 3 月 28 日、健生発 0328 第 1 号、以下「通知法」という。）に基づき個別に標準化されており、当研究所では通知法に基づいてコンベンショナル PCR および電気泳動で検査を実施している。本検査法について作業効率に改善の余地があると考え、遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 および

Bt10 系統に対して、リアルタイム PCR を用いた検出法の技術評価を行ったので報告する。

材料と方法

1. 通知法における感度の確認

1-1. DNA 試料液

CBH351 および Bt10 系統の GM トウモロコシ系統別 DNA 陽性コントロールプラスミド（（株）ニッポン・ジーン、以下「PC」という。）を滅菌蒸留水で 10^{10} 倍まで 10 倍段階希釈したものを DNA 試料液とした。

1-2. コンベンショナル PCR

プライマー対の塩基配列、反応液の調製方法および PCR サイクル条件は通知法に準拠し、PCR 装置は Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700（サーモフィッシュャーサイエンティフィック（株））を使用した。

1-3. 電気泳動

コンベンショナル PCR で増幅した DNA 試料液 7.5 μ L をアガロースゲル電気泳動により分離し、遺伝子増幅バンドを検出した。アガロースゲルは核酸染色試薬があらかじめ添加されたミドリグリーン Advance アガロースタブレット（日本ジェネティクス（株））に滅菌蒸留水で 50 倍希釈した 50xTAE（（株）ニッポン・ジーン）を加えて 3% となるように加熱溶解して作製した。DNA 分子量標準として 20 bp DNA Ladder（タカラバイオ（株））を用い、電気泳動装置

（令和 6 年 12 月 25 日受理）

は Mupid-2plus (タカラバイオ (株))、ゲルイメージ解析装置は AE-6911CX プリントグラフ (アトー (株)) を使用した。

1-4. 結果の判定

結果の判定は CBH351 および Bt10 系統ともに通知法に準拠した。すなわち CBH351 系統では、陽性対照用プライマー対、組換え遺伝子検出用プライマー対および確認用プライマー対を用いた PCR 産物を泳動したレーンで、それぞれ 157 bp、170 bp、171 bp の位置に増幅バンドを目視で確認できた場合に検出可能と判定した。Bt10 系統では、陽性対照用プライマー対、組換え遺伝子検出用プライマー対および確認用プライマー対を用いた PCR 産物を泳動したレーンで、それぞれ 157 bp、117 bp、151 bp の位置に増幅バンドを目視で確認できた場合に検出可能と判定した。

2. リアルタイム PCR 検出法

2-1. DNA 試料液

CBH351 および Bt10 系統の PC を滅菌蒸留水で 10^5 倍まで 10 倍段階希釈したものを DNA 試料液とした。

2-2. リアルタイム PCR

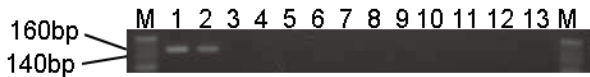
プライマー対の塩基配列は通知法に準拠し、リアルタイム PCR 装置は LightCycler 480 System II (ロシュ・ダイアグノスティックス (株)) を使用した。検出方法はインターカレーター法を採用し、蛍光色素含有 PCR 試薬は TB Green Premix Ex Taq (タカラバイオ (株))、TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ (株))、THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (東洋紡 (株)) および KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡 (株)) の 4 種類を使用した。

結果および考察

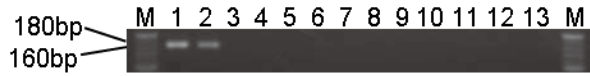
1. 通知法における感度の確認

通知法での感度を確認するため PC の希釈液を用いてコンベンショナル PCR および電気泳動を行った。CBH351 系統の電気泳動写真を図 1 に、Bt10 系統の電気泳動写真を図 2 に示す。CBH351 系統は、陽性対照用プライマー対および検出用プライマー対で 10^1 希釈段階、確認用プライマー対で 10^4 希釈段階、Bt10 系統はいずれのプライマー対でも 10^3 希釈段階まで検出した。

・陽性対照用プライマー対



・検出用プライマー



・確認用プライマー対

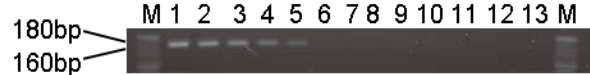
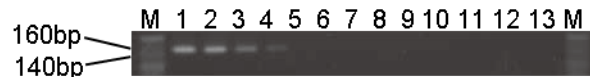


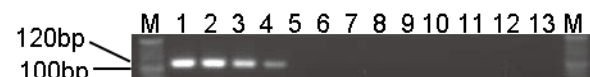
図 1. 通知法に基づく CBH351 系統検査法の感度の確認結果

1: 陽性コントロール、2~11: 陽性コントロールの 10 倍段階希釈液 (希釈倍率の低いものから順に $10^1 \sim 10^{10}$)、12: 滅菌蒸留水 (プライマー代用)、13: 滅菌蒸留水 (DNA 試料液代用)

・陽性対照用プライマー対



・検出用プライマー対



・確認用プライマー対

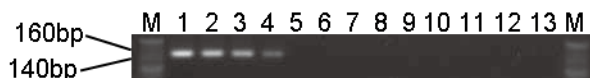


図 2. 通知法に基づく Bt10 系統検査法の感度の確認結果

1: 陽性コントロール、2~11: 陽性コントロールの 10 倍段階希釈液 (希釈倍率の低いものから順に $10^1 \sim 10^{10}$)、12: 滅菌蒸留水 (プライマー代用)、13: 滅菌蒸留水 (DNA 試料液代用)

2. リアルタイム PCR 検出法

2-1. 蛍光色素含有 PCR 試薬の検討

リアルタイム PCR による検出を試みるため、TB Green Premix Ex Taq、TB Green Premix Ex Taq II、THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix および KOD SYBR qPCR Mix の 4 種類の蛍光色素含有 PCR 試薬を検討した。

各説明書等に記載された推奨条件を参考に、反応液を表 1

表 1. リアルタイム PCR における試薬別の反応液調製量 (μL)

試薬	TB Green Premix Ex Taq [※]	TB Green Premix Ex Taq II [※]	THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix [※]	KOD SYBR qPCR Mix [※]
Fプライマー(25μM)	0.16	0.32	0.24	0.16
Rプライマー(25μM)	0.16	0.32	0.24	0.16
DNA試料液	2.5	2.5	2.5	2.5
滅菌蒸留水	7.18	6.86	7.02	7.18

※蛍光色素含有PCR試薬の添加量は全て10 μLとした。

表2. リアルタイム PCR における試薬別の PCR サイクル条件

ステップ		蛍光色素含有PCR試薬							
		TB Green Premix Ex Taq		TB Green Premix Ex Taq II		THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix		KOD SYBR qPCR Mix	
		温度 (°C)	時間 (秒)	温度 (°C)	時間 (秒)	温度 (°C)	時間 (秒)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期変性 増幅※	変性	95	30	95	30	95	30	98	120
	アニーリング	95	5	95	5	95	5	98	10
	伸長	-	-	-	-	-	-	60	10
	融解曲線分析	60	30	60	30	60	30	68	30
		95	5	95	5	95	5	98	5
		60	60	60	60	60	60	60	60
		95	-	95	-	95	-	98	-

※増幅は50サイクルとした。

に示すとおり調製し、表2に示すPCRサイクル条件で試験を実施した。その結果、Cq値が得られ、かつAmplification plot上での指数関数的な増幅の確認ができたが、図3で示すように一部では融解曲線解析で目的産物とは異なるTm値の増幅産物が確認された。それらについては検出不能と判定したところ、検出できたPCの希釈濃度は表3のとおりとなった。TB Green Premix Ex Taq IIはCBH351およびBt10系統の全てのプライマー対において通知法の感度を満たすことができたため、本試薬を採用した。本試薬は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を高めたTaqポリメラーゼを使用しており、DNA増幅時に十分な校正が行われることで増幅エラーが起りにくくなり目的産物以外の生成が抑制されたことから、通知法の感度を満たすプライマー対が多くなったと考える。一方、KOD SYBR qPCR Mixを用いた場合、ほぼ全ての希釈濃度でCq値とAmplification plot上での指数関数的

な増幅が認められたが、低濃度ではTm値が目的産物のものとは異なり、通知法の感度を満たさないプライマー対が多くなった。これは試薬が3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を除去することでDNAの合成能を高め、長鎖やGC含有率の高いDNAの複製にも適用させたものであることから³⁾、今回の検討では増幅エラーによって目的産物以外の生成が起りにやすくなったと考えた。また、それ以外にもDNAポリメラーゼ以外の試薬組成の違いやPCR温度条件の違いが感度の違いに影響したものと考えられた。

2-2. リアルタイム PCR 条件の検討

目的産物以外の生成の抑制や感度の上昇を目指し、DNA試料液の添加量をBt10系統の通知法と同量の5μLと、試薬説明書の例に記載されていた2μLに変更し、TB Green Premix Ex Taq IIを用いてリアルタイムPCRを行った。その結果は表4に示すとおり、2μLでは目的産物以外の生成抑制や感度上昇はなかったものの2.5μLと同様にCBH351およびBt10系統の全てのプライマー対で通知法の感度を満たすことができたため、DNA試料液の使用量がより少ない2μLを採用した。DNA試料液を5μLとした場合に感度が悪くなった原因としてDNA試料液の添加量を増やしたことで試薬組成に影響したと考えたが、DNA試料液は滅菌蒸留水で希釈したPCを用いており、反応液の量の調整にも滅菌蒸留水を用いていることから、試薬組成への影響は考えにくい。同様にDNA試料液由来のPCR阻害物質が原因である可能性は低く、原因は特定できなかった。

PCR温度条件についても、Bt10系統の通知法と同様に伸

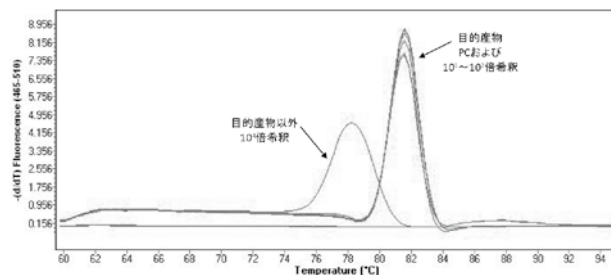


図3. リアルタイム PCR での融解曲線解析結果（試薬：TB Green Premix Ex Taq、プライマー対：CBH351 系統検出用プライマー対）

表3. リアルタイム PCR における試薬別の検出可能な最大希釈倍率

検出項目		蛍光色素含有PCR試薬				通知法の感度
		TB Green Premix Ex Taq	TB Green Premix Ex Taq II	THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix	KOD SYBR qPCR Mix	
CBH351	陽性対照用プライマー対	10 ¹	10 ¹	10 ¹	—	10 ¹
	検出用プライマー対	10 ²	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹
	確認用プライマー対	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ⁴
Bt10	陽性対照用プライマー対	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³
	検出用プライマー対	10 ²	10 ³	10 ²	10 ²	10 ³
	確認用プライマー対	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	10 ³

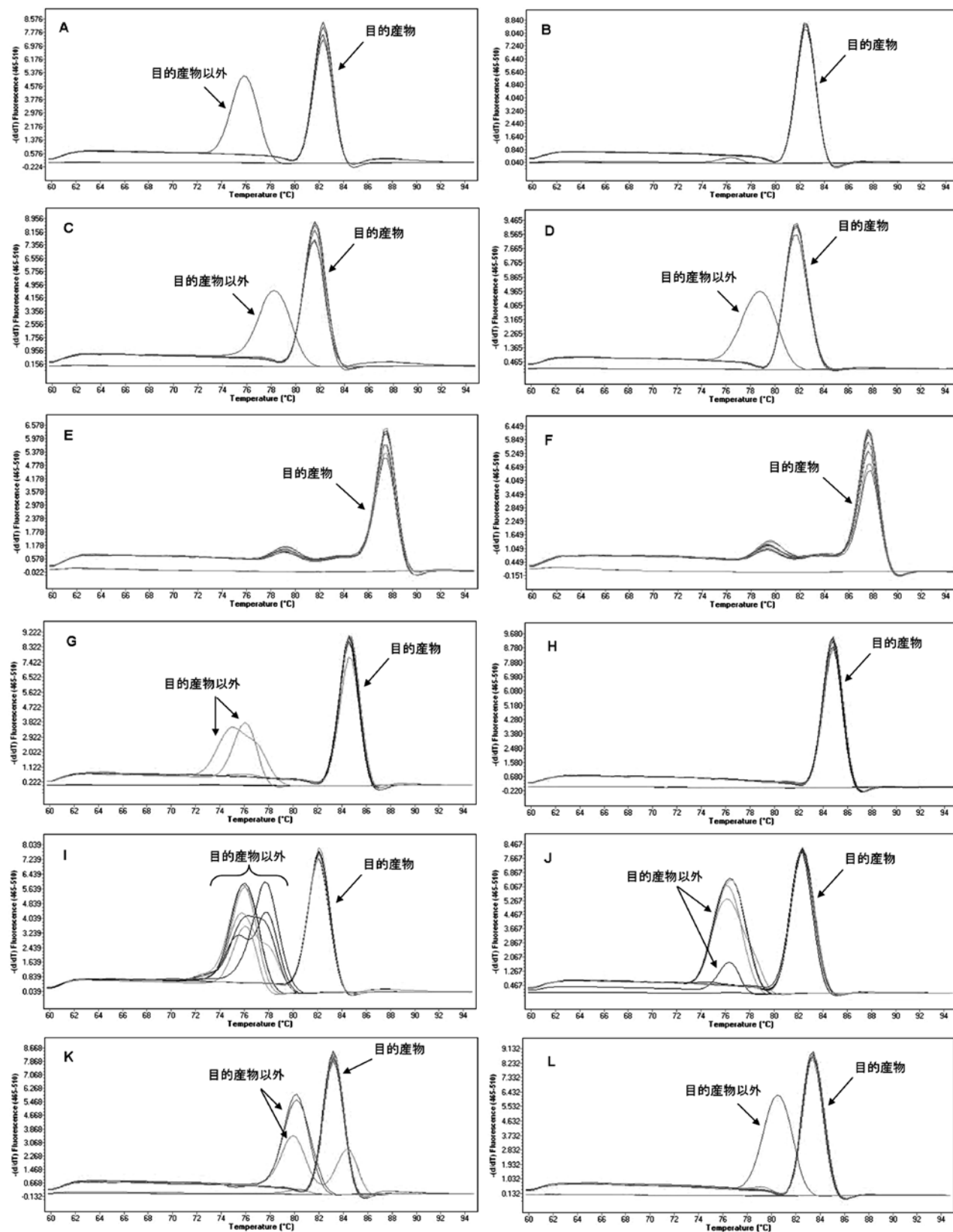


図4. リアルタイム PCR での伸長反応温度別の融解曲線解析結果 (左図: 60°C、右図: 62°C)

A, B: CBH351 系統陽性対照用プライマー対、C, D: CBH351 系統検出用プライマー対、E, F: CBH351 系統確認用プライマー対、G, H: Bt10 系統陽性対照用プライマー対、I, J: Bt10 系統検出用プライマー対、K, L: Bt10 系統確認用プライマー対

表4. リアルタイム PCR における DNA 試料液添加量別の検出可能な最大希釈倍率

検出項目	DNA試料液の添加量			通知法の感度
	2 μ L	2.5 μ L	5 μ L	
CBH351	陽性対照用プライマー対	10 ¹	10 ¹	10 ¹
	検出用プライマー対	10 ¹	10 ¹	10 ¹
	確認用プライマー対	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
Bt10	陽性対照用プライマー対	10 ³	10 ³	10 ³
	検出用プライマー対	10 ³	10 ²	10 ³
	確認用プライマー対	10 ³	10 ²	10 ³

表5. リアルタイム PCR による再現性の確認結果 (Cq 値)

DNA試料液	CBH351			Bt10		
	陽性対照用 プライマー対	検出用プライマー対	確認用プライマー対※	陽性対照用 プライマー対	検出用プライマー対	確認用プライマー対
1日目						
10 ⁵ 倍	- / -	- / -	37.61 / 35.49	- / -	- / -	- / -
10 ⁴ 倍	- / -	- / -	31.87 / 32.10	- / 35.28	- / -	- / -
10 ³ 倍	35.70 / -	- / -	28.02 / 28.47	33.44 / 32.94	34.12 / 33.17	33.63 / 34.94
10 ² 倍	34.27 / -	- / 35.74	24.49 / 24.62	28.59 / 28.34	29.15 / 28.92	28.66 / 28.83
10 ¹ 倍	32.18 / 32.75	33.83 / 32.76	20.72 / 20.81	24.98 / 24.71	25.45 / 25.46	24.88 / 25.00
PC	29.11 / 28.82	29.86 / 29.92	17.27 / 17.35	21.62 / 21.51	21.81 / 21.75	21.49 / 21.55
2日目						
10 ⁵ 倍	- / -	- / -	36.30 / 36.68	- / -	- / -	- / -
10 ⁴ 倍	- / -	- / -	31.88 / 32.14	- / -	34.85 / 34.84	34.60 / 34.69
10 ³ 倍	- / -	- / -	27.97 / 28.27	30.72 / 31.13	30.89 / 31.17	30.69 / 30.50
10 ² 倍	34.24 / -	- / -	24.11 / 24.15	27.31 / 27.50	27.82 / 27.79	27.68 / 27.34
10 ¹ 倍	32.29 / 32.30	33.16 / 33.30	20.51 / 20.35	24.43 / 24.49	24.99 / 24.92	24.69 / 24.64
PC	28.89 / 28.91	30.43 / 29.96	17.09 / 17.13	21.22 / 21.20	21.76 / 21.73	21.49 / 21.52
3日目						
10 ⁵ 倍	- / -	- / -	36.76 / -	- / 34.76	- / -	- / -
10 ⁴ 倍	- / -	- / -	33.59 / 33.44	- / 32.98	- / -	35.27 / -
10 ³ 倍	- / -	- / -	28.76 / 29.04	32.58 / 31.63	32.34 / 31.91	32.16 / 33.89
10 ² 倍	33.49 / -	- / -	24.74 / 24.74	28.19 / 28.25	28.52 / 28.66	28.48 / 28.65
10 ¹ 倍	33.30 / 33.54	33.77 / 34.29	20.93 / 20.89	24.72 / 24.68	25.28 / 25.09	24.95 / 24.89
PC	28.85 / 29.28	29.99 / 29.98	17.58 / 17.63	21.52 / 21.55	21.97 / 21.95	21.81 / 21.89

※非特異的PCR産物の生成が確認され、最終的な遺伝子増幅の確認には電気泳動による確認が必要となった。

長反応温度を 62℃ に変更して増幅を行ったところ、感度上昇は認められなかったものの図 4 に示すとおり目的産物以外の生成が抑制できた。また、CBH351 および Bt10 系統ともに全てのプライマー対で通知法の感度を満たしたため 62℃ を採用した。目的産物以外の生成が抑制できた原因は、伸長反応温度を上昇させたことによる反応特異性の向上と考えられた。

図 4 (E, F) に示すように、前述の検討条件ではいずれも CBH351 系統の確認用プライマー対で非特異的 PCR 産物の生成が確認され、最終的な遺伝子増幅の確認には電気泳動による確認が必要となった。しかし、通知法では検出用プライマー対で遺伝子の増幅が認められない場合には同一抽出液からの確認用プライマー対での検査を不要としていることから、通常の検査では確認用プライマー対での検査まで必要になる事例は少ないことが予想される。

採用したリアルタイム PCR 条件での検査法の再現性を確認するため、異なる 3 日間で繰り返し試験を行った。その結果、表 5 に示すとおり 3 日間とも CBH351 および Bt10 系統の全てのプライマー対で通知法の感度を満たした。CBH351 系統の確認用プライマー対では最終的な確認に電気泳動が必要となるが、検査が必要になる事例は少ないことが予想され

るため、今回検討した方法は通知法のスクリーニング検査として有用であり検査時間の短縮と効率化が期待できることが示唆された。今後の課題として、非特異的 PCR 産物が確認された CBH351 系統の確認用プライマー対について、リアルタイム PCR 条件のさらなる検討が求められる。また、今後は実検体を用いた通知法との比較データの収集を行うことでスクリーニング検査としての精度を検証していきたい。

引用文献

- 1) 川口健太郎, 安倍史高. 2010. 遺伝子組換え技術の農作物への利用に関するこれまでの情勢と 2008 年における動向. 作物研究所研究報告, 11, 17-30
- 2) Brookes G. 2022. GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2020. PG Economics Ltd, Dorchester, UK.
- 3) 北林雅夫, 小松原秀介, 今中忠行. 2015. 超好熱菌由来の新規 DNA ポリメラーゼの発見とその産業利用. 化学と生物, 53 (12), 866-871