

ラウンドアップ・レディ・大豆の定量PCRによる含有率測定 ～ 定量限界の検討 ～

扇谷陽子 相澤 博 大川一美 藤田晃三

要 旨

リアルタイム定量PCR装置のABI PRISM 7000 Sequence Detection systemを用い厚生労働省通知の測定方法でラウンドアップ・レディ・大豆 40-3-2系統 (RoundUp Ready™ Soybean, 以下RRSと略) の含有率の測定を行う際の当所における定量限界を把握する目的で、標準プラスミド及びRRS含有大豆粉末を用いて作物由来及び組換え体由来部位のリアルタイム定量PCRを行った。

標準プラスミド溶液及び調整試料を用い、通知の方法で作物由来及び組換え体由来DNAのリアルタイム定量PCRを行った結果、62.5コピー相当以上での併行精度 (Repeatability Relative Standard Deviation, RSDr) が25%以下であった。

RRSをおよそ0.1～5.0%含有する大豆粉末から抽出したDNA 50ng (n=2) を用い、通知による方法で定量した結果、組換え体由来のコピー数が63以上であったのは、0.5%以上含有している場合であった。

抽出DNAでの測定内の変動を調べるため、0.5%及び5.0%RRS含有大豆DNAを同時に定量 (n=12) した結果、作物由来と組換え体由来DNAのコピー数の相対標準偏差 (Relative Standard Deviation、以下RSDと略) は、0.5%RRS含有大豆DNAは4.1%と10.5%、5.0%RRS含有大豆DNAは7.3%と7.6%であった。測定間の変動を調べるため、0.5～5.0%RRS含有大豆DNAを3重測定の平均値を測定値とし3回繰り返し測定した結果、作物由来及び組換え体由来DNAのコピー数と含有率のRSDは全て25.0%以下であった。

以上の結果により、十分均一化された試料においてRRS含有率0.5%まで測定可能と判断された。

1. 緒 言

世界的に遺伝子組換え作物の作付けが増加している。国内では、平成13年4月から遺伝子組換え作物を使用した食品の表示制度が実施され、5%以下の意図しない混入を除き、一定の食品への表示が義務付けられた。そして、表示の適切性を確認する方法としてリアルタイム定量PCR法¹⁾が示された。この方法におけるラウンドアップ・レディ・大豆 40-3-2系統 (RoundUp Ready™ Soybean, 以下RRSと略) の大豆穀粒中の含有率測定に関する定量限界については、光源にレーザー光線を用いるABI

PRISM 7700 Sequence Detection system(以下ABI 7700と略)による共同実験(collaborative trial)の結果0.1%との報告²⁾がある。一方当所で使用しているABI PRISM 7000 Sequence Detection system(以下ABI 7000と略)はタングステンハロゲンランプを用いる装置であり、共同実験の報告がない。そこで、当所測定における定量限界を把握することを目的として、標準プラスミド及びRRS含有率既知の大豆粉末より抽出したDNAのリアルタイム定量PCRを行ったので、その概要を報告する。

2. 材料と方法

2-1 試料

0.1 ~ 5.0 % RRS 含有大豆粉末は EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE, Institute for Reference Materials and Measurements 製 CRMs (Certified Reference Materials) IRMM-410S-1 ~ 5 を用いた。

製品中のRRS含有量は表1に示すとおりである。

表 1 IRMM-410S中のRRS含有量

製品名	100gの大豆粉中のRRS量 (g)
IRMM-410S-1	0.1±0.05
IRMM-410S-2	0.5±0.10
IRMM-410S-3	1.0±0.2
IRMM-410S-4	2.0±0.3
IRMM-410S-5	5.0±0.6

2-2 試薬

(1)標準プラスミド：

(株)ニッポンジーン製GMダイズ (RRS) プラスミドセット-ColE1/TE-を用いた。この製品は後述するプライマーにより増幅される作物由来DNA及び組換え体由来DNAの領域を含有し、制限酵素処理された直鎖状プラスミドで、構成は表2のとおりである。

表 2 GMダイズ (RRS) プラスミドセットの構成

試薬名	含有量
ColE1/TE Solution	ColE1 5ng/μl
Soy-ColE1/TE-20	20コピー/2.5μl
Soy-ColE1/TE-125	125コピー/2.5μl
Soy-ColE1/TE-1.5K	1,500コピー/2.5μl
Soy-ColE1/TE-20K	20,000コピー/2.5μl
Soy-ColE1/TE-250K	250,000コピー/2.5μl

(2)プライマー：

通知¹⁾に示されたファスマック(株)社製Le1-n02-5' & 3' (各 25 μmol/L 混合溶液) 及び RRS-01-5' & 3' (各 25 μmol/L 混合溶液) を用いた(下記)。塩基配列³⁾は以下に示すとおりで、Le1-n02-5' & 3' は大豆に存在する糖結合性タンパクのレクチンをコ

ードするDNAの一部を、RRS-01-5' & 3' はRRSに組込まれたDNAのうちCTPとCP4 EPSPSおよび結合部の一部を増幅するプライマーである。

作物由来DNA

Le1-n02-5' GCC CTC TAC TCC ACC CCC A

Le1-n02-3' GCC CAT CTG CAA GCC TTT TT

増幅長 118bp

組換え体由来DNA

RRS-01-5' CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG

RRS-01-3' GAC TTG TCG CCG GGA ATG

増幅長 121bp

(3)プローブ：

通知¹⁾に示された塩基配列³⁾が以下に示すところのファスマック(株)製Le1-Taq (10 μmol/l 溶液) 及びRRS-Taq(10 μmol/l 溶液)を用いた。

作物由来DNA

Le1-Taq

5' FAM-AGC TTC GCC GCT TCC TTC AAC TTC AC-TAMRA 3'

組換え体由来DNA

RRS-Taq

5' FAM-CGC AAC CGC CCG CAA ATC C-TAMRA 3'

(4)その他の試薬：

試薬は以下のものを用いた。エタノール〔和光純薬工業(株)製残留農薬用〕、塩酸・2-プロパノール・3-メチル-1-ブタノール・クロロホルム・塩化ナトリウム(同社製試薬特級)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン・SDS(同社製生化学用)、臭化セチルトリメチルアンモニウム(以下CTABと略)(シグマ社製)、フェノール：クロロホルム：3-メチル-1-ブタノール = (25:4:1) 溶液(以下PCIと略)〔(株)インビトロジェン製〕、0.5mol/L EDTA(pH8.0 遺伝子工学用)・TE緩衝液〔10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)・1mmol/L EDTA(pH8.0)〕〔(株)ニッポンジーン製〕、RNase A(キアゲン社製)、Taqman Universal PCR Master Mix〔アプライドバイオシステムズ(株)製〕

CTAB 緩衝液は、ビーカーで 1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 20ml と 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 8ml 及び 5mol/L 塩化ナトリウム溶液 56ml を混合後、約 150ml となるように水を加え、攪拌しながら CTAB 4g を加えて完全に溶解し、精製水を加えて 200ml とし、オートクレーブで滅菌して使用した。

2-3 装置

(1) 遠心濃縮機：エペンドルフ製

遠心濃縮機 5301

(2) 遠心分離機：(株)久保田製作所製 3700型

(3) 微量分光光度計：アマシャムファルマシアバイオテック製 GeneQuant pro

(4) ウォーターパス：タイテック製ウォーターバスシェイカーパーソナル11

(5) 定量PCR装置：アプライドバイオシステムズ製 ABI PRISM 7000 Sequence Detection system

2-4 測定方法

DNA の抽出は通知¹⁾のうち CTAB を用いて抽出する方法に準じた。試料 1g に CTAB 緩衝液 22.5ml を加え、激しく攪拌後 55℃ で 30 分間振とうし、この溶液 600 μl に PCI 500 μl を加えて攪拌後 7,500 × g で 15 分間遠心し、水層を分取し、これにクロロホルム：3-メチル-1-ブタノール = (24:1) (以下 CIA と略) 500 μl を加えて攪拌後 7,500 × g で 15 分間遠心した。さらに水層を分取し、等容量の 2-プロパノールを加え、攪拌後 7,500 × g で 10 分間遠心し、上澄み液を捨て 70% エタノール溶液 500 μl を加えて 7,500 × g で 1 分間遠心し、沈殿に触らないようにしてエタノールを捨て、真空乾燥させた。これを TE 緩衝液 50 μl で溶解し RNase A 5 μl を加え 37℃ で 30 分間振とうし、CTAB 緩衝液 200 μl と CIA 250 μl を加えミキサーで懸濁し 7,500 × g で 15 分間遠心後、水層を分取した。これに 2-プロパノールを 200 μl 加え、攪拌後 7,500 × g で 10 分間遠心し、上澄み液を捨て 70% エタノール溶液 200 μl を加えて 7,500 × g で 1 分間遠心し、沈殿に触らないようにしてエタノールを捨て、真空乾燥させ、TE 緩衝液 50 μl を加え 4 晩放置して溶解させ、

260nm の吸光度から濃度を算出し、TE 緩衝液で 20ng/μl に希釈して DNA 試料液とした。なお、サンプル量について、通知では 2g であるが、使用した製品は 1g/包装だったため 1g に減じ、抽出液量を通知の半量の 22.5ml に減じた。

上記により得られた DNA を用い、表 3 に示す組成の反応液を作成し、図 1 の条件でリアルタイム定量 PCR を行った。結果の解析は、JAS 分析ハンドブック⁴⁾に準じ、全ての標準プラスミドが望ましい増幅を行っている一定の蛍光強度に到達する PCR の回数と標準プラスミドのコピー数を用いて標準曲線を作成し、試料中の作物由来及び組換え体由来の DNA のコピー数を算出した。さらに以下の式から含有率を算出した。

$$\text{RRS 含有率 (\%)} = \left[\frac{\text{組換え体由来 DNA コピー数}}{\text{作物由来 DNA コピー数} \times 0.95 (\text{内標比})} \right] \times 100$$

表 3 定量 PCR の反応液の組成

溶 液	容量(μl)
DNA 試料溶液 (20ng/μl) 又は標準プラスミド	2.5
プライマー対溶液 (各プライマー 25μmol/L)	0.5
プローブ溶液 (10μmol/L)	0.5
滅菌精製水	9.0
Taqman Universal PCR Master Mix	12.5
Total	25.0

50	2 min	} 45回
95	10min	
95	30sec	
59	1 min	

図 1 定量 PCR の反応条件

3. 結 果

3-1 標準プラスミドの再現性

表 2 に示す標準プラスミドセット及び CoIE1/TE Solution と Soy-CoIE1/TE-20、Soy-CoIE1/TE-20 と Soy-CoIE1/TE-125 の等量混合溶液 (10 コピー - 及び 72.5 コピー / 2.5 μl 相当) について n=12 で定量 PCR を行いコピー数の相対標準偏差 (Relative Standard Deviation、以下 RSD と略) を調べた。これを 3 回繰り返す。

返した結果は、表4に示すとおりであった。なお、結果は装置が感知した数値を定量限界を考慮せずに使用した。また、組換え体由来部位の10コピー/2.5µl相当について、3回中1回で12検体中1検体が感知されず、これについてのみ、残り11検体の平均とRSDとした。

さらにCoIE1/TE溶液と125コピー/2.5µlの等量混合溶液(62.5コピー/2.5µl相当)を2試料調整し、n=15で同様に定量し、RSDを調べた。結果は表5に示すとおりであった。

表4 標準プラスミドのRSD
(n = 12, 3回繰り返し)

増幅部位	コピー数	RSD (%) の範囲
作物由来	(10)	48.2 ~ 64.9
	20	23.4 ~ 47.4
	(72.5)	17.1 ~ 21.7
	125	15.5 ~ 21.0
	1,500	8.3 ~ 10.3
プライマー : Le1-n02	20,000	7.5 ~ 10.1
	250,000	4.3 ~ 5.8
	(10)	53.4 ~ 67.8
組換え体由来	20	28.1 ~ 42.7
	(72.5)	10.0 ~ 24.0
	125	14.4 ~ 19.6
プライマー : RRS-01	1,500	9.7 ~ 12.9
	20,000	8.9 ~ 12.5
	250,000	4.4 ~ 7.2
	(10)	53.4 ~ 67.8

表5 標準プラスミドのRSD
(n = 15)

増幅部位	コピー数	RSD (%)
作物由来	(62.5)	24.5
	(62.5)	21.8
組換え体由来	(62.5)	16.9
	(62.5)	22.4

3-2 RRS含有大豆粉末抽出DNAの測定

RRSを0.1~5.0%含有する大豆粉末IRMM 410S-1~5から抽出したDNAを用いて、定量PCRを行い、コピー数及び含有率を調べた(n=2)。通知に従い3重測定の平均値を測定値とした結果は、表6に示すとおりであった。なお、この測定においても結果は装置が感知した数値を定量限界を考慮せずに使用した。

3-3 RRS含有大豆粉末抽出DNAの再現性

IRMM 410S-2~5から抽出したDNAを用いて、測定内と測定間の変動を調べた。

測定内についてはIRMM410S-2及び5から抽出したDNAを用いてn=12で測定した。結果は表7に示すとおりであった。

測定間についてはIRMM 410S-2~5から抽出したDNAを用いて3重測定した平均値を測定値とし、3回繰り返し返した。結果は表8に示すとおりであった。

表6 RRS含有大豆粉末抽出遺伝子の測定

大豆 100g 中の RRS量(g)	作物由来部位 コピー数	組換え体由来部位 コピー数	RRS 含有率 (%)
0.1±0.05	18,000	23	0.1
0.1±0.05	11,000	10	0.1
0.5±0.10	16,000	92	0.6
0.5±0.10	22,000	95	0.5
1.0±0.2	25,000	250	1.1
1.0±0.2	24,000	190	0.8
2.0±0.3	13,000	220	1.8
2.0±0.3	19,000	340	1.9
5.0±0.6	16,000	550	3.6
5.0±0.6	16,000	610	4.0

表7 測定内の再現性
(n = 12)

大豆 100g 中の RRS 量(g)	作物由来部位 コピー数 mean ± SD ()内 RSD	組換え体由来 部位コピー数 mean ± SD ()内 RSD	RRS の 含有率 (%)
0.5±0.10	24,000 ± 980 (4.1%)	82 ± 8.6 (10.5%)	0.4
5.0±0.6	16,000 ± 1,200 (7.3%)	550 ± 42 (7.6%)	3.6

表8 測定間の再現性
(n = 3)

大豆 100g 中の RRS 量(g)	作物由来部位 コピー数 mean ± SD ()内 RSD	組換え体由来 部位コピー数 mean ± SD ()内 RSD	RRS の 含有率 mean ± SD ()内 RSD
0.5±0.10	17,000 ± 580 (3.5%)	77 ± 13 (17.0%)	0.5 ± 0.1 (24.7%)
1.0±0.2	25,000 ± 1,200 (4.7%)	210 ± 20 (9.5%)	0.9 ± 0.1 (11.1%)
2.0±0.3	20,000 ± 580 (2.9%)	310 ± 36 (11.6%)	1.7 ± 0.3 (15.1%)
5.0±0.6	16,000 ± 580 (3.7%)	560 ± 31 (5.5%)	3.7 ± 0.3 (8.6%)

3-4 希釈試験

IRMM 410S-5から抽出した遺伝子を用いて、TE緩衝液を用いて2・4倍に希釈して定量した。結果は表9に示すとおりで、それぞれのコピー数は4倍希釈までほぼ直線的に変化し、その含有率はほぼ一定であった。

表9 希 釈 試 験

IRMM-410S-5	作物由来部位 コピー数	組換え体由来 部位コピー数	RRS 含有率 (%)
原液	15,000	530	3.7
2倍希釈	6,500	210	3.4
4倍希釈	3,700	130	3.7

4. 考 察

厚生労働省通知のリアルタイム定量PCR法¹⁾におけるRRSの大豆穀粒中の含有率測定に関する定量限界については、光源にレーザー光線を用いるABI 7700を用いた共同実験の結果0.1%との報告²⁾がある。一方当所で使用しているABI 7000はタングステンハロゲンランプを用いる装置であり、この装置での共同実験は報告されていない。そこで、当所測定における定量限界を把握することを目的として今回の検討を実施した。

遺伝子組換え作物の検査は、遺伝子組換え作物に関する正確なプロビジョンがないことや、この分野における方法論の実用的なアプリケーションに様々な困難があることから、CODEX COMMITTEEにおいて、遺伝子組換え作物の検査方法のバリデーションと精度管理について、国際的にコンセンサスのあるガイドラインの作成を検討している。この草案⁵⁾の中で、定量限界は、共同実験または単独施設のバリデーションにより容認できるレベルで精密かつ正確に測定できる最も低い濃度または量とし、判断基準(criteria)として、規格の1/10未満かつ併行精度(Repeatability Relative Standard Deviation, 以下RSDrと略) 25%以下としている。

ガイドライン検討の進行状況から判断すると、現在は草案であっても、考え方の骨子が大きく変わるとは考え難いので、この判断基準を満たす値を、入手可能な試料で求めるよう検討を進めることとした。

食品衛生法においては、分別管理をした上での意図しない混入については、5%を超えないとされていることから、定量限界は0.5%以下である必要がある。大豆(Glycine max)のゲノムサイズから推定される重量あたりのコピー数については200ngあたり82,000コピーとの報告⁶⁾がある。これに準じて0.5%定量するのに必要なコピー数を推定すると、通知¹⁾の測定方法ではDNAを50ng使用すること及びRRSにおける大豆ゲノムに対するRRS-01で増幅される挿入遺伝子の数は1と考えられていること³⁾から、100コピー程度となる。さらに、ガイドライン草案⁵⁾の中では正確度(accuracy)として±25%以内としていることを考慮すると少なくとも75コピー程度まで定量できる必要がある。

AOACの統計マニュアル⁷⁾のrepeatabilityの算出方法のうち、単独施設において複数試料で2回以上の反復測定を実施した場合の求め方に従うと、3-1の結果からRSDr ≤ 25%となるのは62.5コピー相当以上と判断される。3-2の結果から通知¹⁾の方法で大豆粉末から抽出したDNAにおいて、RRS-01プライマーにより増幅される遺伝子が63コピー以上であるのは0.5%以上RRSが含有されている場合に相当した。なお、RRSを含有している入手可能なCRMsには、0.1%と0.5%の間の割合がなかったため、この間は調べることができなかった。また、IRMM-410S-1~4の含有率は、含有量の中央値の±25%以内であった。IRMM-410S-5の含有率は、含有量が範囲で最も少ない4.4gであれば±25%以内であるものの中央値の5.0gであれば±25%をはずれる結果であった。この点については今後検討の必要があると考えている。3-3の結果より、RRSをおよそ0.5~5.0%含有するIRMM-410S-2~5から抽出したDNAでの測定内および測定間の変動が概ね25%以内であり、良

好な再現性であることが確認された。3-4の結果より、4倍までの希釈は結果にほとんど影響を及ぼさなかったことから、この範囲において測定が妨害物等の影響を受けていないと考えられ、定量に用いるコピー数がこの範囲で変動していても含有率に影響を及ぼさないと考えられた。

以上の結果から、十分に均一化された試料について、当所の装置及び技術の上で、RRS含有率0.5%以上が定量可能と判断された。なお、遺伝子組換え大豆の含有率を判断するには、サンプリングの方法と量が密接に関わっている。この観点での遺伝子組換え作物のサンプリングの具体的な方法については、統計的な手法を用いる推論の報告⁶⁾があるが、国際的な機関においてははまだ検討が続いている⁵⁾。遺伝子組換え大豆の含有率の判断には、これらの動向を見据えた上で、サンプリングの方法と量について検討する必要がある。

5. 結 語

RRS含有率測定を厚生労働省通知の方法で行った際の当所における定量下限を把握することを目的として、標準プラスミド及びRRS含有率既知の大豆粉末を用いて作物由来及び組換え体由来部位のリアルタイム定量PCRを行った。十分に均一化された試料については0.5%以上が定量可能と判断された。今後は、サンプリングの方法と量についても検討する必要がある。

6. 文 献

- 1)厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)、平成16年6月28日食安発第0628001号
- 2) Yoichiro, S. ; Hideo, K. ; Takeshi, M.; et al.: Validation of Real-time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. *J. AOAC Int.* **85(5)**, 1119-26, 2002.
- 3) Hideo, K. ; Yoichiro, S. ; Takeshi, M. ; et al.: Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. *J. AOAC Int.* **85(5)**, 1077-89, 2002.
- 4)独立行政法人 農林水産消費技術センター：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 改訂第2版 定量PCR編、平成14年6月20日
- 5)CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING: 25th Session, 8-12 March 2004, Criteria for the Methods for the Detection and Identification of Foods Derived from Biotechnology, General Approach and Criteria for the Methods.
- 6) Hübner, P.; Waiblinger, H.U.; Pietsch, K.; et al.: Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plant in Food. *J. AOAC Int.* **84(6)**, 1855-64, 2001.
- 7) Youden, W.J. ; Steiner, E.H.: Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists International. 1975.

Measurement of RoundUp Ready™ Soybean Using Real-time PCR ~Validation on Quantitative Limit ~

Yoko Ogiya, Hiromu Aizawa, Kazumi Okawa and Kozo Fujita

The quantitative limit of RoundUp Ready™ Soybean (RRS) contents in sufficiently mixed soybean flour by the Japanese official method using real-time PCR was evaluated using ABI PRISM 7000 Sequence Detection system. Two regions in soybean DNA (soy lectin gene and transgene) were amplified and RRS contents were calculated according to the manual. Results with commercial reference molecules indicated that relative standard deviation for repeatability (RSDr) was $\leq 25\%$ for more than 63 copies of each gene. Determination of DNAs from soybean flour containing 0.1~5.0% revealed that RRS contents more than 0.5% were equivalent to more than 63 copies of the transgene. To assess precision within assays, 12 independent measurements were carried out with soybean DNAs containing 0.5 or 5.0% RRS. Values of relative standard deviation (RSD) of copies from the lectine gene and the transgene were 4.1 and 10.5% for the 0.5% RRS-containing soybean DNA, and 7.3 and 7.6% for the 5.0% RRS-containing soybean DNA, respectively. To assess precision between assays, soybean DNAs containing 0.5~5% RRS were determined three times. RSD values of copies from the lectine gene and the transgene were 3.5~4.7% and 5.5~17.0%, respectively. RSD values of RRS-content was 8.6~24.7%. From these results, we concluded that the quantitative limit of RRS contents in sufficiently mixed soybean flour using the Japanese official method was 0.5% in our system.