

[成果情報名] 遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討

[要約] 新たに見出されたイネ内在性配列 SPS2 と既報の PLD2 は、他の既報 4 種のイネ内在性配列に比べて、PCR 反応効率、安定性、種得異性の面で優れている。GM 検知に適したイネ内在性配列を見出すことにより、信頼性の高い GM イネ検知法の開発が可能となる。

[キーワード] 遺伝子組換え、検知、イネ、PCR、種特異的

[担当] 食品安全信頼・信頼性確保

[代表連絡先] 電話 029-838-7991

[研究所名] 食品総合研究所・食品分析研究領域

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

我が国の GM 検知における標準分析法では、様々な作物種を対象に、PCR 技術を利用した検出法が数多く利用されている。その際、各作物種に特異的な内在性配列は、定性分析法においては、検出系が正しく機能していることを確認するためのポジティブコントロールとして利用され、混入率を算出する定量分析法では、リアルタイム PCR のリファレンスとして利用されている。内在性配列の要件は、その作物種に固有であり、かつ、種間のゲノムにおいて安定した数で含まれることである。今後、開発途上国を含む多くの国や地域において、GM イネの開発および栽培が広がる可能性があるが、既報のイネ内在性配列には、PCR の反応効率や種特異性といった点に若干の問題があり、より優れたイネ内在性配列の開発が求められている。本研究では、既報の 5 種類のイネ内在性配列に加えて、Sucrose Phosphate Synthase (SPS) 遺伝子のプロモーター領域に、新たなイネ特異的配列を見出し、それらの PCR 反応性や種間における特異性を評価している。

[成果の内容・特徴]

1. 既報の 5 種類のイネ内在性配列 (phospholipase D 遺伝子由来の 2 種類の配列: PLD1 および PLD2、SPS 遺伝子由来の配列: SPS1、gos9 遺伝子由来の配列: GOS9、および ppi-phosphofructokinase (ppi-PPF) 遺伝子由来の配列: ppi-PPF) に加え、本研究で新たに設計した SPS 遺伝子由来の配列: SPS2 の合計 6 種類のシングルコピー配列に関して、リアルタイム PCR 等を用い、反応効率、安定性、特異性等の性能比較が可能である。
2. ジャポニカ米、インディカ米を含む 28 品種のイネ種子を収集し、それぞれから DNA を抽出後、リアルタイム PCR で解析した結果から、SPS2 は PCR 反応効率を示す Ct 値が 6 種類中で最も小さく、反応効率の面で優れていることが示されている (表 1)。
3. イネ 28 品種間での 6 配列の PCR 反応の安定性を、F 検定により比較している。品種間のばらつきは、PLD2、SPS2、PLD1、ppi-PPF、GOS9、SPS1 の順に大きくなり、SPS1 および GOS9 は他の配列に比べて有意にばらつきが大きく、残りの 4 種類の配列のうち、SPS2 および PLD2 はさらにばらつきが小さいことが示されている (表 2)。
4. SPS2 の塩基配列は、解析に用いた 28 種類すべてのイネ品種において完全に保存されている (データは省略)。
5. イネ以外の作物 (トウモロコシ、ダイズ、コムギ、オオムギ) およびイネ近縁種 (アワ、ヒエ) から抽出した DNA を鋳型に定性的 PCR を行う種特異性確認実験から、PLD1 はイネ以外のイネ科作物においても増幅が見られるが、SPS2 および PLD2 の PCR 標的配列は、イネ特異的である (図 1)。

[成果の活用面・留意点]

1. GM イネ検知法の内在性配列として、SPS2 の標準分析法での利用を提案する。

[具体的データ]

表 1 イネ 28 品種を用いたリアルタイム PCR Ct 値の比較

	SPS2	PLD2	PLD1	ppi-PPF	GOS9	SPS1
平均値	22.23	22.36	22.46	22.93	23.00	28.56
ばらつき(分散)	0.040	0.040	0.043	0.048	0.122	0.304

閾値 (Threshold) は 0.2 に設定

表 2 イネ品種間における PCR 安定性の比較 (F 検定)

		SPS1	GOS9	ppi-PPF	PLD1	SPS2	PLD2
V1		0.304	0.122	0.048	0.043	0.040	0.040
V2							
SPS1	0.304	—	2.50	6.37	7.06	7.64	7.65
GOS9	0.122	—	—	2.55	2.55	3.05	3.06
ppi-PPF	0.048	—	—	—	1.11	1.20	1.20
PLD1	0.043	—	—	—	—	1.08	1.08
SPS2	0.040	—	—	—	—	—	1.00
PLD2	0.040	—	—	—	—	—	—

F=V2/V1 (F が 1.90 以上で有意差有り $\alpha=0.05$)

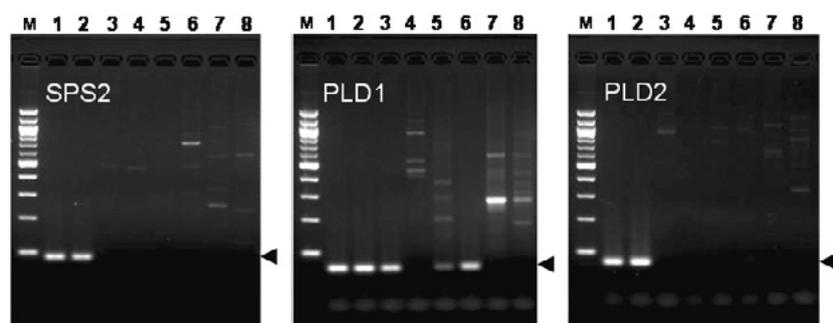


図 1 PCR 特異性の確認

レーン 1～8 はそれぞれ、1 赤米、2 黒米、3 トウモロコシ、4 ダイズ、5 アワ、6 ヒエ、7 コムギ、8 オオムギ由来のゲノム DNA を鋳型に用いた結果を示す。

M は分子量マーカー、矢印は目的の PCR 産物の位置を示す。

(高畠令王奈、真野潤一、橘田和美)

[その他]

中課題名：信頼性確保のための原材料・生産履歴判別等の技術開発と標準化

中課題番号：180d0

予算区分：委託プロ (新農業展開ゲノムプロジェクト)

研究期間：：2011～2014 年度

研究担当者：高畠令王奈、真野潤一、橘田和美

発表論文等：Takabatake R. et al. (2015) Food Control 50:949-955