

クリーピングベントグラス種子での簡易抽出法と 蛍光 LAMP 法を組み合わせた迅速な LMO 検査法の検討

南田 佳祐¹⁾・堀 佑太朗²⁾・井上 佳美・金野 亜紀³⁾・平林 千鶴・川寄 和実⁴⁾

横浜植物防疫所

Consideration of Rapid Screening Detection Methods for Living Modified Organisms of Creeping Bentgrass Seed by Combining of Crude Extraction and Fluorescence Loop-mediated Isothermal Amplification. Keisuke Minamida¹⁾, Yutaro Hori²⁾, Yoshimi Inoue, Aki Konno³⁾, Chizuru Hirabayashi and Kazumi Kawasaki⁴⁾ (Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-yamashita, Naka-Ku, Yokohama, 231-0801 Japan. ¹⁾Tohoku Regional Agricultural Administration Office. ²⁾Chubu Airport Sub-station, Nagoya Plant Protection Station. ³⁾Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Plant Protection Division. ⁴⁾Shiogama Sub-station, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 58: 31-34 (2022).

Abstract: Upon-importation inspections of Living Modified Organisms (LMO) are implemented to detect LMO contaminations under the domestic law in Japan. For this inspection, realtime PCR are employed for LMO detection in many countries (ISO21570: 2005, ISO21571: 2005) including Japan. However it requires upwards of 6h to process. Therefore rapid detection methods are required, given the potential increase in the number of inspections in the global market growth of seeds for cultivation.

We report on a rapid method to detect LMO of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*), with a direct LAMP detection scheme using crude cell lysates. The 35S promoter region derived from *cauliflower mosaic virus* (P35S) and the terminator region of the nopaline synthase gene derived from *Rhizobium radiobacter* (T-NOS) were targeted on this method. Consequently, the limits of detection (LOD) were $\leq 0.5\%$ and the entire process, including seed pretreatments and LAMP detection, could be completed within 3h.

Key Words: Living modified organisms, LMO, LAMP, Creeping bentgrass

緒 言

我が国では、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」に基づき、未承認の遺伝子組換え生物（Living modified organisms、以下「LMO」）が、栽培用の種子や苗として、又はそれらに混入して輸入されることのないよう、植物防疫所で輸入時に検査を実施している。本検査は、対象となる植物毎に輸入時のロットの重量や輸入形態（例えば貨物、郵便、携行）を限定しているところであるが、未承認の LMO が一度発見されると、これらを限定しない全ロットを対象とした検査への移行が検討される方針となっており、その場合には検査量の急激な増加が見込まれる。2019 年度から検査対象に新規追加された米国産クリーピ

ングベントグラス (*Agrostis stolonifera*) 種子は、我が国未承認の除草剤グリホサート耐性 LMO が米国で普及しているとの情報があり、水際検査で発見されるリスクが高いと考えられる。

現在、植物防疫所における LMO 検査方法は、全てリアルタイム PCR 法を適用している。PCR 法は精度が高く、多くの国で LMO 検知方法として採用されている（ISO21570: 2005, ISO21571: 2005）が、PCR 法では検出までに比較的多くの時間を要する。これらの理由から、より簡便で迅速な検出方法の開発が望まれている。

本調査研究では、クリーピングベントグラス種子について、既報の簡易抽出法及び蛍光 LAMP 法を組み合わせた検査法が、現行のリアルタイム PCR による検査法と同等の感度を持つ迅速なスクリーニング法として有効であるか検証した。

¹⁾東北農政局

²⁾名古屋植物防疫所中部空港支所

³⁾農林水産省消費・安全局植物防疫課

⁴⁾横浜植物防疫所塩釜支所

材料及び方法

1. 供試試料

陽性試料として、遺伝子組換えクリーピングベントグラス種子が入手できないことから、遺伝子組換え体認証標準物質である AOCS 0406-D MON88017 maize powder (Monsanto Company) 10g×1 を用いた。非遺伝子組換え体試料として、クリーピングベントグラス種子 CY-2 (雪印種苗) 1kg×1 を用いた。

2. 試料の作製

陽性試料及び非遺伝子組換え体試料をマルチビーズショッカー (MB2400TP・安井器械) を用い、それぞれ 1,000rpm で 5 分間粉砕した。次に、リアルタイム PCR 法の検出限界と同じになるよう陽性試料を重量比で 0.5% 含むように非遺伝子組換え体試料粉砕物に添加し、均一となるよう混合した。

3. 作製試料からの核酸の簡易抽出法

遺伝子組換え体及びその由来製品の分析法に関する国際ガイドライン ISO24276: 2006 では、検出限界 (limit of detection, LOD) 「偽陰性率 5% 以下となる最低濃度」が定められている。標的となる遺伝子組換え系統を微量含む試料を 21 回分析し、20 回以上検出できた最低濃度を LOD として用いる報告が多いことから、この方法で評価を実施した (真野, 2015)。

簡易 DNA 抽出試薬である GenCheck (ファスマック社) を用いて、検体の簡易抽出を既報 (Takabatake *et al.*, 2018) に準じ

て次のとおり行った。供試試料 40 mg を 21 反復量り取り、それぞれ GenCheck 400µl を加え、100℃ で 10 分間加熱後、すぐに氷上で 1 分間冷却した。その後、15,000g で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを回収して LAMP 鋳型に用いた。

4. 簡易抽出液からの蛍光 LAMP 法

既報の 2 種の遺伝子組換え遺伝子検知用 LAMP プライマーセット「P35S」(Takabatake *et al.*, 2018) 及び「T-NOS」(Hardinge *et al.*, 2018) 並びに内在性遺伝子検知用 LAMP プライマーセット「18SrRNA」を用いた (Table 1)。内在性遺伝子検知用プライマーは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されているクリーピングベントグラスの 18SrRNA 近傍領域の塩基配列 (Accession number KX872911) を基に 6 組のプライマーセットをプライマー設計ソフト「Primer Explore (version 4) software」(<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) により作成した。LAMP 反応には、蛍光 LAMP 試薬 isothermal master mix (OptiGene 社) を用い、反応液の調整は付属のマニュアルに従い、次のとおり行った。反応液 25µl 中に 2.0µl の鋳型 DNA、15µl の isothermal master mix、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM DTT、最終濃度がそれぞれ F3、B3 プライマーは 0.2µM、FIP、BIP プライマーは 1.6µM、LoopF、LoopB プライマーは 0.8µM となるように調整した。LAMP 反応には、リアルタイム PCR 機器 QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific 社) を用い、64℃ で 30 秒を 60 サイクル反応し、その後融解曲線解析を行い、増幅産物のアニーリング温度を計測した。

Table 1 The oligonucleotide primers used for the LAMP analyses.

Target		Sequence	References
P35S	F3	5'-ATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCG-3'	Takabatake <i>et al.</i> , 2018
	B3	5'-ACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTC-3'	
	FIP	5'-GAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTAGTGGTCCCAAAGATGGA-3'	
	BIP	5'-GCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCTTGCGAAGGATAGTGGGA-3'	
	LoopF	5'-TTTCCACGATGCTCCTCG-3'	
	LoopB	5'-CGTAAGGGATGACGCACA-3'	
T-NOS	F3	5'-CGCGATAATTTATCCTAGTTTG-3'	Hardinge <i>et al.</i> , 2018
	B3	5'-CGTTCAAACATTTGGCAAT-3'	
	FIP	5'-GCATGACGTTATTTATGAGATTTTCGCGCTATATTTTGTCTTCTA-3'	
	BIP	5'-CATGCTTAACGTAATTC AACATTTTGAATCCTGTTGCCGTC-3'	
	LoopF	5'-GATTAGAGTCCC GCAATTATAC-3'	
	LoopB	5'-AAATTATATGATAATCAATCGCAA-3'	
18SrRNA	F3	5'-CTCGGCAACGGATACTCG-3'	This study
	B3	5'-TACCCGATGAGGGTGTGG-3'	
	FIP	5'-TGGTTTCGCGGATTCTGCAATTTCTCGCATCGATGAAGAACG-3'	
	BIP	5'-AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCAGCGTGTTTTGCGTGACG-3'	
	LoopF	5'-CACACCAGGTATCGCATTTTCG-3'	
	LoopB	5'-CGAGGCCATTCGGCTGA-3'	

結果及び考察

遺伝子組換え遺伝子「P35S」及び「T-NOS」並びに内在性遺伝子「18SrRNA」について、全て100% (21/21) の検出となり、検出限界が0.5%である基準を満たし (Table 2)、現行のリアルタイムPCRと同等の結果が示された (Fig.1)。

一方、それぞれの検知対象における融解曲線解析によるアニーリング温度は、それぞれ「P35S」では $87.24^{\circ}\text{C} \pm 0.15$ 、「T-NOS」では $80.93^{\circ}\text{C} \pm 0.10$ 、「18SrRNA」では $91.25^{\circ}\text{C} \pm 0.10$ となり、非特異的増幅の判別が可能であった。また、LAMP 鑄型に滅菌水 (no-template control) 又は非組換えクレーピングベントグラス種子の簡易抽出液を用い、LAMP 反応を60分まで延長した場

合であっても、アニーリング温度が近似する非特異的反応は見られなかった。

現行の方法では検出まで1日要するところ、本方法では3時間程度に短縮が可能となるため、クレーピングベントグラス種子の遺伝子組換え体検知のスクリーニング法になり得ると考えられる。また、本試験の遺伝子組換え体検知対象「P35S」及び「T-NOS」は、多くのLMOに組み込まれており、植物防疫所のLMO検査では、2021年度現在、本検知対象の少なくとも1つを対象としているものは、植物種全12種類のうち、9種となっている。本試験の簡易抽出法及び蛍光LAMP法を組み合わせた検出方法は、クレーピングベントグラスのみならず、これら他の植物の検査へ応用できる可能性がある。

Table 2 Summary of evaluations for sample detections.

Target	Positive/Total	Positive rate	Detection Time (min)	Annealing Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
P35S	21/21	100%	12.40 ± 1.16	87.24 ± 0.15
T-NOS	21/21	100%	12.16 ± 2.35	80.93 ± 0.10
18SrRNA	21/21	100%	3.89 ± 0.10	91.25 ± 0.10

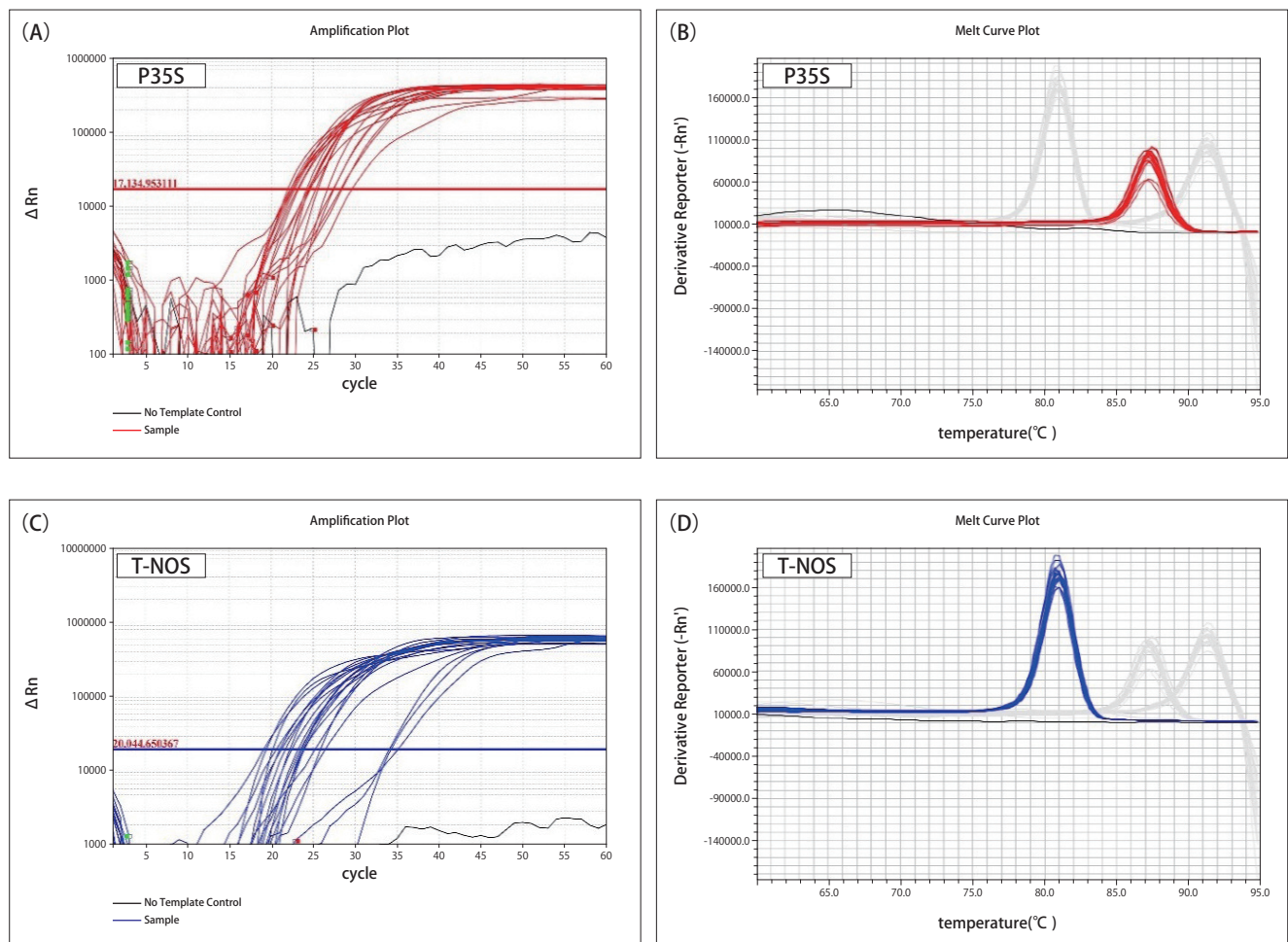


Fig. 1 Representative results of the specificity tests for LAMP analyses from Living Modified creeping bentgrass, obtained with QuantStudio5. The amplification profiles are shown in A, C and E, and the annealing curves are shown in B, D and F. The peaks in the annealing curves indicate the annealing temperature of the LAMP products.

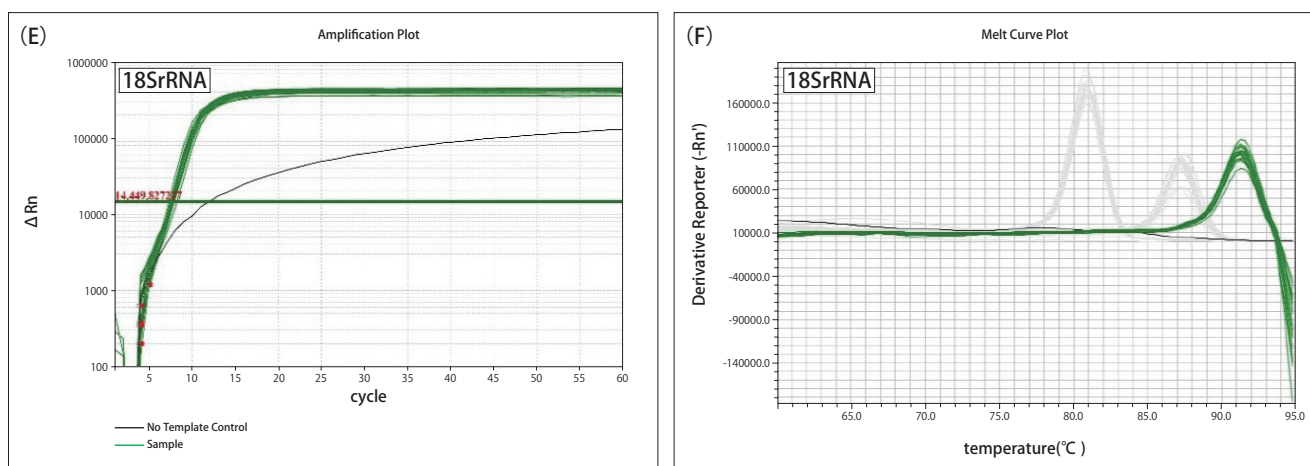


Fig. 1 (continued)

謝 辞

本試験を遂行するにあたり、試験内容にご助言をいただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門食品流通・安全研究領域食品安全・信頼グループの橘田和美博士（現 同機構本部）及び高畠令王奈博士に、厚く御礼申し上げます。

引用文献

Hardinge, P., G. Kiddle, L. Tisi and J. A. H. Murray (2018) Optimised LAMP allows single copy detection of 35Sp and NOST in transgenic maize using Bioluminescent Assay in Real Time(BART). *Sci. Rep.* 8, 17590 (online), available from <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36207-4>>, (accessed_2021-6-30).

ISO21570: 2005. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection

of genetically modified organisms and derived products- Quantitative nucleic acid based methods.

ISO21571: 2005. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction.

ISO24276: 2006. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- General requirements and definitions.

真野潤一 (2015) 遺伝子組換え農作物網羅的検知法の開発. *日本食品科学工学会誌* 62(8): 365-373.

Takabatake, R., Y. Kagiya, Y. Minegishi, S. Yeasmin, S. Futo, A. Noguchi, K. Kondo, J. Mano and K. Kitta (2018) Development and evaluation of rapid screening detection methods for genetically modified crops using loop-mediated isothermal amplification. *Food Chem.* 252: 390-396.