

トウモロコシの遺伝子組換え食品検査における試料由来 DNA 断片化の影響

清田恭平* 吉光真人* 阿久津和彦* 梶村計志*

トウモロコシの遺伝子組換え食品に関する検査では、検査指標となる内在性遺伝子（*SSIb*）の検出が必須である。検査において、レトルトパウチ食品のヤングコーンから十分な純度と収量の DNA が得られたが、*SSIb* 遺伝子のコピー数が低かったため、結果の判定に支障を来した事例が発生した。当該食品は、高度に加圧および加熱処理された加工食品であったため、抽出したゲノム DNA は断片化され、PCR による検出対象の塩基配列の増幅が困難な状態になり、*SSIb* 遺伝子のコピー数低下につながったことが推察された。

キーワード: ポリメラーゼ連鎖反応、DNA 断片化、ヤングコーン、*SSIb* 遺伝子Keywords: polymerase chain reaction, DNA fragmentation, young corn, *SSIb* gene

平成 13 年 4 月から遺伝子組換え食品に関する表示制度が導入された¹⁾。表示から得られる情報は、購入食品が組換え遺伝子食品であるかどうかを消費者が判断するための重要な情報である。この表示制度を維持するためには、正確な検査手法の確立が必要とされ、検査法の開発が行われている¹³⁾。

当所では、年間 50 試料程度について、遺伝子組換え食品に関わる検査を実施している。そのうち、安全性審査済トウモロコシ組換え遺伝子の検査においては、組換え遺伝子の混入率が重要な検査指標である。混入率の算出には、公定法で指標遺伝子であるトウモロコシ内在性遺伝子（*SSIb*: starch synthase IIb）と組換え遺伝子のコピー数について、PCR による定量がそれぞれ必要である。一般に、加圧や加熱などの食品工程を経た試料の場合、食品中の DNA は断片化する傾向がある^{4,5)}。そのため、PCR で増幅可能な DNA を得られるか、断片化が進んだ DNA に対しても PCR で増幅可能であるかが検査の鍵となる。

平成 23 年度の安全性審査済トウモロコシ組換え遺伝子の検査では、レトルトパウチ食品のヤングコーンにおいて、十分な純度と収量の DNA が得られたが、混入率の算出に必要な *SSIb* 遺伝子コピー数は得られなかった。今

回、当該ヤングコーンについて低コピー数となった要因について検討した結果、若干の知見が得られたので、報告する。

方法

1. 試料

試料は、大阪府内の小売店で入手した。製造者の異なるレトルトパウチ食品のヤングコーン A（平成 23 年度に検査不能となった試料の別ロット）、B、C と陽性対照としてヤングコーン生鮮品、スイートコーン生鮮品の計 5 種類の試料を用いた。

2. DNA 抽出

試料は粉碎後、既報の方法⁶⁾に準じて実施した。特に記述のない試薬は、以下すべて和光純薬工業社製を用いた。すなわち、200 mg の試料を 2 mL チューブに採取し、CTAB 溶液（0.1M Tris-HCl、0.02M EDTA、1.4M NaCl、2% CTAB、1%ポリビニルピロリドン K30、0.2%2-メルカプトエタノール）1.3 mL を加えて混合後、60°C で 30 分間インキュベートした。その後、室温で 20,000×g、5 分間遠心分離し（以下の遠心分離操作はすべて同条件）、上清 900 μL を新しい 2 mL チューブに移し、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール溶液（25:24:1 v/v）を 900 μL 加えて混合した。遠心分離後の上層 900 μL を新しい 2 mL チューブに移し、同量のクロロホルム-イソアミルア

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

DNA Fragmentation Affecting Detection Methods for Genetically Modified Corn

by Kyohei KIYOTA, Masato YOSHIMITSU, Kazuhiko AKUTSU
and Keiji KAJIMURA

ルコール溶液 (24:1 v/v) を加え混合した。遠心分離後、上層 900 μ L を新しい 2 mL チューブに移し、同量のイソプロパノールを加え、遠心分離後、上清を除去後に 70% エタノールを 500 μ L 加え、遠心分離した。上清を除去後、吸引デシケーター内で 5 分間静置し、ペレットを乾燥後、Tris-EDTA 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mMEDTA, pH8.0 (同仁化学研究所)) で調製した 500 μ g/mL の RNase A 溶液 (Qiagen) を 100 μ L 加えて、室温で 30 分間静置し RNA 分解処理を行った。その後、400 μ L の CTAB 溶液と 500 μ L のクロロホルム-フェノール溶液を加え混合し、遠心分離後、上層を新しい 2 mL チューブに移した。上述と同様に、同量のイソプロパノールと 70% エタノールを順次加え、ペレットを乾燥させた。Tris-EDTA 緩衝液を 100 μ L 加え、4°C で一晩静置し、DNA 抽出液とした。DNA 抽出液の吸光度は、NanoPhotometer P-300 (Implen) を用いて 260 nm の吸光度を測定し、吸光度 1 を 50 ng/ μ L DNA 溶液として DNA 濃度を算出し、滅菌超純水で適宜希釈した。1 試料から 3 回抽出し、それぞれ PCR に供した。

3. 定量 PCR 条件

トウモロコシ内在性遺伝子 (*SSIIb*: starch synthase IIb) 検出用プライマー対のうち、5'プライマー (5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3')、3'プライマー (5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3') (増幅長 114 bp) およびプローブ (5'-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3') を用いた (以上ニッポン・ジーン)。

定量 PCR では、既報の方法⁷⁾に準じて行い、終濃度が 1 $\times$ TaqManTM Universal PCR Master Mix (Life Technologies)、0.5 μ mol/L プライマー対、0.2 μ mol/L TaqManTM プローブとなるよう調製し、鋳型 DNA を 40 ng 加えて全量を 20 μ L とした。ABI PRISMTM 7900HT 384 well (Life Technologies) を用いて、50°C で 2 分保持後、95°C で 10 分保持し、その後 95°C30 秒、59°C1 分を 1 サイクルとして 45 サイクルの増幅反応を行った。1 抽出あたり 3 ウェル併行で実施し、陽性対照として、GM トウモロコシプラスミドセット (ニッポン・ジーン) を使用した。結果は、SDS software version 2.0 (Life Technologies) を用いて解析した。

4. 定性 PCR 条件

定性 PCR では、下記の 2 つの PCR 条件を検討した。反応液の終濃度が 1 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo、0.5 Unit KOD FX Neo、0.4 mM dNTPs (以上東洋紡績)、0.2 μ M プライマ

ーとなるよう調製し、50 ng の鋳型 DNA を加えて全量を 25 μ L とした。反応サイクルは、94°C2 分に保持後、98°C10 秒、60°C30 秒、68°C10 秒を 1 サイクルとし、35 サイクル PCR を行った。また、反応液の終濃度が 1 $\times$ Ex Taq Buffer、0.1 Units TaKaRa Ex Taq HS、0.19 mM dNTP Mixture (以上タカラバイオ)、0.5 μ M プライマーとなるよう調製し、100 ng の鋳型 DNA を加えて全量を 20 μ L とした。反応サイクルは、94°C3 分に保持後、98°C10 秒、50°C30 秒、72°C30 秒を 1 サイクルとし、30 サイクル PCR を行い、72°C5 分に保持した。いずれの PCR 条件でも、サーマルサイクラーは VeritiTM200 (Life Technologies) を用いた。また、プライマー対は、定量 PCR と同じものを使用した (増幅長 114 bp)。得られた PCR 増幅産物 10 μ L を TAE 緩衝液 (0.04M Tris, 0.04M acetic acid, 0.001 mM EDTA (同仁化学研究所)) で 3% アガロースゲル (GeneMate 3:1 Agarose, Bioexpress) を用いて電気泳動 (電圧 100V、30 分間) した。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、画像解析装置 (アムズシステムサイエンス) を用いてゲル泳動像を撮影した。

5. ゲノム DNA の電気泳動

ゲノム DNA の電気泳動では、200 ng の DNA 抽出液を 1.5% アガロースゲル (Agarose I, 同仁化学研究所) に泳動した。また、DNA 分子量マーカーは GD 100bp DNA Ladder HB RTU (GeneDireX) を用いた。

結果と考察

表 1 に、抽出した DNA の収量と純度、トウモロコシの *SSIIb* 遺伝子のコピー数をそれぞれ示した。8.3~40.1 μ g の DNA が抽出され、DNA の吸光度比 A_{260}/A_{280} は 1.8 程度であり、すべての試料で十分な収量と純度が得られた。*SSIIb* 遺伝子のコピー数はヤングコーン A では、抽出 3 回のうち 1 回は 10、2 回は 0 であった。また、製造者の異なるヤングコーン B、C においてはコピー数が 181~379 であり、陽性対照である生鮮食品のヤングコーン及びスイートコーンと比較して、低コピー数であった。一方、陽性対照では、いずれもレトルトパウチ食品の 100 倍以上のコピー数が確認された。DNA 抽出液を電気泳動した結果、陽性対照では、DNA 分子量マーカーの上限である 3000 bp 以上の高分子の DNA が見られたが、ヤングコーン A、B、C は、100~200 bp 付近に DNA が観察され、

DNA の断片化がそれぞれ確認された（図 1）。ヤングコーンのレトルトパウチ食品では、加圧加熱殺菌処理が行われている。ヤングコーンは、加圧加熱により DNA 断片化が進み、今回我々が対象とした PCR 増幅には適さない DNA も収量に含んでいたと考えられる。殺菌工程を比較すると、ヤングコーン A では 122°C24 分・98°C50 分、ヤングコーン B では 116-121°C 約 30 分であった（ヤングコーン C については不明）。より強い加圧加熱処理が行われたヤングコーン A では他よりも DNA 断片化が進み、*SSIb* 遺伝子コピー数の顕著な減少につながったと考えられる。

次に、断片化が進んだ DNA に対しても PCR で増幅可能かどうか、DNA 合成酵素に着目して検討を行った。表 1 と図 2 に、KOD FX Neo を用いた *SSIb* 遺伝子検出を目的とした定性 PCR の結果を示した。ヤングコーン A、B、C のバンドはそれぞれ明瞭ではなかったが、ヤングコーン A の 1 抽出分を除き、増幅が確認された（表 1）。100 bp 以下の低分子帯のバンドは、プライマーダイマーと考えられる。また、DNA 合成酵素を TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version に変更して定性 PCR を行った結果、ヤングコーン

からの *SSIb* 遺伝子の検出はすべて不検出であった（データ未記載）。DNA 合成酵素の種類によって検出結果が異なることが明らかになったことから、定量 PCR においても、より高い増幅効率を持つ DNA 合成酵素を選択して PCR 条件を最適化することで、必要なコピー数を確認できる可能性があると考えられる。

平成 23 年度の検査では、製造ロットは異なるヤングコーン A について、DNA 抽出方法をイオン交換樹脂タイプキット（Genomic-tip 20/G、Qiagen）を用いた方法についても検討し *SSIb* 遺伝子のコピー数を定量したが、今回と同様にコピー数は低かった（データ未記載）。Jasbeer らは、トウモロコシ内在性遺伝子 *hmg* (high mobility group) の検出において、加工処理によって DNA が断片化したトウモロコシ飼料の DNA 抽出法の違いにより、*hmg* コピー数が異なることを報告している⁹⁾。Jasbeer らの報告が示すように、DNA 収量よりも PCR 増幅が可能な質の高い DNA を抽出できるかどうか重要である。今回のレトルトパウチ食品のヤングコーンに適した DNA 抽出法は、今後検討する必要があると考えられる。

表 1. DNA 抽出結果と *SSIb* 遺伝子の検出

		DNA 収量 (μ g)	DNA 純度 (A_{260}/A_{280})	<i>SSIb</i> コピー数 ¹	<i>SSIb</i> 定性 PCR
ヤングコーン A	抽出 1	8.3	1.653	10	+
	抽出 2	11.0	1.842	0	-
	抽出 3	11.1	1.843	0	+
ヤングコーン B	抽出 1	25.8	1.877	192	+
	抽出 2	28.7	1.876	208	+
	抽出 3	27.7	1.869	181	+
ヤングコーン C	抽出 1	14.3	1.870	258	+
	抽出 2	12.1	1.876	276	+
	抽出 3	12.1	1.869	379	+
ヤングコーン生鮮品	抽出 1	30.1	1.891	72943	+
	抽出 2	28.8	1.898	65746	+
	抽出 3	31.5	1.884	73324	+
スイートコーン生鮮品	抽出 1	39.0	1.896	49995	+
	抽出 2	40.1	1.890	55688	+
	抽出 3	38.3	1.887	57278	+

+: 検出、-: 不検出

¹ 検量線の傾き: -3.47、Y 切片: 41.62、相関係数: 0.99 以上

トウモロコシのデンプン食品であるコーンスターチのように、高度に加工精製された一部のトウモロコシ加工食品では DNA の検出が困難な場合が知られている⁴⁾。一方で、加工食品であっても、スイートコーン缶詰のように、検査可能な加工食品も存在する。今回のレトルトパウチ食品のヤングコーンでは、原形が保持された状態であった。検査に適しているかどうかは外見からでは判別が難しく、ゲノム DNA の状態を確認することが重要であると考えられる。

高度に加工処理された試料は、DNA 断片化により検査が困難になる可能性が高い。そのため、可能であれば加工前の状態で検査を実施することが望ましい。また、どのような加工品が検査に適するのか、その傾向を明らかにすることも、検査技術の発展と併せて今後の課題のひとつと考えられる。

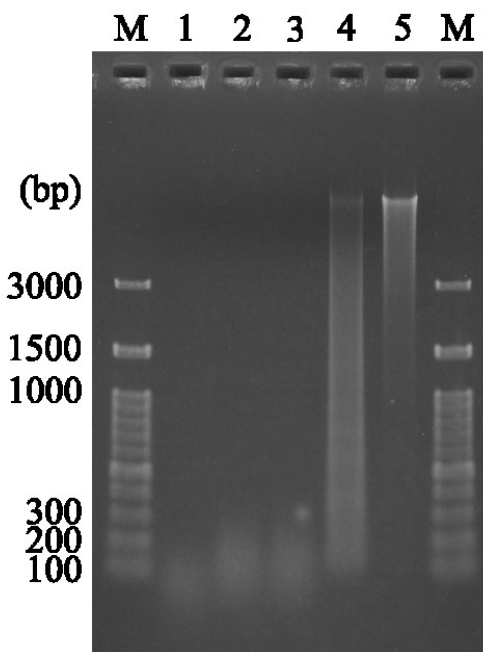


図 1. 抽出したゲノム DNA の電気泳動画像。レーン 1; ヤングコーン A、レーン 2; ヤングコーン B、レーン 3; ヤングコーン C、レーン 4; ヤングコーン生鮮品、レーン 5; スイートコーン生鮮品、M; DNA 分子量マーカー

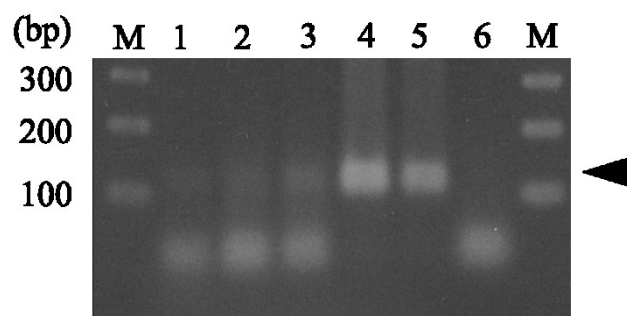


図 2. *SSIIb* 遺伝子の増幅確認。レーン 1; ヤングコーン A、レーン 2; ヤングコーン B、レーン 3; ヤングコーン C、レーン 4; ヤングコーン生鮮品、レーン 5; スイートコーン生鮮品、レーン 6; 陰性対照（鋳型 DNA なし）、M; DNA 分子量マーカー

文献

- 1) H. Akiyama, and K. Kitta : Recent Trends and Future Prospects for Labeling Regulation and Detection Methods of Genetically Modified Foods in Japan, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51(6), 383-392 (2010)
- 2) M. Kitagawa, K. Nakamura, K. Kondo, S. Ubukata and H. Akiyama : Examination of Processed Vegetable Foods for the Presence of Common DNA Sequences of Genetically Modified Tomato, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 55(6), 247-253 (2014)
- 3) M. Yoshimitsu and S. Hori : Comparison of the DNA Extraction Methods from Potato Snacks and Detection of Genetically Modified Potato in Snacks, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 10, 165-170 (2003)
- 4) T. Ogasawara, F. Arakawa, T. Watanabe, H. Akiyama, A. Hino, T. Maitani, Y. Goda and Y. Ozeki : Genomic DNA Fragmentation of Genetically Modified Corn during Food Processing, *Japanese Journal of food chemistry*, 11(3), 137-144 (2004)
- 5) P. Corbisier, S. Trapmann, D. Gancberg, L. Hannes, P. V. Iwaarden, G. Berben, H. Schimmel and H. Emons : Quantitative Determination of Roundup Ready Soybean (*Glycine max*) Extracted from Highly Processed Flour, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383(2), 282-290 (2005)

- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター:
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」,3,7-9(2012)
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター:
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」,3,33-51(2012)
- 8) K. Jasbeer, R. Son, F. M. Ghazali and Y. K. Cheah : Real-
time PCR Evaluation of Seven DNA Extraction Methods for
the Purpose of GMO Analysis, International Food Research
Journal, 16, 329-341 (2009)