

トウモロコシ加工品の新規 DNA 抽出法の検討

則武 寛通, 笠原 正輝

Hiromichi Noritake, Masaki Kasahara

要 約

市販の加工食品を対象として、DNA 抽出キット GM quicker 3 による DNA 抽出法のトウモロコシ加工品への適用について検討した。現行の JAS 分析試験ハンドブックに記載されている DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出法と比較したところ、GM quicker 3 抽出試料はタンパク質の混入が少ない可能性が示唆された。また、10 ng/μL 以上の抽出 DNA 原液が得られる商品の品目の種類は、抽出法間で大きな差は見られなかった。PCR 及び電気泳動の結果として、DNeasy Plant Maxi Kit による抽出では内在性遺伝子が検知されなかった試料でも、GM quicker 3 による抽出では内在性遺伝子が検知された。

以上のことから、GM quicker 3 は DNeasy Plant Maxi Kit よりもトウモロコシ加工品からの DNA 抽出に適していることが示唆された。よって、トウモロコシ加工品について GM quicker 3 による DNA 抽出法の適用は可能であると考えられる。

1. はじめに

遺伝子組換え (genetically modified, GM) 農産物について、169 品種 (平成 24 年 2 月 15 日現在) が食品としての安全性審査を終了し、現在流通が可能となっているが、遺伝子組換え食品に関する品質表示基準 (平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 517 号)¹⁾により、遺伝子組換え農産物 (加工品) 及び遺伝子組換え農産物と非遺伝子組換え農産物を分別生産流通管理していない農産物 (加工品) については、表示が義務づけられている。この表示制度の実効性確保のために科学的な検査法が必要であり、これまでも定性分析法及び定量分析法が開発され、実用化されている。農林水産消費安全技術センター (Food and Agricultural Materials Inspection Center, FAMIC) では、GM 検査分析のためのマニュアルとして JAS 分析試験ハンドブック (以下、JAS ハンドブック)²⁾を作成している。

加工食品用の抽出キット GM quicker 3 は NIPPON GENE 社 (Tokyo, Japan) と独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所が共同で開発した抽出キットであるが、JAS ハンドブックへの掲載に向けた検討がされていない。そこで、本調査研究において GM quicker 3 による抽出法のトウモロコシ加工品への適用の検討を行うため、現行の JAS ハンドブックに記載されている DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出法との比較を行った。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

2. 実験方法

2. 1 試料

トウモロコシ加工品は小売店で購入したものを試料として用いた。

品目名の表記方法については、遺伝子組換え食品に関する品質表示基準¹⁾に準じたものとしている。

トウモロコシ加工品は、コーンスナック菓子 (4: 試料数 4。以下同じ。)、コーンスターチ (2)、ポップコーン (2)、冷凍とうもろこし (2)、とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰としてとうもろこし缶詰 (2)、コーンフラワーを主な原材料とするもの (2)、コーングリッツを主な原材料とするもの (3)、とうもろこし (調理用) を主な原材料とするものとしてコーンスープ (1) 及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするものとしてコーンスターチを主な原材料とするラムネ菓子 (1) の 9 品目 19 商品であった。

2. 2 前処理及び DNA 抽出

各試料を原則として JAS ハンドブック個別品目編 (定性試験用) に従って前処理を行った後、DNA 抽出に供した。

結果の再現性を確認するため、コーンスナック菓子 2 商品 (商品枝番 1 及び 4)、ポップコーン 2 商品 (商品枝番 1 及び 2)、冷凍とうもろこし 2 商品 (商品枝番 1 及び 2)、とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰 2 商品 (商品枝番 1 及び 2)、コーンフラワーを主な原材料とするもの 2 商品 (商品枝番 1 及び 2)、コーングリッツを主な原材料とするもの 3 商品 (商品枝番 1 ~ 3) 及びとうもろこし (調理用) を主な原材料とするもの 1 商品 (商品枝番 1) の各抽出以降の操作については 2 回実施した。

コーンスナック菓子 2 商品 (商品枝番 2 及び 3)、コーンスターチ 2 商品 (商品枝番 1 及び 2) 及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの 1 商品 (商品枝番 1) については、抽出により得られる DNA 原液の濃度が 10 ng/μL 未満となる可能性の高いことが事前検討等から予測された。本研究目的から鑑みて、DNA 原液の濃度が 10 ng/μL 未満となることは好ましくないため、他の試料が同一回 1 点抽出のところを 3 点併行で抽出し、そのうち DNA 収量が最大の 1 点を後の検討に使用した。つまり、3 点併行で 2 回の計 6 点抽出を実施し、各回ごと DNA 収量最大の 1 点ずつの計 2 点を後の検討に使用した。

トウモロコシ加工品の DNA 抽出については GM quicker 3 (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) により行った。現行の JAS ハンドブックに記載されている標準的な抽出法である DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を比較対象として採用し、DNeasy Plant Maxi Kit による抽出も併せて行った。

GM quicker 3 については原則として NIPPON GENE 社が公開しているマニュアル (GM quicker 3 Manual Ver. 1.1) に従って DNA を抽出した。DNeasy Plant Maxi Kit については原則として JAS ハンドブック個別品目編 (定性試験用) 及び基本操作編に従って DNA を抽出した。

抽出した DNA 溶液は 260 nm の吸光度を測定し、1 O.D. 260 nm を 50 ng/μL DNA 溶液

として DNA 濃度を算出し、必要に応じ滅菌超純水で希釈して PCR 用の希釈 DNA 溶液（濃度は各項目に記載のとおり。）を調製した。分光光度計は NanoDrop ND-1000（NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA）を用いた。

2. 3 PCR 及び電気泳動

原則として JAS ハンドブック基本操作編に従って PCR 及び電気泳動を行った。トウモロコシ由来の遺伝子検知の確認については、トウモロコシの内在性遺伝子 *starch synthase IIb* (*SSIIB*) を検知対象とした。

PCR 反応液は、終濃度が 0.625 Units の AmpliTaq Gold（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）、1 × PCR Buffer II（AmpliTaq Gold 添付品）、0.2 mmol/L dNTP Mixture（AmpliTaq Gold 添付品）、1.5 mmol/L MgCl₂（AmpliTaq Gold 添付品）及び 0.5 μmol/L のプライマーセット（*SSIIB* 1-5' & 3'（NIPPON GENE））を含む反応液に、10 ng/μL の希釈 DNA 溶液を 2.5 μL 加え、滅菌超純水で全量を 25 μL とした。抽出した DNA 溶液の濃度が 10 ng/μL 未満であった試料については希釈を行わずにそのまま使用した。トウモロコシ判別用プライマーセットには、5' プライマーとして *SSIIB* 1-5' : 5' -CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3'、3' プライマーとして *SSIIB* 1-3' : 5' -TCGATTTCTCTCTTGGTGACAGG-3'（増幅長 151 bp）を用いた。PCR 温度サイクルは、最初の熱変性として 95 °C で 10 分、次に（1）熱変性として 95 °C で 30 秒、（2）アニーリングとして 60 °C で 30 秒、（3）伸長反応として 72 °C で 30 秒の（1）～（3）を 1 サイクルとして 40 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 7 分反応させた。PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700（Life Technologies）を用いて行った。

アガロースゲル電気泳動は Agarose L03（TAKARA BIO, Shiga, Japan）を用い、ゲルの濃度は 3 %（w/v）とし、ゲル 100 mL 当たり 50 μg の ethidium bromide（NIPPON GENE）が含有されるように調製し、電気泳動緩衝液は TAE 緩衝液を用いた。分子量マーカーとして Gene Ladder 100（0.1-2 kbp）（NIPPON GENE）を用いた。電気泳動装置は、Mupid-exU（ADVANCE, Tokyo, Japan）を用いた。電気泳動結果は Molecular Imager FX（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）を用いて撮影した。

3. 結果及び考察

3. 1 DNA 抽出結果

抽出した DNA の吸光度比 O.D. 260 nm/O.D. 280 nm を示すことにより純度を評価した。JAS ハンドブック基本操作編によると DNeasy Plant Maxi Kit によるトウモロコシ種子からの DNA 抽出においては、O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が 1.7～2.0 程度になると記載されている。今回の検討対象は様々な加工食品であるため、種子と同様に評価することはできないが、加工食品から抽出した DNA に関する様々な知見を得ることは有意義であるため上記基準での評価を行った。また、両抽出法ともに 1 g の試料から抽出した DNA を 50 μL の TE に溶解するという同一の条件のため、50 μL の DNA 抽出原液の DNA 濃度（ng/μL）を示すことにより収量を比較した。

3. 1. 1 DNeasy Plant Maxi Kit 抽出 DNA の純度及び濃度

DNeasy Plant Maxi Kit によるトウモロコシ加工品抽出 DNA 原液の純度及び濃度算出結果は表 1. 1 に示すとおりであった。

表 1. 1 DNeasy Plant Maxi Kit 抽出 DNA の純度及び濃度算出結果表

品目	商品枝番	O.D. 260 nm/O.D. 280 nm		抽出原液のDNA濃度(ng/μL)	
		RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
コーンスナック菓子	1	1.6	1.6	132.4	100.2
	2	1.7	1.6	21.5	41.5
	3	1.7	1.7	40.8	21.9
	4	1.6	1.5	153.3	87.7
コーンスターチ	1	1.4	1.5	5.8	6.9
	2	1.0	1.2	2.5	2.9
ポップコーン	1	1.6	1.5	62.8	45.5
	2	1.7	1.5	49.6	42.8
冷凍とうもろこし	1	1.8	1.8	167.4	195.7
	2	1.9	1.9	68.0	76.6
とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰	1	1.5	1.6	395.7	750.3
	2	2.1	1.7	30.0	29.3
コーンフラワーを主な原材料とするもの	1	1.7	1.7	121.6	153.3
	2	1.8	1.7	108.0	75.9
コーングリッツを主な原材料とするもの	1	1.9	1.8	106.7	137.7
	2	1.5	1.5	189.0	257.0
	3	2.0	1.7	42.3	40.7
とうもろこし(調理用)を主な原材料とするもの	1	1.6	1.6	163.3	173.1
第16号から第20号までに掲げるものを主な原材料とするもの	1	1.2	1.5	5.0	5.1

表 1. 1 中の緑色のセルは O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が小数第二位以下を四捨五入後に 1.7 ~ 2.0 となった結果を示す。O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 となった試料は 38 点中の 17 点であった。

表 1. 1 中の水色のセルは DNA 濃度が 10 ng/μL 未満となった結果を示す。コーンスターチ 2 商品及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの 1 商品については、抽出した DNA 溶液の濃度が 10 ng/μL 未満であった。

3. 1. 2 GM quicker 3 抽出 DNA の純度及び濃度

GM quicker 3 によるトウモロコシ加工品抽出 DNA 原液の純度及び濃度算出結果は表 1. 2 に示すとおりであった。

表 1.2 GM quicker 3 抽出 DNA の純度及び濃度算出結果表

品目	商品枝番	O.D. 260 nm/O.D. 280 nm		抽出原液のDNA濃度(ng/μL)	
		RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
コーンスナック菓子	1	2.0	1.9	23.2	30.5
	2	1.7	1.8	58.7	62.9
	3	1.8	1.8	53.6	56.7
	4	1.6	1.6	57.5	26.3
コーンスターチ	1	1.0	0.8	2.9	3.0
	2	2.3	0.8	1.8	1.6
ポップコーン	1	1.7	1.4	26.6	23.9
	2	2.0	1.8	19.0	18.7
冷凍とうもろこし	1	1.9	1.8	97.0	113.6
	2	2.2	1.9	54.6	79.5
とうもろこし缶詰及びとうもろこし 瓶詰	1	2.2	1.8	69.4	52.6
	2	1.9	1.5	65.4	66.5
コーンフラワーを主な原材料とするもの	1	2.2	1.7	49.5	66.0
	2	2.2	1.8	50.6	39.5
コーングリッツを主な原材料とするもの	1	2.1	1.9	66.5	60.7
	2	2.0	1.8	63.2	79.8
	3	2.2	2.0	54.5	61.9
とうもろこし(調理用)を主な原材料とするもの	1	1.8	1.7	62.7	28.0
第16号から第20号までに掲げるものを主な原材料とするもの	1	2.0	0.4	3.5	2.0

表 1.2 中の緑色のセルは O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が小数第二位以下を四捨五入後に 1.7～2.0 となった結果を示す。O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が 1.7～2.0 となった試料は 38 点中の 23 点であった。

表 1.2 中の水色のセルは DNA 濃度が 10 ng/μL 未満となった結果を示す。コーンスターチ 2 商品及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの 1 商品については、抽出した DNA 溶液の濃度が 10 ng/μL 未満であった。

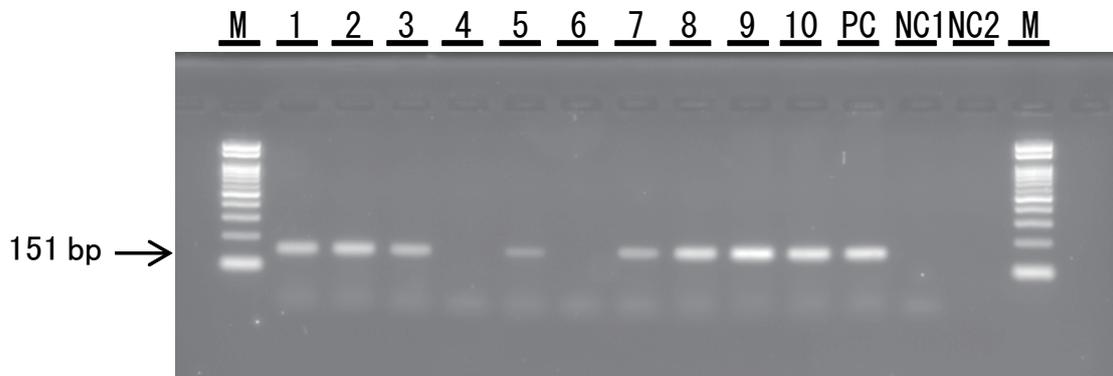
3. 2 電気泳動結果

3. 2. 1 DNeasy Plant Maxi Kit 抽出法の電気泳動結果

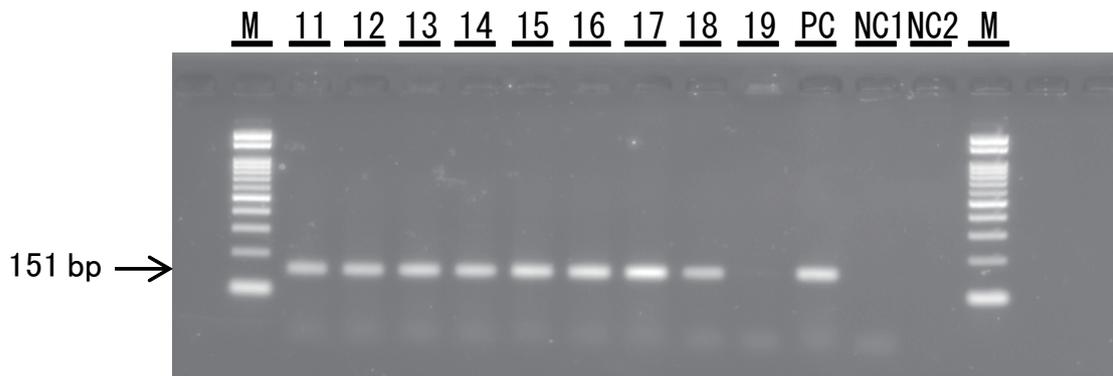
DNeasy Plant Maxi Kit によるトウモロコシ加工品抽出 DNA の分析結果は図 1. 1)～4) に示すとおりであった。検討を行ったトウモロコシ加工品 19 商品については、コーンスナック菓子-4、コーンスターチ-2 及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの-1 を除く全商品の全電気泳動試験結果において内在性遺伝子が検知された。コーンスターチ-2 については 1 点のみ内在性遺伝子が検知されたが、確認されたバンドは著しく薄いものであった。コーンスナック菓子-4 及び第 16 号から第 20 号までに掲げ

るものを主な原材料とするもの-1 については各 2 点とも内在性遺伝子が検知されなかった。コーンスナック菓子-4 については DNeasy Plant Maxi Kit 抽出時の O.D. 260 nm から算出された DNA 濃度は比較的高かったことから、O.D. 260 nm に吸収をもつ夾雑物により DNA 濃度の過剰見積もりが発生し、結果として希釈液中の DNA 濃度が相対的に低くなった可能性や、夾雑物の有する PCR 阻害作用等の影響で検知されなかった可能性が考えられる。また、コーンスターチ-2 及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの-1 については、抽出した DNA 溶液の濃度が 10 ng/μL 未満であったことから、加工による DNA の損傷があったことに加え DNA 濃度が希薄であったことも影響して、検知されなかった可能性がある。

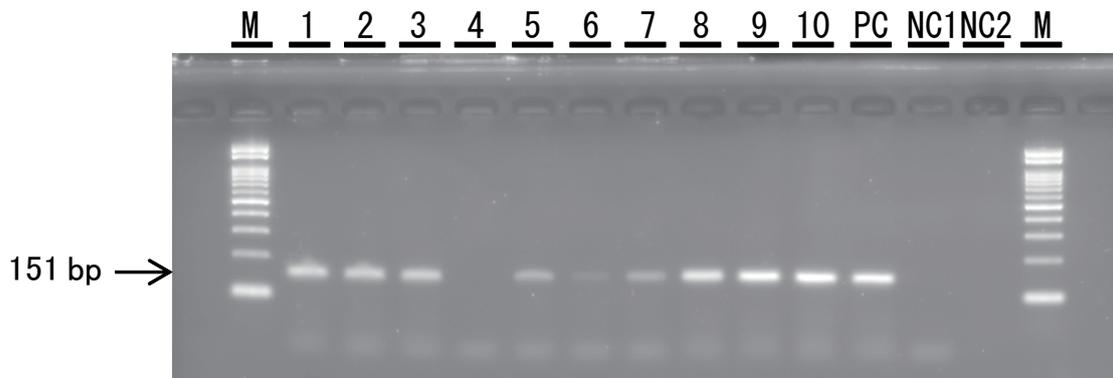
1)



2)



3)



4)

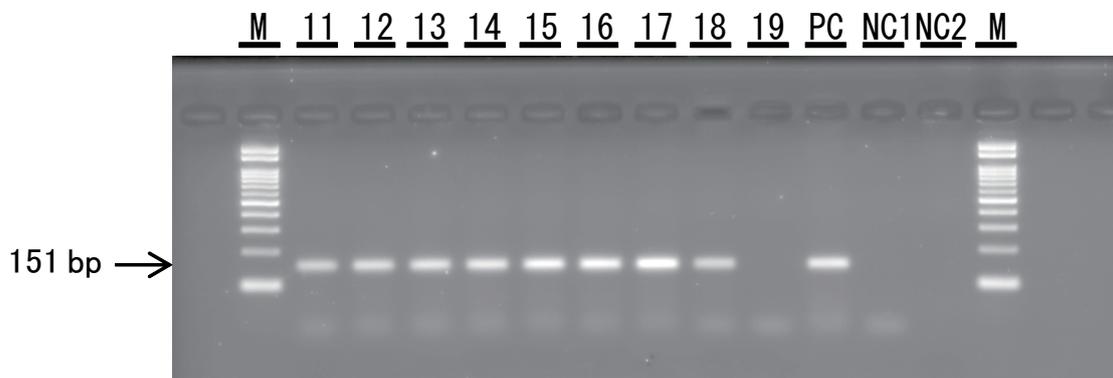


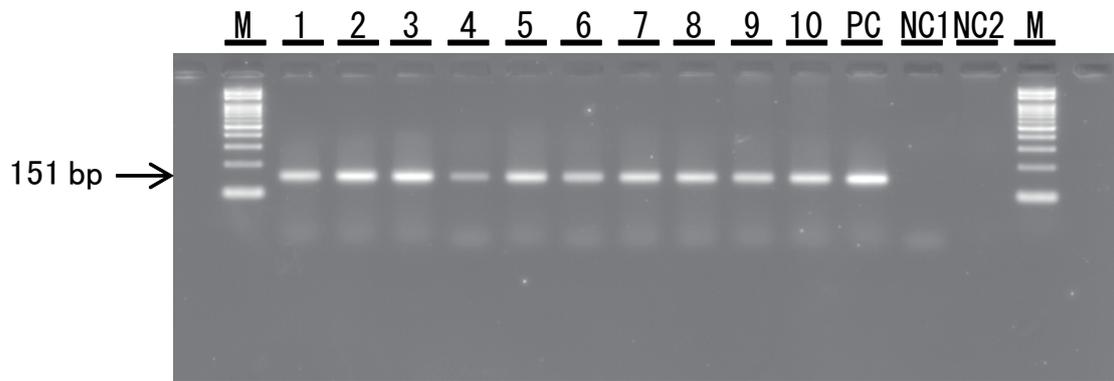
図 1. 1) ~ 4) トウモロコシ加工品の DNeasy Plant Maxi Kit 抽出法の電気泳動図

M: 100 bp DNA Ladder、1: コーンスナック菓子-1、2: コーンスナック菓子-2、3: コーンスナック菓子-3、4: コーンスナック菓子-4、5: コーンスターチ-1、6: コーンスターチ-2、7: ポップコーン-1、8: ポップコーン-2、9: 冷凍とうもろこし-1、10: 冷凍とうもろこし-2、11: とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰-1、12: とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰-2、13: コーンフラワーを主な原材料とするもの-1、14: コーンフラワーを主な原材料とするもの-2、15: コーングリッツを主な原材料とするもの-1、16: コーングリッツを主な原材料とするもの-2、17: コーングリッツを主な原材料とするもの-3、18: とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの-1、19: 第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの-1、PC: positive control、NC1: negative control (no DNA)、NC2: negative control (no primer)

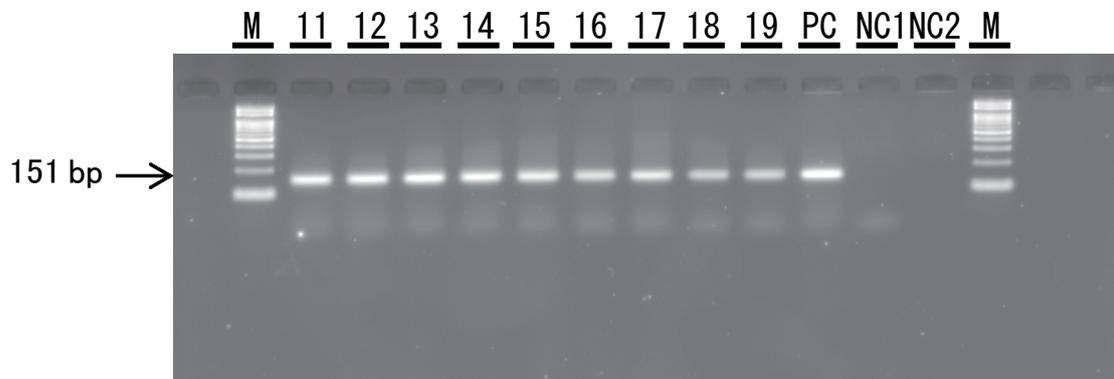
3. 2. 2 GM quicker 3 抽出法の電気泳動結果

GM quicker 3 によるトウモロコシ加工品抽出 DNA の分析結果は図 2. 1) ~ 4) に示すとおりであった。検討を行ったトウモロコシ加工品 19 商品については、全商品の全電気泳動試験結果において内在性遺伝子が検知された。

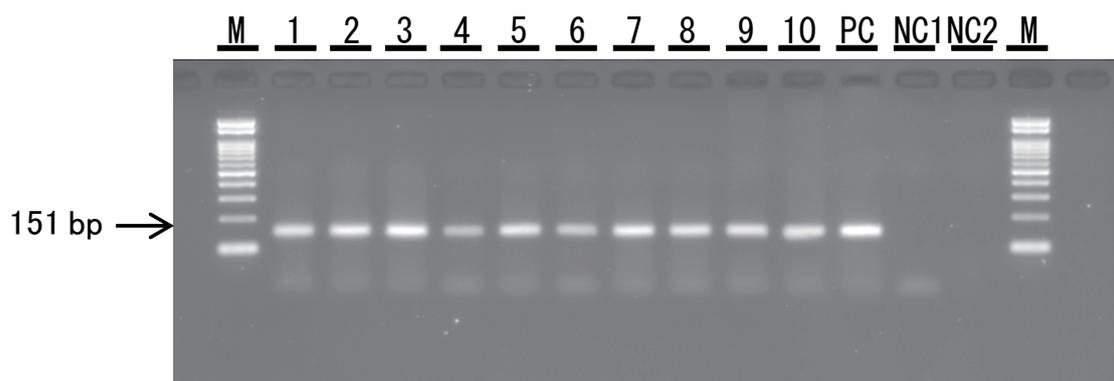
1)



2)



3)



4)

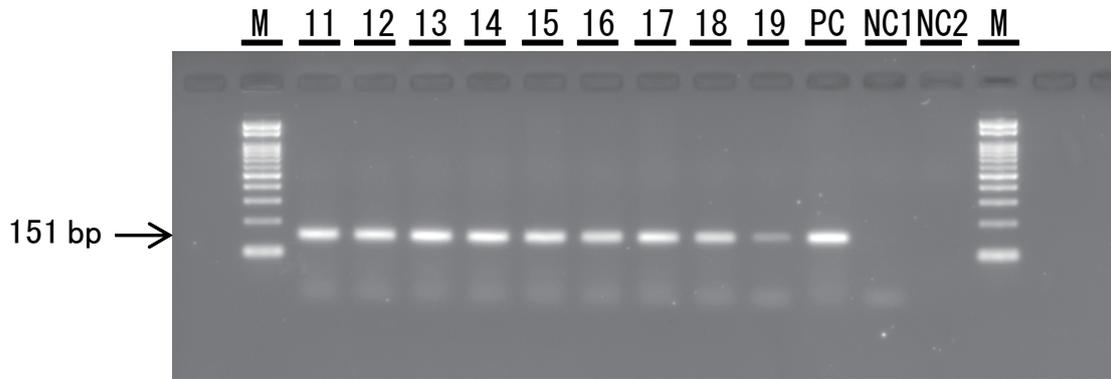


図 2.1) ~ 4) トウモロコシ加工品の GM quicker 3 抽出法の電気泳動図

M: 100 bp DNA Ladder、1: コーンスナック菓子-1、2: コーンスナック菓子-2、3: コーンスナック菓子-3、4: コーンスナック菓子-4、5: コーンスターチ-1、6: コーンスターチ-2、7: ポップコーン-1、8: ポップコーン-2、9: 冷凍とうもろこし-1、10: 冷凍とうもろこし-2、11: とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰-1、12: とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰-2、13: コーンフラワーを主な原材料とするもの-1、14: コーンフラワーを主な原材料とするもの-2、15: コーングリッツを主な原材料とするもの-1、16: コーングリッツを主な原材料とするもの-2、17: コーングリッツを主な原材料とするもの-3、18: とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの-1、19: 第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの-1、PC: positive control、NC1: negative control (no DNA)、NC2: negative control (no primer)

3. 3 各抽出法の結果比較

3. 3. 1 DNA 純度及び DNA 収量の比較

O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 の範囲に入った試料は DNeasy Plant Maxi Kit 抽出よりも GM quicker 3 抽出の方がやや多かった。また、O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 の範囲に入らなかった試料においても GM quicker 3 抽出では 2.0 を超える数値を示す試料が比較的多かったことから、280 nm 付近に極大吸収を有するタンパク質の混入については、DNeasy Plant Maxi Kit 抽出よりも GM quicker 3 抽出の方が少なかった可能性がある。

今回の検討ではコーンスターチ 2 商品及び第 16 号から第 20 号までに掲げるものを主な原材料とするもの 1 商品については、抽出した DNA 溶液の濃度が 10 ng/μL 未満であったことから、両抽出法ともこれらの商品から安定した収量の DNA を回収することができなかった。商品中の DNA が加工により損傷していることや、シリカに DNA を吸着させるという両抽出法に共通する抽出のメカニズムが、これらの商品には適していない可能性が考えられる。上記以外の商品については両抽出法ともに、10 ng/μL 以上の抽出 DNA 原液が各抽出回ごとに 1 点以上は得られたので、10 ng/μL 以上の抽出 DNA 原液が得られる商品の品目の種類は、抽出法間で大きな差は見られなかった。

3. 3. 2 電気泳動結果の比較

表2のとおり GM quicker 3抽出では検討を行ったトウモロコシ加工品19商品については全商品の全電気泳動試験結果において内在性遺伝子が検知されたのに対して、DNeasy Plant Maxi Kit抽出ではコーンスナック菓子-4、コーンスターチ-2及び第16号から第20号までに掲げるものを主な原材料とするもの-1において内在性遺伝子が検知されなかった。DNeasy Plant Maxi Kitによる抽出では内在性遺伝子が検知されなかった試料でも、GM quicker 3による抽出では内在性遺伝子が検知されたことから、GM quicker 3はDNeasy Plant Maxi Kitよりもトウモロコシ加工品からのDNA抽出に適している可能性が示唆された。

表2 電気泳動結果比較表

品目	商品枝番	DNeasy Plant Maxi Kit		GM quicker 3	
		RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
コーンスナック菓子	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	-	-	+	+
コーンスターチ	1	+	+	+	+
	2	-	+	+	+
ポップコーン	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
冷凍とうもろこし	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
コーンフラワーを主な原材料とするもの	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
コーングリッツを主な原材料とするもの	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
とうもろこし(調理用)を主な原材料とするもの	1	+	+	+	+
第16号から第20号までに掲げるものを主な原材料とするもの	1	-	-	+	+

表2中の灰色のセルは内在性遺伝子が検知されなかった結果を示す。

4. まとめ

市販の加工食品19商品を対象として、DNA抽出キットGM quicker 3によるDNA抽出法のトウモロコシ加工品への適用について検討した。

現行の JAS ハンドブックに記載されている DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出法と比較したところ、GM quicker 3 抽出試料はタンパク質の混入が少ない可能性が示唆された。また、10 ng/μL 以上の抽出 DNA 原液が得られる商品の品目の種類は、抽出法間で大きな差は見られなかった。

PCR 及び電気泳動の結果として、DNeasy Plant Maxi Kit による抽出では内在性遺伝子が検知されなかった試料でも、GM quicker 3 による抽出では内在性遺伝子が検知された。

以上のことから、GM quicker 3 は DNeasy Plant Maxi Kit よりもトウモロコシ加工品からの DNA 抽出に適していることが示唆された。よって、トウモロコシ加工品について GM quicker 3 による DNA 抽出法の適用は可能であると考えられる。

5. 謝 辞

本研究は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所との共同研究として実施しました。本研究の実施に当たり、御協力をいただきました独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の橘田和美博士、真野潤一博士、高畠令王奈博士に深謝致します。

6. 文 献

- 1) 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第 7 条第 1 項及び生鮮食品品質表示基準第 7 条第 1 項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 517 号）
- 2) JAS Analytical Test Handbook (2012) Food and Agricultural Materials Inspection Center