

大豆加工品の新規 DNA 抽出法の検討

高嶋 康晴

Yasuharu Takashima

要 約

大豆加工品における遺伝子組換え食品の検査において、新規 DNA 抽出キット (GM quicker 3) による DNA 抽出法の適用の可否を調べるために、市販品を用いて検討した。GM quicker 3 による DNA 抽出法と現在検査に使われている DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出法を (1) 吸光度による抽出 DNA 溶液の純度及び濃度、(2) ダイズ内在性のレクチン遺伝子領域を対象とした PCR 産物の検出の 2 項目について両 DNA 抽出法を比較したところ、GM quicker 3 による DNA 抽出法は、DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出と同等以上の結果が得られた。よって、大豆加工品における遺伝子組換え食品の検査において、GM quicker 3 による DNA 抽出法の適用は可能であると考えられた。

1. はじめに

遺伝子組換え (genetically modified; GM) 農産物については、292 品種 (平成 26 年 10 月 21 日現在) が食品としての安全性審査を終了し、流通が可能となっている。GM 食品 (GM 農産物及び GM 農産物を主な原材料とした加工食品) に関する品質表示基準¹⁾により、GM 食品については、「遺伝子組換え」と表示し、GM 農産物と非 GM 農産物を分別生産流通管理していない食品については、「遺伝子組換え不分別」と表示すること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。独立行政法人農林水産消費安全技術センター (Food and Agricultural Materials Inspection Center; FAMIC) では、GM 食品の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²⁾ (以下、「JAS ハンドブック」とする。)を作成し、FAMIC における大豆加工品等の検査に利用している。

GM quicker 3 (ニッポンジーン) は、ニッポンジーン社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加工品用の DNA 抽出キットであり、消費者庁の GM 農産物の検査法「安全性検査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査法について」³⁾に記載された DNA 抽出法の一つであるが、JAS ハンドブックに記載されておらず、FAMIC における検査に用いることができない。このため、GM quicker 3 による DNA 抽出法 (以下、「新規法」とする。)と現行の JAS ハンドブックに記載されている DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) による DNA 抽出法 (以下、「現行法」とする。)を比較し、DNA 抽出法としての適用の可否について検討する必要がある。前報⁴⁾では、とうもろこし加工品を対象に、検討を実施したところ、新規法が現行法に比べて検査に適している可能性があることを示唆する結果が得られた。本研究では、大豆加工品について両 DNA 抽出法の比較を行った。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料は、大豆加工品として豆腐、油揚げ、凍豆腐、おから、ゆば、納豆、豆乳類、みそ、大豆煮豆、大豆缶詰、きな粉、大豆もやし、枝豆及び大豆たん白を主な原材料とするものとして魚肉ソーセージの14品目について各2商品、合計28商品を試料として使用した。納豆については、製造方法の異なる粒納豆とひきわり納豆をそれぞれ1商品を試料として使用した。

2. 2 DNA抽出

各試料を JAS ハンドブック個別品目編（定性試験用）に従って試料の前処理を行い、両 DNA 抽出法に供した。

DNA の抽出は、1商品について2点並行で行い、それぞれ PCR を行った。新規法は、GM quicker 3 の製品プロトコールに従って DNA を抽出した。現行法は、JAS ハンドブック個別品目編（定性試験用）及び基本操作編の「3. 1. 6. 1 DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出 A」に従って DNA を抽出した。なお、DNA の溶出は、GM quicker 3 の抽出に合わせて、50 μ L の TE(pH8.0)緩衝液で行った。

抽出 DNA 溶液は、260 nm 及び 280 nm の吸光度を測定し、吸光度比 O.D.260 nm/O.D.280 nm により純度を確認し、260 nm の吸光度 O.D.260nm=1 のとき DNA = 50 ng/ μ L とし、DNA 濃度を算出した。算出した DNA 濃度から、滅菌水で PCR 用の DNA 溶液 (10 ng/ μ L) を調製し、DNA 濃度が 10 ng/ μ L 未満であった試料については、希釈を行わずにそのまま PCR に供した。分光光度計は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2. 3 PCR

JAS ハンドブック基本操作編に従って PCR を行った。ダイズ内在性のレクチン (*Le1*) 遺伝子領域を検知対象とした。

PCR 反応液は、終濃度が 0.625 Units/tube の AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific)、1 \times PCR Buffer II、0.2 mmol/L dNTP Mixture、1.5 mmol/L MgCl₂ 及び 0.5 μ mol/L のプライマーセット Le1 n02 (ニッポンジーン) (増幅長 118 bp) を含む反応液に、PCR 用に調製した DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、滅菌水で全量を 25 μ L とした。PCR は、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。PCR 温度サイクルは、最初の熱変性として 95 $^{\circ}$ C で 10 分、次に (1) 熱変性として 95 $^{\circ}$ C で 30 秒、(2) アニールリングとして 60 $^{\circ}$ C で 30 秒、(3) 伸長反応として 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C で 7 分反応させた。

2. 4 電気泳動

PCR により得られた PCR 産物を JAS ハンドブック基本操作編に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、PCR 産物の有無を確認した。アガロースゲルは Agarose LE (和光純薬) を使い、ゲルの濃度は 3.0 % (w/v) とし、エチジウムブロマイド (10 mg/mL) (和光純薬) をゲル 100 mL 当たり 5.0 μ L 使用し、電気泳動緩衝液は 40 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L

EDTA で調製した TAE 緩衝液を用いた。PCR 反応液 2.5 μL を電気泳動に供し、分子量マーカーに 100 bp Ladder (タカラバイオ) を使用した。電気泳動装置は、Mupid-exU (アドバンス) を用い、電気泳動後のゲルは、電気泳動撮影装置 AE-6931FXCF (アトー) を用いて撮影を行った。

3. 結果及び考察

3. 1 抽出 DNA 溶液の純度及び濃度による比較

新規法及び現行法により抽出した DNA 溶液の純度及び濃度について表 1 に示す。JAS ハンドブック基本操作編によると DNeasy Plant Maxi Kit によるダイズ種子からの DNA 抽出では、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。今回の検討対象は大豆加工品であるため、種子と同様に評価を行うことはできないが、大豆加工品から抽出した DNA に関する様々な知見を得ることは有意義であるため、DNA 溶液の純度について上記基準で評価を行った。O.D. 260 nm/O.D. 280 nm 比が 1.7 ~ 2.0 の範囲に入った試料は、新規法 21 商品 36 件、現行法 21 商品 34 件でほぼ同数で、DNA 溶液の純度については、両 DNA 抽出法に大きな差は見られなかった。

また、両 DNA 抽出法は、ともに 1 g の試料から抽出した DNA を 50 μL の TE に溶解しており、抽出 DNA 溶液の DNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) により DNA の収量を比較した。抽出 DNA 溶液の濃度が 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 未満の試料数は、新規法 2 商品 2 件に対して現行法 15 商品 22 件で、新規法の方が抽出 DNA の収量が高い結果が得られた。

表1 新規法及び現行法による抽出DNA溶液の純度及び濃度

品目	商品 番号	新規法				現行法			
		O.D. 260 nm /O.D. 280 nm		抽出DNA原液の DNA濃度(ng/μL)		O.D. 260 nm /O.D. 280 nm		抽出DNA原液の DNA濃度(ng/μL)	
		RUN1	RUN2	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
豆腐	1	1.7	1.8	38.3	45.0	1.8	1.7	13.6	10.3
	2	1.8	1.8	70.5	64.7	1.9	2.0	54.0	6.1
油揚げ	1	2.0	1.8	5.3	52.3	1.9	1.9	13.8	42.1
	2	1.8	1.9	54.0	59.9	2.5	1.9	8.0	19.9
凍豆腐	1	1.6	1.8	53.5	36.1	1.8	1.7	32.9	15.8
	2	1.7	1.8	59.6	33.8	1.7	1.6	18.8	6.0
おから	1	1.7	1.8	31.4	31.1	1.8	3.2	11.3	3.3
	2	1.7	1.7	63.8	69.8	1.3	1.6	6.1	4.4
ゆば	1	1.8	1.9	13.7	12.3	1.4	1.5	4.4	2.3
	2	1.9	1.8	129.4	86.1	1.5	1.8	9.9	1.5
納豆	1	1.5	1.3	15.9	25.1	1.3	1.1	34.9	1.5
	2	1.4	1.3	319.1	11.8	1.0	2.1	2.3	3.8
豆乳類	1	1.8	1.7	50.0	59.1	1.8	1.8	48.6	41.5
	2	1.7	1.8	34.4	34.3	1.8	1.9	40.0	22.2
みそ	1	1.5	1.6	57.3	108.6	1.8	2.0	3.4	3.1
	2	1.5	1.6	101.3	66.7	1.1	1.5	17.2	14.2
大豆煮豆	1	1.6	2.0	24.7	18.8	1.6	1.5	22.1	5.2
	2	1.6	1.6	34.2	21.5	1.7	1.5	6.1	5.1
大豆缶詰	1	2.4	1.7	6.9	19.6	1.8	1.7	15.7	21.1
	2	1.6	1.6	47.7	58.7	1.5	1.5	2.6	24.9
きな粉	1	1.6	1.7	54.9	74.8	1.8	1.8	54.5	84.7
	2	1.7	1.7	54.3	52.4	1.9	1.8	62.8	49.1
大豆もやし	1	1.6	1.7	149.7	62.8	1.9	1.6	1.6	17.4
	2	1.9	1.9	60.3	62.8	2.0	1.9	57.1	62.4
枝豆	1	1.5	1.6	200.8	177.8	1.5	1.7	173.5	121.5
	2	1.9	1.8	128.8	127.1	1.9	1.9	116.5	119.4
魚肉ソー セージ	1	1.6	1.7	65.6	56.0	1.6	1.8	2.8	3.1
	2	1.7	1.7	52.0	23.5	1.8	2.0	46.4	21.2

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となった結果を示し、水色のセルはDNA濃度が10 ng/μL未満となった結果を示す。

3. 2 PCR 産物の検出による比較

新規法及び現行法により抽出した DNA 溶液を用い、*Lel* 遺伝子領域を対象とした PCR 産物の検出結果について図 1 及び表 2 に示す。今回試料とした大豆加工品 28 商品のうち、27 商品で PCR 産物が検出された。両 DNA 抽出法とも検出できなかった商品は、粒納豆であり、ひきわり納豆では検出された。納豆については、これまでの報告^{5,6)}でも、比較的加工条件が緩いとされるひきわり納豆で PCR 産物が検出される可能性があるが、粒納豆では検出されておらず、加工により DNA が断片化され、両 DNA 抽出法ともに検出できなかったものと推測される。*Lel* 遺伝子領域を対象とした PCR 産物の検出に関しては、検出・不検出を含めて新規法と現行法に差は見られなかった。

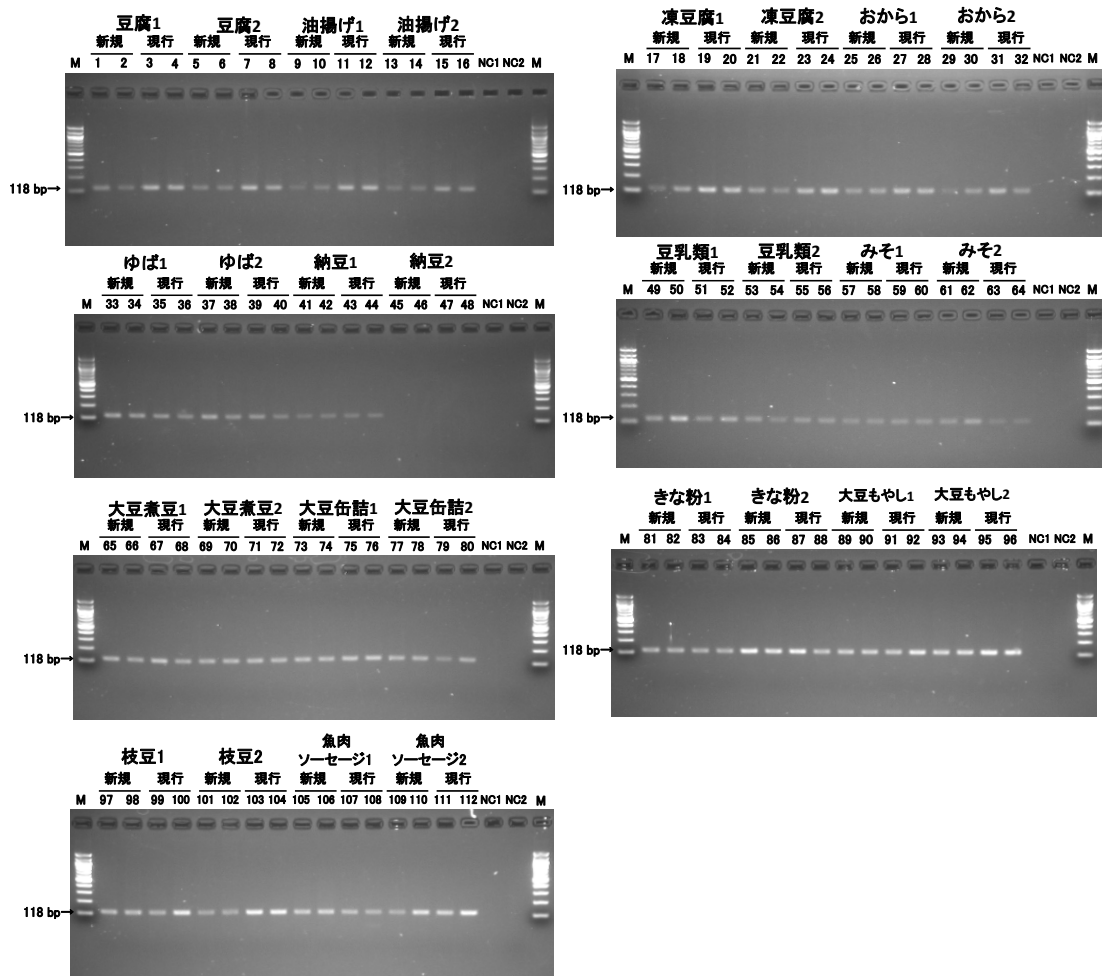


図 1 新規法及び現行法による大豆加工品の電気泳動図

M: 100 bp Ladder; 新規 : GM quicker3 による DNA 抽出法、現行 : DNeasy Plant Max Kit による DNA 抽出法

1 ~ 4:豆腐 1, 5 ~ 8:豆腐 2, 9 ~ 12:油揚げ 1, 13 ~ 16:油揚げ 2, 17 ~ 20:凍豆腐 1, 21 ~ 24:凍豆腐 2, 25 ~ 28:おから 1, 29 ~ 32:おから 2, 33 ~ 36:ゆば 1, 37 ~ 40:ゆば 2, 41 ~ 44:納豆 1 (ひきわり), 45 ~ 48:納豆 2, 49 ~ 52:豆乳類 1, 53 ~ 56:豆乳類 2, 57 ~ 60:みそ 1, 61 ~ 64:みそ 2, 65 ~ 68:大豆煮豆 1, 69 ~ 72:大豆煮豆 2, 73 ~ 76:大豆缶詰 1, 77 ~ 80:大豆缶詰 2, 81 ~ 84:きな粉 1, 85 ~ 88:きな粉 2, 89 ~ 92:大豆もやし 1, 93 ~ 96:大豆もやし 2, 97 ~ 100:枝豆 1, 101 ~ 104:枝豆 2, 105 ~ 108:魚肉ソーセージ 1, 109 ~ 112:魚肉ソーセージ 2, NC1: negative control (no DNA)、NC2: negative control (no primer)

表2 電気泳動結果比較表

品目	商品番号	新規法		現行法		品目	商品番号	新規法		現行法	
		RUN1	RUN2	RUN1	RUN2			RUN1	RUN2		
豆腐	1	+	+	+	+	みそ	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+		2	+	+	+	+
油揚げ	1	+	+	+	+	大豆煮豆	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+		2	+	+	+	+
凍豆腐	1	+	+	+	+	大豆缶詰	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+		2	+	+	+	+
おから	1	+	+	+	+	きな粉	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+		2	+	+	+	+
ゆば	1	+	+	+	+	大豆もやし	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+		2	+	+	+	+
納豆	1	+	+	+	+	枝豆	1	+	+	+	+
	2	-	-	-	-		2	+	+	+	+
豆乳類	1	+	+	+	+	魚肉ソーセージ	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+		2	+	+	+	+

+ : PCR 産物検出、- : DNA 増幅 PCR 産物不検出

4. まとめ

大豆加工品における GM 食品の検査への新規法 (GM quicker 3 よる DNA 抽出法) の適用の可否について、市販の大豆加工品 28 商品を用いて検討した。現行法 (DNeasy Plant Maxi Kit による DNA 抽出法) と (1) 吸光度による抽出 DNA 溶液の純度及び濃度、(2) ダイズ内在性の *LeI* 遺伝子領域を対象とした PCR 産物の検出の 2 項目を比較したところ、新規法は、抽出 DNA 溶液の純度では、大きな差は見られなかったが、DNA 濃度による DNA の収量の比較では、DNeasy Plant Maxi Kit より高い収量となる結果が得られた。

また、*LeI* 遺伝子領域を対象とした PCR 産物の検出では、現行法と大きな差は見られなかった。2 項目の検討では、新規法は従来法と同等以上の結果が得られたため、大豆加工品における GM 食品の検査において、新規法の適用は可能であると考えられた。

5. 謝辞

本研究の実施に当たり、御助言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 (農林水産省告示第 517 号), 農林水産省, 東京, 2000.
- 2) 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 (第 3 版)」. 独立行政法人農林水産消費安全技術センター, さいたま, 2012.

- 3) 安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (消食表第 201 号), 消費者庁, 東京. 2012.
- 4) 則武寛通, 笠原正輝, トウモロコシ加工品の新規 DNA 抽出法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告 2013; **37**: 23-33.
- 5) 森田正品, 田窪健, 栗原秀夫, 遺伝子組換え食品に関する調査研究 (第 2 報) -市販品からの DNA 抽出-. 農林水産消費技術センター調査研究報告 2000; **24**: 53-60.
- 6) 田窪健, 高嶋康晴, 法邑雄司, 大西貢一, 森田正品, 遺伝子組換え食品に関する調査研究 (第 3 報) -市販品からの DNA 抽出-. 農林水産消費技術センター調査研究報告 2001; **25**: 19-30.