

技術レポート**13 稲ワラからのゲノム DNA 抽出法の検討**橋本 仁康^{*1}, 会田 紀雄^{*2}**1 緒 言**

遺伝子組換え技術を用いて開発された作物（GM 作物）は、現在 22 カ国で商業栽培されており、我が国にも、害虫抵抗性や除草剤耐性の性質を付与された GM 作物が、国の審査制度を経て、認可され輸入されている。

我が国で飼料として安全性が認可されていない飼料用 GM 作物の検査は、農林水産消費安全技術センターが行っており、現在は主に、安全性未承認の害虫抵抗性トウモロコシ Bt10 の混入について検査を行っているところである。

平成 17 年 4 月 13 日に環境保護団体であるグリーンピースが、中国湖北省において未承認の害虫抵抗性遺伝子組換え米（Bt GM rice）が栽培、販売されていたと発表し¹⁾、平成 18 年 9 月 5 日には、欧州において中国産米加工品から未承認の遺伝子組換え米が検出されたと発表した²⁾。そして 9 月 27 日には、ドイツ政府が中国産米加工品への Bt GM Rice の混入を確認した³⁾。

我が国においても、食品としての中国産米について、厚生労働省が平成 17 年 4 月より中国産の輸入米の Bt タンパク質の混入検査を開始した⁴⁾。また、ヨーロッパでの混入事例を受けて、平成 18 年 9 月には、中国産米加工品への Bt GM rice の混入検査法を開発し、その混入検査を各検疫所にて開始した⁵⁾。その結果、平成 19 年 1 月に我が国でもコメ加工品（ビーフン等）より Bt GM rice が検出された⁶⁾。

中国産の稲ワラは我が国に飼料用として輸入されていた実績があるが、現在は口蹄疫の影響で輸入が一時停止している。しかし、輸入が再開された場合に備えて、Bt GM rice 由来の稲ワラの検査実施の可能性を検討する必要性が考えられた。しかし、検査に必要な稲ワラからのゲノム抽出法は、現在報告されていないため、EU で公表及び厚生労働省から発出されている米粒からの抽出法^{7), 8)}を参考に、検査のために PCR を行うのに十分な品質と収量を得られる稲ワラからのゲノム DNA の抽出法を検討した。

検討は、GM quicker II（ニッポンジーン製）、ISO PLANT2（ニッポンジーン製）、QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN 製）、QIAGEN Genomic tip 20/G（QIAGEN 製）、の各キット（一部方法を改変したものもある）及び CTAB 法（JAS ハンドブック法）を実施した。その結果、良好な結果が得られた GM quicker II を使用した方法について報告する。

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部，現 （独）農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

^{*2} （独）農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2 実験方法

2.1 試料

平成 18 年度国産稲ワラ (H18 国産), 平成 17 年度国産稲ワラ (H17 国産), 平成 16 年度以前に収去された国産稲ワラ (年度不明国産) 及び輸入一時停止前 (2005 年 5 月) に日本に輸入済みの中国産稲ワラ (中国産) をハサミで 2~3 cm に裁断したものを, 液体窒素で凍結した後, 0.5 mm の網ふるいを通すまでに粉砕した. なお, 粉砕後の試料は -20°C にて保存した.

2.2 試薬

1) 水

水は, 超純水 (比抵抗値 $17\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上精製したもの) を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したもの.

2) ゲノム抽出キット

GM quicker II (ニッポンジーン製)

3) DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 製)

4) プライマー

厚生労働省通知⁸⁾のコメ内在性遺伝子用プライマーセット (SPSF, SPSR)

5) 陽性コントロール

市販の無洗米 (国産) より抽出したゲノム DNA (GM quicker II を用いて抽出) を水で 10ng/mL に希釈したもの

6) イソプロパノール (特級)

7) エタノール (特級)

8) TAE 緩衝液 (pH 8.0)

50 倍 TAE (ニッポンジーン製) を超純水で 50 倍に希釈したもの.

9) アガロースゲル

アガロース S (ニッポンジーン製) 0.8 g 又は 3 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え, 加熱して溶かし, $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ に冷却させた後, ゲルの厚さが $3\sim 4\text{ mm}$ になるようゲル成型に流し込み, 固化させた.

10) DNA サイズマーカー

100 bp Ladder (宝酒造製) 又は λ -Hind III (宝酒造製) を用いた

11) 臭化エチジウム溶液

エチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) (Bio-Rad Laboratories 製) を超純水で 10,000 倍に希釈したもの.

12) ローディングバッファー (宝酒造製)

13) Proteinase K, RNaseA, α -アミラーゼ, GE1 緩衝液, GE2-K 緩衝液, GB3 緩衝液, GW 緩衝液, TE 緩衝液

ゲノム抽出キットに付属のもの.

14) PCR 反応液

1 サンプルあたり, 水 $13.24\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{PCR Buffer II}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP (2 mM each) $2\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 (2.5 mM) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, SPSF (50 μM) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, SPSR (50 μM) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, AmpliTaq Gold $0.16\text{ }\mu\text{L}$ を混合したもの.

2.3 試験方法

1) ゲノム抽出

i) 小スケール

- ① 試料 0.1 g を 2 mL ポリプロピレン製チューブに採取し, GE1 緩衝液 700 μ L, Proteinase K 20 μ L, α -アミラーゼ 2 μ L 及び RNase A 10 μ L をそれぞれ添加し, ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌した.
- ② 65°C で 15 分間加温した後, GE2-K 緩衝液 85 μ L を添加し, ボルテックスミキサーにて攪拌した.
- ③ 氷中にて 10 分間静置した後, 13,000 \times g で 5 分間遠心分離 (室温) した.
- ④ 上清 400 μ L をポリプロピレン製 1.5 mL チューブに移し, 上清の 3/8 倍量の GB3 緩衝液を添加した後, 上清の 3/8 倍量のイソプロパノールを添加し, 液が透明になるまでよく転倒混和した.
- ⑤ ④の混合液を全量キット付属のスピンカラムへ負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑥ GW 緩衝液 650 μ L をスピンカラムに負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑦ スピンカラムを新しいポリプロピレン製 1.5 mL チューブに移し, TE 緩衝液 30 μ L を負荷した.
- ⑧ 室温で 3 分間静置した後, 13,000 \times g で 1 分間遠心分離 (4°C) し, 溶出液をゲノム DNA 抽出原液とした.

ii) 大スケール

- ① 試料 0.2~1.0 g を 50 mL ポリプロピレン製チューブに採取し, GE1 緩衝液 7 mL, Proteinase K 60 μ L, α -アミラーゼ 6 μ L 及び RNase A 30 μ L をそれぞれ添加し, ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌した.
- ② 65°C で 15 分間加温した後, GE2-K 緩衝液 850 μ L を添加し, ボルテックスミキサーにて攪拌した.
- ③ 氷水中にて 10 分間静置した後, 3,000 \times g で 30 分間遠心分離 (室温) した.
- ④ 上清 3,200 μ L をポリプロピレン製 15 mL チューブに移し, 上清の 3/8 倍量の GB3 緩衝液を添加した後, 上清の 3/8 倍量のイソプロパノールを添加し, 液が透明になるまでよく転倒混和した.
- ⑤ ④の混合液に沈殿がある際は, 3,000 \times g で 5 分間遠心分離 (室温) し, 上清をポリプロピレン製 50 mL チューブに移した.
- ⑥ ④の混合液あるいは⑤の上清 700 μ L をキット付属のスピンカラムへ負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑦ ⑥の操作を④の混合液あるいは⑤の上清が無くなるまで繰り返した.
- ⑧ GW 緩衝液 650 μ L をスピンカラムに負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑨ スピンカラムを新しいポリプロピレン製 1.5 mL チューブに移し, TE 緩衝液 50 μ L を負荷した.
- ⑩ 室温で 3 分間静置した後, 13,000 \times g で 1 分間遠心分離 (4°C) し, 溶出液をゲノム DNA

抽出原液とした。

2) ゲノム DNA 抽出原液の濃度測定、純度確認及び DNA の断片化の確認

抽出原液を水で 11 倍に希釈し、分光光度計で 320, 280, 260, 230 nm の波長における吸光度を測定した。320 nm の吸光度をブランク値として、各々の吸光度から差し引いた値を真の吸光度とし、260 nm の吸光度の値が 1 の時の DNA 濃度を 50 ng/μL として DNA 濃度を求めると同時に、(280 nm の吸光度)/(260 nm の吸光度) 及び、(280 nm の吸光度)/(260 nm の吸光度) の値から抽出原液の DNA の純度を確認した。

また、ゲノム DNA 抽出原液 7.5 μL をローディングバッファーと混合した後、0.8%アガロースに注入して電気泳動を行い、抽出ゲノムの断片化の程度を確認した。

3) PCR 反应用 DNA 試料液の調製

ゲノム DNA 抽出原液, ゲノム DNA 抽出原液を水で 10 倍に希釈したもの及びゲノム DNA 抽出原液を水で 10 ng/μL に希釈したものの 3 種類を調製した。

4) PCR 反応

① 100 μL のプラスチック製チューブに PCR 反応液 20 μL 及び DNA 試料液 5 μL を加えたものを PCR 反应用的試料液とした。

② 同様に、PCR 反応液 20 μL 及び国産無洗米由来の DNA 試料液 5 μL を加えたものを陽性コントロール (PC), PCR 反応液 20 μL 及び水 5 μL を加えたものを陰性コントロール (NC) とした。また、同時に、PC の反応液中の SPSF 及び SPSR の代わりに水を添加したものをプライマー未添加陰性コントロール (NPC) とした。

③ 調製した試料液, PC, NC 及び NPC をサーマルサイクラー (Applied Biosystems 製 Gene Amp PCR System9700) に入れ、94°C 10 分間→[94°C 30 秒間→56°C 30 秒間→72°C 30 秒間] (40 サイクル) →72°C 7 分間の反応条件で PCR 反応を行った。

④ 3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、NC と NPC に増幅産物が認められないこと及び PC と比較して目的の PCR 増幅産物 (81 bp) が認められることを確認することにより、抽出したゲノム DNA が PCR に適用可能であることを確認した。

3 結果及び考察

まず、小スケールで 4 種の稲ワラゲノム DNA の抽出を試みた。その結果を表 1 に示した。

260 nm の吸光度より求めた抽出 DNA 量は、841~1,122 ng であり、260/280 の吸光度比も 1.74~1.84 と良好な結果が得られた。また、230 nm における吸光度がマイナスになってしまっているが、この原因は、カラムに AW 緩衝液が残ってしまったことが考えられる。

次に、このゲノム DNA 抽出原液及びゲノム DNA 抽出原液を水で 10 倍希釈したものをテンプレートとして PCR 反応を行い、3%アガロースゲルにて電気泳動を行った。その結果が図 1 である。ゲノム DNA 抽出原液を 10 倍希釈したものをテンプレートとしたもののうち、中国産と年度不明国産で増幅が弱くなっており、ゲノム DNA 抽出原液をそのままテンプレートとしたもののうち、中国産、年度不明国産では増幅が見られなかった。この原因は、二つのサンプルは荒く粉碎した状態で常温にて数年間保管されていたため、DNA の分解が行われているとともに、PCR 反応を阻害する不純物が多く存在しているためと考えられた。

しかしながら、粉碎されずに常温で保管されていた H17 国産と H18 国産のサンプルについては、PC と比べても同程度の DNA の増幅が見られているので、GM quicker II による抽出法が適用できる

ものと考えた。

表1 各稲ワラの小スケール抽出法による抽出結果

試料名	320 nm	280 nm	260 nm	230 nm	260/280の	260/230の	補正後濃 度 (ng/μL)	補正後絶 対量 (ng)
					補正值	補正值		
H17国産	0.001	0.038	0.069	-0.006	1.84	-9.71	37.4	1,122
H18国産	-0.001	0.036	0.067	-0.004	1.84	-22.67	37.4	1,122
年度不明国産	0.002	0.031	0.053	-0.001	1.76	-17.00	28.1	842
中国産	0.005	0.036	0.059	0.002	1.74	-18.00	29.7	891

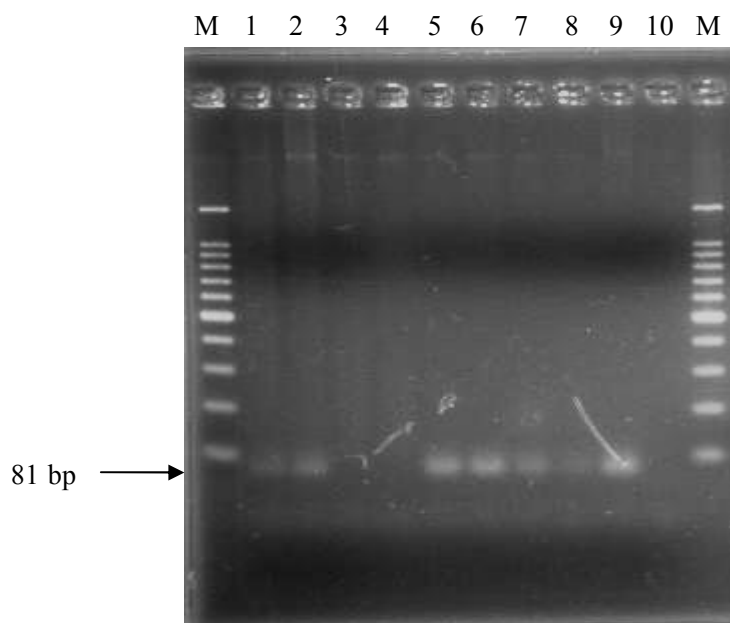


図1 小スケール抽出法による稲ワラ抽出ゲノムのコメ内在性遺伝子をターゲットとしたPCR結果

M : 100 bp ladder standard, レーン 1 : H17 産国産, レーン 2 : H18 産国産, レーン 3 : 年度不明国産, レーン 4 : 中国産, レーン 5 : H17 産国産 (10 倍希釈液), レーン 6 : H18 産国産 (10 倍希釈液), レーン 7 : 年度不明国産 (10 倍希釈液), レーン 8 : 中国産 (10 倍希釈液), レーン 9 : 陽性コントロール

次に、実際に検査法として適用するためには、採取した試料が、そのサンプルを代表するものとならなければならないため、試料採取量を増やす必要がある。そのため、サンプリング量を増やし、抽出液量など全体をスケールアップさせて同一キットでゲノムDNAの抽出を試みた(大スケール)。稲ワラの試料採取量は、0.2 g, 0.5 g, 1.0 g の3種類とし、サンプルはH18国産を用いた。

その結果を表2に示した。

吸光度より求めた抽出DNA量をみると試料採取量0.2 gと0.5 gでは約2倍, 0.5 gと1.0 gでは約1.3倍の違いがみられた。また、DNAの品質では、260/280の吸光度比が1.85~1.88, 260/230の吸光度比が2.36~2.64と良好な結果が得られた。しかし、試料採取量を1.0 gとすると、最初の遠心分離

後に上清を取る作業が困難であったため、通常試験を行う際は、試料採取量を 0.5 g 程度で行うのが妥当であると考えられた。

表 2 H18 国産稲ワラの大スケール抽出法による抽出結果

サンプリング量 (g)	320 nm	280 nm	260 nm	230 nm	260/280の 260/230の		補正後濃度 (ng/μL)	補正後絶対量 (ng)
					補正值	補正值		
0.2	-0.001	0.058	0.11	0.041	1.89	2.64	61.1	3,052
0.5	0.001	0.117	0.218	0.087	1.87	2.52	119	5,995
1.0	0.014	0.161	0.286	0.129	1.85	2.37	150	7,865

これまで行った抽出ゲノムの純度確認は、吸光度比により行ったが、DNA の断片化の問題もあるので、次に、抽出ゲノム DNA 原液を 0.8%アガロースにより電気泳動を行い、ゲノム DNA の断片化の状態を確認した。その泳動図が図 2 である。泳動図より、H17 国産及び H18 国産は、断片化されていないゲノム DNA が認められ、良好な品質であることがわかった。しかし、保存状態が悪かった中国産と年度不明国産については、DNA の断片化が進んでいることが確認された。

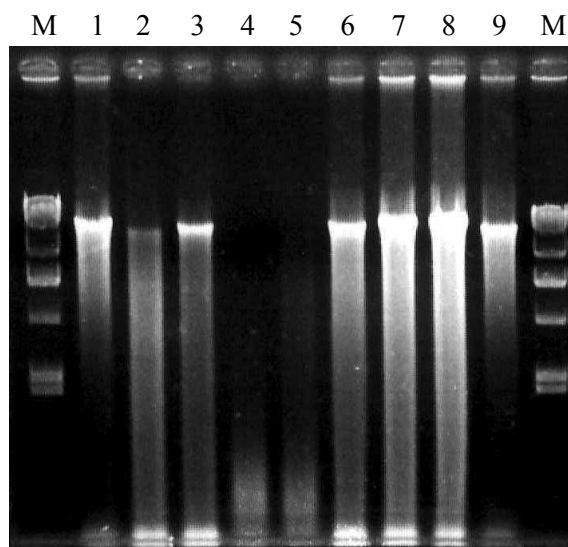


図 2 抽出ゲノムの電気泳動結果

M : λ Hind III standard, レーン 1, 9 : 無洗米, レーン 2 : H17 国産, レーン 3 : H18 国産, レーン 4 : 年度不明国産, レーン 5 : 中国産, レーン 6 : H18 国産 (サンプリング量 0.2 g), レーン 7 : H18 国産 (サンプリング量 0.5 g), レーン 8 : H18 国産 (サンプリング量 1.0 g)

4 まとめ

GM quicker II による稲ワラからのゲノム DNA 抽出の検討を行った結果、比較的新しく、裁断や粉砕などがされていない状態で保管されている稲ワラに関しては、良好な状態のゲノム DNA が抽出でき、PCR 反応も良好に行えた。しかしながら、裁断や粉砕されて室温で保管されていたサンプルについては、吸光度比から見ると良好な状態のゲノム DNA を抽出できているように思われたが、

PCR 反応が良好に行われなかった。

検査分析を行うことになった際に取り扱われると予想される稲ワラは、状態の悪いものが多いと考えられるため、今後、より品質の良い抽出ゲノム DNA が得られるように、更なる改良を行うことが必要であると考えられた。

文 献

- 1) Green peace HP : <http://www.greenpeace.org/international/news/scandal-greenpeace-exposes-il>
- 2) Green peace HP : <http://www.greenpeace.org/international/press/releases/illegal-genetically-engineered>
- 3) European Food Safety Authority : RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED, WEEK 2006/39
- 4) 厚生労働省医薬品食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長通知：“安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品に係る輸入米の検査について”，平成 17 年 4 月 21 日，食安輸発第 0421002 号 (2005).
- 5) 厚生労働省プレスリリース：“中国における安全性未審査の遺伝子組換え米の流通・混入事例について”，平成 17 年 4 月 14 日（平成 19 年 2 月 8 日改訂） (2005).
- 6) 厚生労働省プレスリリース：“安全性未審査の中国産遺伝子組換え米の混入事例について”，平成 19 年 1 月 26 日 (2007).
- 7) European Comission, Joint Research Centre : Sampling and DNA Extraction of Rice
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：“安全性未審査の中国米加工品の検知法について”，平成 19 年 1 月 26 日，食安監発第 0126005 号 (2007).