

200734049A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

超高速・簡便な遺伝子組換え食品の  
新規確定検査法の開発

平成 19 年度 総括研究報告書

(H19-食品-若手-001)

主任研究者 張替 直輝

平成 20(2008)年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

高速・簡便な遺伝子組換え食品の新規確定検査法の開発 張替 直輝	..... 1
------------------------------------	---------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 35
--------------------	----------

総括研究報告書

超高速・簡便な遺伝子組換え食品の新規確定検査法の開発

主任研究者 張替 直輝 武庫川女子大学 薬学部 助手

研究要旨

本研究の目的は、穀物だけでなく加工食品などからも遺伝子組換え食品(GMO)を短時間で簡便に検出できる新規測定法を開発することによって、GMOを使用した食品の正確な情報提供と多くの研究及び検査機関の GMO 検査への参加を促進することである。本研究では、(1) GMO 混入量の重量%算出、(2) 複数遺伝子の同時検出、(3) 加工処理の影響の軽微化、(4) 分析工程の簡略化の 4 項目に着目し、それらの解決法として内部標準法とワンポット PCR 法の開発を行った。

内部標準法では、標準プラスミドを添加した食品サンプルから、DNeasy Plant Mini キットの使用法を一部改変して DNA 抽出を行った。その DNA サンプルを直接定量 PCR で分析し、算出した GMO 遺伝子のコピー数を標準プラスミドのコピー数で補正することで GMO 含有量を算出した。この方法によって、従来の公定法ではできなかった加工食品中の GMO の重量%算出及び DNA 抽出工程の簡略化をすることができた。更に、Duplex 定量 PCR を組み合わせることで、一回の定量 PCR で GMO 遺伝子と標準プラスミドのコピー数を算出することができた。

ワンポット PCR 法では、食品サンプル溶解液を対象遺伝子補足用オリゴが固定された PCR チューブに添加してハイブリダイゼーションにて対象遺伝子を抽出した。更に、その PCR チューブに PCR 試薬を添加して定量 PCR を行った。今回、大豆のレクチン遺伝子にて、固定オリゴの配列及び濃度、ハイブリダイゼーションの時間及び温度、共雑物質の影響、加工処理の影響などの基礎検討を行った。それを元に作成した条件にて、GM 大豆溶解液から GMO 遺伝子を濃度依存的に検出することができた。

この二つの方法は、迅速で簡便だけでなく、穀物や加工食品からの GMO の重量%算出に対しても有用な方法であると考えられる。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

田中 温子 武庫川女子大学薬学部 副手

齋藤 晋 住友ベークライト株式会社 研究員

阿部 碧 住友ベークライト株式会社 研究員

## A. 研究目的

遺伝子組換え食品(GMO)は、食品の生産を量的及び質的に向上させ、食糧の安定供給に貢献している。その安全性は専門家で構成される食品安全委員会で科学的に検証され、平成20年2月現在、審査の手続を経た GMO 数は 88 品種に上る。一方、平成13年から安全性審査を受けた GMO には表示が義務付けられ、また、安全性未審査のものは流通しないよう監視が行われている。この国民の食の安全を守る重要な制度を支えるためにも、増加の一途を辿る GMO に対して、今まで以上の簡易で高精度な検査法が必要である。

その GMO 検査の公定法には、高い特異性と検出感度を兼ね備える PCR 法が使用されている。しかし、一般的に PCR 法は、煩雑で時間のかかる DNA 抽出が必要とされる。また、従来法は、穀物中の GMO の重量%算出には対応できるが、加工食品中の GMO の重量%算出には、加工処理による DNA の断片化<sup>1)</sup>や GMO 遺伝子/内在性遺伝子の比と重量比の違い<sup>2)</sup>などの問題が残っている。そこで本研究は、食品中に存在する GMO の新規測定法の開発にあたり、(1)重量%算出、(2)複数遺伝子の同時検出、(3)加工処理の影響の軽微化、(4)分析工程の簡略化の4項目に着目した。そして、それらの解決法として内部標準法とワンポット PCR 法を考案した。

内部標準法とは、サンプルに添加した標準遺伝子で対象遺伝子の抽出効率及び検出効率を補正するため、対象食品の重量%算出が可能な方法である。また、この方法は、吸光度で DNA の重量及び純度を検討する

必要がないため、短時間でサンプルを調整できる利点もある。一方、ワンポット PCR 法は、非特異的吸着を阻害する S-Bio® PrimeSurface®処理 PCR チューブにオリゴを固定して DNA をハイブリダイゼーションで回収する方法で、一つのチューブでサンプル調整から PCR までを行う非汚染的で簡便なシングルチューブ法に分類される。従来の DNA に対するシングルチューブ法では、酸化アルミニウム膜<sup>3)</sup>や微量の加熱グアニジン溶液<sup>4)</sup>を使用していたが、それらの方法には特殊な装置を必要とすることや微量サンプルしか扱えないことなどの問題点があった。近年、オリゴを固定した磁気ビーズを使用してミルク中のリステリア菌 DNA をハイブリダイゼーションで簡便に回収する方法が報告されている<sup>5)</sup>。これらのことから、ハイブリダイゼーションを利用したシングルチューブ法であるワンポット PCR 法は、共雑物質存在下でも簡便で短時間に安定した DNA 抽出ができる可能性がある。

そこで、本研究では内部標準法とワンポット PCR 法について検討し、食品の GMO 検査への応用を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 内部標準法

#### 1-1. 食品サンプル

GM 大豆標品(0、0.1、0.5、1、5% (w/w) ラウンドアップ・レディー・大豆)は、Fluka から購入した。未加工食品の砂糖、小麦粉、コーンフラワー及び加工食品のチョコレート

ト、クッキー、ポップコーンは、兵庫県内のスーパーマーケットで購入した。それらの食品には、大豆が含まれている記載はなかった。加工食品は AM-3 ホモジナイザー (Nihon Seiki Seisakusho) で粉末にして 5% GM 大豆粉末を加え、終濃度 0.5% GM 大豆混入食品サンプルを作成した。

### 1.2. DNA 抽出

サンプルからの DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini (Qiagen) の方法を改変して行った。サンプル 50 mg に AP1 緩衝液 800  $\mu$ L、RNase A 8  $\mu$ L、ECoRI で直鎖にした  $5.4 \times 10^6$  copy/ $\mu$ L ColE1 プラスミド (Nippon Gene) 2.5  $\mu$ L を添加し、65°C で 30 分間、用時攪拌しながら加温した。加温後、AP2 緩衝液 260  $\mu$ L を加えて氷上で 5 分間放置した。そのサンプルを QIAshredder Mini スピнкаラムに入れて、室温にて 20000 g で 5 分間遠心した。カラムを通過した溶液の上清 200  $\mu$ L に AP3/E 緩衝液 300  $\mu$ L を加えて、DNeasy Mini スピнкаラムに入れて室温にて 6000 g で 1 分間遠心した。そのカラムに AW 緩衝液 500  $\mu$ L を加えて室温にて 20000 g で 1 分間遠心した。もう一度 AW 緩衝液 500  $\mu$ L を加えて室温にて 20000 g で 10 分間遠心した。65°C の Nuclease Free 水 100  $\mu$ L を加えて 5 分間放置後、室温にて 6000 g で 2 分間遠心した。もう一度、65°C の Nuclease Free 水 100  $\mu$ L を加えて同様の操作を行った。抽出された 200  $\mu$ L の DNA 溶液を直接 PCR のサンプルとして使用した。また、溶液の DNA 濃度測定には、Quant-iT Picogreen dsDNA キット (Invitrogen) を使用した。

### 1.3. 定量 PCR

定量 PCR 反応液は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ M プローブ溶液 0.5  $\mu$ L、25  $\mu$ M プライマー溶液 各 0.5  $\mu$ L、Nuclease Free 水 8.5  $\mu$ L、サンプル 2.5  $\mu$ L で調整した。大豆のレクチン遺伝子 (Le1) 及び組換え遺伝子 (RRS) のプライマー及びプローブは、厚生労働省通知法に従った<sup>6)</sup>。ColE1 に対して、フォワードプライマーは 5'-GGGCTA TCTCATTTTGTAGC-3'、リバースプライマーは 5'-ATGCCTGACGCTGATGCTT G-3'、プローブは 5' FAM-TTCTGCTTCCT GCGTCTGCGA-TAMRA 3' を使用した。7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して、50°C 2 分と 95°C 10 分のインキュベーション後、95°C 30 秒と 59°C 60 秒の 40 サイクルで定量 PCR を行った。GM Soybean (RRS) Detection Plasmid セット (Nippon Gene) 及び ColE1 プラスミドで検量線を作成し、コピー数を算出した。各サンプルは 3 回測定した。

### 1.4. Duplex 定量 PCR

定量 PCR 反応液は、QuantiTect Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ M プローブ溶液 各 0.5  $\mu$ L、25  $\mu$ M プライマー溶液 各 0.4  $\mu$ L、Nuclease Free 水 7.4  $\mu$ L、サンプル 2.5  $\mu$ L で調整した。RRS 及び ColE1 のプライマー及びプローブは、上記の定量 PCR と同じ配列を使用した。ColE1 に対するプローブは 5' 末端を Yakima Yellow、3' 末端を Dark Quencher にした。7300 Real-Time PCR System を使用して、50°C 2 分と 95°C 15 分のインキュベ

ーション後、94°C60 秒と 60°C60 秒の 40 サイクルで定量 PCR を行った。GM Soybean (RRS) Detection Plasmid セットは ColE1 に類似したプラスミドで作成されていたので、RRS と ColE1 の両方の標品として使用し、その検量線からコピー数を算出した。各サンプルは 3 回測定した。

## 2. ワンポット PCR 法

### 2-1. オリゴ固定チューブ

S·Bio® PrimeSurface®処理 PCR チューブ (Sumitomo Bakelite) に、オリゴ固定溶液で調整した 10  $\mu$ M の 5'アミノリンカー修飾オリゴを 25  $\mu$ L 添加して、室温で 90 分間放置した。0.1 N NaOH 溶液 300  $\mu$ L を添加して反応を停止後、Nuclease Free 水を添加してチューブを洗浄した。余分な水分を除いて 4°C で保存した。

### 2-2. DNA サンプル

大豆粉末から DNeasy Plant Mini を使用して DNA を抽出し、更に、エタノール沈殿で精製した。DNA 濃度は OD 260 nm あたり 50  $\mu$ g/mL として算出した。Binding 緩衝液 (100 mM Tris HCl buffer (pH8.0)、10 mM CaCl<sub>2</sub>、0.4 M NaCl、0.5% SDS) で DNA 4 ng/ $\mu$ L に調整したサンプルをワンポット PCR で使用した。

### 2-3. 食品抽出液

食品 50 mg に 400  $\mu$ g/mL Proteinase K、200  $\mu$ g/mL RNase A、14 U/ $\mu$ L  $\alpha$ -amylase を含む Binding 緩衝液 980  $\mu$ L を添加し、60°C で 60 分間、用時攪拌しながら加温した。更に 95°C で 5 分加温後、0.5 M EDTA 20  $\mu$ L

を添加して混和し、室温にて 13000 g で 10 分間遠心した。上清を回収し、食品抽出液として使用した。

### 2-4. ワンポット PCR

オリゴ固定チューブに 25  $\mu$ L のサンプルを添加し、95°C で 5 分間熱変性後、50°C で 30 分間ハイブリダイゼーションした。チューブからサンプルを除去後、洗浄液 (10 mM Tris HCl buffer (pH8.0)、1 mM EDTA、0.2 M NaCl) 200  $\mu$ L で 3 回洗浄した。洗浄したチューブに、定量 PCR 試薬 (FastStart Universal Probe Master (Roche) 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ M プローブ溶液 0.5  $\mu$ L、25  $\mu$ M プライマー溶液 各 0.5  $\mu$ L、Nuclease Free 水 11  $\mu$ L) 25  $\mu$ L を添加した。プライマー及びプローブとして、Le1 では Le1n02-5'、Le1n02-3'、Le1-Taq を使用し (Fig. 1)、RRS は上記と同じものを使用した。7300 Real-Time PCR System を使用して、50°C 2 分と 95°C 10 分のインキュベーション後、95°C 30 秒と 59°C 60 秒の 40 サイクルで定量 PCR を行った。GM Soybean (RRS) Detection Plasmid セットを使用してコピー数を算出した。

### 2-5. 配列特異性

公定法で使用されている大豆内在性遺伝子であるレクチンのプライマー並びにプローブ配列、更に、そのフォワードプライマーの 64 塩基上流並びにリバースプライマーの 31 塩基下流の配列を選択した (Fig. 1、Table 1)。ネガティブコントロールとして、トウモロコシ内在性遺伝子であるスターチシンターゼ (SSIIb) のリバースプライマー配列固定チューブ及びオリゴを加えずに

オリゴ固定処理を行ったチューブ(None チューブ)も作成した。

## 2-6. 配列の長さ

Le1n02-3'-a 配列の 5'側の塩基を 8 つ減らした Le1n02-3'-a (-8 mer)と 8 つ増やした Le1n02-3'-a (+8 mer)の固定チューブを作成した(Table 1)。

## 2-7. 固定オリゴ濃度

5'アミノリンカー修飾 Le1n02-3'-a をオリゴ固定溶液で 0.1、1、10  $\mu\text{M}$  に調整し、各溶液を S-Bio® PrimeSurface®処理 PCR チューブに加えて Le1n02-3'-a チューブを作成した。

## 2-8. ハイブリダイゼーション温度

Le1n02-3'-a チューブにサンプル 25  $\mu\text{L}$  を加えて 95°C5 分間の熱変性の後、25、40、50、60°Cの各温度で 30 分間のハイブリダイゼーションを行った。

## 2-9. ハイブリダイゼーション時間

Le1n02-3'-a チューブにサンプル 25  $\mu\text{L}$  を加えて 95°C5 分間の熱変性の後、50°Cで 15、30、60、120 分の各時間でハイブリダイゼーションを行った。

## 2-10. 共雑物質の影響

トウモロコシ及び小麦の抽出液に大豆 DNA を加えて 4 ng/ $\mu\text{L}$  に調整したサンプル 25  $\mu\text{L}$  を Le1n02-3'-a チューブで検討した。コントロールとして、大豆 DNA 4 ng/ $\mu\text{L}$  を Binding 緩衝液で調整したサンプルについても検討した。

## 2-11. DNA を使用した濃度依存

Le1n02-3'-a チューブに DNA 量 10、100、1000 ng の各サンプル 25  $\mu\text{L}$  を加えて検討した。

## 2-12. 大豆抽出液を使用した濃度依存

大豆 50 mg/mL の抽出液を 100%として、Binding 緩衝液で希釈して 0.1、1、10%溶液を作成し、Le1n02-3'-a チューブに各サンプル 25  $\mu\text{L}$  を加えて検討した。

## 2-13. 加熱処理の影響

大豆 50 mg に精製水 375  $\mu\text{L}$  を加え、オートクレーブ KS-323 (TOMY Seiko) にて 110°Cで 30 分及び 60 分間加熱処理をした。そのサンプルに 2 x Binding 緩衝液 375  $\mu\text{L}$  を添加後、Binding 緩衝液で大豆 50 mg/mL に調整した。また、0 分として同様の操作でオートクレーブ処理を行わないサンプルも作成した。Le1n02-3'-a チューブに各サンプル 25  $\mu\text{L}$  を加えて検討した。

## 2-14. GM 大豆への応用

GM 大豆 50 mg/mL の抽出液を 100%として、Binding 緩衝液で希釈して 1%と 10%溶液を作成し、RRS-Taq-s チューブに各サンプル 25  $\mu\text{L}$  を加えて検討した。ハイブリダイゼーションは 60°Cで行った。

## C. 結果・考察

### 1. 内部標準法

#### 1-1. GM 大豆標品を使用した定量性の検討

50 mg の大豆標品から抽出した DNA 量

の平均は、907-1246 ngであった (Table 2)。Le1 と ColE1 のコピー数の平均は、22010-29043 及び 12533-14682 であった。更に、RRS のコピー数は、大豆標品の GM 含有量に依存して増加した。外部精度管理試験の報告では、DNeasy Plant Mini キットを使用した際の GM 大豆標品からの DNA 抽出量は 2-13 µg であった<sup>7)</sup>。今回の研究では、AP1 緩衝液の使用量の増加、QIAshredder Mini スピンカラム処理サンプルの使用量の固定、温めた Nuclease Free 水 100 µL による 2 回溶出などの変更により、DNA の回収量は低下した。しかし、Le1 と ColE1 のコピー数の平均は各サンプル間で大きな差がなく、一定の DNA 回収率に安定させることができた。

RRS/Le1 比及び RRS/ColE1 比は、それぞれ大豆標品の GM 含有量に依存して増加した (Table 3)。GM 含有量と RRS/Le1 比の間には、 $\text{GMO 含有量 (\%)} = 123 \times (\text{RRS/Le1 ratio}) + 0.044$  の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.98 であった (Fig. 2)。また、GM 含有量と RRS/ColE1 比の間においても、 $\text{GMO 含有量 (\%)} = 59.7 \times (\text{RRS/ColE1 ratio}) + 0.072$  の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.97 であった。本方法で得られた値には、DNA 抽出から定量 PCR までの工程のばらつきが含まれていることを考慮すると、高い相関性であると考えられた。更に、RRS/Le1 比は RRS/ColE1 比よりも低い CV 値を示すことから、大豆標品での検討では Le1 の方が精度の高い補正ができると考えられた。

## 1-2. GM 大豆混入食品サンプルを使用した検討

未加工食品サンプルにおいて、抽出 DNA 量は小麦サンプルで 862 ng と大きく、一方、砂糖サンプルで 57 ng と低かった (Table 4)。加工食品サンプルでは、チョコレートサンプルで 68 ng と低かった。これらの結果から、砂糖や脂質などの DNA を含まない材料を多く含む食品では抽出 DNA 量が低いことが示唆された。一方、RRS、Le1、ColE1 のコピー数の平均は、未加工食品サンプルでそれぞれ 49-117、1344-2976、6593-11665 であり、加工食品サンプルでそれぞれ 68-89、2011-3454、11951-12749 であった。このように、各サンプル間において、抽出 DNA 量には大きな差があるが、コピー数には僅かな差しかなかった。更に、RRS/Le1 比と RRS/ColE1 比の平均は、未加工食品サンプルでそれぞれ 0.0336-0.0394 と 0.0076-0.0100 であり、加工食品サンプルでそれぞれ 0.0257-0.0337 と 0.0055-0.0073 であった (Table 5)。このように、RRS のコピー数を Le1 及び ColE1 コピー数で補正することで、各サンプル間の差を少なくすることができた。また、RRS/Le1 比と RRS/ColE1 比の各値の CV 値には大きな差がなく、食品サンプルでの検討では、Le1 と ColE1 とともに同じくらいの精度で補正ができると考えられた。

GM 大豆標品で作成した検量線では RRS/Le1 比と RRS/ColE1 比から算出した GMO 含有量は、未加工食品サンプルでそれぞれ 4.29-5.04% と 0.48-0.63% であり、加工食品サンプルでそれぞれ 3.28-4.30% と 0.35-0.44% であった (Table 5)。このように、RRS/ColE1 比から算出した GMO 含有量は、実際に含まれる GM 含有量である 0.5% に近い値を示した。一方、RRS/Le1 比では、

実際に含まれる GM 含有量の 10 倍に近い値を示し、この値は食品サンプル調整に使用した 5% GM 大豆粉末に依存していると考えられた。

### 1-3. Duplex 定量 PCR

プラスミド標品及び ColE1 を添加した GM 大豆 DNA の PCR 産物を 3%アガロースで電気泳動した結果、RRS 及び ColE1 のバンドが 121 bp と 95 bp に確認された (Fig. 3)。また、プラスミド標品で検量線作成を 3 回検証したところ、両遺伝子ともに直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.99 であった (Fig. 4)。複数の測定対象遺伝子をつ一つの分子に挿入した Multiple-target プラスミドが、操作性だけでなく各遺伝子の増幅効率を同程度にする上でも Multiplex PCR に適しているとされており<sup>8)</sup>、今回、RRS と ColE1 配列の両方を含むプラスミド標品を使用したことが検量線作成の安定に繋がったと考えられた。このように、今回の Duplex 定量 PCR 条件が各遺伝子の定量分析に使用できることが示された。

50 mg の大豆標品から抽出した DNA では、ColE1 のコピー数の平均は 64149-76436 であり、RRS のコピー数は大豆標品の GM 含有量に依存して増加した (Table 6)。更に、GM 含有量と RRS/ColE1 比の間においては、 $\text{GMO 含有量 (\%)} = 48.4 \times (\text{RRS/ColE1 ratio}) + 0.03$  の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.99 であった (Fig. 5)。このように、今回の Duplex 定量 PCR では、上記の各遺伝子を単独で定量 PCR したときよりも、高い相関性が得られることが示された。

食品サンプルにおいて、RRS と ColE1

のコピー数の平均はそれぞれ 283-757 と 36502-86798 であり、RRS/ColE1 比の平均は 0.0064-0.0118 であった (Table 7)。更に、GM 大豆標品で作成した検量線で RRS/ColE1 比から算出した GMO 含有量は 0.34-0.60% であった。また、チョコレートサンプル以外の各サンプルでは、RRS のコピー数よりも RRS/ColE1 比の方が低い CV 値を示すことから、Duplex 定量 PCR においても ColE1 による補正が有用であることが示唆された。

## 2. ワンポット PCR 法の開発

### 2-1. 配列特異性

使用した配列の塩基数は 19-26 で GC 含有率は 50-68% であった。各配列のセンス及びアンチセンスの両方を検討した。大豆 DNA を使用した検討で、レクチン配列を固定した各チューブでは定量 PCR でいずれも Le1 を検出できたが、SSIIb3-3'チューブ及び None チューブでは検出できなかった (Table 8)。更に、いずれの配列でもセンス及びアンチセンスの片方のみがコピー数が大きく、その値は 69 から 110 コピーで各配列間に大きな差はなかった。これらのことから、チューブに固定したオリゴは配列特異的に DNA を捕獲し、その捕獲能は、今回の配列選択条件の範囲内においては、配列の位置及び GC 含有率への依存度が低い可能性が示唆された。今回の結果では 5'側ではセンス鎖、3'側ではアンチセンス鎖で捕獲能が高いことから、一定領域の DNA の立体構造がセンス及びアンチセンスのどちらか片方の結合能を高めている可能性などが考えられるが、立証には更に多くの検

証が必要である。一方、定量 PCR のプライマー及びプローブである Le1n02-5'-s、Le1-Taqs、Le1n02-3'-a の配列を固定したチューブを使用しても検出には問題がなかった。今回、10  $\mu$ M オリゴ溶液でチューブにオリゴを固定しているが実際に固定で使用されるのはそのごく一部で、その結果、0.5 及び 0.2  $\mu$ M のプライマー及びプローブが存在する PCR 溶液に対する影響が少ないことが考えられた。また、今回使用した大豆 DNA 100 ng を直接定量 PCR で測定した場合のコピー数が 9068 であることから、今回の検討で最も大きい 110 コピーであった Le1n02-3'-a チューブの DNA 回収率は 1.2%であった。この Le1n02-3'-a チューブを他の基礎検討に使用した。

## 2.2. 配列の長さ

Le1n02-3'-a から 8 塩基減らした 11 塩基の配列及び 8 塩基増やした 27 塩基の配列ともに、Le1 のコピー数は減少した (Table 9)。このことから、固定オリゴの配列にはハイブリダイゼーションに至適な長さが存在することが示唆された。

## 2.3. 固定オリゴ濃度

固定したオリゴ濃度に依存して Le1 のコピー数が増加したことから、高濃度でオリゴを固定した方が良いことが示唆された (Table 10)。しかし、100  $\mu$ M では溶液が白濁し、更に、それでチューブを作成しても 10  $\mu$ M で作成したチューブと大きな差はなかった (data not shown)。従って、チューブへのオリゴ固定には 10  $\mu$ M オリゴ溶液が良いと考えられた。

## 2.4. ハイブリダイゼーション温度

25°C では Le1 のコピー数は少ないが、40 及び 50°C と上昇させることでコピー数が増加した (Table 11)。しかし、60°C では 50°C に比べてコピー数が減少した。このことから、オリゴ固定チューブを使用したハイブリダイゼーションには至適温度が存在することが示唆された。従って、今回の Le1n02-3'-a チューブを使用した他の基礎検討において、50°C の条件を使用した。

## 2.5. ハイブリダイゼーション時間

ハイブリダイゼーション 15 分でも Le1 が検出され、時間が長くなるに伴いコピー数の増加が認められた (Table 12)。Le1 のコピー数は 15 分と 120 分で 1.7 倍の差しかないことから、短時間でも十分 DNA が捕獲できることが示唆された。従って、短時間で標準偏差も低い 30 分のハイブリダイゼーション時間を他の基礎検討で使用した。

## 2.6. 共雑物質の影響

定量 PCR で算出した Le1 のコピー数は小麦抽出液サンプルで一番大きかった (Table 13)。しかし、そのコピー数はコントロールサンプルの 1.4 倍の差しかなかった。このことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は精製された DNA サンプルだけでなく、共雑物質を含む食品抽出液にも応用できることが示唆された。

## 2.7. DNA を使用した濃度依存

サンプルの DNA 量に依存して Le1 のコピー数は増加した (Table 14)。サンプルの DNA 重量 (ng) と Ct 値には、 $Ct = -3.41 \times \log \text{DNA} + 39.19$  の直線式が成り立ち、相

関係数(r)は0.99であった。これらのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は添加したDNA量に依存した検出が可能で、定量分析に応用できることが示唆された。

#### 2-8. 大豆抽出液を使用した濃度依存

大豆抽出液の濃度に依存してLe1のコピー数は増加した (Table 15)。大豆抽出液の%濃度(C)とCt値には、 $Ct = -3.14 \times \log C + 35.19$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は0.99であった。これらのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は、精製されたDNAサンプルだけでなく、食品サンプルの定量分析においても適応できることが示唆された。

#### 2-9. 加熱処理の影響

加熱処理サンプルではLe1のコピー数は、0分に比べて30分処理で4.5倍、60分処理で2.2倍に増加した (Table 16)。これらのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は加熱処理食品サンプルからの遺伝子検出が可能であるが、定量値が過大に評価される可能性があることが示唆された。頻用されているシリカゲルカラム法やCTAB法では加熱処理でDNAが断片化するとコピー数が低下することが報告されている。一方、DNA同士のハイブリダイゼーション効率は、一般的にDNAの大きさが小さい方が良いとされている。今回のオリゴ固定チューブではハイブリダイゼーションを利用するため、適度に断片化したDNAの補足率が高いのではないかと考えられた。

#### 2-10. GM大豆への応用

GM大豆抽出液の濃度に依存してRRS遺

伝子のコピー数は増加した (Table 17)。GM大豆抽出液の%濃度(C)とCt値には、 $Ct = -4.49 \times \log C + 39.53$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は0.99であった。これらのことから、オリゴ固定チューブを使用した方法は、対象遺伝子にあったオリゴを固定することで、遺伝子組換え食品の検出にも応用できることが示唆された。一方、今回固定したオリゴではPCRの増幅効率が若干低下することから、別の配列の固定についても、今後検討する予定である。

### D. 結論

#### 1. 内部標準法

遺伝子による食品中のGMO含有量の算出には、従来、組換え遺伝子と内在性遺伝子のコピー数の比率が使用されてきた<sup>6)</sup>。しかし、今回、同じGMO含有量にも関わらず各食品サンプルで抽出DNA量が大きく異なることやGMO遺伝子と内在性遺伝子のコピー数の比率では実際の食品中のGMO含有量が算出できないことが明らかになった。それらの検討から、組換え遺伝子と内在性遺伝子のコピー数の比率を使用する方法を多様な加工食品に適応する上で以下の2つの問題が定義された。

(1)GMO以外の食品由来DNAの多い場合には定量PCRでの検出感度が低下し、逆に少ない場合では検出感度が高くなる。

(2)食品中のGMO含有量がGMO遺伝子量だけでなく、補正に使用する内在性遺伝子の量にも依存する。

それらの問題を解決する方法として、今

回、添加標品として一般的に使われている 6646 bp の適度な大きさの ColE1 プラスミド、及び、一般的に使われている DNA 抽出法で食品間の DNA 抽出効率のばらつきが少ないシリカゲルカラム法<sup>9)</sup>を使った内部標準法を検討した。その内部標準法では、抽出 DNA の吸光度測定が不要で、更に実際の食品サンプル中の GMO 含有量に近い値を算出できることが明らかになった。また、今回の内部標準法の Duplex 定量 PCR 法では、操作や試薬コストの軽減だけでなく、各遺伝子を単独で定量 PCR する方法と同等以上の精度がある有用な方法であることが明らかになった。

## 2. ワンポット PCR 法

今回、ワンポット PCR 法の開発にあたり、大豆レクチン遺伝子を対象として基礎検討を行った。その結果、ワンポット PCR 法を使用する上で重要な以下の 3 つの基礎データを得た。

(1) 固定配列として、PCR 増幅領域の上流 60 塩基及び下流 30 塩基の範囲、塩基数 19-26、GC 含有率 50-68% の条件において、各配列のセンス及びアンチセンスの片方のみが DNA の高い捕獲率を示す。

(2) ハイブリダイゼーションには至適温度が存在する。

(3) ハイブリダイゼーションは 15 分程度の短時間でも認められる。

また、本方法を食品に応用する上で重要な以下の 4 つの特徴が明らかになった。

(1) DNA の回収率が 1% 程度である。

(2) 対象食品抽出液 0.1-100% の間で定量性がある。

(3) 食品由来の共雑物質の存在下でも安定した DNA 回収ができる。

(4) 加熱処理食品からでも検出できるが過大評価になる場合がある。

大豆レクチン遺伝子による基礎検討を GM 大豆に応用した結果、RRS において GM 大豆抽出液の 1-100% の間で定量性を得ることができた。このように、溶解した食品サンプルのワンポット PCR 法による新規 GMO 検出法を開発することができた。今回は、多様な食品サンプルに対応するため溶解条件を 65 分にしたが 35 分でも十分に溶解できる食品も存在した。また、DNA のハイブリダイゼーションも今回は 30 分にしたが 15 分でも DNA を捕獲できた。今回開発したワンポット PCR 法は、現時点でも十分に迅速で簡便な遺伝子検出方法であるが、更に迅速にできる可能性がある。一方、対象食品や固定配列ごとに定量性の差があること、多様な食品の中には DNA のハイブリダイゼーションを阻害する共雑物質が存在すること、加工処理の条件で検出感度に変化することなどの可能性が考えられる。従って、本方法を更に有用に使用するためにも、今後も多くの検証例を増やして、より詳細な特徴を明らかにして行くことが重要である。

## 3. 総括

今回、穀物だけでなく加工食品などからも GMO 検出することができる新規測定法の開発にあたり、(1)重量%算出、(2)複数遺伝子の同時検出、(3)加工処理の影響の軽微化、(4)分析工程の簡略化の 4 項目に着目し、内部標準法とワンポット PCR 法の開発を

行った。内部標準法では、従来から使用されているシリカゲルカラムの DNA 抽出法を改変し、上記の(1)、(2)、(4)を実現し、ワンポット PCR 法では上記の(1)、(3)、(4)を実現した。これらの方法は、GMO を使用した食品の正確な情報提供と多くの研究及び検査機関の検査への参加を促進するものと思われる。

また、この両方法で共通することは、DNA 抽出条件を精査することで、従来法で行っていた吸光度測定による抽出 DNA 重量及び純度の算出が不要となり、重量%算出が可能になったことである。高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーなどの機器分析ではサンプル抽出が安定しているため、分析前に抽出後のサンプルの質を検討することはほとんどない。近年、高品質の DNA が安定して抽出できる試薬並びにキットが販売されて来ており、今後は、定量 PCR 前に DNA サンプルの重量及び純度の検討を必要としない本研究に準じた遺伝子検査法が、主流に成り得る可能性があると考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Yoshimura, T., Kuribara, H., Matsuoka, T., Kodama, T., Iida, M., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Furui, S., Hino, A. Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2052-9 (2005).
- 2) Berdal, KG., Holst-Jensen, A. Roundup Ready soybean event-specific real-time

quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis. *Eur. Food Res. Technol.*, 213, 432-438 (2001).

- 3) Dames, S., Bromley, LK., Herrmann, M., Elgort, M., Erali, M., Smith, R., Voelkerding, KV. A single-tube nucleic acid extraction, amplification, and detection method using aluminum oxide. *J. Mol. Diagn.*, 8(1), 16-21 (2006).

- 4) Hartshorn, C., Anshelevich, A., Wangh, LJ. Rapid, single-tube method for quantitative preparation and analysis of RNA and DNA in samples as small as one cell. *BMC Biotechnol.*, 5, 2 (2005).

- 5) Amagliani, G., Omiccioli, E., Campo, A., Bruce, IJ., Brandi, G., Magnani, M. Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for *Listeria monocytogenes* direct detection in milk samples. *J. Appl. Microbiol.*, 100(2), 375-83 (2006).

- 6) Notification No. 110 (2001), Director-General of Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

- 7) Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T. Laboratory performance study of the quantitative detection method for genetically modified soybeans (roundup ready soybeans 40-3-2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 46(6), 270-6 (2005).

- 8) Taverniers, I., Van Bockstaele, E., De

Loose M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. Anal. Bioanal. Chem. 378(5), 1198-207 (2004).

9) Peano, C., Samson, MC., Palmieri, L., Gulli, M., Marmiroli, N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. J. Agric. Food Chem., 52(23), 6962-8 (2004).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

（論文発表）

Harikai, N., Saito, S., Kinoshita, K. An internal standard method to assay the amount of genetically modified soybean in food samples by real-time PCR. submitted.

（学会発表）

張替直輝. 標準添加法を使用した遺伝子組み換え食品の新規検出法の開発. 第 128 年会日本薬学会 横浜 (2008).

GACGCTATTGTGACCTCCTCGGGAAAGTTACAACTCAATAAGGTTGACGAAAACGGCACC  
Upstream  
CCAAAACCCTCGTCTCTTGGTCGCGCCCTCTACTCCACCCCA TCCACATTGGGACAAA  
Le1n02-5'  
GAAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCACCTTCTATGCCCCTGAC  
Le1-Taq  
ACAAAAGGCTTGCAGATGGGCTTGCCTTCTTCTCGCACCAATTGACACTAA GCCACAA  
Le1n02-3'  
ACACATGCAGGTT  
Downstream

Fig. 1. Positioning of capture oligos and PCR primers and probe in the lectin gene.

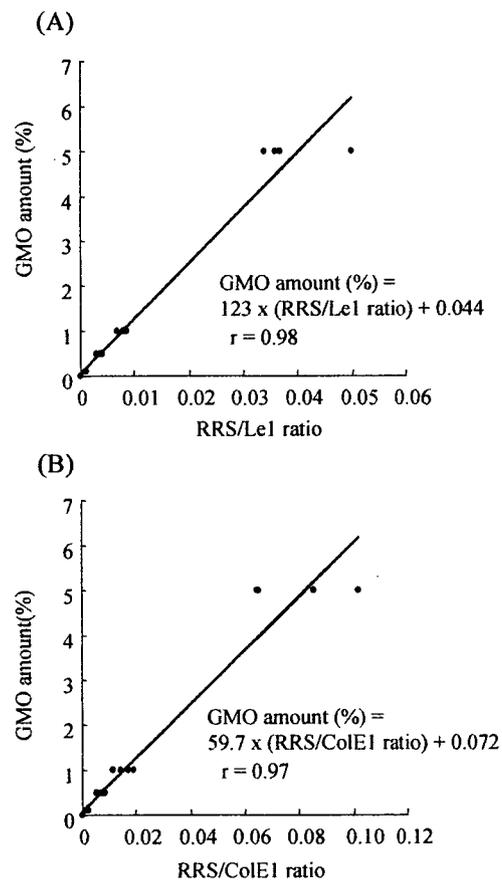


Fig. 2. Correlations between the GMO amount and the RRS/Le1 ratio (A) or the RRS/ColE1 (B) ratio. The lines represent the least squares regression line.

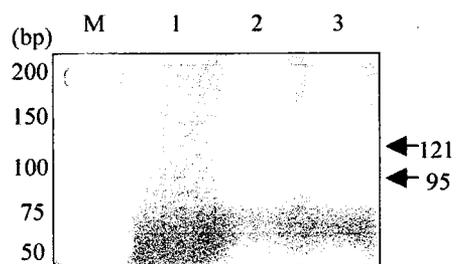


Fig. 3. Agarose gel (3%) electrophoretic analysis of the duplex real-time PCR products, which detected RRS and ColE1.

M: maker, lane 1: none, lane 2: 250000 copies of the standard plasmid, lane 3: 15 ng of DNA extracted from 5% GM soybean spiked with ColE1.

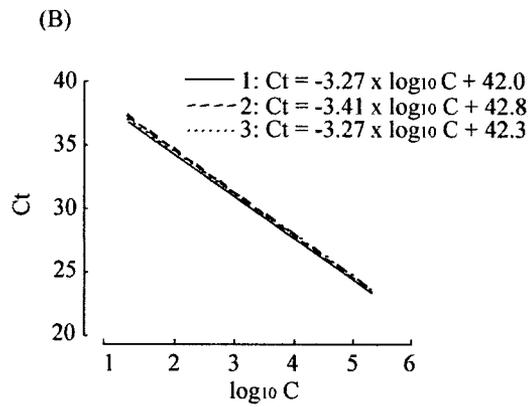
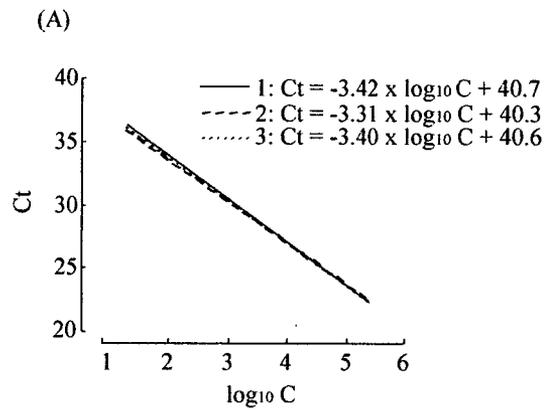


Fig. 4. Calibration curves for RRS (A) and ColE1 (B) generated from three independent runs of a duplex real-time PCR in the standard plasmid containing 20, 125, 1500, 20000, 250000 copies.

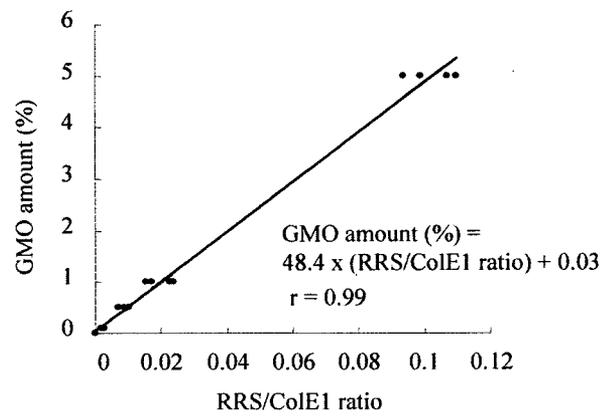


Fig. 5. Correlations between the GMO amount and the RRS/ColE1 (B) ratio. The lines represent the least squares regression line.

Table 1. List of capture oligos for the PrimeSurface treated tube

Name	Orientation	Sequence
Upstream-s	sense	5'-NH <sub>2</sub> -GACGCTATTGTGACCTCCTC-3'
Upstream-a	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -GAGGAGGTCAACAATAGCGTC-3'
Le1n02-5'-s	sense	5'-NH <sub>2</sub> -GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'
Le1n02-5'-a	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -TGGGGGTGGAGTAGAGGGC-3'
Le1-Taq-s	sense	5'-NH <sub>2</sub> -AGCTTCGCCCGCTTCCTTCAACTTCAC-3'
Le1-Taq-a	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -GTGAAGTTGAAGGAAGCGGGAAGCT-3'
Le1n02-3'-s	sense	5'-NH <sub>2</sub> -AAAAGGCTTGCAGATGGGC-3'
Le1n02-3'-a	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -GCCCATCTGCAAGCCTTTT-3'
Downstream-s	sense	5'-NH <sub>2</sub> -GTCGTCGCTGTTGAGTTTGA-3'
Downstream-a	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -TCAAACTCAACAGCGACGAC-3'
Le1n02-3'-a(-8 mer)	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -GCAAGCCTTTT-3'
Le1n02-3'-a(+8 mer)	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCCTTTT-3'
SSIIb3-3'	antisense	5'-NH <sub>2</sub> -GATCAGCTTTGGGTCCCGA-3'
RRS-Taq-s	sense	5'-NH <sub>2</sub> -CGCAACCGCCCGCAAATCC-3'