

200837035A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

(H19-食品-若手-001)

研究代表者 張替 直輝

平成 21 (2009) 年 3 月

目次

I. 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 — 1

研究代表者：張替 直輝（武庫川女子大学薬学部）

II. 分担研究報告書

1. ワンポット PCR 法：オリゴ固定 PCR チューブを使用した大豆および
遺伝子組換え大豆の定量 PCR 法 — 8

研究分担者：齋藤 晋（住友ベークライト株式会社）

2. PCR-multiple primer extension (MPEX) 法：遺伝子組換えトウ
モロコシと遺伝子組換え大豆に対するプラスチック基板上での
プライマー伸長反応を使用した複数遺伝子の同時検出法 — 26

研究分担者：阿部 碧（住友ベークライト株式会社）

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 — 34

- IV. 研究成果の刊行物・印刷物 — 34

I. 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

研究代表者 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、遺伝子組換え食品(GMO)を短時間で簡便に検出できる新規検査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)分析工程の簡略化、(2)食品中のGMOの重量%算出、(3)加工処理の影響の軽微化、(4)複数遺伝子の同時検出、(5)可視での検出の5項目に着目し、それらの解決法を検討している。本年度は、ワンポットPCR法とPCR-multiple primer extension (MPEX)法の開発を行った。

ワンポットPCR法は、対象遺伝子を捕捉できるオリゴを固定したPCRチューブを使用することで、ハイブリダイゼーションによる対象遺伝子の抽出と定量PCRによる検出を一つのチューブで行う方法である。今回、まず始めに大豆レクチン遺伝子(Le1)を実験対象として、チューブに固定するオリゴの配列や濃度、ハイブリダイゼーションの温度や時間などの基礎検討を行った。その最適化された条件では、1-100%の大豆溶解液からLe1を定量的に検出でき、更に大豆DNAを小麦やトウモロコシの溶解液に混和したサンプルからもLe1を検出することができた。そこで、遺伝子組換え(GM)大豆の組換え遺伝子(RRS)を捕獲するオリゴを固定したPCRチューブを作製して、GM大豆検出に応用した。その結果、1-100%のGM大豆溶解液からRRSを定量的に検出することができ、更に市販の1、2、5%w/wのGM大豆標品を使用した検討でも定量的な検出が確認できた。

PCR-MPEX法は、DNAサンプルからMultiplex PCRで対象遺伝子を増幅し、そのPCR産物をDNAポリメラーゼの伸長反応にて検出するDNAマイクロアレイ法である。今回、トウモロコシと大豆の種特異的遺伝子、GMOの構造特異的配列(Event176, Mon810, Bt11, GA21, T25 トウモロコシ、ラウンドアップレディー大豆)に対応するオリゴを固定したプレートを作製した。食品から抽出したDNAからこの8種類の遺伝子をMultiplex PCRで増幅し、そのPCR産物をそのプレートで発色反応にて検出した。この方法によって、GMトウモロコシ5品目とGM大豆1品目に対してGMO含有量1%まで判定することができた。

ワンポットPCR法では食品溶解液をオリゴ固定チューブに添加して30分間インキュベートし、そのチューブを3回洗浄してPCR試薬を添加するだけで定量PCRを行うことができた。また、PCR-MPEX法では、従来のマイクロアレイで1-18時間かかるハイブリダ

イゼーション工程を伸長反応にすることで 3 分にすることができた。このように、今回開発した 2 つの方法は、短時間で簡便な GMO 検査法を提供することができた。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

齋藤 晋 住友ベークライト株式会社 研究員

阿部 豊 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、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。この増加の一途を辿る GMO に対して、今まで以上に簡便で高精度な検査法、更には、複数の GMO を同時検出できる検査法が必要とされている。

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た 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 抽出が必要である。更に、加工食品では、加工処理による DNA の断片化などの問題が残っている。一方、複数の遺伝子を同時検出できる DNA マイクロアレーを GMO 検査に応用する試みもされているが、高価なレーザースキャナが必要であることや操作が煩雑で時間がかかることが問題である。

そこで本研究では、食品に存在する GMO

の新規検査法の開発にあたり、(1) 分析工程の簡略化、(2) 食品中の GMO の重量%算出、(3) 加工処理の影響の軽微化、(4) 複数遺伝子の同時検出、(5) 可視での検出の 5 項目の解決を目指している。本年度は、それらの解決法として、ワンポット PCR 法と PCR-multiple primer extension (MPEX) 法に着目した。

ワンポット PCR 法とは、対象遺伝子を補足するオリゴを固定した PCR チューブを使用することで、DNA 抽出から定量 PCR までを一つのチューブで行う方法である。この方法は、非汚染的で簡便な方法とされるシングルチューブ法に分類される。

PCR-MPEX 法は、従来の DNA マイクロアレーで長時間を要するハイブリダイゼーション反応を短時間の DNA ポリメラーゼ伸長反応にした方法である。この方法は容易に発色反応にすることもできるので、複数の GMO を可視で同時に検出できると考えられる。

今回、ワンポット PCR 法と PCR-MPEX 法を食品に存在する GMO の検査法に応用した。

B. 研究方法

B-1. ワンポット PCR 法

大豆 DNA は大豆粉末から DNeasy Plant Mini (Qiagen) で抽出し、Binding 緩衝液 (100 mM tris HCl buffer (pH8.0)、10 mM CaCl₂、0.4 M NaCl、0.5% SDS) で DNA 4 ng/μL に調整してワンポット PCR に使用した。食品溶解液の作製にあたり、食品 50 mg に 400 μg/mL Proteinase K、200 μg/mL RNase A、14 U/μL α-amylase を含む Binding 緩衝液 980 μL を添加して 60°C で 60 分間加温した。更に 95°C で 5 分間加温後、0.5 M EDTA 20 μL を添加して遠心し、その上清を食品溶解液として使用した。

オリゴ固定チューブの作製では、活性エステル基をもつ 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 μM 5' アミノリンカー修飾オリゴ溶液を添加して、室温で 90 分間放置した。反応停止後、Nuclease Free 水で洗浄し、乾かしたチューブを使用した。

オリゴ固定チューブに 25 μL 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。チューブを洗浄液 (10 mM Tris HCl buffer (pH8.0)、1 mM EDTA、0.2 M NaCl) 200 μL 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 μL、10 μM プローブ溶液 0.5 μL、25 μM プライマー溶液 各 0.5 μL、Nuclease Free 水 11 μL) 25 μL を添加した。大豆レクチン遺伝子 (Le1) と遺伝子組換え (GM) 大豆の組換え遺伝子 (RRS) に対するプライマーとプローブは報告されている配列を使用した²⁾。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) を使用してコピー数を算出した。

本研究では、まず、固定するオリゴの配列の位置、長さ、固定する際の濃度などのチューブ作製条件とハイブリダイゼーションの温度や時間などの反応条件を検討した。そして、最適化された条件にて、定量性や食品マトリックスの影響を検討し、更には、GM 大豆検出に応用した。

B-2. PCR-MPEX 法

1、5%w/w の Event176、Mon810、Bt11、GA21 (GA21 は 1、4.3%w/w を使用) の GM トウモロコシ粉末及びブラウンドアップレディー大豆粉末を使用した。各粉末から DNeasy Plant Mini キットで抽出した DNA を Multiplex PCR に使用した。また、T25 トウモロコシは、非組換えトウモロコシと GM トウモロコシの DNA 比率として、1、5% のサンプルを使用した。

Multiplex PCR 反応液 25 μL は、QuantiTect Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) 12.5 μL、0.05 μM SSIIb、Event176、Bt11 プライマー、0.1 μM Le1、RRS、Mon810、T25 プライマー、0.5 μM GA21 プライマー、DNA サンプル 100 ng、Nuclease Free 水で調整した。各プライマーは報告されているものを使用した^{2,3)}。GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) 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°C 60 秒

と 61°C60 秒の 35 サイクルで反応した。

プレートに固定するオリゴは、主に定量 PCR のプローブの配列を使用し^{2,3)}、SSII についてはその配列から微調整したものを使用した。オリゴ固定プレートの作製では、S-Bio* PrimeSurface*処理プラスチックプレート(Sumitomo Bakelite)に、オリゴ固定溶液で調整した 10 μM 5'アミノリンカー修飾オリゴ溶液をスポットして、室温で 3 時間放置した。反応停止後、Nuclease Free 水で洗浄し、乾かしたプレートを使用した。

伸長反応液 50 μL は、5U TERMIPol DNA polymerase (Solis Biodyne)、1×緩衝液 C、2 mM MgCl₂、50 μg/mL salmon sperm DNA、0.05% triton-X 100、100 μM dATP、100 μM dGTP、100 μM dCTP、65 μM dTTP、35 μM biotin-11-dUTP、PCR 産物 5 μL、Nuclease Free 水で調整した。95°Cで 5 分間加熱後、72°Cに温めたオリゴ固定プレートに添加し、溶液の上にカバーを乗せた状態で 72°C3 分間反応した。プレートを洗浄液 1 (0.1% triton X-100・50 mM tris buffer (pH 7.5))と洗浄液 2 (50 mM tris buffer (pH 7.5))で洗浄し、あらかじめ作成しておいたアルカリフォスファターゼ結合ビオチン・アビジン複合体溶液 (VectaStain ABC-AP kit、Vector Laboratories)を添加して 37°C20 分間反応した。プレートを洗浄液 1 と洗浄液 2 で洗浄し、NBT/BCIP 溶液(Roche)を添加して、37°C10 分間反応した。プレートを精製水で洗浄後、乾かして発色したスポットを確認した。

C. 研究の結果・考察

C-1. ワンポット PCR 法

C1-1. Le1 を実験対象にした条件検討

大豆 DNA サンプルで Le1 を対象にして、固定オリゴの条件を検討した結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 配列位置の影響は少ない
- 2) センスとアンチセンスで挙動が異なる
- 3) 20 塩基程度が最適な長さである
- 4) 固定濃度が濃いほど回収が高い
- 5) DNA 回収率は 1%程度である

また、ハイブリダイゼーション条件を検討した結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 50°Cが至適温度である
- 2) 時間は 15-30 分でも十分である

これらの結果から、Le1n02-3'a オリゴ (Le1 の PCR プライマーのリバース配列)を 10 μM 溶液で固定した PCR チューブを使用して、50°C30 分のハイブリダイゼーションが Le1 検出に適していると考えられた。

C1-2. 食品分析への応用

Le1n02-3'a チューブを使用して定量性について検討した。大豆 DNA 10-1000 ng において、DNA 重量 (ng)と Ct 値には $Ct = -3.41 \times \log DNA + 39.19$ の直線式が成り立ち、相関係数(r)は 0.99 であった。更に、50 mg/mL 大豆溶解液を 100%とした 1-100% の大豆溶解液においても、大豆溶解液の濃度(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。従って、ワンポット PCR 法は、精製 DNA だけでなく、食品溶解液においても定量性があることが示唆された。

食品マトリックスの影響を検討するため、

小麦とトウモロコシ溶解液に大豆 DNA を混和したサンプルで検討した結果、大豆 DNA のみのサンプルと比べて、Le1 コピー数は最大で 1.4 倍程度の差しかなかった。従って、大豆以外の食品溶解液からも検出できることが示唆された。

加工食品への適応性を検討するため、110℃で 30 分と 60 分処理した大豆サンプルで検討した結果、Le1 コピー数は、処理 0 分に比べて処理 30 分で 4.5 倍、処理 60 分で 2.2 倍に増加した。従って、加熱処理食品からの検出はできるが、定量値が過大評価される可能性があることが示唆された。

C1-3. GM 大豆検出への応用

GM 大豆を捕獲するための RRS-5'short-s チューブを作成し、50 mg/mL GM 大豆溶解液を 100%とした 1:100%の大豆溶解液で検討した結果、GM 大豆溶解液の濃度(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。更に、市販の 1、2、5%w/w GM 大豆標品の 50 mg/mL 溶解液で検討したところ、17、30、63 コピーと GMO 含有量に依存した検出が可能であった。従って、ワンポット PCR 法は、GMO の検出にも応用できることが示唆された。

C-2. PCR-MPEX 法

非組換えトウモロコシと非組換え大豆の DNA では、それぞれ種特異的遺伝子の Le1 と SSIb のスポットのみに発色が認められた。従って、これらは、このマイクロアレイにおけるポジティブコントロールになる

と考えられた。更に、1、5%w/w の GM トウモロコシ(GA21 は 1、4.3%w/w。T25 は DNA 比率として 1、5%。)及び GM 大豆の標品から抽出した DNA では、各対応するスポットで発色が認められた。また、5 種類の GM トウモロコシの DNA を各 1%含むサンプルでも、対応する 5 カ所のスポットで発色が認められた。これらのことから、伸長反応を利用した DNA マイクロアレイによって、短時間で簡便に複数の GMO 遺伝子を可視で同時検出できることが示唆された。

D. 結論

ワンポット PCR 法では、食品溶解液から短時間で簡便に対象遺伝子を定量できた。また、定量性には問題は残るが、加工処理したサンプルからも検出が可能であった。そして、実際に GM 大豆の定量分析が可能であった。今後、感度や加工食品への適応性について、更なる改良が必要である。

PCR-MPEX 法では、GMO を判定するための 8 種類の配列を可視で同時検出できる方法を開発した。その結果、GM トウモロコシ 5 品目と GM 大豆 1 品目の 1%GMO 含有サンプルを判定することができた。また、この方法は伸長反応を使用することで極めて短時間であった。今回、DNA サンプルの増幅法として、簡便な Multiplex PCR を使用したが、精度の高い増幅法と組み合わせることで、定量性や感度の向上が期待できると思われる。

本研究では、GMO の新規検査法として、(1) 分析工程の簡略化、(2) 食品中の GMO

の重量%算出、(3) 加工処理の影響の軽微化、(4) 複数遺伝子の同時検出、(5) 可視での検出の5項目が解決できる方法を模索してきた。今回開発した2つの方法は、各々それらの幾つかの項目を満たす方法である。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GMO検査への参加を促進するものと思われる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 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) Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirao T, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, 85(5), 1077-89 (2002).
- 3) Xu J, Zhu S, Miao H, Huang W, Qiu M, Huang Y, Fu X, Li Y. Event-specific detection of seven genetically modified soybean and maizes using multiplex-PCR

coupled with oligonucleotide microarray. *J. Agric. Food Chem.*, 55(14), 5575-9 (2007).

G. 研究発表

(論文発表)

Harikai N, Saito S, Abe M, Kondo K, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Kinoshita K. A real-time PCR method using capture oligo-immobilized PCR tubes to determine the specific gene for soybean and genetically modified soybean in food matrices. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(11), 2953-2958 (2008).

Tanaka A, Harikai N, Saito S, Yakabe T, Funaoka S, Yokoyama K, Fujiwara K, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. All-in-one tube method for quantitative gene expression analysis in oligo-dT30 immobilized PCR tube coated with MPC polymer. *Anal. Sci.*, 25(1), 109-114 (2009).

Harikai N, Saito S, Tanaka A, Kinoshita K. Determination of unprocessed genetically modified soybean in foods using simplex and duplex real-time PCR with an internal standard. 投稿中.

Harikai N, Saito S, Tanaka A, Kinoshita K. Gene expression assay in blood and various tissues by a single-tube real-time RT-PCR method using an oligo-dT immobilized PCR tube. 投稿中.

学学会学術大会 (2009). 発表予定.

Harikai N, Saito S, Abe M, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Kinoshita K. Optical detection of specific genes for genetically modified soybean and maize using multiplex PCR coupled with primer extension on a plastic plate. 投稿中.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

(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).

張替直輝, 穂山 浩, 近藤一成, 手島玲子, 木下健司. Duplex real-time PCR を使用した内部標準法による遺伝子組換え大豆の検出. 第 14 回 日本食品化学学会学術大会 (2008).

張替直輝, 齋藤 晋, 阿部 碧, 近藤一成, 橋田和美, 穂山 浩, 手島玲子, 木下健司. 大豆及び遺伝子組換え大豆のオリゴ固定 PCR チューブを使用した定量 PCR 法. 第 129 年会日本薬学会 京都 (2009).

山田千尋, 穂山 浩, 中村文美, 中島 治, 張替直輝, 古井 聡, 橋田和美, 川上 浩, 手島玲子. 未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング検知法について. 第 15 回 日本食品化学学会学術大会 (2009). 発表予定.

張替直輝, 齋藤 晋, 阿部 碧, 近藤一成, 橋田和美, 穂山 浩, 手島玲子, 木下健司, 吉田雄三. プラスチック基板上におけるプライマー伸長反応を用いた遺伝子組換え食品の同時可視検出法. 第 15 回 日本食品化

II. 分担研究報告書

1. ワンポット PCR 法：オリゴ固定 PCR チューブを使用した 大豆および遺伝子組換え大豆の定量 PCR 法

研究分担者 齋藤 晋 住友ベークライト株式会社 研究員

研究要旨

本研究の目的は、食品中の遺伝子組換え食品(GMO)を短時間で簡便に検出できるワンポット PCR 法を開発することである。GMO 検査法には、一般的に高い感度と特異性を備えた PCR 法が使用されている。しかし、PCR 法には、煩雑な操作で長時間を要する DNA 抽出が必要である。更に、一部の DNA 抽出法では有機溶媒を必要とする。これらの問題を解決することは、検査機関の負担軽減に繋がる。

簡便な方法の一つとして、ハイブリダイゼーションを利用した方法が挙げられる。更に、シングルチューブ法と呼ばれる一つのチューブで DNA 抽出から測定までを行える方法は、非汚染的で簡便な操作が期待できる。そこで、本研究では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 法を GMO 検査に応用した。

ワンポット PCR 法では、捕獲オリゴ固定 PCR チューブに添加した食品溶解液から対象遺伝子をハイブリダイゼーションで抽出し、その PCR チューブに PCR 試薬を添加して定量 PCR することで対象遺伝子を検出する。今回、大豆レクチン遺伝子の捕獲オリゴ固定チューブにて基礎検討を行い、固定オリゴの配列や濃度、ハイブリダイゼーションの温度や時間などの設定条件を明らかにした。その条件を遺伝子組換え(GM)大豆検出に応用し、組換え遺伝子の捕獲オリゴ固定チューブを使用して、GM 大豆溶解液から組換え遺伝子を定量的に検出することができた。

今回、オリゴ固定チューブに食品溶解液を添加して 30 分間インキュベートし、チューブを 3 回洗浄後、定量 PCR を行うという短時間で簡便なワンポット PCR 法による GMO 検査法を提供することができた。更に、この方法は、対象遺伝子に適したオリゴをチューブに固定することで他の食品分析にも応用できるものと考えられる。

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、今まで以上の簡便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た 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、加工処理による DNA の断片化で検出率が低下する。それらの解決法として、短時間で簡便に断片化 DNA を回収できる可能性があるハイブリダイゼーションを利用した方法が挙げられる。実際の例としては、オリゴ固定ビーズを使用した方法が報告されている²⁾。また、一つのチューブで、DNA 抽出から定量 PCR 測定までを行うシングルチューブ法は、操作が簡便で非汚染的である^{3,4)}。

これらのことから、Fig.1 に示したように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、短時間で簡便な遺伝子検出法になる可能性がある。そこで本研究では、対象遺伝子を捕獲するオリゴを内壁に固定した PCR チューブを使用して、食品溶解液から対象遺伝子を検出する試みを行った。まず、大豆レクチン遺伝子(Lc1)を実験対象にして、PCR チューブに固定する捕獲オリゴの条件やサンプルのハイブリダイゼーション条件を検討した。そして、その基礎条件を元に、ワンポット PCR 法を遺伝子組換え(GM)大豆検出に応用した。

B. 研究方法

B-1. サンプル

非組換え大豆、小麦、トウモロコシは兵庫県内のスーパーマーケットで購入し、AM-3 ホモジナイザー(Nihon Seiki Seisakusho)で粉末にした。GM 大豆標品(1、2、5%w/w ラウンドアップレディー大豆)は、Fluka から購入した。

B-2. 大豆 DNA

大豆粉末から DNeasy Plant Mini kit (Qiagen)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 µg/mL として算出した。Binding 緩衝液(100 mM Tris HCl buffer (pH8.0)、10 mM CaCl₂、0.4 M NaCl、0.5% SDS)で DNA 4 ng/µL に調整したサンプルをワンポット PCR で使用した。

B-3. 食品溶解液

食品 50 mg に 400 µg/mL Proteinase K、200 µg/mL RNase A、14 U/µL α-amylase を含む Binding 緩衝液 980 µL 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 µL 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、食品溶解液として使用した。

B-4. オリゴ固定チューブ

活性エステル基をもつ 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 µM の 5'アミノリンカー修飾

オリゴを 25 μ L 添加して、室温で 90 分間放置した。0.1 N NaOH 溶液 300 μ 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。

B-5. ワンポット PCR

オリゴ固定チューブに 25 μ 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 μ 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 μ L, 10 μ M プローブ溶液 0.5 μ L, 25 μ M プライマー溶液 各 0.5 μ L, Nuclease Free 水 11 μ L) 25 μ L を添加した。プライマーとプローブは、Le1 については Fig. 2 で示した配列を使用し、GM 大豆の組換え遺伝子 (RRS) については報告されている配列を使用した⁵⁾。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) を使用してコピー数を算出した。

B-6. 固定オリゴの条件

Le1 を対象として固定オリゴの条件を検討した。まず、配列の位置の影響を検討するため、プライマー、プローブ、フォワードプライマーの 64 塩基上流、リバースプライマーの 31 塩基下流の配列を選択した (Fig. 2, Table 1)。また、ネガティブコント

ロールとして、トウモロコシの種特異的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) でも検討した。

配列の長さの影響を検討するため、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) の固定チューブで検討した。

固定する際のオリゴ濃度の影響を検討するため、Le1n02-3'a の 0.1、1、10 μ M オリゴ溶液を調整し、各濃度でオリゴ固定チューブを作製して検討した。

B-7. ハイブリダイゼーション条件

Le1n02-3'a 固定チューブに大豆 DNA サンプルを加えて 95°C 5 分間の熱変性後、25、40、50、60°C で 30 分間ハイブリダイゼーションして温度の影響を検討した。更に、50°C で 15、30、60、120 分間ハイブリダイゼーションして時間の影響を検討した。

B-8. 定量性の検討

Le1n02-3'a 固定チューブに大豆 DNA 10、100、1000 ng を加えて定量性を検討した。更に、50 mg/mL 大豆溶解液を 100% として Binding 緩衝液で希釈した 1% と 10% 溶液のサンプルでも、定量性を検討した。

B-9. 食品マトリックスの影響

トウモロコシと小麦の溶解液に大豆 DNA を加えて 4 ng/ μ L に調整したサンプルを Le1n02-3'a 固定チューブに添加して、それらの食品マトリックスの影響を検討し

た。コントロールとして、大豆 DNA 4 ng/ μ L を Binding 緩衝液で調整したサンプルについても検討した。

B-10. 加熱処理サンプルでの検討

大豆 50 mg に精製水 375 μ 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 μ 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。各溶解サンプルを作製して、Le1n02-3'a 固定チューブに添加して検討した。

B-11. GM 大豆への応用

50 mg/mL GM 大豆溶解液を 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 固定チューブに添加して検討した。更に、1、2、5% の GM 大豆標品の各 50 mg/mL 溶解液でも検討した。また、この際のハイブリダイゼーションは 60°C で行った。

C. 結果・考察

C-1. 固定オリゴの条件

Le1 を対象として、固定オリゴの条件を検討した。配列位置の検討で使用した 5 つの配列の塩基数は 19-26 で GC 含有率は 50-68% であった。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 Le1 が検出されたが、SSIIb3-3' 固定チューブ及びオリゴ未固定チューブでは検出さ

れなかった (Table 2)。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 を捕獲していると考えられた。また、今回の配列選択条件の範囲内において、配列の位置や GC 含有率がその捕獲能に与える影響は少ないと考えられた。今回の検討では 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 固定チューブの DNA 回収率は 1.2% であった。この Le1n02-3'a 固定チューブを他の基礎検討にも使用した。

固定オリゴの長さの検討として、Le1n02-3'a から 8 塩基減らした 11 塩基の配列と 8 塩基増やした 27 塩基の配列を固定したチューブを作製した。しかし、共に Le1 のコピー数は減少した (Table 3)。このことから、固定オリゴには至適の長さが存在することが示唆された。

最後にチューブに固定する際のオリゴ濃度について検討した。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 3)。しかし、100 μ M では溶液が白濁し、更に、それで作製したチューブは 10 μ M で作製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 μ Mオリゴ溶液が良いと考えられた。

C-2. ハイブリダイゼーション条件

Le1n02-3'a 固定チューブと大豆DNAを使用して、ハイブリダイゼーション温度について検討したところ、25°CではLe1のコピー数は少ないが、40°Cさらに50°Cと上昇させることでコピー数が増加した(Table 4)。しかし、60°Cでは50°Cに比べてコピー数が減少した。従って、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。

更に、ハイブリダイゼーション時間についても検討したところ、15分で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 4)。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、短時間でも十分にDNAが捕獲できることが示唆された。従って、Le1n02-3'a 固定チューブでは、50°Cで15-30分程度の短時間のハイブリダイゼーション条件が適切であると考えられた。

C-3. 定量性の検討

Le1n02-3'a 固定チューブに大豆DNA溶液を添加して検討したところ、DNA量に依存してLe1のコピー数は増加した(Table 5)。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。また、大豆溶解液についても、濃度依存的にLe1のコピー数は増加し、大豆溶解液の%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、DNAだけでなく食品溶解液のサンプルでも対象遺伝子を定量的に検出できることが示唆された。

C-4. 食品マトリックスの影響

小麦とトウモロコシの溶解液に大豆DNAを添加したサンプルにおいても、Le1n02-3'a 固定チューブでLe1を検出することができた(Table 6)。各サンプル間の値の差は1.4倍程度しかなく、オリゴ固定チューブを使用した方法は食品マトリックス存在下でも対象遺伝子を検出することができることが示された。

C-5. 加熱処理サンプルでの検討

加熱処理大豆サンプルの溶解液をLe1n02-3'a 固定チューブに添加して検討したところ、Le1のコピー数は0分比べて30分処理で4.5倍、60分処理で2.2倍に増加した(Table 7)。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から遺伝子を検出することはできるが、その定量値は過大評価にな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⁹⁾。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⁶⁾。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、適度に断片化されたDNAの方が補足され易いのではないかと考えられた。

C-6. GM大豆への応用

RRS-5'short-s 固定チューブにGM大豆

溶解液を添加して検討したところ、濃度依存的に RRS のコピー数は増加した (Table 8)。GM 大豆溶解液の濃度 (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。更に、1、2、5% の GM 大豆標品の各 50 mg/mL 溶解液でも検討したところ、RRS のコピー数は 17、30、63 と GM 大豆含量に依存した値を示した (Table 9)。これらのことから、ワンポット PCR 法は、GMO 検出にも応用できることが示唆された。

D. 結論

ワンポット PCR 法の基礎検討の結果、使用する上で重要な以下の 3 つの知見を得た。

- (1) 固定オリゴがセンスとアンチセンスで検出率が異なる。
- (2) ハイブリダイゼーションに至適温度が存在する。
- (3) ハイブリダイゼーションは 15-30 分でも十分である。

また、本方法を食品分析に応用する上で重要な以下の 3 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) 食品溶解液から対象遺伝子を定量的に検出できる。
- (3) 加熱処理食品からも検出できるが過大評価になる場合がある。

このワンポット PCR 法は、食品溶解液から定量 PCR を行うまでの工程が 40 分程度で、更に操作も簡便である。そして、測定対象にあったオリゴをチューブに固定することで、様々な食品分析に応用できると思われる。

本研究では、このワンポット PCR 法を使用することで、短時間で簡便な GM 大豆の検査法を提供することができた。今後、感度や加工食品への適応性を改善することで、より有用な方法になると考えられる。

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) 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).
- 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) Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirao T,

Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, 85(5), 1077-89 (2002).

6) Liu WT, Guo H, Wu JH. Effects of target length on the hybridization efficiency and specificity of rRNA-based oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(1), 73-82 (2007).

F. 研究発表

(論文発表)

Harikai N, Saito S, Abe M, Kondo K, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Kinoshita K. A real-time PCR method using capture oligo-immobilized PCR tubes to determine the specific gene for soybean and genetically modified soybean in food matrices. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(11), 2953-2958 (2008).

Tanaka A, Harikai N, Saito S, Yakabe T, Funaoka S, Yokoyama K, Fujiwara K, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. All-in-one tube method for quantitative gene expression analysis in oligo-dT30 immobilized PCR tube coated with MPC polymer. *Anal. Sci.*, 25(1), 109-114 (2009).

Harikai N, Saito S, Tanaka A, Kinoshita K. Determination of unprocessed genetically modified soybean in foods using simplex and duplex real-time PCR

with an internal standard. 投稿中.

Harikai N, Saito S, Tanaka A, Kinoshita K. Gene expression assay in blood and various tissues by a single-tube real-time RT-PCR method using an oligo-dT immobilized PCR tube. 投稿中.

Harikai N, Saito S, Abe M, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Kinoshita K. Optical detection of specific genes for genetically modified soybean and maize using multiplex PCR coupled with primer extension on a plastic plate. 投稿中.

(学会発表)

張替直輝, 齋藤 晋, 阿部 碧, 近藤一成, 橘田和美, 穂山 浩, 手島玲子, 木下健司. 大豆及び遺伝子組換え大豆のオリゴ固定 PCR チューブを使用した定量 PCR 法. 第 129 年会日本薬学会 京都 (2009).

張替直輝, 齋藤 晋, 阿部 碧, 近藤一成, 橘田和美, 穂山 浩, 手島玲子, 木下健司, 吉田雄三. プラスチック基板上におけるプライマー伸長反応を用いた遺伝子組換え食品の同時可視検出法. 第 15 回 日本食品化学学会学術大会 (2009). 発表予定.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

Table 1. List of capturing oligos

Capturing oligo	Orientation	Sequence
Upstream-s ^a	sense	5'-NH ₂ -GACGCTATTGTGACCTCCTC-3'
Upstream-a ^a	antisense	5'-NH ₂ -GAGGAGGTCACAATAGCGTC-3'
Le1n02-5'-s ^a	sense	5'-NH ₂ -GCCCTCTACTCCACCCCA-3'
Le1n02-5'-a ^a	antisense	5'-NH ₂ -TGGGGGTGGAGTAGAGGGC-3'
Le1-Taq-s ^a	sense	5'-NH ₂ -AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-3'
Le1-Taq-a ^a	antisense	5'-NH ₂ -GTGAAGTTGAAGGAAGCGGCGAAGCT-3'
Le1n02-3'-s ^a	sense	5'-NH ₂ -AAAAGGCTTGCAGATGGGC-3'
Le1n02-3'-a ^{a, b}	antisense	5'-NH ₂ -GCCCATCTGCAAGCCTTTT-3'
Downstream-s ^{a)}	sense	5'-NH ₂ -GTCGTCGCTGTTGAGTTTGA-3'
Downstream-a ^{a)}	antisense	5'-NH ₂ -TCAAACCAACAGCGACGAC-3'
Le1n02-3'-a(-8 mer) ^b	antisense	5'-NH ₂ -GCAAGCCTTTT-3'
Le1n02-3'-a(+8 mer) ^b	antisense	5'-NH ₂ -GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCCTTTT-3'
SSIIb3-3' ^c	antisense	5'-NH ₂ -GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'
RRS-5'short-s ^d	sense	5'-NH ₂ -CCTTTAGGATTTTCAGCATCA-3'

^a Capturing oligos for *Le1* used to investigate the optimal location to bind target DNA.

^b Capturing oligos for *Le1* used to investigate the optimal length of the capturing oligo.

^c Capturing oligo for the starch synthase IIb gene in maize (negative control oligo).

^d Capturing oligo for *RRS*.

Table 2. Ct values and copy numbers measured for *Le1* from 100 ng of soybean DNA using different capturing oligos

Capturing oligo	Ct value	Copy number
Upstream-s	34.2 ± 0.5	71 ± 23
Upstream-a	36.4 ± 0.5	15 ± 4
Le1n02-5'-s	33.9 ± 0.3	83 ± 14
Le1n02-5'-a	39.0 ± 0.4	3 ± 1
Le1-Taq-s	34.2 ± 0.2	69 ± 11
Le1-Taq-a	36.7 ± 1.0	13 ± 6
Le1n02-3'-s	36.8 ± 0.4	12 ± 3
Le1n02-3'-a	33.5 ± 0.2	110 ± 16
Downstream-s	36.6 ± 0.4	13 ± 4
Downstream-a	34.0 ± 0.2	76 ± 10
SSIIb3-3'	ND	ND
None	ND	ND

None, no oligo was immobilized on the tube.

Data are mean values ± SD ($n=4$).

ND, not detected

Table 3. Ct values and copy numbers measured for *Lel* from 100 ng of soybean DNA using capture oligos with different lengths and concentrations

Capture oligo	Ct value	Copy number
Oligo length		
Le1n02-3'-a (-8 mer)	36.8 ± 0.5	14 ± 4
Le1n02-3'-a	33.1 ± 0.1	157 ± 12
Le1n02-3'-a (+8 mer)	35.6 ± 0.5	32 ± 10
Oligo concentration		
0.1 uM Le1n02-3'-a	39.1 ± 1.0	2 ± 1
1.0 uM Le1n02-3'-a	35.9 ± 0.5	12 ± 4
10 uM Le1n02-3'-a	32.8 ± 0.4	101 ± 28

Data are mean values ± SD ($n=4$).

Table 4. Effects of different incubation temperatures and times on Ct values and copy numbers measured for *Le1* from 100 ng soybean DNA using Le1n02-3'-a-immobilized tubes

Hybridization conditions	Ct value	Copy number
Temperature (°C)		
25	35.1 ± 0.2	40 ± 5
40	33.5 ± 0.4	115 ± 35
50	32.9 ± 0.4	169 ± 43
60	33.6 ± 0.3	104 ± 22
Time (min)		
15	33.7 ± 0.5	111 ± 35
30	33.6 ± 0.2	119 ± 16
60	33.2 ± 0.2	151 ± 15
120	32.9 ± 0.3	185 ± 33

Data are mean values ± SD ($n=4$).