

市販トウモロコシ半加工品中のリコンビナント DNA の混入率について

Amount of Recombinant DNA from Half-processed Maize on the Market

鈴木 智宏 久保亜希子 孝口 裕一
加藤 芳伸 澤田 幸治

Tomohiro SUZUKI, Akiko KUBO, Hirokazu KOUGUCHI,
Yoshinobu KATOH and Yukiharu SAWADA

最近、遺伝子組換え食品が流通するようになり、厚生労働省は平成13年4月より遺伝子組換え食品の安全性審査及び表示の義務化を行うこととした¹⁾。このことから、遺伝子組換え体が5%を超えて混入している場合には遺伝子組換え体使用の表示をしなければならなくなった。そこで、表示内容が適正であるかを確認するために遺伝子組換え体を定量する必要がでてきた。現在のところ、遺伝子組換え体の絶対量を定量することは技術的に困難であるため、試料固有の遺伝子（内在性遺伝子）と組換え遺伝子（リコンビナント DNA）の存在比により遺伝子組換え体の混入率を算出することとなっている²⁾。

DNA の定量には TaqMan-PCR 法が使用されている。この方法は蛍光標識したプローブを用い PCR (Polymerase Chain Reaction) による標的 DNA の増幅過程で発せられる蛍光の強度をリアルタイムで検出して DNA のコピー数の定量を行う。この定量 PCR は高感度で、しかも精度良く定量することができる。

著者らは、これまでリコンビナント DNA を標的とした PCR による遺伝子組換え体の検知法の確立を試みてきた。前報では遺伝子組換えサイズのリコンビナント DNA の検知について報告した³⁾。今回は TaqMan-PCR により道内で市販されているトウモロコシ半加工品について遺伝子組換え体混入率を調べたので報告する。

方 法

1. 試料及び試薬

トウモロコシは、道内で市販されているトウモロコシの半加工品（コーンフラワー、コーングリッツ、コーンミールのそれぞれ1試料、原産国：米国）を使用した。

2. トウモロコシ DNA の精製

トウモロコシ半加工品 2 g を 50 mL チューブにとり、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて DNA を抽出、精製した。DNA 溶出液は 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し、DNA の純度と濃度を算出した後、10 ng/ μ L と 20 ng/ μ L の各 DNA 溶液を調製して -30°C で保存した。

3. PCR 用プライマー

PCR に用いたプライマーを Table 1 に示した。表示したプライマーによりトウモロコシゲノム DNA に内在的に含まれるスターチシンターゼ IIb (SSIIb) 遺伝子と遺伝子組換えトウモロコシに組み込まれているカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター (CaMV35S) 及び除草剤ラウンドアップ（主成分グリホサート）耐性の *Agrobacterium tumefaciens* 由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS: GA21) 遺伝子を増幅した。プライマーはいずれもニッポンジーン社製を

Table 1 PCR Primers^{2,4)} for Amplifications of Recombinant DNA

Primer	Sequence	Product length (bp)
SSIIb-F	5'-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3'	151
SSIIb-R	5'-TCGATTTCTCTCTTGGTGACAGG-3'	
CaMV35S-F	5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'	101
CaMV35S-R	5'-CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT-3'	
GA21-F	5'-GAAGCCTCGGCAACGTCA-3'	133
GA21-R	5'-ATCCGGTTGGAAAGCGACTT-3'	

用いた。

4. 定性 PCR

PCR 反応には AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社製) を使用した。DNA の増幅のための PCR 反応液は、DNA 溶液 (10 ng/ μ L) 2.5 μ L に10 \times 緩衝液 2.5 μ L, dNTPs (2 μ mol/mL) 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mM) 1.5 μ L, センス及びアンチセンスプライマー対混合液 (各25 μ M) 0.2 μ L, AmpliTaq Gold (5 Units/ μ L) 0.125 μ L, を加えて滅菌蒸留水にて全量を25 μ Lとした。PCR 反応は95 $^{\circ}$ C で10分間保った後、95 $^{\circ}$ C 30秒間、60 $^{\circ}$ C 30秒間、72 $^{\circ}$ C 30秒間を1サイクルとして40サイクル、最後に72 $^{\circ}$ C 7分間の条件で行った。

5. 定量 PCR

定量 PCR には、遺伝子組換えトウモロコシ検出用 TaqMan Probe とプライマー (ニッポンジーン社製) を用いた。また、TaqMan Universal Master Mix は Applied Biosystems 社製を使用した。定量 PCR 反応液は、1 \times TaqMan Universal Master Mix, 0.5 μ M センスプライマー, 0.5 μ M アンチセンスプライマー, 0.2 μ M TaqMan Probe (CaMV35S の場合は0.1 μ M), DNA 50 ng となるように調製した。これを内在性遺伝子定量及びリコンビナント DNA 定量それぞれについて3ウエルに分注した。定量 PCR 条件及びデータ解析は、厚生労働省の組換え DNA 技術応用食品の検査法⁵⁾ 及び農林水産省消費技術センターの JAS 分析試験ハンドブック²⁾ に従い、ABI PRISM 7700 (PE-Biosystems 社製) で定量した。なお、組換え体混入率は以下の式に従って算出した。

$$\begin{aligned} \text{含有率(\%)} &= (\text{リコンビナント DNA コピー数} / \text{内在性} \\ &\quad \text{遺伝子コピー数}) \times (100 / \text{内標比}) \\ \text{内標比} & [(\text{組換え遺伝子}) / (\text{内在性遺伝子})] : \\ &\quad \text{CaMV35S (0.39), GA21 (1.40)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{試料における組換え体混入率(\%)} \\ &= \text{CaMV35S 含有率(\%)} + \text{GA21含有率(\%)} \end{aligned}$$

結果及び考察

市販のトウモロコシ半加工品粉末から抽出・精製した DNA の電気泳動写真を Fig. 1 に示した。また、抽出した DNA 溶液の波長260 nm 及び280 nm における吸光度から算出した DNA の純度及び回収量を Table 2 に示した (なお、DNA 濃度は1.0 OD₂₆₀=50 μ g/mL として算出した)。回収 DNA の純度は1.9~2.2の範囲であり、定量 PCR を行うには必要な純度の DNA が得られた。

これら DNA を鋳型として、トウモロコシに内在的に含まれる SSIIB 遺伝子と遺伝子組換え体に組み込まれている CaMV35S 及び GA21 遺伝子の定性 PCR を行った結果を Fig. 2 に示した。GA21 に由来する DNA 断片は認められなかったが、SSIIB の151 bp, CaMV35S の101 bp バンドが確認された。このことから、今回分析に使用した市販ト

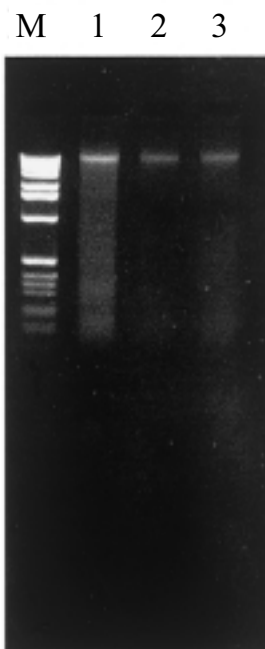


Fig. 1 Agarose Gel Electrophoregram of DNA Purified from Maize Using DNeasy Plant Mini Kit

Lane 1: DNA from corn flour, Lane 2: DNA from corn grits, Lane 3: DNA from corn meal, M: Kb ladder size standard

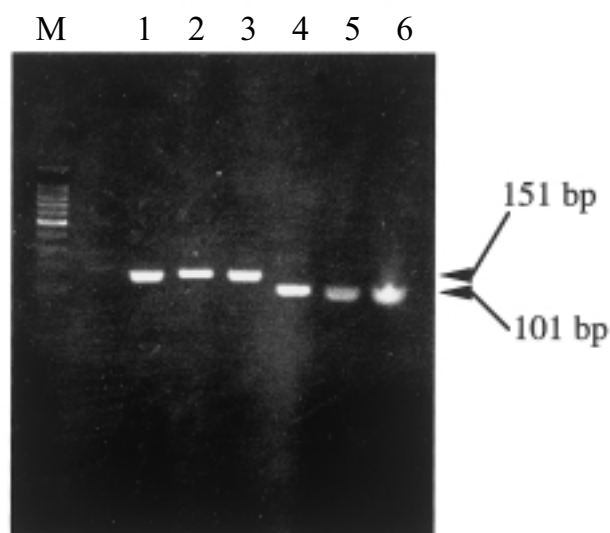


Fig. 2 Agarose Gel Electrophoregram of PCR Products Amplified from Maize DNA Using SSIIB and CaMV35S Primers

SSIIB primers: Lanes 1~3, CaMV35S primers: Lanes 4~6
Lanes 1 and 4: DNA from corn flour, Lanes 2 and 5: DNA from corn grits, Lanes 3 and 6: DNA from corn meal, M: 100 bp ladder size standard

Table 2 Purity and Recovery of DNA Extracted from Maize

Sample	A260 nm	A280 nm	DNA purity	DNA concentration	DNA recovery
			A260 nm/A280 nm	(ng/ μ L)	(μ g/2g sample)
Flour	0.129	0.060	2.2	64.5	9.0
Grits	0.050	0.027	1.9	25.0	3.5
Meal	0.057	0.028	2.0	28.5	4.0

Table 3 Data of Quantitative PCR and GMO Amount

Sample	Copy number			Content (%)		GMO amount (%)
	SSIIb	CaMV35S	GA21	CaMV35S	GA21	
Flour	32184.34	22.43	2.28	0.18	0.01	0.19
Grits	27297.04	15.70	0	0.15	0	0.15
Meal	21052.04	25.91	0	0.32	0	0.32

GMO amount(%) is the sum of the CaMV35S and GA21 contents(%).

ウモロコシ半加工品には遺伝子組換え体が混入していることが明らかになった。

次に、定量PCRを行った結果をTable 3に示す。コーンフラワー、コーングリッツ、コーンミールの組換え体混入率は、それぞれ0.19%、0.15%、0.32%であった。3試料すべてにおいて組換え体が混入していることが認められた。

トウモロコシは風媒花であるため、米国のように広大な農地での栽培では他品種と交雑する可能性が高く、遺伝子組換え体の混入を避けることは困難である。今回の結果はこのことを支持するものと思われる。なお、平成13年4月より食品衛生法¹⁾及びJAS法⁶⁾における遺伝子組換え体混入率の表示義務は5%を超える場合であることから、今回の結果では表示義務はない。しかし、わずかでも組換え体の混入が認められたことを考慮すると、トウモロコシの加工品については原産国が国内ではない場合には、遺伝子組換え体の混入の可能性が示唆されることから⁷⁾、検査には細心の注意が必要と思われる。

また、市販のトウモロコシ半加工品の遺伝子組換え体の定量的検出では、一連の操作過程でDNAの抽出が重要と考えられる。植物体、特にトウモロコシからのDNAの抽出の場合、色素、多糖類⁸⁾などがトウモロコシに多く含まれているため、このような物質がDNA抽出液に混入するとPCRを阻害し定量値に影響を及ぼす要因となる。従って、DNAの抽出では、このようなPCR阻害物質が混入しないように注意を払う必要がある。さらに、半加工品や加工品などの加工行程を経た試料はDNAの断片化や劣化を起こしているものが少なくなく、DNAの回収が困難な場合が指摘されている^{2,9)}。今回、半加工品の種類により

DNAの回収量に大きな違いが認められたことから、イオン交換樹脂カラム Genomic-tip (QIAGEN社製)の使用や抽出に供する試料の量を多くするなどしてDNA抽出量を増やす工夫が必要と思われる。

文 献

- 厚生労働省食品保健部長通知食発第79号「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」平成13年3月15日、厚生労働省食品保健部企画課長・監視安全課長通知食企発第3号、食監発第47号「遺伝子組換え食品に関する表示について」平成13年3月21日
- 農林水産省消費技術センター：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 改訂2版(2002)
- 加藤芳伸, 斉藤明子, 久保重希子, 澤田幸治, 砂川紘之: 道衛研所報, 51, 106 (2001)
- Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirano T, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A: J. AOAC Int., 85, 1077 (2002)
- 厚生労働省：組換えDNA技術応用食品の検査法(2001)
- 農林水産省食品流通局長通知12食流第1775号「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について」平成12年6月10日、一部改正(平成13年3月19日付け12総合第1115号総合食料局長通知)
- 合田幸広, 柿原芳輝, 穂山 浩, 松岡 猛, 日野明寛, 豊田正武：食衛誌, 43(2), 74 (2002)
- Matsuoka T, Kawashima Y, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A: J. Food Hyg. Soc. Japan, 41, 137 (2000)
- 松岡 猛, 川島よしみ, 穂山 浩, 三浦裕仁, 合田幸広, 瀬畑 環, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛：食衛誌, 40(2), 149 (1999)