

ダイズ加工食品の遺伝子組換え定性検査法における 鋳型 DNA の抽出精製に関する検討

横山あかね, 南谷臣昭, 岩附綾子, 志水美奈, 遠藤利加

要 旨

遺伝子組換え表示義務のある種々のダイズ加工食品について鋳型 DNA を抽出精製し、ダイズ内在性遺伝子 *Lel* が検知可能であるか検討した。抽出精製には、加工食品の DNA 抽出精製に優れているとされる GM quicker 4 を用い、リアルタイム PCR を用いて増幅を確認した。その結果、豆腐、厚揚げなど 12 食品群については *Lel* の検知が可能であった。みそは種類により、GM quicker 4 による抽出精製を行っても *Lel* が検知できない場合があった。みそでは、発酵の結果生じた生成物が精製の工程で除去しきれず *Lel* が検知不能になることが示唆され、DNA の抽出精製にさらなる工夫が必要であると考えられた。

キーワード：遺伝子組換え食品、ダイズ内在性遺伝子 *Lel*、GM quicker 4、リアルタイム PCR

1 はじめに

日本に輸入される遺伝子組換え食品は、国による安全性審査を受けることが義務付けられている。安全性が認められた遺伝子組換え由来の DNA を含む食品は、食品表示法による表示が義務付けられており、現在、9 農産物（大豆、とうもろこし、ばれいしょ、なたね、綿実、アルファルファ、てん菜、パパイヤおよびからしな）と、これらを原材料とする 33 加工食品群が表示義務の対象となっている。岐阜県では、特に県内の流通量が多いダイズ加工食品について組換え遺伝子混入の有無を判別し、適正な表示がなされているかを検査する体制を整備することとした。

安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法は、消費者庁の「食品表示基準について」における別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」¹⁾（以下、通知法）により定められている。通知法では、リアルタイム PCR により *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S および RRS2 を検知することにより、ダイズ加工食品中の組換え遺伝子混入の有無を判定するとされているが、その前提として、陽性対照のダイズ内在性遺伝子 *Lel* の Cq 値が 43 未満となることが必要とされている。加工食品は、食品群により試料マトリックスが大きく異なる。また、同じ食品群であっても原材料や製造工程が違う場合は、試料マトリックスが異なる場合がある。PCR を阻害する試料マトリックスの影響により *Lel* が検知不能になることを避けるためには、

食品ごとに適切な DNA の抽出精製法を選択することが必要となる。各検査機関は、通知法に記載のある代表的な方法を参考にして、それぞれの食品に適した DNA の抽出精製法を用いることができるとされている。

通知法に例示されている DNA の抽出精製法は、シリカゲル膜タイプキット (QIAGEN 社製 DNeasy Plant Maxi kit, 以下 Maxi kit)、イオン交換樹脂タイプキット (QIAGEN 社製 Genomic-tip 20/G, 以下 Genomic-tip) および CTAB 法の 3 法である。このうち、Maxi kit や Genomic-tip を用いた方法では、溶解した DNA 溶液を 1 晩置いておく必要があり、抽出精製にかなりの時間を要する。また、CTAB 法は有機溶媒を使用する上、抽出操作が煩雑である。一方、加工食品の DNA 抽出に適用可能なキットとして、ニッポンジーン (株) 製の GM quicker 3 が広く使用されている²⁾。GM quicker 3 は Maxi kit と同じくシリカゲル膜タイプキットであるが、抽出工程における遠心時間が短く、操作全般においてより簡便なキットである。さらに近年、GM quicker 3 の DNA 回収率が改良された GM quicker 4 も発売された。

今回、ダイズ加工食品の検査体制整備のため、様々なダイズ加工食品について GM quicker 4 を用いて鋳型 DNA を抽出精製し、リアルタイム PCR によりダイズ内在性遺伝子 *Lel* が検知可能かどうかについて検討した。また、GM quicker 4 により *Lel* の検知が困難であつ

たみそについては、通知法記載の抽出精製キットを用いて追加検討した。本資料では、これらの結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

遺伝子組換え表示義務があるダイズ加工食品 15 食品群のうち、特に流通量が多い 13 食品群 21 品目を試料として用いた (表 1 および表 2)。

表 1 義務表示対象食品群

食品群	ダイズ加工食品
1	豆腐・油揚げ類
2	凍り豆腐、おから及びゆば
3	納豆
4	豆乳類
5	みそ
6	大豆煮豆
7	大豆缶詰及び大豆瓶詰
8	きなこ
9	大豆いり豆
10	1~9に掲げるものを主原料とするもの
11	調理用の大豆を主な原材料とするもの
12	大豆粉を主な原材料とするもの
13	大豆たんぱくを主な原材料とするもの
14	枝豆を主な原材料とするもの
15	大豆もやしを主な原材料とするもの

※ 塗りつぶし：検討した食品群

2.2 試薬・器具等

DNA の抽出精製には、GM quicker 4 のキットを用いた。通知法に記載のある Maxi kit および Genomic-tip の 2 キットも追加検討に用いた。DNA の抽出精製に必要な試薬は、富士フィルム和光純薬 (株) 製 2-プロパノールおよび 70 vol% エタノールを用い、水は MERCK 社製 IQ7003 で製造した超純水をオートクレーブで処理したものを使用した。

リアルタイム PCR には、ニッポンジーン (株) 製ダイズ内在性 DNA *Le1* オリゴヌクレオチドセットおよび GM ダイズ (RRS) 陽性コントロールプラスミド、Thermo Fisher Scientific 社製 TaqMan Universal Master Mix, MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, MicroAmp Optical Adhesive Film および MicroAmp Adhesive Film Applicator を用いた。

2.3 装置

- リアルタイム PCR 装置：Thermo Fisher Scientific 社製 Quant Studio 5
- 紫外可視分光光度計：(株) 島津製作所製 UV-2600
- 粉碎機：Retsch 社製グラインドミックス GM200

- 高速冷却遠心機：久保田商事 (株) 製 6200 および 7780 II

- オートクレーブ：ヤマト科学 (株) 製 SP200

2.4 試験方法

2.4.1 DNA の抽出精製

試料の前処理は通知法に従った。DNA の抽出精製は GM quicker 4 キットのマニュアルに従い、以下の操作を行った。

均質に粉碎した試料 1 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に量り採り、GE1 Buffer 4.0 mL (水分を多く含む食品は 1.0 mL)、RNase A 10 μ L、 α -Amylase 2 μ L および Proteinase K 20 μ L をそれぞれ加えた。壁面に付着した試料や緩衝液をフラッシュ遠心によりチューブの底に集めた後、ボルテックスミキサーにて 60 秒間激しく攪拌した。65°C で 30 分間加温し、10 分ごとにボルテックスミキサーにて 10 秒間激しく攪拌した。GE2-M Buffer 400 μ L (水分を多く含む食品は 200 μ L) を加え、ボルテックスミキサーにて均一になるように攪拌した。次に、8,000 \times g、4°C の条件で 10 分間遠心した後、その上清 800 μ L を 2 mL マイクロチューブに移した。GB3 Buffer 600 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和した。これを 10,000 \times g、4°C の条件で 5 分間遠心し、その上清を可能な限り 2 mL マイクロチューブに回収した。この上清 700 μ L を spin column に負荷し、10,000 \times g、4°C の条件で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄した。残りの上清全量と同じ spin column に負荷し、同条件で遠心した後ろ液を廃棄した。次いで GW Buffer 600 μ L を spin column に負荷し、10,000 \times g、4°C の条件で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄した。spin column を新たな 1.5 mL マイクロチューブに移し、TE Buffer (pH 8.0) 50 μ L をメンブレン中央に滴下して 3 分間室温で静置した後、10,000 \times g、4°C の条件で 1 分間遠心し、得られたろ液を DNA 試料原液とした。

米みそ、豆みそ、麦みそについては、GM quicker 4 の他に Maxi kit および Genomic-tip を用いて抽出精製を行った。試料量は Maxi kit : 1 g、Genomic-tip : 2 g で行った。Maxi kit および Genomic-tip を用いての抽出は、原則として通知法に記載に従い実施した。ただし Genomic-tip では、カラムに負荷する前の遠心操作を 17,000 \times g で行った。いずれの抽出法についても、1 試料につき 2 併行で抽出精製を行った。

2.4.2 DNA の濃度・精製度の確認

DNA 試料原液の適当量を取って水で20倍希釈し、分光光度計を用いて波長260nmの吸光度(A₂₆₀)を測定し、吸光度(A₂₆₀)の値1を50ng/μL DNAに相当するものとして、DNA濃度を算出した。得られたDNA濃度からリアルタイムPCRに必要な濃度20ng/μLになるよう水で希釈した。

また、同時に波長280nmの吸光度(A₂₈₀)も測定し、波長260nmとの吸光度の比A₂₆₀/A₂₈₀を算出し、精製度を確認した。

2.4.3 リアルタイムPCR

PCR用反応液は25μL/wellとして調整し、その組成は以下のとおりとした。

TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5μL、対象プライマー対溶液(25μM)0.5μL、対象プローブ溶液(10μM)0.5μL、水9μLおよび20ng/μL DNA 試料液2.5μL(50ng)を加え、全量を25μLとした。ダイズ内在性遺伝子 *Le1* についてPCRを行い、Cq値の結果よりDNA検出の可否を確認した。各試料液当たり2ウェル併行で行った。

PCR反応条件は、50°Cで2分間保持した後、95°Cで10分間加温し、その後、95°C30秒、59°C1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行った。

2.4.4 結果の解析

ベースラインを3サイクルから15サイクル、Threshold lineを0.2に設定し、Cq値が43未満となったウェルを陽性とした。2併行抽出で各2ウェル、合計4ウェルすべてが陽性となった場合、その試料をDNA検出可能とした。

3 結果および考察

3.1 ダイズ加工食品の精製度

ダイズ加工食品から抽出したDNA濃度、精製度(A₂₆₀/A₂₈₀)を表2に示す。

吸光度からDNA濃度を算出したところ、すべての試料液がリアルタイムPCRに必要な20ng/μLを上回っていた。また、A₂₈₀はタンパク質などの不純物由来の吸光度とされ、A₂₆₀/A₂₈₀比はタンパク質などの混入度合いを示している^{3),4)}。通知法ではこの値が1.7~2.0であると「DNAが十分に精製されている」とされているが、今回検討した加工食品のうち、納豆類、豆乳類、みそ類、大豆菓子のA₂₆₀/A₂₈₀比はそれぞれ平均で1.2、1.6、1.2、1.6となり、特に納豆とみそは、上記範囲を大きく下回る値となった。A₂₆₀/A₂₈₀比が低い原因として、試料液に含まれるタンパク質などが抽出精製にお

いて除去しきれなかったことが考えられた。また、おから、大豆煮豆、大豆粉、大豆プロテインのA₂₆₀/A₂₈₀比は2.0以上となった。これらの食品は、製造過程においてDNAの断片化が進行し、A₂₆₀が高くなったことが一因として考えられた⁴⁾。

表2 DNA濃度およびCq値

食品群	加工食品	試料液	DNA濃度 (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	内在性遺伝子(<i>Le1</i>)		DNA検出
					Cq値		
	木綿豆腐	1	115.0	1.6	24.73	24.59	○
		2	158.8	2.0	25.46	25.44	
1	絹ごし豆腐	1	109.4	2.2	24.15	24.16	○
		2	170.1	1.7	24.75	24.79	
	厚揚げ	1	327.0	1.9	24.31	24.27	○
		2	317.7	1.8	24.36	24.36	
2	凍り豆腐	1	196.8	2.0	23.97	23.97	○
		2	190.6	2.1	23.96	24.12	
	おから	1	36.3	2.7	23.74	23.75	○
		2	40.0	2.6	24.09	24.14	
3	納豆(粒)	1	40.3	1.2	35.36	35.32	○
		2	47.0	1.2	33.53	34.04	
	納豆(ひきわり)	1	50.6	1.2	31.88	32.00	○
		2	68.6	1.3	32.47	32.81	
4	豆乳	1	58.8	1.7	25.77	25.77	○
		2	86.7	1.4	26.32	26.32	
	調整豆乳	1	58.8	1.7	25.77	25.77	○
		2	86.7	1.4	26.32	26.32	
5	米みそ	1	63.8	1.3	34.24	34.63	○
		2	57.2	1.4	33.69	33.56	
	豆みそ	1	62.8	1.2	-	-	×
		2	79.6	1.1	-	-	
	麦みそ	1	53.9	1.2	-	-	×
		2	49.5	1.2	-	-	
6	大豆煮豆	1	115.9	2.5	25.08	25.03	○
		2	111.5	2.5	25.32	25.29	
7	大豆缶詰	1	86.1	2.0	26.89	26.85	○
		2	93.2	1.8	27.17	27.11	
8	きなこ	1	105.9	2.0	27.13	27.21	○
		2	96.8	2.1	28.14	28.27	
10	大豆菓子	1	128.9	1.6	26.78	26.83	○
		2	109.9	1.6	26.70	26.88	
12	大豆粉	1	115.9	2.0	24.51	24.45	○
		2	72.7	2.6	24.98	25.00	
13	大豆プロテイン	1	207.6	2.2	23.91	23.84	○
		2	233.8	2.2	23.65	23.72	
	大豆ミート	1	33.0	1.7	35.88	35.89	○
		2	28.9	2.0	35.33	35.86	
14	冷凍枝豆	1	61.7	2.0	23.97	23.98	○
		2	104.8	1.6	24.71	24.72	
15	大豆もやし	1	451.7	1.8	37.90	36.61	○
		2	448.5	1.8	37.06	38.65	

3.2 ダイズ内在性遺伝子 *Le1*

リアルタイムPCRによる*Le1*のCq値を表2に示す。また、代表的な試料として木綿豆腐と米みその増幅曲線を図1に示す。

豆みそ、麦みそはいずれの試料液からも*Le1*のCq値が得られず、DNA不検出という結果になった。それ以外の試料液は、すべて判断基準となる43未満のCq値であり、DNAの検出が可能であった。

A₂₆₀/A₂₈₀比が高く、DNAの断片化が進行したと考えられるおから、大豆煮豆、大豆粉、大豆プロテインについても、Cq値はすべて30以下で良好な値となり、DNAの検出への影響は確認されなかった。

表3 各キットにおける DNA 濃度および Cq 値 (みそ)

試料液	GM quicker 4					DNeasy Plant Maxi kit				Genomic-tip 20/G			
	DNA濃度 (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	内在性遺伝子(Le1) Cq値		DNA濃度 (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	内在性遺伝子(Le1) Cq値		DNA濃度 (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	内在性遺伝子(Le1) Cq値		
米みそ	1	63.8	1.3	34.24	34.63	103.2	1.2	32.81	32.74	486.0	1.3	30.62	30.48
	2	57.2	1.4	33.69	33.56	105.3	1.3	31.46	31.53	662.6	1.2	30.82	30.77
豆みそ	1	62.8	1.2	-	-	245.2	1.2	41.69	-	383.6	1.1	-	-
	2	79.6	1.1	-	-	207.4	1.2	-	39.65	406.3	1.0	-	-
麦みそ	1	53.9	1.2	-	-	112.1	1.4	-	-	325.7	1.1	-	-
	2	49.5	1.2	-	-	82.4	1.6	-	-	344.6	1.1	-	-

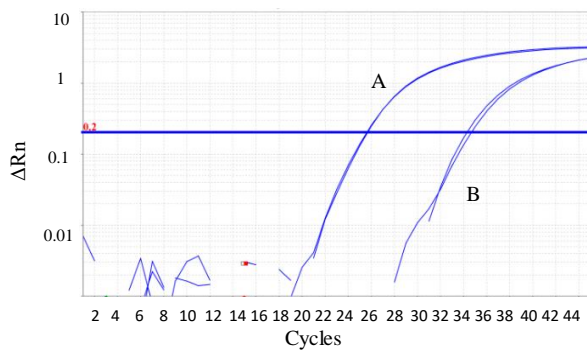


図1 リアルタイム PCR の増幅曲線
 A : 木綿豆腐 (Cq = 25) B : 米みそ (Cq = 34)

3.3 みその DNA 抽出精製

3種類のみそについて、GM quicker 4, Maxi kit および Genomic-tip を用いて抽出精製およびリアルタイム PCR を行った結果を表3に示す。

米みそでは、いずれのキットでも 43 未満の Cq 値であった。豆みそについては、Maxi kit による抽出において一部のウェルで 43 未満の Cq 値 (41.69, 39.65) が得られたものの、他のキットでは Le1 が検知できなかった。麦みそについては、いずれのキットでも Le1 が検知できなかった。

豆みそについて GM quicker 4 と Maxi kit を用いた結果を比較すると、両者は同じシリカゲル膜タイプキットであり、精製度の指標である A₂₆₀/A₂₈₀ 比はいずれも 1.1~1.2 と低かったにもかかわらず、Maxi kit のみで Le1 が検知された。このことから、Maxi kit で抽出された DNA 濃度の方が高く、リアルタイム PCR の試料液濃度 (20 ng/μL) に希釈する過程で、試料液中の夾雑物質も希釈されたと考えられた。しかし、これらの Cq 値 (41.69, 39.65) は判定基準の 43 に近く、DNA を再現性良く検出することは難しいと考えられた。

以上、みそは種類により Le1 が検知できない場合があった。米みそ、豆みそ、麦みそは、それぞれ原料となる麴の種類の違いであり、主たる原材料はいずれも

ダイズである。麴の種類の違いにより麴を加えるタイミングや発酵の工程が異なるため、発酵生成物にも違いがある⁵⁾。豆みそや麦みそでは、発酵の結果生じた生成物が今回検討した精製の工程で除去しきれず、PCR を阻害する原因となった可能性が示唆された。

抽出精製の工程において、Maxi kit および Genomic-tip を用いた抽出法では、沈殿を吸わないように上清を採る必要がある上、注意深く処理しても目詰まりを起こしやすく時間のロスが大きかった。さらに両キットでは、乾燥後に溶解した DNA 溶液を 1 晩置いておく必要があり、抽出精製にかなりの時間を要した。GM quicker 4 を用いた抽出法では、今回検討した3種類のキットの中で作業時間が最も短く、煩雑な操作がなかった。そのため、検査時間の大幅な短縮を図ることができ、操作性の点においては優れていると考えられた。

4 まとめ

遺伝子組換え表示義務のあるダイズ加工食品 13 食品群について GM quicker 4 を用いて抽出精製し、Le1 の検知状況を調査した。その結果、豆腐や厚揚げなど 12 食品群については Le1 の検知が可能であった。Le1 の検知が難しいとされている納豆でも、今回検討した試料では検知することができた。みそについては3種類のキットを用いて抽出を試みたが、Le1 を検知できたのは米みそのみであり、麦みそは検知できなかった。豆みそは Maxi kit で抽出した試料液で Le1 が検知できたものもあったが、Cq 値は判定基準の 43 に近く、DNA を再現性良く検出することは難しいと考えられた。みそは発酵の結果生じた生成物が精製の工程で除去しきれないことにより、Le1 検知が困難となるものが多いと考えられた。

加工食品は様々な種類があり、同じ食品であっても原材料や製造工程の違いによって、リアルタイム PCR で検知可能な鋳型 DNA の残存量や、DNA 試料液に含まれるマトリックスの量が異なると考えられる。PCR を阻害する試料マトリックスの影響により Le1 が検知

不能になることを避けるためには、食品ごとに適切なDNAの抽出精製法を選択することが必要となる。

今回の検討で用いたGM quicker 4は、みそ以外のダイズ加工食品全般において*Le1*を検知することができ、ダイズ加工食品の抽出精製に有用であることが示された。みそについては、今回検討したいずれの抽出精製法でも*Le1*の検知が困難であったことから、さらなる工夫が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 「食品表示基準について」(平成27年3月30日付け消食表第139号消費者庁次長通知) 別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」
- 2) 高嶋康晴, 大豆加工品の新規DNA抽出法の検討, 食品関係等調査研究報告書, 38, 30-36 (2014)
- 3) 柴山祥枝, 核酸 (DNA・RNA) の定量法, ぶんせき, 7, 268-274 (2018)
- 4) 谷口武利編, 改訂PCR実験ノート, 羊土社 (2005)
- 5) みそ健康づくり委員会; 新みそを知る, p18, https://miso.or.jp/museum/pdf/new_learn_about_miso.pdf

Discussion on the Extraction and Purification Procedure of Template DNA in Qualitative Method for GM Soybeans

Akane YOKOYAMA, Tomiaki MINATANI, Ayako IWATSUKI, Mina SHIMIZU and Rika ENDO

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan*