

遺伝子組換えトウモロコシ(DAS 59132)における組換え DNA 検出法の検証

石井 学, 山本 淳, 肥塚加奈江, 山辺真一 (衛生化学科)

【資 料】

遺伝子組換えトウモロコシ(DAS 59132)における組換えDNA検出法の検証

Verification of Modified DNA Detection Methods for Genetically Modified Corn

石井 学, 山本 淳, 肥塚加奈江, 山辺真一 (衛生化学科)
Manabu Ishii, Jun Yamamoto, Kanae Koeduka, Shinichi Yamabe

要 旨

平成20年6月18日付食安監発第0618001号にて、安全性未審査の組換えトウモロコシ(DAS59132)のDNA検出法が示されたことを受け、平成20年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査試料を用いて組換え遺伝子検査法の検証を行った結果、厚生労働省から示された方法により、内在性遺伝子及び組換え遺伝子を検出することが出来た。また、外部精度管理調査に参加したことでDAS59132の陽性コントロールが手に入り、当センターにおいて当該遺伝子の検出が可能となった。

[キーワード：遺伝子組換え食品, トウモロコシ, リアルタイムPCR]

[Key words : Genetically modified organism, Corn, Realtime PCR]

1 はじめに

遺伝子組換え食品においては、平成13年に安全性審査及び表示が義務づけられたことに伴い、その検査法が示された。当センターにおいても平成15年度から検査を継続実施し、米国産・中国産輸入大豆や、岡山県内で流通する大豆・トウモロコシの加工食品、半加工食品について定性・定量のモニタリング検査を実施してきている。また、大豆穀粒、トウモロコシ穀粒、トウモロコシ加工品及びジャガイモ加工品からのDNA抽出の比較検討および通知で新たに追加された2種類の抽出法を含めた4種類の抽出法について、大豆穀粒からのDNA抽出の比較検討を行いその結果を報告してきている^{1)~3)}。さらに、平成19年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査に参加し、遺伝子組換えコメについて調査を行い、遺伝子の抽出や組換え遺伝子の検知法について若干の知見を得た⁴⁾。

今回、著者らは平成20年6月18日付食安監発第0618001号にて安全性未審査の組換えトウモロコシ(DAS59132)のDNA検出法が示された⁵⁾ことから、平成20年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査に参加して得られた試料及びDAS59132の陽性コントロールを用いて、通知に示された組換え遺伝子の検知法について検証を行い、若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

2.1 試料

平成20年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査において配布された試料

トウモロコシ粉

2試料(試料A, B)

定性PCR用DNA溶液

3試料(試料1, 2, 3 : Bt10用)

リアルタイムPCR用DNA溶液

3試料(試料1, 2, 3 : DAS59132用)

2.2 試薬及びキット等

試薬等はすべて特級または生化学用を使用した。

抽出キットについては、シリカゲル膜タイプキットとしてキアゲン製DNeasy Plant Mini Kitを用いた。

2.3 DNA抽出方法

試料A, Bについて、DNA抽出は通知で示されているシリカゲル膜タイプキット法にて、2並行で行った。(抽出後のDNA試料溶液を試料A-1, A-2, B-1, B-2とする)

2.4 定性PCR法

今回の外部精度管理調査においては、DAS59132のみならず、Bt10についても精度管理の対象となっているため、試料A-1, A-2, B-1, B-2(n=1)及び試料1, 2, 3

(n=2)について、Bt10を検出するための定性PCRを行った。定性PCRの条件を次に示した。

反応液組成：	PCR緩衝液
dNTP	0.128mmol/L
MgCl ₂	1.2mmol/L
5'及び3'プライマー	0.48mmol/L
Taq DNAポリメラーゼ	8units
DNA試料	50ng

PCR Volume：25 μL

反応条件：94℃ 10min.

→94℃ 25sec.→62℃ 30sec.→72℃ 45sec.(40cycles)

→72℃ 7min.→4℃保存

2.5 リアルタイムPCR法

試料A-1, A-2, B-1, B-2(各2well)及び試料1, 2, 3(各4well)について、DAS59132を検出するためのリアルタイムPCRを行った。

反応液組成：Universal PCR Master Mix12.5 μL

対象プライマー対溶液 0.4mmol/L

対象プローブ溶液 0.2mmol/L

DNA試料 50ng

PCR Volume：25 μL

反応条件：50℃ 2min. → 95℃ 10min.

→ 95℃ 15sec. → 60℃ 1min.(40cycles)

9600emulationモード

Plate Format：96wells Clear Plate

2.6 機器等

分光光度計：那珂インスツルメンツ社製

Gene Spec V

定性PCR装置：アプライドバイオシステムズ社製

ABI GeneAmp PCR System 9700(96wells)

定量PCR装置：アプライドバイオシステムズ社製

ABI PRIZM 7900HT(96wells)

3 結果および考察

3.1 トウモロコシ粉からの抽出

配布されたトウモロコシ粉を、シリカゲル膜タイプキット法で抽出(n=2)した。その結果、DNA収量は試料A-1：14.2μg, A-2：14.8μg, B-1：13.4μg, B-2：15.0μgであり、2並行のサンプルでいずれも十分な量が得られた。また、タンパク質混入量を示すO.D.260/280比はそれぞれ1.82, 1.81, 1.83, 1.79で、目安となる1.7

～2.0の範囲にあり、糖質の混入を示すO.D.260/230比もそれぞれ1.56, 1.61, 1.62, 1.35で、いずれも1.0より大きくDNAの抽出は問題なく行うことができた。

3.2 定性PCR結果

Bt10については定性PCRで判定するため、試料A-1, A-2, B-1, B-2及び試料1, 2, 3について、定性PCRを行い、その結果を表1に示した。

表1 トウモロコシDNA溶液の定性PCR結果

	陽性対照用 プライマー対	Bt10検出用 プライマー対	Bt10確認用 プライマー対	判定
試料A-1 (n=1)	検出	検出せず	—	陰性
試料A-2 (n=1)	検出	検出せず	—	陰性
試料B-1 (n=1)	検出	検出せず	—	陰性
試料B-2 (n=1)	検出	検出せず	—	陰性
試料1 (n=2)	検出	検出	検出	陽性
	検出	検出	検出	
試料2 (n=2)	検出	検出せず	—	陰性
	検出	検出せず	—	
試料3 (n=2)	検出	検出せず	—	陰性
	検出	検出せず	—	

3.2.1 陽性対照用プライマー対を用いた増幅

全ての検体について通知の条件で十分な増幅が検出された。

3.2.2 Bt10検出用プライマー対を用いた増幅

試料1のみで増幅が検出され、試料A-1, A-2, B-1, B-2及び試料2, 3については増幅が検出されなかった。

3.2.3 Bt10確認用プライマー対を用いた増幅

3.2.2で増幅が検出された試料1について確認用プライマー対を用いたPCRを行ったところ、増幅が検出された。

3.2.4 Bt10の判定

全ての試料について、陽性対照用プライマー対における増幅が検出されたことから、検査そのものは有効と判断された。

試料1については、Bt10検出用プライマー対及びBt10確認用プライマー対における増幅が検出されたため、Bt10系統陽性と判定した。

その他の試料については、Bt10検出用プライマー対における増幅は検出されなかったため、Bt系統陰性と判定した。

3.3 リアルタイムPCR結果

DAS59132について検査するため、全ての試料についてリアルタイムPCRを行い、その結果を表2, 3および図1, 2に示した。

表2 トウモロコシDNA溶液のリアルタイムPCR結果 (Th.Line = 0.2)

		陽性対照用プローブ		DAS59132検出用プローブ	
		増幅回数値	判定	増幅回数値	判定
試料A-1	well 1	26.72	検出	33.86	検出
	well 2	26.70	検出	33.38	検出
試料A-2	well 1	26.95	検出	34.33	検出
	well 2	27.05	検出	34.43	検出
試料B-1	well 1	27.54	検出	undetermined	検出せず
	well 2	27.42	検出	undetermined	検出せず
試料B-2	well 1	27.57	検出	undetermined	検出せず
	well 2	27.70	検出	undetermined	検出せず
試料1	well 1	27.52	検出	undetermined	検出せず
	well 2	27.51	検出	undetermined	検出せず
	well 3	-	-	undetermined	検出せず
	well 4	-	-	undetermined	検出せず
試料2	well 1	27.32	検出	undetermined	検出せず
	well 2	27.32	検出	undetermined	検出せず
	well 3	-	-	undetermined	検出せず
	well 4	-	-	undetermined	検出せず
試料3	well 1	27.41	検出	36.18	検出
	well 2	27.36	検出	36.80	検出
	well 3	-	-	37.86	検出
	well 4	-	-	36.69	検出

表3 トウモロコシDNA溶液のリアルタイムPCR結果 (Th.Line = 0.5)

		陽性対照用プローブ		DAS59132検出用プローブ	
		増幅回数値	判定	増幅回数値	判定
試料A-1	well 1	28.47	検出	35.36	検出
	well 2	28.49	検出	34.97	検出
試料A-2	well 1	28.83	検出	35.85	検出
	well 2	28.91	検出	35.89	検出
試料B-1	well 1	29.27	検出	undetermined	検出せず
	well 2	29.21	検出	undetermined	検出せず
試料B-2	well 1	29.39	検出	undetermined	検出せず
	well 2	29.42	検出	undetermined	検出せず
試料1	well 1	29.22	検出	undetermined	検出せず
	well 2	29.20	検出	undetermined	検出せず
	well 3	-	-	undetermined	検出せず
	well 4	-	-	undetermined	検出せず
試料2	well 1	29.13	検出	undetermined	検出せず
	well 2	29.11	検出	undetermined	検出せず
	well 3	-	-	undetermined	検出せず
	well 4	-	-	undetermined	検出せず
試料3	well 1	29.21	検出	37.60	検出
	well 2	29.14	検出	37.97	検出
	well 3	-	-	39.21	検出せず
	well 4	-	-	38.22	検出せず

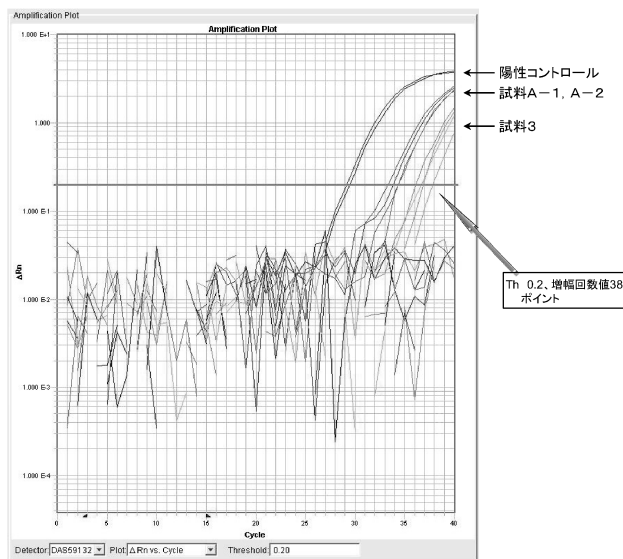


図1 リアルタイムPCRによる増幅曲線 (通知法では試料3は4wellとも検出)

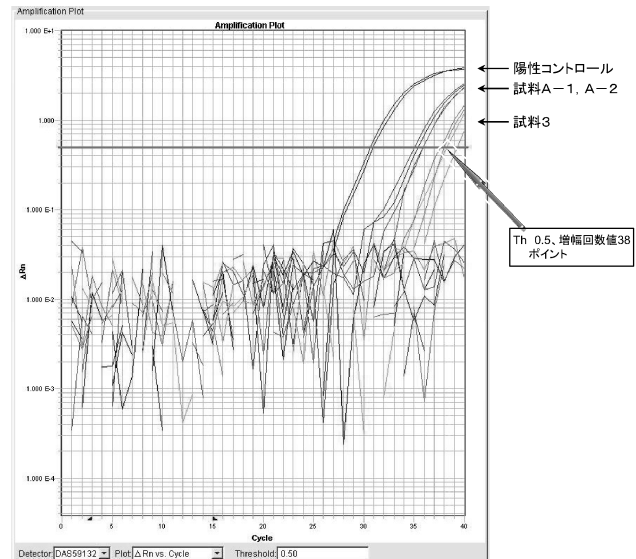


図2 リアルタイムPCRによる増幅曲線 (通知法では試料3は2wellのみ検出)

3.3.1 トウモロコシ陽性対照用試験

外部精度管理で配布された粉末試料から抽出したDNA抽出試料および配布された抽出済みのDNA溶液試料とも、ほぼ同じレベルでPCR産物の増幅が検出された。(表2, 3)

3.3.2 DAS59132検出用試験

試料A-1, A-2において、ほぼ同じレベルでPCR産物の増幅が検出された。試料3については、全体的にややレベルが低いものの、PCR産物の増幅が検出された。

その他の試料については、PCR産物の増幅が検出されなかった。

3.3.3 リアルタイムPCR法での判定

全ての試料について、陽性対照用試験においてPCR産物の増幅が検出されたことから、検査そのものは有効と判断された。

物の増幅が検出されたこと、検査そのものは有効と判断された。

DAS59132検出用試験においては、トウモロコシ粉である試料Aについては、2並行のDNA抽出試料全てでPCR産物の増幅が検出されたため、DAS59132陽性と判定した。

試料3については、n=2(4well)の全てでPCR産物の増幅が検出されたため、DAS59132陽性と判定したが、通知で示された判定根拠には厳密に定めていない項目があり、その項目で参考として示されている値(Thライン0.2~0.5において増幅回数値が38未満であること)を用いた場合には、試料3についてはThライン0.2を採用したとき、0.5を採用したときでは2~4wellと、幅を持った

結果となった。(図1, 2)

その他の試料については、いずれもPCR産物の増幅が検出されなかったため、DAS59132陰性と判定した。

4 まとめ

著者らは、今回外部精度管理調査に参加しなければ手に入らないDAS59132の陽性コントロールを得られたことから、当施設において通知法によるDAS59132の検出が可能かどうかの検証を行った。

トウモロコシ粉からの抽出については、DNA量も十分に得られ、タンパク質・糖の混入も問題のない良好な結果であった。また、リアルタイムPCRの陽性対照用試験において、外部精度管理で配布された粉末試料から得られたDNA抽出試料と抽出済みのDNA溶液試料の結果がほぼ同等であったことから、センターでの抽出操作に問題がないことが検証できた。

Bt10検出に用いる定性PCR法については、増幅バンドの有無ははっきりと確認できたため、Bt10系統トウモロコシの混入があれば検出は可能である。

DAS59132検出に用いるリアルタイムPCR法については、技術的にはPCR産物の増幅の検出は可能であるものの、通知法は判定基準を「増幅曲線を目視により」と測定者の主観に依存した部分があり、混入割合や判定のしかたによっては陽性と陰性を取り違える可能性もある。

このように判定方法にやや問題はあるものの、今後DAS59132トウモロコシの混入があれば、検出が可能と

なった。

なお、外部精度管理調査の結果報告によると、当機関の検査結果は全て正しく判定されており、今後も手技の熟練等、遺伝子組換え食品検査の信頼性が増すようにしていく予定である。

文 献

- 1) 武志保, 難波順子, 山辺真一, 今中雅章: 岡山県における遺伝子組換え食品の実態調査, 岡山県環境保健センター年報, 28, 111-114, 2004
- 2) 田邊英子, 山本淳, 肥塚加奈江, 山辺真一, 今中雅章: 大豆穀粒, トウモロコシ穀粒, トウモロコシ加工品及びジャガイモ加工品からのDNA抽出法の比較検討, 岡山県環境保健センター年報, 30, 127-133, 2006
- 3) 北村雅美, 田邊英子, 山辺真一, 肥塚加奈江, 今中雅章: 米国産大豆穀粒におけるDNA抽出法の比較検討, 岡山県環境保健センター年報, 31, 133-136, 2007
- 4) 石井学, 山本淳, 山辺真一, 肥塚加奈江, 今中雅章: 遺伝子組換えコメ粉末におけるDNA抽出法の検証, 岡山県環境保健センター年報, 32, 151-155, 2008
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0618001号: 組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正), 平成20年6月18日