

米国産大豆穀粒における DNA 抽出法の比較検討

北村雅美, 田邊英子, 山辺真一, 肥塚加奈江, 今中雅章 (衛生化学科)

【資 料】

米国産大豆穀粒における DNA 抽出法の比較検討

Comparison of DNA Extraction Methods for Genetically Modified Soybean

北村雅美, 田邊英子, 山辺真一, 肥塚加奈江, 今中雅章 (衛生化学科)

Masami Kitamura, Eiko Tanabe, Shinichi Yamabe, Kanae Koeduka and Masaaki Imanaka

要 旨

平成18年6月29日付け食安発第0629002号にて大豆穀粒のDNA抽出精製法が一部改正されたことを受け、シリカベースレジソタイプキット法(Promega Wizard DNA Clean-Up System), シリカゲル膜タイプキット法(2種)(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit, NIPPON GENE GM quicker)の3種類のキット法と、CTAB法で同一サンプル(Roundup Ready Soybeanを混入させた米国産大豆)のDNA抽出を行い、そのDNAの精製度とRRS混入率の比較・検討を行った。

抽出DNAの収量・純度, 定量PCR結果(レクチン増幅・混入率), コスト, 所要時間, 手技の煩雑さなどの比較から, 3種類のキット法の中で最も実用的で抽出結果も良好な抽出法は, シリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:改定法)であった。

[キーワード: 遺伝子組換え食品, 大豆, DNA抽出法, 定量PCR]

[Key words: Genetically modified organism, Soybeans, DNA extraction method, Quantitative polymerase chain reaction]

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, 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ている。平成15年度年報では, 米国産・中国産輸入大豆と岡山県内で流通する大豆加工食品, トウモロコシ半加工品についての定性・定量検査の結果を報告した¹⁾。平成17年度年報では, 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抽出の比較検討を行いその結果を報告した²⁾。

組換えDNA技術応用食品についての厚生労働省通知では, 平成18年12月現在まで7回の改正が行われており, 直近では, 平成18年6月29日付け食安発第0629002号にてDNA抽出法が一部改正された³⁾。その中には, 手順が改良された抽出法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit改定法)や, 抽出所要時間が全抽出法中最短の45分程度であるとする抽出法(NIPPON GENE GM quicker)が加えられ, 従来からのシリカベースレジソタイプキット法(Promega Wizard DNA Clean-Up System)とCTAB法を含めて抽出法は4種類となった(表1)。CTAB法は優れたDNA抽出法であるが, 定量PCRに適

したDNA量を得るには熟練を要することが知られている⁴⁾。そこで今回著者らは, CTAB法でDNA抽出が十分にできない場合に代替となりうるキット抽出法があるかどうか検討を行うこととした。大豆穀粒についてシリカベースレジソタイプキット法, シリカゲル膜タイプキット法とCTAB法について, 抽出DNAの収量・純度, 定量PCR結果(レクチン増幅・混入率), コスト, 所要時間, 手技の煩雑さなどからそれぞれ比較を行い, 4種類の抽出法のうち, 総合的に見て最も実用的かつ抽出結果が良好といえる抽出法を見いだすべく検討を加え, 若干の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

研究用に入手した米国産不分別大豆(品種不明)(Roundup Ready Soybean(以下RRSと省略)混入率80.4%)と米国産分別大豆(品種不明)をそれぞれ粉碎し, 重量比で混入率が5%になるよう混合した模擬試料大豆を用いた。

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、シリカベースレジソタイプキット法としてPromega Wizard DNA Clean-Up System (以下 Wizard 法と略) を、シリカゲル膜タイプキット法として QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (以下 DNeasy - 改定法と略) 及び NIPPON GENE GM quicker (以下 GM quicker 法と略) を用いた。

2.3 DNA抽出方法とPCR法

DNA抽出は表1に示す4つの方法で行った。

抽出されたDNAについて、定量PCRを行い、RRS混入率を算出した。

PCR条件：50℃ 2min. → 95℃ 10min. → 95℃ 30sec. →

59℃ 1min. (45cycles)

PCR Volume：25 μL

Plate Format：96wells Clear Plate

2.4 機器等

粉碎装置：フォアベルク社製

Thermomix

分光光度計：那珂インスツルメンツ社製

Gene Spec V

定量PCR装置：アプライダイオシステムズ社製

ABI PRIZM 7900HT (96wells)

3 結果および考察

3.1 模擬試料大豆からの抽出

模擬試料大豆を、A, B, C, D 4つの抽出方法で抽出 (n=4)、その結果を表2に示した。

3.1.1 DNA収量

DNA収量は、A > B > D > C の順で多かった。

GM quicker (C法) では、最もDNA収量が少なかった。ニッポンジーン社より提供された資料によると、C法を用いて1gの大豆粉末試料から得られるDNA収量は3.75~6.0μg (最低でも2.5μg) とのことであった。抽出作業の各工程を再検討したが、DNA収量の増加に効果は無かった。以上のことから、著者らの実施している方法に問題点がある可能性を疑い、同一サンプルをニッポンジーン社に送付して分析を依頼した。その結果、当センターと同程度のDNA収量であった。

また、平成18年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理 (財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所食品衛生事業部外部精度管理調査室担当) では、C法を使用した場合、必要なDNA量が抽出できない恐れがあるとし、上清を2本の2.0mLチューブに採取し2本並行して以降の抽出操作を行い、最終的に抽出したDNA溶液をあわせて混合し、DNA試料原液とするとされていた。

これらのことから、C法を使用した抽出法では、DNA抽出液濃度が定量PCRでの分析に必要な濃度である20ng/μL (DNA収量として1.0μg) を下回る場合もあると考えられる。

3.1.2 O.D.260/O.D.280比

4抽出法とも、ほぼ1.7~2.0の範囲に収まっており、タンパク混入については問題なかった。

表1 DNA抽出法

記号	抽出法	備考
A	シリカベースレジソタイプキット法	厚生労働省通知 (Promega Wizard DNA Clean-Up System)
B	シリカゲル膜タイプキット法	厚生労働省通知 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 改訂法
C	シリカゲル膜タイプキット法	厚生労働省通知 (NIPPON GENE GM quicker)
D	CTAB法	厚生労働省通知 (CTAB法)

表2 抽出法によるDNA収量の比較 (n=4) (模擬資料大豆)

記号	DNA (μg)	O.D.260/O.D.280比	O.D.260/O.D.230比
A	27.81 ± 7.26%	1.93 ± 1.45%	0.463 ± 14.0%
B	8.13 ± 7.25%	1.85 ± 7.72%	1.66 ± 8.03%
C	1.50 ± 16.7%	1.98 ± 4.74%	4.21 ± 28.8%
D	2.00 ± 14.9%	1.81 ± 0.74%	1.37 ± 1.82%

A, B, C, D については表1参照

3.1.3 O.D.260/O.D.230比

Wizard法（A法）でO.D.260/O.D.230比が1を下回るのは、試薬として用いるグアニジン自体に230nmの吸収がある⁵⁾ためと考えられた。

その他の抽出法ではO.D.260/O.D.230比は1を上回り、糖の混入も少なく良好であった。

3.1.4 DNA収量の変動（文献値⁴⁾との比較検討）

C>D>A>Bの順にDNA収量のばらつきが大きかった。平成15年度組換えDNA食品検査外部精度管理⁴⁾報告書によると、RRS大豆試料についてDNeasy旧法でDNA抽出した機関が18機関、CTAB法が3機関、Wizard法が1機関あった（各n=3）ので、各抽出法でのDNA収量の変動率を比較検討した。CTAB法でのDNA収量の相対標準偏差は7.84%、23.7%、29.6%となっており、今回のDNA抽出でのCTAB法の相対標準偏差は14.9%であるので、CTAB法については比較的ばらつきは少ないと考えられた。（相対標準偏差7.84%の機関では、抽出の際に乳鉢を用いる工夫をしていたとある。）また、Wizard法は1機関しか抽出データがないので比較は難しいが、その相対標準偏差は26.3%であり、著者等の抽出による相対標準偏差は7.26%であった。DNeasy旧法については、平成18年6月29日付け食安発第0629002号にて抽出法が一部改正された際に同抽出法も一部プロトコルが改正されている。旧法では混入率が他法と比較して著しく低い値として得られる事実が明らかになったため⁶⁾、抽出時間が15分から60分に延長され、氷冷時間、遠心分離の時間の一部（スウィング式遠心機指定部分）が延長された。このため比較対象にするのは多少無理があるが、18機関の相対標準偏差は12.4%～46.7%の範囲にあり、7.25%という今回得られた相対標準偏差からは、DNeasy改定法（B法）でのDNA収量のばらつき

は少ない方ではないかと考えられた。また、GM quick-er法（C法）は同改正で新たに加えられた抽出法であるため、著者等の結果との比較はできなかった。

3.1.5 全抽出過程における所要時間

D>A>B>Cの順に抽出所要時間が長かった。D法は4時間半～5時間で手技も煩雑であり、抽出だけでは1日がかかりとなる。また、抽出DNAを完全にTE緩衝液に溶解するため、4℃で一晩保存しなければならないので、吸光度測定は翌日以降となる。A法は4時間程度、B法は3時間～3時間半程度、C法は1時間以内で抽出作業が終了し、その日のうちに吸光度測定を行うことができる。C法については、大豆粉碎試料中のRNAやタンパク質・多糖類処理のために、他キットにはある60℃前後で試料溶液を加温する作業が無いことと、全体を通して遠心時間が短いことから作業時間の短縮が可能となっている。

3.2 各種DNA抽出法の定量PCR値に及ぼす影響について

模擬試料大豆から種々の方法で抽出されたDNAを用いてRRSの定量PCRを行い、その結果を表3に示した。

3.2.1 レクチン遺伝子（Le1）増幅

Le1はC>D>B>Aの順に多く増幅され（表3）、DNA収量の多さ（A>B>D>C）とは逆の順序となった。これは吸光度測定において抽出DNA溶液が実際のDNA溶液濃度より低濃度に測定されたため、この測定値をもとに調整する定量PCR用のサンプルのDNA濃度が20ng/μLより高めになり、レクチン遺伝子が多くなったためではないかと考えられた。また、Le1遺伝子コピー数が20,000コピー以上の値であれば、検出限度0.1%が保証される⁷⁾とされているが、A法については20,000コピーを下回っていた。

表3 定量PCRの結果(n=4)（模擬試料大豆）

記号	Le1 遺伝子コピー数	RRS 遺伝子コピー数	混入率%	Welch 検定 t 値
A	15711±7.44%	389±6.56%	2.39±8.95%	0.055
B	21469±8.51%	577±8.56%	2.59±0.97%	1.000
C	53237±10.8%	1447±3.73%	2.63±10.9%	2.771
D	48675±11.7%	1509±12.7%	2.98±6.74%	0.138

（自由度6のt分布5%点 ± 2.447 ）

A, B, C, Dについては表1参照

Welch 検定はLe1コピー数について行った。

3.2.1.1 Welchの検定

Welchの検定⁸⁾とは、標本数が少ない時、母分散を標本の分散数から推定する際に、その不確かさを考慮に加えた有意差検定法であり、2つの標本の母分散が異なる場合の検定法である。Le1増幅について、n=4で一度にPCRで分析した場合と、n=2ずつで2回に分けてPCRで分析した結果とでLe1増幅に有意差があるかどうかをWelchの検定により調べたところ、A、B、D法についてはそれぞれ有意差は認められなかったが、C法については有意水準5%で平均値に有意な差が見いだされた。

Le1増幅数のばらつきについて相対標準偏差で比較すると、C>D>B>Aの順に多いことと、Welchの検定結果から、C法はLe1増幅について同一プレートでも、異なるプレート間でも、ばらつきが大きい傾向にあると考えられた。

3.2.2 混入率

D>C>B>Aの順に高い。平成15年度組換えDNA食品検査外部精度管理⁴⁾において、DNeasy旧法により抽出を行うと実際の混入率よりも測定値が低くなることが述べられている。しかし、前述のように現在のプロトコルとは異なるため参考にするのは難しい。また、今回の場合重量比で混入率5%に調整したサンプルを用いて分析を行ったが、全抽出法で2%台と低い値となった。

3.3 各種DNA抽出法の試薬代比較

1検体あたりの抽出にかかる費用は、A法は779円、B法は806円、C法は1033円、D法は711円であり、C>B>A>Dの順にコストがかかる。D法では試薬調製はもちろん必要となるが、A法ではキットの内容物の他に、バッファー等、自分で調製しなければならない試薬があることが購入費用の削減につながっている。

4 まとめ

著者らは、今回3種類のキットとキット不使用のDNA抽出法を用いて、大豆穀粒からのDNA抽出を行った。現行のCTAB法以外のキット法を用いるならば、QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 改訂法がルーチン分析に最も適していると結論された。その理由として、①DNA収量とその質も良好で、DNA収量のばらつきも小さいこと、②所要時間も3時間程度でその日のうちにDNA濃度の測定ができること、③Le1増幅数も平均して20,000程度であることで検出限度0.1%が保証されることがあげられ

る。デメリットとしては、抽出されたDNAが短く切断されている⁸⁾ため、混入率が低くなることがあげられる。試薬代に関してはA法・D法と比較すると高価になるが、キットに同梱されている試薬の使用のみで抽出できることから、試薬調製の煩雑さが無くなることにメリットがあると考えた。これらをもとに、CTAB法で充分な量のDNAが得られなかった場合に、QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 改訂法での検討が可能となるように、当センターの大豆穀粒に対するDNA抽出法SOPを改訂した。

<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) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0629002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18年6月29日
- 4) 笠間菊子, 渡邊敬浩, 鈴木達也, 菊地博之, 時下祥子ほか: 遺伝子組換えダイズ(ラウンドアップ・レディー・大豆40-3-2系統)の定量検査法の外部精度管理試験, 食衛誌 46(6), 270-276, 2005
- 5) 大森清美, 土屋久世, 平山クニ: シリカベースレジソタイプキット法による遺伝子組換え食品からのDNA抽出に関する検討, 第41回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 116-117, 2004
- 6) 大森清美: 「遺伝子組換え食品およびアレルギー食品検査と情報ネットワークについて」まとめ, 第43回全国衛生化学技術者協議会自由集会食品部会, 2-3, 2006
- 7) 杉浦義紹, 伊藤光男, 大石英明, 奴久妻聡一, 田中敏嗣: ABI PRISM 7900HTによる大豆および大豆加工品の定量PCR試験, 第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 86-87, 2003
- 8) 長谷川勝也: 確率・統計のしくみがわかる本, 378-432, 技術評論社, 東京, 2000