

カラムへのライナー装着によるトウモロコシ 加工食品からの DNA 抽出迅速化

Rapid DNA Extraction from Maize Processed Foods
by Attaching a Liner to the Column

今野 綾乃 細川 葵 菅野 陽平

Ayano KONNO, Aoi HOSOKAWA and Yohei SUGANO

Key words : genetically modified maize (遺伝子組換えトウモロコシ) ;
DNA extraction (DNA 抽出) ; liner (ライナー)

緒 言

トウモロコシは、加工食品・飼料・バイオエタノールなど様々な目的で利用され、その需要は世界的に増大し続けている¹⁾。そのため、平成8年以降、トウモロコシを効率よく生産するために遺伝子組換えトウモロコシの栽培が盛んに行われてきた^{2, 3)}。一方、平成12年には安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 (スターリンク) が国内の食品から検出される事案が発生し、社会的関心を集めるといった出来事があった⁴⁾。このような背景から、わが国では農林水産省の農林物資の規格化及び適正化に関する法律 (JAS 法)⁵⁾ 及び厚生労働省による食品衛生法の一部改正⁶⁾ を行い、平成13年4月から安全性未審査の遺伝子組換え食品の流通を防ぐ仕組みを整備した。これをうけ、北海道では道民の食の安全・安心を確保するために、平成15年から道内に流通するトウモロコシ加工食品を対象に安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) 混入の有無について検査を開始した。この検査は PCR で行っており、その PCR に供する DNA は陰イオン交換樹脂タイプキット ((株)キアゲン製 Genomic-tip 20/G) により抽出する。しかし、本抽出法は自然落下方式による固相抽出のため、コーンスープのような粘性をもつ試料では Genomic-tip 20/G カラムに目詰まりを起し、抽出時間が大きく増加することが課題となっている。

残留農薬検査では、固相抽出の迅速化を目的としてカラムに細い管から構成されるライナーを装着することがある。これらは、細い管の部分で発生する毛細管現象による吸引圧が流速の改善をもたらし⁷⁾ 処理時間の短縮に効果があるとされている。そのため、遺伝子組換えトウモロコシ検査の DNA 抽出においても、ライナーを Genomic-tip 20/G

カラムに装着することで抽出時間を短縮できると考え、トウモロコシ加工食品からの DNA 抽出迅速化及び装着が DNA に与える影響について検討を行ったので、その結果を報告する。

方 法

1. 試験品

本研究では、道内で流通しているトウモロコシ食品3試料 (冷凍トウモロコシ、生トウモロコシ、コーンスープ) を使用した。

2. ライナー

ライナーはジーエルサイエンス(株)製 GL-SPE 自然落下デリバリーチップ (PTFE 製、長さ 70 mm、内径 1.8 mm) を使用した。

3. 抽出前処理

1) 可溶化液の調製

均質化した試料 2 g を採取し G2 緩衝液 ((株)キアゲン製) 15 mL を加えた後、RNaseA ((株)キアゲン製) を 20 μ L、ProteinaseK ((株)キアゲン製) を 200 μ L 添加し、50°C で 1 時間静置した。続いて、1,500 \times g、4°C で 15 分間遠心し上清を回収した。この上清を 9,000 \times g、4°C で 5 分間遠心し上清を回収し可溶化液とした。

2) 可溶化液の粗精製による DNA 溶液の調製

ライナーの効果を明確に確認するため可溶化液の粗精製を行った。そこで、「コメ (63Bt、NNBt、CpTI) の検査方法⁸⁾」に従い DNA 抽出を行った。抽出後、DNA 濃度を測定し 4.5 ng/ μ L になるよう超純水で希釈したものを DNA 溶液とした。この DNA 溶液は、「粗精製した DNA 溶液に対するライナー装着の効果」の検討に使用した。

4. DNA 抽出

本稿では、カラムに何も装着せずに DNA 抽出を実施した場合を自然落下法、カラムの先端にライナーを装着し DNA 抽出を実施した場合をライナー法とした (図1)。DNA 抽出は、「JAS 分析試験ハンドブック遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル第3版⁹⁾」の「I 基本操作編」に記載の「3,2,6 抽出操作: QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」の (7) 以降の操作に準じた (図2)。Genomic-tip 20/G カラムに QBT 緩衝液 ((株)キアゲン製) 1 mL を注入 (平衡化) した後、3. 抽出前処理で調製した DNA 溶液を 2 mL、または可溶化液を 0.5 mL もしくは 2 mL 負荷 (吸着) した。次に、QC 緩衝液 ((株)キアゲン製) を 2 mL ずつ 3 回注入 (洗浄) した後、カラム中の QC 緩衝液を除去するため 50°C の QF 緩衝液 ((株)キアゲン製) 200 μ L を注入し流出液は廃棄した。さらに、ライナー法ではライナー装着による空隙容積分 200 μ L の QF 緩衝液を追加で注入し、流出液を廃棄した。続いてカラムを新しい 2 mL チューブに移し、50°C の QF 緩衝液 1 mL を注入 (溶出) して溶出液を回収した。本稿では、平衡化から溶出までの工程を抽出時間として検討を行った。さらに精製及び濃縮のため、この溶出液にイソプロパノール 700 μ L を加えよくボルテックスし、17,800 \times g、4°C で 5 分間遠心し

上清を捨てた後、70%エタノール 1 mL を加え 17,800 \times g、4°C で 5 分間遠心した。さらに、上清を捨てて遠心濃縮装置にて目視で水滴が見えなくなるまで乾燥させた。その後、超純水 50 μ L に溶解した。

5. DNA の定量

Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific 製) で紫外外部吸収スペクトルを測定し A260 の値が 1 のとき DNA 濃度を 50 ng/ μ L として DNA 濃度を算出した。また、A260/A280 及び A260/A230 を算出し DNA 純度とした。

6. FRED assay による DNA 断片化指数の算出

(株)ニッポン・ジーン製 FRED assay Kit for plant DNA を使用した。プライマー及びプローブは、キット付属の P100 Primer & Probe Mix 及び P400 Primer & Probe Mix を使用した。酵素は、Direct Ace qPCR Mix plus ROX Tube ((株)ニッポン・ジーン製) を使用した。測定するサンプルは、DNA 溶液 (20 ng/ μ L) 及びコントロールとして No Fragmentation Control (キット付属) を使用した。リアルタイム PCR を 1 抽出につき各 3well 併行で行い Ct 値を測定した。リアルタイム PCR は QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher scientific 製) で行い、反応条件はキットのマニュアルに従った。反応後、以下の式に測定値を当てはめ DNA 断片化指数 (DNA Fragmentation

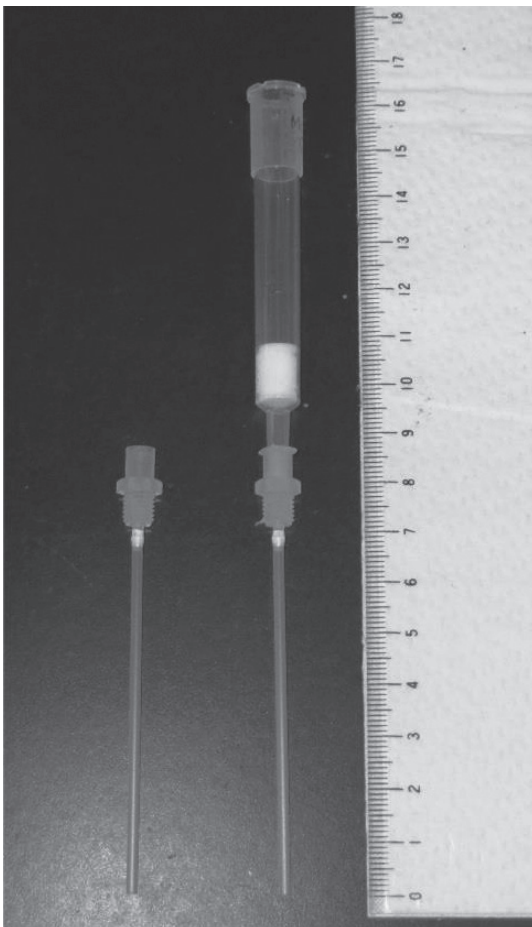


図1 ライナー (左) 及びライナーを Genomic-tip 20/G カラムに装着した状態 (右)

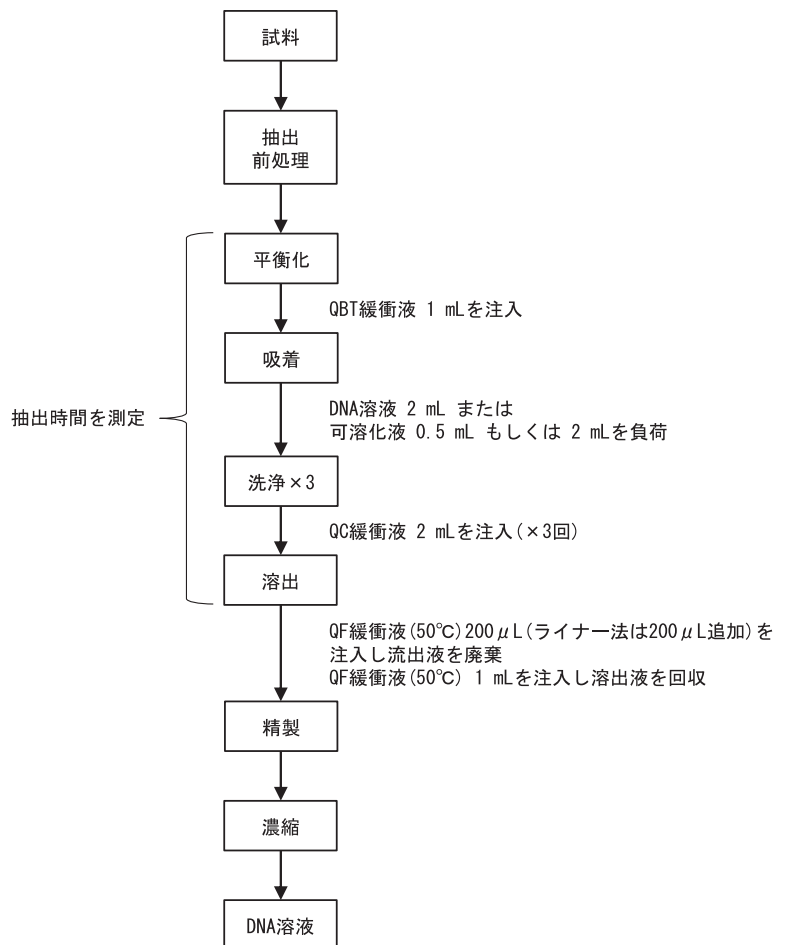


図2 Genomic-tip 20/G カラムを用いた DNA 抽出工程

Index : DFI) を算出した。

$$DFI = 1 - \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{44Cl}{3}}$$

DFI は 0~1 の値で算出され、例えば DFI = 0.89 と算出された場合、鋳型 DNA 溶液中に含まれる 100 bp の標的 DNA のうち、約 9 割の DNA が断片化していることを示す。

7. 統計解析

統計解析は Excel ver.16.0.5378.1000 を用い t 検定を行った。

結果及び考察

1. 粗精製した DNA 溶液に対するライナー装着の効果

はじめに、ライナー装着が抽出時間に与える影響を明確に確認するため、粗精製によりマトリックスを除去した DNA 溶液を用いて、平衡化、吸着、洗浄 (3 回)、溶出に要した時間を抽出時間として比較を行った。また、DNA の品質に与える影響も調べるため、回収 DNA 濃度、DNA 純度及び DNA の断片化を確認した。

DNA 溶液 2 mL (9 µg 相当) を Genomic-tip 20/G カラムに負荷し、自然落下法及びライナー法により 6 併行で抽出を行った (図 3)。全抽出時間は自然落下法で 25 分 11 秒、ライナー法で 9 分 11 秒と統計的に有意な差が認められ ($p < 0.01$)、抽出時間を 16 分短縮することができた。各工程の抽出時間を詳細に確認すると、自然落下法で 2 分 43 秒 (平衡化)、3 分 58 秒 (吸着)、5 分 7 秒~5 分 16 秒

(洗浄)、2 分 55 秒 (溶出) であり、ライナー法で 1 分 16 秒 (平衡化)、1 分 25 秒 (吸着)、1 分 49 秒~1 分 54 秒 (洗浄)、54 秒 (溶出) と全工程で統計的に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。自然落下法の抽出時間を 100% としたときのライナー法の抽出時間の割合は、47% (平衡化)、36% (吸着)、35~37% (洗浄)、31% (溶出) であり、抽出工程が進むにつれ抽出時間の割合は低下し、ライナー装着の効果が顕著に認められた。

次に DNA 品質について回収 DNA 濃度、DNA 純度、DNA の断片化に注目し検討を行った (表 1)。回収 DNA 濃度は、負荷した DNA が 100% 回収された場合 (180 ng/µL、理論値) に対し、自然落下法で 69.5 ng/µL、ライナー法で 56.4 ng/µL と、ライナー法がやや低い値を示したが共に PCR に必要な量は回収できた。DNA 純度は A260/A280、A260/A230 共に同等の値であった。

DNA の断片化の程度を示す DFI は抽出前で 0.462、自然落下法による抽出後で 0.498、ライナーによる抽出後で 0.497 となり、いずれも抽出により断片化がやや進行したが、ほぼ同じ値を示していた。従って、操作法の違いが断片化率に影響を与えていないと判断し、以降の検討では断片化の検討は省略した。以上の結果から、Genomic-tip 20/G カラムにライナーを装着することで、自然落下法で抽出した場合と同程度の DNA 品質を維持したまま、抽出時間を短縮可能なことが示された。

2. 実試料に対するライナーの効果

実際の検査ではマトリックスの除去は行わず可溶化液を

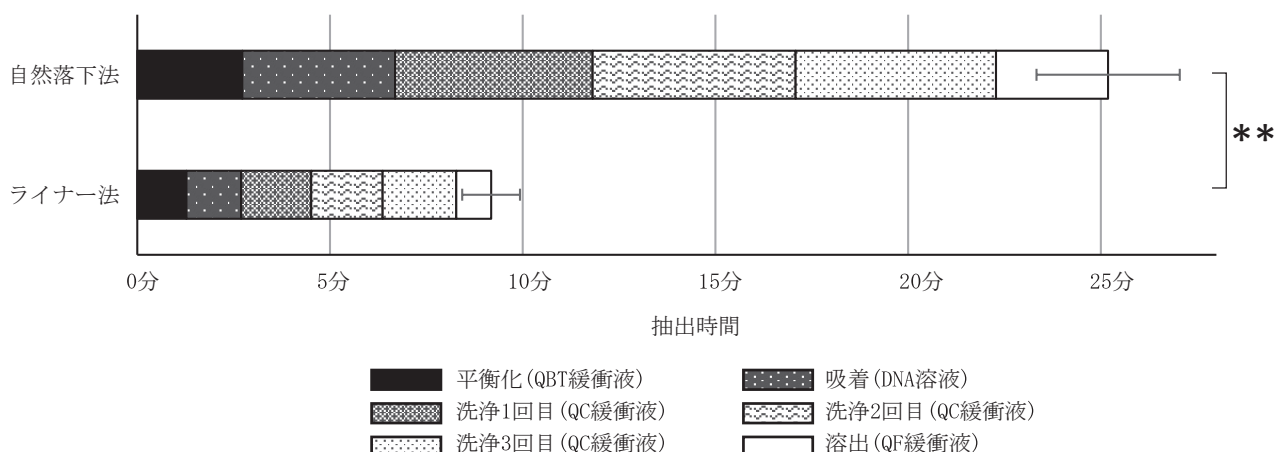


図 3 粗精製した試料の抽出時間 (n=6)

** : $p < 0.01$

表 1 粗精製した DNA 溶液の抽出時間及び DNA の品質 (n=6)

操作法	抽出時間	回収 DNA 濃度 (ng/µL)	DNA 純度		DFI
			A260/A280	A260/A230	
抽出前	—	180*	1.82	2.07	0.462
自然落下法	25 分 11 秒 ± 111 秒	69.5 ± 10.7	1.83 ± 0.01	2.11 ± 0.09	0.498 ± 0.029
ライナー法	9 分 11 秒 ± 45 秒	56.4 ± 9.7	1.86 ± 0.05	2.27 ± 0.26	0.497 ± 0.021

*負荷した DNA (9 µg) が 100% 回収された場合の DNA 濃度 (理論値)

そのままカラムに負荷することから、実試料のマトリックス存在下でも同様にライナー装着の効果が得られるか検討した。

生トウモロコシから調製した可溶化液 2 mL をカラムに負荷し、自然落下法及びライナー法にて 6 併行で抽出した (図 4)。全抽出時間は自然落下法で 26 分 0 秒、ライナー法で 9 分 7 秒と統計的に有意な差が認められ ($p < 0.01$)、約 17 分短縮することができた。各工程の抽出時間を詳細に確認すると、自然落下法で 2 分 15 秒 (平衡化)、4 分 3 秒 (吸着)、5 分 0 秒~5 分 46 秒 (洗浄)、3 分 31 秒 (溶出)、ライナー法で 1 分 4 秒 (平衡化)、1 分 26 秒 (吸着)、1 分 49 秒~1 分 57 秒 (洗浄)、58 秒 (溶出) と平衡化以外のすべての工程で統計的に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。自然落下法に対するライナー法の抽出時間の割合は、48% (平衡化)、35% (吸着)、34~36% (洗浄)、27% (溶出) であり、前章の結果と同様に抽出工程が進むにつれ抽出時間の割合は低下した。

回収 DNA 濃度は、自然落下法に比べライナー法では若干低値であったが、PCR に必要な量は十分に回収できた (表 2)。DNA 純度は A260/A280、A260/A230 共に同等の値であった。以上の結果から、実試料に対しても、Genomic-tip 20/G カラムにライナーを装着することにより抽出時間を短縮可能なことが示された。

3. カラムに目詰まりする試料に対するライナーの効果

カラムに目詰まりする試料に対するライナーの有用性を評価するため、過去の検査でカラムに目詰まりを起こしたコーンスープ試料を使用し抽出時間及び DNA の品質へ与える影響を検討した。

コーンスープから調製した可溶化液 0.5 mL をカラムに負荷し、自然落下法及びライナー法にて 6 併行で抽出した (図 5)。全抽出時間は自然落下法で 102 分 4 秒、ライナー法で 15 分 55 秒と統計的に有意な差が認められ ($p < 0.01$)、抽出時間を約 86 分短縮することができた。各工程の抽出時間を詳細に確認すると、自然落下法で 2 分 49 秒 (平衡化)、26 分 54 秒 (吸着)、18 分 40 秒~25 分 14 秒 (洗浄)、9 分 43 秒 (溶出)、ライナー法で 1 分 15 秒 (平衡化)、3 分 49 秒 (吸着)、2 分 54 秒~3 分 47 秒 (洗浄)、1 分 12 秒 (溶出) と、全工程で統計的に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。自然落下法に対するライナー法の抽出時間の割合は、44% (平衡化)、14% (吸着)、15~16% (洗浄)、12% (溶出) であり、これまでの検討結果と同様に抽出工程が進むにつれ抽出時間の割合は低下した。また、目詰まりする試料は粗精製した試料及び実試料よりも自然落下法に対するライナー法の割合がより顕著に減少していた。これは、目詰まりする試料を対象にした抽出において、自然落下法ではひとたび目詰まりが発生すると自然に解消することはないが、ライナー法は絶えず吸引圧が発生し抽出が進行するためと考えられた。従って、ライナー装着により実試料、特に目詰まりする試料の抽出時間を著しく短縮可能なことが示された。

また、回収 DNA 濃度及び DNA 純度の A260/A280 については、操作法にかかわらず同等の値であった (表 3)。一方、A260/A230 ではライナー法が自然落下法と比べやや低値を示した。A260/A230 が低値となる原因として、タンパク質の存在、糖質キャリアオーバー、核酸抽出からの残留フェノールの存在があるとされている¹⁰⁾。本検討においても、ライナーの装着で発生する吸引圧が上記のよう

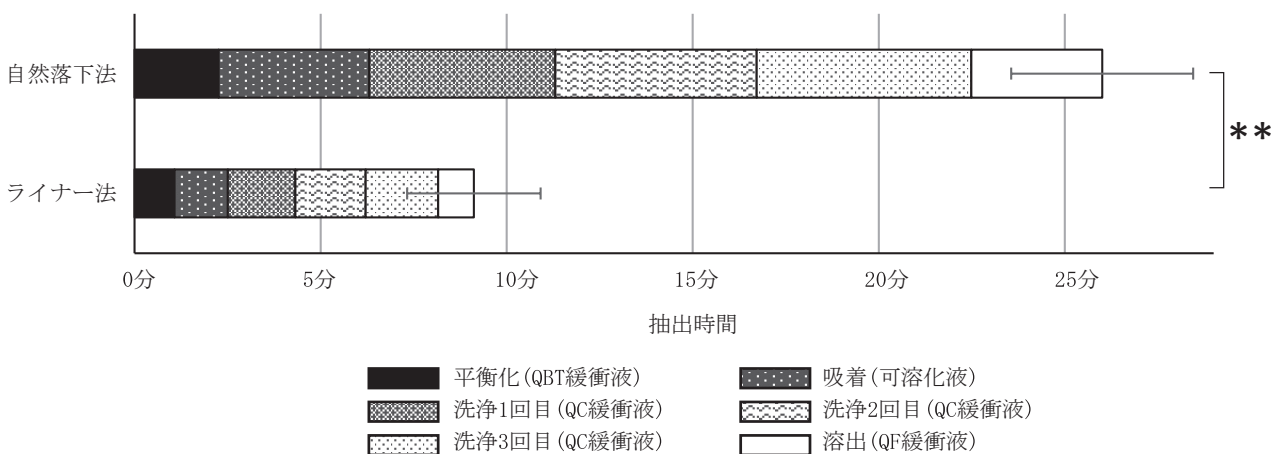


図 4 実試料の抽出時間 ($n=6$)

** : $p < 0.01$

表 2 実試料の抽出時間及び DNA の品質 ($n=6$)

操作法	抽出時間	回収 DNA 濃度 (ng/ μ L)	DNA 純度	
			A260/A280	A260/A230
自然落下法	26 分 0 秒 \pm 147 秒	246.1 \pm 30.1	1.78 \pm 0.03	2.11 \pm 0.11
ライナー法	9 分 7 秒 \pm 108 秒	179.9 \pm 31.8	1.80 \pm 0.02	2.17 \pm 0.04

な核酸以外の成分を引き込んでしまった可能性も考えられるが詳細は不明であった。しかしながら、A260/A230の値は高純度とされる1.8~2.2¹¹⁾の範囲内にあり、検査に影響はないと考えた。

カラムに目詰まりする試料について、厚生労働省通知別添「害虫抵抗性コメ（63Bt コメ、NNBt コメ及び CpTI コメ）の検査法」では、シリンジのプランジャーで加圧することにより目詰まりを解消する方法が示されている⁸⁾。しかし、プランジャーによる加圧は同時に多検体の処理を行うことが難しく時間を要すると考えられた。一方で、ライナー法は Genomic-tip 20/G カラムに装着するだけでよく、多検体からより迅速に DNA 抽出を行う方法としての利用が期待できる。

以上の結果から、カラムにライナーを装着することにより検査に使用可能な品質を保ったまま抽出時間を短縮可能なことが示された。安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ検査では、幅広い加工食品を対象とするためコーンスープのような抽出時間が極端に長くなる試料についても検査を行う必要がある。このような試料からも迅速に抽出を行うために、カラムへのライナー装着は有効であると考えられた。

文 献

- 1) 安井 護：世界の飼料穀物の需要について、トウモロコシを中心に、畜産技術, 807, 28-31 (2022)
- 2) 農林水産省ホームページ：世界の遺伝子組換え農作物栽培状況（令和元年），<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/zyoukyou/attach/pdf/index-36.pdf>（確認：2024年5月10日）

- 3) AgbioInvestor GM monitor: GM production, <https://gm.agbioinvestor.com/gm-production>（確認：2024年5月10日）
- 4) 片岡 寛：遺伝子組換え食品に関する表示義務化の問題点、学術の動向, 6(8), 36-40 (2001)
- 5) 農林水産省告示第517号「遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準」, 平成12年3月31日
- 6) 厚生労働省医薬局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の施行について」, 平成13年3月15日
- 7) GL-Science ホームページ：GL-SPE 自然落下マニホールド（一般分析用），https://www.gls.co.jp/product/spe_accessories/other_manifold/01015.html（確認：2024年5月10日）
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長発0528第1号「（別添）害虫抵抗性遺伝子組換えコメ（63Bt コメ、NNBt コメ及び CpTI コメ）」の検査法, 平成24年5月28日
- 9) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター編：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 第3版, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター, さいたま, 平成24年9月24日, https://www.maff.go.jp/j/jas/hyoji/pdf/idenshi_manual.pdf（確認：2024年5月10日）
- 10) Thermo Fisher Scientific ホームページ：NanoDrop 分光光度計のリソース, <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop/resources.html>（確認：2024年5月10日）
- 11) Philippe Desjardins, Deborah Conklin: NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. J. Vis. Exp., 45, e2565 (2010)

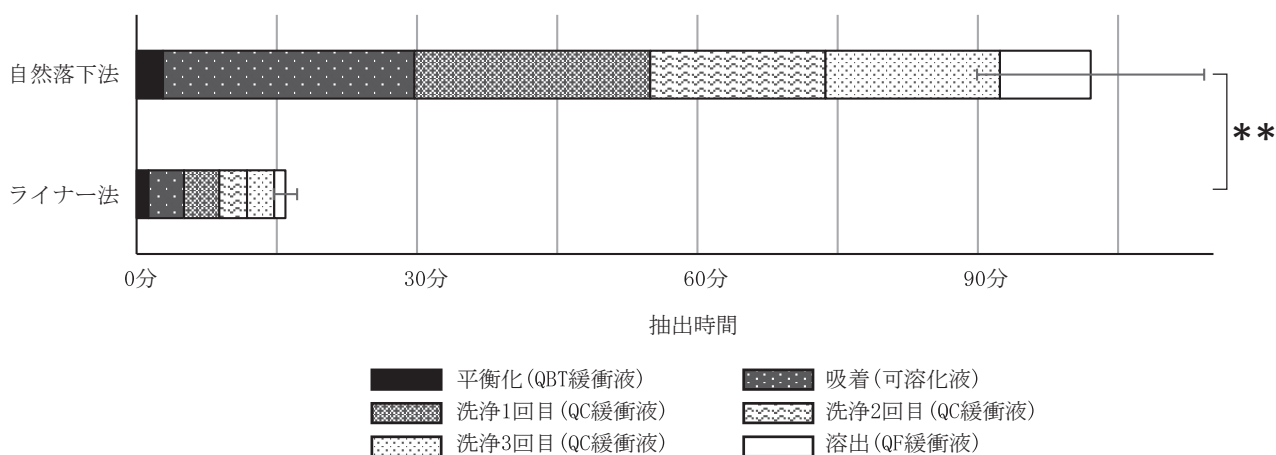


図5 カラムに目詰まりする試料の抽出時間 (n=6)

** : $p < 0.01$

表3 カラムに目詰まりする試料の抽出時間及び DNA の品質 (n=6)

操作法	抽出時間	回収 DNA 濃度 (ng/μL)	DNA 純度	
			A260/A280	A260/A230
自然落下法	102 分 4 秒 ± 553 秒	107.8 ± 10.6	1.82 ± 0.05	2.06 ± 0.06
ライナー法	15 分 55 秒 ± 70 秒	114.2 ± 6.0	1.80 ± 0.01	1.89 ± 0.04