ノート

コンニャク製粉含有コメ粉からのコメ DNA 抽出精製法の検討

(平成 22 年 5 月 10 日受理)

峰松 和彦¹ 中村 公亮² 穂山 浩^{*2} 張替直輝³ 中島 治³
 橋田 和美⁴ 手島 玲子² 飯塚 太由¹

Extraction and Purification Method of Rice DNA from Rice Powder Containing *Konjak* Flour

Kazuhiko MINEMATSU^{1,†}, Kosuke NAKAMURA^{2,†}, Hiroshi AKIYAMA^{*2}, Naoki HARIKAI³,
 Osamu NAKAJIMA², Kazumi KITTA⁴, Reiko TESHIMA² and Tayoshi IIZUKA¹

¹ Japan Inspection Association of Food and Food Industry Environment: 2-10-3 Shinkiba,
 Koutou-ku, Tokyo 136-0082, Japan;

² National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

³ School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University:
 11-68 Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan;

⁴ National Food Research Institute: 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642,
 Japan; * Corresponding author

Rice powder containing *Konjak* flour made with tuberous roots of *Amorphophallus konjac* is imported as a rice-processed product from China to Japan. An improved DNA purification method for the polymerase chain reaction (PCR) analysis of rice in such products is necessary, since *Konjak* flour constituents absorb the DNA purification buffer to form a gel, and cause problems in the subsequent purification steps. Here, we present a simple preparative system for isolation of the rice and a purification method of the rice DNA from the product. The purified DNA was confirmed to be a good template for both PCR and real-time PCR.

(Received May 10, 2010)

Key words: 遺伝子組換え コメ genetically-modified rice; コンニャク製粉 *Konjak* flour; コメ加工食品 rice product; 検知法 detection method; DNA 抽出 DNA purification

緒 言

2010 年 1 月 4 日付 “New Scientist” によると、2009 年 11 月に中国当局は世界に先駆けて害虫抵抗性遺伝子組換えコメ (Huahui 1 系統および Shanyou 63 系統、以下、GM Bt コメと略す。) に正式な安全性認可を与えた^{*1}と報告している。一方、わが国では GM Bt コメは安全性未承認であり、今後、中国国内で商業栽培が進むにつれて輸入米の中に混入の可能性も考えられ¹⁾、水際の監視が求

められる。コメを加工した製品を対象品目とした GM Bt コメの試験法として、定性 polymerase chain reaction (PCR) を用いた検知法が通知されている (厚生労働省通知 食安監発第 0220002 号^{*2}、以下、通知試験法と略す。)。通知試験法ではコメ内在性遺伝子 (sucrose phosphate synthase 遺伝子, SPS)^{2),3)} が検出されることが、DNA 抽出が適切に行われたか否かの確認および GM Bt コメ DNA の検知の前提条件となっており、PCR 増幅の結果で SPS が検出されない場合には、その試験は無効、すなわち「検知不能」の判定結果となる。

コンニャク製粉含有コメ粉は、主に中国から輸入されるコメ加工品であるが、通知試験法に従って操作を行うと検知不能となる検体が多いことが検疫所などの試験機関において問題視されていた (私信)。これは、通知試験法の抽出方法では、コンニャク製粉による抽出緩衝液の吸収のため DNA 抽出が困難になることや、純度の高い DNA 抽出

* 連絡先 akiyama@nihs.go.jp

¹ (財)食品環境検査協会: 〒136-0082 東京都江東区新木場 2-10-3

² 国立医薬品食品衛生研究所 代謝化学部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

³ 武庫川女子大学薬学部: 〒663-8179 兵庫県西宮市甲子園九番町 11-68

⁴ (独)農研機構食品総合研究所: 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

[†] These authors contributed equally to this study.

^{*1} Coghlan, A. “Gene rice on its way in China”, New Scientist online, Reed Business Information Ltd., 2010 年 1 月 4 日 (<http://www.newscientist.com/article/dn18328-gene-rice-on-its-way-in-china.html>).

^{*2} 厚生労働省通知 (平成 19 年 2 月 20 日付食安監発第 0220002 号)「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」, 厚生労働省

液を調製することの難しさ、原材料にコメが少量のみ含まれる可能性があること⁴⁾などが原因と考えられた。そこで、本研究では、まず、コンニャク製粉含有コメ粉からコンニャク画分、特に多糖画分を効果的に除去する方法を試みた。また併せて、コンニャク製粉含有コメ粉から精製したコメ粉のDNAを使用し、通知試験法のPCR検査への適合性について検討を試みた。

実験方法

1. 試料および試薬

コンニャク製粉含有コメ粉試料は、一般的な配合割合（コンニャク製粉40% (w/w)、コメ粉60% (w/w)）に基づいて、都内のスーパーで購入した特に粒子径の差のないコンニャク製粉およびコメ粉それぞれ5製品をランダムに選択し擬似混入試料5検体（Sample A, B, C, D, E）を調製して用いた。また、うるち米、もち米およびビーフンはいずれも都内の市販品を購入して用いた。100 bp DNA ラダーマーカーは宝酒造(株)製、試料溶解用バッファーはニッポンジーン(株)製 GE1 buffer、アガロースは宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」をそれぞれ使用した。プライマーの合成はグライナージャパン(株)に委託し、逆相カートリッジ精製されたものを用いた。また、純水は日本ミリポア(株)製 Milli-Q Synthesis A10 で精製した超純水を用いた。他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. 使用機器

恒温槽はドライサーモユニット DTU-1B（タイテック(株)製）、冷却遠心機は Avantii HP25（Beckman 社製）、卓上遠心機は KR-1000（フナコシ(株)製）、タッチミキサーは MT-51（ヤマト(株)製）、分光光度計は NanoDrop ND-1000（Thermo Fisher Scientific 社製）をそれぞれ用いた。定性PCR装置は GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems 社製）、電気泳動装置は Mupid- α （アドバンス(株)製）、ゲルイメージ解析装置は AE-6905H Image Saver HR（アトー(株)製）をそれぞれ用いた。また、リアルタイムPCR機器には ABI PRISM 7900HT Sequence Detector System（Applied Biosystems 社製）を用いた。

3. 試料の前処理法とDNAの抽出

うるち米、もち米およびビーフンは、粉碎器（ミキサーミル MM200, Retsch 製）で均質に細く粉碎した。コンニャク製粉含有コメ粉は、2 g を 50 mL 容チューブに採取し、40 mL の純水もしくは GE1 buffer を入れてボルテックミキサーで激しく混合し、均質化した。4℃ で 1 時間静置した後、浮遊してきた固形物を取り除いた。チューブに残った沈殿物からコンニャク製粉由来の混在物を除くため再攪拌後、さらに 1 時間静置して上清を除き、沈殿物を検体とした。DNA の抽出・精製は、シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM Quicker2, ニッポンジーン(株)製）の DNA 精製プロトコールに従って行っ

た。また、別途調製したコメ DNA 50 ng 溶液にニッポンジーン(株)製定性試験用 GM コメ Bt コメ陽性コントロールプラスミド 1000 コピーを添加し、コメ DNA 50 ng 溶液で 10 倍希釈系列を作成したものを GM 含有試料として実験に供した。

4. 抽出DNAの評価

抽出DNAの純度は、DNA抽出液を純水にて希釈後、分光光度計を用いて、230 nm, 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することによって行った。DNA濃度は、260 nm の吸光度を基に算出した。また、 A_{260}/A_{230} および A_{260}/A_{280} の吸光度比を求めることによって抽出DNAの純度評価を行った。抽出DNAの妥当性の評価は、PCR による SPS の増幅率および PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、その電気泳動プロファイルを解析することによって行った。SPS 検出には、コメ陽性対照用のプライマー対（SPSF: 5'-TTGCGCCTGAACGGATAT-3' および SPSR: 5'-CGGTTGATCTTTTCGGGATG-3'）を用い、GM Bt コメ検出には、GM Bt コメ検出用プライマー対（AC-3F: 5'-GTTCGCCTATGGAACCTCTT-3' および AC-3R: 5'-TTCTGTGGTGGGATTTCGTC-3'）を用いた。PCR 条件は通知試験法に準拠した既報告のとおり行った^{5),6)}。すなわち、PCR 緩衝液（Applied Biosystems 社製）、0.20 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、0.2 μ mol/L プライマー対、ならびに 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ（Applied Biosystems 社製）を含む液に、10 ng/ μ L に調製した DNA 試料液 5 μ L（DNA として 50 ng）を水中で加え、全量を 25 μ L の PCR 反応液とした。PCR 反応液は、95℃ で 10 分間反応後、95℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、最後に 72℃ で 7 分間保持した後、4℃ で保存し、PCR 増幅反応液とした。アガロースゲル電気泳動には、100 mL 当たり 10 μ g の臭化エチジウムを含む 3% (w/v) アガロースを用いた。PCR 増幅反応液の 7.5 μ L をゲルに負荷し Tris-acetate-EDTA (TAE) 緩衝液中で 100 V 定電圧下に置くことによって泳動を行った。その後、ゲルイメージ解析装置を用いて、UV (312 nm) 照射下で DNA の電気泳動プロファイルを撮影した。

5. リアルタイムPCRによる解析

リアルタイムPCR反応液は、既報どおりに 25 μ L/well として調製した^{5),6)}。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems 社製）12.5 μ L、SPSF/SPSR プライマー対（終濃度各 0.4 μ mol/L）、コメ陽性対照用試験のコメ陽性対照用プローブ SPS-Taq: 5'-FAM-GACGCACGGACGACGGCTC-GGA-TAMRA3'（終濃度 0.2 μ mol/L）を混合し、純水で全量 20 μ L に調製後、10 ng/ μ L に純水であらかじめ調整した DNA 試料液 5.0 μ L を添加した。リアルタイムPCRは、ABI PRISM 7900 を用いてホットスタート法を採用し、50℃、2 分間の条件で保持した後、95℃ で 10 分間加温し、反応を開始した。その後、95℃ 30 秒、60℃

1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った。

結果および考察

1. 試料の前処理の検討

まず、コンニャク製粉含有コメ粉試料 5 検体を用いて、通知試験法に準じて DNA の抽出を試みた。その結果、0.5 g の試料 (Fig. 1A) に対し 2.1 mL の GE1 buffer を加え攪拌放置すると、Fig. 1B に示すように、いずれの検体においても検液自体がゲル化し採取できず、DNA 抽出精製を進める上で支障をきたすことが確認された。これは、コンニャク中のグルコマンナン多糖によって形成された網

目構造の中に多量の水が包含され膨潤^{7), 8)}してしまうことが原因であると考えられた。そこで、本研究ではこの固有のゲル化現象を利用し、コンニャク多糖を混合粉中から除去することを試みた。すなわち、コンニャク製粉含有コメ粉試料 2 g に純水 20 mL を加えると、コンニャク多糖成分が一様に水分を吸収しゲル化したため、2 倍量の純水計 40 mL を加え激しく攪拌し、均質混合後、1 時間静置した。その結果、Fig. 1C に示すように、上層部に固形物の浮遊を認めた。そこで、同溶液中の底に沈殿した白色沈殿物 0.5 g を採取し、通知試験法に従って DNA の抽出精製を行った。次いで、SPS に特異的なプライマー対 (SPSF/SPSR) を用いて PCR 増幅した結果、81 bp の特異的増幅

Fig. 1. Analysis of rice product containing a mixture of *Konjak* flour and rice powder

(A) A representative sample of the rice product. (B) Gel formation during DNA preparation according to the notification 0220002 of Feb. 20, 2007 by the Department of Food Safety, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan^{*2}. (C) Separation of rice from the product. (D) Qualitative PCR was performed using SPSF/SPSR primer set. Amplicon size is 81 bp. Lanes 1 and 2 were the negative controls with no template and no primers, respectively. Purified DNA from the isolated rice powder from Sample A was used as a template (Lane 3). Lane M represents 100 bp ladder size standards. Arrowheads indicate the position of the 500 bp and the 100 bp bands in Lane M.

Table 1. Yield and purity of the total genomic DNA^a purified from the rice isolated by the preparative method using water or buffer as a solvent

Solvent	DNA conc.		A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{230}	
	Mean (ng/ μ L)	RSD (%)	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
Water	147.2	11.6	2.22	3.66	1.83	1.44
GE1 buffer	139.0	4.3	2.57	14.17	1.86	1.89

^a Each value represents the mean and relative standard deviation (RSD (%)) of 5 extraction runs from 5 different samples.

^b A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} represent the UV absorption ratios of 260 nm/280 nm and 260 nm/230 nm, respectively, of genomic DNA individually extracted from the samples.

Scheme 1. Preparative method for isolation of rice sample from rice product containing a mixture of rice powder and *Konjak* flour

産物が得られ、白色沈殿物からコメ由来の DNA が採取されたことが確認された。以上の結果から、コンニャク製粉含有コメ粉試料からコメ粉のコメ DNA の抽出・精製が可能であることが示された (Fig. 1D)。

2. 効果的な分離条件の検討

コンニャク製粉含有コメ粉から効果的にコメ粉を分離する方法について、攪拌条件とゲル化温度、溶解対照溶液の諸条件について検討を行った。その結果、攪拌条件については、試料を 1 分間、均質溶解後、静置し、ゲル化させることが最適であることが示された。一方、1 時間以上激しく攪拌し続けた場合には、コンニャク多糖がうまくゲル化せず、コメ粉との分離が困難となることが明らかになった。ゲル形成を起こさせるための温度については、室温 (25°C) に 12 時間以上放置すると、サンプルの腐敗が進行した検体を確認したため、低温 (4°C) での静置が望ましいことが示された。一方、ゲル形成のための静置時間は長いほうが良好である傾向を示したが、1 時間の静置でも、コンニャク多糖が効果的に分離していることが示された。次にゲル形成のための溶媒についての検討を行った。すなわち、コンニャク製粉含有コメ粉試料を純水もしくは通知試験法に使用されている GE1 buffer に溶解し、両者を比較

した。その結果、Table 1 に示すように、いずれの溶媒においても抽出 DNA の収量や紫外領域吸光度比の有意な差は見られなかった。また、5 検体のコンニャク製粉含有コメ粉試料から得られたコメ粉のコメ DNA を鋳型に使用して、SPSF/SPSR プライマー対を用いた PCR を試みたところ、いずれの試料からも 81 bp の単一特異的なバンドを再現性良く増幅されることが明らかとなった。

以上のことから、コンニャク製粉含有コメ粉試料からのコメ粉の分離は、Scheme 1 に示す手順で行うことにより検査可能になることが示唆された。すなわち、2 g の試料を 50 mL 容チューブに採取し、純水 40 mL を入れて短時間ボルテックミキサーで激しく混合することで均質化し、4°C で 1 時間静置後、浮遊してきた固形物を取り除き再攪拌後、4°C で 1 時間静置した後、上清を除き、チューブに残った白色沈殿物を、コメ DNA 精製用の試料とした。

3. GM Bt コメの PCR 解析結果について

コンニャク製粉含有コメ粉に非意図的な安全性未承認の GM コメの混入を検知できるか検証するため、GM Bt コメの定性 PCR 検査用対象プライマー対を用いて、擬似 DNA 混入試料から GM Bt コメに特異的な遺伝子の定性 PCR による検出を試みた (Fig. 2A)。コンニャク製粉含有コメ粉から今回検討した抽出法で得られた DNA 溶液の DNA 量 50 ng に対し、GM コメ Bt コメ陽性コントロールプラスミドの 10 倍希釈系列 (1,000, 100, 10 コピー数) を添加して鋳型 DNA とし、AC-3F/AC-3R プライマー対と SPSF/SPSR プライマー対を用いて定性 PCR を実施した。その結果、両プライマー対は標準プラスミドを 10 コピー数以上の感度で検出可能であることが示された。また、プラスミドコピー数に依存的な増幅産物のバンドの強度は認められず、PCR による標的遺伝子の増幅が上限に達していると考えられた。

次に、5 検体のコンニャク製粉含有コメ粉試料から精製したコメ粉のコメ DNA を各々鋳型として、AC-3F/AC-3R プライマー対と SPSF/SPSR プライマー対を使用した定性 PCR を実施した。いずれの試料からもコメ内在性遺伝子陽性バンドのみが特異的に検出された。この結果より、すべての試料において GM Bt コメ陰性であることが示された (Fig. 2B)。以上の結果より、定性 PCR による試験が困難であると考えられていたコンニャク製粉含有コメ

Fig. 2. Agarose-gel electrophoresis of the PCR products

(A) Qualitative PCR was performed with the primer pair AC-3F/AC-3R or SPSF/SPSR. DNA purified from Sample A was mixed with 1,000 copies (Lanes 1, 2), 100 copies (Lanes 3, 4), 10 copies (Lanes 5, 6) and none (Lanes 7, 8) of the control plasmid for Bt rice. (B) DNAs purified from five independent samples (Lanes A, B, C, D and E) were used as templates. Either SPSF/SPSR or AC-3F/AC-3R was used as the primer set. No primer in the PCR reaction sample was used as a control. Lane P; control plasmid as the template, Lane N; no primer, Lane M; 100 bp ladder size standards

粉試料から、コンニャク多糖成分を効果的に分離し、コメ粉のコメ DNA の抽出精製を行うことで、GM Bt コメ混入の有無を検査可能であることが明らかになった。

また、得られた DNA 試料は、リアルタイム PCR を用いたコメ DNA の検出への利用について検証を行った。比較対照には、うるち米、もち米、ビーフンから通知試験法に従って精製した DNA を使用した。鋳型 DNA 量は、50 ng を使用しリアルタイム PCR を行った。その結果、Fig. 3 に示すように、うるち米 (Non-glutinous rice)、もち米 (Glutinous rice) およびビーフン (Rice vermicelli product) の Ct 値はそれぞれ 24.18, 24.31 および 26.94 であったのに対し、コンニャク製粉含有コメ粉試料の Ct 値はコメ加工品と同等の Ct 値 26.49 であることが明らかにされ

た。これらの結果より、リアルタイム PCR を用いても、GM Bt コメ検査が可能であることが確認された。

ま と め

本研究では、コンニャク製粉含有コメ粉試料からコメ DNA を抽出・精製する方法についての検討を行った。その結果、DNA 抽出操作前に、まず、コンニャク製粉とコメ粉とを分離することが肝要であることが示された。Scheme 1 に示した手順で得られるコメ粉のコメ DNA 抽出液を使用することで、定性 PCR およびリアルタイム PCR で再現性の高い結果を得ることができていることが確認された。本法は、コンニャク製粉含有コメ粉から、未承認 GM コメ混入の有無を確認するためのコメ DNA 精製方法

Fig. 3. Amplification plots of the real-time PCR using SPS-specific primers and probe

DNA samples purified from non-glutinous rice, glutinous rice, Sample A, and rice vermicelli product were used as templates. Ct values were determined at the threshold value of 0.20.

として有効であることが示唆された。

謝 辞

著者の峰松和彦と中村公亮の本研究における貢献度は同等である。本稿で紹介した内容の一部は、厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究）によるものである。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Akiyama, H. Idenshi kumikae shokuhin no kenchihou.

- Bunseki, **3**, 140–143 (2009).
- 2) Ding, J., Jia, J., Yang, L., Wen, H., Zhang, C., Liu, W., Zhang, D. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3372–3377 (2004).
- 3) Jiang, L., Yang, L., Zhang, H., Guo, J., Mazzara, M., Van den Eede, G., Zhang, D. International collaborative study of the endogenous reference gene, sucrose phosphate synthase (SPS), used for qualitative and quantitative analysis of genetically modified rice. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3525–3532 (2009).
- 4) Takahashi, K., Ishii, R., Matsumoto, R., Horie, M. Examination of cause of failure to taxon-specific DNA was not detected from bifun (rice vermicelli) using processing model experiment. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 37–42 (2010).
- 5) Akiyama, H., Sasaki, N., Ohki, K., Nakamura, F., Sakata, K., Nakamura, K., Omori, K., Nakashima, A., Furui, S., Kitta, K., Ozeki, Y., Teshima, R. A conventional PCR method to detect recombinant DNA from genetically modified rice lines not approved for use in processed foods. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **16**, 147–151 (2009).
- 6) Akiyama, H., Sasaki, N., Sakata, K., Ohmori, K., Toyota, A., Kikuchi, Y., Watanabe, T., Furui, S., Kitta, K., Maitani, T. Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5942–5947 (2007).
- 7) Huang, L., Takahashi, R., Kobayashi, S., Kawase, T., Nishinari, K. Gelation behavior of native and acetylated konjac glucomannan. *Biomacromolecules*, **3**, 1296–1303 (2002).
- 8) Paradossi, G., Finelli, I., Cerroni, B., Chiessi, E. Adding chemical cross-links to a physical hydrogel. *Macromolecules*, **14**, 3662–3675 (2009).