

## リアルタイムPCRを用いたコーンフレーク中のとうもろこしゲノムDNA検出について

曾我慶介, 中村公亮<sup>#</sup>, 岸根雅宏<sup>\*1</sup>, 高嶋康晴<sup>\*2</sup>, 宮原平<sup>\*3</sup>, 木俣真弥, 真野潤一<sup>\*1</sup>,  
高畠令王奈<sup>\*1</sup>, 小関良宏<sup>\*3</sup>, 橘田和美<sup>\*1</sup>, 近藤一成

### Studies on detection of maize genomic DNAs in cornflakes using real-time PCR

Keisuke Soga, Kosuke Nakamura<sup>#</sup>, Masahiro Kishine<sup>\*1</sup>, Yasuharu Takashima<sup>\*2</sup>, Taira Miyahara<sup>\*3</sup>,  
Shinya Kimata, Junichi Mano<sup>\*1</sup>, Reona Takabatake<sup>\*1</sup>, Yoshihiro Ozeki<sup>\*3</sup>, Kazumi Kitta<sup>\*1</sup> and Kazunari Kondo

Cornflakes are exempt from mandatory genetically modified (GM) food labeling regulations in Japan because of difficulties in detecting maize deoxyribonucleic acids (DNAs). Indeed, the reproducible and specific detection of maize DNAs in cornflakes is a prerequisite for including cornflakes in this regulation. To meet the increasing demands of Japanese consumers for GM food labeling, we attempted to develop a detection method for the maize DNAs in cornflakes. In the present study, we examined the detection of a single-copy maize endogenous gene, starch synthase IIb (*SSIIB*), and a multi-copy maize endogenous gene, 18S ribosomal deoxyribonucleic acid (*18S rDNA*), in a haploid genome from cornflakes commodities by improving the DNA extraction process and using real-time polymerase chain reaction (PCR). We showed that rinsing cornflakes with pure water to remove sugar- and chocolate-coating improved the DNA purity. Real-time PCR detection tests targeting shorter *SSIIB* sequences increased the detection frequency (0/9 and 5/9 cornflakes commodities at 114 bp and 67 bp, respectively). Additionally, *18S rDNA* was detected from all cornflakes commodities. The inter-laboratory study by three independent laboratories revealed low reproducibility of *SSIIB* detection but high reproducibility of *18S rDNA* detection from various cornflakes commodities. Although these results suggested that trace amounts of *18S rDNA* exist in cornflakes, *18S rDNA* detection was not specific to maize. Therefore, we concluded that it is currently difficult to develop a robust GM maize detection method to specifically detect single-copy maize endogenous and transgenic sequences in a haploid genome from cornflakes commodities.

Keyword: cornflakes, real-time polymerase chain reaction (PCR), genetically modified food, processed food, deoxyribonucleic acid fragmentation

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Kosuke Nakamura; Division of Biochemistry, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 210-9501, Japan; Tel/Fax: +81-44-270-6583; E-mail: kosnakamura@nihs.go.jp

<sup>\*1</sup> Division of Analytical Science, Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, NARO: 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, FAMIC: 2-1, Shintoshin, Chuo-ku, Saitama 330-9731, Japan

<sup>\*3</sup> Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

## 1. 緒言

2001年以降、日本において、遺伝子組換え (Genetically Modified : GM) 食品は、食品衛生法により安全性審査が義務付けられており、食品安全委員会のリスク評価により、安全性について審査され承認されたもののみ食品としての流通が認められている。流通するGM食品は、食品表示法により、「遺伝子組換え」または「遺伝子組換え不分別」の表示が義務化されており、「遺伝子組換えでない」、あるいは「非遺伝子組換え」等は任意表示と規定された。GM表示義務対象品目は、安全性審査を経たGM品目の対象農作物およびこれを原材料 (全原材料中の重量が上位3品目以内かつ重量比5%以上のもの) とする加工食品群とされ、GM作物由来の組換えDNA等が検出できない品目は対象外になっている。2015年施行の食品表示法の規定に基づく食品表示基準によると、大豆、とうもろこし、ばれいしょ、なたね、線実、アルファルファ、てん菜およびパパイヤの8作物と、それらを原料とする33加工食品がそのGM表示義務の対象とされ、一部の加工食品においては、その対象から除外されているのが現状である<sup>1)</sup>。

近年GM食品の安全性に関して消費者の関心が高まり、表示対象品目の拡大が強く求められたことにより、DNA等が残存しないとされている加工食品に関しても、その科学的な検証が要求されている。また、2017年度に開かれた「遺伝子組換え表示制度に関する検討会」において、「遺伝子組換えでない」、あるいは「非遺伝子組換え」表示が認められるGM作物混入率の条件が現行の「5%以下」よりさらに引き下げられる可能性が高まった。今後、これら加工食品をGM表示義務の対象品目へ追加するには、微量に残存すると考えられる原材料に由来するDNA等を特異的に検出、かつ表示内容を正確に表すGM作物の混入を検証可能な再現性の高い検出法を開発する必要がある。

とうもろこし加工食品はコーンスナック、コーンスターチ、ポップコーンなど9項目でGM表示義務が課せられているが、その中でコーンフレークは例外的に、GM表示義務対象から除外されている<sup>1)</sup>。コーンフレークは、コーンミールを高温・高圧下で加工して製造されることから、原材料由来のDNA等は高度に分解されていると考えられる。これまでの研究から、高温高圧で処理されたとうもろこし加工食品では、従来の定性PCRではとうもろこしの半数体ゲノムDNAに1コピー含まれる遺伝子 *starch synthase IIb* (*SSIb*) やその他の低コピーの遺伝子の検出が困難とされてきた<sup>2,3)</sup>。また、コーンフレーク中の夾雑物のマトリクス効果によるDNA抽出やPCRの阻害の影響も、コーンフレーク中のゲノムDNAの検出を困難にする理由の一つとして考えられて

いた<sup>4)</sup>。しかし、その抽出法の改良や、定性PCRより感度の良いリアルタイムPCRによる検出法に関する詳細な検討は、これまで行われていなかった。

そこで、本研究では、日本で市販されているコーンフレーク製品のとうもろこしゲノムDNAの検出に関して、コーンフレーク中の夾雑物の除去、キットを用いたゲノムDNAの抽出法、およびリアルタイムPCRの標的とその長さについて検討し、様々な種類のコーンフレーク製品に適用可能な再現性の高い検出法の開発が可能かどうか検証した。

## 2. 方法

2-1. 試料: 試験には、市販コーンフレーク9製品 (プレーンタイプ3製品、フロストタイプ3製品、チョコレートタイプ3製品) (Table 1) を供した。プレーンタイプとフロストタイプ試料は20 g、チョコレートタイプ試料は30 gを500 mlビーカーに量り取り、試料が全て浸かる容量の純水を加え、手動回転攪拌により糖類やチョコレートを溶出後、デカンタで洗浄液を除いた。以上の前処理操作は、脱色がみられなくなるまで数回繰り返すことにより行った。その後トレイ上で、試料を50℃で恒量まで乾燥させた。乾燥させた試料はフードミルサー (IFM-720GY MILLSER, 岩谷産業) で粉碎後、均一化し、試料とした。

2-2. DNA抽出: Genomic-tip 100/G (QIAGEN) と GM quicker 4 (ニッポンジーン) の2種類のDNA抽出キットを用いた。

2-2-1. Genomic-tip 100/G: 「食品表示基準について (平成28年11月17日付け消食表第706号) 別添 安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」<sup>5)</sup> の2.5.2.2.3 「QIAGEN Genomic-tip 20/GによるDNAの抽出」項を参考に適宜修正したプロトコルで行った。50 ml容遠沈管に試料1 g、G2緩衝液7.5 ml、およびRNase A (100 mg/ml, ニッポンジーン) 5  $\mu$ l, Proteinase K (20 mg/ml, QIAGEN) 50  $\mu$ lを加えてよく転倒混和させ、50℃で1時間加温した。遠心分離 (8,000 $\times$ g以上, 4℃, 15分間) 後、あらかじめQBT緩衝液4 mlで平衡化したGenomic-tip 100/Gに上清を負荷した。QC緩衝液を合計22.5 mlを負荷し、カラムを洗浄した。50℃に温めておいたQF緩衝液3 mlを加えDNAを溶出した。DNA溶出液にグリコーゲン溶液 (20 mg/ml, ナカライテスク) を4  $\mu$ l加え混和後、イソプロパノール3 mlをよく混合し室温で5分間静置し、遠心した (20,000 $\times$ g, 4℃, 30分間)。上清を捨て、沈殿物を70% (v/v) エタノールでリンスし、再度遠心分離した (20,000 $\times$ g, 4℃, 5分間)。上清を廃棄し、沈殿物を軽く乾燥させ、50℃に温めておいた純水

Table 1. Cornflakes commodities analyzed in this study

| Sample name | Coating type | Ingredients indicated on the label in Japan                                                                                                                                                                                    |
|-------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C 1         | Plain        | 有機とうもろこし (遺伝子組換えではない), 有機砂糖, 食塩 (赤穂の天塩)                                                                                                                                                                                        |
| C 2         | Plain        | コーングリッツ (遺伝子組換えではない), 砂糖 (三温糖), 食塩, 乳糖, 麦芽エキス, モルトシロップ, ビタミンK2含有食用油脂, 炭酸カルシウム, ビタミンC, 香料, ビロリン酸鉄, 乳化剤, ナイアシン, 酸化防止剤 (ビタミンE), ビタミンB6, パントテン酸カルシウム, ビタミンB1, 葉酸, ビタミンB2, ビタミンD, ビタミンB12, (原材料の一部に大豆を含む)                           |
| C 3         | Plain        | コーングリッツ (非遺伝子組換え), 砂糖, 麦芽エキス, 食塩, ぶどう糖果糖乳糖, ビタミンC, ビタミンE, 乳化剤, ナイアシン, ビタミンA, 鉄, ビタミンD, ビタミンB2, 酸味料, ビタミンB1 (原材料の一部に大豆を含む)                                                                                                      |
| C 4         | Frost        | コーングリッツ (遺伝子組換えでない), 砂糖 (三温糖), 食塩, 麦芽エキス, モルトシロップ, ビタミンC, 炭酸カルシウム, ビロリン酸鉄, 乳化剤, ナイアシン, 酸化防止剤 (ビタミンE), ビタミンB6, パントテン酸カルシウム, ビタミンB1, ビタミンA, 葉酸, ビタミンB2, ビタミンB12                                                                  |
| C 5         | Frost        | コーングリッツ (非遺伝子組換え), 砂糖, 麦芽エキス, 食塩, ぶどう糖果糖乳糖, ビタミンC, ビタミンE, ナイアシン, 鉄, 乳化剤, ビタミンA, ビタミンB2, ビタミンB1, ビタミンB6, ビタミンD, ビタミンB12, 酸味料, 葉酸 (原材料の一部に大豆を含む)                                                                                 |
| C 6         | Frost        | コーングリッツ, 砂糖, はちみつ, 食塩, 乳糖, 麦芽エキス, モルトシロップ, 乳酸菌 (殺菌) (乳成分を含む), デキストリン, 炭酸カルシウム, ビタミンC, ビロリン酸鉄, ナイアシン, 乳化剤, 酸化防止剤 (ビタミンE), ビタミンB6, パントテン酸カルシウム, ビタミンB1, ビタミンA, 葉酸, ビタミンB2, ビタミンB12                                               |
| C 7         | Chocolate    | とうもろこし (遺伝子組換えではない), 砂糖 (北海道産てんさい糖), ココアパウダー, 全粉乳 (北海道産), 食塩, カカオマス, 麦芽エキス, 乳化剤                                                                                                                                                |
| C 8         | Chocolate    | コーングリッツ (遺伝子組換えでない), 砂糖 (三温糖), ココアパウダー, 果糖, 食塩, チョコレート, カカオマス, 乳糖, モルトシロップ, 麦芽エキス, ビタミンK2含有食用油脂, 炭酸カルシウム, ビタミンC, 香料, ビロリン酸鉄, ナイアシン, 乳化剤, 酸化防止剤 (ビタミンE), ビタミンB6, パントテン酸カルシウム, ビタミンB1, 葉酸, ビタミンB2, ビタミンD, ビタミンB12 (原材料の一部に大豆を含む) |
| C 9         | Chocolate    | 砂糖 (三温糖), コーングリッツ (遺伝子組換えでない), 小麦粉, 果糖, ココアパウダー, チョコレート, 小麦全粒粉, カカオマス, 食塩, 麦芽エキス, ビタミンK2含有食用油脂, 炭酸カルシウム, ビタミンC, 香料, ビロリン酸鉄, 酸化防止剤 (ビタミンE), 乳化剤, ナイアシン, ビタミンB6, パントテン酸カルシウム, ビタミンB1, 葉酸, ビタミンB2, ビタミンD, ビタミンB12 (原材料の一部に大豆を含む)  |

60  $\mu$ lに溶解し, DNA試料溶液とした.

2-2-2. GM quicker 4:50 ml容遠沈管に試料1 g, GE1緩衝液4 ml, RNase A 10  $\mu$ l, Proteinase K 20  $\mu$ lを添加し, ボルテックスミキサーで混合した後, 65 $^{\circ}$ Cで60分間加温した. GE2-M緩衝液400  $\mu$ lを添加し, ボルテックスミキサーで混合後, 遠心分離 (8,000  $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10分間) した. 上清を新しいチューブに分注し, 上清の0.75倍容量のGB3緩衝液を加え, 転倒混和後, 混合液をスピнкаラムに700  $\mu$ l移し, 遠心した (20,000  $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10分間). 混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返した. 600  $\mu$ lのGW緩衝液をスピнкаラムに添加し, 遠心した (20,000  $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 1分間). この操作を2回繰り返した. スピнкаラムを新しい1.5 ml容チューブに移し, 60  $\mu$ lの純水をメンブレン中央に滴下した後, 3分間室温で静置, 遠心分離し (20,000  $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 1分間), 濾液をDNA試料溶液とした.

2-3. DNA濃度測定: DNA試料溶液の取量と質は, NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて吸光度 (波長: 230 nm, 260 nm および280 nm) を測定することで求めた.

2-4. リアルタイムPCR: 標的はとうもろこし内在性

遺伝子で半数体ゲノムに1コピー存在する*SSIIB*<sup>6,8)</sup>, 低コピー存在する*high-mobility-group protein (HMG)*<sup>7)</sup>, および真核生物の核ゲノムに数百から数千と多コピー存在する*18S rDNA*<sup>9)</sup>とした. PCR阻害確認試験にはInternal Positive Control (IPC) (ニッポンジーン)<sup>5,10)</sup>を用いた. 使用した各遺伝子検出用のプライマー・プローブの配列並びに増幅断片長はTable 2に示した. リアルタイムPCR機器には, ABI PRISM<sup>TM</sup> 7900HT (Thermo Fisher Scientific) を用いた. PCR反応液の1ウェルあたりの組成は以下に示した. TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 12.5  $\mu$ l, 対象プライマー対溶液 (各プライマー終濃度: 0.5  $\mu$ M), 対象プローブ溶液 (終濃度: 0.2  $\mu$ M) を混合し, 抽出したゲノムDNA試料溶液 (10 ng/ $\mu$ l) あるいはNo template control (NTC) として純水を5  $\mu$ lを添加し, 純水で全量25  $\mu$ lに調製した. PCR阻害確認試験はIPCを1  $\mu$ l添加して同様に全量を25  $\mu$ lに調製した. DNA試料液が10 ng/ $\mu$ lに満たない場合は, 原液を用いた. PCR反応は, 50 $^{\circ}$ C, 2分間の条件で保持した後, 95 $^{\circ}$ Cで10分間加温し, その後, 95 $^{\circ}$ C, 30秒間, 59 $^{\circ}$ C, 1分間を1サイクルとして, 45サイクルの増幅反応を行った.

Table 2. List of primers and probes used in this study

| Detection method | Name           | Sequence (5'-3') <sup>a)</sup>           | Amplicon size (bp) |
|------------------|----------------|------------------------------------------|--------------------|
| SSIIb            | SSIIb 3-5'     | CCAATCCTTTGACATCTGCTCC                   | 114                |
|                  | SSIIb 3-3'     | GATCAGCTTTGGGTCCGGA                      |                    |
|                  | SSIIb-Taq      | FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA      |                    |
| SSIIb-2          | SSIIb 3-5'     | CCAATCCTTTGACATCTGCTCC                   | 67                 |
|                  | SSIIb inner Rv | CCCCACTCGTTCCGTT                         |                    |
|                  | SSIIb-Taq      | FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA      |                    |
| HMG              | hmg-F          | TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA                  | 79                 |
|                  | hmg-R          | GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT                   |                    |
|                  | hmg-P          | FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA        |                    |
| 18S rDNA         | 18S rRNA-F     | GTTGGCCTTCGGGATCGGAGTA                   | 100                |
|                  | 100-R          | TTGTTCGTCTTTCATAAATCCAAGAATTTCCACC       |                    |
|                  | 18S rRNA-Probe | FAM-TCGGGGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAGA-TAMRA |                    |
| IPC              | IPC 1-5'       | CCGAGCTTACAAGGCAGTT                      | 100                |
|                  | IPC 1-3'       | TGGCTCGTACACCAGCATACTAG                  |                    |
|                  | IPC 1-Taq      | FAM-TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC-TAMRA      |                    |

a) FAM, 6-carboxy-fluorescein; TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine

解析ソフトウェアはSDS software ver. 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を用い、Threshold lineを0.2に設定した。各DNA検出試験では各DNA抽出操作に対して2ウェル反応で行い、指数関数的な増幅曲線と43未満のCq値が両ウェルで得られた場合を「陽性」判定とし、それ以外の場合「陰性」判定とした。PCR阻害確認試験は、各試料のIPCのリアルタイムPCRのCq値がNTCと比較して変化するかで判断した。

2-5. ゲノムDNA熱処理の影響解析：とうもろこしのゲノムDNA (10 ng/μl) 10 μlをPCRチューブに加え、Veritiサーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) を使用して95℃で0, 5, 10, 30, 60分間それぞれ熱処理した。そのうちの5 μlを使用して、2%のアガロースゲル電気泳動を行うことでゲノムDNAの状態を確認した。残りの溶液は、SSIIb並びに18S rDNA検出用の各プライマー・プローブによるリアルタイムPCR解析に供した。

2-6. 試験室間共同試験：国立医薬品食品衛生研究所と外部の2機関 (機関A, B) で実施した。試験室間共同試験は、C2プレーン、C5フロスト、C7チョコレート製の3製品を同ロットで配布し、上記プロトコルに従い、リアルタイムPCRによる検出試験を行った。

### 3. 結果および考察

#### 3-1. 前処理 (洗浄) の検討

Table 1 に示したとおり、コーンフレークは製品に

よっては糖質やチョコレートなどの原材料が多く含まれており、これらがDNA抽出やPCRの阻害を引き起こす可能性がある<sup>4)</sup>。そこで、チョコレートタイプ製品 (C7) を用いて、その付着物を水洗によって除去する前処理を検討した。前処理後、Genomic-tip 100/Gによって抽出したDNAをリアルタイムPCRに供した結果をTable 3 に示した。前処理を行わない場合はIPCの増幅が確認できず、明確なPCR阻害が確認されたが、洗浄を1回以上行うことによって改善された。それに伴い、多コピーの遺伝子である18S rDNAはより低いCq値で検出されるようになったが、1コピーの遺伝子であるSSIIbは検出されず、HMGは片方のウェルのみ検出されるなど安定して検出されなかった。以上の結果より、前処理はPCR阻害物質の除去が可能で、DNAの精製度の向上が期待できるが、SSIIbやHMGが安定して検出されるほどの感度の向上には至らなかった。

#### 3-2. 様々なコーンフレーク製品での検出試験

コーンフレーク製品間のとうもろこしDNAの検出に関する違いを調べるために、C1~C9からイオン交換樹脂タイプのGenomic-tip 100/Gとシリカゲル膜タイプのGM quicker 4を用いてDNAを抽出後、リアルタイムPCRによる検出試験に供し、得られた結果をTable 4 に示した。C9は他の製品に比べてDNAの収量が多かったが、原材料に小麦粉なども含まれており、とうもろこし以外の作物由来のDNAが存在する可能性が考えられた。C9は洗浄操作を行ったにも関わらず、いずれの

Table 3. Effect of rinsing cornflakes

| Sample                  | Rinse       | Cq values (duplicate test) |             |             |             | Yield and quality of purified DNA |                        |                        |
|-------------------------|-------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
|                         |             | SSIIb                      | HMG         | 18S rDNA    | IPC         | Yield <sup>a)</sup><br>(ng/g)     | A260/280 <sup>b)</sup> | A260/230 <sup>c)</sup> |
| C7                      | none        | - <sup>d)</sup> /-         | -/-         | 29.12/29.44 | -/-         | 1,641                             | 1.38                   | 0.40                   |
|                         | once        | -/-                        | 41.02/-     | 22.33/22.33 | 35.22/35.02 | 962                               | 1.29                   | 0.35                   |
|                         | twice       | -/-                        | -/-         | 23.55/23.39 | 36.53/37.11 | 799                               | 1.27                   | 0.32                   |
|                         | three times | -/-                        | 38.60/-     | 23.39/23.46 | 35.36/35.11 | 908                               | 1.17                   | 0.27                   |
| NTC <sup>e)</sup>       |             | -/-                        | -/-         | -/-         | 34.27/34.45 |                                   |                        |                        |
| 50 ng<br>genomic<br>DNA |             | 26.79/26.98                | 25.87/26.05 | 14.91/14.90 | 34.97/34.22 |                                   |                        |                        |

a) Total amount of DNAs obtained from one gram of dried cornflakes

b) Ratio of absorbances at 260 nm and 280 nm

c) Ratio of absorbances at 260 nm and 230 nm

d) Not detected

e) No template control

Table 4. Representative results of detection tests for the cornflakes commodities

| DNA<br>extraction<br>method | Sample | Cq values (duplicate test) |                       |             |             |             | Yield and quality of purified DNA |                        |                        |
|-----------------------------|--------|----------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
|                             |        | SSIIb                      | SSIIb-2 <sup>a)</sup> | HMG         | 18S rDNA    | IPC         | Yield<br>(ng/g) <sup>b)</sup>     | A260/280 <sup>c)</sup> | A260/230 <sup>d)</sup> |
| Genomic-<br>tip<br>100/G    | C 1    | - <sup>e)</sup> /-         | 40.18/-               | -/-         | 33.21/32.78 | 34.82/34.83 | 322                               | 1.62                   | 0.49                   |
|                             | C 2    | -/-                        | 39.41/39.40           | -/-         | 29.14/29.14 | 34.68/34.95 | 615                               | 1.55                   | 0.49                   |
|                             | C 3    | -/-                        | -/40.44               | -/-         | 30.13/30.11 | 34.82/35.29 | 482                               | 1.81                   | 0.48                   |
|                             | C 4    | -/-                        | 38.35/38.46           | -/-         | 26.03/25.99 | 34.82/35.20 | 630                               | 1.61                   | 0.48                   |
|                             | C 5    | -/-                        | 39.18/39.02           | -/-         | 31.01/31.07 | 35.04/34.47 | 172                               | 2.22                   | 0.42                   |
|                             | C 6    | -/-                        | -/40.33               | 40.56/-     | 30.37/30.39 | 35.73/35.14 | 464                               | 1.72                   | 0.48                   |
|                             | C 7    | -/-                        | 41.95/41.71           | -/-         | 24.69/24.89 | 34.32/34.70 | 367                               | 1.59                   | 0.51                   |
|                             | C 8    | -/-                        | 40.53/42.35           | 39.93/-     | 27.98/27.94 | 35.13/35.73 | 331                               | 2.01                   | 0.47                   |
|                             | C 9    | -/-                        | -/-                   | -/-         | 23.66/22.37 | -/-         | 91,115                            | 1.88                   | 1.98                   |
| GM<br>quicker 4             | C 1    | -/-                        | N.T. <sup>f)</sup>    | -/40.22     | 34.59/34.44 | 33.84/34.34 | 540                               | 1.40                   | 0.28                   |
|                             | C 2    | -/41.51                    | 37.97/39.11           | /39.06      | 30.09/30.05 | 34.33/35.02 | 438                               | 1.25                   | 0.29                   |
|                             | C 3    | -/-                        | N.T.                  | 40.70/-     | 30.21/30.44 | 35.18/34.04 | 798                               | 1.39                   | 0.33                   |
|                             | C 4    | -/39.13                    | 39.67/41.15           | -/38.92     | 23.39/23.25 | 35.45/34.33 | 306                               | 1.06                   | 0.34                   |
|                             | C 5    | 39.86/-                    | 39.01/42.12           | 40.30/38.46 | 30.61/30.51 | 33.81/33.82 | 438                               | 1.49                   | 0.35                   |
|                             | C 6    | -/-                        | N.T.                  | 40.37/37.98 | 30.25/30.19 | 34.40/33.80 | 294                               | 1.12                   | 0.33                   |
|                             | C 7    | -/-                        | N.T.                  | -/-         | 22.36/22.33 | 34.36/33.91 | 612                               | 1.74                   | 0.33                   |
|                             | C 8    | 40.36/-                    | -/41.37               | 39.32/38.65 | 24.40/24.34 | 34.17/33.97 | 312                               | 1.39                   | 0.38                   |
|                             | C 9    | -/-                        | N.T.                  | -/-         | -/-         | -/-         | 6,336                             | 1.02                   | 0.33                   |
| NTC <sup>g)</sup>           |        | -/-                        | -/-                   | -/-         | -/-         | 35.53/34.81 |                                   |                        |                        |
| 50 ng<br>genomic<br>DNAs    |        | 28.2/28.01                 | 27.42/27.39           | 26.83/26.81 | 15.09/15.09 | 34.75/34.79 |                                   |                        |                        |

a) The samples were prepared independently

b) Total amount of DNAs obtained from one gram of dried cornflakes

c) Ratio of absorbances at 260 nm and 280 nm

d) Ratio of absorbances at 260 nm and 230 nm

e) Not detected

f) Not tested

g) No template control

抽出法によっても明確なPCR阻害が見られた。その他の製品では顕著なPCR阻害は見られず、GM-quickerで抽出したC9を除いて18S rDNA検出試験は陽性と判定された。しかし、今回用いた18S rDNA検出法では様々な植物由来のゲノムDNAを標的とすることから<sup>9)</sup>、とうもろこしの検出という点では特異性が低く、加工食品に含まれる作物種を特定するに至らない。Genomic-tip 100/Gでは、C6とC8においてHMGはCq値39~41で1ウェルずつ検出された。GM quicker 4では、C7とC9を除く製品においてSSIIbまたはHMGが検出され、特にHMG検出試験では9製品中3製品で陽性と判定されたが、Cq値は39~41とリアルタイムPCRの検出限界の付近を示しており、再現性という点では不十分と考えられた。これらの結果より、検討した方法で様々なコーンフレーク製品から1コピーまたは低コピーの遺伝子配列を再現性良く検出することは困難と考えられた。また、DNAの精製度の指標である吸光度比「A260/280」と「A260/230」は1.7以上が望ましいが<sup>11)</sup>、今回の結果では全体としてDNAの収量が低いため、多くの場合でその範囲外の値となった。この値は過去の報告<sup>2,12,13)</sup>と同等の結果であった。

### 3.3. 短い標的配列を増幅するプライマー対を用いたリアルタイムPCRの検討

コーンフレークは、高温で加圧処理などを施して作られるため、含まれるゲノムは、高度に断片化されていると推測される<sup>23)</sup>。実際に、抽出したとうもろこしゲノムDNAを用いてアガロースゲル電気泳動法で実験的に熱処理の影響を解析すると、95℃で5分以上の加熱では、200~600 bpに断片化され、30分の加熱では、約100 bpに、60分の加熱では、目視で確認できないほどに断片化された (Fig. 1)。そこで、断片化DNAの検出効率を高めるために、既報のSSIIb (SSIIb検出法; 114 bp)<sup>5-7)</sup> およびHMGのアンプリコンサイズ (HMG検出法; 79 bp)<sup>7)</sup> よりも、可能な限り短いアンプリコン (SSIIb-2

検出法; 67 bp) を増幅するプライマー対を設計し、検出を試みた。断片化DNAをリアルタイムPCRで解析し、その結果をTable 5に示した。熱処理前のDNAの場合、SSIIb検出法とSSIIb-2検出法では、Cq値に違いが見られなかったが、熱処理5分後からCq値は、SSIIb-2検出法のCq値の方がSSIIb検出法と比べて低くなった。熱処理30分後では、SSIIb検出試験では陰性であったが、SSIIb-2検出試験では陽性と判定された。以上の結果は、とうもろこしのゲノムDNAは、熱処理により断片化されることを示唆し、コーンフレーク中に含有するDNAの検出にはより短い標的塩基配列を検出する方法 (SSIIb-2検出法) が有用と考えられた。過去の報告でも断片化とうもろこしゲノムDNAを検出する際、約100 bpの短い標的が有用とされているが<sup>3,6,9,14)</sup>、本研究では、さらに短い67 bp未満を標的としている。

Genomic-tip 100/GまたはGM quicker 4によるDNA

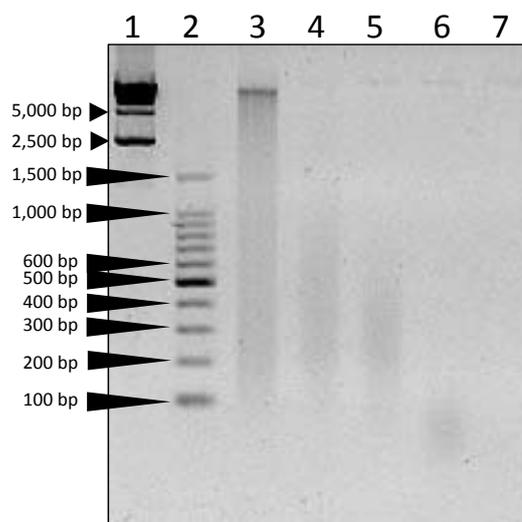


Fig.1 DNA degradation by heating at 95°C

Heated genomic DNAs (50 ng) were applied to 2% agarose gel electrophoresis. Lanes 1 and 2, DNA marker; lane 3, intact genomic DNA; lane 4, 5 min; lane 5, 10 min; lane 6, 30 min; lane 7, 60 min.

Table 5. Effect of the heating process

| Sample            | Condition   | Cq values (duplicate test) |             |             |
|-------------------|-------------|----------------------------|-------------|-------------|
|                   |             | SSIIb                      | SSIIb-2     | 18S rDNA    |
| 5 ng genomic DNA  | none        | 30.42/30.54                | 30.22/30.08 | 16.92/16.94 |
|                   | 95°C 5 min  | 33.18/33.19                | 32.05/31.65 | 18.05/17.96 |
|                   | 95°C 10 min | 36.92/36.52                | 34.41/34.48 | 21.06/21.04 |
|                   | 95°C 30 min | - <sup>a)</sup> /-         | 40.16/39.02 | 27.93/27.79 |
|                   | 95°C 60 min | -/-                        | -/41.18     | 29.28/29.33 |
| NTC <sup>b)</sup> |             | -/-                        | -/-         | -/-         |

a) Not detected

b) No template control

抽出法と、SSIIb-2 検出法を用いたリアルタイムPCR による様々なコーンフレーク製品のとうもろこしDNA の検出試験の結果を Table 4 に示した。SSIIb-2 検出試験では Genomic-tip 抽出法では 9 製品中 5 製品で、GM quicker 抽出法では 4 製品中 3 製品で陽性と判定された。C 9 製品だけは SSIIb-2 検出試験でも陰性であった。SSIIb-2 検出法は SSIIb 検出法よりもコーンフレーク製品からとうもろこしDNA を検出するのに有用であったが、得られる Cq 値は 37~43 とリアルタイムPCR を用いた検出限界付近であった。このことはコーンフレーク中に含まれているとうもろこしゲノムDNA の大部分は 67 bp よりさらに短く断片化されており、プライマー 2 種類とプローブ 1 種類を用いて検出する TaqMan chemistry の原理に基づくリアルタイムPCR ではDNA の検出が困難なことを示唆している。また、製品によってはとうもろこしDNA を全く検出できなかったことから、現状様々なコーンフレーク製品に適用した再現性の高い検出法を開発することは難しいと考えられた。

### 3-4. 試験室間共同試験

上記で検討してきたDNA抽出法で得られたDNAを鋳型にリアルタイムPCR法の試験室間共同試験を行い、方

法の再現性並びに頑健性を検証した。外部機関AとBによる結果を Table 6 に示した。外部機関Aでは全ての製品でPCR阻害は見られず18S rDNA検出試験では全て陽性と判定されたが、SSIIb検出試験とSSIIb-2 検出試験ともにSSIIbは全て陰性と判定された。また、外部機関Bでも同様に全ての製品でPCR阻害は見られず、18S rDNA検出試験は全て陽性と判定された。SSIIbに関しては、検出されるウェルも見られたが、DNAの抽出法や検出法に関わらず安定して検出されず、検出試験において全て陰性と判定された。外部機関共同試験の結果より、SSIIbおよびSSIIb-2 検出法の頑健性は低く、様々なコーンフレーク製品から1コピーのとうもろこし由来の遺伝子を再現性良く検出することは困難であると考えられた。一方で、極微量のSSIIbが検出されるコーンフレーク製品もあったが、そのような検出のパラッキの原因の一つに、加工食品が製品によって原材料の種類や使用される部位、加工度が異なり、不均一であることが挙げられる。例えば、とうもろこし穀粒中では胚乳に比べ胚芽部位にDNAが多いため、加工前段階で胚芽部位を含む原材料かどうかによっても重量あたりのDNA存在量が異なる<sup>6)</sup>。一般社団法人日本コーングリッツ協会によると、コーングリッツなどは精選したとうもろこしの

Table 6. Inter-laboratory study on cornflakes commodities

| Lab | DNA extraction method | Sample             | Cq values (duplicate test) |             |             |             |             |             |             |             |
|-----|-----------------------|--------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|     |                       |                    | SSIIb                      |             | SSIIb-2     |             | 18S rDNA    |             | IPC         |             |
|     |                       |                    | Test 1                     | Test 2      | Test 1      | Test 2      | Test 1      | Test 2      | Test 1      | Test 2      |
| A   | Genomic-tip 100/G     | C 2                | - <sup>a)</sup> /-         | -/-         | -/-         | -/-         | 38.06/37.85 | 38.91/37.85 | 34.00/34.48 | 33.87/34.93 |
|     |                       | C 5                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 34.20/34.79 | 35.27/35.26 | 34.85/33.73 | 35.27/33.97 |
|     |                       | C 7                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 24.94/24.98 | 24.92/24.93 | 34.16/34.20 | 34.39/34.36 |
|     | GM quicker 4          | C 2                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 40.54/39.98 | 39.38/39.14 | 34.21/34.23 | 34.01/34.93 |
|     |                       | C 5                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 35.83/36.39 | 36.78/35.26 | 34.42/34.37 | 33.32/33.93 |
|     |                       | C 7                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 26.50/26.58 | 24.45/24.44 | 33.86/33.94 | 34.26/34.07 |
|     |                       |                    | NTC <sup>b)</sup>          | -/-         | -/-         | -/-         | -/-         | -/-         | 34.36/34.79 |             |
|     |                       | 50 ng genomic DNAs | 24.96/25.01                | 25.13/25.39 | 14.40/14.38 | 34.40/34.50 |             |             |             |             |
| B   | Genomic-tip 100/G     | C 2                | -/41.78                    | -/-         | -/-         | -/-         | 28.97/28.97 | 29.34/29.24 | 33.50/34.11 | 34.38/34.20 |
|     |                       | C 5                | -/-                        | -/-         | 42.16/-     | -/-         | 30.02/30.06 | 29.66/29.88 | 34.04/33.94 | 34.24/33.96 |
|     |                       | C 7                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 22.98/22.91 | 22.14/22.07 | 33.77/33.70 | 33.83/33.62 |
|     | GM quicker 4          | C 2                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 27.26/27.63 | 27.49/27.74 | 33.46/34.15 | 33.76/33.36 |
|     |                       | C 5                | -/-                        | -/-         | -/-         | -/-         | 28.45/28.83 | 29.13/28.84 | 33.90/33.78 | 33.23/33.28 |
|     |                       | C 7                | -/-                        | -/-         | -/42.10     | -/-         | 21.37/21.44 | 20.18/19.96 | 34.14/35.28 | 34.21/33.17 |
|     |                       |                    | NTC <sup>b)</sup>          | -/-         | -/-         | -/-         | -/-         | 33.75/33.81 |             |             |
|     |                       | 50 ng genomic DNAs | 32.90/33.17                | 32.35/32.32 | 19.53/19.79 | 34.53/33.65 |             |             |             |             |

a) Not detected

b) No template control

皮と胚芽は除かれて挽砕・篩別された製品とされるが、コーンミールの場合、そのまま挽砕・篩別されるとされる製品とされ、挽き方によっては胚芽を含むということになる<sup>15)</sup>。また、製品によっては加工度が低い場合にDNAは断片化されず、多くの検出可能な標的配列が残存する可能性がある。コーンフレークはコーンミールを加工したもので、とうもろこし組織の不均一性は高く、また加工によりDNAは断片化されているため、リアルタイムPCRを使用したとうもろこしDNAの安定した検出は困難と予想される。

日本の現行制度では、5%以上のGMとうもろこしの混入がある場合は、「遺伝子組換え」の表示が義務化されている<sup>1)</sup>。そこで、その5%の閾値を検査することを想定し、抽出とうもろこしゲノムDNA（通常、とうもろこしは二倍体ゲノムを有する）中に重量比で5%のヘテロ接合トランスジェニック配列（1コピー）が挿入されたGMとうもろこしゲノムDNAが存在し、かつ加工工程のDNA断片化の影響は遺伝子の配列に依存せず、リアルタイムPCRの検出感度が内在性遺伝子とトランスジェニック配列とで同等と仮定する。その場合、100%に対する5%の重量比及びゲノムの接合性の違いより、トランスジェニック配列を検出する感度は、理論上ホモ接合の1コピーの内在性遺伝子より40倍高い必要がある。リアルタイムPCRのCq値が1異なるとDNA存在量が2倍異なることを示すことから、40倍の差をCq値に換算すると5～6高くなると考えられる。従って、今回の検討ではコーンフレーク製品によってはSSIIbがCq値37～43付近で検出されることがあったが、その場合でも原材料にGMとうもろこしが5%含まれることを検出する感度は担保されていないと考えられた。また、2017年度に開かれた「遺伝子組換え表示制度に関する検討会」では、現行の表示制度の見直しが行われ、今後の「遺伝子組換えでない」表示が認められる条件を、現行制度の混入率「5%以下」から「不検出」に引き下げの方針で決定された<sup>16)</sup>。この「不検出」は、リアルタイムPCRによるGM食品検査で「検出限界以下」となる製品において、「遺伝子組換えでない」表示が認められるということを示している。本研究で検討した方法をコーンフレークに適用した場合、例えば原材料の段階で100%のGMとうもろこしが混入していても、SSIIb検出試験の結果と同様に「不検出」とされる可能性が高く、科学的検証の信頼性を損ねる懸念が生じると考えられる。実際には、安全性審査済のGM系統を複数組み合わせた「スタック品種」が増加しており、標的となる遺伝子は複数コピーでゲノム中に挿入されている可能性もあるが、それを踏まえても現状では、組換え遺伝子を安定して検出することは困難と考えられ、様々な種類のコーンフレーク製品

に適用可能な再現性の高い検出法を開発するには至らなかった。従って、コーンフレークを対象としたGMとうもろこしの検査という観点では、原材料の段階で検査されることが望ましい。

一方で、多コピー遺伝子を標的とした18S rDNA検出法では、試験室内および試験室間の試験において、いずれの製品においても陽性となった。この結果は、コーンフレークのような加工度の高い加工食品においても、検出できるDNAが極微量で残存していることを示唆している。しかしながら、18S rDNA検出法は、様々な作物由来のDNAを標的とするため、その特異性は低く、加工食品のDNA試験法には不向きである。各原材料に対して特異性が高く、かつ多コピーの遺伝子を標的とした代替法を開発することができれば、DNAの断片化の進んだ加工食品中の原材料の残存を確かめる定性・定量検査法や、断片化の程度を推測する手法にも今後応用されることが期待される。本研究では、そのような方法の開発には至っていないが、バイオインフォマティクス等の活用によって標的候補を探索することが、その検出技術の開発に有用になるだろう。

#### 4. 結論

市販コーンフレーク製品に含まれるとうもろこしDNAの検出法に関して、製品の洗浄によるDNA抽出・PCR阻害物質の除去や、断片化したDNAを検出するためにリアルタイムPCRを用いて、より短い標的配列用のプライマー対等を検討した。その結果、洗浄によりDNAの精製度は向上し、67 bpの標的配列を検出する方法を用いた場合は、とうもろこしの半数体ゲノムに1コピー含まれる内在性遺伝子検出試験で陽性と判定される製品数は増加した。しかし、試験室間共同試験結果より、様々なコーンフレーク製品から、良好な再現性および頑健性をもってとうもろこしDNAを検出するには至らなかった。従って、現段階ではコーンフレークの場合、5%以下の割合で含まれるGMとうもろこしを検出する方法を開発することは困難で、原材料の段階でGMとうもろこしの混入に関する検査が行われることが望ましいと考えられた。

#### 5. 謝辞

本研究は、平成29年度消費者庁支出委任費によって実施した。

#### 引用文献

- 1) 消費者庁、食品表示基準Q&Aについて（平成27年3月30日消費表第140号）別添 遺伝子組換え食品に関する事項。

- 2) Ohmori K, Tsuchiya H, Watanabe T, Akiyama H, Maitani T, Yamada T, Hirayama K, Satoh S.: DNA extraction method using a silica-base resin type kit for the detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2008; 49: 63-69.
- 3) Ogasawara T, Arakawa F, Watanabe T, Akiyama H, Hino A, Maitani T, Goda Y, Ozeki Y.: Genomic DNA fragmentation of genetically modified corn during food processing. *Jpn J Food Chem*. 2004; 11: 137-144.
- 4) Terry CF, Harris N, Parkes HC.: Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *J AOAC Int*. 2002; 85: 768-774.
- 5) 消費者庁, 食品表示基準について (平成28年11月17日付け消食表第706号) (別添) 安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法.
- 6) Yoshimura T, Kuribara H, Matsuoka T, Kodama T, Iida M, Watanabe T, Akiyama H, Maitani T, Furui S, Hino A.: Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 2052-2059.
- 7) Noguchi A, Akiyama H, Nakamura N, Sakata K, Minegishi Y, Mano J, Takabatake R, Futo S, Kitta K, Teshima R, Kondo K, Nishimaki-Mogami T.: A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *Eur Food Res Technol*. 2015; 240: 412-422.
- 8) Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, Guan H, Keeling PL, Wasserman BP.: Isolation and characterization of the *zSSIa* and *zSSIb* starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol Biol*. 1998; 37: 639-649.
- 9) Mano J, Nishitsuji Y, Kikuchi Y, Fukudome SI, Hayashida T, Kawakami H, Kurimoto Y, Noguchi A, Kondo K, Teshima R, Takabatake R, Kitta K.: Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR. *Food Chem*. 2017; 226: 149-155.
- 10) Mano J, Yanaka Y, Ikezu Y, Onishi M, Futo S, Minegishi Y, Ninomiya K, Yotsuyanagi Y, Spiegelhalter F, Akiyama H, Teshima R, Hino A, Naito S, Koiwa T, Takabatake R, Furui S, Kitta K.: Practicable group testing method to evaluate weight/weight GMO content in maize grains. *J Agric Food Chem*. 2011; 59: 6856-6863.
- 11) Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A.: A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2000; 42: 24-32.
- 12) Ateş Sönmezoğlu Ö, Keskin H.: Determination of genetically modified corn and soy in processed food products. *J App Biol Biotech*. 2015; 3: 032-037.
- 13) Asicioğlu M, Yalçınkaya B, Akgoz M.: Measurement of genetically modified (GM) genes in different corn products. *J Chem Metrol*. 2017; 11: 55-60.
- 14) Chiter A, Forbes JM, Blair GE.: DNA stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food. *FEBS Lett*. 2000; 481: 164-168.
- 15) 一般社団法人日本コーングリッツ協会, コーンドライミリングの製品基準 (平成27年1月14日改定).
- 16) 消費者庁, 遺伝子組換え表示制度に関する検討会報告書 (平成30年3月28日).