

てんさい加工品からの DNA 抽出と PCR による
てんさい DNA の残存性に関する調査報告書

平成 18 年 3 月 16 日

独立行政法人 食品総合研究所

独立行政法人 農林水産消費技術センター

てんさい加工品からの DNA 抽出と PCR によるてんさい DNA の残存性に関する調査

1. 目的

遺伝子組換え食品の表示に関しては、食品衛生法に基づく食品衛生法施行規則（昭和23年7月13日厚令第23号）（以下、「規則」という。）第21条及び農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（以下、「JAS法」という。）に基づく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日農林水産省告示第517号）（以下、「基準」という。）において定められている。

遺伝子組換え食品の表示対象品目については、規則別表第7及び基準別表1、別表2に掲げられているが、基準附則第2項では、新たな遺伝子組換え農産物の商品化、遺伝子組換え農産物の流通及び原料としての使用の実態、組換えられたDNA及びこれによって生じたたん白質の除去並びに分解の実態、検出方法の進歩等に関する新たな知見、消費者の関心等を踏まえ、1年ごとに見直しを行うものとしている。

遺伝子組換えてんさいに関しては、3系統（T120-7, 77及びH7-1）が食品に対する安全性審査の手続を終了しており、食品用途として使用可能となっている。よって、てんさい由来の加工食品についてDNAの検出方法を調査し、それらてんさい由来加工食品について、分析調査を行った。

2. 試料及び試験法

2. 1. 試料

てんさいを原料とした加工食品である、いわゆる「砂糖」からDNAが検出できるか否かについて確認を行うため、

① 市販のてんさい加工品（砂糖）（試料番号1～8）

② 糖を製造する工程の各段階で得られる試料（試料番号9～16）

について、PCRによるてんさい内在性DNA配列の検出試験を行った。

番号	砂糖の種類	商品の名称	原材料名	色
1	てんさい含蜜糖	砂糖	砂糖大根(ビート)	褐色
2	てんさい含蜜糖	砂糖(てん菜含蜜糖)	てん菜(ビート)	褐色
3	糖蜜入液糖	オリゴ糖入液状甘味料	ビート糖蜜(北海道産)	淡褐色
4	グラニュー糖	グラニュー糖	てん菜(北海道産)	白色
5	上白糖	上白糖	てん菜(北海道産)	白色
6	てんさい含蜜糖	砂糖(てんさい含蜜糖)	てん菜	褐色
7	てんさい含蜜糖	砂糖	てん菜(北海道産)	白色
8	グラニュー糖	グラニュー糖	てん菜(ビート)	白色
9		シソジュース	搾汁液を石灰処理・脱色したもの	淡褐色
10		糖液1	搾汁液を石灰処理(軟化)した糖液	淡褐色
11		シソジュース	糖液2を濾過したもの	濃褐色
12		糖液2	シソジュースからCa除去して煮詰めたもの	褐色
13	上白糖	砂糖		白色
14	グラニュー糖	精製糖(HBS-P)		白色
15	てんさい糖原液(糖蜜)	てん菜糖 原液	精製糖製造を終えた糖蜜	濃褐色
16	てんさい含蜜糖	てん菜糖	てん菜糖原液から水分を取り除いた糖	褐色

てんさい加工品：東京、北海道の市場で買い上げたもの。

糖製造工程試料：日本ビート糖業協会の協力により入手したもの(製造工程の詳細は別添1を参照のこと)。

なお、商品の名称はテンサイ加工品については商品に記載のとおり、糖製造工程試料については受け入れ時の試料に記載のとおりとしてある。

2. 2. DNA 抽出法

「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」(以下、JAS ハンドブックという。)基本操作編「3.2.6 抽出操作: QIAGEN Genomic-tip20/G による DNA の抽出」及び厚生労働省「組換え DNA 技術応用食品の検査法について」(厚生労働省 食発第 110 号、平成 13 年 3 月 27 日及び食発第 158 号、平成 13 年 5 月 25 日)(以下、厚労省検査法という。)[2.2.3.1. タコス、トルティーヤ、コーンチップ及びコーンフレーク(加熱加工されているものに限る)からの DNA 抽出精製]を以下の表のとおり一部改変し試料から DNA を抽出した(詳細は別添 2 を参照)。なお、DNA 抽出は試料 1 点につき 2 回行った。

JASハンドブック		厚労省検査法	改変法
(試料の懸濁ステップ)			
(1)	・試料適量	・試料1g	(厚労省検査法と同じ)
	・7.5 mlのG2緩衝液を添加	・4 mlのG2緩衝液を添加	(JASハンドブックと同じ)
(2)	・7.5 mlのG2緩衝液を添加	・4 mlのG2緩衝液を添加	(削除)
	・Proteinase Kを200μl添加	・Proteinase K 100μl添加	(厚労省検査法と同じ)
	・RNase Aを20μl添加	・RNase A 10μl添加	(厚労省検査法と同じ)
(3)	・50℃の恒温水槽中で1時間保温	・50℃で2時間放置	(JASハンドブックと同じ)
(カラムからの溶出ステップ)			
(11)-(12)	750 μlのQF緩衝液(50℃)を加えDNAを溶出(2回繰り返す)	1 mlのQF緩衝液(50℃)を2回加えDNAを溶出	(JASハンドブックと同じ)
(イソプロパノールによってDNAを沈殿するステップ)			
(13)	・等量のイソプロパノールを加える。	・0.7倍量のイソプロパノールを加える。	・サンプルの1/10量の3M酢酸ナトリウムとエタ沈メイト(DNAキャリアー)2μlを添加後、攪拌し、等量のイソプロパノールを加える。
(14)	・12,000×gで遠心	・10,000×g以上で遠心	(JASハンドブックと同じ)
(15)-(16)	・70%エタノール 1,000μlを添加し、12,000×g、4℃で3分遠心	・70%エタノール2 mlを添加後、10,000×g、4℃で5分遠心	・70%エタノール500μlを添加後、12,000×g、4℃で5分遠心
(溶出ステップ)			
(17)	・TE (pH8.0) 50μlで溶出	・水 100μlで溶出	・DW (滅菌水) 40μlで溶出
(17)-(18)	・65℃で15分間振とう溶解	・65℃で5分間放置(振とうしない)	・65℃で15分間放置(振とうしない)
(19)	・12-24時間冷蔵庫に静置	・ピペッティングによりDNAを溶解	(JASハンドブックと同じ)

2. 3. PCR 条件 (装置 : Applied Biosystems 社 GeneAmp PCR system 9700 (シルバーブロック))

「JAS ハンドブック」基本操作編「4.6.1 PCR 操作」に従い、以下の条件で PCR を行った。プライマー対はてんさい内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対 3 及びプライマー対 4 の 2 種類について、各種てんさい品種に対する安定性、てんさい近縁種及び他の主要作物に対する特異性及び検知下限を確認 (詳細は別添 3 を参照) したのちに使用した。

(組成)

PCR buffer II	1×
dNTPs	0.2 mM each
MgCl ₂	1.5 mM
AmpliTaq Gold	0.025 U/μL (0.625 U/一反応)
プライマー対	0.5 μM each
鋳型DNA	抽出DNA原液17.875μL (最大量)

(反応サイクル)

95°C 10 min] 40 cycles
95°C 30 sec	
60°C 30 sec	
72°C 30 sec	
72°C 7 min	

3. 結果

3. 1. DNA の量及び品質

各試料から抽出した DNA の量及び品質の指標となる吸光度比は以下の表のとおり。てんさい加工品及び糖製造工程試料の全試料において DNA の収量が非常に少なく、次に続く PCR に必要な鑄型 DNA 濃度である 10 ng/μL 以上を満たす試料は糖製造工程試料の 9 番のシンジュースを除いてなかった。このことは OD260 値を用いた場合よりも正確な DNA 量を測定できる蛍光色素 PicoGreen から求めた DNA 濃度からもわかる。DNA の収量が非常に少なかったことから、PCR に供する鑄型 DNA は抽出 DNA を希釈せず反応系に最大量添加することとした。

また、抽出 DNA 溶液の品質を推定する指標となる吸光度比の結果も、260 nm/280 nm の比では基準となる 1.7 ~ 2.0 の範囲 (*1) から 16 試料中 12 試料が外れており、260 nm/230 nm の比においても全ての試料でおおよその目安とする 0.6 以上 (*2) を大幅に下回っており、PCR に適した品質の DNA を抽出することは困難であった。

番号	砂糖の種類	商品の名称	DNA 濃度 (ng/μl)	260nm/280nm *1	260nm/230nm *2	最大鑄型 DNA 量 (ng/一反応)*3	Total DNA 収量(ng)	PicoGreen で測 定した DNA 濃度 (ng/μl)*4
1	てんさい含蜜糖	砂糖	4.3	2.8	0.09	78	521	0.39
2	てんさい含蜜糖	砂糖(てん菜含蜜糖)	3.7	4.0	0.08	66	440	0.85
3	糖蜜入液糖	オリゴ糖入液状甘味料	2.3	2.3	0.06	42	281	0.70
4	グラニュー糖	グラニュー糖	2.9	2.7	0.06	51	343	0.72
5	上白糖	上白糖	2.7	20.3	0.07	48	322	0.73
6	てんさい含蜜糖	砂糖(てんさい含蜜糖)	2.3	2.2	0.06	41	277	0.73
7	てんさい含蜜糖	砂糖	3.5	1.2	0.07	63	424	0.68
8	グラニュー糖	グラニュー糖	2.6	5.0	0.06	47	317	0.66
9		シンジュース	13.4	2.0	0.28	239	1606	8.36
10		糖液1	3.3	1.2	0.08	58	390	0.72
11		シックジュース	3.0	2.3	0.07	53	358	0.58
12		糖液2	3.8	1.7	0.09	68	458	0.83
13	上白糖	砂糖	2.2	1.2	0.08	40	269	0.36
14	グラニュー糖	精製糖(HBS-P)	3.0	1.7	0.09	54	365	-0.16
15	てんさい糖原液 (糖蜜)	てん菜糖 原液	3.1	1.7	0.07	55	370	-0.03
16	てんさい含蜜糖	てん菜糖	4.3	1.3	0.10	77	518	0.01

上記の測定値は、試料1点につき2回抽出を行った平均値である。

*1: JASハンドブックでは、トモロコシ種子及びダイズ種子においては品質の良好なDNAは260nm/280nmの比が1.7~2.0となるとしている。

*2: 食品総合研究所企画調整部GMO検知解析チームでは、品質の良好なDNAは260nm/230nmの比がおおよその目安として0.6以上になるとしている。

*3: DNA抽出原液を最大限(17.875 μl) 添加したときの鑄型 DNA 量。公定法では25 (ng/一反応) を加えることになっている。

*4: 蛍光色素PicoGreenを使用するとOD260の値よりも正確なDNA量を求めることができる。

3. 2. PCR 増幅結果

番号	砂糖の種類	商品の名称	プライマー対3	プライマー対4
1	てんさい加工品	てんさい含蜜糖	砂糖	- -
2		てんさい含蜜糖	砂糖(てん菜含蜜糖)	- -
3		糖蜜入液糖	オリゴ糖入液状甘味料	- -
4		グラニュー糖	グラニュー糖	- -
5		上白糖	上白糖	- -
6		てんさい含蜜糖	砂糖(てんさい含蜜糖)	- -
7		てんさい含蜜糖	砂糖	- -
8		グラニュー糖	グラニュー糖	- -
9	糖製造工程試料		シンジュース	++
10			糖液1	- -
11			シックジュース	- +
12			糖液2	- -
13		上白糖	砂糖	- -
14		グラニュー糖	精製糖(HBS-P)	- -
15		てんさい糖原液(糖蜜)	てん菜糖 原液	- -
16		てんさい含蜜糖	てん菜糖	- -
対応する写真			3.3.1	3.3.2.

DNA抽出及びPCRを1連として2回繰り返した結果

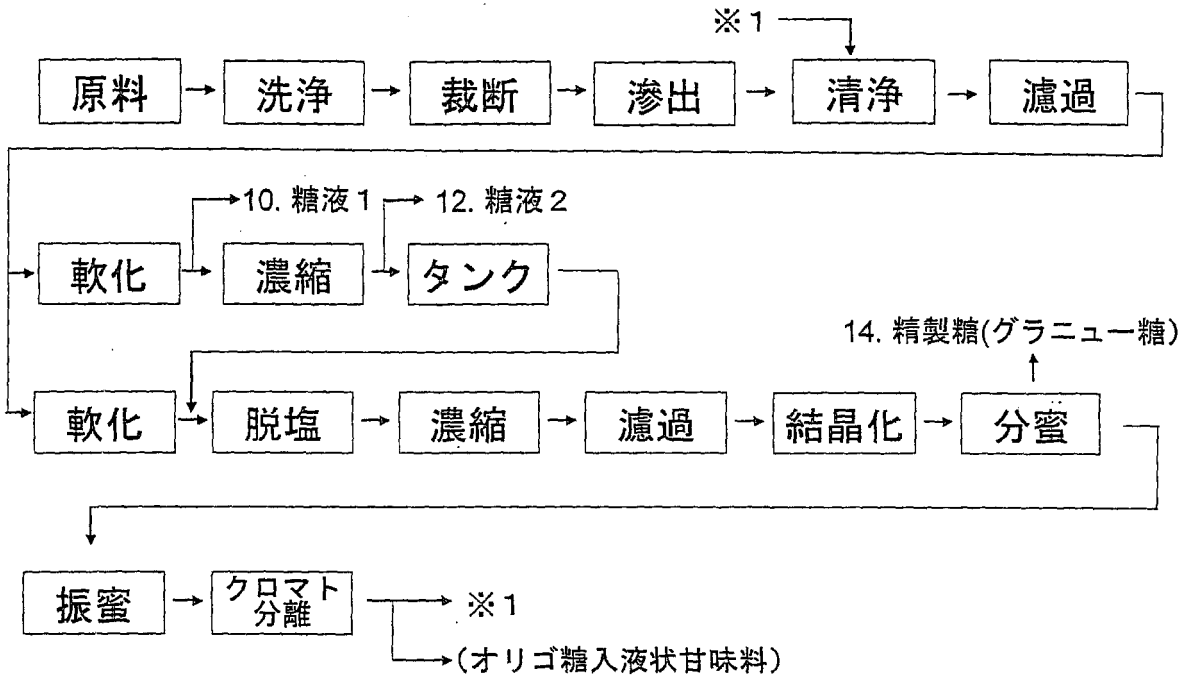
糖製造工程からサンプリングした試料については、8点中2点からてんさい内在性DNA配列が検知されたが、てんさい加工品については8点全てから検知されなかった。

ほとんどの試料において増幅DNAが確認できなかったこと、また、抽出DNAの品質が通常の植物体試料から得られる場合よりも劣っていたことから、抽出DNA溶液中にPCRを阻害する物質が含まれている可能性が示唆された。そのため、今回抽出したDNA溶液がPCRを阻害する可能性を調査した。その結果、今回の調査で使用したプライマー対3によるPCRでは抽出試料16点のうち7点、プライマー対4では8点でPCRの阻害が確認された(詳細は別添4参照)。このように、一部のサンプル抽出DNA溶液についてPCRへの阻害の影響が確認された。

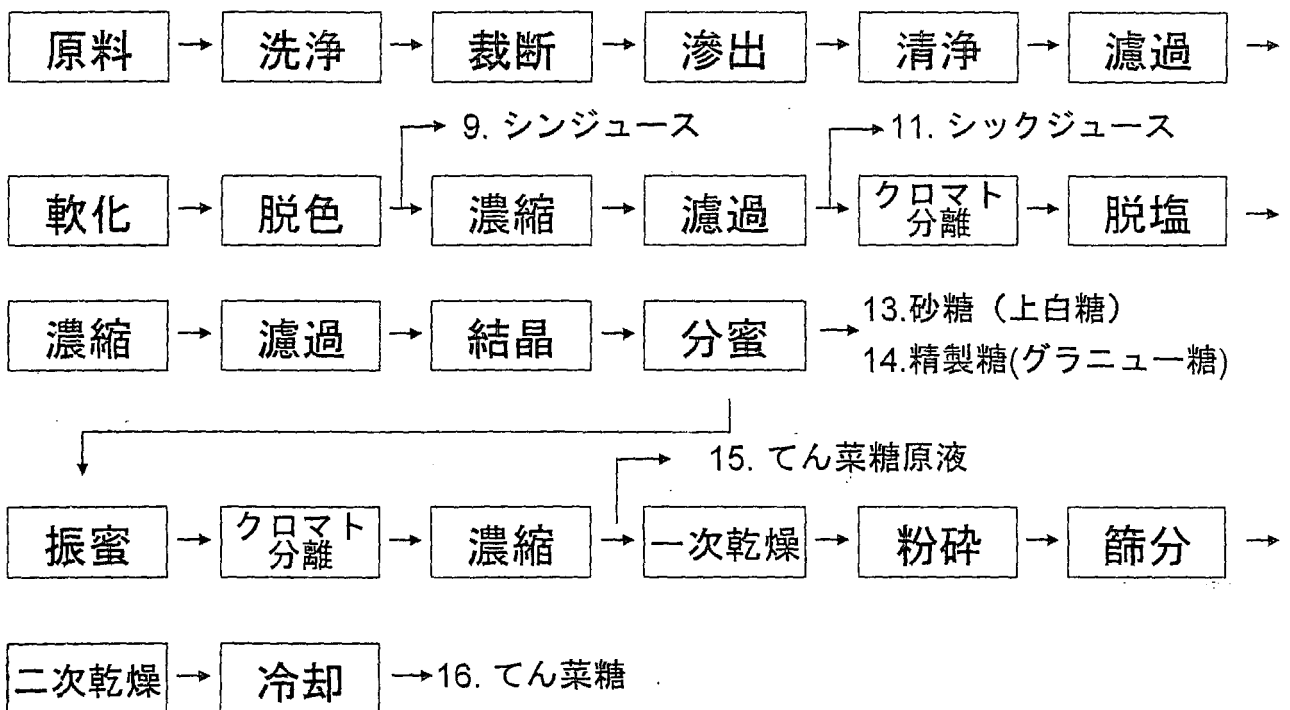
以上のことから、今回の調査で市場から買い上げたてんさい加工品の全ての試料からPCRで検知可能な内在性DNA配列の増幅は確認できなかった。

(別添1)

てんさい糖製造フロー (A工場)



てんさい糖製造フロー (B工場)



(別添2)

てんさい加工品からの DNA 抽出法 (改変法)

- (1) 試料 1 g を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、7.5 mL の G2 緩衝液を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。
- (2) さらにチューブに、10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、100 μ L の QIAGEN Proteinase K 及び 10 μ L の RNase A を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (3) 50 $^{\circ}$ C の恒温水槽中で 2 時間保温する (15 分ごとに 7 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離 (3,000 \times g) する。
- (5) 15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取する。
- (6) チューブをフラッシュ遠心する。
- (7) QIAGEN Genomic-tip 20/G に、1 mL の QBT 緩衝液を負荷し平衡化する。
- (8) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物を取らないようにして上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下する。
- (9) tip に、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、2 mL の QC 緩衝液を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。
- (10) (9) のカラムの洗浄操作を、さらに 2 回行う。
- (11) tip を 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、1 mL の QF 緩衝液 (50 $^{\circ}$ C) を加え、DNA を溶出する (溶出 1)。
- (12) tip を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、1 mL の QF 緩衝液 (50 $^{\circ}$ C) を加え、DNA を溶出する (溶出 2)。
- (13) 溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、サンプルの 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムとエタ沈メイト (DNA キャリアー) 2 μ L を添加後、攪拌し、等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (14) 遠心分離器 (アングルローター) を使用し、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離 (12,000 \times g) 後、200-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (15) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、500 μ L の 70 % エタノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。
- (16) 遠心分離器 (アングルローター) を使用し、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離 (12,000 \times g) し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (17) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブに 40 μ L の DW (滅菌水) を加え、沈殿物を 65 $^{\circ}$ C で 15 分間放置する (振とうしない)。
- (18) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて、溶出 2 のチューブの液量を全量、溶

出1のチューブに入れ、DNAを65℃で15分間振とう溶解する。

(19) 指先でチューブをはじき、(12-24時間)冷蔵庫に静置する。

(20) 目視で不溶物がないことを確認し、これをDNA抽出溶液とする。24時間かけても不溶物が認められる場合は、4℃で3分間遠心分離(12,000×g)して得られた上清を新しいチューブに移し、これをDNA溶出溶液とする。なお、沈殿も、-20℃以下で保存すること。

てんさい内在性 DNA 配列検知用プライマー対について

1. 安定性及び特異性

1. 1. てんさいについて

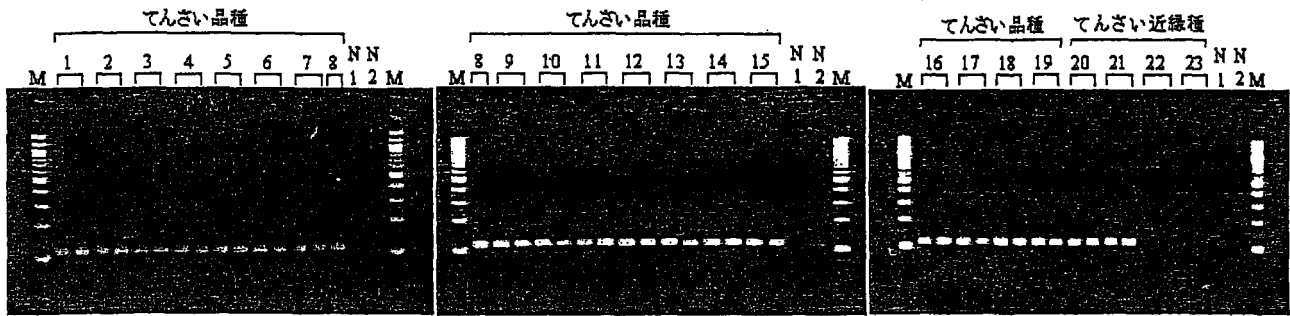
てんさいは、アカザ科フダンソウ属の多年草植物であり、種名は *Beta vulgaris* である。植物学上は飼料用ビート、テーブルビート、フダンソウと同一種であり、ビートの砂糖用品種群がてんさいと呼ばれている。*B.vulgaris* のアカザ科近縁種としては *Chenopodium amaranticolor*、*Chenopodium quinoa* などがある。

1. 2. 各種てんさい品種を含む *B.vulgaris* に対する安定性及びてんさい近縁種、*B.vulgaris* 近縁種に対する特異性

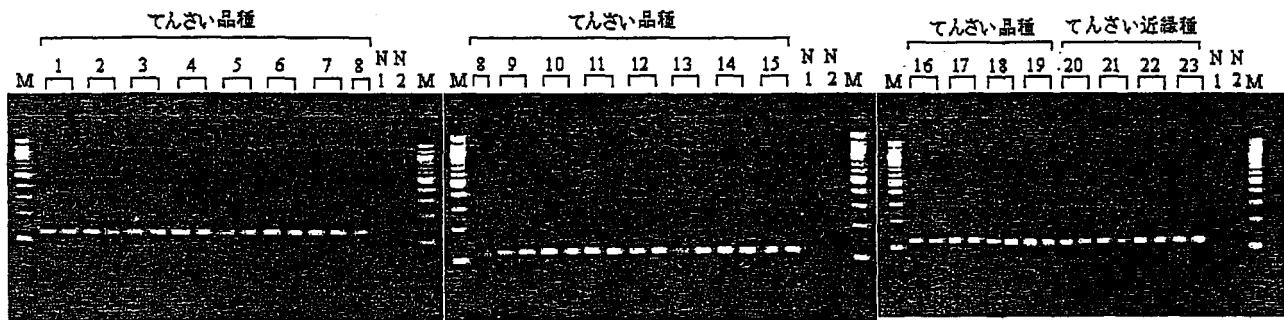
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センターより分譲を受けた 19 種類の *B.vulgaris* の種子 (14 品種のてんさい種子 (モノミドリ、モノヒカリ、モノパール、モノホワイト、モノホマレ、ホツカイマイティー、シュベルト、カプトマル、ユキヒノデ、きたまさり、えとびりか、のぞみ、スコーネ、フルーデンR)、てんさい近縁種の種子 (NK-150、C-110)、飼料用ビート種子 (Amono、Hinderupgaard)、及びテーブルビート種子 (Detroit Dark Red)、フダンソウ (FK-02-09、FK-02-34)) を用いて、*B.vulgaris* に特異的な内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対 3 (SNP F 1-5' & 3', 増幅長: 116 bp) 及びプライマー対 4 (SNP B 2-5' & 3', 増幅長: 121 bp) の安定性を確認した結果、両プライマー対で全てのてんさい品種を含む *B.vulgaris* から目的長のバンドが増幅したことからこれらのプライマーを利用することで、安定的にてんさい DNA 配列を検知できると考えられた。

しかし、*B.vulgaris* 近縁種に対する両プライマー対の特異性を、独立行政法人種苗管理センターより入手した *C.amaranticolor* 及び *C.quinoa* を用いて検討したところ、プライマー対 4 ではアカザ及びシロザにおいて目的長のバンドが増幅したことからプライマー対 3 は、*B.vulgaris* 特異的、プライマー対 4 はアカザ科特異的な増幅産物が得られるプライマーであると判断された。

プライマー対3



プライマー対4

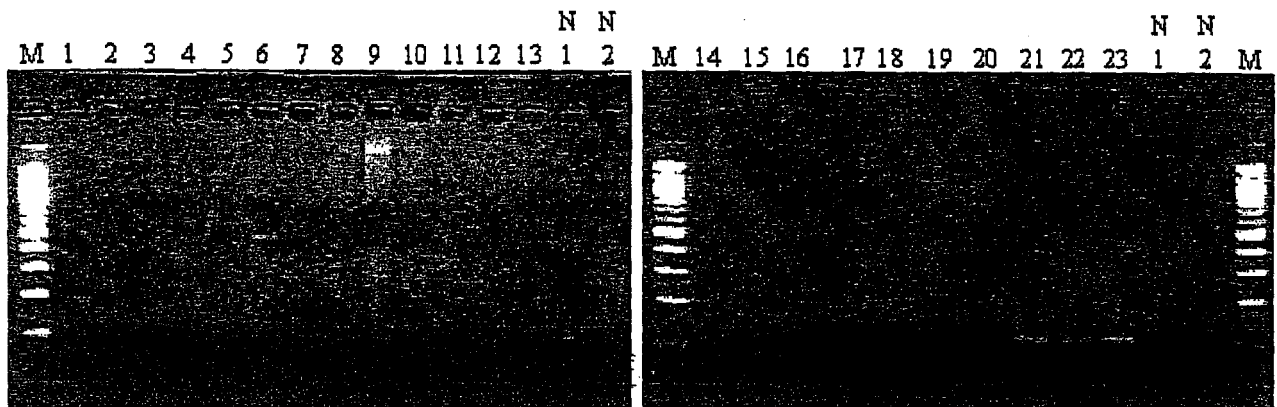


M: 100 bp ラダーマーカー, 1: モノミドリ, 2: モノヒカリ, 3: モノパール, 4: モノホワイト, 5: モノホマレ, 6: ホッカイマイティー, 7: シュベルト, 8: カプトマル, 9: ユキヒノデ, 10: きたまさり, 11: えとびりか, 12: のぞみ, 13: スコーネ, 14: フルーデンR, 15: NK-150, 16: C-110, 17: Amono, 18: Hinderupgaard, 19: Detroit Dark Red, 20: FK-02-09 (フダンソウ), 21: FK-02-34 (フダンソウ), 22: C.amaranticolor (アカザ), 23: C.quinoa (シロザ), N1: ネガティブコントロール1 (No DNA), N2: ネガティブコントロール2 (No primer)

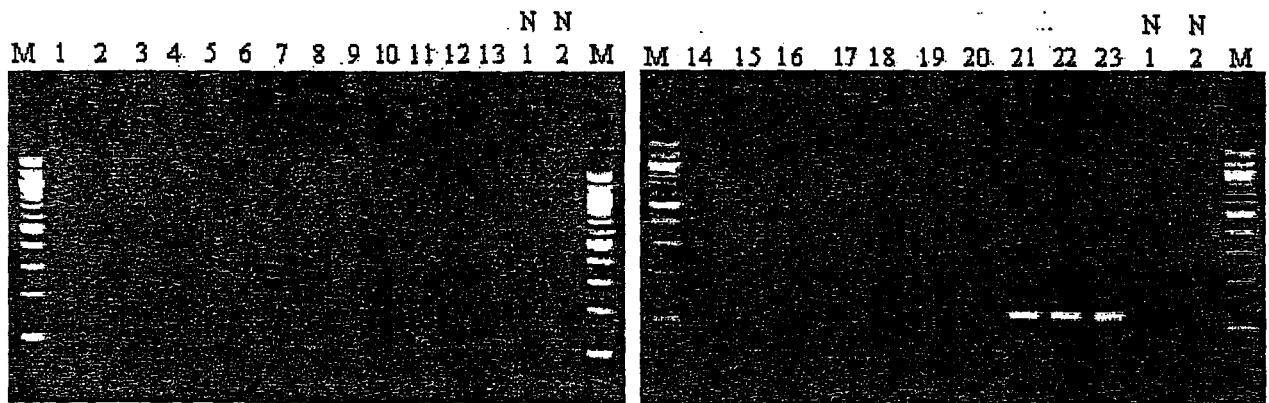
1. 3. 主要作物に対する特異性

てんさい内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対3及びプライマー対4について、入手した主要作物（国産イネ、中国産イネ、ワタ、オオムギ、コムギ、non-GM ダイズ、GM ダイズ (Roundup Ready Soy)、non-GM トウモロコシ、GM トウモロコシ (Bt11, Event 176, MON810, GA21, MON863, NK603, T25, TC1507)、デュラムコムギ、ナタネ、アルファルファ及びジャガイモ）を用いて特異性を確認した結果、両プライマーともに目的長のバンドは増幅されず、これらの主要作物に対しては特異性があることが確認された。

プライマー対3



プライマー対4



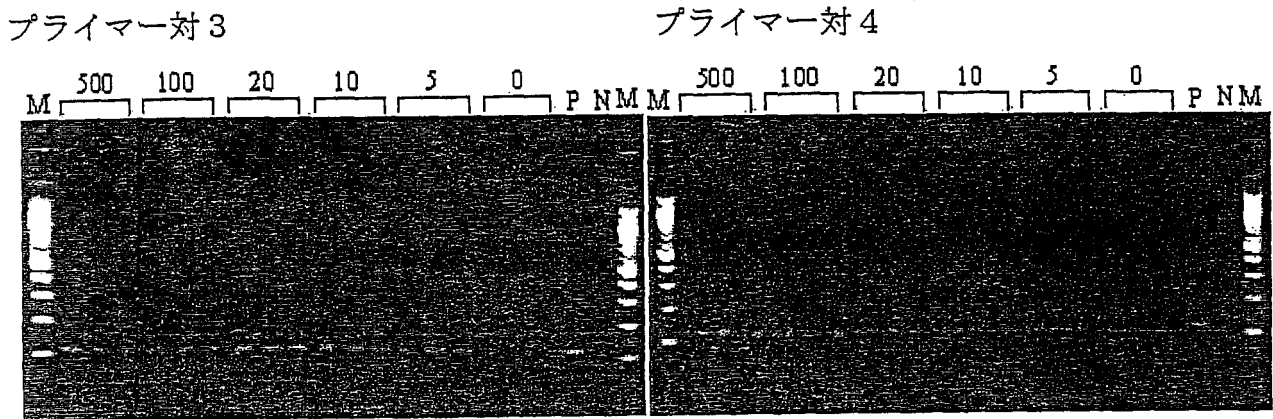
M: 100 bp ラダーマーカー, 1: 国産イネ, 2: 中国産イネ, 3: ワタ, 4: オオムギ, 5: コムギ, 6: non-GM ダイズ, 7: GM ダイズ (Roundup Ready Soy), 8: non-GM トウモロコシ, GM トウモロコシ (9: Bt11, 10: Event 176, 11: MON810, 12: GA21, 13: MON863, 14: NK603, 15: T25, 16: TC1507), 17: デュラムコムギ, 18: ナタネ, 19: アルファルファ, 20: ジャガイモ, 21: ホッカイマイティー (テンサイ), 22: シュベルト (テンサイ), 23: FK-02-09 (フダンソウ), N1: ネガティブコントロール1 (No DNA), N2: ネガティブコントロール2 (No primer)

1. 4. 安定性及び特異性のまとめ

てんさい内在性 DNA 配列検知用プライマー対3及びプライマー対4は、各種てんさい品種を含む *B.vulgaris* に対し安定的に増幅し、主要作物に対しては増幅しなかった。しかし、プライマー対4は *B.vulgaris* 近縁種においても増幅産物が得られた。しかしながら、一般に用途が異なる飼料用ビートやテーブルビートがてんさいに混入することは極めて低いと考えられ、また、同種であるフダンソウは野菜であり、根部の肥大が余り起きないことから、混入することは想定できない。このため、今回開発した2つのプライマー対は本調査に使用可能であると判断した。

2. 検知下限

てんさい内在性 DNA 配列検知用に開発したプライマー対 3 及びプライマー対 4 の検知下限をてんさいの C-value (一倍体ゲノムあたりの DNA 量) をもとに抽出 DNA 溶液を段階希釈して確認した結果、両プライマー対ともに、ゲノム DNA として 5 コピーまで検知可能であった。



M: 100 bp ラダーマーカー

数字はてんさい (品種; スコーネ) ゲノム DNA 添加量 (単位はコピーで、てんさいゲノム量 (C-value) から計算した)。

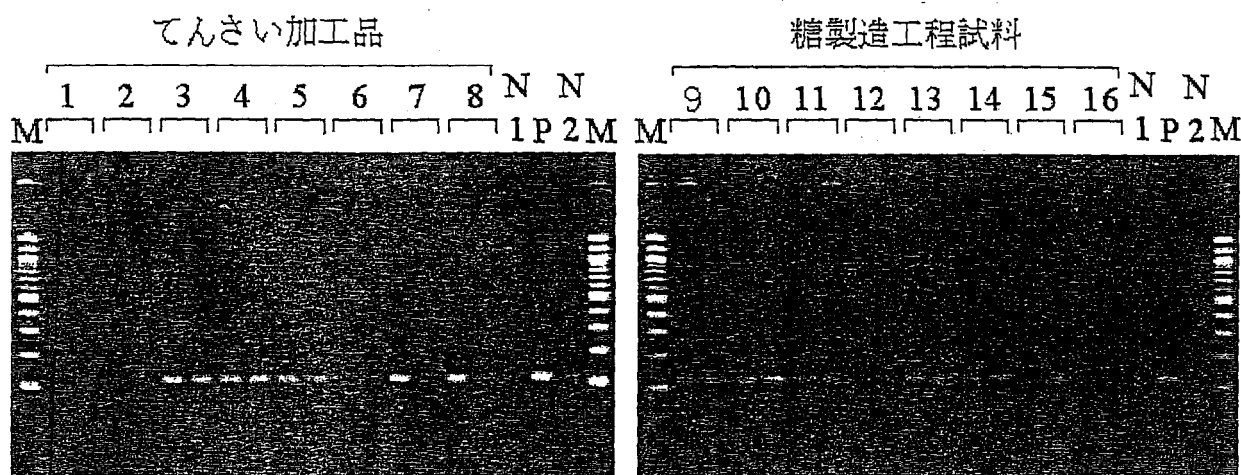
P: ポジティブコントロール (てんさい (品種: スコーネ) の葉から抽出した DNA), N: ネガティブコントロール (No DNA)

抽出 DNA の PCR における阻害確認試験

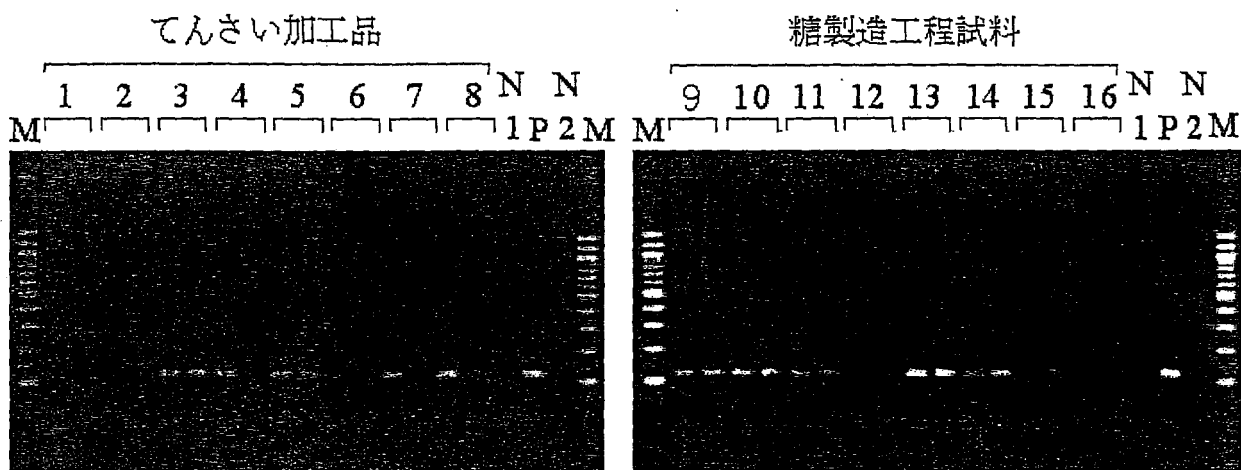
プライマー対3及びプライマー対4による抽出 DNA の PCR における阻害確認試験は、試料 16 点から抽出した DNA に、別途てんさい(スコーネ)の葉から抽出したゲノム DNA を各反応液中に 20 コピー入るように添加することで実施した。なお、添加したゲノムコピー数はてんさいのゲノム量 (C-value) と抽出 DNA の 260nm 吸光度から計算した。

その結果、今回の調査で使用したプライマー 3 対による PCR では試料 16 点のうち 7 点、プライマー対 4 では 8 点で PCR の阻害が確認された。阻害が確認された試料の多くは、肉眼で認識できる程度の褐色を帯びているという共通点があったが、この色素が阻害原因かは不明である。また、一部の砂糖においても 2 回繰り返し試験のうちの 1 回で阻害が確認された。

プライマー対 3



プライマー対 4



M: 100 bp ラダーマーカー, 1~16: 試料番号, N1: ネガティブコントロール1 (No DNA), P: ポジティブコントロール (てんさい (品種:スコーネ)の葉から抽出した DNA), N2: ネガティブコントロール2 (No primer)