

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870868

研究課題名(和文) LAMP法を用いた遺伝子組換え食品の簡易検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a convenient detection system for detection of genetically modified foods using LAMP assay

研究代表者

野口 秋雄(Noguchi, Akio)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号：80616574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え(GM)食品の検査には、高価な装置や煩雑なDNA精製操作が必要であり、検査法の簡便化が求められている。本研究では、LAMP法を用いた遺伝子組換え食品の簡易検査法の開発を行った。開発した検査法は、DNA精製操作を必要とせずに簡便な方法で食品試料からDNAを抽出し、高価な装置を必要とせずにLAMP法を用いた簡便な目視判定法によりGM食品混入の有無を判定できるため、現場レベルや検査機器が揃っていない施設での利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The detection methods of genetically modified (GM) foods require DNA purification and expensive equipment, thereby the convenient assay is need. In this study, we developed a convenient detection system for detection of genetically modified foods using LAMP assay. The developed system consists of convenient DNA extraction from food samples without DNA purification and visual determination of GM foods using LAMP assay with no need for expensive equipment, and is expected to use on field and in testing facilities possessing no testing equipment.

研究分野：生化学

キーワード：遺伝子組換え食品 LAMP法

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え (GM) 作物開発の目的は、食糧不足対策や高付加価値化であり、これまでに世界中で多様な GM 作物が開発されている。一方で、GM 食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められ、国際的な基準作りが進められてきた。我が国では 2001 年から食品衛生法および JAS 法により、GM 食品の安全性審査が義務づけられており、安全性未審査の GM 食品は食品としての流通が禁止されている。我が国では GM 作物の商業栽培は行われていないが、食料の多くを輸入に頼っているため、安全性未審査の GM 食品が国内に流入、流通する恐れがある。安全性未審査の GM 食品の食品への混入を未然に防ぐために、GM 食品の検査法が必要とされている。また、多種多様な食品を各国から輸入している現状において、検査法の簡便化が求められている。

食品中に存在する GM 食品を検知する手法として、PCR 法を利用したものが現在主流である。しかしながら、PCR 法は反応に 2~3 段階の温度変化を必要とするため高価な装置が必要であり、検出までに時間を要する (2~3 時間)。一方で近年開発された LAMP 法は、等温で反応を行うため高価な装置を必要とせず、短時間 (15~60 分) での検出が可能である。さらに、PCR 法に比べて、増幅産物量が多いため、目視での簡易検出が可能である。以上のことから LAMP 法は PCR 法に比べて検査法の簡便化が容易であると考えられる。

2. 研究の目的

食品中には PCR 法や LAMP 法の酵素反応を阻害する物質が多く含まれており、これらは鑄型として用いるゲノム DNA を検体試料から抽出する際に混入してしまう。そのため、通常の PCR 法や LAMP 法を用いる際には、阻害物質をゲノム DNA から分離するために精製工程を必要とし、これが簡便化の障害となっている。また、LAMP 法の簡易検出法としては、反応副産物であるピロリン酸あるいは反応産物である DNA 増幅産物を目視検出する方法が挙げられるが、これらの方法は反応系の影響を受けやすい。そのため、反応系に合った簡易検出法の検討が必要になる。以上のように LAMP 法は PCR 法に比べ優れている点が多く、GM 食品検査法の簡便化に有効であると考えられるが、簡便化にはいくつかの障壁があるのが現状である。そこで本研究では、GM 食品検査の簡便化を目的として、反応条件や検出法を工夫することで DNA 精製操作を必要としない LAMP 法を用いた GM 食品検査法 (図 1) の開発を試みた。

3. 研究の方法

本研究は以下の 5 つの研究項目に分けて実施した。まず、(1) LAMP 反応系の構築、(2) 標準プラスミドの作製、(3) DNA 抽出法の検討

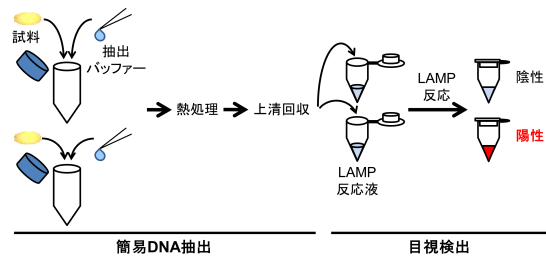


図 1 本検査法の概略図

を行い、検査法の基礎部分の構築を試みた。続いて、簡便化のための大きな課題項目である (4) 簡易検出法の検討、および (5) 擬似試料を用いた検査法の適用性確認を行った。各研究項目の詳細な方法は以下の通りである。

(1) LAMP 反応系の構築

GM トウモロコシおよび GM パパイヤに対して挿入配列とゲノム配列の境界領域を増幅する LAMP プライマーを設計した。鎖置換型 DNA Polymerase、LAMP 反応阻害抑制剤などを検討し、簡易抽出した DNA 溶液でも検出可能な反応阻害物質の影響を受けにくい反応条件を検討した。増幅 DNA の検出は、反応液に SYBR Green I を添加し、リアルタイム PCR 装置を用いて行った。

(2) 標準プラスミドの作製

PCR 法にて標的配列を増幅し、pUC19 に組み込み、標準プラスミドを作製した。本プラスミドは、反応特異性や検出感度などの反応系の性能評価および (5) に用いた。

(3) DNA 抽出法の検討

試料として穿孔処理したトウモロコシ穀粒、トウモロコシ粉砕物およびパパイヤ粉砕物を用いた。各試料に抽出バッファを加え、熱処理にて DNA を抽出した。試料処理条件や抽出バッファを検討し、最適な簡易抽出条件を探索した。

(4) 簡易検出法の検討

増幅 DNA を目視検出できる二本鎖 DNA に特異的に結合する DNA 発色染色剤および DNA 蛍光染色剤を検討した。

(5) 擬似試料を用いた検査法の適用性確認

非 GM 試料に GM 試料あるいは標準プラスミドを少量混入させた擬似試料を作製し、本検査法の適用性を確認した。

4. 研究成果

(1) について、構築した LAMP 反応系は、非 GM 品種および他作物への反応性はなく、対象 GM 品種に高い特異性を示した (図 2)。また、ゲノム DNA および (2) で作製した標準プラスミドを用いた試験において、定性検査法としては十分な検出感度を有することが示された。

操作の簡便化のために、本検査法では DNA

精製を行わずに簡易抽出した DNA をそのまま検査に使用することを前提と考えている。そのため、LAMP 反応系には DNA と同時に抽出される食品および DNA 抽出バッファー由来の反応阻害物質が混入する可能性が高く、これらに影響されない反応系を構築することが求められる。人工の阻害物質を反応系に添加し、様々な反応阻害抑制剤の候補を試した結果、2 種類の非イオン性界面活性剤および市販の反応阻害抑制剤にて、反応阻害が抑制された。(3) について、トウモロコシにおいては穀粒にピンを用いて穿孔処理した試料および粉碎した試料を、パパイヤにおいては粉碎した試料を直接 DNA 抽出バッファーに加え、熱処理にて抽出した DNA 溶液にて十分に検出が可能であった。また、DNA 抽出バッファーの成分として、最適な界面活性剤および DNA 安定化剤を添加することで検出感度の向上が見られた。

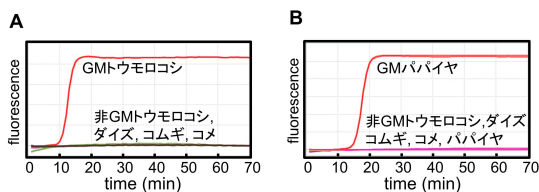


図 2 本検査法の特異性解析

A, GM トウモロコシ, 非 GM トウモロコシ, ダイズ, コムギ, コメから抽出した DNA を鋳型に GM トウモロコシに対する LAMP 反応を行った。B, GM パパイア, 非 GM トウモロコシ, ダイズ, コムギ, コメ, パパイアから抽出した DNA を鋳型に GM パパイアに対する LAMP 反応を行った。増幅 DNA の検出は、反応液に SYBR Green I を添加し、リアルタイム PCR 装置を用いて行った。

(4) について、crystal violet (CV) および SYBR Green I (SGI) を DNA 染色剤として用いた場合に、増幅 DNA の目視での判定が可能であった。ただし、CV を用いた場合にはイオン性界面活性剤や市販の反応阻害抑制剤に対しても発色したため、これらを使用できないことが判明した。また、SGI は反応前に添加すると反応阻害を示したため、あらかじめ反応チューブの蓋に固定化しておき、反応後に反応液と混合する手法を考案した(図 3)。この手法では反応後に反応チューブの蓋を開ける必要がないため、コンタミネーションの危険性を抑えることができる。

(5) について、擬似試料を用いて本検査法を実施した結果、CV および SGI を用いた検出法ともに適用性が確認された(図 4)。ただし、CV を用いた検出法では DNA 抽出において抽出効率の高いイオン性界面活性剤を使用できず、また、LAMP 反応に市販の反応阻害抑制剤を使用できなかったため、SGI を用いた検出法に比べて感度は低かった。本検査法は、食品試料から簡便な方法で DNA を抽出し、さらに LAMP 法を用いた簡便な目視判定法により GM 食品混入の有無を判定でき

るため、現場レベルや検査機器が揃っていない施設での利用が期待される。

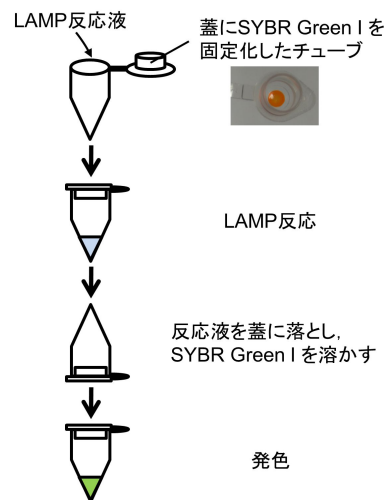


図 3 SYBR Green I を用いた目視検出方法

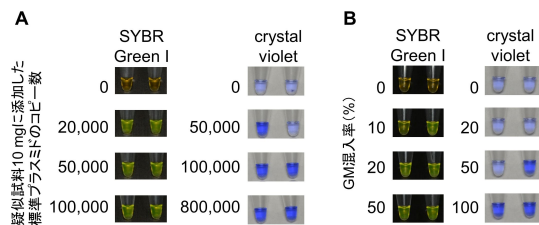


図 4 擬似試料を用いた本検査法の適用性確認

A, 非 GM トウモロコシに標準プラスミドを添加して作製した擬似試料を用いて本検査法を実施した。B, 非 GM パパイアに GM パパイアを添加して作製した擬似試料を用いて本検査法を実施した。増幅 DNA は SYBR Green I および crystal violet を用いて目視検出した。SYBR Green I を用いた場合、陰性試料は橙色、陽性試料は緑色を呈する。crystal violet を用いた場合、陰性試料は薄青色、陽性試料は濃青色を呈する。各試料あたり 2 併行で本検査法を実施した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

- 野口秋雄, 近藤一成, 最上(西巻)知子「LAMP 法を用いた遺伝子組換え作物の簡易検査法の開発」第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 26 日, 城山観光ホテル(鹿児島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 秋雄 (Akio NOGUCHI)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号: 80616574

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし