

機関番号：84407

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790601

研究課題名（和文）亜硫酸処理による食品中 DNA への影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of DNA in foods treated with sulfites as a preservative

研究代表者

吉光 真人（YOSHIMITSU MASATO）

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：70321940

研究成果の概要（和文）：

本研究では、亜硫酸処理がなされたドライフルーツ中の DNA 塩基配列情報を解析する方法を検討した。ドライフルーツの塩基配列情報を解析したところ、一部試料で塩基の置換が疑われる事例が観察された。また、別の試料において PCR で十分な量の増幅産物が得られているものの、シーケンスデータが得られない事例が見られた。

ドライフルーツから抽出した DNA 溶液に対してリアルタイム PCR 装置を用いた SYBR green 検出系を検討したところ、従来法よりも増幅産物の検出率が高かった。また、SYBR green 検出系により得られた増幅産物を用いてダイレクトシーケンスが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I have tried to develop the method for analyzing DNA sequence of dried fruits, which were treated with sulfites as a preservative.

As a result, in specific dried fruits, it was suggested that some nucleotides were converted to another, and it was not possible to analyze the DNA sequence, although the amount of PCR amplification products was enough to use. Using real time PCR system with SYBR green fluorescent reagent, it was possible to detect dried fruits more clearly than using thermal cycler and electrophoresis, and the real time PCR products were useful for direct sequencing of nucleotides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：亜硫酸、DNA 抽出、塩基配列、シーケンス

1. 研究開始当初の背景

亜硫酸は古くから使用されてきた食品添加物である。現在でも漂白剤、保存料等として認可されており、ワインや魚介類など、

様々な食品に漂白や発酵調整等の目的で添加されている。世界的にも広く利用されており、使用実績の多い食品添加物である。

当所において亜硫酸処理がなされたコー

ンスターチやドライフルーツ等の食品中に含まれる遺伝子組換え食品の有無を調査したところ、DNA は抽出されているものの PCR で増幅、検出不可能な試料が存在した。この原因として、亜硫酸処理により DNA 塩基配列中のシトシンがウラシルに置換することで検出用プライマーと試料由来 DNA の二重鎖形成が不可能となり、その結果 PCR 反応が阻害されている可能性が考えられた。他の食品で同様の反応が生じた場合、亜硫酸処理により食品中の DNA 塩基配列が影響を受け、食品中の DNA 塩基配列情報に基づく検査、鑑別等の結果の判定に悪影響をおよぼす可能性が否定できない。

そこで、現時点で塩基配列情報の解析が困難な、亜硫酸処理がなされた食品に対する検査方法を確立し、亜硫酸処理による食品中 DNA 塩基配列への影響を調査、解析することとした。

DNA を指標とした食品検査には、主として以下の検査が挙げられる。遺伝子組換え食品の検査においては、遺伝子組換え作物に含まれる組換え遺伝子の有無や、組換え遺伝子と作物共通に含まれる遺伝子の比率に基づいて算出した遺伝子組換え作物の混入率を確認している。アレルギー食品の検査においては、特定原材料由来タンパク質の濃度に基づいてスクリーニング検査を行った後、特定原材料由来遺伝子の有無を PCR 法を用いて確認している。また、米の品種鑑別、加工食品の原材料中の肉種鑑別、フグの魚種鑑別等においても DNA の塩基配列情報を用いた検査、鑑別が行われている。このように、DNA の塩基配列情報に基づく食品の検査は広く普及し、国民の食の安全、安心に大きく寄与している。本研究を進めることで、食品中 DNA 塩基配列に対する亜硫酸処理の影響を解析し、これら検査での結果に対する正確性、信頼性を確保することは重要であると考えられる。

2. 研究の目的

亜硫酸処理がなされた食品中の DNA 塩基配列で塩基の置換が疑われる事例が存在したことから、その実態を確認し、これら食品に対する DNA の塩基配列情報に基づく検査を可能とすることを目的とした。

以前より試料として検討していたドライパイヤを含むドライフルーツ類に着目し、パイヤ由来遺伝子（パイイン遺伝子）もしくは植物由来遺伝子を検出対象に PCR を行い、増幅の有無を確認する。増幅産物が得られた試料についてはダイレクトシーケンスを行い、塩基配列の置換の有無を確認する。また、塩基配列の新しい検出系を検討する。以下の3項目について検討する。

(1) 亜硫酸処理条件を検討し、ドライパイ

イヤのモデル食品を作成する。モデル食品中の DNA 塩基配列のシトシンからウラシルへの置換の有無について、ダイレクトシーケンスを行い確認する。

(2) ドライフルーツ類に関して実態調査を行う。DNA 塩基配列の置換の有無について、ダイレクトシーケンスを行い確認する。PCR で増幅産物が得られなかった場合、プライマー結合部位の塩基配列が置換したと仮定したプライマーを設計し、検討する。また、プライマー結合部位の塩基配列を完全に置換させるため、再亜硫酸処理を検討する。

(3) 試料から抽出した DNA 溶液について、迅速、簡便に目的の増幅産物が確認可能なリアルタイム PCR 装置を用いた SYBR green 蛍光試薬による検出系（以下、SYBR green 検出系）を検討する。また、ダイレクトシーケンスが可能かどうか検討する。

3. 研究の方法

まず、ドライパイヤのモデル食品の作成を検討した。続いて、市販ドライフルーツについて、PCR 増幅産物が得られなかった際の方法を検討しながら生果と亜硫酸処理食品中の PCR 増幅産物の塩基配列を比較した。また、新たな手法の検討として、SYBR green 検出系を検討した。

(1) ドライパイヤの作成には、まず生果パイヤの外皮と種子を除去後、適当な大きさに切り分けた。スターラーで攪拌しながら亜硫酸溶液に浸せき後、アルカリ溶液に浸せきし、乾熱滅菌器を用いて乾燥した。亜硫酸試薬として亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウムを、アルカリ試薬には水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、リン酸緩衝液を検討した。亜硫酸処理時の pH は弱酸性、アルカリ溶液の pH は弱アルカリ性になるよう調整した。作成したドライパイヤから DNA 抽出後、パイイン遺伝子検出用プライマー対、植物由来遺伝子検出用プライマー対を用いて PCR を行った。得られた増幅産物をダイレクトシーケンスし、塩基配列を比較した。また、パイヤ抽出 DNA 溶液に対し、上記同様の検討、及び市販 DNA メチル化部位検出用試薬による亜硫酸処理を検討した。

(2) 市販ドライフルーツの実態調査として、パイヤ、マンゴー、リンゴ、メロン、イチゴ、キウイ、バナナ、トマトの亜硫酸表示のあるものを試料として用いた。ドライフルーツ及び対応する生果から DNA を抽出し、植物由来遺伝子検出用プライマー対を用いて PCR を行った。得られた増幅産物をダイレクトシーケンスし、生果の塩基配列と比較し

た。増幅産物が得られなかった場合、以下の2点を検討した。

- ①プライマー結合部位の塩基配列が置換したと仮定したプライマーを設計した。
- ②プライマー結合部位の塩基配列を十分置換させるため、抽出 DNA 溶液に対して亜硫酸処理を行った。

(3) ドライパイヤモデル食品及び市販ドライフルーツから抽出した DNA 溶液について、SYBR green 検出系を検討した。得られた測定結果と従来法の PCR、ゲル電気泳動による測定結果を比較した。また、当該検出系の PCR 産物を用いたダイレクトシーケンスが可能かどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 種々の亜硫酸処理条件を検討し、ドライパイヤモデル食品の作成を試みた。パパイン遺伝子検出用プライマー対、植物由来遺伝子検出用プライマー対どちらの増幅産物についてもシトシンからウラシルへの塩基配列の置換は確認されなかった。

亜硫酸処理の影響が観察されなかったことから、パイヤ抽出 DNA 溶液に対して種々の亜硫酸処理条件及び市販 DNA メチル化部位検出用試薬での処理を検討した。通常のパイマー対とともに、プライマー結合部位の塩基配列が置換したと仮定したプライマーも用いたが、ほとんど増幅産物が確認されなかった。パイヤから抽出した DNA においては本処理条件は厳しすぎ、その結果、PCR で増幅産物が確認されない程度まで DNA が損傷を受けた可能性が考えられた。一方、増幅産物が得られたものについてはドライパイヤモデル食品と同様、シトシンからウラシルへの塩基配列の置換は確認されなかった。以上より、パイヤに関して亜硫酸処理のモデル食品を作成するためには、さらなる処理条件の検討が必要であると考えられた。

(2) 8種のドライフルーツ及び対応する生果から DNA を抽出し、植物由来遺伝子検出用プライマー対の増幅産物に対してダイレクトシーケンスを行った。PCR で増幅産物が得られなかった試料に対し、シトシンがウラシルに置換したと仮定して設計したプライマー対を用いて検討したが、増幅産物は得られなかった。さらに、抽出 DNA 溶液に対して再度の亜硫酸処理を行いプライマー結合部位の塩基配列の置換を促進させた。その後、改めて上述のプライマー対を用いた PCR を行ったが、増幅産物は得られなかった。

PCR で増幅産物が得られた試料についてはダイレクトシーケンスを行った。シーケンス結果を解析したところ、一部試料で塩基の置換が疑われる事例が観察された。しかし

ながら、今回の測定結果はドライフルーツの原料となった生果そのものの塩基配列と比較したものではない。今後、原料生果を入手し、可能であれば同一生果の一部をドライフルーツに加工後、加工前と加工後の試料のシーケンス結果を比較する必要がある。

また、一部試料については PCR で十分な量の単一増幅産物が得られているものの、シーケンスデータが得られない事例が見られた。この原因として、塩基配列の増幅部位内に多数の塩基の置換が生じ、あるいは存在比率が高い配列が存在しない状態が考えられた。その結果、シーケンスデータがばらついてシグナル強度が検出下限値以下となり、単一増幅産物が得られたにも関わらず、シーケンスデータが得られなかった可能性が考えられた。今後、1. 次世代型シーケンサーを用いて増幅産物に含まれるすべての塩基配列のシーケンスデータを解析する、あるいは2. 増幅産物の TA クローニングを行い、できる限り多くのクローンのシーケンスを行う等の検討が必要であると考えられた。

(3) ドライフルーツから抽出した DNA 溶液中の植物由来遺伝子を検出対象として測定したところ、従来法の PCR、ゲル電気泳動の系よりも SYBR green 検出系が検出率が高い結果となった。また、SYBR green 検出系による測定で、解離曲線を作成することにより単一ではない増幅産物であることが示された試料を、従来法のゲル電気泳動で確認した。その結果、全ての試料が電気泳動では陽性対照検体と移動度が同じ一本のバンドで検出された。従来法で単一増幅産物である結果を示した試料に関しても、SYBR green 検出系を用いて測定することで、より正確な結果を確認することができる可能性が示された。

本検出系は従来法と比較して、ゲルを作成し、泳動、核酸染色剤で染色後、トランスイルミネーターで確認するという手順を省略し、機械の測定ソフトで増幅産物の有無を確認することが可能となり、結果を迅速、簡便に、経験の有無に関わらず誰でも確認することが可能であった。また、増幅産物が高濃度に含まれる PCR 産物を空气中に解放することなく結果を確認可能であり、コンタミネーションの防止にも有効であった。

また、従来法で増幅産物が得られず、本検出系のみで増幅産物が確認された試料に関してもダイレクトシーケンスが可能であった。

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3件)

- ① 吉光真人、清田恭平、阿久津和彦、尾花裕孝：特定原材料「えび」「かに」検査 その2 - 確認試験について -、第47回全国衛生化学技術協議会年会講演集、p110-111、神戸市、2010年11月
- ② 吉光真人、清田恭平、阿久津和彦、尾花裕孝：特定原材料「えび」「かに」の定性検査法について、第100回日本食品衛生学会学術講演会要旨集、p127、熊本市、2010年9月
- ③ 吉光真人、尾花裕孝：食用油からのDNA抽出法の検討、第98回日本食品衛生学会学術講演会要旨集、p74、函館市、2009年10月

[その他]

ホームページアドレス

<http://www.iph.pref.osaka.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉光 真人 (YOSHIMITSU MASATO)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：21790601