

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860104

研究課題名(和文)加工食品中の特定原材料の検出に適した遺伝子検査法の開発

研究課題名(英文)Development of DNA analysis for allergenic foods in processed foods

## 研究代表者

張替 直輝(Harikai, Naoki)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：90454743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：加工食品中の特定原材料の遺伝子検査で問題となるDNAの劣化に対して、その劣化過程とPCR検出率との関係および劣化DNAの検出法と試料調製法を検討した。DNAを用いた基礎検討で高温高圧負荷によるDNA劣化がポアソン過程に従うことが分かり、劣化DNAとPCR検出率の関係式が得られた。劣化DNAの検出率は人工核酸の導入によるPCR増幅サイズの縮小化で改善した。検出感度や実際の試料への応用などの課題もあるがDNA断片から元の配列を復元する方法で約20塩基を検出できた。シリカ膜スピンカラムのDNA抽出の改良法は、劣化DNAを簡便な操作で大量に回収でき、そのPCR検出率は他の抽出法と同等であった。

研究成果の概要(英文)：In PCR analysis of processed foods, DNA degradation is essential problem. We focused on a DNA-degraded process and developed suitable extraction and detection methods for degraded DNA. We estimated the degraded process of DNA as model DNA by high temperature and pressure conditions, and found the linearity between logarithms of PCR detection rates and exposed temperatures or times. Our DNA extraction method based on alkaline SDS lysis and DNA binding to silica membrane could conveniently extract a large amount of DNA from degraded samples, and had almost the same performance of PCR detection as general DNA extractions. In PCR detection, the probes contained locked nucleic acids could make the PCR conditions with small amplicon size and improve sensitivity in degraded DNAs. Furthermore, we developed detection method of a short DNA, about 20 mer, by reconstruction reaction using the template DNA with dUTP in model DNAs, although improving sensitivity and applying to foods are remained.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子検査 食品衛生

## 1. 研究開始当初の背景

現在、特異性と感度を備えた Polymerase Chain Reaction (PCR)法は、特定原材料や遺伝子組換え食品 (Genetically Modified Organisms (GMO))の検出、魚や肉の種判別など多くの食品検査に利用されている。しかし、加工食品の検査では、PCR の検出率が低いこと、一般的なシリカ膜スピンカラムの DNA 抽出率が低いことなどの問題がある。また、我国の特定原材料の表示制度のようにタンパク質検出の Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)法と DNA 検出の PCR 法を組み合わせた検査の場合、加工処理によるタンパク質と DNA の劣化の程度の違いなどから、ELISA 法と PCR 法で検査結果が分かれる可能性がある。実際に一部の加工食品では、ELISA 法で陽性、PCR 法では陰性になるケースが報告されている。<sup>1)</sup> 更に、食品からのタンパク質抽出の効率改善などにより ELISA 法の検出感度の向上が進み、このようなケースが増加する可能性も示唆されている。これらの問題の根幹となっているのは、食品試料中の DNA の劣化が、検査の際に DNA の抽出や検出へ影響を及ぼしていることである。

この DNA 劣化の問題に対して、DNA の劣化過程を解析して PCR 検出率との関係を明らかにすることや、劣化 DNA に適した検出法と試料調製法を開発することが重要である。そして、これらの問題を解決することで、加工食品中の特定原材料に対する DNA 検査において偽陰性を削減することができ、食品に含まれる原材料のより精確な情報提供が期待できる。

## 2. 研究の目的

### (1) DNA の劣化と PCR 検出率についての基礎的な検討

物理的、化学的、生物学的な負荷を受けた試料ではその中に含まれる DNA が劣化するため、PCR 法での検出率が低下する。従って、PCR 法を用いた検査データを正確に判断するには、DNA の劣化と PCR の検出率との関係を明らかにする必要がある。既に超音波、変異原性物質、DNA 分解酵素を用いた DNA の劣化過程の基礎的な検討が行われている。食品検査でも特定原材料などで PCR 法が利用されているが、加工食品では製造で多様な負荷を受けているため、その中に含まれる DNA が著しく劣化し、PCR 法での検出率が低下する。その加工処理の影響を検証する手段として、試料をオートクレーブして作製したモデル加工食品を用いた報告がなされている。<sup>2)</sup> しかし、その方法では食品試料からの劣化 DNA の抽出効率を考慮する必要があるため、DNA の劣化と PCR 検出率の関係を解析することは難しい。そこで、直鎖の約 5 万塩基対の  $\lambda$ DNA をモデル試料に用いて、高温高圧負荷に伴う DNA の劣化と PCR 検出率の関係について検討した。

### (2) 劣化 DNA に適した検出法の検討

加工処理に伴う DNA の劣化に対して PCR 増幅領域を小さくすることで検出率低下を軽減できることが報告されている。<sup>3)</sup> 上記(1)の検討で劣化 DNA 試料に対する PCR 増幅サイズと PCR 検出率の関係を明らかにすることで PCR 増幅サイズの縮小化による劣化 DNA の検出率の改善効果が予測でき、更に断片化 DNA に最適な検出法として増幅サイズが極めて小さい 45 塩基の PCR 条件を人工塩基の導入によって作成できた。そこで、この 45 塩基の PCR 条件の劣化 DNA の検出率の改善効果を検証した。更に、人工核酸を導入したプローブを用いて、特定原材料である落花生を検出する公定法の PCR 条件を改良し、落花生の劣化 DNA の検出率の改善効果も検証した。

また、一般的に PCR 法では約 20 塩基の 2 つのプライマーに加えて検出用プローブを必要とする場合があるため、40 塩基よりも短い DNA 断片を検出することは極めて難しい。しかし、上記(1)で得られる PCR 増幅サイズと PCR 検出率の関係式から、検出に必要な塩基配列の長さを縮小化することで検出率が更に向上することが予測される。そこで、20 塩基程度の極度に断片化された DNA の検出法として、試料中の断片化 DNA から元の塩基配列を復元して PCR で検出する方法を検討した。

### (3) 劣化 DNA に適した試料抽出法

Boom 等はカオトロピック塩の溶液下で DNA がシリカ膜に吸着することを見出した。<sup>4)</sup> 現在、この方法はシリカ膜スピンカラムを用いた簡便な方法として様々な試料からの DNA 抽出に広く用いられている。しかし、加工食品の検査では、DNA 抽出率が低いことが報告されている。<sup>5)</sup> 一方、アルカリ抽出法とは試料にドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むアルカリ溶液を加えてタンパク質や細胞壁複合体を可溶化し、DNA を回収する方法で、主に環状 DNA を回収する方法である。この方法は、操作が簡便で試料のマトリックスの溶解性に優れているという利点がある。そこで、高温高圧負荷した試料を用いて、アルカリ SDS とシリカ膜スピンカラムを組み合わせた方法による劣化 DNA の抽出を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA の劣化と PCR 検出率についての基礎的な検討

高温高圧の負荷時間の検討では、オートクレーブを用いて  $\lambda$ DNA 水溶液を 105 で 3、6、9、12、15、30、45、60、75、90 分間負荷し、劣化 DNA 試料を調製した。温度条件の検討では、オートクレーブを用いて  $\lambda$ DNA 水溶液を 105、107、109、111、113、115 で 15 分間の負荷を行い、試料を調製した。

DNA上のPCR増幅領域の位置と検出率との関係を検討するため、λDNAに対して約1万塩基対間隔で6種類のプライマーを作製し、SYBR Greenを用いた定量PCRで測定した。PCR増幅サイズと検出率の検討では、λDNAのほぼ中央に位置する塩基配列を認識する人工核酸を導入した検出用の加水分解プローブと増幅サイズ45、60、75、90、104、190、302、416、506塩基のプライマーを使用し、定量PCRで測定した。電気泳動法では、DNA試料を15%アクリルアミドゲルで泳動し、GelRedでDNAを染色した。その泳動像を撮影した後、その蛍光強度を読み取った。

#### (2) 劣化DNAに適した検出法の検討

人工核酸を用いたPCR増幅サイズの縮小に伴う検出率改善効果：人工核酸のLocked Nucleic Acid (LNA)を用いた8塩基の加水分解プローブと17塩基のプライマー2つを用いて、増幅サイズを極限まで短くしたλDNAに対するPCR条件を作成した。そして、オートクレーブを用いて調整したλDNAの劣化試料を定量PCR法で測定した。その結果を増幅サイズ104塩基のPCRと比較した。

還元反応による約20塩基のDNA断片の検出：λDNA中の90塩基の配列でdTの代わりにdUを組込んだ一本鎖DNAを合成した。それに含まれる配列で17塩基の一本鎖DNAを劣化DNAの疑似試料とし、その合成dU含有DNAと混合した。その17塩基のDNAを起点としてポリメラーゼで複製反応した後、ウラシル-N-グリコシラーゼを加えてdUを含んだ合成DNAを分解した。この反応液の一部を取り、加水分解プローブを用いた定量PCRで還元されたDNAを測定した。また、落花生のゲノミックDNA中の100塩基の配列でdTの代わりにdUを組込んだ一本鎖DNAを合成し、それに含まれる配列で20塩基の一本鎖DNAを劣化DNAの疑似試料とした検討も行った。

#### (3) 劣化DNAに適した試料抽出法

ラット肝臓試料での基礎検討：取扱いが容易で大量に新鮮な試料が入手できるラットの肝臓を使って基礎条件を検討した。屠殺したラットから直ちに肝臓を摘出し、そのまま使用した生試料、液体窒素で凍結して-80保存した凍結試料、その凍結試料をオートクレーブで121 60分処理した試料の3つを調製した。アルカリ抽出法とシリカ膜スピнкаラム法を組み合わせたプラスミドDNA抽出キットのQIAprep Spin MiniPrep Kit(Qiagen)を使用して、アルカリSDS処理後の上清に等容量の8Mグアニジン溶液を加えて抽出したものをPrepMとした。total DNA抽出キットであるDNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)(DNeasy Plant)、Genomic-tip(Qiagen)(G-tip)と比較した。各抽出DNAの260nmと280nmの吸光度を測定して回収量や質を評価し、更にPCRに

よるDNA検出率を検証するため、加水分解プローブを用いた定量PCRでβ-actin配列を測定した。

特定原材料であるエビ試料での検討：車エビの可食部の凍結試料とオートクレーブで121 60分処理した試料を調製した。Prep M、DNeasy Plant、G-tipの3つを検討した。定量PCRには、エビのmitochondria 16S rRNA gene配列を対象にした公定法エビ検出用プライマーを使用し、SYBR Greenを用いた定量PCRで測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNAの劣化とPCR検出率についての基礎的な検討

DNA検出部位とPCR検出率の関係：高温高圧負荷した試料と未負荷の試料とのCt値は、DNA検出部位間でほとんど差が無かった(表1)。従って、DNA検出部位の違いは劣化DNA試料からのPCR検出率に影響しないと考えられた。

表1. DNA検出部位とPCR検出率の関係

Primer No.	105 5 min ΔCt	105 25 min ΔCt
1	3.23	8.55
2	3.00	7.39
3	3.11	8.38
4	2.60	8.31
5	2.95	8.41
6	2.71	8.11

$$*\Delta Ct = Ct_{control} - Ct$$

(Ct<sub>control</sub>は無負荷のDNA試料のCt値)

負荷時間とPCR検出率の関係：105で3~90分間高温高圧負荷した試料において、負荷時間と検出率の対数との間に負の直線関係が成立した(図1)。更にPCR増幅サイズ毎の直線の傾きから、PCR増幅サイズが大きいほど単位負荷時間あたりの検出率の低下が大きくなるのが分かった(図2)。

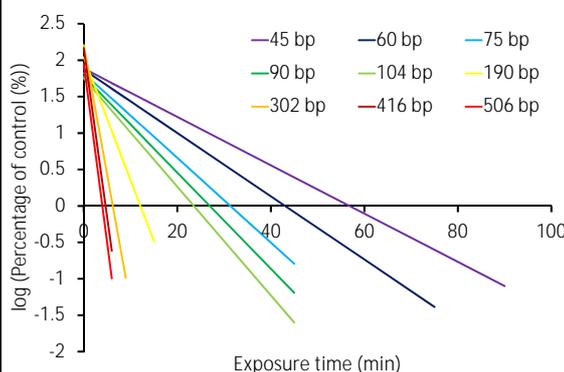


図1. 負荷時間とPCR検出率との関係

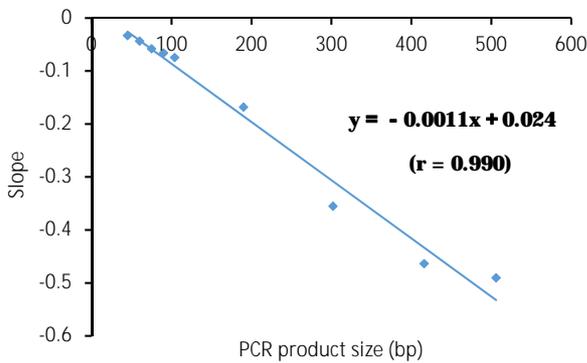


図2. 負荷時間あたりのPCR検出率低下に及ぼすPCR増幅サイズの影響

負荷温度とPCR検出率の関係：105～115で15分間高温高圧負荷した試料において、温度と検出率の対数との間に負の直線関係が成立した(図3)。更にPCR増幅サイズ毎の直線の傾きから、PCR増幅サイズが大きいほど単位負荷温度あたりの検出率の低下が大きくなることが分かった(図4)。

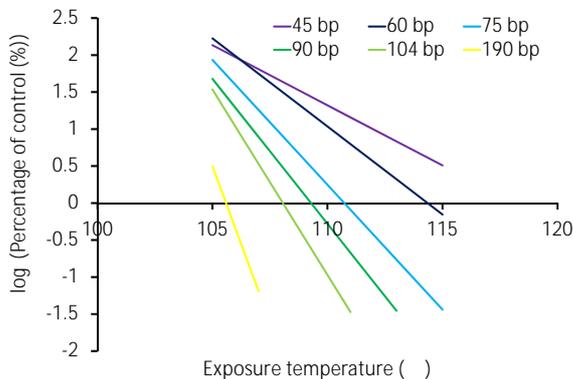


図3. 負荷温度とPCR検出率との関係

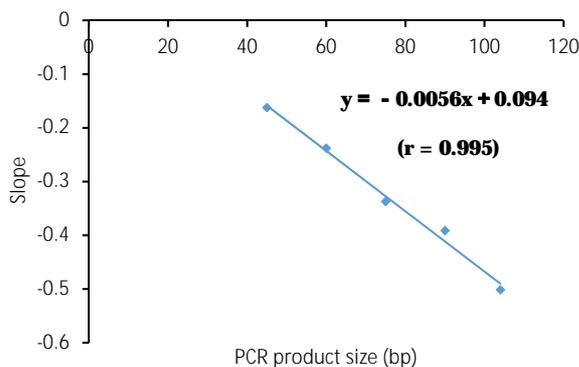


図4. 負荷温度あたりのPCR検出率低下に及ぼすPCR増幅サイズの影響

また、これらの高温高圧負荷した試料を電気泳動したところ、DNAの発色がスミア状となり、負荷時間の増加に伴い低分子側にシフトし、DNA劣化が進行していることが確認された。そして、定量PCRの結果と同じく、50塩基以上のDNAの発色強度の対数と負荷時間の間には負の直線関係が成立した。

まとめ：本研究で得られた劣化DNAのPCR検出に関する関係式から、高温高圧負荷によるDNA劣化がポアソン過程に従うことが分かった。そして、負荷する時間と温度がポアソン過程の強度に關与していることが明らかになった。これらの関係式は、劣化したDNA試料から本来の遺伝子量の予測や劣化に耐性のあるプライマーの設計に役立つと考えられる。

## (2) 劣化DNAに適した検出法の検討

人工核酸を用いたPCR増幅サイズの縮小に伴う検出率改善効果：一般的なPCR検査では増幅サイズが100塩基程度の条件が頻用されている。今回検討した104塩基と45塩基のPCRでは、105の負荷時間の増加に伴い検出率の差が大きくなり、30分の試料では45塩基のPCR条件は約56倍の検出率を示した(表2)。

表2. 増幅サイズ45塩基のPCR条件の検出率改善効果

Time (min)	PCR (45 mer)	PCR (90 mer)	Ratio (45 mer/90 mer)
6	48.0	27.6	1.74
15	24.6	4.82	5.12
30	6.77	0.12	55.8

無負荷のADNA試料の測定値を100としたときの百分率を示す。

この人工核酸で落花生検出用のプローブを作製し、特定原材料の公定法の95塩基よりも短い60塩基のPCR条件を作成した。落花生から抽出したDNAに6～30分間の105の高温高圧負荷をしたDNA試料に対して、定量PCRを行ったところ、増幅効率を2倍と仮定すると60塩基(LNA probe)は95塩基(Normal)の3.1倍の検出率を示した(表3)。

表3. LNAを導入したプローブを用いた落花生DNAのPCR検出率

Time (min)	LNA probe $\Delta Ct$	Normal $\Delta Ct$
6	0.42	0.77
15	0.58	1.44
30	2.70	4.34

$\Delta Ct = Ct_{\text{control}} - Ct$

( $Ct_{\text{control}}$ は無負荷の落花生DNA試料の $Ct$ 値)

復元反応による約20塩基のDNA断片の検出：DNA中の90塩基の配列を基に合成したdUを組込んだ一本鎖DNAを用いた検討で、疑似試料の17塩基の一本鎖DNAの濃度が0.1～10 pMと上昇するのに伴い $Ct$ 値の低下が認められた(図5)。

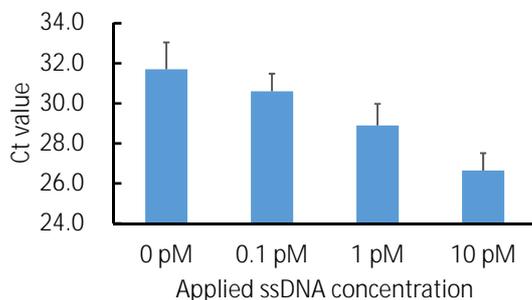


図 5. DNA 配列の復元検出

また、落花生のゲノミック DNA 中の 100 塩基の配列を基に合成した dU を組込んだ一本鎖 DNA を用いた検討でも、疑似試料の 20 塩基の一本鎖 DNA の添加により、Ct 値の低下が認められた (図 6)。

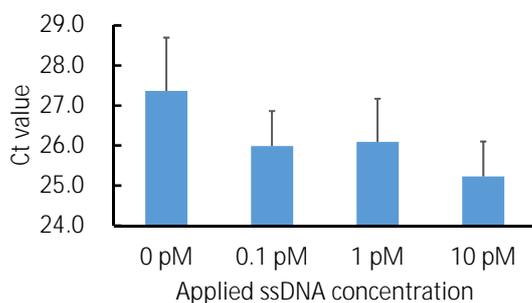


図 6. 落花生 DNA 配列の復元検出

まとめ：人工核酸の導入により PCR 増幅サイズを縮小化することで劣化 DNA の検出率が大きく改善された。また、本研究で行った DNA 断片から元の配列を復元する方法は、約 20 塩基を検出することができた。しかし、この方法には検出感度の改良や実際の劣化 DNA 試料への応用などの課題が残っている。

### (3) 劣化 DNA に適した試料抽出法

ラット肝臓試料での基礎検討：生試料と凍結試料において、PrepM は OD260/280 比が良好であったが、DNA 回収量は極めて少なかった (表 4)。

表 4. ラット肝臓試料を用いた DNA 抽出法の検討

	260/280 ratio	DNA conc. (ng/μL)	DNA yield (μg)	-actin copy (×10 <sup>6</sup> ) / 25 ng DNA
Fresh sample				
PrepM	2.00 ± 0.22	6.8 ± 0.8	0.7 ± 0.1	1128 ± 92
DNeasy Plant	1.44 ± 0.02	296.7 ± 34.3	29.7 ± 3.4	121 ± 32
G-Tip	1.73 ± 0.01	318.9 ± 18.4	31.9 ± 1.8	657 ± 276
Cold sample				
PrepM	1.83 ± 0.28	7.9 ± 0.6	0.8 ± 0.1	1581 ± 169
DNeasy Plant	1.42 ± 0.02	233.3 ± 17.1	23.3 ± 1.7	167 ± 43
G-Tip	1.73 ± 0.01	335.7 ± 9.0	33.6 ± 0.9	788 ± 143
Autoclaved sample				
PrepM	1.71 ± 0.09	75.0 ± 33.6	7.5 ± 3.4	126 ± 48
DNeasy Plant	1.55 ± 0.10	10.8 ± 7.0	1.1 ± 0.7	44 ± 21
G-Tip	1.75 ± 0.00	254.1 ± 24.4	25.4 ± 2.4	52 ± 13

平均 ± SD (n = 6)

この結果は、本来、PrepM がゲノム DNA を除き、環状 DNA を回収する方法であるためと考えられた。一方、高温高圧負荷した試料では、生試料と凍結試料に比べて他の 2 つの抽出法では DNA 回収量が低下する中、PrepM では DNA 回収量が増加し、定量 PCR による  $\beta$ -actin の検出でも他の 2 つと同等以上の検出が可能であった。

特定原材料であるエビ試料での検討：エビの凍結試料においても、PrepM は DNA 回収量が少ないが、OD260/280 比は良好であった (表 5)。また、定量 PCR による検出率も高かった。高温高圧負荷した試料では、PrepM では凍結試料に比べて DNA 回収量が増加したが、それ以外の抽出法では回収量が低下した。定量 PCR による抽出 DNA あたりの検出率はすべての DNA 抽出法で低下したが、PrepM の検出率は DNeasy Plant よりも高く、G-tip よりも若干低い程度であった。

表 5. エビ試料を用いた DNA 抽出法の検討

	260/280 ratio	DNA conc. (ng/μL)	DNA yield (μg)	Ct value / 2500 pg DNA
Cold sample				
PrepM	1.74 ± 0.35	2.3 ± 0.3	0.23 ± 0.03	18.7 ± 0.3
DNeasy Plant	1.72 ± 0.05	10.9 ± 6.1	1.09 ± 0.61	22.8 ± 0.6
G-Tip	1.65 ± 0.04	44.3 ± 13.3	4.43 ± 1.33	25.7 ± 0.3
Autoclaved sample				
PrepM	1.65 ± 0.03	21.0 ± 8.4	2.10 ± 0.84	30.3 ± 0.6
DNeasy Plant	1.27 ± 0.18	3.0 ± 0.3	0.30 ± 0.03	33.5 ± 1.2
G-Tip	1.64 ± 0.06	18.8 ± 11.3	1.88 ± 1.13	29.2 ± 0.5

平均 ± SD (n = 6)

まとめ：本研究で行った PrepM は、高温高圧負荷で劣化した DNA を簡便な操作で大量に回収でき、その回収した DNA に対する定量 PCR での検出率は他の DNA 抽出法と同等であることが分かった。

### < 引用文献 >

- 1) Hashimoto H et al., Annual Report of Chiba Institute of Public Health, 2005, 54, 53–57.
- 2) Yoshimura T et al., J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 2052–2059.
- 3) Nakamura K et al., Jpn. J. Food Chem. Safety, 2010, 17(2), 123–128.
- 4) Boom R et al., J. Clin. Microbiol., 1990, 28(3), 495–503.
- 5) Takabatake R et al., Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2013, 54(4), 309–315.

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Harikai N, Shinomiya K. Application of an alkaline and silica membrane DNA extraction method to detect mitochondrial DNA in foods. Food Analytical Methods, 査読有, 8, 2015, 1215-1224

DOI: 1.1007/s12161-014-0002-9

〔学会発表〕(計 2件)

張替直輝, 高田雄基, 四宮一総. 高温高压負荷で劣化したλDNA試料に対するPCR法と電気泳動法での検出率の違い. 日本分析化学会 第75回分析化学討論会, 2015年5月23日~2015年5月24日, 山梨大学甲府キャンパス(山梨・甲府)

張替直輝, 四宮一総. DNAの物理的劣化とPCR検出率低下との関連性に関する基礎的検討. 日本分析化学会 第74回分析化学討論会, 2014年5月24日~2014年5月25日, 日本大学工学部(福島・郡山)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/101/0010001/profile.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

張替 直輝 (HARIKAI, Naoki)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号: 9 0 4 5 4 7 4 3

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: