

技術レポート**6 DDGS からの DNA 抽出について**会田 紀雄^{*1}, 橋本 仁康^{*2}**1 緒 言**

DDGS (Distiller's Dried Grains with Solubles) は、トウモロコシを原料として燃料用エタノール (バイオエタノール) を生産する際に生じる副産物であり、米国、カナダ、EU 等では、従来から家畜用飼料として使用されてきた。

最近の石油価格の高騰、地球温暖化対策としての化石燃料からの代替え需要等からバイオエタノールの生産量が増加し、原料であるトウモロコシの供給が厳しくなっている。このため、我が国では、DDGS の飼料用への利用はあまり見られなかったが、トウモロコシの代替え原料として今後需要が伸びるものと考えられる。農林水産省生産局、消費・安全局作成「畜産をめぐる情勢について (平成 20 年 1 月)」によれば、米国からの DDGS の輸入量は 2006 年度には 42 千トンであったものが、2007 年度には 88 千トンになると予想している¹⁾。また、米国における DDGS の生産量は 2006 年に 8.6 百万トンであったが、2010 年には 36 百万トンになると予想されている²⁾。

DDGS は、非食用のバイオエタノール生産の副産物であるため、その原料となるトウモロコシについては必ずしも食用・飼料用の品種が使用されない可能性がある。特に、遺伝子組換えトウモロコシについては、食品又は飼料と異なり、消費者が忌避するような状況は考えにくく、よりバイオエタノール生産に適した品種 (系統) の作出が可能であるため、利用が拡大するものと考えられる。

一方、遺伝子組換えトウモロコシについては、近年、Bt10, Event32 等の安全性が確認されない系統の放出事故が散発している。また、米国以外での遺伝子組換え技術利用作物の開発も盛んになっており、今後日本の安全性確認システムを経ない品種が使用された DDGS が輸入される可能性がある。

そのため、DDGS から DNA を抽出する方法及びその抽出 DNA を用いて遺伝子組換えに関する品種 (系統) を検出できるか検討した。

試験は、農林水産省通知「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」別添 3 組換え DNA 技術応用飼料の検査方法 2.2. トウモロコシ (Bt10) の検査方法³⁾ (以下「通知法」という。) に準じて実施した。

2 試験方法**2.1 試料調製**

米国産 DDGS を遺伝子組換えトウモロコシと同様に 0.5 mm 網ふるいを全通するように粉碎した。ただし、粉碎する際には液体窒素を用いなかった。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、現 同仙台センター

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

2.2 試薬

1) 水

水は、超純水（比抵抗値 17 M Ω ·cm 以上に精製したもの）を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したもの。

2) 抽出キット

DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN 製）

3) DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold（Applied Biosystems 製）

4) プライマー対

トウモロコシ内在性遺伝子用 トウモロコシ内在性 DNA Zein オリゴヌクレオチド（Zein n-5' & 3', ニッポンジーン製（318-05671））

Bt11 検知用 GM トウモロコシ系統別 DNA Bt11-3 オリゴヌクレオチド（Bt11 3-5' & 3', ニッポンジーン（319-05461））

cp4 epsps 検知用⁴⁾ EPS011-5'（5'-gcc tgc tgt cgg aaa acc ct-3'）及び EPS011-3'（5'-ttc gta tgc gag agt tgc atc ttc-3'）を TE 緩衝液で 50 μ mol/L に希釈したものを等量混合したもの（合成はタカラバイオに依頼）

5) イソプロパノール（特級）

6) エタノール（特級）

7) TAE 緩衝液（pH 8.0）

50 倍 TAE（ニッポンジーン製）を超純水で 50 倍に希釈したもの。

8) アガロース

アガロースゲル S（ニッポンジーン製）3 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え、加温して溶かし、50~60°C に冷却させた後、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル成形型に流し込み、固化させた。

9) DNA サイズマーカー

100 bp DNA Ladder（宝酒造製）を用いた。

10) 臭化エチジウム溶液

エチジウムブロマイド溶液（10 mg/mL）（Bio-Rad Laboratories 製）を TAE 緩衝液で 10,000 倍に希釈したもの。

11) ローディングバッファー

100 bp DNA Ladder（宝酒造製）に付属のものを用いた。

12) Proteinase K

Proteinase K (>600 mAU/mL)（QIAGEN 製）を用いた。

13) 緩衝液等

AP1Buffer, RNase A, AP2Buffer, AP3/E Buffer 及び Buffer AW はキットに、10 \times PCR Buffer II, dNTPs（2 mM each）及び MgCl₂ 溶液（25 mM）は DNA ポリメラーゼに付属のものを使用した。

14) TE 緩衝液

ニッポンジーン製を用いた。

15) PCR 反応液

- i) Zein 及び Bt10 : 1 サンプルあたり, 水 13.24 μL , 10 \times PCR Buffer II 2.5 μL , dNTPs 2 μL , MgCl_2 溶液 1.5 μL , プライマー対 0.6 μL , DNA ポリメラーゼ 0.16 μL を混合したもの.
- ii) *cp4 epsps* : 1 サンプルあたり, 水 15.875 μL , 10 \times PCR Buffer II 2.708 μL , dNTPs 2.167 μL , MgCl_2 溶液 1.625 μL , プライマー対 0.5 μL , DNA ポリメラーゼ 0.125 μL を混合したもの.

2.2 試験方法

1) DNA 抽出

試料 1.0 g を 15 mL ポリプロピレン製チューブに量り, 予め 65°C に加温した AP1Buffer 5 mL, RNase A 10 μL 及び Proteinase K 60 μL をそれぞれ添加し, 以下通知法に従って抽出操作を実施した.

2) PCR 反応

1)で抽出した DNA 抽出原液について濃度を測定し, 水で正確に 10 倍に希釈した溶液 (以下「 $\times 10$ 溶液」という.) 及び DNA 濃度 10 ng/ μL の溶液を調製し, PCR 反応に用いるテンプレートとした. このテンプレートをトウモロコシ内在性遺伝子 (Zein) 及び Bt11 検知の場合は 5 μL , *cp4 epsps* 検知の場合には 2.5 μL を 100 μL のプラスチック製チューブに入れた PCR 反応液に加えて PCR 反応に供する試料液とした. また, 同時に, テンプレートに Zein の場合にはトウモロコシから抽出した DNA 溶液 (10 ng/ μL), Bt11 検知の場合には遺伝子組換えトウモロコシ Bt11 系統から抽出した DNA 溶液 (10 ng/ μL) 及び *cp4 epsps* 検知の場合には *cp4 epsps* 遺伝子が組み込まれていることが明らかな遺伝子組換えトウモロコシから抽出した DNA 溶液 (10 ng/ μL) を加えた反応液を調製し陽性コントロール (PC) とした. テンプレートの代わりに水を同量加えたもの及び陽性コントロールの反応液中のプライマー対を水に置き換えたものをそれぞれノーテンプレートコントロール (NTC) 及びノープライマーコントロール (NPC) とした.

調製した試料液, PC, NTC 及び NPC をサーマルサイクラー (Applied Biosystems 製 Gene Amp PCR System9700) にセットし, 以下の反応条件で PCR 反応を実施した.

PCR 反応条件

Zein 及び Bt11 系統 : 94°C, 10 分間 \rightarrow [94°C, 25 秒間 \rightarrow 62°C, 30 秒間 \rightarrow 72°C, 45 秒間] (40 サイクル) \rightarrow 72°C, 7 分間

cp4 epsps : 95°C, 10 分間 \rightarrow [95°C, 30 秒間 \rightarrow 60°C, 30 秒間 \rightarrow 72°C, 30 秒間] (40 サイクル) \rightarrow 72°C, 7 分間

3) 電気泳動, 染色及び画像解析

通知法に従って操作した.

3 結果及び考察

3.1 抽出法の検討

DDGS からの DNA 抽出に当たっては当初, 通知法がそのまま適用できるのではないかと考え, 最初に入手した DDGS 2 点について通知法に従い抽出したところ, 表 1 の結果が得られた.

表 1 従来抽出法による DNA 抽出液

試料名	採取量 (g)	(260-320)/ (280-320)	(260-320)/ (230-320)	濃度 (ng/μL)	絶対量 (ng)
19XA-1	1.02	1.963	0.815	66.25	3312.5
19XA-2	0.97	2.000	0.679	47.50	2375.0
19XB-1	1.03	1.875	0.259	18.75	937.5
19XB-2	1.02	2.250	0.209	11.25	562.5

通知法では、抽出できた DNA 量も少なく、精製度も良くなかった。

DDGS はトウモロコシのデンプンをアルコール発酵してアルコールを抽出した残渣であるので、トウモロコシに比べ、糖類が少なくタンパク質が多いと考えられる。このタンパク質が多いことが DNA 抽出に影響している可能性が考えられたため、最初のインキュベートの際に Proteinase K 60 μL を添加して抽出したところ、表 2 の結果が得られた。

表 2 改良法による DNA 抽出液

試料名	採取量 (g)	(260-320)/ (280-320)	(260-320)/ (230-320)	濃度 (ng/μL)	絶対量 (ng)
19XA-3	0.98	2.157	2.146	1011.25	50562.5
19XA-4	1.00	2.178	2.225	1913.75	95687.5
19XB-3	1.02	2.199	2.066	1575.00	78750.0
19XB-4	1.02	2.194	2.059	1791.25	89562.5

また、それぞれの抽出 DNA 溶液の紫外吸光スペクトルの例を図に示した。

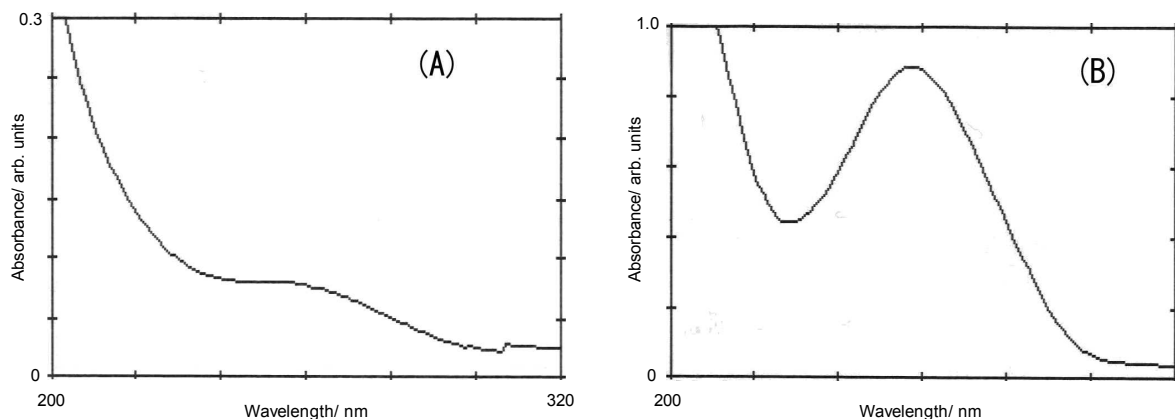


図 DDGS の DNA 抽出液の紫外吸光スペクトルの例

(A) 従来法による DNA 抽出液, (B) 改良法による DNA 抽出液

表 2 及び図 (B) のとおり DNA の抽出量及び精製度も良好であったため、当該方法を改良法として以後試験を実施することとした。

なお、Proteinase K の添加量については、同一試料を用いて 15 及び 30 μL についても試験を実施したが、60 μL の場合と大きな差は見られなかった。しかし、DDGS の品質にバラツキが大きいことが知られているため、今回の試験では余裕を見て添加量を 60 μL とすることとした。

3.2 PCR 反応

抽出した DNA で PCR 反応が可能であることを確認するため、トウモロコシ内在性遺伝子 Zein 及び米国で比較的一般的に栽培されているが栽培量が比較的少ないと考えられた遺伝子組換えトウモロコシ Bt11 系統について、PCR 反応を実施した。また、Bt11 系統が検出されなかった試料については、NK603 系統等米国で広く栽培されていると考えられる遺伝子組換えトウモロコシに導入されている *cp4 epsps* 遺伝子について PCR 反応を実施した。

また、通知法では、DNA 濃度を 10 ng/μL に調製した DNA 溶液を用いて PCR 反応を実施することとなっているが、DNA が損傷し断片化している可能性が考えられたため、抽出した濃度によらず、水で 10 倍に希釈した溶液についても PCR 反応を実施することとした。その結果を表 3 に示した。

表 3 DDGS 抽出 DNA の PCR 反応結果

遺伝子等 試料名	トウモロコシ内在性遺伝子			遺伝子組換えに係る遺伝子					
	Zein			Bt11			<i>cp4 epsps</i>		
	10 ng/μL	10倍希釈	20倍希釈	10 ng/μL	10倍希釈	20倍希釈	10 ng/μL	10倍希釈	20倍希釈
19XA	2/2	-	-	0/2	2/2	-	-	-	-
19XB	2/2	-	-	0/2	1/2	-	-	-	-
19XC	2/2	2/2	-	0/2	0/2	-	2/2	2/2	-
19XD	2/2	2/2	-	2/2	2/2	-	-	-	-
19XE	2/2	2/2	-	0/2	0/2	-	1/2	2/2	-
19XF	0/4	1/4	2/4	-	0/1	0/1	-	1/1	1/1
19XG	1/2	2/2	-	0/2	0/2	-	1/2	2/2	-
19XH	2/2	2/2	-	1/2	1/2	-	-	-	-

注：表中の分数は、分母が実施した点数を、分子が検出された点数を表している。「1/2」の場合、2点実施し1点検出されたことを表している。「-」は、試験未実施を表している。

平成 19 年度に収集した米国産 DDGS について改良法により抽出し、PCR 反応を実施したところ、Zein については試験した全ての試料で検出することができた。ただし、試料 19XF については、当初 2 点並行で分析を実施したところ、Zein を検出できなかつたため、再度 2 点抽出を実施したところ、1 点 10 倍希釈溶液で検出できた。この検出できた抽出 DNA 原液は、検出できなかったものに比べ抽出量が少なく、他の共存物質による妨害も考えられたため、水で 20 倍に希釈したものについても実施したところ、4 点中 2 点で検出できた（検出できた 2 点中 1 点は 10 倍希釈溶液でも検出できた。）。このため、以後の試験は、検出された溶液で濃度の高い方を用いることとした。

Bt11 系統については、8 点中 4 点で検出できた。なお、DNA 濃度 10 ng/μL の溶液では、8 点中 2 点でしか検出できなかった。

cp4 epsps 遺伝子については、Bt11 系統が検出できなかつた 4 点について実施し、全てで検出することができた。

以上の結果から、米国産 DDGS から DNA を抽出し、PCR 法により遺伝子組換えに係る遺伝子を検出することは可能であると考えられた。しかし、内在性遺伝子のように必ず含まれる遺伝子の検出が困難なものも存在し、DNA が大きく損傷しているものがあることも示唆された。

飼料の遺伝子組換え体に係る検査は、安全性が確認されていない系統に限られ、これらは事故等により環境中に放出され微量に存在する場合がほとんどである。例えば、Bt10 系統の場合の検出下限は 0.05%程度とされており、実際検査に使用する場合には、更に低濃度のものの検出が可能となるように、さらなる精製又は PCR 反応が不可能な断片の除去等を検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省HP : www.maff.go.jp/j/council/seisaku/tikusan/bukai/02/pdf/data5.pdf - 2008-02-04
- 2) 米国穀物協会HP : <http://www.grains.org/galleries/DDGS%20User%20Handbook/01%20-%20Introduction.ERE%20draft.pdf>
- 3) 農林水産省生産局長・水産庁長官通知：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について”，平成15年4月1日，14生畜第8598号（2003）.
- 4) Matuoka, T., KURIBARA, H., Takubo, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M. and HINO, H.: J. Agric. Food Chem., 50, 2100-2109 (2002).

謝 辞

試料の収集にご協力頂いた，飼料製造業者の皆様に謝意を表します。