

PCR法を用いた遺伝子組換え食品の検査

An Examination of Genetically Modified Foods with PCR Procedure

渡邊 節 佐々木 美江 山口 友美
後藤 郁男 畠山 敬 齋藤 紀行
白石 廣行*¹

Setsu WATANABE, Mie SASAKI, Yumi YAMAGUCHI
Ikuo GOTO, Takashi HATAKEYAMA, Noriyuki SAITO
Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：遺伝子組換え作物，PCR，DNA抽出

Key Words：Genetically Modified Organism，PCR，DNA extraction

遺伝子組換え食品の検出技術を確立するため、国の通知に準じて大豆粉末、豆腐、トウモロコシ粉末及びスナック菓子を対象に組換え遺伝子の検出を行うと共に、DNA抽出方法の検討を行った。その結果、安全性未審査食品においてもPCR（Polymerase Chain Reaction）法による定性感度は0.5%含有の検出が可能であった。また、シリカゲル膜法がCTAB（Cetyl trimethyl ammonium bromide）法に比較し食品の種類に関係なく高率に抽出可能であった。さらに、水分含量が多い豆腐や加工工程で精製、加熱、添加物等があるスナック菓子ではDNAを抽出する前に検体をエーテル処理することにより抽出量が増加することが明らかとなった。

1 はじめに

近年、遺伝子組換え技術を応用した作物が米国、カナダ等で栽培され、我が国でも遺伝子組換え作物及びそれらを原料とした加工食品が流通している。国では消費者の高い関心のなか、平成13年4月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、組換え食品等の安全性確認のシステムを作ると同時に、遺伝子組換え作物を使用した食品に関して表示制度を設けた。¹⁾平成13年3月には「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」を通知し²⁾、安全性未審査食品及び安全性審査済み食品の適正表示を確認するための検査方法を示した。

通知では安全性未審査食品検査はラテラルフロー法、定性PCR法、安全性審査済み食品検査ではELISA法、定量PCR法を用いるとされている。しかし、ラテラルフロー法やELISA法はタンパク質を検査対象とするため、材料を加工する間に物理化学的变化を受けた食品中の組換え体タンパク質の検出感度が低下すると考えられる。そこで我々は組換え遺伝子を増幅するPCR法を採用し、DNA抽出方法やDNA抽出前の処理方法について検討したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 検査対象検体

2.1.1 安全性審査済み食品

ラウンドアップ・レディ大豆（RRS）をそれぞれ5%、1%、0.5%、0%含有する大豆粉末4件及び市販の豆腐9件を検査対象とし、大豆粉末は1検体3点並行で、市販豆腐は1検体2点並行で検査を実施した。

2.1.2 安全性未審査食品

トウモロコシ粉末3件及び市販のトウモロコシ加工品（スナック菓子）10件を検査対象とし、トウモロコシ粉末は1検体のみ、スナック菓子は1検体2点並行で検査を実施した。

なお、スナック菓子はDNA抽出量が少なかった2検体と、多量にDNAが抽出できた1検体について、試料そのもの、前処理として5分間60℃の湯洗いを2回実施し遠心したもの、5分間60℃の湯洗いを2回実施後エーテルで油分を除去し遠心したもの、さらに試料をエーテル処理後遠心したものの4系列に分けてシリカゲル膜法を用いてDNA抽出を行い比較した。

2.2 DNA抽出法

大豆粉末、トウモロコシ粉末はそのまま2gを試料とした。豆腐はビニール袋内で均一にすり潰し、その2gを試料とした。スナック菓子はチョコレート等のコーティングがある部分を除去し120g秤量後粉碎し、うち2

* 1 現 財宮城県公衆衛生協会

g を試料とした。試料からのCTAB法並びにシリカゲル膜法によるDNA抽出手順を図1に示した。DNA量の算出は、DNA抽出液から10 μlを採り、精製水90 μlを加えて紫外線可視分光解析システム(ベックマン社 DU650)を使用し吸光度(10倍希釈)を測定した。OD260nm及びOD280nmの値からDNA濃度(OD260nm値 × 50 × 希釈倍率)及びDNA純度(OD260nm/OD280nm)を計算し、定性用として10ng/μlとなるように希釈して用いた。

2.3 遺伝子の検出法

2.3.1 大豆粉末・豆腐

DNA抽出液はレクチン遺伝子(Le 1-n02, Le 1-Taq)をプライマーとしてPCRを行い、大豆特有の内在性遺伝子を確認した後、組換え体遺伝子をP35S及びRRSプライマーを用いて検出した。PCRの反応液は通知に準じて1検体当たり10×PCR Buffer 2.5 μl, 2 mM dNTP mixture 2.5 μl, 25mM MgCl₂溶液 1.5 μl, 20 μM primer 5'溶液 0.25 μl, 20 μM primer 3'溶液 0.25 μl, Ampli Taq 0.125 μl, 精製水 15.375 μl, 試料DNA溶液 2.5 μl, 全量 25 μlで定性を行った。PCRは、95・10分反応後、95・30秒, 60・30秒, 72・30秒を1サイクルとして40サイクル増幅後、72・7分保った。PCR増幅反応液は2.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、DNA増幅バンドをエチレンブロミドで染色し、電気泳動パターンを確認した。

①CTAB法

- 粉砕試料
 - CTAB緩衝液
 - 55 30分放置 攪拌
- 均質化溶液
 - フェノール/クロロホルム混合液
 - 懸濁 7500 × g 15分
- 水層
 - クロロホルム/イソamilアルコール混合液
 - 懸濁 7500 × g 15分
- 水層
 - 等容量イソプロピルアルコール
 - 混和 7500 × g 10分 上清捨てる
- 沈殿
 - 70%エタノール
 - 7500 × g 1分
- 沈殿
 - 2 ~ 3分真空乾燥
 - TE緩衝液 混和後15分放置 混和完全溶解
 - RNaseA 37 30分
 - CTAB緩衝液
 - クロロホルム/イソamilアルコール懸濁
 - 7500 × g 10分 上清捨てる
- 水層
 - イソプロピルアルコール
 - 混和 7500 × g 10分 上清捨てる
- 沈殿
 - 70%エタノール
 - 7500 × g 1分
- 沈殿
 - 2 ~ 3分真空乾燥
 - 水50 μl

DNA抽出溶液

2.3.2 トウモロコシ粉末・スナック菓子

DNA抽出液はZEIN遺伝子(Zein n-5', Zein n-3')をプライマーとしたPCRを行いトウモロコシ特有の内在性遺伝子を確認後、通知に準じてCBH1st(CaM03-5', CBH02-3') CBH2nd(Cry9C-5', 35Ster-3')のプライマーで組換え遺伝子を検出した。以下は大豆と同様に行った。なお、内在性遺伝子を確認できなかった検体については組換え体の検出を行わなかった。

2.4 遺伝子のシーケンス

遺伝子組換え体豆腐について、RRSプライマーでPCRを行い、PCR生成物についての全塩基配列をシーケンス(パーキンエルマー社: 310 Genetic Analyser)を使用し、ダイターミネーター法で解析した。

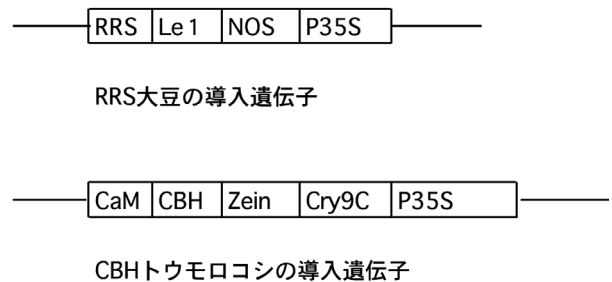


図2 遺伝子検出に用いたプライマーの位置

②シリカゲル膜法

- 粉砕試料
 - API緩衝液, RNaseAを加え混和
 - 65 15分
 - AP 2 緩衝液
 - 氷上 5分 3000 × g 5分
- 上清
 - 2回に分けて負荷
- QIAShredder spim column
 - 負荷毎10000 × g 4分
- 溶出液
 - 1.5倍量AP 3 緩衝液・エタノール
 - 混合液を数回に分けて負荷
- mini spin column
 - 1回の負荷毎に1000 × g 1分
 - 溶出液を捨てる
 - AW緩衝液を捨てる
 - 1回の負荷毎に1000 × g 1分
 - 溶出液を捨てる
 - mini spin columnを10000 × g 15分
 - 65 の水70 μlずつ負荷10000 × g 1分
 - 水を再度70 μl負荷

DNA抽出溶液

(厚生労働省 食発第110号通知より抜粋)

図1 試料からのDNA抽出法

3 結 果

3.1 PCR法の検知感度

遺伝子組換え体含有が5%、1%、0.5%及び0%と明確な検体についてPCR法で遺伝子の検出を実施した。図3にRRSプライマーを用いた結果を示した。遺伝子組換え体含有が0.5%以上の検体から検出が可能であり、DNA含有量に比例してバンドに濃淡が認められた。さらに、対象のDNA部位とPCR産物の塩基配列が同一であることはPCR産物のシーケンスを実施し、組換え部分と一致することを確認した。

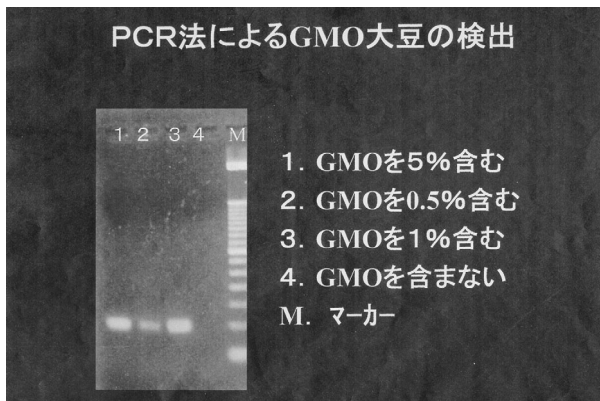


図3 PCR法による遺伝子組換え大豆の検出

3.2 抽出方法の検討

大豆粉末、豆腐、トウモロコシ粉末、スナック菓子からのDNA抽出をCTAB法及びシリカゲル膜法の2法で実施した結果を表1に示した。シリカゲル膜法ではすべての検体から抽出できたが、CTAB法では高濃度のDNA量が抽出できた検体がある一方、PCR法の検査に必要な10ng/μlを抽出できない検体もあった。

3.3 食品の組換え遺伝子検出

大豆粉末、豆腐、トウモロコシ粉末及びスナック菓子の組換え遺伝子検査をシリカゲル膜法とCTAB法の2法でDNAを抽出し実施した結果を表2、表3、表4、表5に示した。複数並行で行ったものは、一点でも検出した場合を組換え遺伝子陽性とした。はじめにDNA抽出溶液

が種特異性のある内在性遺伝子を含んでいることを確認し、次にそれぞれの組換え遺伝子用プライマーを用いて組換え遺伝子の検出を行ったが、豆腐検体番号1、2、3及び5から組換え遺伝子を検出した。また、スナック菓子の検体番号3、4及び10のCTAB法によるDNA抽出溶液からは、内在性遺伝子が2点とも確認できず組換え遺伝子検査はできなかった。それに対してシリカゲル膜法では2点中1点で内在性遺伝子が確認でき、組換え遺伝子検査が可能であった。確認できた検体からは安全性未審査食品のスターリンクは検出しなかった。

表2 大豆粉末の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3	4
CTAB法1	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
CTAB法2	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
CTAB法3	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
判 定		陽性	陽性	陽性	陰性
抽出方法	試料番号	1	2	3	4
シリカゲル膜法1	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
シリカゲル膜法2	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
シリカゲル膜法3	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
判 定		陽性	陽性	陽性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性

表1 抽出方法の比較

方法	検体名	検体数	DNA抽出範囲 (ng/μl)	平均抽出量 (ng/μl)	DNA純度
シリカゲル膜法	大豆粉末	12	47.9 ~ 94.1	71.9	1.96 ~ 2.54
	豆腐	18	19.3 ~ 62.7	42.1	1.76 ~ 1.98
	トウモロコシ粉末	3	63.7 ~ 68.9	66.8	1.76 ~ 1.82
	スナック菓子	20	21.2 ~ 88.1	45.1	1.28 ~ 1.64
C T A B 法	大豆粉末	12	60.2 ~ 218.6	137.3	1.71 ~ 2.34
	豆腐	18	3.8 ~ 35.2	14.9	0.71 ~ 2.78
	トウモロコシ粉末	3	38.8 ~ 55.9	49.9	1.51 ~ 1.77
	スナック菓子	20	10.1 ~ 183.5	67.6	0.91 ~ 1.70

表3 豆腐の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CTAB法1	Le1n02	+	+	+	+	/	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-	/	+	+	+	+
	RRS	+	+	+	/	/	-	-	/	/
CTAB法2	Le1n02	+	+	+	+	+	+	+		+
	P35S	-	-	-	-	-	-	-		-
	RRS	/	/	/	/	/	/	/		/
判定		陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
シリカゲル膜法1	Le1n02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P35S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RRS	/	/	/	/	/	/	/	/	/
シリカゲル膜法2	Le1n02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	RRS	+	+	+	/	+	/	/	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性 / : 検査不要

表4 トウモロコシ粉末の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3
CTAB法	ZEIN	+	+	+
	CBH1st	-	-	-
	CBH2st	/	/	/
判定		陰性	陰性	陰性
シリカゲル膜法	ZEIN	+	+	+
	CBH1st	-	-	-
	CBH2st	/	/	/
判定		陰性	陰性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性 / : 検査不要

3.4 DNA抽出前処理

スナック菓子ではDNAを抽出できない検体が多かったことから、スナック菓子4, 6, 8の検体を粉碎後湯洗いあるいはエーテル脱脂の前処理を行い、DNA抽出量の比較を検討した結果を表6に示した。スナック菓子4はコーン、植物油、砂糖、食塩のみの単純な油処理で作られており、原料そのままあるいはエーテル処理がDNA抽出に適していた。また、スナック菓子8はコーンの他ソース、チーズ、乳製品や魚肉エキス等の24種類、スナック菓子6はコーンの他、ソース、砂糖等10種類と多くの材料で作られていたが、エーテル処理することでDNA抽出量が増加する傾向が認められた。

表5 スナック菓子の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CTAB法1	ZEIN	+	+			+	+	+	+	+	
	CBH1st	-	-			-	-	-	-	-	
	CBH2st	/	/			/	/	/	/	/	
CTAB法2	ZEIN	+	+				+	+	+	+	
	CBH1st	-	-				-	-	-	-	
	CBH2st	/	/				/	/	/	/	
判定		陰性	陰性	/	/	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	/
抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
シリカゲル膜法1	ZEIN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	CBH1st	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CBH2st	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
シリカゲル膜法2	ZEIN	+	+	+		+	+	+	+	+	+
	CBH1st	-	-	-		±	-	±	-	-	-
	CBH2st	/	/	/		-	/	-	/	/	/
判定		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性 ± : 疑陽性 / : 検査不要

表6 前処理方法の比較

(ng/μl)

スナック菓子	前処理なし	湯洗い	湯洗い+エーテル	エーテル
No.4	32.3	4.5	3.7	28.8
No.6	35.1	82.7	16.8	41.0
No.8	15.8	17.1	10.1	25.4

4 考 察

市販品の遺伝子組換え食品の検出法の技術確立を目的として、大豆とトウモロコシを検査対象に組換え遺伝子検出を行った。組換え遺伝子検査には定性法と定量法が示されているが、今回我々は安全性未審査食品に対して用いられる定性法を行った。その結果、遺伝子組換え体の含有量が明確な大豆粉末において0.5%以上の検体から組換え遺伝子が探知でき、PCR法が安全性未審査食品の検査に有用であることが確認できた。このことから、今回検査した市販豆腐で「遺伝子組換え大豆は不使用」と表示されていた4件が陽性と確認されたことは、0.5%以上の組換え体含有があったと推測された。現在の表示記載は、遺伝子組換え農作物と非遺伝子組換え農作物を生産、流通及び加工の各段階で管理者が分別生産流通管理し、その旨を証明する書類を確認した上で行われている。この分別生産流通管理が適切に行われている場合は、意図しない混入があったとしてもおおむね5%以下とされている。今回、PCR法の検出感度は0.5%以上であったが、定性検査のため法律上規制を受ける5%を越え含有していたかは確認できなかった。海外依存の食品が増えている現状では、食の安全を確保するため定量検査を行い、適正表示を確認する必要があると思われる。

一方、トウモロコシ粉末及びスナック菓子では安全性未審査のスターリンクの遺伝子組換え体は検出されなかった。大豆粉末とトウモロコシ粉末は原料に近い形態で、DNAを大量に純度も高く抽出できたが、加工食品のスナック菓子での抽出は量及び純度も低い傾向であった。これは食品加工工程中の加熱、pH、油分、他のタンパク質等添加物によりDNA自体の断裂や消失、あるいはDNA抽出溶液に不純物が残存した結果と考えられた。そのた

め、遺伝子検出では食品からいかに高純度かつ高濃度のDNAを抽出するかが重要であると思われ、抽出効率を比較するため、通知のCTAB法とシリカゲル膜法の2法を検討した。

試料中のタンパク質を変性・除去後、DNAをエタノール析出し回収するCTAB法は、原料や原料に近い形状を示す試料からDNAを多量に抽出可能であった。しかし、検体間でのばらつきが大きいこと、加工品からの抽出量が少ないこと、有機溶媒を使用する上、手技が煩雑で長時間を要するなどの短所も認められた。

一方、シリカゲルメンブランにDNAを吸着させるシリカゲル膜法は、加工品においてもPCRを実施するに十分なDNA量が抽出可能であること、純度の高いDNAが抽出できること、抽出方法が簡便である等の長所があり、通常検査での有用性が示された。

次に、加工工程の多いスナック菓子では、シリカゲル膜法でもDNA抽出の効率が低いことから、粉碎後湯洗いやエーテル処理と脱塩、脱脂等添加物の除去を試みた。その結果多くの食材が使用されているスナック菓子の複合食品からのDNA抽出は、何らかの前処理が抽出量を増加させると考えられ、今後さらに検討する必要がある。

参 考 文 献

- 1) 平成12年3月31日付農林水産省告示第517号「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
- 2) 平成13年3月27日付食発第110号「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」