

遺伝子組換え食品検知法の検討

A Study of Detection Method of Recombinant DNA in Genetically Modified Foods

曽根 美千代 高橋 紀世子 大江 浩¹

Michiyo SONE, Kiseko TAKAHASHI, Hiroshi OOE

キーワード：遺伝子組換え食品，定性PCR，DNA抽出，加工食品

Key Words：Genetically Modified Foods，Qualitative PCR，DNAextraction，Processed Foods

大豆及びその加工品，じゃがいも加工品を対象に前処理及びDNA抽出方法等について検討を行った。その結果，PCR実施時ミネラルオイルを重層することにより，片栗粉を除く全検体から安定して内在遺伝子を検出できた。加工品から抽出されたDNAの電気泳動結果から，シリカゲル膜法はCTAB法に比べDNA抽出量が少ないが，短鎖域DNAの抽出割合は少なく，PCRによる目的のDNA配列の検出に有利であると思われた。

1 はじめに

平成13年4月より，食品衛生法上安全性未審査の遺伝子組換え食品及びこれを用いた食品の輸入・販売が禁止，安全性審査済みの5品目（大豆，とうもろこし，じゃがいも，菜種，綿実）については表示が義務づけられている。国では，公定法として平成13年3月に厚生労働省通知¹⁾及び平成13年4月に(独)農林水産消費技術センターの「JAS分析試験ハンドブック」²⁾を示し，それぞれ順次改訂を行っている。

渡邉ら³⁾は，平成13年度に本県県内流通加工品のモニタリング検査を開始するとともに，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定性PCR法による遺伝子組換え食品の検査について検討を行い，DNA抽出におけるシリカゲル膜法の有用性やスナック菓子の前処理におけるエーテル洗浄効果を報告した。

そこで今年度は，大豆及びその加工品，じゃがいも加工品を対象に試料の前処理とDNA抽出量の関係，DNA抽出液の電気泳動像の解析やPCRのパラッキ原因等基礎的な検討を行ったので報告する。

2 分析試料および試薬・機器

2.1 試料

- ・大豆1件及び大豆加工品17件（豆腐13件，凍り豆腐1件，きな粉1件，黒豆きな粉1件，大豆缶詰1件）
- ・じゃがいも加工品15件（片栗粉1件，マッシュポテト3件，スナック菓子（ポテトチップ含む）11件）
- ・遺伝子組換え大豆（ラウンドアップレディ）混入大豆粉末（平成13年度厚生科学研究試料）

* 1 現 生活衛生課

2.2 試薬

（抽出用）

- ・CTAB法：分子生物学用および試薬特級
- ・シリカゲル膜法：DNeasy plant mini kit（以下mini kit）（Quiagen）DNeasy plant maxi kit（以下Maxi kit）（Quiagen）（PCR用）
- ・Ampli Taq Gold&10×Gold buffer with dNTP（Applied Biosystems）
- ・大豆プライマー 対照用：Le1-n02 検出用：RRS - 01 確認用：P35S - 1
- ・ジャガイモプライマー 対照用：Pss 検出用：New leaf Y 検出用 確認用：Pvy-cp遺伝子検出用（各プライマーともニッポンジーン）（電気泳動用）
- ・アガロースS，エチジウムブロミド溶液（各々ニッポンジーン）
- ・DNAマーカー：50 Ladder（インビトロジェン），-Hind（BioLabs）
- ・その他試薬特級

2.3 機器

- ・サーマルサイクラー：ABI 9700（Applied Biosystems）
- ・電気泳動装置：Mupid - 21（アドバンス）

3 方法

3.1 前処理

大豆および凍り豆腐はグラインダーで粉末状に破碎後，一部をふるいにかけて，48mesh以上，48～100mesh，100～150meshの各々の粒径ごとに分取した。

豆腐は流水で軽く洗浄後ビニール袋に入れ手で均一に

押しつぶし、未処理、遠心分離後上清除去、滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去、滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去、凍結後遠心分離上清除去、凍結後滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去、凍結後滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去の7種類の前処理を行った。

大豆缶詰はフードカッターでペースト状にした。マッシュポテト、スナック菓子はビニール袋に入れ木槌で破碎した。スナック菓子の一部は、フードミキサーで破碎し、その一部を滅菌ミリQ水で洗浄後上清を除去した。きなこ、黒豆きなこ、片栗粉についてはそのまま使用した。

3.2 DNA抽出

公定法で使用する15ml、50mlチューブでの操作は作業効率が悪く、また現在所有する遠心機では十分な遠心力を与えられない。そこで試料採取量及び使用する試薬量等をスケールダウンし、その後の分離液も全量使用するなど、全行程を2mlマイクロチューブで実施できるようにマニュアルを変更した(図1)。なお、DNA抽出は1試料につき2点並行して実施した。

DNA濃度及びDNA純度の算出については、公定法に準じた。

3.3 PCR

PCR反応液は、PCR緩衝液をPCR Gold緩衝液に、MgCl₂の濃度を3.0mMから1.5mMに変更し、反応条件、その他については公定法に準じた。

大豆及びその加工品については、ラウンドアップレディ大豆を対象とし、検出用プライマーとしてRRS-01、確認用プライマーとしてP35S-1を用いた。ジャガイモ

加工品についてはNew leaf Yジャガイモを対象とし、プライマーは公定法に準じた。

3.4 電気泳動

PCR後、TBE緩衝液と3%アガロースゲルを用いて100V定電圧で電気泳動を行い、エチジウムブロミド液で染色し、その後蒸留水で軽く洗浄し、トランスイルミネーターにゲルをのせ、ポラロイドカメラによりDNAを確認した。DNAマーカーは50 Ladder(インビトロジェン)を用いた。

また、抽出したDNA原液について、TBE緩衝液と0.8%アガロースゲルを用い100V定電圧で電気泳動を行い、エチジウムブロミド液で染色し、その後蒸留水で軽く洗浄し、トランスイルミネーターにゲルをのせ、ポラロイドカメラによりDNAパターンを確認した⁴⁾。DNAマーカーは-Hind (BioLabs)を用いた。

4 結果及び考察

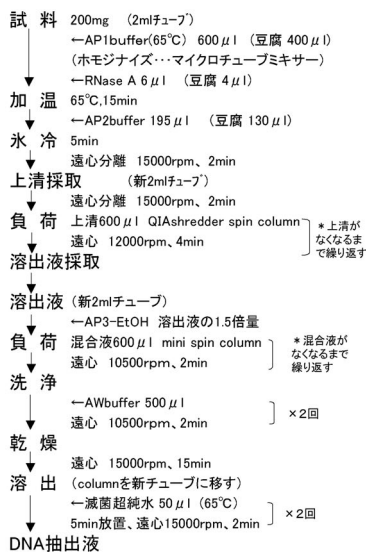
4.1 PCRのバラツキ

同じ試料を用いた繰り返し実験において、内在遺伝子の電気泳動像の検出バンドの濃淡が大きく変動する傾向が見られた(図2左)。PCR後のチューブを詳細に観察すると、チューブ内壁に微細な水滴が多数見られた。本法では反応液量が25µlと微量なため極少量の水分の蒸発がPCR増幅に影響し、バラツキの原因になったものと思われる。また、使用するPCRチューブの構造がメーカーにより微妙に違うためヒートブロックへの密着性が異なり、PCR増幅に影響したことも考えられた。

< CTAB法 >



< シリカゲル膜法(大豆およびその加工品) >



< シリカゲル膜法(ジャガイモ加工品) >

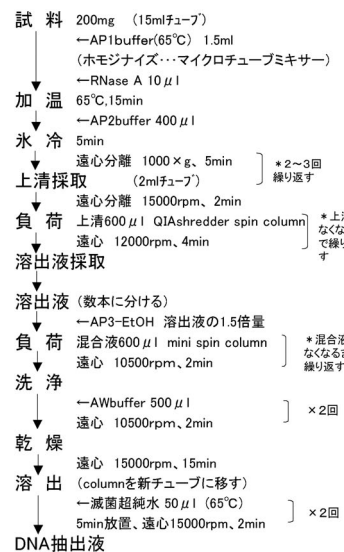


図1 DNA抽出法

このような水分蒸発を防止するために従来よりミネラルオイルを重層する方法がある。使用したサーマルサイクラーは上蓋も加熱するタイプであるため、通常ミネラルオイル重層は必要ないと考えられたが、今回、水分の蒸発が認められたことから、ミネラルオイル重層を適用したところPCR増幅が改善され、同一検体による電気泳動像の濃淡のバラツキもなくなった(図2右)。これにより、DNAが抽出された全検体について内在遺伝子の確認を安定して行うことができた。

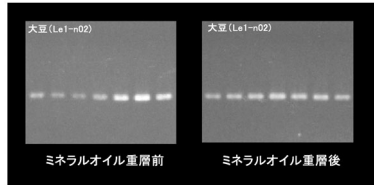


図2 PCRのバラツキの改善

なお、ゲルを電気泳動後エチジウムブロミド液で染色した後に蒸留水で洗浄することにより、染色液が除かれ明瞭な泳動像が得られた。

4.2 前処理

4.2.1 試料の粒径とDNA抽出量

国の通知によるELISA法では、試料の粉碎を粒径100mesh以下としているが、PCR法ではDNA抽出における試料粒径等の詳細な記述はない。効率よく抽出するためには粒径を小さくすることが有利と考え、試料の粒径とDNA抽出量について検討した。

ふるいを掛けないものを100%として粒径ごとのDNA抽出量を比較した(図3-1)。図から、CTAB法では大豆の粒径が小さくなるにつれ抽出量が120~130%と増加した。しかし、シリカゲル膜(mini kit)法では、48~

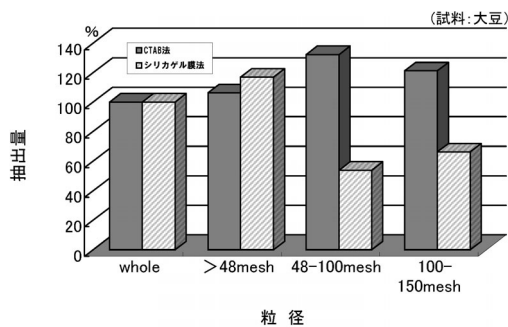


図3-1 DNA抽出量①(抽出法別)

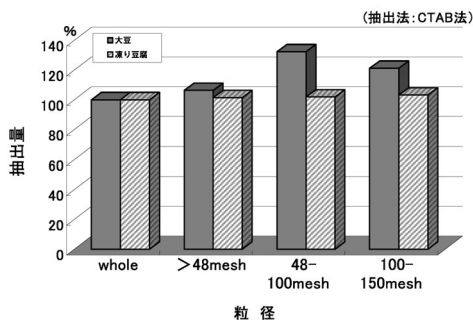


図3-2 DNA抽出量②(製品別)

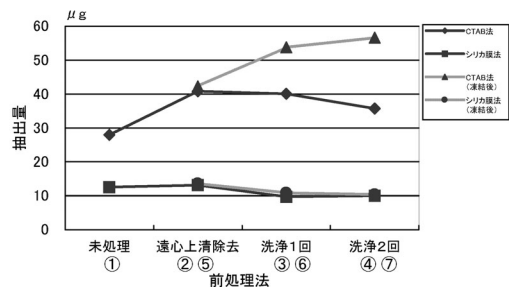
100mesh以下の粒径で60%前後に減少した。シリカゲル膜法の場合、この粒径の試料はAP3/EtOHの添加でゲル化し、ミニカラムに負荷した際、カラム上部にゲルが残り、シリカゲル膜まで抽出液が到達できないため、結果としてシリカゲル膜への吸着量が少なかったものと考えられた。

一方、加工品(凍り豆腐)については、CTAB法では粒径による差はなかった。これは、一度豆乳に加工されたものは均一化されており影響を受けないためと考えられた(図3-2)。従って、粉碎は48mesh程度で十分に抽出が可能であると考えられる。

4.2.2 豆腐の洗浄効果

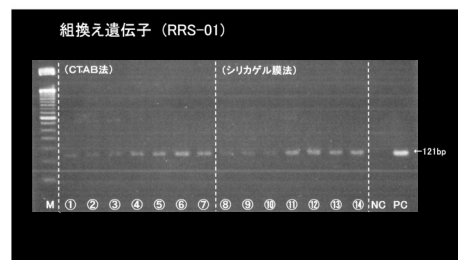
PCRに影響を与える恐れのある「にがり」等を除去するため、前処理として豆腐を押しつぶした後の洗浄(3.1に示す7種類)について検討した。図4には、それぞれ洗浄後のCTAB法、シリカゲル膜法によるDNA抽出量を示した。CTAB法では、未処理が最も少なく、洗浄遠心でより幾分増加したものの、凍結遠心、凍結洗浄遠心では明らかにDNA抽出量が増加した。これは凍結後の遠心で水分がより多く除去されたため、見かけ上DNA抽出量が増加したものと思われた。

一方、シリカゲル膜法では約10µgで洗浄による差がなかった。また、抽出されたDNAに対して行われたPCRの結果は、両方法とも2回以上洗浄したもの(図5の ~)で組換え遺伝子の電気泳動像が明瞭となった。



①未処理 ②遠心分離後上清除去 ③滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去 ④滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去 ⑤凍結後遠心分離上清除去 ⑥凍結後滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去 ⑦凍結後滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去

図4 豆腐の前処理別DNA抽出量



M: maker ① CTAB法未処理 ② CTAB法遠心上清除去 ③ CTAB法2回洗浄上清除去 ④ CTAB法凍結遠心上清除去 ⑤ CTAB法凍結遠心後上清除去 ⑥ シリカゲル膜法未処理 ⑦ シリカゲル膜法遠心上清除去 ⑧ シリカゲル膜法凍結遠心後上清除去 ⑨ シリカゲル膜法凍結遠心後2回洗浄上清除去 ⑩ シリカゲル膜法凍結遠心後2回洗浄上清除去 ⑪ シリカゲル膜法凍結遠心後2回洗浄上清除去 ⑫ シリカゲル膜法凍結遠心上清除去 ⑬ シリカゲル膜法凍結遠心後1回洗浄上清除去 ⑭ シリカゲル膜法凍結遠心後2回洗浄上清除去 NC: Negative control PC: Positive control

図5 豆腐の前処理別PCR結果

また、豆腐の製造工程で「にがり」として使用されるMg及びCa濃度を測定したが、両抽出法ともDNA抽出液中のMg濃度は1 ppm以下(表1)であり、PCR時に添加するMgCl₂の濃度に比べ無視できるものであると考えられた。

表1 豆腐洗液等のMgCa濃度

	Mg(ppm)	Ca(ppm)
豆腐浸漬液	155	246
遠心後上清液	101	132
1回洗浄上清液	101	127
2回洗浄上清液	36	36
CTAB法抽出液	< 1	4
シリカゲル膜法抽出液	< 1	6

4.2.3 その他の加工品

片栗粉は、加温操作の過程で糊状になり、十分なDNAの抽出ができなかった。スナック菓子は、油分については加温の際分離されるため除去でき、また洗浄、フードミキサーによる粉碎の前処理による差は見られなかったが、前処理の検討に使用したスナック菓子が塩分のみ使用していたことと豆腐の洗浄効果から考えると、添加物が多いものについては湯洗浄等が必要だと思われる。

4.3 加工品から抽出されたDNA(抽出量と電気泳動像)

大豆および大豆加工品、じゃがいも加工品のDNA抽出量を表2に示した。片栗粉を除き、試料採取等のスケールダウンを検討した方法でもDNAは十分量抽出でき、DNA純度も1.55~2.11と満足する結果が得られた。また、抽出方法の違いによるDNA抽出量は、きな粉類を除きCTAB法のほうがシリカゲル膜法に比べ2~10倍多かった。

大豆加工品のDNA抽出原液の電気泳動像を図6に示す。

加工品の製品による違いを比較すると、CTAB法及びシリカゲル膜法でほぼ同様な傾向が見られる。すなわち、加工されていない大豆はDNAの断片化は見られず長鎖側に太い一本のバンドとして確認できる。また、高温高压で加工されるきな粉や大豆缶詰はDNAが小さく断片化し短鎖側に短いスメア状の泳動像として確認できる。一方、70~100 程度で加熱加工される豆腐は凍り豆腐やきな粉、黒豆きな粉、大豆缶詰に比べDNAの断片化は少なく、比較的長鎖側のスメア状の泳動像が得られる。このように、DNA抽出原液の電気泳動像の違いにより加工品のDNA断片化(分解)の程度が推定でき、抽出されたDNAの評価指標の一つになるものと思われる。また、これらの加熱加工によるDNAの断片化は松岡らの納豆で検討した報告⁵⁾と同様の結果であった。

一方、抽出法による電気泳動像の違いについて比較すると、豆腐と黒豆きな粉については、CTAB法で長鎖域から短鎖域まで広範囲に分布しているのに対し、同試料

のシリカゲル膜法では、短鎖域、長鎖域それぞれで狭い範囲に分布しており、明らかに異なる。また、凍り豆腐と大豆缶詰については、分析に供したDNA量の違いが大きく明確ではないが、豆腐等と同様にシリカゲル膜法で短鎖域及び長鎖域のDNAの割合が少ないように見える。

従って、細かく断片化した短鎖域のDNAの割合はシリカゲル膜法よりCTAB法で多いと考えられ、相対的に標的配列域のDNA濃度が低くなると思われる。また、テンプレートとして使用するDNAは10ng/μlに濃度調整するため、短鎖域を含んだ抽出量の多さは相対的に希釈率を高め、目的の組換え遺伝子のPCRにうまく反映されにくいものと考えられる。以上のことから、DNA抽出法としてはシリカゲル膜法がより適していると考えられる。

図7は、シリカゲル膜法で抽出した加工品のPCR後の内在遺伝子の電気泳動像であるが、片栗粉を除く全検体で内在遺伝子が確認できた。

表2 大豆及び各加工品からのDNA抽出量

	CTAB法		シリカゲル膜法	
	抽出量(μg)	純度	抽出量(μg)	純度
大豆(50mg)	9.6~23	1.78~1.94		
大豆(200mg)	28~84	1.89~2.00	4.9~13	1.82~2.11
豆腐	13~36	1.78~1.92	5.0~11	1.78~1.93
凍り豆腐	110~180	1.72~1.90	24~51	1.89~1.92
きな粉	11~29	1.83~1.90	24~28	1.82~1.83
黒豆きな粉	22	1.88	18~20	1.8
大豆缶詰	38~43	1.92	2.3~2.6	1.55~1.86
片栗粉			0~0.3	1.67~6.00
マッシュポテト			1.2~2.4	1.88~2.10
スナック菓子			1.6~7.7	1.72~1.89

(サンプル量200mg)

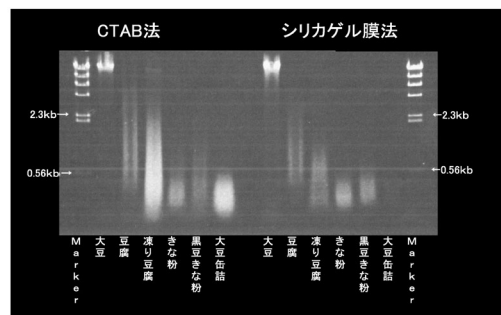


図6 DNA抽出原液の電気泳動像

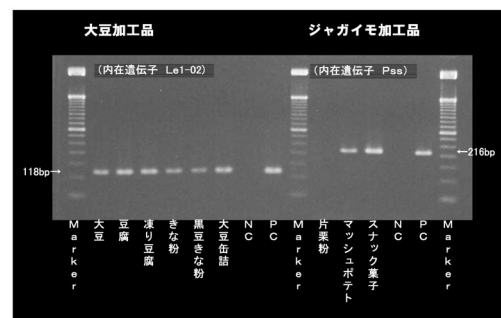


図7 各加工品の内在遺伝子のPCR結果

4.4 定性PCR検知感度の確認

既知濃度の遺伝子組換え大豆混入大豆粉末を使用し、定性PCRの検知感度を確認した。採取量を公定法の1/10量としたが、抽出液をミニカラムへ全量負荷することにより、0.5%濃度まで検出できた。試料を48mesh前後に破碎し十分混和することにより、サンプリング量のスケールダウンは可能だと思われる。

4.5 流通品の実態調査

検討した結果を基に市販の大豆加工品10件(豆腐10件)、じゃがいも加工品10件(マッシュポテト2件、スナック菓子8件)について流通品の試買検査を実施した。豆腐4検体から安全性審査済の大豆の組換え遺伝子RRSを検出した(表3)。その後の調査で、これらの製品は分別生産流通管理された外国産の大豆を使用していることがわかり、分別生産流通管理を実施しても非意図的混入はさけられないことが分かった。

また、ジャガイモ加工品については安全性未審査の組換え遺伝子New leaf Yは検出されなかった。

表3 豆腐の組換え遺伝子の検査結果
(対象組換え遺伝子：RRS)

	判定結果	表 示	国産大豆 使 用	外 国 産 大豆使用
豆腐1	陽 性			
豆腐2	陰 性			
豆腐3	陽 性			
豆腐4	陰 性			
豆腐5	陰 性			
豆腐6	陰 性			
豆腐7	陽 性			
豆腐8	陰 性			
豆腐9	陽 性	*		
豆腐10	陰 性			

：遺伝子組換え大豆使用せず
*：非遺伝子組換え大豆100%
：使用している

5 ま と め

- 1) ミネラルオイルの重層により、PCR増幅が改善され、DNAが抽出された全検体から内在遺伝子の確認が可能となった。
- 2) シリカゲル膜法ではDNAの抽出量は少ないが、短鎖域が相対的に抽出されにくいいため、PCRによるDNAの目的配列の検出が容易になる。これは他の豆加工品にも適用できるものと思われる。また、DNA原液の電気泳動により、加工品のDNA抽出液の断片化(分解)の程度が推定できる。
- 3) 組換え遺伝子を検出した豆腐4検体は、輸入大豆を使用しており、分別生産流通管理を実施しても遺伝子組換え大豆の非意図的混入はさけられないことが分かった。表示の妥当性を検討する上にも定量PCRによる分析が必要であると思われる。

(参 考 文 献)

- 1) 平成13年3月27日食発第110号厚生労働省通知「組換えDNA技術応用食品の検査法について」(平成15年6月18日最終改訂)
- 2) (独)農林水産消費技術センター：JAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」(平成14年6月20日最終改訂)
- 3) 渡邊節他：宮城県保健環境センター年報 20, 59~63 (2002)
- 4) 農林交流センター：第79・82回農林交流センターワークショップ「遺伝子組換え体の検知技術 農産物・食品からの定性・定量的検知法」
- 5) 松岡猛他：食衛誌. Vol 40, 2 149~157(1999)