

## 遺伝子組換え食品検知法の検討（第2報）

### A Study of Detection Method of Recombinant DNA in Genetically Modified Foods (II)

曽根 美千代 高橋 紀世子 佐藤 信俊

Michiyo SONE, Kiseko TAKAHASHI, Nobutoshi SATO

遺伝子組換え大豆の定量PCR測定におけるポリエチレングリコール処理は、短鎖長域のDNAを除去し、内在性遺伝子及び組換え遺伝子のコピー数を十分に確保できる有効な方法であることがわかった。定性PCR検査で陽性とされた豆腐及び大豆の遺伝子組換え体混入率は、非意図的混入として許容される5%を超えるものは無く、分別生産流通管理が正しく行なわれていることがわかった。

キーワード：遺伝子組換え食品；定量PCR；PEG処理

**Keywords** : Genetically Modified Foods ; Quantitative PCR ; PEG treatment

#### 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・販売が禁止され、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）については食品への表示が義務づけられている。また、これら安全性審査済みのものについては、分別生産流通管理されていれば混入率5%以下のものについては非意図的混入として許容することとされている。したがって、これら組換え遺伝子の定性試験で陽性となった場合、分別生産流通管理されていたかを確認すると共に、定量試験で混入率を測定し基準以下であることを確認する必要がある。

一方、DNAの抽出はこれまで検討してきたシリカゲル膜法（DNeasy plant mini kit）が大豆抽出において公定法から除外されたため<sup>1)</sup>他の方法に切替える必要が生じた。しかし、CTAB法による抽出では内在性遺伝子のコピー数が十分得られない場合があり、精度上の問題が生じた。

以上のことから、DNAの抽出・精製と定量PCRの精度等について検討すると共に、これまで実施した定性検査で陽性となった試料の定量検査を実施したので報告する。

#### 2 分析試料および試薬・機器

##### 2.1 試料

ラウンドアップレディ大豆混入大豆粉末（以下GMO大豆）4件、豆腐9件、輸入大豆（分別流通管理されたもの）4件、国産大豆1件、昨年度定性PCR陽性DNA抽出液（豆腐及び大豆粉末）9件合計27件を検査対象とした。

##### 2.2 試薬

（抽出用）

- ・CTAB 分子生物学用
- ・DNeasy plant mini kit (Quiagen)
- ・その他試薬特級（PEG処理用）
- ・ポリエチレングリコール8000（シグマ社）
- ・その他試薬特級（定量PCR用）
- ・TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems）
- ・大豆プライマー & プローブ：内在性遺伝子用：Le1-n02&Le1-Taq, 組換え遺伝子用：RRS-01&RRS-Taq（各々ニッポンジーン）
- ・検量線用標準液：GM大豆（RRS）プラスミドセット（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：λ-Hind III（BioLabs）, 50 Ladder（インビトロジェン）
- ・その他試薬特級

##### 2.3 機器

- ・定量PCR装置：ABI PRISM 7900HT（Applied Biosystems）
- ・電気泳動装置：Mupid-21（アドバンス）

#### 3 方法

##### 3.1 試料からのDNA抽出

試料からのDNA抽出は、当初シリカゲル膜法（DNeasy

plant mini kit) を用いたが、平成15年11月の厚生労働省通知<sup>1)</sup>以降はCTAB法を用いた。告示法によるCTAB法では、フェノール・クロロホルム抽出時の中間層が多く分取する上清が十分得られなかったため、松岡ら<sup>2)</sup>の方法と平成13年度厚生科学研究<sup>3)</sup>の方法をもとに平成14年度に著者らが改良したCTAB法<sup>4)</sup>で行なった。

平成14年度定性PCR検査で陽性だったDNA抽出液(豆腐及び大豆粉末)については、公定法に準じイソプロパノールを用いDNAを沈殿させ、70%エタノール溶液でリンスし、乾燥後TE溶液に溶解し、定量PCR試験用とした。

### 3.2 定量PCR

大豆の内在性遺伝子及び組換え遺伝子の対象プライマー対及びプローブは公定法に準じた。TaqMan Chemistryを応用した定量PCRを公定法のプロトコルに従いABI PRISM 7900HTで実施した(図1)。なお、遺伝子組換え体の混入率は、下記の式により求めた。

$$\text{遺伝子組換え体混入率(\%)} = \frac{\text{組換え遺伝子のコピー数}}{\text{内在性遺伝子のコピー数}} \times \frac{1}{\text{内標比}} \times 100$$

### 3.3 電気泳動

抽出したDNA液について、平成14年度と同様に0.8%アガロースゲルを用い、50V定電圧電気泳動を行いDNAパターンを確認した<sup>5)</sup>。DNAマーカーはλ-Hind III (BioLabs)を用いた。

### 3.4 PEG処理によるDNAの再精製

CTAB法で抽出したDNA液の短鎖長域のDNA断片と残存するRNAを除去するためポリエチレングリコール(以下PEG)によるDNAの再精製<sup>6)</sup>を行なった。すなわち、抽出したDNA溶液に等量のPEG溶液(1.6M NaCl含有)を加え、4℃で1時間放置しDNAを共沈させる。その後4℃で15,000rpm、20分冷却遠心しDNAをペレット状に沈殿させ、70%エタノールでリンスし、上清除去後乾燥させTE溶液に溶解し、DNA再精製液とした(図2)。

## 4 結果及び考察

### 4.1 内在性遺伝子のコピー数と検出下限

検出下限値を0.1%とした場合、組換え遺伝子のコピー

数を検量線作成に使用する標準プラスミド液の下限値の20コピーとすると、理論上内在性遺伝子は20,000コピー必要となる<sup>7)</sup>。しかし、実際には数10コピーとなることがあり、この場合、検出下限値を上げることになり、精度上問題が生じる。特に二度挽きした大豆及び凍結した検体において激減した。

また、定量PCRではDNA濃度を20ng/μlに調整するが、CTAB法によるDNA抽出液では抽出量が多い検体で測定された内在性遺伝子のコピー数が低くなる傾向が見られた。

したがって、安定した検査結果を得るためには内在性遺伝子のコピー数を高める必要がある。

### 4.2 DNA抽出液の鎖長とPEG処理

これらのDNA抽出液について電気泳動を行うと長鎖長域側のバンドだけでなく短鎖長域側にもスメア上のバンドが見られた(図4のPEG処理前の電気泳動像)。これらは壊れたDNA断片や残存するRNAと考えられた。この短鎖長域のDNA断片と残存するRNAの混入を防ぐためシーケンス用のプラスミド精製に用いられるPEG処理<sup>6)</sup>を用いDNAの再精製を試みた。

PEGはDNAの水和水を奪うことでDNA分子の凝集を促進し沈殿させる。また、RNAはDNAに比べリボース2位の水酸基分だけ親水性が高いため凝集されずに除去されると考えられている<sup>6)</sup>。

図3にDNAマーカーの50ラダーを試料としてPEGの濃度を変えてPEG処理を行ったDNA液の電気泳動像を示す。第1レーンのDNAマーカーに対して第2レーンのPEG13%濃度では500bp以下の小さい短鎖長域のDNAが、第3、第4レーンのPEG10%及び8.7%濃度では800bp以下のDNAが除去されていることがわかる。ラウンドアップレディー大豆の内在性遺伝子(Le1-n02)のDNA増幅長は118bp、組換え遺伝子(RRS-01)のDNA増幅長は121bpであり、これ以下の短鎖長域のDNAはPCRによる増幅には直接関係しない。

また、試料の前処理や抽出によりDNAの切断部位が様々であると推測されるので、ターゲットとなる増幅鎖長域を確保するにはある程度以上の長さが必要である。豆腐のDNAはおよそ500bp以上の鎖長域であったことが

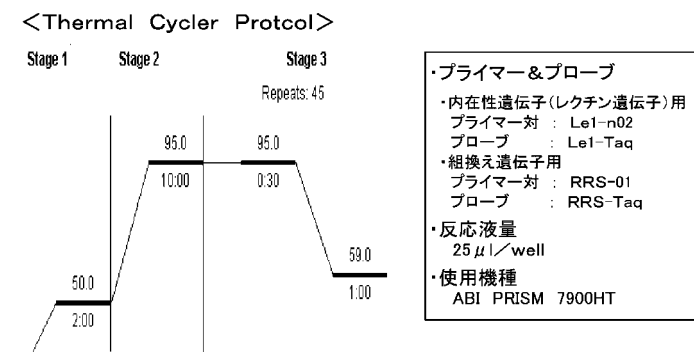


図1 定量PCR条件

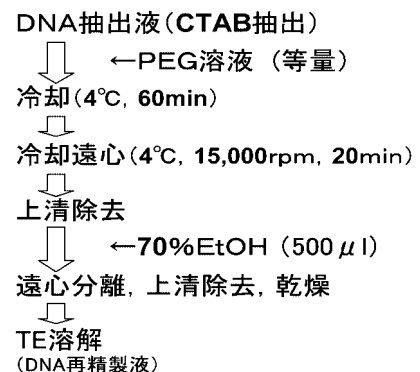


図2 PEG処理

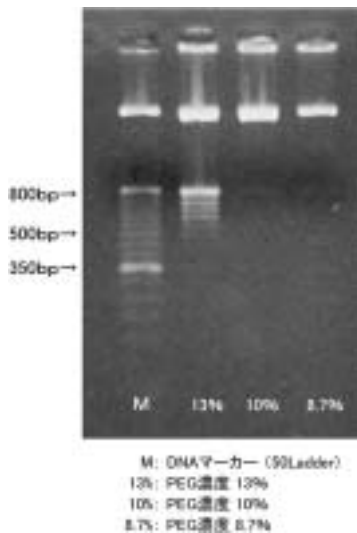


図3 PEG処理後のDNA

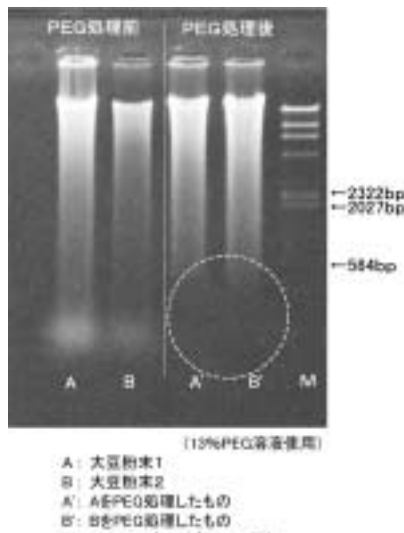


図4 PEG処理前後の電気泳動像

表1 PEG処理前後の内在性遺伝子のコピー数の変化

No.	前	後	試料
1	16580	112719	GMO大豆50mg
2	18462	87559	GMO大豆50mg
3	19325	78611	GMO大豆50mg
4	1513	83864	GMO大豆100mg
5	137	87416	GMO大豆100mg
6	465	78818	GMO大豆100mg
7	58	87482	GMO大豆100mg
8	40	69006	GMO大豆100mg
9	77	110827	GMO大豆100mg
10	38	151252	GMO大豆100mg
11	67	79197	原材料大豆100mg
12	8013	93300	原材料大豆100mg
13	63	83605	原材料大豆100mg
14	6384	49914	豆腐200mg
15	987	46523	豆腐200mg
16	539	27571	豆腐200mg
17	292	33890	豆腐200mg
18	661	33742	豆腐200mg
19	1071	61978	豆腐200mg
20	2077	28564	豆腐200mg
21	180	53638	豆腐200mg
22	472	36939	豆腐200mg

表2 GMO大豆による繰返し試験

GMO混入率(%)	組換え遺伝子コピー数	内在性遺伝子コピー数	測定値(%)				相対値	H13年度厚生科学研究報告(%)
			AVE	SD	C.V%	n		
5.0	4049	83071	4.69	0.51	11	8	0.94	5.01±1.00
1.0	936	93971	1.03	0.43	42	6	1.03	1.14±0.41
0.5	378	83249	0.44	0.09	21	8	0.88	0.63±0.30
0.1	72	84558	0.08			1	0.82	

ら、500bp以下の短鎖長域のDNA断片を除去できる13%濃度のPEG溶液を用いることにした。

4.3 PEG処理による定量PCRへの影響

図4に大豆のPEG処理前後のDNA抽出液の電気泳動像、表1にPEG処理前後の定量PCRによる内在性遺伝子のコピー数の変化を示す。図4の電気泳動像ではおよそ500bpより小さい短鎖長域側DNAが除去されていることがわかる。また、表1ではPEG処理により内在性遺伝子のコピー数が大幅に改善され、大豆で70,000~150,000コピー、豆腐で30,000~60,000コピーまで増加し、PCRの増幅が効率よく行なわれていることがわかる。

4.4 混入率既知試料による繰返し精度

表2に平成13年度厚生科学研究で配布された混入率既知のGMO大豆を用いた定量PCRの繰返し試験の結果を示す。いずれもCTAB法で抽出されたDNA液をPEG処理し、定量PCRを実施したものである。内在性遺伝子のコピー数が90,000コピー前後まで増加し、0.1%混入試料の組換え遺伝子のコピー数も72コピーとなり20コピーを超えている。測定した混入率も表示値に近似し、表示値に対する相対値は0.82~1.03となり、低濃度域でも良好な結果であった。また、C.V.%は11~42%で、低濃度試料で大きくなる傾向が見られたが、同一試料を用いたH13年度厚生科学研究報告<sup>3)</sup>の結果とほぼ同様であった。このようにPEG処理によるDNAの再精製は、CTAB法

で抽出される短鎖長域のDNA断片や残存するRNAを除去し、ターゲット域のDNAを確保するのに有効と考えられた。

4.5 実態調査

過去2年間の定性PCR検査で陽性だった豆腐検体と原材料の大豆について定量PCRを実施した結果を表3、表4に示す。

定性PCR検査陽性だった豆腐検体の遺伝子組換え体混入率は0~0.38%であり、その原材料の大豆についての遺伝子組換え体混入率も0~0.48%であった。義務表示となる5%を超えるものは無く、全て意図しない混入として許容される範囲内であり、分別生産流通管理が正しく行なわれていることが示唆された。

表3の豆腐9は、定性検査で陽性であったが、定量PCRでは組換え遺伝子のコピー数が1コピーと20コピー未満であることから不検出とした。一方、原材料大豆は表4に示すように2種類の大豆(大豆5,6)を使用しており、カナダ産の大豆6から組換え体が微量に検出された。したがってこの違いは、試料のバラツキや定性検査と定量検査の感度の差によるものと考えられる。

また、国産大豆使用と明記されていた豆腐11から組換え遺伝子RRSが検出され、原材料の大豆7からは検出されなかった事例があったが、その後の調査によりこれは、作業工程で外国産大豆と国産大豆の製品切換え時に十分

表3 遺伝子組換え食品定量結果①(豆腐)

(抽出:CTAB法)

No.	定性PCR結果	組換え遺伝子コピー数	内在性遺伝子コピー数	遺伝子組換え体混入率(%)	表 示
豆腐1	+	51	29638	0.16	非遺伝子組換え
豆腐2	+	34	32505	0.10	非遺伝子組換え
豆腐3	+	111	29975	0.35	非遺伝子組換え
豆腐4	+	32	28897	0.11	非遺伝子組換え(100%)
豆腐5	+	35	32935	0.10	非遺伝子組換え
豆腐6	+	68	26161	0.25	非遺伝子組換え
豆腐7	+	33	43916	0.07	
豆腐8	+	84	34263	0.23	非遺伝子組換え
豆腐9	+	1	67566	0.00	非遺伝子組換え
豆腐10	+	130	33065	0.38	非遺伝子組換え
豆腐11	+	46	18426	0.24	非遺伝子組換え 国産大豆使用
豆腐12	+	106	52286	0.20	非遺伝子組換え

表4 遺伝子組換え食品定量結果②(原材料大豆)

No.	組換え遺伝子コピー数	内在性遺伝子コピー数	遺伝子組換え体混入率(%)	原産地	対応する豆腐検体	抽出法
大豆1	115	102075	0.11	アメリカ	No.3	DNeasy plant mini kit法
大豆2	115	97122	0.11			
大豆3	438	95344	0.44		No.4	
大豆4	192	38440	0.48			
大豆5	0	93300	0.00	中国	No.9	CTAB法+PEG処理
大豆6	43	83605	0.05	カナダ		
大豆7	0	79197	0.00	日本		

な洗浄をしないまま同じ機械を使用したことによる製造ラインでのコンタミによるものであることがわかった。このように加工品の場合、原材料大豆の流通過程だけでなく製造工程による組換え体の混入もあり得るため製造業者への十分な指導が必要だと思われる。

## 5 ま と め

- 1) CTAB法ではDNA抽出量が多いが、定量PCRを実施するためにはDNAの再精製が必要であると思われる。
- 2) PEG処理後の定量PCR検査では、各々の遺伝子のコピー数が増加し、GMO混入大豆の測定値も表示値に近似し、相対値も0.82~1.03であった。PEG処理によるDNA再精製は、CTAB法で抽出される短鎖長域のDNA断片や残存するRNAを除去し、ターゲット域のDNAを確保するのに有効と考えられた。
- 3) 定性PCR検査陽性だった豆腐検体の遺伝子組換え体混入率は0~0.38%、原材料大豆の遺伝子組換え体混入率は0~0.48%と、非意図的な混入として許容される5%以内であり、分別生産流通管理が正しく行なわれていることが示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査法について(一部改正)”平成15年11月13日、食安発第1113001号(2003)
- 2) 松岡 猛, 川島よしみ, 穂山 浩, 三浦裕仁, 合田幸弘, 瀬畑 環, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 食品衛生学雑誌, 40(2), 149(1999)
- 3) 杉田 隆博: 平成十三年度厚生科学研究費補助金健康科学総合研究事業報告書 地方衛生研究所の地域における健康危機管理のあり方に関する研究, 27(2002)
- 4) 曾根 美千代, 高橋紀世子, 大江 浩: 宮城県保健環境センター年報, 21, 70(2003)
- 5) 農林交流センター: 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 第90回農林交流センターワークショップ 第48回食品技術講習会(2003)
- 6) 中山 広樹, 西方敬人: バイオ実験イラストレイテッド②, p.23(1995)(秀潤社)
- 7) 杉浦 義紹, 伊藤光男, 大石英明, 奴久妻総一, 田中敏嗣: 第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p.86(2003)