

リアルタイム PCR を用いた 大豆および豆腐における組換え遺伝子の定量相関

内山亜喜子・赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

Correlation Between Genetic Modification of Soybean and Tofu by Real-time PCR

Akiko UCHIYAMA, Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

遺伝子組換え大豆の検査法は、穀粒大豆はリアルタイム PCR による定量検査、加工食品は PCR および電気泳動による定性検査である。豆腐はその原料がほぼ大豆であるため、原料大豆と同じ定量結果が得られると考えられるが、広範囲な遺伝子組換え大豆含有率における原料大豆と豆腐の相関調査の報告は少ない。そこで、遺伝子組換え大豆であるラウンドアップ・レディ大豆 (Roundup ReadyTM Soybean, 以下 RRS) と非遺伝子組換え大豆を混合調製した大豆および豆腐について、リアルタイム PCR を用いて組換え遺伝子含有率を定量検査した結果、組換え遺伝子含有率 0.05 ~ 100% において、相関係数 $r^2=0.99$ と良好な結果が得られた。

Key Words: 相関 correlation, リアルタイム PCR real-time PCR, 遺伝子組換え genetic modification, ラウンドアップ・レディ大豆 Roundup ReadyTM Soybean, 豆腐 tofu

1 はじめに

近年、遺伝子組換え食品および食品添加物の開発・実用化は国際的にも急速に広がり、今後さらに新しい食品の開発が進むことも予想される。そこで、平成 12 年 5 月 1 日厚生省告示第 232 号¹⁾により、食品衛生法の規格基準が改正され、遺伝子組換え食品の安全性審査が義務化された。これにより、平成 13 年 4 月 1 日から安全性未審査の遺伝子組換え食品は、輸入および販売等が法的に禁止されることとなった。また、安全性審査済み遺伝子組換え食品は表示規制の対象となり、分別生産流通管理が適切に行なわれたものについては、遺伝子組換え食品の「5%以下の意図せざる混入」まで認められている。

日本の大豆自給率は 5%前後と低く、遺伝子組換え食品の中で最も輸入量が多い。その大半は、害虫耐性遺伝子を持つ RRS である。福岡市では、市内で流通している

穀粒大豆の組換え遺伝子定量検査を実施しているが、保健所の要望により、非遺伝子組み換え大豆から製造された市販の豆腐 4 検体について、組換え遺伝子定性試験を行った結果、全て RRS 陽性であった。遡り調査により入手した原材料の穀粒大豆を定量検査したところ、定量下限以下ではあるが組換え遺伝子を検出した。

大豆加工品である豆腐は原料のほとんどを大豆が占めるため、原料の穀粒大豆と同様の定量結果が推測されるが、意図せざる混入の基準である RRS 含有率 5%以下を含む 100%までの広範囲な含有率については相関調査の報告がない²⁻⁴⁾。そこで、RRS と非組換え遺伝子大豆を用いて、RRS 含有率 0.05 ~ 100%の重量比で混合調製した大豆およびそれを原料として調製した豆腐について、RRS 定量検査をおこない、その相関を調べたので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

RRS（カナダ産，組換え遺伝子含有率 100%）
非遺伝子組換え大豆（国産）
ともに福岡市内で入手し，事前に RRS 含有率を確認

2.2 使用機器

分光光度計：ND-1000，NanoDrop Technologies, Inc
リアルタイム PCR：ABI PRISM 7900HT，Applied Biosystems 社

2.3 試薬等

DNA 抽出キット：DNeasy Plant Mini Kit（大豆）および Genomic-tip 20/G（豆腐），QIAGEN 社

プラスミド：GM 大豆プラスミドセット-ColE1/TE-，（株）ニッポンジーン

プライマーおよび TaqMan Probe：大豆内在性遺伝子（Le1）検知用および RRS specific 検知用，（株）ニッポンジーン

TaqMan Universal PCR Master Mix：Applied Biosystems 社

Proteinase K および RNase A 溶液（100mg/mL）：QIAGEN 社

グルコノ-δ-ラクトン：特級，関東化学（株）

TE 緩衝液：遺伝子工学研究用，（株）ニッポンジーン

2.4 試料調製

2.4.1 大豆

RRS250g および非遺伝子組換え大豆 850g をそれぞれ粉砕機を用いて粉砕した。

表 1 のとおり粉砕器用容器に RRS 粉末をはかり取り，非遺伝子組換え大豆粉末を加えて 100g とし，再度粉砕および混合して調製した。

2.4.2 豆腐

混合調製した各大豆粉末 50g をビーカーに量り取り，超純水 150mL を加えて 1 時間静置した。あらかじめ沸騰させた超純水 200mL に加え，強火で加熱し焦げ付かないように攪拌した。沸騰したら弱火にし 8 分間焦げ付かないように攪拌した。遠心（3000rpm，20 分）した後，分取した上清にグルコノ-δ-ラクトン 1g を加えて軽く攪拌し，室温で静置，凝固させて調製した。

2.5 DNA 抽出および精製

大豆および豆腐は，各キットに添付された操作方法に基づき，DNA 抽出および精製をおこなった。なお，全て 3 並行でおこなった。

分光光度計を用い，200～320nm の範囲で DNA 試料原液の紫外吸収スペクトルを測定した。260nm の吸光度 ABS1.0 を 50ng/μL DNA として DNA 濃度を算出した。また，230nm，260nm および 280nm の吸光度（O.D.230，O.D.260 および O.D.280）から精製度（O.D.260/O.D.280）が 1.2～2.5 であることおよび不純物としてのタンパク量（O.D.230）を確認した。なお，DNA 試料原液を TE 緩衝液で希釈し，20ng/μL の濃度に調製したものを DNA 試料液とした。

2.6 リアルタイム PCR

PCR 反応液の組成は，厚生労働省通知食安発第 0618001 号⁵⁾に基づいて調製した。

PCR 反応は，50℃ で 2 分，95℃ で 10 分加熱した後，45 サイクル（95℃，30 秒→59℃，1 分）の条件でおこなった。なお，全て 3 ウェル並行でおこなった。

2.7 データ解析

結果解析については，JAS 分析試験ハンドブックおよび組換え DNA 技術応用食品の検査に関わる実地技術研修会の実験マニュアルに準拠した。

3 結果および考察

3.1 DNA 抽出

DNA 試料原液の各 DNA 濃度は，大豆穀粒 38.3～58.6 ng/μL，豆腐 68.6～96.5ng/μL とそれぞれ良好であった。

豆腐製造の過程である豆乳調製について，綿布製こし袋による搾取方法と遠心分離による上清採取方法を検討したところ，抽出 DNA 濃度に差はみられなかった。また，豆腐凝固剤による DNA 抽出阻害について，グルコノラクトン添加前の豆乳および添加後の豆腐を比較検討したところ，抽出 DNA 濃度に差はみられなかった。これらのことから，遠心分離によって得られた上清採取による豆乳の調製および凝固剤添加により，豆腐の調製をおこなうこととした。

表1 試料の遺伝子組換え大豆混合割合

	混合試料(g)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RRS	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00	10.0	25.0	50.0	100.0
非遺伝子組換え大豆	100.0	99.95	99.9	99.5	99.0	95.0	90.0	75.0	50.0	0.00

3.2 豆腐の定量検査

大豆と同条件におけるリアルタイム PCR を用いた定量検査が可能か検討するため、本試験と同様の方法を用い、市内で入手した 2.4% 遺伝子組換え大豆および組換え遺伝子含有率 50% に調製した大豆粉末から豆腐を調製し、予備試験をおこなった。DNA 試料原液の濃度はそれぞれ 24 ~ 60 ng/μL と良好であったため、対照試験として市販の非遺伝子組換え大豆使用豆腐を用い、リアルタイム PCR による定量検査をおこなった。その結果、2.4% 遺伝子組換え大豆から調製した豆腐は 1.1 ~ 3.2%、組換え遺伝子含有率 50% の大豆粉末から調製した豆腐が 43 ~ 55% であり、大豆と同条件でのリアルタイム PCR による定量検査が可能であると判断した。

3.3 定量結果の相関

大豆および豆腐のリアルタイム PCR による定量検査結果を表 2、相関を図 1 に示す。大豆と豆腐の組換え遺伝子含有率には $r^2=0.99$ と相関がみられた。組換え遺伝子含有率別でも、意図せざる混入の基準である 5% 以下および中西らの報告⁴⁾ にはない 5 ~ 100% において、ともに $r^2=0.99$ と相関関係がみられた。また、大豆と豆腐の組換え遺伝子含有率を比較したところ、豆腐は大豆の約 2 分の 1 であり、DNA 抽出方法や豆乳調製時の残渣などが影響していると推察された。

表2 大豆の混合比とリアルタイムPCRの定量結果 (n=3)

		単位 %					
RRS 混合比		大豆	豆腐	大豆	豆腐	大豆	豆腐
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.05	0.07	0.04	0.08	0.04	0.07	0.03
3	0.10	0.20	0.07	0.16	0.07	0.15	0.07
4	0.50	0.79	0.37	0.51	0.35	0.54	0.31
5	1.00	1.22	0.69	1.15	0.73	1.23	0.62
6	5.00	6.73	2.97	5.46	2.82	5.69	3.04
7	10.0	12.5	6.02	11.5	6.04	11.7	5.67
8	25.0	29.0	13.6	26.7	14.1	24.4	13.9
9	50.0	58.3	27.4	54.3	26.9	53.0	27.0
10	100.0	101.5	46.6	95.7	41.4	94.2	46.6

数値は3ウェルの平均値

4 まとめ

RRS と非遺伝子組換え大豆を混合調製した大豆および豆腐について、リアルタイム PCR を用いて組換え遺伝子含有率を定量検査した結果、組換え遺伝子含有率 0.05 ~ 100% において、相関係数 $r^2=0.99$ と良好な結果が得られた。また、意図せざる混入の基準である 5% 以下および報告のない 5 ~ 100% においても、ともに $r^2=0.99$ と相関関係がみられた。

文献

- 1) 厚生労働省告示第 232 号：食品、添加物の規格基準の一部改正，平成 12 年 5 月 1 日
- 2) 扇谷陽子，他：ラウンドアップ・レディ大豆の定量 PCR による含有率測定，札幌市衛研年報，31，41 ~ 47，2004
- 3) 扇谷陽子，他：植物性たん白使用食品における遺伝子組換え大豆挿入遺伝子の検出状況，札幌市衛研年報，33，50 ~ 56，2006
- 4) 中西希世子，他：大豆加工食品の製造過程におけるラウンドアップ・レディ大豆の定量，全国衛生化学技術協議会年会講演集，47，124 ~ 125，2010
- 5) 厚生労働省通知食安発第 0618001 号：組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（一部改正），平成 20 年 6 月 18 日

図1 組換え遺伝子含有率の相関

