

遺伝子組換え大豆のスクリーニング検査について

宮崎 悦子¹・真子 俊博¹・藤本 喬¹

Study for Screening Methods of Recombinant DNA from Genetically Modified Soybean

Etsuko MIYAZAKI, Toshihiro MAKO and Takashi FUJIMOTO

要 旨

遺伝子組換え作物に導入されている遺伝子 { 35S プロモーター (35S), CP4-EPSPS, NOS ターミネーター (NOS) } のうち, 国の通知法で用いられる CP4-EPSPS 以外の 35S や NOS を標的にした PCR が遺伝子組換え大豆の定性検査 (スクリーニング) に適当かどうかを検討するため, JAS 法と市販キットの検出結果を比較した. その結果, 試料大豆 56 検体中 47 検体が一致した. 一致しなかった 9 検体について別のキットの検出結果と比較した結果, 統一した傾向は認められなかった. 2 種キットは JAS 法で検出されたものが検出されなかったり, コストが高いなどスクリーニング検査用としては不適當であった.

Key Word : 遺伝子組換え大豆 Genetically modified soybean, グリホサート Glyphosate, ポリメラーゼ連鎖反応 Polymerase Chain Reaction (PCR), スクリーニング法 Screening method

は じ め に

平成 13 年 4 月 1 日付食品衛生法の一部改正により, 組換え DNA 技術応用食品 (遺伝子組換え食品) の安全性審査と表示が義務化された. 平成 14 年 5 月末現在, 安全性審査済みの遺伝子組換え作物は 6 作物 40 品種である.

これらの作物の中でも, 現在, 遺伝子組換え大豆は最も栽培面積が多く^{1), 2)}, また, 日本人の食生活では大豆や大豆加工品を摂食する機会が多いため, 信頼性と実用性の高い遺伝子組換え食品の検査法の確立を目指し, 大豆を対象にして検討を行った.

遺伝子組換え大豆は, 除草剤グリホサート (商品名: ラウンドアップ) に耐性を持つ大豆である. グリホサートは, 酵素 (EPSPS) と結合し, 芳香族アミノ酸合成経路を阻害して植物を枯らす有機リン系農薬である³⁾. 遺伝子組換え大豆は, グリホサートの影響を受けない細菌由来の酵素 (CP4-EPSPS) を遺伝子組換え技術を用いて導入することで, グリホサートに耐性を有している.

一般的な遺伝子組換え食品の検査は, 導入された遺伝

子を標的にして PCR 法で検出するものである. 遺伝子組換え大豆では, 新たにカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (以下 35S), CP4-EPSPS, NOS ターミネーター (以下 NOS) からなる遺伝子の発現カセットが組み込まれているので, この配列を標的にした PCR での定性検査が可能である. しかし, 国の通知⁴⁾では大豆検査は試料大豆中に含まれる組換え大豆の比率を求める定量法のみが示されており, 定性検査に関する記述はない.

そこで, 今回は定性によるスクリーニング検査法 (PCR) を検討したのでその結果を報告する. ただし国の通知法では大豆の定性試験の記述はないため, 定量法と同じプライマー対を用いる「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」⁵⁾に基づいた定性検査 (以下 JAS 法) と市販キットの PCR 結果を比較した.

実 験 方 法

1. 検体

平成 11 年度 ~ 平成 13 年度に福岡市内で入手した大豆計 66 検体を用いた (表 1).

2. 使用キット

1) Screening Kit for the detection of genetically modified DNA Standard Kit 100 (Hanse Analytik GmbH)

1. 福岡市保健環境研究所 衛生化学部門

2) PCR Screening Kit for GM Soybean Ver.2.0 (宝酒造)

表1 被検大豆

年度	国産表示 (13)	輸入表示 (38)	不明 (5)	合計 (56)
H11	3	11	5	19
H12	6	15	0	21
H13	4	12	0	16

3. 検査方法

1) 試料粉碎

大豆 800 粒をミルミキサー (象印マホービン製 BME-02) を用いて可能な限り均一な微小な粉末状に破碎した。

2) DNA 抽出

粉碎大豆 50mg を CTAB 法で処理して、50μL の DNA 試料原液とした。

3) DNA のアガロースゲル電気泳動

DNA 試料原液 5μL を 1 % アガロースゲルを用いて電気泳動し、抽出した DNA の純度および濃度を確認した。

4) PCR 反応

キットは説明書に従い、JAS 法はマニュアルのとおりに行った。

5) PCR 産物のアガロースゲル電気泳動

PCR 産物のうち 10μL を 3) と同様に濃度 3 % のアガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

6) 結果の判定

各法とも組換え・非組換えに関わらず本来大豆に含まれる内在遺伝子と組換え遺伝子の検出結果をあわせて判定した。(表 2 ~ 4)

表2 JAS法による検知

標的遺伝子	増幅断片
内在遺伝子 (Lectin)	118 bp
組換え遺伝子 (CP4-EPSPS)	121 bp

表3 Hanse Analytik GmbH (Hキット)による検知

標的遺伝子	増幅断片
内在遺伝子 (Lectin)	145 bp
組換え遺伝子 (35S プロモーター)	195 bp
組換え遺伝子 (NOS ターミネーター)	180 bp

表4 宝酒造 (Tキット)による検知

標的遺伝子	増幅断片
内在遺伝子 (Actin)	225 bp
組換え遺伝子 (CP4-EPSPS)	570 bp

結 果 及 び 考 察

遺伝子組換え作物を創る場合、目的遺伝子の発現に適したプロモーターやターミネーターが必要となる。そこで遺伝子組換え大豆では、35S と NOS の間に目的遺伝子 (CP4-EPSPS) を挿入した発現カセットが組込まれている。

国の通知の定量 PCR および JAS 法の PCR では CP4-EPSPS を標的とするが、遺伝子組換え食品中に幅広く導入されている 35S, NOS を標的とした PCR による定性検査も有効でないかと考え、大豆 (穀粒) を試料として JAS 法および市販キット (Hanse Analytik GmbH 製、以下 H キット) を用いた検討を行った。

その結果、JAS 法、H キットにおいて、すべての検体から内在遺伝子の Lectin を検出した。また 56 検体中 47 検体の組換え遺伝子検出結果が一致したが、9 検体は異なった。一致した結果が得られたものについては結果の信頼度は高いものと思われた (表 6 ~ 8)。

一致しなかった 9 検体について、上記 2 法とは異なる部位を標的とする宝酒造製キット (以下 T キット) を使用した定性検査を実施した (表 5)。その結果、3 法の組換え遺伝子検出結果において統一した傾向は認められなかった。JAS 法および 2 種のキットにおける組換え遺伝子の検出結果が異なったのは、感度の差や非特異的な増幅など様々な要因が考えられるため、今後検討したい。

各法の問題点・優れた点は次のとおりである。

JAS 法: PCR における標的部位は通知の定量分析と同じであり、検出結果は通知法に近いと考えられる。

H キット: 組換え遺伝子検出結果は、JAS 法と比べ 8 割が一致していたが、JAS 法で組換え遺伝子が検出された検体を検出できないこともあったので、スクリーニングとして用いるのには適当ではないと思われた。また、1 検体あたり内在遺伝子、35S, NOS の 3 つの PCR をする必要があり、T キットの 3 倍の手間がかかるため操作性は低かった。しかし、H キットは 35S, NOS を有する大豆以外の遺伝子組換え作物、さらに単品または複数の遺伝子組換え作物が入った加工食品からの組換え遺伝子のスクリーニングへ応用できる可能性があるため、今

後検討したい。

T キット：1 回の PCR で内在遺伝子と組換え遺伝子の両方を検出できるので操作性が優れていたが、高価なため、多くの検体を扱うスクリーニング検査には不向きであった。また T キットの増幅断片は内在遺伝子（225bp）、組換え遺伝子（570bp）ともに、遺伝子組換え食品検査の一般的な増幅断片が 100 ～ 200bp であることを考慮すると非常に大きい。今回のように大豆穀粒を検査対象とする場合は、大豆 DNA の分解がほとんどないので感度に問題はないと考えられるが、加熱や加圧処理を受けた加工食品を対象とした場合は感度が低いので検査には適さない。また 1 回の PCR で同時に 2 つの遺伝子の増幅反応を行う場合、特に 2 つの遺伝子の比率が極端な場合には遺伝子同士の干渉（Titration Effect）が起こりやすく、鋳型 DNA 中の遺伝子組換え大豆の割合が低いほど感度が下がるので、混入率 5 % を 1 つの目安にしている遺伝子組換え食品検査には適さない。

これらの結果を考慮して、JAS 法で定性試験を行い、組換え遺伝子を検出したものの確認試験として H キットを併用するのが有効であると考えられた。

平成 11 年度～ 13 年度に入手した大豆のうち、アメリカ、中国、カナダ産表示の大豆から組換え遺伝子を検出した。この結果は遺伝子組換え作物が商業ベースで生産されている国とも一致していた。^{7) , 8)}

表5 平成11年度に入手した大豆検査結果

No.	原産国表示	JAS法	Hキット法
1	日本	-	-
2	日本	-	-
3	日本	-	-
4	アメリカ	+	+
5	アメリカ	+	+
6	アメリカ	+	+
7	アメリカ	+	+
8	アメリカ	+	+
9	アメリカ	+	-
10	中国	-	-
11	中国	+	+
12	中国	-	+
13	中国	-	-
14	中国	+	+
15	不明	-	-
16	不明	-	-
17	不明	-	-
18	不明	+	+
19	不明	-	-

表6 平成12年度に入手した大豆検査結果

No.	原産国表示	JAS法	Hキット法
20	日本	-	-
21	日本	-	-
22	日本	-	-
23	日本	-	-
24	日本	-	-
25	日本	-	-
26	アメリカ	+	+
27	アメリカ	+	+
28	アメリカ	+	+
29	アメリカ	+	+
30	アメリカ	+	+
31	アメリカ	+	+
32	アメリカ	+	-
33	アメリカ	-	-
34	中国	-	+
35	中国	-	+
36	中国	-	+
37	中国	-	-
38	中国	-	-
39	中国	-	-
40	カナダ	-	+

表7 平成13年度に入手した大豆検査結果

No.	原産国表示	JAS法	Hキット法
41	日本	-	+
42	日本	-	-
43	日本	-	-
44	日本	-	-
45	アメリカ	+	+
46	アメリカ	+	+
47	アメリカ	+	+
48	アメリカ	+	+
49	アメリカ	+	+
50	アメリカ	+	-
51	アメリカ	-	-
52	アメリカ	-	-
53	アメリカ	-	-
54	中国	-	-
55	中国	-	-
56	カナダ	-	-

遺伝子組換え食品の表示は平成 13 年度から義務づけられたが、入手した検体では「遺伝子組換え」表示されたものが 1 検体で、「遺伝子組換え不分別」が表示されたものは見られなかった。これは、市民の遺伝子組換え

食品に対する強い抵抗感から，大豆や表示義務対象大豆加工品の原料が分別生産流通管理された非組換え大豆や国産大豆へと大幅に切り替えられたことによるものと推察された．

今回，大豆（穀粒）からの組換え遺伝子の検査において若干の知見が得られたため，今後大豆加工品について遺伝子組換え検査の検討を行う予定である．

文 献

表8 JAS法 Hキット法 Tキット法の比較

No.	原産国表示	JAS法	Hキット法	Tキット法
9	アメリカ	+	-	-
12	中国	-	+	-
32	アメリカ	-	+	-
34	中国	-	+	-
35	中国	-	+	-
36	中国	-	+	-
40	カナダ	-	+	-
41	日本	-	+	-
50	アメリカ	+	-	+

- 1) ISAAA データ：2000
- 2) ISAAA データ：2001
- 3) 本田 博 他：新農業学概論，朝倉書店，1993
- 4) 厚生労働省通知食発第 0430001 号：組換え DNA 応用食品の検査方法について（一部改正），2002
- 5) 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，2001
- 4) 松岡 猛 他：ダイズ及び加工食品からの組換え遺伝子の検知法（第 1 報），食衛誌，40，149-157，1999
- 5) 門間公夫 他：国産及び輸入ダイズ並びに豆腐からのグリホサート耐性遺伝子の検知状況 41 312-315 2000
- 6) 山口秀明 他：遺伝子組換え大豆および豆腐中の組換え遺伝子の同定，日本食品化学学会誌 7 112-115 2000