

リアルタイム PCR による遺伝子組換え大豆の定量

宮崎 悦子¹・真子 俊博¹・藤本 喬¹

Study for Quantification of Recombinant DNA from Genetically Modified Soybean with Realtime PCR

Etsuko MIYAZAKI ,Toshihiro MAKU and Takashi FUJIMOTO

要 旨

平成 13 年度から 14 年度に福岡市内で流通した豆腐 65 件を用いてリアルタイム PCR を使った TaqMan ケミストリー法による遺伝子組換え大豆の定量試験を実施した。その結果、8 割の検体から組換え遺伝子を検出したが、混入率は 0.01 ~ 1.7 % であり、分別生産流通管理システムが適正に行われたかの目安とされる 5% を超える検体は認められなかった。

Key Word : 豆腐 tofu, 遺伝子組換え大豆 genetically modified soybean , グリホサート glyphosate , リアルタイム PCR realtimePCR , 定量 PCR quantitative PCR

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 15 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 49 品種である¹⁾。

これらの作物の中でも大豆は最も栽培面積が多く、摂食する機会も多い。安全性審査が終了した遺伝子組換え大豆は現在除草剤耐性大豆が 3 と高オレイン酸形質が 1 の計 4 系統があるが、モンサント社のラウンドアップ・レディー大豆はいち早く安全性審査を終えており、現在流通している遺伝子組換え大豆の大半を占めている。

ラウンドアップ・レディー大豆は土壌細菌由来の遺伝子 (CP4EPS5) が導入され、除草剤グリホサートに耐性を持つ。すでに安全性審査を終了しており、組換え大豆として分別されたものや、分別されていないもの（不分別）は表示義務の対象となる。分別生産流通管理システム (IP ハンドリング) が適正に行われたかどうかは遺伝子組換え大豆の混入率 5% が目安とされている。

醤油と油以外の表示対象食品では、「組換え」や「組換え不分別」の表示を目にするのはほとんどなく、「遺伝子組換えでない」等の表示がなされることが多い。

そこで表示の対象食品である豆腐を対象として、原料大豆中の遺伝子組換え大豆の混入率についてリアルタイム PCR を用いて検査を実施した。

リアルタイム PCR による定量法は、PCR を行う際に蛍光ラベルされた内部配列に特異的なプローブ (TaqMan プローブ) を入れておくことで、増幅により増加する蛍光強度をリアルタイムにモニタリングする PCR である。一定の蛍光強度 (Threshold) に達するサイクル数は初期の DNA 鋳型量と逆相関の関係にあるので、DNA 量既知のスタンダードから標準曲線が得られる。内在性遺伝子、組換え遺伝子の DNA 量をそれぞれ求めた後、計算式より混入率を算出した。

今回、厚生労働省の通知および JAS 分析試験ハンドブックに基づき、ABI PRISM 7900 を使用し、定量分析を試みたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 検体

平成 13 年度から平成 14 年度に福岡市内で製造された豆腐計 65 検体を用いた。

2. 使用機器

ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社)

3. 試薬

プライマー、プローブおよびプラスミドセットは全て (株) ニッポンジーンの遺伝子組換え食品検査用試薬を

1. 福岡市保健環境研究所 衛生化学部門 (現 保健科学部門)

使用した。(表 1,2) また水は全て超純水をオートクレーブ処理したものを使用した。

表1 TaqManPCRによる組換え遺伝子の検知

標的遺伝子	プライマー	プローブ	蛍光色素
内在性遺伝子	Le1n02-5'	Le1-Taq	FAM
Lectin	Le1n02-3'		
組換え遺伝子	RRS-5'	RRS-Taq	FAM
cp4epsps	RRS-3'		

表2 スタンダードプラスミドのコピー数

試薬名	濃度(コピー/μL)
NTC	0
Soy20	20
Soy125	125
Soy1.5k	1500
Soy20k	20000
Soy250k	250000

4. 検査方法

1)DNA 抽出

豆腐 150mg を量り採り, CTAB 及びプロテナーゼ K を加え DNA を抽出した。DNA は滅菌水に溶解し最終量を 100μL とした。

2)DNA の吸光度を測定

DNA 試料原液 10μL を滅菌水を用いて 20 倍希釈後分光光度計により 260, 280nm の各吸光度を測定した。280nm の吸光度に対する 260nm の吸光度の比 (A260/A280) から DNA の純度を確認し, 260nm の吸光度から DNA 濃度を求めた。

3)DNA 濃度が 20ng/μL になるように DNA 溶液を滅菌水で調整し, PCR 反応の鋳型として用いた。

4)定量 PCR 反応

Primer probe mix を調整

25μM each 5'&3'primer	30 μL
10μM TaqMan probe	30 μL
滅菌水	540 μL
	600 μL

Primer probe mix と Universal mix (2 ×) を混合した

Primer probe mix	570 μL
Universal mix	712.5 μL

各 1.5mL マイクロチューブに の mix78.75μL ずつ分注した

鋳型 DNA を 8.75μL ずつ加え, よく混合した。

プレートに 25μL ずつ 3well に分注したのち, PCR した。

5)結果の解析

結果の解析法については JAS 分析試験ハンドブックおよび第 2 回組換え 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。

結果及び考察

今回, リアルタイム PCR を用いて TaqMan ケミストリー法による遺伝子組換え食品の定量検査を行った。図 1 に増幅曲線の例を示す。増幅曲線上の ThLine で対数をとったいずれの標準曲線も相関係数 0.99 以上のよい直線性が得られたことから, CTAB 法で抽出された豆腐 DNA は定量検査に十分な純度であり, ピペット操作も申し分ない精度であると思われた。

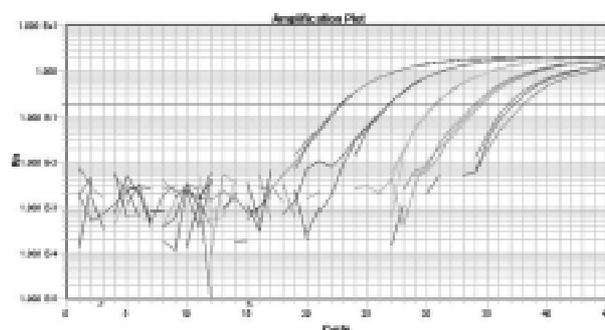


図1 増幅曲線

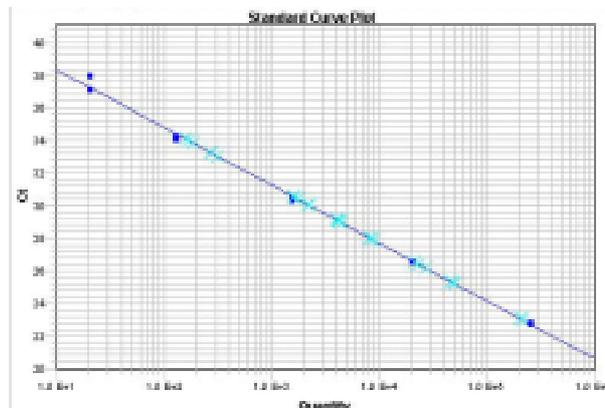


図2 標準曲線

定量検査には平成 13 年度から 14 年度の 2 年間に福岡市内で製造された豆腐を用いた。その結果, 65 検体中 55 検体から組換え遺伝子を検出し, 検出率は 8 割であった。表 3 に定量結果をまとめた。

表3 定量結果まとめ

検体数	陽性数 (検出率)	定量(%)
65	55 (85%)	(0.01)* ~ 1.7

* 組換え遺伝子の増幅が20コピー未満

図3に混入率とその分布を示した。平成13年度及び14年度ともに混入率が0.1%未満の検体が半数を占めていた。また14年度の方が若干混入率が低い傾向が認められた。

組換え遺伝子が検出された検体の混入率は最大で1.7%であり、分別生産流通管理システム(IPハンドリング)の目安である5%を下回っており、IPハンドリングは適正に行われたものと判断された。

福岡市内の多くの豆腐製造者は原料大豆を豆腐組合から仕入れることが多いという地域の特性があるため、8割の検体が同様の傾向を示したのではないかと推測した。

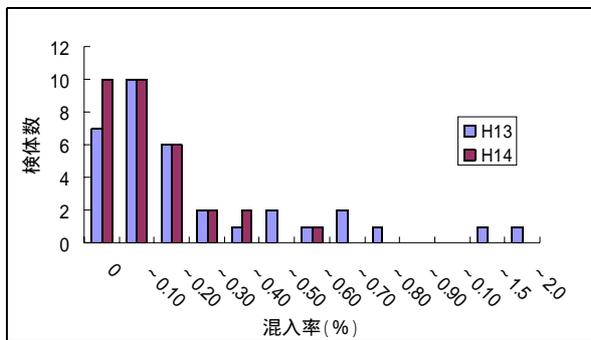


図3 定量結果と分布状況

定量分析においてはPCRの鋳型量が十分あり遺伝子が十分量増幅しないと正確な定量結果が得られないので、鋳型量は非常に重要である。

国の通知では鋳型DNA濃度は20ng/μLとされている。しかし実際にはDNA濃度300~700ng/μLに相当するDNA抽出原液をそのまま用いないと鋳型量が十分でないことが多かった。

その原因として、豆腐が加工食品であり抽出されたDNAが部分分解を受けたものであること、また通知ではシリカゲル膜やイオン交換樹脂といったキットによるDNA抽出を前提としているため、CTAB法で抽出されたDNAの場合にはあてはまらないことなどが考えられた。

定量PCR法では混入率は内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の割合であることから、内在性遺伝子の増幅が制限されて実際よりコピー数が少なくなると組換え遺伝子の混入率が高くなる、また逆に組換え遺伝子の増幅が制限されてしまうと実際より混入率が低くなってしまふなどの問題点がある。

今回は最小のスタンダードである20コピー以下の組換え遺伝子も定量しているが、これはあくまで参考値であり、20コピー以下の増幅では本来定量できない。

検証試験からも組換え大豆の保証定量下限は0.1%とされていることもあり、実際の検査における定量下限は0.5%程度にするのが望ましいと思われる。

また13年度の34検体と比較したところ、定性試験では混入率が0.01~0.05%程度のときには陰性となることもあったので、定性PCRの検出限界は混入率0.05%程度であると思われた。

文 献

- 1) 厚生労働省通知薬食審第0516001号：組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査に関する部会報告について、2003
- 2) 厚生労働省通知食発第0506002号：組換えDNA応用食品の検査方法について(一部改正)、2003
- 3) 農林水産消費技術センター：JAS分析試験ハンドブック組換え食品検査・分析マニュアル改訂第2版、2002
- 4) 第2回組換えDNA技術応用食品の検査に関わる実地技術研修会実験マニュアル、2002
- 5) 中山広樹：バイオ実験イラストレイテッド3+本当にふえるPCR、秀潤社
- 6) 柿原芳輝 他：市販豆腐からの組換え遺伝子の検知並びに原料ダイズ中の組換え体比率の推定、日本食品化学学会誌、9、60-66、2002
- 7) 農林水産省プレスリリース：遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果について、2002
- 8) 農林水産省プレスリリース：有機大豆使用食品緊急調査の結果について、2002
- 9) 荒木理江 他：組換え大豆混入試料から作製した加工食品の定量検査について、第39回全化協講演要旨集、2002
- 10) 宮崎仁志 他：加工食品からの組換え遺伝子の検出、第39回全化協講演要旨集、2002
- 11) 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
- 12) 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、食衛誌、41、312-315、2000
- 13) 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
- 14) 宮崎悦子 他：遺伝子組換え大豆のスクリーニング検査について、福岡市保健環境研究所報、27、132-135、2002