

2005年夏現在の市販豆腐に含まれる組換え遺伝子の検出

鬘谷 要, 後藤政幸, 福本由希

Detection of modified genes contained in bean curd (tofu) commercially available as of summer 2005

Kaname KATSURAYA, Masayuki GOTOH and Yuki FUKUMOTO

The presence of modified genes resistant to a chemical herbicide Roundup Ready (glyphosate) in commercially available bean curd (tofu) labeled as modified gene-free was examined by the PCR method. Samples were taken from twelve brands of bean curd all available on the market and bought during August and September 2005. For DNA extraction, PCR analysis was conducted from primers based on the disclosed Roundup Ready-resistant expression sequence and soybean lectin expression sequence using a DNeasy Plant Mini Kit produced by Qiagen, and the results were confirmed by electrophoresis.

As a result, a clear band that appears to derive from modified genes was detected in one brand, and a trace of such a band was detected in two other brands. In an analysis of unsorted ration for livestock carried out for comparison, a clear band that appears to derive from modified genes was detected.

緒 言

遺伝子組換え作物と、それを直接あるいは原料として含む食品について、その安全性の議論が繰り返されている。遺伝子組換えの技術は、その正しい利用により我々人類に多大な恩恵を与える物として期待され、実用化されてきたが、その安全性については疑問視する向きもある。特に日本では日常摂取する食品の安全性ということから、マスコミの報道などに過敏に反応し、「組換え＝危険」という印象を持つ消費者が多いことも事実である。実際、現在市場に出回っている豆腐については、遺伝子組換え作物に由来する原料を使用していない旨の表示がほぼすべての商品にある。これまでも加工食品から大豆やトウモロコシの組換え遺伝子を取り扱う報告が出されている^{1,2)}。

一方で、PCR (Polymerase Chain Reaction ; 遺伝子増幅法) は、比較的簡便な方法で、

特定の遺伝子配列を特異的に検出できる方法として大変優れており、今日の分子生物学分野での一般的な手法となり、本学でも管理栄養士養成系学科で学生実験（生化学）にPCRを取り入れている。また、PCR法で取り扱うDNAの抽出についても専用のキットが開発されるなどその取り扱いが非常に容易になり、豆腐や油揚げなどの加工食品からもPCR反応に十分な品質のDNAを取り出せるようになって来ている。

このような背景から、本報告では、無作為に購入した市販の豆腐から、DNAを抽出し大豆のラウンドアップ耐性発現遺伝子配列と、大豆レクチン発現遺伝子配列を基にしたプライマーペアを用いてPCR反応を行い、最終製品である豆腐の中の組換え遺伝子の有無を調べた。

装置および試薬

1) 装置

サーマルサイクラー：エッペンドルフ社製 マスターサイクラーグラジエント

微量遠心分離器：エッペンドルフ社製5415D

トランスイルミネータ：UVP社製3UV Transilluminator

撮影装置：Doc-It®System

デジタルカメラ：オリンパス社製C-400ZOOM

電気泳動装置：アドバンス製Mupid-2plus

2) 試薬

植物組織用DNA抽出キット：QIAGEN社製DNeasy Plant Mini Kit

PCR用マスターミックス：Invitrogen社製Platinum Blue PCR SuperMix

アガロースゲル：ニッポンジーン社製アガロース S

TAEバッファー：ニッポンジーン社製を50倍に希釈

臭化エチジウム：ニッポンジーン社製

エタノール：和光純薬社製特級

Protainase K：QIAGEN社製

泳動用マーカー：ニッポンジーン社製Marker 5 (ϕ X172/*Hinc* II digest)

3) プライマー

RRS-01：ニッポンジーン社製GM作物検定用プライマーペア

Le1n02：ニッポンジーン社製GM作物検定用プライマーペア

以下4点はニッポンEGT社へ委託合成^{3,4)}

35S1	GCTCCTACAAATGCCATCA
35S2	GATAGTGGGATTGTGCGTCA
SL520D	GATGGATCTGATAGAATTGAC
SL155U	GCCGAAGCAACCAAACATG

実 験

QIAGEN社のDNeasy Plant Mini Kit、とProtainase Kを用いて豆腐からDNAを抽出精製した。

このプロトコールはDNeasy Plant Mini Kit添付のマニュアルおよび同社User-developed protocolに基づきその一部を改変して用いた。

1) 組織の分解

豆腐サンプルをさらし木綿2枚を重ねた布帛で裏漉し、その約100mgをマイクロチューブに取り360 μ LのAP1溶液と40 μ LのProtainase Kを加えてボルテックスミキサーで攪拌した。この混合溶液を55 $^{\circ}$ Cに加熱し、途中2時間経過時にProtainase Kを20 μ L追加し計3時間適宜攪拌を行いながら温度を維持した。RNase 4 μ Lを加え攪拌し室温で5分静置した。

2) DNAの抽出

1.5mLのマイクロチューブに130 μ LのAP2溶液と、1)の懸濁溶液を移し混合し、これを氷中に5分置き16000gで6分間遠心分離を行った。QIAshredder Spin Columnを2mLのマイクロチューブにセットしたものにこの上清を移し、16000gで3分間遠心分離を行った。続いて新しい2mLのマイクロチューブにこの溶液とその1.5倍量のAP3/Eを加えた。

2mLのマイクロチューブにDNeasy Mini Spin Columnをセットし、前ステップの混合液を2回に分けて6000gで1分遠心分離しカラムを通過させた。

DNeasy Mini Spin Columnを別の2mLのマイクロチューブにセットしたものに500 μ L \times 2のAW溶液をDNeasy Mini Spin Columnに加え6000gで1分間遠心分離により2回洗浄した。

最後にDNeasy Mini Spin Columnを1.5mLのマイクロチューブに移し、80 μ LのAE溶液を直接DNeasy膜上にピペットで加え、そのまま室温で5分静置した後、6000gで1分間遠心分離し溶出させた。再度80 μ L AE溶液を通過させDNAの抽出精製を完了した。

3) PCR反応

精製DNAを組換え遺伝子検出用プライマーセット1 μ L、大豆レクチン検出用プライマー

セット1 μL と共に耐熱ポリメラーゼを含むPCRSuperMix溶液45 μL に溶かし攪拌後、サーマルサイクラーにセットし、次に示すPCR条件で反応を行い、DNAの増幅を行った。プライマーとしては、大豆レクチン検出用としてLe1n02 (プライマーペアとして市販)、SL520D+SL155U、RRS検出用にRRS-01(プライマーペアとして市販)、35S1+35S22を用いた。

PCR条件

94°C 2分

サイクル開始

94°C 30秒

55°C 20秒 35サイクル

72°C 60秒

サイクル終了

72°C 2分

室温まで冷却

4) 電気泳動

3%アガロースゲルを用いてプレートを作成し、ローディング後100V30分間電気泳動を行った。泳動後のゲルは臭化エチジウム溶液に20分間浸漬し、UV-C (254nm) で発色させ、デジタルカメラで撮影した後、画像処理として専用のソフトウェアでコントラストおよびガンマ補正処理を行った。

結果と考察

1) 豆腐からのDNA抽出

一般にDNA抽出用組織の前処理としては、液体窒素冷却下での粉碎が行われるが、豆腐が植物組織を一度完全に破碎処理をし濾過した豆乳を原料としていることから、布帛による圧迫濾過のみとした。結果として、次項以降に示すようにPCR反応による選択的増幅が認められ、本実験で検討した範囲では良好にDNAが抽出できたものと考えられる。

2) 組換え遺伝子の検出

組換え遺伝子をもつ大豆が正しく検出されるかどうかは、動物用飼料を用いて確認した。図1および図2のレーン1~4に示すように、RRS遺伝子と大豆レクチン発現遺伝子とが検出されている。大豆レクチン検出用としてLe1n02、RRS遺伝子検出用にRRS-01を用いたのが図1、大豆レクチン検出用として35S1+35S2、RRS遺伝子検出用にSL520D+SL155Uを用いたのが図2であり、いずれも目的のバンドを検出しているが、後者(図2で示した系)の

図1. 動物用試料、国産大豆、豆腐サンプルから抽出したDNAをテンプレートとして得られたPCR産物の電気泳動結果。

- レーン1：サンプル=動物用試料A、
プライマー=RRS-01
- レーン2：サンプル=動物用試料A、
プライマー=Le1n0
- レーン3：サンプル=動物用試料B、
プライマー=RRS-01
- レーン4：サンプル=動物用試料B、
プライマー=Le1n0
- レーン5：サンプル=市販国産大豆、
プライマー=RRS-01
- レーン6：サンプル=市販国産大豆、
プライマー=Le1n0
- レーン7：マーカー
- レーン8：サンプル=市販豆腐A、
プライマー=RRS-01
- レーン9：サンプル=市販豆腐A、
プライマー=Le1n0
- レーン10：サンプル=市販豆腐B、
プライマー=RRS-01
- レーン11：サンプル=市販豆腐B、
プライマー=Le1n0

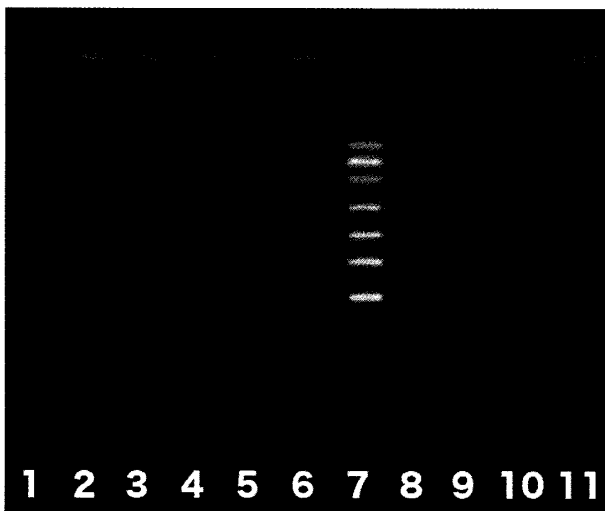


図2. 動物用試料、国産大豆、豆腐サンプルから抽出したDNAをテンプレートとして得られたPCR産物の電気泳動結果。

- レーン1：サンプル=動物用試料A、
プライマー=35S1 + 35S22
- レーン2：サンプル=動物用試料A、
プライマー=SL520D + SL155U
- レーン3：サンプル=動物用試料B、
プライマー=35S1 + 35S22
- レーン4：サンプル=動物用試料B、
プライマー=SL520D + SL155U
- レーン5：サンプル=市販国産大豆、
プライマー=35S1 + 35S22
- レーン6：サンプル=市販国産大豆、
プライマー=SL520D + SL155U
- レーン7：マーカー
- レーン8：サンプル=市販豆腐A、
プライマー=35S1 + 35S22
- レーン9：サンプル=市販豆腐A、
プライマー=SL520D + SL155U
- レーン10：サンプル=市販豆腐B、
プライマー=35S1 + 35S22
- レーン11：サンプル=市販豆腐B、
プライマー=SL520D + SL155U

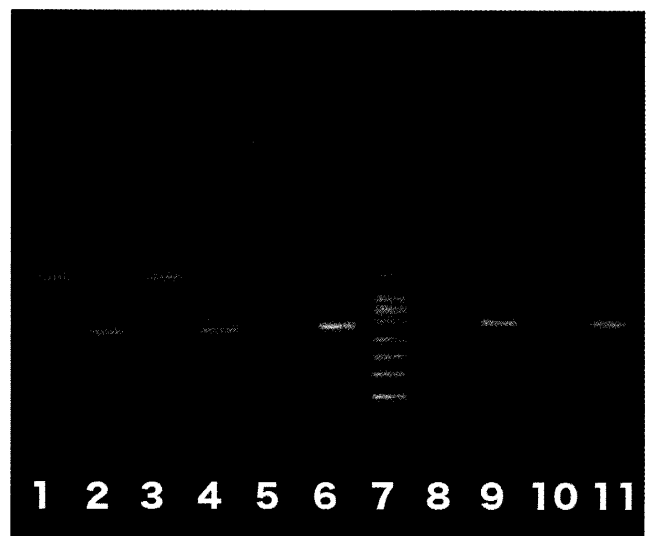


図3. 豆腐サンプルから抽出したDNAをテンプレートとして得られたPCR産物の電気泳動結果。

- レーン1：サンプル＝市販豆腐C、プライマー＝35S1 + 35S22
- レーン2：サンプル＝市販豆腐C、プライマー＝SL520D + SL155U
- レーン3：サンプル＝市販豆腐D、プライマー＝35S1 + 35S22
- レーン4：サンプル＝市販豆腐D、プライマー＝SL520D + SL155U
- レーン5：サンプル＝市販豆腐E、プライマー＝35S1 + 35S22
- レーン6：サンプル＝市販豆腐E、プライマー＝SL520D + SL155U
- レーン7：サンプル＝市販豆腐F、プライマー＝35S1 + 35S22
- レーン8：サンプル＝市販豆腐F、プライマー＝SL520D + SL155U
- レーン9：サンプル＝市販豆腐G、プライマー＝35S1 + 35S22
- レーン10：サンプル＝市販豆腐G、プライマー＝SL520D + SL155U
- レーン11：マーカー



方がそれぞれのバンドの分子量が異なることとノイズが少なかったことから以降後者のプライマーペアを用いて調べることにした。

3) 市販豆腐の調査結果

市販の豆腐12サンプルを調査した結果、図2でサンプルAには明確なRRS遺伝子発現バンドが、また図3のサンプルCで有意な、さらに同図サンプルDで痕跡量のバンドが検出された。

それ以外のサンプルでは肉眼および写真で判断できる程度のバンドを見出せなかった。

まとめ

遺伝子組換え作物由来の、組換え遺伝子を加工食品から検出することを行った。豆腐を加工食品として取り上げ、比較的簡便な市販の植物組織からのDNA抽出キットを用いること

で、豆腐からでも安定したDNAの抽出が可能であることが分かった。

遺伝子組換え大豆（RRS：Roundup Ready Soy）を含まない旨が明示されている市販の豆腐をサンプルとして、PCR法により、ラウンドアップ（除草剤：成分名はグリホサート）耐性組換え遺伝子の有無を2005年夏現在の調査としてして行った。サンプル数は12銘柄、すべて市販の豆腐で2005年8月から9月に購入した物を用いた。DNAの抽出には、キアゲン社のDNeasy Plant Mini Kitを用い、公開されているラウンドアップ耐性発現配列と、大豆レクチン発現配列を基にしたプライマーを用いてPCRを行い、電気泳動により確認した。

その結果、1銘柄に組換え遺伝子に由来すると考えられる明瞭なバンドを検出し、更に2銘柄に少量あるいは痕跡量のバンドを検出した。比較のために行った、組換え大豆非選別の家畜用飼料からは極めて明瞭な組換え遺伝子に由来すると考えられるバンドを検出し、本手法の有効性が確認できた。

遺伝子組換え食品の表示制度では5%以内の混入までは、組換え作物を含まないと表示して良いことになっているため⁵⁾、このことを考慮し、今後定量PCR法を用いて継続的な調査研究を行っていきたいと考えている。表示制度上の許容範囲については一般消費者が正確な情報を持ち得ていないと考えられることから、一般の認識と事実との乖離には憂慮せざるを得ない。一方で、遺伝子組換え作物への正確な理解が著しく遅れていることも課題であると考えられる。

文 献

- 1) 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
門間公夫・佐々木城子・牛尾房雄他、食品衛生学雑誌、41巻5号、312-315、2000
- 2) 大豆加工食品からの組換え遺伝子検知法の検討
東京都健康安全研究センター研究年報（54）、136-141、2003
- 3) Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products, A.M.A. Van Hoef, E.J. Kok, E. Bouw, et. al., *Food Additives and Contaminants*, 15 (7), 767-774, 1998
- 4) A Method of Detecting Recombinant DNAs from Four Lines of Genetically Modified Maize, Takeshi Matsuoka, Yoshimi Kawashima, Hiroshi Akiyama, et. al., *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 41 (2), 137-143 (2000).
- 5) 食品衛生法施行規則第5条第15項

鬘 谷 要 (家政学部服飾造形学科助教授)
後 藤 政 幸 (家政学部健康栄養学科教授)
福 本 由 希 (家政学部生活環境学科専任講師)