

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

扇谷陽子 坪井 弘 宮下妙子 藤田晃三

要 旨

遺伝子組換え作物の使用に関する表示の省略が可能な加工食品における遺伝子組換え作物挿入遺伝子の検出状況を把握することを目的として、表示の省略が可能な量の範囲で、植物性たん白・大豆たん白が使用されている市販の加工食品22製品について、ラウンドアップ・レディ・大豆40-3-2系統(RoundUp Ready™ Soybean、以下RRSと略)のPCRによる検出を試みた。

定性検査について、プライマーは、大豆に内在するレクチン遺伝子検知用としてLe1-n02、RRS挿入遺伝子検知用としてRRS-01、GM07/8、Sttmf3a/r2aの3種を用いた。Le1-n02を用いてPCRを行った結果、全ての食品からレクチン遺伝子が検出され、このことからRRSの含有を調べることが可能と判断した。RRS検知用プライマーを用いてPCRを行った結果、JAS分析試験ハンドブックに示されたRRS-01で22食品中16食品(73%)、11食品(50%)は3種類全てが陽性であった。しかし、目安としての定量検査の結果、意図しない混入が検出されたものと考えられた。現状の定性検査の検知技術で、表示の省略が可能な量の範囲で植物性たん白等を使用した多数の食品において、原料となった大豆に5%未満含まれるRRSを検出できる状況にあることが判明した。

1. 緒 言

平成13年4月よりJAS法及び食品衛生法による遺伝子組換え食品の表示制度¹⁾²⁾が施行された。この制度では、遺伝子組換え作物を原材料とする加工食品はこの旨を表示する義務がある。しかし、遺伝子組換え作物およびその加工品が主な原材料(原材料重量が上位3品目、かつ重量に占める割合が5%以上のもの)に該当しない場合、表示の省略が可能である。この点について、厚生労働省医薬局の表示に関する通知³⁾の中で、当面のものとされ、今後の検証技術の向上や国際的議論の推移等により再検討することが示されている。そこで、現状での表示の省略が可能な加工食品からの遺伝

子組換え作物の検出状況を把握することを目的として、表示の省略が可能な範囲で植物性たん白が使用されている加工食品について、遺伝子組換え作物であるラウンドアップ・レディ・大豆40-3-2系統(RoundUp Ready™ Soybean、以下RRSと略)の挿入遺伝子のPCRによる検出を試みたので概要を報告する。

2. 材料と方法

2-1 試 料

試料は、平成16年3月～平成17年3月に札幌市内販売店で購入した、原材料の表示に「植物性たん白・大豆たん白以外の遺伝子組換え食品の表示が必要

な加工食品」の記載がなく、原材料の表記4番目以降に「植物性たん白等」の記載がある、かまぼこ類8製品、ギョーザ・シューマイ類6製品、ハム・ソーセージ類4製品、即席めん類4製品の22製品を用いた。

2-2 試薬

(1)プライマー(定性用)：

大豆に内在するレクチン遺伝子検知用として(株)ファスマック製Le1-n02(増幅長118bp)⁴⁾を用いた。また、RRS挿入遺伝子検知用として、組込まれたDNAのうちCTPと結合部及びCP4 EPSPSの一部を増幅する同社製RRS-01(増幅長121bp)⁴⁾、CaMV 35S promoterと結合部及びCTPの一部を増幅する北海道システム・サイエンス(株)に合成及びHPLC精製を依頼したGMO7/8(増幅長169bp)⁵⁾及びCP4 EPSPSの一部を増幅する同社に合成及びHPLC精製を依頼したSttmf3a/r2a(増幅長146bp)⁶⁾を用いた(表1)。

表1 プライマーの塩基配列

名称	塩基配列
Le1-n02-F	5' GCCCTCTACTCCACCCCCA 3'
Le1-n02-R	5' GCCCATCTGCAAGCCTTTTT 3'
RRS-01-F	5' CCTTTAGGATTCAGCATCAGTGG 3'
RRS-01-R	5' GACTTGTCGCCGGAATG 3'
GMO7-F	5' ATCCCACTATCCTTCGCAAGA 3'
GMO8-R	5' TGGGGTTTATGGAAATTGGAA 3'
Sttmf3a-F	5' GCAAATCCTCTGGCCTTTCC 3'
Sttmr2a-R	5' CTTGCCCGTATTGATGACGTC 3'

(2)プライマー(定量用)：

大豆に内在するレクチン遺伝子検知用として(株)ファスマック製Le1-n02(増幅長118bp)⁴⁾を用いた。また、RRS挿入遺伝子検知用として、同社製RRS-01(増幅長121bp)⁴⁾を用いた。(表1)

(3)プローブ(定量用)：

レクチン遺伝子検知用としてファスマック(株)製Le1-Taq⁴⁾(10 μmol/l溶液)を用いた。また、RRS挿入

遺伝子検知用として、同社製RRS-Taq⁴⁾(10 μmol/l溶液)を用いた(表2)。

表2 プローブの塩基配列

名称	塩基配列
Le1-Taq	5' FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA 3'
RRS-Taq	5' FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC -TAMRA 3'

(4)標準プラスミド(定量用)：

(株)ニッポンジーン製GMサイズ(RRS)プラスミドセット-CoIE1/TE-を用いた。

(5)陽性対照：

陽性対照は、EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE, Institute for Reference Materials and Measurements 製 CRMs (Certified Reference Materials) IRMM-410Sを、厚生労働省通知⁷⁾のOCTAB法に準じた方法で抽出し、TEで20ng/μlに希釈した溶液を用いた。

(6)その他の試薬：

試薬は以下のものを用いた。Genomic-tip 20/G・Genomic DNA Buffer Set(G2・QBT・QC・QF緩衝液)・Proteinase K・RNase A(QIAGEN社製)、L03「TAKARA」・100bpラダー(3407A)[宝酒造(株)製]、Ampli Taq Gold™ DNA Polymerase・Taqman Universal PCR Master Mix・PCR Buffer・dNTP・MgCl₂溶液[アプライドバイオシステムズ(株)製]、エタノール(残留農薬用)・塩酸(特級)・酢酸(特級)・2-プロパノール(特級)・3-メチル-1-ブタノール(特級)・クロロホルム(特級)・トリスヒドロキシメチルアミノメタン(生化学用)・SDS(生化学用)[和光純薬工業(株)製]、0.5mol/L EDTA(pH8.0)遺伝子工学用)・TE緩衝液[10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)・1mmol/L EDTA(pH8.0)]・10mg/ml EtBr溶液[(株)ニッポンジーン製]、フェノール:クロロホルム:3-メチル-1-ブタノール=(25:4:1)溶液[(株)イ

ンビトロジェン製]、臭化セチルトリメチルアンモニウム(以下CTABと略)(シグマ社製)、CoI1/TE[株式会社ファスマック製]

TAE緩衝液は、トリスヒドロキシメチルアミノメタン242g、酢酸57.1ml、0.5mol/l EDTA 100mlに精製水を加えて溶かし、1lにメスアップ後、50倍に希釈して使用した。

2-3 装置

- (1)遠心濃縮装置：エッペンドルフ(株)製
遠心濃縮機5301
- (2)遠心分離機：(株)久保田製作所製3700型
- (3)微量分光光度計：アマシャムファルマシアバイオテック(株)製GeneQuant pro
- (4)ウォーターバス：タイテック(株)製ウォーターバスシェイカーパーソナル11
- (5)PCR装置(定性)：アプライドバイオシステムズ(株)製 Gene Amp PCR System 9700
- (6)PCR装置(定量)：アプライドバイオシステムズ(株)製 ABI PRISM 7000 Sequence Detection system
- (7)電気泳動装置：コスモバイオ(株)製 Mupid
- (8)画像解析装置：東洋紡績(株)製FAS-システム

2-4 測定方法

(1)定性検査

試料一包装に同量の精製水を加えて粉碎し、2gを採取してDNAの抽出を行った。抽出は、JAS分析試験ハンドブック⁸⁾に記載されているQIAGEN Genomic-tip 20/GIによる方法に準じ、各試料について2試料ずつ抽出した。抽出後の溶液は、TE緩衝液で20ng/μlに希釈した。

PCR反応溶液は、総量25μlで、組成は1×PCR buffer・200μmol/L dNTPs・1.5mmol/L MgCl₂・0.5μmol/L F/Rプライマー・0.625 units AmpliTaq Gold™ DNA polymerase・50ng抽出DNAとした。

PCRは、95℃で10分間保持後、熱変性を95℃で30秒間、アニーリングを65℃で30秒間、延長反応を72℃で30秒間行い、これを1サイクルとして40サイクル増

幅反応を行った後、72℃で10分間保持した。

PCR後のサンプルは、エチジウムブロマイドを添加した3%アガロースゲルで電気泳動を行い、UV照射下で増幅されたDNAを観察し、目的とするDNAの検知について判断した。

(2)定量検査

陽性対照用のIRMM-410Sは、厚生労働省通知⁷⁾のCTAB法でDNAを抽出した。

加工食品は、(1)で定性検査用に抽出したDNA溶液を用いた。

PCR反応溶液は、総量25μlで、組成は1×Taqman Universal PCR Master Mix・0.5μmol/L F/Rプライマー・0.2μmol/L プローブ・50ng抽出DNAとした。

PCRは、95℃で2分間保持後、95℃で10分間保持し、その後95℃で30秒間、72℃で1分間を1サイクルとして45サイクル増幅反応を行った。

結果の解析は、JAS分析試験ハンドブック⁸⁾に準じ、全ての標準プラスミドが望ましい増幅を行っている一定の蛍光強度に到達するPCRの回数と標準プラスミドのコピー数を用いて標準曲線を作成し、試料中の作物由来(Le1-n02増幅分)及び組換え体由来(RRS-01増幅分)のDNAのコピー数を算出した。

含有率算式：

$$\text{RRS含有率(\%)} = \left[\frac{\text{組換え体由来DNAコピー数}}{\text{作物由来DNAコピー数} \times 0.95(\text{内標比})} \right] \times 100$$

3. 結果

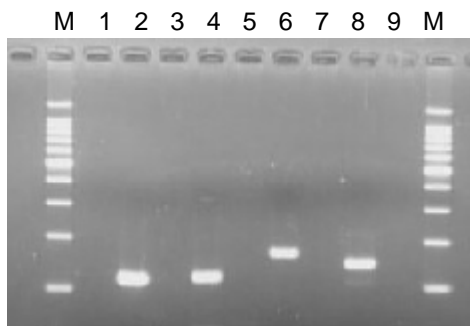
3-1 各プライマーでの増幅パターン(図1)

各プライマーでの増幅パターンを把握することを目的として、陽性対照(P)としてIRMM-410S由来DNA、陰性対照(N)としてCoIE1/TEを用いてPCRを行い、増幅産物は明瞭に検出できた。

3-2 RRS挿入遺伝子の検知感度

RRS挿入遺伝子を検知する3種類のプライマーの感度を把握することを目的として、IRMM-410Sから厚生労働省通知⁷⁾のCTAB法でDNAを抽出し、20ng/μlに希釈したDNA溶液(通知の定量PCR法で測定した結果、溶

液2.5 μl中にRRS由来遺伝子が概ね120コピー含有)、及びこの溶液をTEで5・10・20・40倍に希釈した溶液を用いて2重測定を行った。結果は表3に示すとおりであった。



118bp 121bp 169bp 146bp

M:100bp Ladder 1:Le1-n02(N) 2:Le1-n02(P)
3:RRS-01(N) 4:RRS-01(P) 5:GMO7/8(N) 6:GMO7/8(P)
7:Sttmf3a/r2a(N) 8:Sttmf3a/r2a(P) 9:no primer

図1 各プライマーでの増幅パターン

表3 RRS挿入遺伝子のPCRによる検知感度

希釈倍率 プライマー	×1		×5		×10		×20		×40	
	RRS-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GMO7/8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sttmf3a/r2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+: 陽性 -: 陰性

3-3 加工食品からのレクチン遺伝子の検知

大豆に内在するレクチン遺伝子の検知について調べるため、各食品2試料ずつから抽出したDNA溶液について、Le1-n02を使用してPCRを実施した。この結果、全ての食品で2試料とも明確なバンドが検出された。

3-4 加工食品からのRRS挿入遺伝子の検知

RRS挿入遺伝子の検知について調べるため、各食品2試料ずつから抽出したDNA溶液を用いて、RRS-01・GMO7/8・Sttmf3a/r2aを使用してPCRを実施した。この結果、陽性バンド検出状況は、表4・表5のとおり

であった。

表4 RRS挿入遺伝子の定性検査(個別結果)

食品	RRS-01		GMO7/8		Sttmf3a/r2a	
	a-1	+	-	-	-	-
a-2	+	+	+	+	+	+
a-3	+	+	+	+	+	+
a-4	+	+	+	+	+	+
a-5	+	+	+	+	+	+
a-6	+	+	-	-	+	+
a-7	+	+	+	-	+	-
a-8	-	-	-	-	+	-
b-1	+	+	+	+	+	+
b-2	+	+	+	+	+	+
b-3	+	+	+	-	+	+
b-4	-	-	+	+	+	+
b-5	-	-	-	-	-	-
b-6	+	+	+	+	+	+
c-1	+	+	+	-	+	-
c-2	+	-	+	+	+	+
c-3	-	-	-	-	+	-
c-4	+	-	-	-	+	-
d-1	+	-	+	-	-	-
d-2	-	-	-	-	-	-
d-3	-	-	-	-	-	-
d-4	+	-	-	-	-	-

a:かまぼこ類 b:キョウザ類 c:仏類 d:即席めん類

+: 陽性 -: 陰性

表5 RRS挿入遺伝子の定性検査(まとめ)

結果	食品数
3プライマー対で+/+	7
3プライマー対で+/+又は+/-	4
2プライマー対で+/+又は+/-	4(3)
1プライマー対で+/-	4(2)
3つのプライマー対とも-/-	3

+: 陽性 -: 陰性 ()内: RRS-01の数

3-5 定量検査(目安としての参考値)

定性検査で検出されたRRS挿入遺伝子が、大豆中にどの程度の割合で含まれているか把握することを目的として、定性検査で使用したDNA抽出液を用いて、大豆穀粒中RRS挿入遺伝子含有率測定のための定量PCR法⁹⁾を実施した。結果は表6に示すとおりで、作物由来DNAのコピー数がRRS含有率5%を判断可能と考えられる、レクチン由来遺伝子のコピー数が概ね1330コピー以上である14食品について、RRS由来

DNAコピー数は、定量下限の63コピー⁹⁾未満であった。

表6 定量検査結果

食品	作物由来 DNA (コピー)		RRS 由来 DNA (コピー)	
a-1	360	310	< 63	< 63
a-2	3900	3900	< 63	< 63
a-3	8200	5500	< 63	< 63
a-4	22000	9500	< 63	< 63
a-5	2900	2800	< 63	< 63
a-6	3100	2800	< 63	< 63
a-7	2900	2200	< 63	< 63
a-8	< 63	< 63	< 63	< 63
b-1	2200	1900	< 63	< 63
b-2	7300	6100	< 63	< 63
b-3	3000	3000	< 63	< 63
b-4	1800	1700	< 63	< 63
b-5	170	150	< 63	< 63
b-6	12000	2900	< 63	< 63
c-1	2200	1900	< 63	< 63
c-2	2300	2200	< 63	< 63
c-3	2100	2100	< 63	< 63
c-4	< 63	< 63	< 63	< 63
d-1	< 63	< 63	< 63	< 63
d-2	< 63	< 63	< 63	< 63
d-3	< 63	< 63	< 63	< 63
d-4	< 63	< 63	< 63	< 63

a:かまぼこ類 b:キョウザ類 c:仏類 d:即席めん類

4. 考 察

今回の調査において、定性検査におけるRRS挿入遺伝子検知用プライマーは、JAS分析試験ハンドブック⁸⁾に示されたRRS-01の他、加工時のDNAの分断・除去等の可能性を考慮し、他に2種類使用した。

3-1の結果から、各プライマーとも非特異的な増幅は認められず、今回用いた増幅条件で検査可能と判断された。

3-2の結果から、RRS挿入遺伝子検知に用いたプライマーは、いずれも感度が高く、反応溶液中に数コピー存在すれば検出できることが判った。

3-3の結果、調査に用いた全ての食品から大豆に内在する遺伝子が検出されたため、これらがRRSを含有するか否かを調べる事が可能と判断した。

3-4の結果について、各食品2試料から抽出した

片方でも検出された場合に陽性と判断すると、RRS-01で22食品中16食品(73%)、プライマー3種類全てでは11食品(50%)が陽性であった。表示の省略が可能な加工食品であっても、多数にRRS挿入遺伝子が検出されることが判明した。

加工食品中のRRSの含有率測定については、JAS分析試験ハンドブック⁸⁾に、「本マニュアル記載の定量法を用いて加工食品中の遺伝子組換え体の混入率を測定することは、試料中の大豆若しくはトウモロコシ中の内在性遺伝子と組換え遺伝子の加工に伴う分解率が同じであると仮定した場合には可能である。しかしながら、複数の組換え体加工品を原料とする加工食品では、原料間でDNA分解率が異なり、PCRの鋳型として機能する長さのDNAは一定でないため、そのような試料中のGM農産物の混入を測定することは目安程度にしかならない。」旨記載されている。また、今回と同じ抽出・定量法で、RRSが1及び5%含まれる5種類の加工食品の測定について検討した報告¹⁰⁾においては、検討に用いた加工食品の含有率は、原材料と等しいか増加のいずれかであったことが記されている。3-5においては、これらを考慮した上で、目安としての参考値を得るために検査を実施した。食品衛生法においては、分別生産流通管理を行った上での意図しない混入の範囲として認められるのは、5%以下とされている。当所のRRS含有率測定における各遺伝子のコピー数の定量下限は、既報⁹⁾のとおり63コピーであるから、5%の含有を判断するためには、レクチン由来遺伝子のコピー数が概ね1330コピー以上必要である。これに該当する食品は14食品で、これらについてRRS由来のコピー数は、いずれも定量下限に満たなかった。あくまで目安としての検査であるが、この結果と前述の報告¹⁰⁾を考慮すると、これら14食品について、含有率は5%未満と考えられる。そこで、これらは、意図しない混入が検出されたものと考えられた。

以上の結果から、現状の定性検査の検知技術で、表示の省略が可能な量の範囲で植物性たん白等を

使用した多数の食品から、原料となった大豆に5%未満含まれるRRSを検出できる状況にあることが判明した。

欧州連合においては、遺伝子組換え作物およびその加工品を原料として使用している場合、全て表示すること¹⁰⁾となっている。総務省が実施したアンケート調査¹²⁾では、84%の人が「遺伝子組換えが行われた農産物を原材料として使用しているのであれば、使用した量の多少にかかわらず遺伝子組換えに関する表示をして欲しい」と回答している。今後の表示のあり方が、これらの状況を考慮した上で進展することを期待したい。

5. 結 語

遺伝子組換え食品の使用に関する表示の省略が可能な食品における遺伝子組換え作物挿入遺伝子の検出状況を把握することを目的として、PCRにより、表示の省略が可能な量の範囲で植物性たん白が使用されている食品からのRRS挿入遺伝子の検出を試みた。この結果、現状の定性検査の検知技術で、表示の省略が可能な量の範囲で植物性たん白等を使用した多数の食品から、原料となった大豆に5%未満含まれるRRSを検出できる状況にあることが判明した。

6. 文 献

- 1) 農林水産省食品流通局長通知：加工食品品質表示基準等の設定について、平成12年4月4日 12食流第599号
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知：食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について、平成13年3月15日 食発第79号
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課長・監視安全課長通知：遺伝子組換え食品に関する表示について、

平成13年3月21日 食企発第3号・食監発第47号

- 4) Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, et al: Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, J AOAC Int 85, 1077-89, 2002
- 5) Meyer R, Jaccaud E: Detection of genetically modified soya in processed food products, Proceedings of the Euro Food Chem conference 1, 23-28, 1997
- 6) Marc V, Hans P, Francois G, et al: Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods, J Agric Food Chem 47, 5261-66, 1999
- 7) 厚生労働省医薬局安全食品部長通知：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18年6月29日 食安発第0629002号
- 8) 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 改訂第2版、平成14年6月20日
- 9) 扇谷陽子, 相澤博, 大川一美他: ラウンドアップ・レディ・大豆の定量PCRによる含有率の測定～定量限界の検討～, 札幌市衛生研究所年報, 31: 41-47, 2004
- 10) Yoshimura T, Kuribara H, Kodama T, et al: Comparative studies of the quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using trial producing, J Agric Food Chem, 53, 2060-69, 2005
- 11) EC Regulation No.1829/2003 (September 22, 2003) Off J Eur Communities L268
- 12) 総務省行政評価局: 食品表示に関するアンケート調査結果, 平成14年7月 (<http://www.soumu.go.jp/s-news/2002/020705-1.html>)

Detection of Genetically Modified Soybean Gene in Processed Foods Containing Soy Protein

Yoko Ogiya, Hiroshi Tsuboi, Taeko Miyashita and Kozo Fujita

The existence of genetically modified organisms (GMO) as an ingredient must be stated on a label of processed foods according to the law, except for the case that the content of the GMO or processed foods made from GMO in the food ranks below third, or the amount of the GMO or processed foods made from GMO is less than 5% of total weight of the food. In order to detect GMO in processed foods with label that they contain soy proteins but none of GMO, we determined genes derived from genetically modified soybean (RoundUp ReadyTM soybean; RRS) in 22 processed foods by polymerase chain reaction (PCR). For qualitative test, we used three primer pairs named RRS-1, GMO7/8, and Sttmf3a/r2a for RRS-derived genes as well as a primer pair "Le1-n02" for lectin gene as a control. The RRS-derived genes could be detected in 16 (73%) and 11 (50%) out of the 22 processed foods by RRS-1 and all the three primer pairs, respectively, whereas the lectin gene was detected in all samples. Quantitative analysis implied that contamination of soybean with RRS was detected by this highly sensitive qualitative method. We concluded that this qualitative PCR method can be used to detect RRS gene in various processed foods including those expected to contain a small amount of RRS.