

遺伝子組換え大豆の検査キットを用いた検出

三枝静江

Detection and Quantification of Genetically Modified Soybeans Using the Test Kits Based on Immunoassay and Polymerase Chain Reaction

Shizue Saegusa

A genetically modified (GM) soybean, Roundup Ready™, is authorized and utilized for foods in Japan. In this report, it was examined whether American (IOM) and domestic (Fukuyutaka) soybean samples contained GM soybeans using three commercially available test kits. The CP4EPSPS protein, which Roundup Ready™ crops express, was detected in American but not in domestic soybean samples using the lateral flow test kit. This kit was designed for the qualitative determination of the CP4EPSPS protein. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed that American soybean samples contained 0.85% Roundup Ready™ soybeans. However, domestic soybean samples contained Roundup Ready™ soybeans below detection limit. The kit based on polymerase chain reaction (PCR) confirmed that only American but not domestic soybean samples contained the DNA inserted in Roundup Ready™ soybeans, which produces CP4EPSPS protein.

(Accepted Feb. 21, 2002)

近年の科学技術の発展に伴い、遺伝子組換え技術を用いた農作物が多く開発されるようになった。食品としても流通するようになり、日本においても、安全性が確認された大豆やトウモロコシなどの商品化が可能となっている。このような状況の中、消費者の商品選択の自由を確保するなどのために表示を求める声が強くなり、2001年4月より遺伝子組換え農作物とそれを原料とした食品に対する表示が義務化された^{1)~4)}。この表示制度の運用や、未認可遺伝子組換え農作物の混入防止のために、組換え体の検知技術が必要とされ開発されている。既に国や自治体、検査機関、食品会社などにおいて検査が行われており、数種類の検査キットも販売されている。現在用いられている検査方法としては、酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を用いて組換え遺伝子によって発現した蛋白質を検知する方法^{5)~7)}や、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) を用いて組換え遺伝子を増幅して検知する方法^{7)~13)}などがある。今回、市販の検査キットを用いて、国産と米国の2種類の

大豆試料に関し、日本においても食品としての安全性が確認されている Monsanto 社の除草剤 Roundup 耐性大豆 (Roundup Ready™大豆) 混入の検査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料、試薬および検査キット

試料となる大豆は、国産大豆 (フクユタカ) および米国産大豆 (IOM) を約 300g ずつ高速回転式粉碎机 (三田村理研工業) で 500 μ m メッシュを用いて粉碎したものを検査に用いた。

検査キットは、ラテラルフロー法として、Roundup Ready™ 作物に発現する蛋白質 CP4EPSPS を検出する Strategic Diagnostics Inc. (SDI) 社製 <Trait>GR 大豆バルクテストを、ELISA 法として、CP4EPSPS を検出する SDI 社製 <GMO>大豆キットおよび、定量用標準試料として SDI 社製 GMO 大豆全粒粉用標準を用いた。PCR に用いる DNA の抽出には Qiagen 社製 DNeasy Plant Mini Kit を用い、PCR には CP4EPSPS

遺伝子を検出する宝酒造(株)製 PCR Screening Kit for GM Soybean Ver.2.0 を用いた。アガロースは、宝酒造(株)製 Agarose L03 「TaKaRa」を用いた。DNA マーカーは宝酒造(株)製 ϕ X174-*Hinc* II digest および λ -*Hind* III digest を用いた。水はラテラルフロー法および ELISA 法には滅菌蒸留水を、PCR には滅菌超純水を用い、試薬はすべて特級品を用いた。

2. ラテラルフロー法

<Trait>GR 大豆バルクテスト (SDI 社) に記載された方法に準じて検査を行った。すなわち、大豆粉末が全て浸る程度に滅菌蒸留水を加えて約 10 秒間試験管ミキサー (Scientific Industry 社, VORTEX-GENIE 2) で振とうし、さらに上澄み液が生じる程度に蒸留水を加えて振とうした。上澄み液 0.5ml を付属の 1.5ml チューブに移し、Sample Buffer を 3 滴加えて混合した。その溶液につかるようにテストストリップを垂直に静置し、10 分経過した時点でテストストリップの表示部を観察し、コントロールラインとテストラインが 2 本現れたものを陽性、コントロールライン 1 本だけが現れたものを陰性、1 本も現れなかった場合はそのテストを無効と判断した。

3. ELISA 法

<GMO>大豆キット (SDI 社) に記載された方法に準じて検査を行った。すなわち、100US メッシュ (150 μ m) のふるいを通る粒子になるまで粉碎した大豆粉末および、Roundup ReadyTM 大豆をそれぞれ 0, 0.3, 1.25, 2.5% 含んだ 4 種類の大豆全粒粉標準試料を 0.5g ずつ 15ml 遠沈管に量り採り、Soya Extraction Buffer 4.5ml を加え、試験管ミキサーで約 10 秒間振とうした。高速冷却遠心機 (日立工機(株), CR20B2) を用いて 5000rpm で 15 分間遠心分離し、上清を新しい 15ml 遠沈管に移して抽出液とした。Soya Assay Buffer 280 μ l が入った試験管に抽出液 20 μ l を加えて混合し、さらにその混合液 20 μ l を Soya Assay Buffer 380 μ l が入った試験管に移して混合したものを試料液とした。

試料液 100 μ l を ELISA プレートの各ウェルに滴下し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置後 Wash Buffer で 3 回洗浄し、あらかじめ調整しておいた Reconstituted and Diluted Soya Conjugate Mix 100 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。Wash Buffer で 3 回洗浄し、Color Reagent 100 μ l を加え、室温で 10 分間静置した後、Stop Solution 100 μ l を加えて反応を停止した。反応停止後、マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラド ラボラトリ

ーズ(株), Model 550) を用いて 450nm の波長で吸光度を測定し、大豆全粒粉標準試料の測定値を用いて作成した検量線から未知試料の Roundup ReadyTM 大豆の混入率を求めた。結果は、1 種類の試料液に対して 2 ウェルずつ行った平均値を用いて算出した。

4. PCR 法

(1) DNA 抽出

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) に記載された方法に準じて抽出を行った。すなわち、粉碎した大豆粉末 100mg を 2ml マイクロチューブに量り採り、Buffer AP1 1ml と RNase A 4 μ l とを加えて試験管ミキサーで混合し、65 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した。次に Buffer AP2 300 μ l を加えて混合し、5 分間氷上に静置した。その後 12000rpm で 10 分間遠心し、QIAshredder spin column に負荷した後、12000rpm で 2 分間遠心し、沈殿を吸わないように溶出液を新しいチューブに移した。そこに Buffer AP3/E を 1.5 倍量加えてすぐに混和し、DNeasy mini spin column に 650 μ l ずつ負荷し、12000rpm で 1 分間遠心して溶出液を捨てた。Spin column に Buffer AW 500 μ l を負荷して 12000rpm で 2 分間遠心する操作を 2 回繰り返し溶出液を捨てた。Spin column からの溶出液を受けるマイクロチューブを新しいものに交換し、あらかじめ 65 $^{\circ}$ C に温めておいた Buffer AE 50 μ l を加えて 5 分間静置した後、12000rpm で 2 分間遠心し、DNA 溶液を得た。

抽出 DNA 溶液の純度および濃度の検討は、吸光度の測定と電気泳動により行った。吸光度による検討は、分光光度計 (那珂インストロメント(株), Gene Spec III) で 230, 260, および 280nm の吸光度を測定し、吸光度比 260nm/230nm から夾雑物、260nm/280nm から蛋白質の割合を推定し、260nm/230nm > 2, 260nm/280nm = 1.7~2.0 のものを PCR に用いた。DNA 濃度は 1A₂₆₀ unit = 50 μ g/ml で算出し、滅菌水で 2 μ g/ml に調整し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。また電気泳動は、電気泳動槽 (コスモバイオ(株), Mupid-21) を用いて 0.8% アガロースゲルにより TAE 緩衝溶液中で 100V で行った後、GelStar Nucleic Acid Gel Stains (BMA 社) で染色し、紫外線照射装置 (アトー(株), DT-20 型) 上で撮影し、純度を検討した。

(2) PCR 条件

PCR Screening Kit for GM Soybean Ver.2.0 (宝酒造(株)) の説明書に記載された方法で検査を行った。GM-Soybean PCR Mixture 1 が 20 μ l 入った 0.2ml PCR チューブに GM-Soybean PCR Mixture 2 を 5 μ l

と、2 μ g/ml に調整したサンプル DNA 溶液を 25 μ l 加え、全量を 50 μ l にした。また DNA 溶液の代わりに滅菌水を 25 μ l 加えたものを陰性対照、付属の TEST template for GM-Soybean 5 μ l と滅菌水 20 μ l を加えたものを陽性対照として、サンプルと同様の PCR を行った。PCR チューブを GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) にセットして、94 $^{\circ}$ C で 2 分間反応後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして 40 サイクルを行った。最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間保った後、4 $^{\circ}$ C で保存した。

PCR 終了後の反応溶液 10 μ l を 2% アガロースゲルにより TAE 緩衝液中で 100V で電気泳動し、GelStar Nucleic Acid Gel Stains で染色し、紫外線照射装置上で撮影し、Roundup ReadyTM 大豆が混入しているか判定した。

実験結果及び考察

1. ラテラルフロー法による定性検査

図 1 に示すように、国産大豆ではコントロールラインのみが現れたので、Roundup ReadyTM 大豆の混入は陰性と判断した。米国産大豆ではラインが 2 本現れたので陽性と判断した。

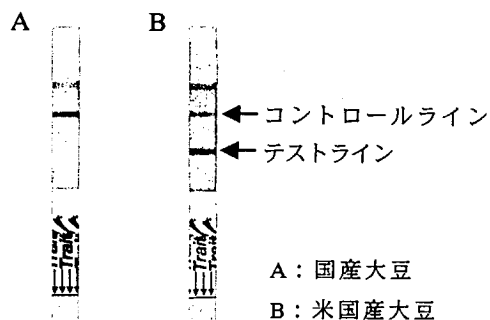


図 1 ラテラルフロー法による定性検査

この検査キットは、Roundup ReadyTM 大豆が特異的に発現する蛋白質を検出するため、加熱や酸などにより蛋白質が変性して抗体との特異性が減少または喪失したものについては、適切な検査が不可能である。またこの検査は、用いたサンプル中に Roundup ReadyTM 大豆が含まれているかいないかを判定するものであり、検出感度は 0.1% である。このラテラルフロー法を用いて Roundup ReadyTM 大豆の混入率を求めることを考えた場合、1 粒ずつ全数検査を行えば可能であるが、それは現実的な方法ではない。しかしながらポアソンの定理を用いることにより、このテストストリップを

複数用いて統計的に選択された複数試料の検査を行えば、その結果から母集団が陽性か陰性かを判定出来ると同時に、その確率を示すことも可能になり、混入率を推計できる⁵⁾。

また、日本において安全性未審査のトウモロコシ CBH351 の検査を行う際にも、穀粒の場合はこのラテラルフロー法での検査が可能であり、<Trait>コーンバルクテスト Bt9 (SDI 社) を用いて混入の有無を判定できる⁷⁾。

この検査は短時間で特別な機械を用いずに行えるため、現場などでのスクリーニング試験において有用である。

2. ELISA による定量検査

Roundup ReadyTM 大豆の混入率は、検量線から算出した結果、国産大豆では検出限界以下、米国産大豆では 0.85% であった (表 1)。

表 1 ELISA 法による定量検査

	吸光度	混入率 (%)
国産大豆	-0.007	未検出
米国産大豆	0.856	0.85

このキットでの検出限界は約 0.1%、定量範囲は 0.3 ~ 2.5% である。この検査はラテラルフロー法と同様に蛋白質を検出するものであり、加熱や酸などにより蛋白質が変性して抗体との特異性が減少または喪失したものについては、適切な検査が不可能である。しかし、未加工の大豆を粉砕した大豆全粒粉を用いて検査を行った場合は正確な検査が可能であり、その有効性も確認されている⁶⁾。

3. PCR による定性検査

抽出した DNA の電気泳動写真を図 2 に示す。国産大豆および米国産大豆ともに、DNA が抽出されていた。

PCR 法により、図 3 に示すように、国産大豆では全て大豆が持っている内在性遺伝子であるアクチン蛋白質遺伝子の増幅産物 (225bp) のみが見られたので Roundup ReadyTM 大豆の混入は陰性、米国産大豆ではアクチン蛋白質遺伝子の増幅産物 (225bp) および CP4EPSPS 遺伝子の増幅産物 (570bp) が見られたので陽性と判断された。また、陰性対照ではいずれの増幅産物も検出されず、陽性対照ではアクチン蛋白質遺伝子用プライマーによる増幅産物 (700bp) および

CP4EPSPS 遺伝子用プライマーによる増幅産物 (1000bp) が見られたので、PCR が正常に行われたことが確認された。

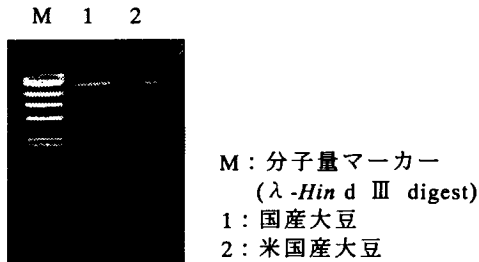


図2 抽出 DNA の電気泳動写真

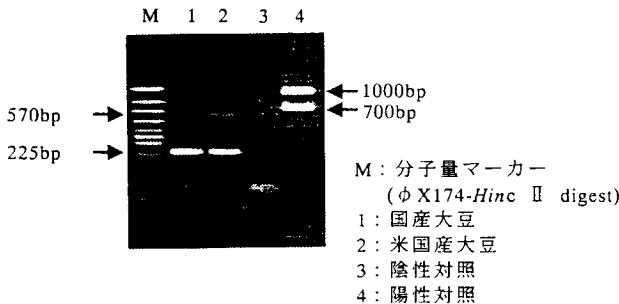


図3 PCR 法による定性検査

PCR 法による検出感度は PCR 条件やプライマーの配列によって異なってくるが、生大豆粉を用いて検査を行った場合、0.1%以下まで検出可能である^{9)~11)}。また DNA は蛋白質よりも分解されにくく、PCR では微量の DNA でも増幅し検出が可能であるため、加工食品の検査においても有効とされる^{10)~12)}。遺伝子組換えに関する表示の対象となっている加工食品は、組換えられた DNA が残存するとして表示が義務付けられたので、これらの食品から適切な方法¹³⁾で DNA を抽出すれば PCR による検出が可能ははずである。しかしながら同じ種類の食品でも、その加工工程の違いから DNA の分解の程度が異なるので、必ずしも PCR が可能な DNA が抽出できるわけではなく、検出できない場合もある¹¹⁾。

また、PCR の増幅の様子を経時的に測定できるリアルタイム PCR 装置を用いて、該当する農作物が必ず

持っている内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の比率から、組換え農作物の混入率を相対的に求める定量検査方法もある⁷⁾⁸⁾¹³⁾。

上記で紹介したものを含めて遺伝子組換え食品の検査法について、農林水産省¹³⁾および厚生労働省⁷⁾から公表されている。

遺伝子組換え農作物は、農業生産力の向上のほか、有用物質の生産や健康機能性の付与などさまざまな可能性をもっている。遺伝子組換え技術の開発を進めると同時に、環境や人体に対する安全性の確保、社会的な理解と受入れ体制の確立などの問題も解決する必要がある。また消費者の商品選択のための表示制度と、その表示制度を運用していくための標準検査方法を確立していくことも必要であろう。また、食品が国を超えて流通している現在、国際的な基準作りも必要である。

要 約

3種の市販検査キットを用いて、国産および米国産大豆穀粒への Roundup ReadyTM大豆混入を調べた。Roundup ReadyTM大豆に発現する蛋白質 CP4EPSPS を検出するラテラルフロー法では、国産大豆は混入陰性、米国産大豆は陽性となった。同様に CP4EPSPS を検出する ELISA 法では、混入率既知の標準物質の測定値から算出した結果、国産大豆では検出限界以下、米国産大豆では混入率 0.85% という結果を得た。また CP4EPSPS 遺伝子を増幅して検出する PCR 法では、国産大豆で陰性、米国産大豆で陽性となった。本報告では3種の方法で混入に関し一致した結果を得たが、これは未加工の大豆穀粒を用いたために、蛋白質や DNA がほとんど分解しておらず、検査を行うのに十分な蛋白質や DNA を抽出することができたためと考えられた。検査対象、時間やコストなどを検討し、より適切な方法を選んで行うことが必要である。

文 献

- 1) 農林水産省、遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準、農林水産省告示第517号、平成13年9月28日改正。
- 2) 農林水産省食品流通局、遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について、12食流第1775号、平成13年3月19日改正。

三枝：遺伝子組換え大豆の検査

- 3) 厚生労働省医薬局，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，食発第 79 号，平成 13 年 3 月 15 日。
- 4) 厚生労働省医薬局，遺伝子組換え食品に関する表示について，食企発第 3 号，食監発第 47 号，平成 13 年 3 月 21 日。
- 5) 伊藤泰彦，遺伝子組み換え大豆の検査技術，デ일리ーフード夏季号 大豆と技術，**20**，66-71 (2000)。
- 6) Lipp, M., Anklam, E. and Stave, J. W., Validation of an Immunoassay for Detection and Quantitation of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study, *J. AOAC Int.*, **83**, 919-927 (2000)。
- 7) 厚生労働省医薬局，組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（一部改正），食発第 241 号，平成 13 年 9 月 14 日。
- 8) 松岡猛，日野明寛，遺伝子組換え体の検知技術の開発の現状，農林水産技術研究ジャーナル，**24** (4), 28-33 (2001)。
- 9) Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E., IUPAC Collaborative Trial Study of a Method To Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder, *J. AOAC Int.*, **82**, 923-928 (1999)。
- 10) Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. and Kroath, H., Genetically Modified Organisms in Food-Screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5038-5043 (1999)。
- 11) 松岡猛，川島よしみ，穂山浩，三浦裕仁，合田幸広，瀬畑環，一色賢司，豊田正武，日野明寛，ダイズ及びダイズ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 (2000)。
- 12) 門間公夫，佐々木城子，牛尾房雄，齋東由紀，市川久次，松岡猛，西島基弘，日野明寛，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) 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」改訂第 1 版，平成 13 年 5 月 25 日。
(平成 14 年 2 月 21 日受理)