

遺伝子組換え検査のための豆腐・豆乳からの簡便迅速なDNA抽出法

誌名	育種学研究 = Breeding research
ISSN	13447629
著者名	小林, 括平 宗村, 郁子 内宮, 博文 山村, 三郎
発行元	日本育種学会
巻/号	9巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 21-25
発行年月	2007年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ノート

遺伝子組換え検査のための豆腐・豆乳からの簡便迅速な DNA 抽出法

小林 括平・宗村 郁子・内宮 博文・山村 三郎

(財) 岩手生物工学研究センター, 北上市, 〒024-0003

Simple and Rapid DNA Extraction from Tofu and Soy Milk for the Detection of Contaminating GMO

Kappei Kobayashi, Ikuko Munemura, Hirofumi Uchimiya and Saburo Yamamura

Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami, Iwate 024-0003, Japan

キーワード

遺伝子組換え, ダイズ, 加工食品, 検査, DNA 抽出, PCR

緒言

植物分子生物学の発展によってこれまでにさまざまな新形質を持つ植物が遺伝子組換え法によって作られ, それらの一部は商業栽培に供されてきた。それらの遺伝子組換え (GM) 植物は, 農業生産の安定化, 省農薬および農業労働の軽減等を可能にし, 食料生産に大きく寄与している (立川 2005)。しかし一方で, GM 作物の食品としての安全性や環境影響に対する懸念を示す消費者等もあり, 我が国では GM 作物の商業栽培はこれまで行われていない。消費者の GM 作物由来の食品に対する忌避感の背景には, GM 技術に対する不十分な理解に加えて食品安全性の管理に対する不信感すなわちリスクコミュニケーションの不足がある (小林・草深 2005)。これを払拭するための行政の取り組みとして, GM 作物由来の材料を含む食品への表示の徹底のための法改正 (農林水産省 2002) やダイズ加工食品の大規模検査 (農林水産省 2005) 等が行われてきた。これらの努力によって消費者による GM および非 GM 食品の選択が保証されることは, 食用作物の分子育種に関する研究開発の促進および GM 作物の普及にとって重要なことである。一方, 輸入作物を原材料として食品を製造する加工業者にとっては, GM 作物が非 GM 作物に混入することに対する懸念が高まる状況にある。意図せざる混入によって基準値以上の GM 作物由来の材料を含む食品が市場に出回る事態になれば, 食品安全性管理に対する信頼も失われ, GM 作物の普及を非常に困難なものにすると懸念される。これを防ぐためには, 行政による検査だけではなく, 加工業者やその団体による自主的な検査が重要と考えられる。

GM 作物の検査は, 国立研究機関を中心とするグルー

プによって信頼性の高い方法が確立され, 公定法として定着している (日野 2005)。加工業者等による自主的な検査も公定法を利用することになるが, 一回の検査あたりのコストが高く, 広範な自主検査の障壁となっている。本研究では, ダイズおよびダイズ加工食品における GM 作物の遺伝子検査に関して, まず公定法の実施可能性と信頼性を確認し, 市販されている豆腐について予備的な検査を行った。さらにダイズ加工食品からの簡便迅速かつ廉価な DNA 抽出法について検討した。

方法および結果

ダイズ等の GM 作物由来材料の混入率検査の公定法として「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」(農林水産消費技術センター 2002) に基づいた定量および定性検査法 (以下 JAS 法) が確立されており, 全国規模の調査だけではなく, 自治体レベルでの調査にも用いられている。本研究では, ダイズから抽出した DNA を用いて JAS 法を追試し, その信頼性を確認した。ついで, 市販豆腐について JAS 法による検査を行い, 市販豆腐における GM 混入率について検討した。その過程で, JAS 法で推奨する DNA 抽出法は高コストでかつ長時間を要するため, 改善の余地があると考えた。そこで, 豆腐および豆乳からの簡便迅速かつ廉価な DNA 抽出法について, JAS 法の定量 PCR に適用可能か否か検討した。

1. JAS 法の実施可能性

材料として Roundup Ready ダイズ (RR ダイズ) を使用した。RR ダイズおよび非遺伝子組換えダイズを秤量し, 全量を 100 g としてさまざまな割合 (表 1) で混合後, JAS 法に従い, DNeasy Plant Maxi kit (キアゲン, 東京) を用いて DNA を抽出した。得られた DNA を JAS 法に従い定量 PCR によって分析した。プローブとプライマーのセッ

表 1. GM 混合ダイズ DNA の定量 PCR 解析

混合率 (%)	反復 ¹⁾ (回)	測定値 ²⁾ (平均 %)
1	4	0.89
3	2	2.48
5	8	4.60
6	2	5.44
10	2	8.65
15	2	14.99

¹⁾独立した DNA 抽出および測定回数。²⁾JAS 法の定量 PCR によって求めた値。

ト、標準 DNA はニッポンジーン（富山）から、PCR マスターミックスはアプライドバイオシステムズ（東京）から購入した。定量 PCR 装置は、アプライドバイオシステムズの 7500 Real Time PCR system を用いた。1～15% の範囲の GM ダイズを混合したものから抽出した DNA について定量 PCR 法で検討した結果、重量比とほぼ同等の DNA コピー数比が得られた（表 1）。全ての実験区で DNA コピー数比は、重量比よりもやや低値を示したが、これは用いた非 GM および GM ダイズの品種、産地等が異なるため、DNA の含有量および／または抽出効率が両者で異なったか、あるいは用いた GM ダイズが劣化していたためと考えられる。

次に、市販豆腐について JAS 法により GM ダイズの混入を検討した。検討した商品 24 点中、3 点で JAS 法の定量 PCR の測定限界（0.1%）未満の RR ダイズ特異的な配列（RRS 配列）が検出され、その他では検出されなかった（表 2）。そこで、これら全てについてより高感度の定性 PCR を行い、定量 PCR で非検出だった試料では、全く GM ダイズ由来の成分が含まれていないのか否かを検討した。この PCR には、プライマーとして F215a（5'-GCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAA-3'）および R344（5'-GGATTAAGGGTTTGATCCCTTG-3'）を用い、94°C（3 分）の後、94°C（20 秒）、60°C（20 秒）、72°C（30 秒）のステップを 45 サイクル繰り返し、72°C（3 分）で反応を完結させた。PCR 装置は、アプライドバイオシステムズの GeneAmp PCR system 9700 またはタカラバイオの PCR Thermal Cycler MP を用いた。プライマーはデータベース上の配列（Glycine max transgenic cp4epsps gene for 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase class 2 precursor, complete cds; Accession No. AB209952）をもとにデザインした。その結果、13 点で RRS 配列が検出されたが、この中に原材料の産地として国内を示す表示のあるものはなかった（図 1 および表 2）。また、定量 PCR で 0.1% 未満の RRS 配列が検出された試料では、検出されなかったものよりも濃いバンドが検出されたこと、およびプラスミドクローンをを用いた標準試料との比較から、定性試験でのみ陽性だった豆腐における GM 混入率は 0.01% 程度であると推定された。以上の結果から、現時点でダイズ加工食品の製造に供されている輸入ダイズは

表 2. 市販豆腐における GM 混入に関する定量試験と定性試験

No.	商品の種類	製造元	混入率 (%) ¹⁾	定性試験 ²⁾
1	もめん、無農薬	A	—	+
2	もめん	B	—	—
3	きぬ、国産	C	—	—
4	やき	A	—	+
5	きぬ	D	—	+
6	もめん、国産	C	—	—
7	きぬ、有機	C	—	—
8	もめん	D	—	+
9	きぬ	E	—	+
10	よせ豆腐、国産	E	—	—
11	よせ豆腐	E	—	+
12	よせ豆腐、国産	E	—	—
13	きぬ	C	—	—
14	もめん、国産	F	—	—
15	もめん	F	(0.027)	+
16	もめん、有機	C	—	—
17	充填、きぬ、味付	C	—	+
18	もめん	E	—	+
19	焼	E	—	+
20	充填、きぬ、味付	F	(0.057)	+
21	充填、きぬ	C	—	—
22	充填、きぬ	F	(0.035)	+
23	充填、きぬ、味付	E	—	+
24	充填、きぬ	E	—	—

¹⁾JAS 法の定量 PCR によって求めた値。測定限界の 0.1% 未満の値は、括弧内とした；—、不検出。²⁾定性 PCR の結果。+、検出；—、不検出。

充分分別した上で集荷されたものであると考えられた。また、JAS 法による GM ダイズ混入率の測定は、定量 PCR のためのリアルタイム PCR 装置を除けば通常の分子生物学実験室の設備で充分行うことができる。

2. 簡便迅速かつ廉価な DNA 抽出法の検討

上述のように JAS 法は信頼性が高く、検査機関等であれば概ねどこでも実施可能であるが、一つの問題点は DNA 抽出の操作に時間を要するためにスループットが低く、また、高価なキットを用いることである。この点について改善する目的で、より迅速かつ廉価な方法について検討した。市販豆乳、10% GM 混合ダイズから定法によって調製した豆乳、および市販の豆腐を等量の滅菌水と混合し、乳鉢中で摩砕したものを DNA 抽出の出発材料とした。試料の可溶化にはカオトロピックイオンを含む Buffer QG（キアゲン、東京）を、DNA 精製キットは QIAprep Spin Miniprep kit（キアゲン、東京）を用いた。

1 ml の豆乳または豆腐摩砕液に 3 ml の Buffer QG を加え、室温に 10 分間放置した。この時、試料はほぼ透明になったが、油滴様の微小な粒子が認められた。この試料液 750 μ L を QIAprep スピニングカラムに加えて DNA を吸着させようと試みたが、不溶成分のためカラムがつまり、DNA を吸着・精製することはできなかった。Buffer QG

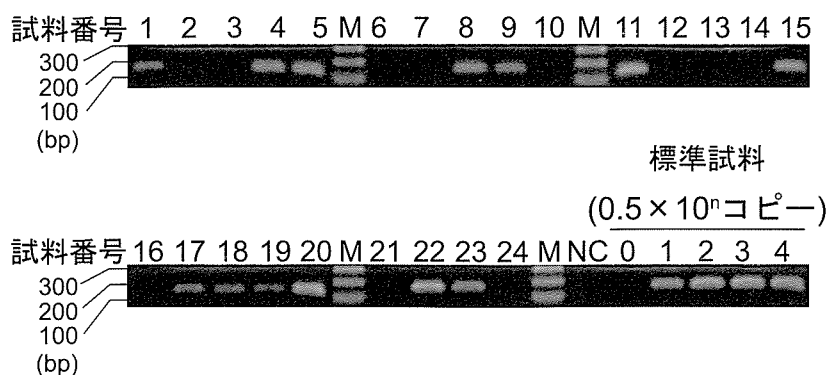


図 1. 豆腐 DNA の定性 PCR 解析.

試料番号は表 2 と符合する. 20 μ l で増幅反応を行った後, そのうちの 10 μ l を 1.5% アガロースゲルにて分析した. M, 分子量マーカー (250 ng); NC, 陰性対照; 標準試料, 増幅標的を含む領域を PCR で増幅後, クローン化したもの. 写真の左側に分子量マーカーの鎖長 (塩基対, bp) を示した.

表 3. DNA 抽出法によるダイズ加工食品からの DNA 収量の差異

実験	反復 ¹⁾ (本)	収量 ²⁾ (μ g/ml 出発材料)の平均値
ミ	市販豆乳 1 ³⁾	6
	市販豆乳 2	4
	市販豆腐 1	6
	市販豆腐 2	2
	市販豆腐 3	2
ニ	GM ダイズ豆乳 1	4
	GM ダイズ豆乳 2	12
	GM ダイズ豆乳 3	6
マキシ	市販豆乳 2	2
	GM ダイズ豆乳 1	2
	GM ダイズ豆乳 2	4

¹⁾ 独立した DNA 抽出および測定回数.

²⁾ A_{260} で測定した DNA 量.

³⁾ 市販豆乳・豆腐に付された番号は異なる商品であることを示す. GM ダイズ豆乳の番号は独立に調製されたものであることを示す.

で可溶化する際, 試料を 50°C, 10 分間熱処理したが, カラムのつまりは解消されなかった. そこで, Buffer QG で可溶化した試料を等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24:1; CI) で一回抽出したところ, その水層は透明であり, これをスピナカラムに通した時につまりが生じることはなかった. CI 抽出した試料液 750 μ L を通したカラムを Buffer PB および Buffer PE (いずれもキアゲン, 東京) で一回ずつ洗浄し, 50 μ L の Buffer EB で DNA を溶出した.

得られた DNA を 260 nm の吸光度で定量した結果を表 3 に示す. QIAprep Spin Miniprep kit を用いた場合 (以下, ミニ法) には, JAS 法で勧める DNeasy Plant Maxi kit (キアゲン, 東京) で抽出した場合 (以下, マキシ法) と同等以上の DNA 量が得られた. また, ミニ法では収量のばらつきが若干大きい傾向があった. 抽出された DNA を

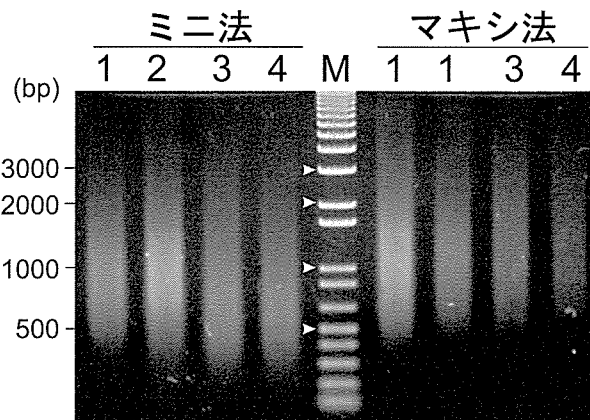


図 2. ミニ法およびマキシ法で抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動による解析. 1 および 2, 市販豆乳 1 (表 3); 3 および 4, GM ダイズ豆乳 2 (表 3). 1 レーンあたり 200 ng の DNA を 1% アガロースゲルにて分析した. M, 分子量マーカー (500 ng). 写真の左側に分子量マーカーの鎖長 (塩基対, bp) を示し, 該当するバンドを矢頭で示した.

260 nm の吸光度に基づいて 20 ng/ μ l に調製し, 10 μ l ずつアガロースゲル電気泳動で分析したところ, ほぼ同程度の蛍光強度のスメアが得られ, 260 nm の吸光度による定量結果が裏付けられた (図 2). また, ミニ法で抽出したものでは高分子量の DNA の割合が低く, 特に当研究室で調製した GM ダイズ豆乳においてその傾向は顕著であった (図 2). この結果と, マキシ法が高分子のゲノム DNA を調製することを目的にデザインされていることを考え合わせると, マキシ法では比較的高分子の DNA が選択的に抽出されるのに対し, ミニ法ではそのような選択性がないため, 低分子 DNA がより多く回収されたものと考えられる. また, 当研究室で調製した豆乳では, 市販のものよりも DNA の分解が進んでいることが示唆された.

10% GM 混合ダイズ由来の豆乳およびこれを同様に調

表 4. DNA 抽出法と GM 混入率計測効率

実験	材料 (GM 混入率; %)	抽出法	反復 ¹⁾	計測値 ²⁾ (%; 平均)	効率 ³⁾
1	豆乳 (10%)	マキシ	2	6.98	100
		ミニ	4	6.10	87.4
2	豆乳 (10%)	マキシ	4	6.91	100
		ミニ	6	8.27	119.7
3	豆乳 (5%)	マキシ	2	3.58	100
		ミニ	2	2.21	61.7
	豆乳 (2%)	マキシ	2	1.44	100
		ミニ	2	0.80	55.6
	豆乳 (1%)	マキシ	2	0.80	100
		ミニ	2	0.49	61.3
	豆乳 (0.5%)	マキシ	2	0.36	100
		ミニ	2	0.23	63.9
4	きぬごし豆腐	マキシ	2	0.023	100
		ミニ	2	0.018	78.3
	焼き豆腐	マキシ	2	0.010	100
		ミニ	2	0.010	100
	よせ豆腐	マキシ	2	0	—
		ミニ	2	0	—

¹⁾ 独立した DNA 抽出および測定回数。

²⁾ JAS 法の定量 PCR によって求めた値。

³⁾ マキシ法における混入率測定値の平均を 100 とした時の混入率測定値。

製した非 GM ダイズ豆乳で希釈し、5, 2, 1 および 0.5% GM としたものの抽出した DNA を用い、ミニ法およびマキシ法で調製した場合の、JAS 法の定量 PCR で算定される混入率を比較した (表 4)。マキシ法で調製した GM 混合ダイズ豆乳 DNA では、GM 混合ダイズから直接 DNA を抽出した場合と比較して低値を示したが、これは豆乳調製時の抽出効率が用いた GM ダイズと非 GM ダイズで異なっていたためと考えられる。ミニ法で調製した DNA では、マキシ法の場合よりも高値を示す場合もあったが、多くの実験でより低値を示した。このような差の生じる原因として、ミニ法では上述のように DNA の分解による影響が顕著であることが考えられた。

市販豆腐、3 商品について、同様にミニ法およびマキシ法で抽出した DNA を用いて GM 混入率を計測した (表 4)。ミニ法およびマキシ法で抽出した DNA からほぼ同等の結果が得られ、DNA の分解がより軽度と思われる試料においては、ミニ法とマキシ法における計測値の差異は研究室で調製した豆乳を用いた場合よりも小さく、無視できる程度と考えられた。また、同じ DNA 試料を高感度定性 PCR で分析したところ、ミニ法とマキシ法で同様な結果が得られ (図 3)、ミニ法によって抽出した DNA が定量および定性試験に十分使用可能であることが示された。

考 察

本研究では、ダイズおよびダイズ加工食品における GM

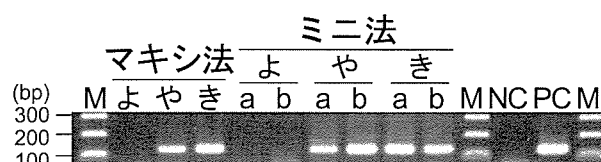


図 3. ミニ法およびマキシ法で抽出した豆腐 DNA の定性 PCR 解析。

よせ豆腐 (よ), 焼き豆腐 (や) およびきぬごし豆腐 (き) の 3 商品からミニ法およびマキシ法で抽出した DNA を用い、20 μ l で増幅反応を行った後、そのうちの 10 μ l を 2% アガロースゲルにて分析した。a, b はそれぞれが独立して調製された DNA 試料であることを示す。M, 分子量マーカー (250 ng); NC, 陰性対照; PC, 図 1 の標準試料 (500 コピー) を用いた陽性対照。写真の左側に分子量マーカーの鎖長 (塩基対, bp) を示した。

植物の遺伝子検査に関して、まず、公定法である JAS 法の信頼性と当研究施設における実施可能性について検討し、これらを確認した。さらに市販豆腐に関して GM 混入率を計測した。その結果、市販豆腐における GM ダイズの混入率は、法令で定められている意図せざる混入の上限値である 5% を大きく下回り、JAS 法の定量限界以下であることが示された。

JAS 法で推奨する DNA 抽出法であるマキシ法が、長時間の煩雑な操作を要し、さらに高価な DNA 抽出キットを用いる点を考慮し、本研究ではダイズ加工食品からの簡便迅速かつ廉価な DNA 抽出法について検討した。本研究で検討した DNA 抽出法、ミニ法では、操作が少ないため短時間で PCR での分析にたえる純度の DNA を調製することができた。また、必要な消耗品のコストは、マキシ法の約 2000 円に対してミニ法では約 300 円、すなわちミニ法ではマキシ法の約 1/7 と概算され、GM 混入遺伝子検査の迅速化と低廉化に大きく寄与する可能性がある。

ミニ法では、マキシ法に比べて収量が高かったが、これはミニ法において低分子 DNA を効率良く回収できたためである可能性が示された (図 2)。豆腐・豆乳では、その調製過程で DNA の分解が起こることが報告されており (Yoshimura *et al.* 2005)、実際、本研究においてマキシ法によって抽出した DNA の平均鎖長は 1000 ないし 2000 塩基対程度であった。このことから、ミニ法における、高分子 DNA よりも低分子 DNA を効率良く回収する特性は、豆腐や豆乳からの DNA 抽出に適合するものと考えられる。

JAS 法の定量 PCR による GM 混入率の検討において、ミニ法によって DNA を調製した場合、材料に依存して最大 45% 程度の誤差があった (表 4)。行政機関が商品の表示が適正であるかを確認することを目的に GM 混入率を検査しようとする場合には、この差は判定を左右しうるため、ミニ法を用いることについては議論の余地があらう。一方、現状の輸入ダイズの GM 混入率が上述の

ように 0.1% 未満であることから、加工業者が自主検査をする場合には法定の 5% 以下よりも厳しい基準、例えば 1% 以下を設定することによって DNA 抽出法によって生じるばらつきを十分に吸収できる。

本研究では、JAS 法の定量 PCR に加えて、およそ 0.01% までの微量の GM 混入を検出可能な定性 PCR を確立した。国産ダイズには流過程での GM 混入はあり得ないこと、および多くの豆腐製造業者が少数の生産ラインで国産ダイズ製品を含む種々の製品を製造している現状を考えると、材料の切換え時に国産ダイズ製品にごく微量の GM ダイズ由来成分が混入する可能性も否定できない。そのため、生産ライン上で GM ダイズ成分が国産ダイズ製品に混入することがないように、原料の切換え時等に検査を行うことが望ましい。本論文で述べた高感度定性 PCR は、このような用途にその有効性を発揮すると考えられる。

以上に述べたように、本研究で確立された 2 種類の技術、ミニ法による DNA 抽出および高感度定量 PCR は、ダイズ加工食品加工業者あるいはその業界団体が自衛的に行う自主検査、あるいは自治体が地元産業の保護を目的に行う検査において消耗品コストを低減し、さらに DNA 抽出の迅速化によって人件費の削減に有用である。

このような検査コストの削減により GM 混入の可能性のある食品について広く検査が行われ、GM 食品に関するリスクコミュニケーション（小林・草深 2005）において重要な消費者の選択権が保証されるものと期待される。

謝 辞

研究の過程で貴重なご意見を賜った岩手県豆腐流通協議会、株式会社黒川食品、黒川賢太郎氏、および岩手県農業研究センターに深謝申し上げるとともに、実験を手伝ってくれた小原和恵氏に感謝する。

引用文献

- 日野明寛（2005）農業および園芸 80: 192–201.
- 小林信一・草深美奈子（2005）農業および園芸 80: 220–226.
- 農林水産省（2002）告示第 334 号（食品衛生法施行規則第 21 条）
- 農林水産省（2005）プレスリリース：8 月 19 日
- 農林水産消費技術センター（2002）：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
- 立川雅司（2005）農業および園芸 80: 93–98.
- Yoshimura, T., H. Kuribara, T. Matsuoka, T. Kodama, M. Iida, T. Watanabe, H. Akiyama, T. Maitani, S. Furui and A. Hino (2005) J. Agric. Food Chem. 53: 2052–2059.