

## 大豆加工食品からの組換え遺伝子検知法の検討

門 間 公 夫\*, 中 里 芙 美 子\*, 松 本 智 行\*\*, 佐 藤 和 恵\*\*\*, 戸 部 徹\*\*\*,  
市 川 久 次\*, 松 岡 猛\*\*\*\*, 日 野 明 寛\*\*\*\*, 斉 藤 和 夫\*

### A Detection Method of the Recombinant DNA from Processed Foods of Soybean

Kimio MONMA\*, Fumiko NAKAZATO\*, Tomoyuki MATSUMOTO\*\*, Kazue SATOH\*\*\*, Takashi TOBE\*\*\*,  
Hisatsugu ICHIKAWA\*, Takeshi MATSUOKA\*\*\*\*, Akihiro HINO\*\*\*\* and Kazuo SAITO\*

**Keywords** : 遺伝子組換え体 genetically modified organism, 大豆 soybean, 加工食品 processed food, 豆腐 tofu,  
組換え DNA recombinant DNA, CTAB 法 CTAB-extraction, 抽出法 extraction method

### 緒 言

我が国においては、平成 8 年 9 月に遺伝子組換え技術によって作成された除草剤耐性大豆や害虫抵抗性トウモロコシ等 7 種の安全確認が厚生省（現厚生労働省）により行われて以来、平成 15 年 6 月の時点で 6 作物 47 品種の遺伝子組換え農作物の安全性審査が終了している。このような状況の中で消費者の遺伝子組換え食品に対する不安や食品を自由に選択したいという志向により、遺伝子組換え食品の表示を求める声が強くなってきている。これらを受け厚生労働省及び農林水産省は平成 13 年 4 月から遺伝子組換え食品に対する表示義務制度を施行した。これと同時に両省は大豆、トウモロコシ並びにジャガイモ等の農産物及び一部の加工品について組換え遺伝子の検知法を示した<sup>1,2)</sup>。組換え遺伝子の検査法には多くの加工食品に適応できる方法が求められる。そこで日本人になじみの深い大豆加工品について、著者らが従来から大豆及び豆腐からの組換え遺伝子の検知に用いてきた CTAB 法<sup>3,4)</sup>、プロティナーゼ K で処理を行う PK 法<sup>5)</sup>及び平成 13 年 4 月に農林水産消費技術センターより示された「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」に準じた方法<sup>2)</sup>（以下 CTAB-PK 法とする）の 3 種の DNA 抽出法について、検知感度の比較を行ったので報告する。

### 材料と実験方法

#### 1. 試料

実験に用いた大豆加工品の豆腐、煮豆、きな粉、調製豆乳、納豆、干し湯葉、生揚げ、油揚げ及びみそは平成 13 年 2 月～7 月にかけて都内の小売店で、それぞれ 3 製品を購入した。

#### 2. 試薬

セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 及びリボスクレアーゼ A (クロマトグラフ精製品) は Sigma 社製を用いた。0.5 mol/L EDTA (pH8.0, 遺伝子工学用), 1 mol/L Tris - 塩酸緩衝液 (pH8.0, 遺伝子工学用) はニッポンジーン (株) 製を用いた。プロティナーゼ K (生化学用), イソプロパノール (特級), エタノール (特級), 2-メルカプトエタノール (特級) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。20% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は Prime 社製を用いた。クロロホルム (精密分析用), TE 飽和フェノール, 塩化ナトリウム (分子生物学用) 及びフェノール - クロロホルム - イソアミルアルコール (PCI; 25:24:1, pH6.7, 分子生物学用, 付属の TE 緩衝液を加えて pH8.0 に調整) はナカライテスク (株) 製を用いた。精製水はオートクレーブで 121, 15 分間高圧滅菌したものを用いた。

CTAB 法に使用する CTAB 緩衝液は各試薬の最終濃度が CTAB 2%, Tris - 塩酸 0.1 mol/L, EDTA 0.02 mol/L, 塩化ナトリウム 1.4 mol/L になるように調製した。

CTAB-PK 法に使用するメルカプトエタノール加 CTAB 緩衝液は 2-メルカプトエタノールが最終濃度で 0.2% となるように CTAB 緩衝液に加えた。

PK 法に使用する DNA 抽出緩衝液は各試薬の最終濃度が Tris-塩酸 0.01 mol/L, EDTA 0.01 mol/L, 塩化ナトリウム 0.15 mol/L, SDS 0.1% になるように調製した。これらの緩衝液はオートクレーブで 121, 15 分間高圧滅菌した。

DNA ポリメラーゼはパーキンエルマ・アプライドバイオシステムズ社製の Ampli Taq Gold™ DNA Polymerase を、デオキシリボ核酸 5'-三リン酸混合溶液 (dNTPs), 塩化マグネシウム溶液及び 10 倍濃度の PCR 緩衝液は付属品を用いた。100 bp ラダーマーカーはアマシャムファルマシアバイオテック社製を用いた。

\* 東京都健康安全研究センター 食品化学部 食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京薬科大学生命科学部

\*\*\* 昭和大学薬学部

\*\*\*\* 独立行政法人食品総合研究所

プライマーは大豆に内在するレクチン遺伝子の検知には PCR 法での増幅長が 818 bp の Le1 01-5' ( 5'-GGCTGATAACACACTCTATTATTGT-3' ) と Le1 01-3' ( 5'-TGATGGATCTGATAGAA TTGACGTT-3' )<sup>9</sup> 及び増幅長が 118 bp の Le1 n-5' ( 5'-GCCC TCTACTCCACCCCATCC-3' ) と Le1 n-3' ( 5'-GCCCATCT GCAAGCCTTTTGTG-3' )<sup>9</sup> のペアを用いた。グリホサート耐性遺伝子 (以下組換え遺伝子とする) の検知には増幅長が 513 bp の CaM03-5' ( 5'-CCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATA-3' ) と EPSPS01-3' ( 5'-ATCCTGGCGCCCATGGCCTGCATG-3' )<sup>7</sup> 及び増幅長が 180 bp の CTPn-5' ( 5'-CCCCAAGTTCCTAAA TCTTCAAGT-3' ) と EPSPSn3' ( 5'-TGCGGGCCGGCTGCT TGCA-3' )<sup>7</sup> のペアを使用した。これらのプライマーはグライナー・ジャパン社に合成委託した逆相カートリッジ精製品を用いた。

### 3. 装置

試料粉碎器：オスター社製の 16 スピードブレンダー、試験管ミキサー：ヤマト科学(株)製の SCM-40A、インキュベーター：東京理化機器(株)製の NTS-2000、遠心機：(株)日立製作所製の himac CR21、電気泳動装置：コスモバイオ社製の Mupid-21、UV 照射装置：UVP 社製の TDS-15、ポラロイドカメラ：フナコシ(株)製の DS-300L、サーマルサイクラー：Applied Biosystems 社製の Gene Amp<sup>®</sup>PCR System 9700、分光光度計：Beckman 社製の DU-7500 を用いた。

### 4. 試料の前処理

豆腐、みそ及び煮豆は均質化した試料 150 mg を、生揚げ、油揚げは豆腐部分を取り出し均質化した試料 150 mg を、調製豆乳はそのまま 50  $\mu$ L を、きな粉及び干し湯葉は均質化した試料 100 mg を、納豆は粘着物質の影響により PCR 反応が阻害されたため、流水で 15 分間洗浄後、等量の精製水を加え、均質化した試料 150 mg をそれぞれ 2 mL のマイクロチューブ 5 本に秤量した。

### 5. DNA の抽出

1) CTAB 法 試料を秤量した 2.0 mL チューブに CTAB 緩衝液 400  $\mu$ L を加え、マイクロチューブ用ミキサーでホモジナイズした。さらに CTAB 緩衝液 400  $\mu$ L を加え良く混合後、55 $^{\circ}$ C で 30 分間加温した。次いで PCI による DNA の抽出を行った。

2) PK 法 試料を秤量した 2.0 mL チューブに DNA 抽出緩衝液 400  $\mu$ L 及び PK 溶液 ( 600U/mL ) 25  $\mu$ L を加え、マイクロチューブ用ミキサーでホモジナイズした。さらに DNA 抽出緩衝液 400  $\mu$ L を加え良く混合後、55 $^{\circ}$ C で 30 分間加温した。さらに、振とう恒温槽で 37 $^{\circ}$ C、一夜加温した。次いで PCI による DNA の抽出を行った。

3) CTAB-PK 法 試料を秤量した 2.0 mL チューブにメルカプトエタノール加 CTAB 緩衝液 400  $\mu$ L 及び PK 溶液 ( 400 U/mL ) 20  $\mu$ L を加え、マイクロチューブ用ミキサーでホモジナイズした。さらに、メルカプトエタノール加 CTAB 緩衝液 1,300  $\mu$ L を加え良く混合した。60 $^{\circ}$ C で 30 分間加温後、14,000 rpm、3 分間、遠心分離した。上清 700  $\mu$ L を新しいマイクロチューブに移した。次いで PCI による DNA の抽出を行った。

4) PCI による DNA の抽出 PCI による DNA の抽出は CTAB 法及び PK 法では 800  $\mu$ L、CTAB-PK 法では 700  $\mu$ L の PCI をマイクロチューブに加え試験管ミキサーで混和後、14,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を別のマイクロチューブに移し、これと等量のクロロホルム - イソアミルアルコール ( 24 : 1 ) を加え混和後、14,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を別のマイクロチューブに移し、これと等量のイソプロパノールを加え転倒混和後、14,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、70%エタノール 500  $\mu$ L を静かに加え 14,000 rpm で 1 分間遠心分離した。上清を除去し沈殿を乾燥後 CTAB 法及び PK 法の場合は TE 50  $\mu$ L を、CTAB-PK 法の場合は精製水 50  $\mu$ L を加え DNA を溶解させた DNA 原液を 100 ng/ $\mu$ L に調製し DNA 試験溶液とした。

### 6. PCR の反応条件

PCR の反応液の最終濃度が 0.23 mmol/L dNTP、1.75 mmol/L 塩化マグネシウム、1  $\mu$ mol/L プライマー及び反応液 25  $\mu$ L 当たり 2.5  $\mu$ L の 10 倍濃度 PCR 緩衝液と 1.25 units の DNA ポリメラーゼになるように混合し、DNA 試験溶液を 2.5  $\mu$ L 加え、精製水で全量を 25  $\mu$ L に調整した。PCR 反応はプライマーに CaM 03-5' と EPSPS 01-3' のペア及び Le1 01-5' と Le1 01-3' を用いる場合は、95 $^{\circ}$ C に 10 分間保持後、熱変性を 96 $^{\circ}$ C 1 分間、アニーリング温度を 62 $^{\circ}$ C 1 分間、延長反応を 72 $^{\circ}$ C 2 分間行い、これを 1 サイクルとして 45 サイクルの増幅反応を行った後、72 $^{\circ}$ C 10 分間保持した。プライマーに CTP n-5' と EPSPS n-3' のペア及び Le1 n-5' と Le1 n-3' のペアを用いる場合はアニーリング温度を 57 $^{\circ}$ C 1 分間に変更した以外は同様な条件で PCR を行い、PCR 反応液を得た。

### 6. レクチン遺伝子及び組換え遺伝子の検知

PCR 反応液 8  $\mu$ L を 1.5% アガロースゲルに付加し、TAE 緩衝液中で、100 V 定電圧で電気泳動を行った。泳動後、UV 照射装置上で予想される DNA 断片が観察された場合に遺伝子が検知されたと判断した。

### 結果及び考察

#### 1. 抽出した DNA の検討

今回 CTAB 法、PK 法及び CTAB-PK 法で抽出した各種大豆加工食品の DNA について、波長 230、260 及び 280 nm における吸光度の測定結果から DNA の純度と収量の検討を行った。DNA の吸光度比 260 nm/230 nm が 2 以上、及び 260 nm/280 nm が 1.8 ~ 2.0 の範囲にある場合に PCR を行う条件として適当であるとされている。今回 DNA の抽出法を検討した煮豆、きな粉、豆腐、生揚げ、油揚げ、干し湯葉においてはこれらの条件を満たしていた。一方、納豆及びみその場合は全ての DNA 抽出法において 260 nm/230 nm の値が 2 以下、納豆では 0.92 ~ 1.44、みそでは 0.51 ~ 1.12 の範囲にあった。また 260 nm/280 nm の値は、納豆で 0.92 ~ 1.44、みそで 1.30 ~ 1.34 の範囲にあり PCR に用いる DNA の適当な条件より低い値であった。そ

の理由の一つとしては納豆やみその様な発酵食品の場合は微生物の作用により DNA が分解を受け DNA が良好に抽出されなかったことが推察された。

波長 260 nm における吸光度から換算した DNA の収量を表 1 に示した。収量の平均値は煮豆, きな粉, 豆腐, 生揚げ, 油揚げ及び調製豆乳では CTAB-PK 法, CTAB 法, PK 法の順で収量が多くなった。CTAB-PK 法の場合は加えた緩衝液のおよそ半量より DNA の抽出を行うため DNA 収量が少ない傾向にあったと推察された。納豆ではどの方法もほぼ同じ収量であった。みそでは CTAB 法, CTAB-PK 法に比べ PK 法での収量が少なかった。その理由としては, みそに高濃度で含まれる塩化ナトリウム等の成分がプロテイナーゼ K の活性を阻害し, DNA の収量を少なくした可能性が推察された。干し湯葉ではプロテイナーゼ K の処理を伴う PK 法, CTAB-PK 法に比べ, これを行わない CTAB 法での DNA の収量が少なかった。干し湯葉のような乾燥した試料の場合はプロテイナーゼ K による処理を行うことにより DNA の収量を多くできることが明らかとなった。

食品別では煮豆, きな粉, 豆腐, 生揚げ, 油揚げ及び干し湯葉に比較して, 納豆, みそ, 調製豆乳の DNA 収量が少なかった。

## 2. 大豆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を指標として, CTAB 法, PK 法及び CTAB-PK 法の 3 種 DNA の抽出法について比較した。大豆加工食品それぞれ 3 検体について, 5 試料ずつ PCR 法で DNA の検知を行った。遺伝子の増幅

断片長が 818 bp のプライマー-Le1 01-5' と Le1 01-3' のペアを用いて PCR を行った結果を表 2 に示した。

豆腐, 生揚げ, 油揚げ及び調製豆乳では, CTAB 法, PK 法及び CTAB-PK 法の全ての抽出法でレクチン遺伝子が検知された。一方, 煮豆, 納豆, みそからはいずれの抽出法でもレクチン遺伝子は検知されなかった。干し湯葉及びきな粉では, 抽出法によって結果が異なった。干し湯葉では PK 法及び CTAB-PK 法では全ての検体で 5 試料全てから遺伝子が検知されたが, CTAB 法では検体番号 25 及び 26 で 1 試料, 27 で 4 試料から遺伝子が検知できないものがあった。

きな粉では, PK 法では 3 検体全て全試料からレクチン遺伝子が検知できたが CTAB-PK 法では, 検体番号 6 の検体では 5 試料中 3 試料しか検知できなかった。CTAB 法では, 番号 4 及び 5 の検体では 5 試料中 1 試料ずつ遺伝子が検知出来ない試料があった。番号 6 の検体では, 5 試料中 4 試料でレクチン遺伝子が検知できなかった。

加工食品の場合, 製品製造の行程で DNA の細切化が起こる可能性が考えられるため, プライマー-Le1 01-5' と Le1 01-3' のペアでレクチン遺伝子が検知出来ない試料があった煮豆, きな粉, 納豆, みそ及び干し湯葉については増

表 1. 大豆加工食品から抽出した DNA の収量

| 食品   | 抽出法     | 平均値(µg) | 範囲(µg)    |
|------|---------|---------|-----------|
| 煮豆   | CTAB    | 117     | 76 - 154  |
|      | PK      | 148     | 129 - 162 |
|      | CTAB-PK | 66      | 60 - 71   |
| きな粉  | CTAB    | 238     | 141 - 289 |
|      | PK      | 271     | 257 - 278 |
|      | CTAB-PK | 142     | 104 - 170 |
| 豆腐   | CTAB    | 100     | 73 - 121  |
|      | PK      | 181     | 173 - 194 |
|      | CTAB-PK | 88      | 83 - 93   |
| 生揚げ  | CTAB    | 75      | 46 - 65   |
|      | PK      | 112     | 72 - 133  |
|      | CTAB-PK | 49      | 30 - 65   |
| 油揚げ  | CTAB    | 143     | 81 - 220  |
|      | PK      | 194     | 151 - 264 |
|      | CTAB-PK | 104     | 89 - 117  |
| 納豆   | CTAB    | 34      | 26 - 43   |
|      | PK      | 30      | 22 - 34   |
|      | CTAB-PK | 32      | 21 - 51   |
| みそ   | CTAB    | 18      | 3 - 47    |
|      | PK      | 8       | 3 - 18    |
|      | CTAB-PK | 12      | 4 - 25    |
| 調製豆乳 | CTAB    | 11      | 9 - 13    |
|      | PK      | 21      | 16 - 26   |
|      | CTAB-PK | 8       | 7 - 9     |
| 干し湯葉 | CTAB    | 47      | 41 - 50   |
|      | PK      | 255     | 235 - 283 |
|      | CTAB-PK | 154     | 139 - 182 |

表 2. 大豆加工食品からのレクチン遺伝子の検知 (1)

| 食品   | 検体番号 | 抽出法    |      |           |
|------|------|--------|------|-----------|
|      |      | CTAB 法 | PK 法 | CTAB-PK 法 |
| 煮豆   | 1    | 0*     | 0    | 0         |
|      | 2    | 0      | 0    | 0         |
|      | 3    | 0      | 0    | 0         |
| きな粉  | 4    | 4      | 5    | 4         |
|      | 5    | 4      | 5    | 4         |
|      | 6    | 1      | 5    | 3         |
| 豆腐   | 7    | 5      | 5    | 5         |
|      | 8    | 5      | 5    | 5         |
| 生揚げ  | 9    | 5      | 5    | 5         |
|      | 10   | 5      | 5    | 5         |
| 油揚げ  | 11   | 5      | 5    | 5         |
|      | 12   | 5      | 5    | 5         |
|      | 13   | 5      | 5    | 5         |
| 納豆   | 14   | 5      | 5    | 5         |
|      | 15   | 5      | 5    | 5         |
|      | 16   | 0      | 0    | 0         |
| みそ   | 17   | 0      | 0    | 0         |
|      | 18   | 0      | 0    | 0         |
|      | 19   | 0      | 0    | 0         |
| 調製豆乳 | 20   | 0      | 0    | 0         |
|      | 21   | 0      | 0    | 0         |
|      | 22   | 5      | 5    | 5         |
| 干し湯葉 | 23   | 5      | 5    | 5         |
|      | 24   | 5      | 5    | 5         |
|      | 25   | 4      | 5    | 5         |
|      | 26   | 4      | 5    | 5         |
|      | 27   | 1      | 5    | 5         |

\* : 数値は 5 試料あたりのレクチン遺伝子の検知数  
プライマー-Le1 01-5' 及び Le1 01-5' (818bp) を使用

幅領域が短い 118 bp のプライマー-Le1 n-5' と Le1 n-3' のペアーを用いて PCR を行った。その結果は表 3 に示したように、プライマー-Le1 01-5' と Le1 01-3' のペアーでレクチン遺伝子が検知出来なかった煮豆、きな粉及び干し湯葉においては全ての DNA 抽出法で、3 検体全てから遺伝子が検知できた。

みそでは、CTAB 法及び CTAB-PK 法では、3 検体全ての全試料から遺伝子が検知できたが、検体番号 21 番の検体においては PK 法で全試料から遺伝子が検知できなかった。この検体については遺伝子が検知できたみそとの成分等の検討を行ったが、その原因については特定できなかった。なお、この検体番号 21 番のみそについては QIAGEN 社製のシリカゲル膜タイプのキットである、DNeasy plant mimi kit を用いて DNA の抽出後 PCR を行ったところ、レクチン遺伝子が検知できた。

この結果より、みその場合は製品によっては PK 法が適用できないものがあることが明らかとなった。

納豆の場合は、検体番号 16 と 17 の製品では全ての DNA 抽出法で全試料からレクチン遺伝子が検知されたが検体番号 18 では、PK 法と CTAB 法では 2 試料で検知できないものがあった。

### 3. 大豆加工食品からの組換え遺伝子の検知

組換え遺伝子についても、レクチン遺伝子の場合と同様に DNA 抽出法の検討を行った。遺伝子の増幅断片長が 513 bp のプライマー-CaM03-5' と EPSPS01-3' のペアー（以下 A とする）及び増幅断片長が 180 bp のプライマー-CTPn-5' と EPSPSn-3' のペアー（以下 B とする）を用いて PCR を行った。

表 3. 大豆加工食品からのレクチン遺伝子の検知 (2)

| 食品   | 検体番号 | 抽出法    |      |           |
|------|------|--------|------|-----------|
|      |      | CTAB 法 | PK 法 | CTAB-PK 法 |
| 煮豆   | 1    | 5*     | 5    | 5         |
|      | 2    | 5      | 5    | 5         |
|      | 3    | 5      | 5    | 5         |
| きな粉  | 4    | 5      | 5    | 5         |
|      | 5    | 5      | 5    | 5         |
|      | 6    | 5      | 5    | 5         |
| 納豆   | 16   | 5      | 5    | 5         |
|      | 17   | 5      | 5    | 5         |
|      | 18   | 3      | 5    | 3         |
| みそ   | 19   | 5      | 5    | 5         |
|      | 20   | 5      | 5    | 5         |
|      | 21   | 5      | 0    | 5         |
| 干し湯葉 | 25   | 5      | 5    | 5         |
|      | 26   | 5      | 5    | 5         |
|      | 27   | 5      | 5    | 5         |

\* : 数値は 5 試料あたりのレクチン遺伝子の検知数  
プライマー-Le1 n-5' 及び Le1 n-3' (118bp) を使用

その結果、煮豆、納豆、みそ及び豆乳からは組換え遺伝子は検知されなかった。組換え遺伝子が検知された、きな粉、豆腐、生揚げ、油揚げ及び干し湯葉についての検知結果を表 4 に示した。

きな粉では、増幅領域の短いプライマー-B を用いた場合に PK 法と CTAB-PK 法で両者とも組換え遺伝子が 5 試料中 2 試料から検知されたが、CTAB 法では検知されなかった。

豆腐では、プライマー-A を用いた場合は、検体番号 7 では CTAB 法と PK 法の両法で 5 試料中 3 試料から組換え遺伝子が検知されたが、CTAB-PK 法では全試料から遺伝子は検知されなかった。検体番号 8 の場合、CTAB 法では組換え遺伝子が検知されなかったが PK 法では 5 試料中 5 試料から、CTAB-PK 法では 4 試料から組換え遺伝子が検知された。検体番号 9 では、PK 法と CTAB-PK 法で全ての試料から組換え遺伝子が検知されたが、CTAB 法では遺伝子は検知されなかった。豆腐の場合 PK 法と CTAB-PK 法で組換え遺伝子が検知できる傾向にあったが、検体によっては CTAB-PK 法で検知されない場合もあった。一方、プライマー-B を用いた場合は全ての検体で抽出法に係わらず全試料から組換え遺伝子が検知された。

生揚げでは検体番号 11 はプライマー-A を用いた場合、CTAB 法では組換え遺伝子は全ての試料で検知されなかったが、PK 法では 5 試料中 4 試料から、CTAB-PK 法では 5 試料全てから組換え遺伝子が検知された。プライマー-B を用いた場合は全ての抽出法で全試料から組換え遺伝子が検知された。検体番号 12 ではプライマー-A と B いずれを用いても全抽出法で全試料から組換え遺伝子が検知された。

油揚げでは、検体番号 13 ではプライマー-A を用いた場合、CTAB 法では組換え遺伝子は検知されなかったが、PK 法では 5 試料中 3 試料、CTAB-PK 法では 5 試料中 1 試料から組換え遺伝子が検知された。検体番号 14 では CTAB 法で 5 試料中 3 試料、PK 法では 5 試料中 4 試料、CTAB-PK 法で 5 試料中 1 試料から組換え遺伝子が検知された。検体番号 15 では PK 法と CTAB-PK 法では全試料から組換え遺伝子が検知された。プライマー-B を用いた場合は検体番号 14 と 15 では、いずれの抽出法でも組換え遺伝子が検知できた。しかし、検体番号 13 の検体では CTAB-PK 法では、全試料から組換え遺伝子が検知できたが、CTAB 法と PK 法では 5 試料中 1 試料検知できないものがあった。

干し湯葉では、プライマー-A を用いた場合、検体番号 25 の検体では CTAB 法では 5 試料中 1 試料から組換え遺伝子が検知されたが、PK 法と CTAB-PK 法では 5 試料中 2 試料から組換え遺伝子が検知された。検体番号 26 の検体では CTAB-PK 法で 5 試料中 1 試料からのみ遺伝子が検知できた。プライマー-B を用いた場合は、検体番号 25 の検体では全ての抽出法で組換え遺伝子が検知できた。検体番号 26 では PK 法では 5 試料中全てから組換え遺伝子が検知されなかったが CTAB 法及び CTAB-PK 法では 5 試料中 1 試料からのみ組換え遺伝子が検知できた。

表4. 大豆加工食品からの組換え遺伝子の検知

| 食品   | 検体番号 | CTAB 法 |     | PK 法 |   | CTAB-PK 法 |   |
|------|------|--------|-----|------|---|-----------|---|
|      |      | A*     | B** | A    | B | A         | B |
| きな粉  | 6    | 0***   | 0   | 0    | 2 | 0         | 2 |
|      | 7    | 3      | 5   | 3    | 5 | 0         | 5 |
| 豆腐   | 8    | 0      | 5   | 5    | 5 | 4         | 5 |
|      | 9    | 0      | 5   | 5    | 5 | 5         | 5 |
| 生揚げ  | 11   | 0      | 5   | 4    | 5 | 5         | 5 |
|      | 12   | 5      | 5   | 5    | 5 | 5         | 5 |
| 油揚げ  | 13   | 0      | 4   | 3    | 4 | 1         | 5 |
|      | 14   | 3      | 5   | 4    | 5 | 1         | 5 |
|      | 15   | 4      | 5   | 5    | 5 | 5         | 5 |
| 干し湯葉 | 25   | 1      | 5   | 2    | 5 | 2         | 5 |
|      | 26   | 0      | 1   | 0    | 0 | 1         | 1 |

\*: プライマー CaM03-5' 及び EPSPS01-3' (513bp)

\*\* : プライマー CTPn-5' 及び EPSPSn-3' (180bp)

\*\*\*: 数値は5試料あたりの組換え遺伝子の検知数

以上により、大豆加工食品から大豆に内在するレクチン遺伝子を検知する場合は増幅長の短いプライマーを用いることによって遺伝子の検知率が高くなることが明らかとなった。このことにより、大豆加工食品では遺伝子の細切化が起こっていることが推察された。

組換え遺伝子の検知の場合には、混入している組換え遺伝子の比率によって検知率が異なることが推察される。CTAB 法は広く DNA の抽出に用いられている方法であるが、組換え大豆の検知においては CTAB 法より PK 法で感度が高い<sup>5)</sup>と報告されている。著者らの実験においても同様の傾向であった。しかし、みそでは PK 法では適応できない検体もあった。CTAB-PK 法は両者の長所を合わせた方法で、今回実験を行った PK 法と同程度の検知感度で大豆加工食品全般に適用できた。また、DNA の抽出時間は CTAB 法と CTAB-PK 法はほぼ同じ時間であったが PK 法はこれらの方法より長時間を要した。このことにより、日常検査で大豆加工食品から組換え遺伝子の検知を行う場合は CTAB-PK 法で DNA を抽出し、増幅長の短いプライマーで PCR を行うのがもっと良い方法といえる。

今後は、大豆加工食品以外のトウモロコシ加工食品及びジャガイモ加工食品等についても DNA 抽出法の検討を行うとともに、検査に要する時間の短縮化と簡素化を図るために、近年、遺伝子組換え食品検査に用いられている市販の DNA 抽出キット<sup>8-11)</sup>についても検討を行いたい。

#### ま と め

大豆加工食品9種(煮豆、きな粉、豆腐、生揚げ、油揚げ、納豆、みそ、調製豆乳及び干し湯葉)から感度良く組換え遺伝子を検知するために DNA の抽出法とプライマー

の検討を行った。CTAB 法、PK 法及び CTAB-PK 法で DNA の抽出を行い、PCR 法で組換え遺伝子の検知を行った。プライマーには増幅長が 180 bp のプライマー CTPn-5' と EPSPSn-3' の組み合わせ及び増幅長が 513 bp の CTPn-5' と EPSP01-3' の組み合わせを用いて比較した。その結果、日常検査においては CTAB-PK 法で DNA を抽出し、プライマー CTPn-5' と EPSPSn-3' の組み合わせで PCR を行い組換え遺伝子の検知を行う方法が推奨された。

#### 文 献

- 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」平成 13 年 3 月 27 日、食発第 110 号 (2001)。
- 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、2001
- 松岡 猛, 川島よしみ, 穠山 浩, 他: 食衛誌, **40**, 149-157, 1999
- 門間公夫, 佐々木城子, 牛尾房雄, 他: 食衛誌, **41**, 312-315, 2000
- 吉光真人, 堀 伸二郎: 日本食品衛生学会, 第 80 回学術講演会要旨集, 65, 2000
- Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P., et al.: *Z. Lebensm. Unters. Forsdh.* **203**, 339-344, 1996
- Köppel, E., Stadler, M., Luthy, J., et al.: *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 164-175, 1997
- Takeshi Matsuoka, Hideo Kuribara, Hiroshi Akiyama, et al.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **42**, 24-32, 2001
- 松岡 猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 他, 食衛誌, **42**,

- 197-201, 2001
- 10) 合田幸広, 浅野卓哉, 渋谷雅明, 他, 食衛誌, **42**,  
231-236, 2001
- 11) 穉山 浩, 杉本和恵, 松本美佐緒, 他, 食衛誌, **43**,  
24-29, 2002