

市販豆腐からの大豆DNAの抽出と組換え遺伝子の検出

安田庄子・永田美世・北本則行

1994年に米国で遺伝子組換え植物として世界で初めて日持ちの良いトマトが商品化されて以来、遺伝子組換えされた大豆、トウモロコシ、ナタネなどの農作物が米国、カナダなどにおいて商品化されている。これらの遺伝子組換え農作物は、品質の向上、生産性の向上、環境保全などを目的として開発されている。海外から輸入される遺伝子組換え農作物は厚生省の「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」¹⁾、農林水産省の「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」²⁾及び「組換え体利用飼料の安全性評価指針」³⁾に基づき、食品としての安全性、環境に対する安全性及び飼料としての安全性が確認されており、これまでに6種22品目の遺伝子組換え農作物が食品としての安全性を確認され、国内への輸入が可能となっている(1999年9月現在)。遺伝子組換えそのものは自然界でも起こりうる現象であるが、組換え技術は高度な先端技術であり、食品分野への応用経験が少ない。そのため、遺伝子組換え作物の安全性に対する消費者の不安から、遺伝子組換え食品の表示制度が固まり、2001年4月から、組換えが特定できる大豆やトウモロコシなどを原料とする30品目に表示が義務付けられることになった。これに伴って、今後、食品原料や加工食品中の組換え体存在の有無と含有量に関する分析技術の向上への要望が高まると予想される。

大豆は味噌、醤油、豆腐、納豆などの主原料であるが、国内自給率は約2%で年間約500万トンが海外より輸入されている。北米での遺伝子組換え大豆の作付面積の拡大により遺伝子組換え大豆の国内流通量も増加することが考えられる。遺伝子組換え大豆は除草剤(グリホサート)耐性となるように、*Agrobacterium tumefaciens* 由来 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 遺伝子が大豆に導入されている⁷⁾。これまでに大豆の種子⁴⁾、葉⁵⁾及び大豆加工食品⁶⁾からの組換え遺伝子の検出について報告されているが、いずれもこの導入されたEPSPS遺伝子の存在をPCR法を用いて検出している。そこで、松岡らにより報告されている方法⁶⁾によって実際

に大豆加工食品からの組換え遺伝子の検出を行い、その際の技術的な問題点について検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

名古屋市内及び日進市内の食料品店で平成11年8月19日に購入した6種類の市販豆腐を試料として用いた。

2. 豆腐からのDNA抽出

松岡らの方法⁶⁾に従って以下のように行った。約300mgの豆腐を1.5ml容チューブに入れ、6,000rpmで5分間遠心分離し上清を捨てた。これにCTAB緩衝液(2%セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB), 0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl) 600 μ lを加え、ピペットマンのチップでよく懸濁した後、55 $^{\circ}$ Cで30分間静置した。500 μ lのフェノール-クロロホルム(1:1)を加えて激しく攪拌し、遠心分離(15,000rpm, 15分間)後、上層を新しいチューブに移した。等容のクロロホルムを加えて激しく攪拌し、遠心分離(15,000rpm, 15分間)後、上層を新しいチューブに移した。等容のイソプロパノールを加えてよく混合し、遠心分離(15,000rpm, 10分間)した。上清を捨てた後、500 μ lの70%エタノールを加え、遠心分離(15,000rpm, 1分間)後、再度上清を捨て、沈殿を真空乾燥した。沈殿に50 μ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)を加えて、十分に溶解させた。リボヌクレアーゼA(20mg/ml)を5 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間静置した。200 μ lのCTAB緩衝液を加えた後、250 μ lのクロロホルムを加えて激しく懸濁した。遠心分離(15,000rpm, 15分間)後、上層を新しいチューブに移した。200 μ lのイソプロパノールを加えてよく混合し、遠心分離(15,000rpm, 10分間)した。上清を捨てて沈殿を真空乾燥した後、これを20 μ lのTE緩衝液に溶解させて、DNA溶液とした。下記3の条件でPCR反応を行った際に判定できなかった試料は、そのDNA溶液10 μ lを

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) で精製し、5 μ l の TE 緩衝液に溶解させて、精製 DNA 溶液とした。

3. 組換え遺伝子の PCR 反応による増幅

PCR 反応液は、終濃度が 1 \times PCR 緩衝液、200 μ M dNTP、各 1pM のプライマー (表 1)、1.25unit AmpliTaq Gold DNA polymerase となるように混合し、DNA 溶液 1 μ l を加えて全量を 25 μ l とした。この反応液を 95 $^{\circ}$ C に 10 分間保った後、94 $^{\circ}$ C 1 分間、60 $^{\circ}$ C 2 分間、72 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして、35 サイクルの増幅反応を行った。また、この条件で増幅しなかった試料については、サイクル数を 40 にして PCR 反応を行った。

表1 使用したプライマー

プライマー名	配列
CaM03-5'	5'-CCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATA-3'
EPSPS01-3'	5'-ATCCTGGCGCCCATGGCTGCATG-3'
Lel101-5'	5'-GGCTGATAACACACTCTATTATTGT-3'
Lel101-3'	5'-TGATGGATCTGATAGAATTGACGTT-3'

4. 組換え遺伝子の検出及び塩基配列の決定

5 μ l の PCR 反応液を 2% アガロースゲルにより電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロミドで染色した。その後、UV 照射装置上で画像解析装置を使用して、ゲルの写真撮影を行い、増幅された DNA 断片の検出を行った。プラスミド pUC18 にクローン化された PCR 増幅 DNA 断片の塩基配列の解析は、Thermo Sequenase 蛍光シーケンサー用サイクルシーケンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 及び DNA シーケンサー Model 4000 (LI-COR 社製) を使用して行った。

実験結果及び考察

1. 市販豆腐からの DNA 溶液の調製

前述の方法により市販豆腐から DNA の抽出を行ったところ、図 1 に示したようにすべての試料で DNA の抽出が確認された。試料 6 においては約 23kbp の大きな DNA 断片が確認されたが、それ以外の試料では DNA の長さはいずれも 2kbp 以下であり、分解を受けていることがわかった。DNA の抽出量は 10 ~ 100ng 程度で抽出効率は試料により大きく異なっていた。これらのことより、豆腐製造工程における加熱やしぼりなどの条件の

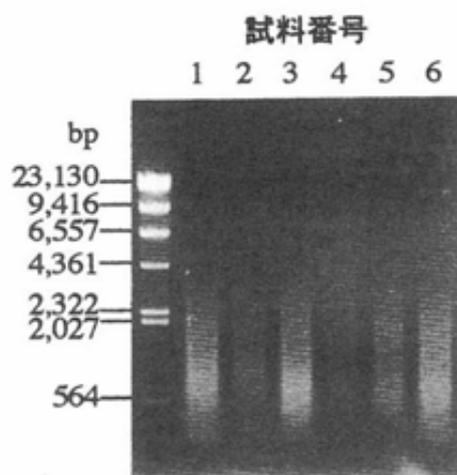


図 1 6種類の市販豆腐から抽出した大豆DNA

違いが大豆 DNA の分解率及び抽出効率に影響を与えていることが考えられた。抽出効率の向上には最初に豆腐を CTAB 緩衝液に十分懸濁させることが特に重要であり、その際マイクロチューブミキサー等の使用も有効であると思われた。また、フェノールクロロホルム処理後の遠心分離では変性たんぱく質を含んだ中間層の厚さに大きな差が見られ、これも DNA の抽出効率に関与していると考えられる。従って、この遠心分離の後、残った下層に CTAB 緩衝液を加えて再度フェノールクロロホルム処理を行うことが望ましいと考えられた。

2. 市販豆腐からの組換え遺伝子の検出

大豆に導入された組換え遺伝子すなわち EPSPS 遺伝子検出のためのプライマーとして CaM03 - 5'及び EPSPS01 - 3'を使用した。調製した大豆 DNA が PCR 反応に十分な程度に精製されており、かつ過度の分解を受けていないことを確認するためにプライマー Lel 01 - 5' 及び Lel101 - 3'を使用した。これらのプライマーの組み合わせにより大豆に導入された EPSPS 遺伝子からは 513bp の DNA 断片が増幅され、大豆ゲノムに内在的に含まれるレクチン遺伝子からは 818bp の DNA 断片が増幅される (図 2)。従って、大豆 DNA が十分に精製され、正常な PCR 反応が行われていれば、遺伝子組換え大豆を使用していない試料では 818bp の DNA 断片だけが増幅され、遺伝子組換え大豆を使用している試料では、513bp 及び 818bp の 2 種類の DNA 断片が増幅される。試料により調製した DNA 濃度が異なるため最も低い DNA 濃度の試料 4 とほぼ同濃度となるように試料 1、3 及び 6 は 10 倍希釈、試料 2 及び 5 は 2 倍希釈として PCR 反応を行った。その結果を図 3

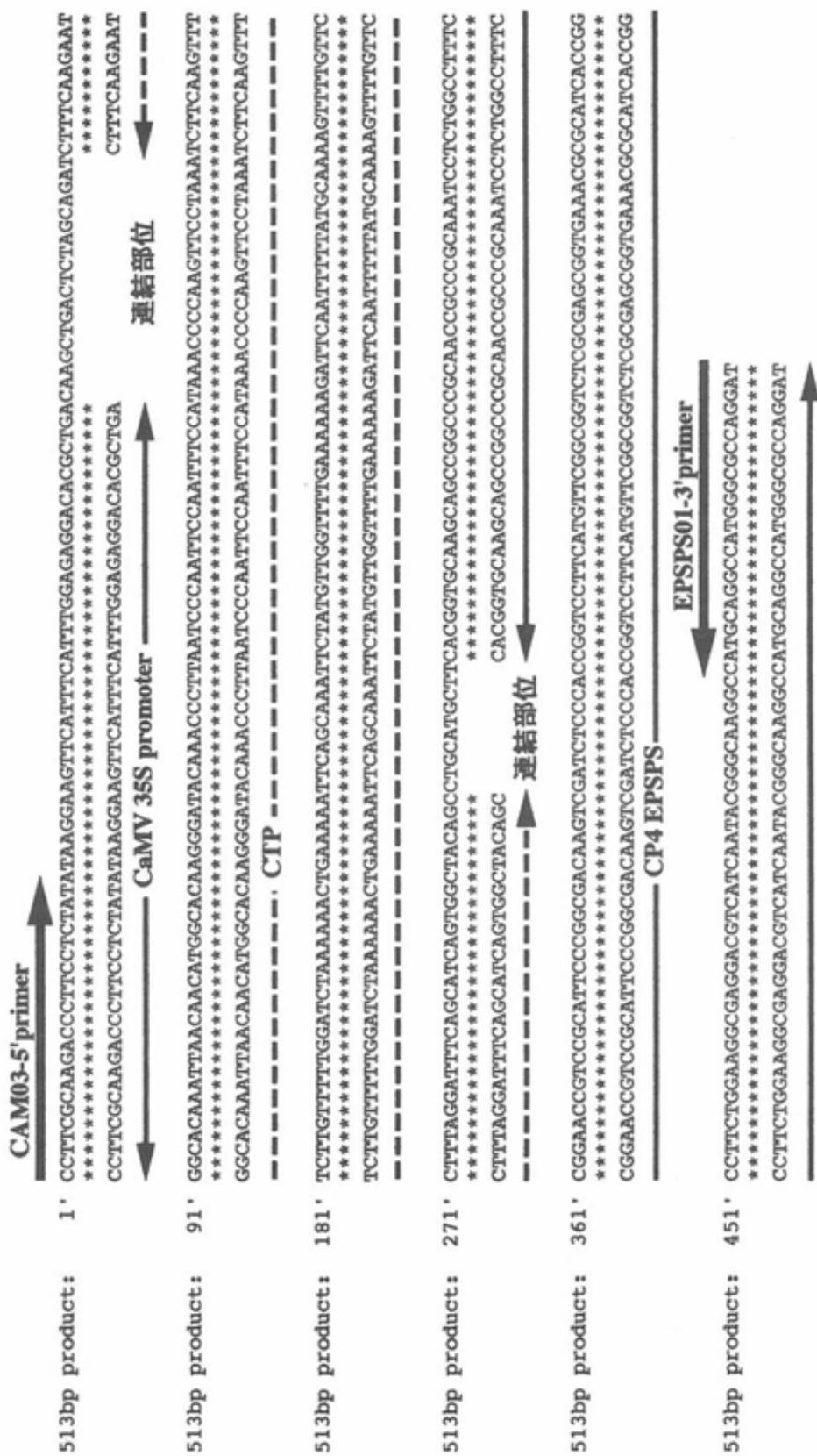


図4 513 bp DNA 断片の塩基配列とグリホサート耐性遺伝子の塩基配列の比較

CaMV 35S promoter : cauliflower mosaic virus 35S promoter, CTP : *Petunia hybrida* 由来 プラスチド移行配列,
 CP4 EPSPS : *Agrobacterium fumefaciens* CP4 由来 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 遺伝子

Lel 01-5' primer

818bp product: 1' GGCTGATAACACACTCTATTATTGTTAGTACGTACGTATTCCTTTTGGTTTAGTTTGAATTTAAATTAATAAATAATATATATGCTAA

 Lectin gene : GGCTGATAACACACTCTATTATTGTTAGTACGTACGTATTCCTTTTGGTTTAGTTTGAATTTAAATTAATAAATAATATATATGCTAA

818bp product: 91' CAACATTAATAATTTAAATTTACGTCATAATATATATTGTGATGATATAATAAATTTGTCACACCTTTTAAATAATTAATAAAGAAATTAATTAATTT

 Lectin gene : CAACATTAATAATTTAAATTTACGTCATAATATATATTGTGATGATATAATAAATTTGTCACACCTTTTAAATAATTAATAAAGAAATTAATTAATTT

818bp product: 181' TGATAAACAACATTTTGAAGAAGTACCCAAATAATAGTATATAAATAGGGGCATGACATCCCATGCATCACAGTGCATTTAGCTGAAGCAA

 Lectin gene : TGATAAACAACATTTTGAAGAAGTACCCAAATAATAGTATATAAATAGGGGCATGACATCCCATGCATCACAGTGCATTTAGCTGAAGCAA

818bp product: 271' AGCAATGGCTACTTCAAGAAGTTGAAAACCCAGAAATGTGGTTGATATCTCTCCCTAACCTTAACCTTTGGTACTGGTACTGACCAGCAA

 Lectin gene : AGCAATGGCTACTTCAAGAAGTTGAAAACCCAGAAATGTGGTTGATATCTCTCCCTAACCTTAACCTTTGGTACTGGTACTGACCAGCAA

818bp product: 361' GGCAAACTCAGCGGAAACTGTTTCTTTTCAGCTGGAACAAGTTCGCGGAAGCAATGATCCTCCAAAGGAGACGGCTATTGTGAC

 Lectin gene : GGCAAACTCAGCGGAAACTGTTTCTTTTCAGCTGGAACAAGTTCGCGGAAGCAATGATCCTCCAAAGGAGACGGCTATTGTGAC

818bp product: 451' CTCCTCGGAAAGTTACAACTCAATAAGGTTGACGMAAACGGCACCCCAAAACCCTCGTCTCTTTGGTGGGCCCCCTACTCCACCCCCAT

 Lectin gene : CTCCTCGGAAAGTTACAACTCAATAAGGTTGACGMAAACGGCACCCCAAAACCCTCGTCTCTTTGGTGGGCCCCCTACTCCACCCCCAT

818bp product: 541' CCACATTTGGGACAAAGAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCCCTTCCCTTCACTTCACTTCTATGCCCTGACACAAAAAGGCTTGC

 Lectin gene : CCACATTTGGGACAAAGAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCCCTTCCCTTCACTTCACTTCTATGCCCTGACACAAAAAGGCTTGC

818bp product: 631' AGATGGCCTTGCCTTCTTCTCGCACCAATGACACTAAGCCACAAACACATGCAGGTTATCTTTGGTCTTTTCAACGAAAAACGAGTCTGG

 Lectin gene : AGATGGCCTTGCCTTCTTCTCGCACCAATGACACTAAGCCACAAACACATGCAGGTTATCTTTGGTCTTTTCAACGAAAAACGAGTCTGG

818bp product: 721' TGATCAAGTCGTCGCTGTTGAGTTTGACACTTTCCGGAACTCTTCCGGAACTCTTGGGATCCACAAATCCACATCGGAATTAACGTCAATCTATCAG

 Lectin gene : TGATCAAGTCGTCGCTGTTGAGTTTGACACTTTCCGGAACTCTTCCGGAACTCTTGGGATCCACAAATCCACATCGGAATTAACGTCAATCTATCAG

818bp product: 811' ATCCATCA

 Lectin gene : ATCCATCA

Lel 01-3' primer



図5 818 bp DNA 断片の塩基配列と大豆レクチン遺伝子の塩基配列の比較

に示した。試料 1 及び 6 では、513bp の DNA 断片は増幅されたが、818bp の DNA 断片はほとんど増幅されなかった。試料 2 からは、513bp 及び 818bp の DNA 断片が共に増幅されなかった。試料 3 では 818bp の DNA 断片は増幅されたが、513bp の DNA 断片はゲルを肉眼で見て微かに増幅されていると思われる程度で判別がつかなかった。試料 4 及び 5 からは 513bp 及び 818bp の 2 つの DNA 断片が共に増幅された。試料 4 及び 5 以外の他の試料は予想と異なる結果となった。そこで、増幅された DNA 断片が目的とする DNA 断片であることの確認を行った。すなわち、予想どおりの結果となった試料 4 及び 5 の増幅 DNA 断片をプラスミド pUC18 にクローニングして、その塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。決定された 513bp 及び 818bp の DNA 断片の塩基配列は公開されている塩基配列と完全に一致していた (図 4 及び図 5)。従って、試料 4 及び 5 は組換え遺伝子を含むことが明らかになった。いずれの試料においても非特異的な DNA 断片の増幅は認められなかったが、使用した DNA 溶液とこの PCR 条件では、組換え遺伝子の存在の有無を判定できるものとできないものがあるということが明らかになった。

試料 1, 2, 3 及び 6 では調製した DNA 溶液中に含まれる夾雑物が PCR 反応を阻害していると推察されるため、豆腐の DNA 溶液をカラムで精製 (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) し、サイクル数を増加させて同じプライマーで PCR 反応を行った。その結果、試料 1, 2, 3 及び 6 のすべてにおいて、513bp 及び 818bp の DNA 断片が共に増幅された (図 6)。すなわち、最初の結果と合わせると 6 試料すべてに組換え遺伝子が含まれることが明らかになった。この結果から試料 1 及び 6 のように最初の PCR 反応条件で 513bp の DNA 断片のみが増幅された試料についても組換え遺伝子を含むと判定でき、さらに調べる必要がないことが示された。以上のことより、今回使用したプライマー及び豆腐から抽出し、カラムで精製した DNA 溶液を用いれば、組換え遺伝子の存在の有無を判定できることが確認された。

松岡らは、今回行った最初の PCR 反応条件で DNA 断片の増幅が確認できない市販豆腐の存在を報告しており、nested PCR 法すなわち 1 回目の PCR 産物とさらに内部のプライマーを用いた 2 回目の PCR 反応を行うことにより解決した⁹⁾。

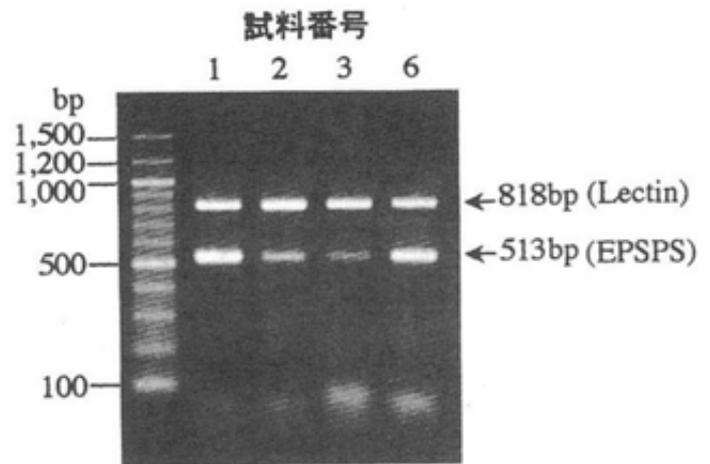


図 6 精製した大豆 DNA より増幅された PCR 産物のアガロースゲル電気泳動

我々も最初の PCR 反応条件では同様な結果を得たため、次にカラムで精製した豆腐の DNA を用いたところ、1 回の PCR 反応で解決した。ここには示していないが、PCR 反応に用いる DNA の濃度を上げた時や下げた時に DNA 断片の増幅が確認できない試料がいくつか存在していた。これらのことは、PCR 反応が適正に行われるためには、抽出した DNA には十分な純度と適度な濃度が必要であることを示唆している。また、豆腐の製造工程における加熱やしぼりなどの条件によっては、DNA がかなり分解される可能性もあるので、nested PCR 法を行うことなく、今回のように 1 回の PCR 反応で組換え遺伝子の検出が可能であるかどうかについては、より多くの市販豆腐を用いて検討することが必要である。

今回使用した試料の大豆に関する表示と検出結果を表 2 にまとめた。試料 2 のように遺伝子組み換え大豆不使用と表示してある豆腐からも組換え遺伝子が検出された。この理由としては、1) 原料段階で非組換え大豆に遺伝子組換え大豆が混入している可能性 (分別流通のシステムは完全ではなく、多少の混入は不可避である) 及び 2) 製造工程の途中で遺伝子組換え大豆が混入している可能性の 2 つが考えられる。しかしながら、試料 2 及び国産大豆使用の試料 3 では、513bp の DNA 断片の増幅量が比較的少ないことから、組み換え大豆の混入割合は他の試料よりも低いと考えられる。混入割合を詳しく推定するためには、より詳細な実験を重ね、データを大量に集める必要がある。

今後、ここで用いた方法が他の大豆加工食品に対しても有効であるか検討すると共に、検出感度の向上及び混入割合の推定に向けて、DNA の抽

表2 市販豆腐からのレクチン遺伝子及び EPSPS 遺伝子の検出

試料 No.	大豆に関する表示	DNA 精製前		DNA 精製後	
		レクチン遺伝子	EPSPS 遺伝子	レクチン遺伝子	EPSPS 遺伝子
1	なし	-	+	+	+
2	国内産大豆 100 % 遺伝子組み換え大豆不使用	-	-	+	+
3	国産大豆使用	+	±	+	+
4	なし	+	+	N.T.*	N.T.*
5	有機栽培無農薬大豆使用	+	+	N.T.*	N.T.*
6	なし	-	+	+	+

N.T.* = not tested

出方法やプライマー配列, PCR 反応産物の定量法などを検討していく必要がある。

要約

6 種類の市販豆腐より大豆 DNA の抽出を行い、すべての試料から大豆 DNA を抽出することができた。抽出された大豆 DNA は豆腐製造中に分解を受け、その大部分が 2kbp 以下の大きさであった。抽出された大豆 DNA を鋳型として PCR 反応を行ったところ、818bp の大豆レクチン遺伝子断片の増幅が確認されない試料があった。DNA 精製用カラムを用いて精製した大豆 DNA を使用することによりすべての試料から大豆レクチン遺伝子断片が増幅された。一方、513bp の組換え遺伝子断片は未精製の大豆 DNA を鋳型とする PCR 反応では 4 種類の試料から検出された。精製した大豆 DNA を鋳型とする PCR 反応では残りの 2 種類の試料からも組換え遺伝子断片が検出された。PCR 反応で増幅された DNA 断片の塩基配列は、公開されている塩基配列と完全に一致していた。

文献

- 1) 厚生省：衛食第 32,33,34 号 (1996)
- 2) 農林水産省：元農会第 747 号 (1989)
- 3) 農林水産省：8 畜 B 第 585 号 (1996)
- 4) E.Köppel, M.Stadler, J.Lüthy and P.Hübner: Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg.,88,164(1997)
- 5) N.Shirai, K.Momma, S.Ozawa, W.Hashimoto, M.Kito, S.Usami and K.Murata: Biosci.Biotechnol.Biochem.,62,1461(1998)
- 6) 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：食衛誌, 40, 149 (1999)

7) S.R.Padgette, K.H.Kolacz, X.Delannay, D.B.Re, B.J.LaVallee, C.N.Tinius, W.K.Rhodes, Y.I. Otero, G.F.Barry, D. A.Eichholtz, V.M.Peschke, D.L.Nida, N.B.Taylor and G.M. Kishore: Crop.Sci.,35,1451(1995)

8) R.Meyer, F.Chardonens, P.Hübner and J.Lüthy: Z.Lebensm.Unters.Forsch.,203,339(1996)