

農産物遺伝子組換え体の検知・判定技術

はじめに

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでいる。

我が国でも表 1 に示す遺伝子組換え (GM) 農作物が食品として利用されるようになってきている。現在、この技術の応用について社会的合意を得るための一つの手段として、農林水産省では 2001 年 4 月から GM 農作物とそれを原料にした食品 (GM 食品) に対する表示制度が、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律 (JAS 法)」の下で実施されている。厚生労働省においても、食品の安全性に関わる情報提供として食品衛生法の下で、同じ内容の表示制度が実施されている。義務表示の対象食品は、安全性の審査が終了した GM 農作物 (ダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ、なたねおよび綿実) とその加工食品 30 品目が指定されている。指定食品の判断基準は、組換え体由来の DNA や蛋白質が食品中から検知できるかにあるため、植物油や醤油、糖類などは表示義務の対象外となっている。高オレイン酸ダイズといった栄養素や用途などを変更した GM 食品については、表示義務の対象となっている。この表示を行うためには、信頼性と実用性の高い GM 農作物の検知技術の開発が必要である。筆者らのグループは、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法を用いて GM 農作物に導入されている DNA の検知技術の開発を行っている。

1. DNA 抽出法の検討

PCR の鋳型となる DNA の抽出がうまくいかないと PCR は阻害され、良好な結果を得ることができない。そのため、筆者らは、ダイズおよびトウモロコシから PCR に適した DNA 抽出法を検討した。

まず、植物体からの一般的な DNA 抽出法であるセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を使用した方法および種々の市販の DNA 抽出キットを用いて、DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液を用いて、260nm/230nm 吸光度比および 260nm/280nm 吸光度比の測定、ゲル電気泳動、ダイズまたはトウモロコシが内在的に持つ遺伝子 (内在性遺伝子) の PCR による検知を行い、PCR に適した抽出法であるか否かを評価した。ここで、260nm/230nm 吸光度比から夾雑物の残存量を、260nm/280nm 吸光度比からタンパク質の残存量を推定し純度を検定している。また、アガロースゲル電気泳動から、DNA 溶液に低分子化した DNA がないことを確認している。CTAB またはシリカメンブレンを利用して抽出した DNA 溶液は、通常 260nm/230nm 吸光度比 >1.8 かつ 260nm/280nm 吸光度比 >1.8 であり、ゲル電気

表 1 我が国で食品用として商品化が可能な GM 農作物の現状

2003.8 現在

| GM 農作物の種類計 55 件 | 開発国 (開発企業) | 他の商品化可能な国 |
|---|-----------------|------------------|
| 除草剤の影響を受けないダイズ | アメリカ (Monsanto) | 米国, EU |
| 除草剤の影響を受けないダイズ (2 種) | アメリカ (Bayer) | 米国, カナダ |
| オレイン酸高生産ダイズ | アメリカ (Dupont) | 米国, カナダ |
| 除草剤の影響を受けないトウモロコシ (5 種) | アメリカ (Bayer) | 米国, カナダ, EU (一部) |
| | アメリカ (Monsanto) | |
| | アメリカ (Dekalb) | |
| 害虫 (ガの仲間) に強いトウモロコシ (3 種) | アメリカ (Syngenta) | 米国, カナダ, EU (一部) |
| | アメリカ (Monsanto) | |
| 害虫 (ガの仲間) に強い及び除草剤の影響を受けないトウモロコシ (8 種) *1 | アメリカ (Monsanto) | 米国, カナダ |
| | アメリカ (Dow) | |
| | アメリカ (Syngenta) | |
| 害虫 (甲虫類) に強いジャガイモ (2 種) | アメリカ (Monsanto) | 米国, カナダ |
| 害虫 (甲虫類) に強い及びウイルスに強いジャガイモ (6 種) | アメリカ (Monsanto) | 米国, カナダ |
| 除草剤の影響を受けないテンサイ (3 種) | アメリカ (Bayer) | 米国, EU (一部) |
| 除草剤の影響を受けないナタネ (13 種) | カナダ (Monsanto) | 米国, カナダ (一部) |
| | カナダ (Bayer) | |
| 除草剤の影響を受けない雄性不稔ナタネ | カナダ (Bayer) | カナダ, 米国, EU |
| 除草剤の影響を受けない稔性回復ナタネ | カナダ (Bayer) | カナダ, 米国, EU |
| 除草剤の影響を受けないワタ (4 種) | アメリカ (Calgene) | 米国, オーストラリア |
| 害虫 (ガの仲間) に強いワタ (3 種) | アメリカ (Monsanto) | 米国, オーストラリア |
| 害虫 (ガの仲間) に強い及び除草剤の影響を受けないワタ (2 種) *2 | アメリカ (Monsanto) | 米国, オーストラリア |

*1, 4 種は既に安全性審査済みの害虫 (ガの仲間) に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの交配種

*2, 安全性審査済みの害虫 (ガの仲間) に強いワタと除草剤の影響を受けないワタの交配種

泳動像において DNA の低分子化は見られず, PCR に適した良好な DNA の抽出が可能であった¹⁾⁻³⁾。

2. 定性分析法

定性分析法の開発は, まず, 検知対象の GM 農作物を入手し, 抽出した DNA を用いて導入遺伝子の発現カセットのシークエンスを行う。次に, シークエンス結果

と公開されている安全性評価資料，DNA データベース等とを比較して，複数の生物種由来の DNA 配列部分であり組換え体の特異的な部分を増幅するようにプライマーの設計を行う．最後に，設計したプライマーの特異性と検知感度を PCR により調査する．さらに，抽出した DNA 溶液が PCR に適していることのコントロールとして，対象農作物に必ず含まれる DNA 配列を検知するためのプライマーの設計を行う必要がある．

例として，GM トウモロコシ CBH351 系統（商品名：スターリンク）の定性分析法の開発を示す⁴⁾．CBH351 系統は，Aventis CropScience 社（当時）が開発した害虫抵抗性トウモロコシである．1998 年に米国環境保護庁は，ヒトに対して食物アレルギーを誘発する可能性を否定できないとして，飼料用に限って栽培を許可していた．しかし，2000 年 9 月以降，米国で食品への混入が明らかとなり，2001 年度以降作付けを行うことが禁じられた系統である．

まず，環境に対する安全性評価資料および諸外国の安全性評価資料から CBH351 に導入されている DNA 配列の構造を調べた．図 1 に示す．CBH351 系統に導入されている遺伝子は，*Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi* 由来の害虫抵抗性 Cry9C タンパク質を合成する遺伝子（*cry9C*）であり，これは cauliflower mosaic virus 由来の 35S プロモーター（p35S）と 35S ターミネーター（T-35S）に制御されている．また，*cry9C* 遺伝子の 5' 末端には *Petunia hybrida* 由来の photosynthetic 22L chlorophyll a/b binding protein (*cab22L*) のリーダー配列が導入されている．この情報を基に p35S から T-35S までの DNA 配列のシークエンスを行った．シークエンス結果から，CBH351 に特異的な DNA 領域として，2 生物または 3 生物の異なった生物種由来の DNA 配列部分を増幅するように，プライマー対 a および b を設計した（図 1）．設計したプライマー対の特異性を調べるため，non-GM トウモロコシ，6 系統の GM トウモロコシ（Bt11, GA21, T25, Event176, MON810, CBH351），non-GM ダイズ，1 系統の GM ダイズ（40-3-2 系統 Roundup Ready® Soy, RRS），その他の農作物としてコメ，コムギおよびオオムギから抽出した DNA を鋳型 DNA として，PCR を行った．この電気泳動写真を図 2 に示すが，設計したプライマー対 a および b から増幅が予想された長さのバンドが CBH351 抽出 DNA を鋳型 DNA にした場合のみ観察された．なお，RRS は Monsanto 社が開発した除草剤グリホサート耐性ダイズである．次に，non-GM トウモロコシに CBH351 を 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 20% 混合し，DNA を抽出後，PCR を行った．その結果，プライマー対 a では 0.05%，プライマー対 b では 0.1%CBH351 が混入しているものまで検知することが可能であった（図 3）．GM 農作物の定性分析法の開発においては，検知感度と特異性はプライマーの配列に依存しており，プライマーの設計が最も重要であると考えられた．

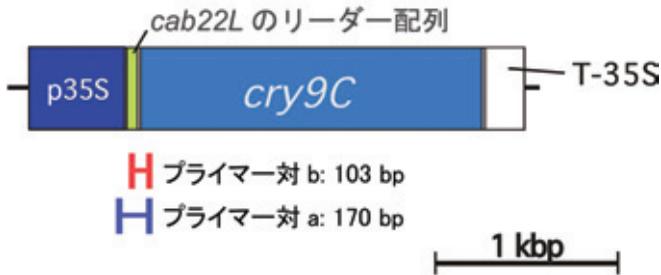


図 1 CBH351 系統に導入されている DNA 構造と PCR 増幅領域
 プライマー対 a は p35S-*cry9C*間を、
 プライマー対 b は *cab22L* のリーダー配列 -*cry9C*間を増幅する。

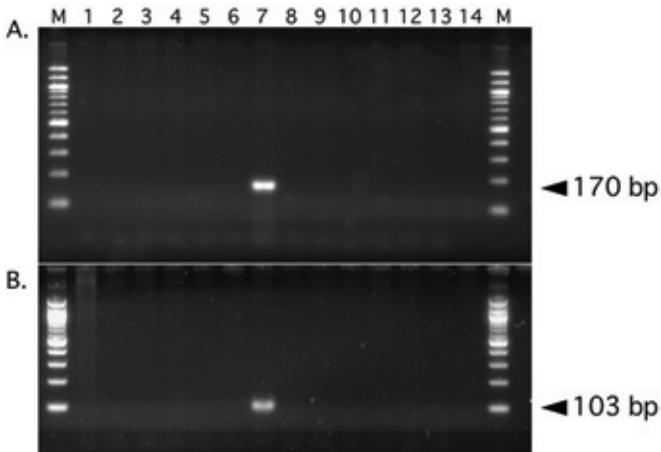


図 2 CBH351 検知用プライマー対 a,b の特異性の確認
 A はプライマー対 a, B はプライマー対 b を用いた。

M:DNA 分子量マーカー, 1:non-GM トウモロコシ, 2-7:GM
 トウモロコシ (順に, Event176, Bt11, T25, MON810, GA21,
 CBH351), 8-12: 順に, non-GM ダイズ, GM ダイズ (RRS),
 コメ, コムギ, オオムギ, 13-14: ネガティブコントロール
 (順に, DNA なし, プライマーなし)
 矢尻は, 予想される長さのバンド長

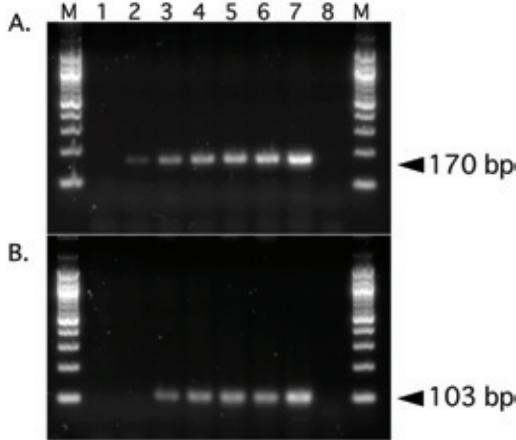


図3 CBH351 検知用プライマー対 a,b の検知感度の確認

A はプライマー対 a, B はプライマー対 b を用いた .

M:DNA 分子量マーカー, 1:non-GM トウモロコシ,

2-7:non-GM トウモロコシに CBH351 を順に, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 20% 含む, 8: ネガティブコントロール (DNA なし)

矢尻は, 予想される長さのバンド長

3. 定量分析法

GM 農作物の PCR 法を利用した定量とは, 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存在比率から GM 農作物が何%存在するかを相対的に算出することである . 定量には標準物質が必要となるが, その作製には, GM の定量特有の以下のような問題が考えられる .

ダイズは自殖性の植物であることから, 在来優良系統との交配, 自殖を人為的に繰り返して遺伝子をホモ (homozygous) で持つ GM 品種が育成されている . 現在, 販売されている RRS 種子は, このような交配により米国内で 1,000 品種以上あり, 栽培されていると聞いている .

一方トウモロコシは他殖性であるため, GM, non-GM に関わらず種子は一代限りの優良形質を持つ F1 ハイブリッド (雑種強勢品種) として育成されている . 販売されている GM 種子は, GM ダイズの場合と同様に優良品種との交配, 自殖を繰り返して一度導入遺伝子をホモで持つ植物体を育成し, これを片親とし, もう一方の片親を在来交配種とするハイブリッド種子である . さらに最近になって, 異なる GM 系統を両親とする F1 ハイブリッド種子も育成されており, これはスタック (stack) 品種と呼ばれている . このため, F2 世代の種子が穀物として生産されるこ

とになり、生産された GM 種子は各 GM 系統の表現形質ではメンデルの遺伝の法則に従い 3:1 に分離し、組換え遺伝子も (+/+:+/-:-/-=1:2:1) に分離する。また、放任受粉の植物であるトウモロコシの花粉は、通常環境条件下では 9 割以上が数 m ~ 数十 m の範囲内にしか飛散しないが、風が強ければかなりの距離を移動する。そのため、他の畑の花粉が混ざること否定できない。以上のことから、GM 農作物を栽培している畑でも non-GM 種子はできるし、その逆も起きているはずである。さらに、これら穀物は植物種子であるため、トウモロコシなどの有胚乳種子ではゲノム量が胚 (2n) と胚乳 (3n) で異なる。胚乳の 2n 分は母親由来のため、GM 系統が雌しべ親の場合は、胚乳部分の導入遺伝子量は在来系統を雌しべ親にした場合の 2 倍となる。このため、育成過程の経緯の違いにより胚と胚乳の比率が品種間で異なる可能性もあり、定量結果に影響がでると考えられる。

このように 1 つの GM 系統には多数の品種が存在し、また non-GM 品種も多数存在すること、さらに育成過程の経緯が異なるため、測定結果は標準物質の調製に使用した品種の影響を受けることになる。公的機関等が同一品種の種子から標準物質を調製した場合であっても、植物であるために生産地、年、気候によって組成等が変化し、常に一定品質の DNA が抽出できる試料を入手することは困難であると考えられる。そのため筆者らは、種子によらない標準物質を作製し、GM 農作物の定量分析法を開発した。

3.1 標準物質

筆者らは、まず標準物質の作製を行った。定量技術の開発は、我が国で輸入可能な GM サイズ 4 系統およびデント種 GM トウモロコシ 11 系統 (害虫に強い GM トウモロコシと除草剤の影響を受けない GM トウモロコシの交配種を除く) のうち、実際に米国で種子として広く販売されている GM サイズ 1 系統 (RRS) および GM トウモロコシ 5 系統 (Bt11, GA21, T25, Event176, MON810) を対象とした。GM トウモロコシ Bt11 と Event176 は、Syngenta Seeds 社が開発した害虫抵抗性および除草剤グルホシネート耐性系統である。MON810 は、Monsanto 社が開発した害虫抵抗性系統である。GA21 は Monsanto 社が開発した除草剤グリホサート耐性系統である。T25 は Bayer CropScience 社が開発した除草剤グルホシネート耐性系統である。これら RRS と 5 系統の GM トウモロコシに導入されている DNA 配列模式構造を図 4 に示す。

定性分析法の開発と同様に各 GM 農作物に導入されている遺伝子構造を調べ、RRS および GM トウモロコシ 5 系統を特異的に検知するプライマーと、GM 農作物に導入されている遺伝子構造から幅広く利用されている p35S 領域および nopaline synthase terminator (tNOS) 領域を特異的に検知するプライマーを設計した。さらに、サイズ内在性遺伝子としてレクチン遺伝子 (*Le1*) およびトウモロコシ内在性遺伝子としてスターチシンターゼ IIb (*zSSIIb*) を検知するプライマーの設計を行った。

(図4, 5). これらのプライマーを利用することにより, RRS と GM トウモロコシ 5 系統を定性 PCR により特異的に検知することが可能となった. PCR 産物の長さ は, 100 ~ 150bp 程度である. これらの PCR 増幅産物をプラスミド上につないで (図6), RRS または GM トウモロコシ 5 系統を検知するための標準物質として使用 することとした⁵⁾. このプラスミドを標準物質とする場合は, GM 種子と non-GM 種子の混合物を標準物質にする場合よりも, 大腸菌により一定の品質のものが大量 生産できる上, GM 系統ごとに種子を入手する必要がない利点がある.

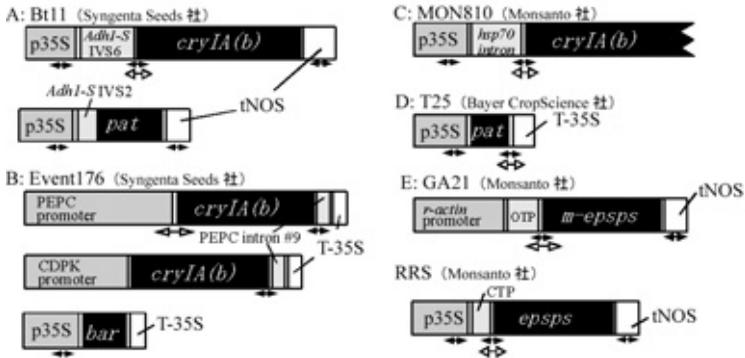


図4 各組換え体に導入されている DNA 構造
A-E:GM トウモロコシ, RRS:GM ダイズ ()内は開発企業を示す.
↔ 定量 PCR 増幅領域 ↔ Multiplex PCR 増幅領域

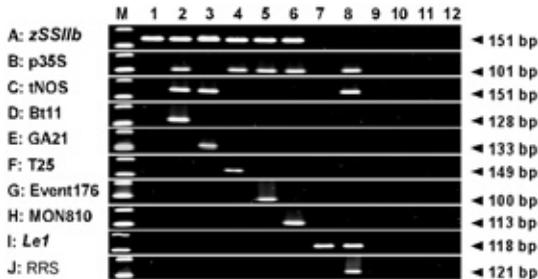


図5 RRS および GM トウモロコシ定量用プライマーの特異性
A, B, C, D, E, F, G, H, I 及び J はそれぞれ, zSSHb, p35S, tNOS, Bt11, GA21, T25, Event176, MON810, Le1 及び RRS 定量用プライマーを用いた場合の結果を示す.
M:DNA 分子量マーカー, 1:non-GM トウモロコシ, 2-6:GM トウモロコシ (順に, Bt11, GA21, T25, Event176, MON810), 7-11: 順に, non-GM ダイズ, RRS, コメ, コムギ, オオムギ, 12: ネガティブコントロール (DNA なし)
矢尻は, 予想される長さのバンド長

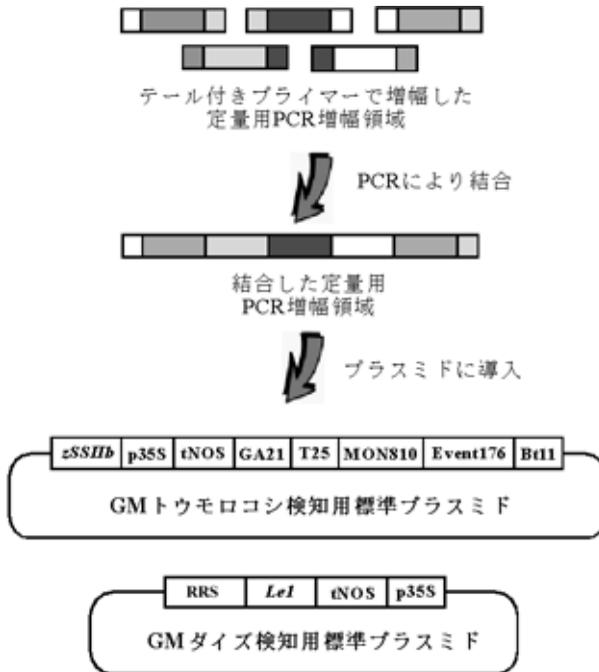


図6 GM 定量用のプラスミドの作成法

3.2 TaqMan® chemistry 法

GM 農作物の定量には、鋳型 DNA 量の定量を行うリアルタイム PCR 装置が必要となる。鋳型 DNA の定量には、Roche 社の TaqMan® chemistry 法を利用した。TaqMan® chemistry 法の原理は、まず、通常の PCR 用のプライマー間に、DNA プローブを設計する。DNA プローブは、鋳型とする DNA 配列中の一部と相補的配列を持ち、その 5' 側に蛍光色素（レポーター：R）、3' 側に消光色素（クエンチャー：Q）を結合させている。ポリメラーゼ反応が繰り返されるに従って DNA プローブは分解されるが、分解された DNA プローブに伴って放出される蛍光強度を動力学的に測定することにより PCR をリアルタイムに計測することができる（図7）。

3.3 リアルタイム PCR 法を用いた GM 系統の定量法⁵⁾

リアルタイム PCR 法で GM 系統を定量するために、まず純粋な GM ダイズまたはトウモロコシ系統の代表的な品種の種子から DNA を抽出し、組換え DNA 配列の数と内在性遺伝子の数を測定した。3.1 で示した標準物質となるプラスミド溶液を鋳型 DNA として、1 反応中 20, 125, 1,500, 20,000, 250,000 コピー含むように調製

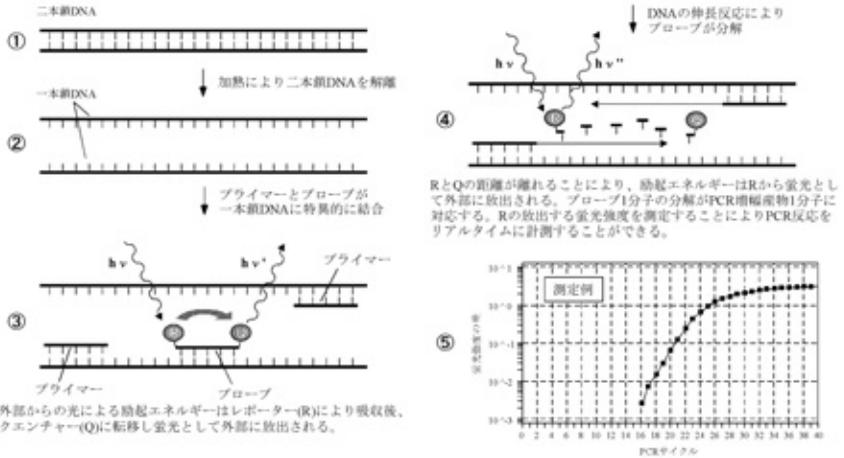


図 7 TaqMan Chemistry の原理 ~

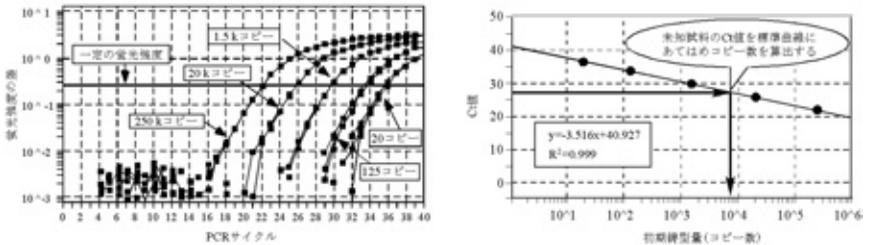


図 8 MON810 の増幅曲線 (左) 及び標準曲線 (右)

し、リアルタイム PCR を行った (図 8 左). 反応液の組成は、 $1 \times$ Universal Master Mix (Applied Biosystems 社), 各 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 5'-, 3'- プライマー, $0.2 \mu\text{mol/L}$ プロブ (ただし, p35S 用は $0.1 \mu\text{mol/L}$) に鋳型 DNA を含み, 全量 $25 \mu\text{L}$ とした. PCR 温度条件は, 最初の熱変性を 95°C で 10 分行った後, 熱変性 95°C で 0.5 分, アニールリングと伸長反応 59°C で 1 分を 1 サイクルとして, 40 サイクル行った. プラスミドのコピー数に対し, その増幅曲線がある一定の蛍光強度に達したときの PCR サイクル (Threshold Cycle, Ct) をプロットし標準曲線を作成した (図 8 右). 同時に, 純粋な GM 系統から抽出した DNA 溶液を, 鋳型 DNA として 1 反応中 50ng 含むように調製し, リアルタイム PCR を行った. 一定の蛍光強度に達したときの PCR サイクルから, この DNA 溶液の組換え DNA 配列の数および内在性遺伝子の数を測定した. このようにして, 純粋な GM ダイズまたはトウモロコシ品種ごとの (組換え

え DNA 配列の数) / (内在性遺伝子の数) の比率を求めた (式 1)。この比率を内標比とし、各組換え系統種子中で一定の値となる。混入率が未知の試料については、その試料から抽出した DNA 中の (組換え DNA 配列の数) / (内在性遺伝子の数) の比率を測定し、その値を内標比で除すれば、未知試料中の混入率が算出される (式 2)。

$$(式 1) \quad \text{内標比} = \frac{\text{純粋な GM 系統から抽出した DNA 中の組換え DNA 配列の数}}{\text{純粋な GM 系統から抽出した DNA 中の内在性遺伝子の数}}$$

$$(式 2) \quad \text{混入率 (\%)} = \frac{\text{未知試料から抽出した DNA 中の組換え DNA 配列の数}}{\text{未知試料から抽出した DNA 中の内在性遺伝子の数}} \times \frac{1}{\text{内標比}} \times 100$$

3.4 遺伝子組換え体の定量法の妥当性確認試験 (バリデーション)⁶⁾

筆者らは、本定量法の確立を目指し、日本、韓国、米国の 15ヶ所の研究室の協力により妥当性確認試験を行った。まず、純粋な GM サイズまたはトウモロコシ種子を入手し、15ヶ所の研究室で内標比を算出した。この内標比を統計処理し、混入率算出の際の定数となる内標比を決定した (表 2)。次に、ブラインド試料として混入率を隠した試料を 15ヶ所の研究室に配布し、その分析値を集計した。表 3 に統計処理を行った分析結果を示す。この結果から、決定した内標比は適当であり、本定量法は真度および再現性ともに優れた定量法であることが実証された。本定量の絶対的な定量下限は、未知試料中の組換え DNA 配列の数が 20 コピーの検量点となるときであり、表 3 より組換えサイズ RRS, 0.1%; 組換えトウモロコシ MON810, 0.5%; T25, 0.5%; Bt11, 0.5%; GA21, 0.1%; Event176, 0.1% が、保証下限値となる。

表 2 各 GM 系統の内標比

| GM 系統 | 内標比 |
|----------|------|
| Bt11 | 0.50 |
| GA21 | 1.40 |
| T25 | 0.34 |
| Event176 | 2.05 |
| MON810 | 0.38 |
| RRS | 0.95 |

表 3 組換え体定量法ブラインドテスト結果

| GM 系統 | 実際の混入率 | 解析した研究室数 | 正確さ (%) | | 精度 (%) | | 組換え DNA 配列の測定値が 20 コピー以下の数 |
|----------|--------|----------|---------|-------|--------|-------|----------------------------|
| | | | 平均値 | かたより | 室内再現性 | 室間再現性 | |
| RRS | 0.10% | 11 | 0.108 | +8.1 | 13.4 | 13.4 | 4 / 22 |
| | 0.50% | 12 | 0.571 | +14.3 | 12.0 | 15.9 | 0 / 24 |
| | 1.0 % | 12 | 1.16 | +16.1 | 11.2 | 13.9 | 0 / 24 |
| | 5.0 % | 12 | 5.76 | +15.1 | 7.6 | 11.5 | 0 / 24 |
| | 10 % | 12 | 11.7 | +17.2 | 8.5 | 10.6 | 0 / 24 |
| Bt11 | 0.10% | 11 | 0.091 | -9.0 | 22.3 | 18.0 | 21 / 22 |
| | 0.50% | 14 | 0.510 | +2.0 | 23.7 | 20.5 | 0 / 28 |
| | 1.0 % | 14 | 1.15 | +14.7 | 18.9 | 18.8 | 0 / 28 |
| | 5.0 % | 14 | 6.08 | +21.6 | 13.7 | 12.9 | 0 / 28 |
| | 10 % | 14 | 12.1 | +21.1 | 10.4 | 11.5 | 0 / 28 |
| GA21 | 0.10% | 12 | 0.095 | -5.4 | 20.5 | 20.6 | 4 / 24 |
| | 0.50% | 13 | 0.538 | +7.7 | 12.6 | 21.8 | 0 / 26 |
| | 1.0 % | 13 | 1.20 | +20.2 | 12.3 | 18.6 | 0 / 26 |
| | 5.0 % | 12 | 5.83 | +16.6 | 8.2 | 15.9 | 0 / 24 |
| | 10 % | 13 | 11.5 | +15.0 | 7.9 | 13.6 | 0 / 26 |
| T25 | 0.10% | 11 | 0.139 | +38.6 | 23.7 | 26.5 | 22 / 22 |
| | 0.50% | 14 | 0.577 | +15.3 | 28.2 | 27.6 | 1 / 28 |
| | 1.0 % | 13 | 1.20 | +20.0 | 6.8 | 11.5 | 0 / 26 |
| | 5.0 % | 14 | 5.58 | +11.6 | 12.4 | 14.8 | 0 / 28 |
| | 10 % | 14 | 10.8 | +8.1 | 13.3 | 14.7 | 0 / 28 |
| Event176 | 0.10% | 12 | 0.111 | +11.3 | 16.3 | 21.3 | 1 / 24 |
| | 0.50% | 11 | 0.492 | -1.6 | 5.8 | 10.3 | 0 / 22 |
| | 1.0 % | 13 | 0.923 | -7.7 | 7.1 | 11.4 | 0 / 26 |
| | 5.0 % | 13 | 5.00 | 0.0 | 8.1 | 11.2 | 0 / 26 |
| | 10 % | 12 | 9.62 | -3.8 | 5.8 | 9.5 | 0 / 24 |
| MON810 | 0.10% | 11 | 0.125 | +25.0 | 32.3 | 26.1 | 19 / 22 |
| | 0.50% | 13 | 0.547 | +9.4 | 15.1 | 19.6 | 0 / 26 |
| | 1.0 % | 14 | 1.05 | +4.6 | 11.8 | 15.1 | 0 / 28 |
| | 5.0 % | 13 | 4.78 | -4.3 | 13.5 | 11.9 | 0 / 26 |
| | 10 % | 13 | 9.82 | -1.8 | 10.5 | 11.6 | 0 / 26 |

3.5 定量分析法の加工食品への適用

本分析法にかかわらず、標準物質として GM 種子粉砕物を用いる場合でも、PCR 法を用いた定量は内在性遺伝子と組換え DNA 配列の数の比から算出される。熱等の加工により DNA が分解される場合であっても、両 DNA 配列が同程度に分解していれば、理論上定量は可能と考えられる。現在筆者らのグループが、その適用性について検討を進めている。

4. その他の PCR

定量法は GM 系統毎に測定するため、その前の段階としてスクリーニングを行うと便利である。筆者らは、定量分析法の開発を行った GM トウモロコシ 5 系統 (Bt11, GA21, T25, Event176, MON810) を対象に、簡便な組換え遺伝子の検知を行う Multiplex PCR 法も検討した^{2),3)}。各 GM トウモロコシに導入されている DNA 塩基配列を解析し、各 GM 系統とトウモロコシの内在性遺伝子 *Ze1* を 1 回の PCR で特異的かつ確実に特定でき、トウモロコシ、ダイズ、コメ、コムギ、オオムギに対して偽陽性のバンドが見られないプライマーの設計 (図 4) および PCR 条件の設定を行った。本法による検知感度を non-GM トウモロコシ粉砕物に GM トウモロコシ 5 系統の粉砕物を 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 20% 混合して DNA を抽出し、Multiplex PCR を行ったところ、それぞれ 0.5% 程度であった (図 9)。その他、様々な GM 農作物の開発に利用されているプロモータ、構造遺伝子、ターミネータ配列を検知できる方法も開発している⁷⁾。

5. 加工食品からの遺伝子組換え体の検知

筆者らのグループは、豆腐および納豆における組換え遺伝子の検知も検討している¹⁾。non-GM ダイズに RRS が 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 5% となるように混合したダイズ粉末試料から豆腐を調製した。この豆腐から、CTAB を用いて DNA を抽出し電気泳動したところ、1kbp 付近を中心にスメアーとなり分解を受けていることがわかった。組換え体の検知用のプライマー対と、抽出した DNA 溶液が PCR に十分

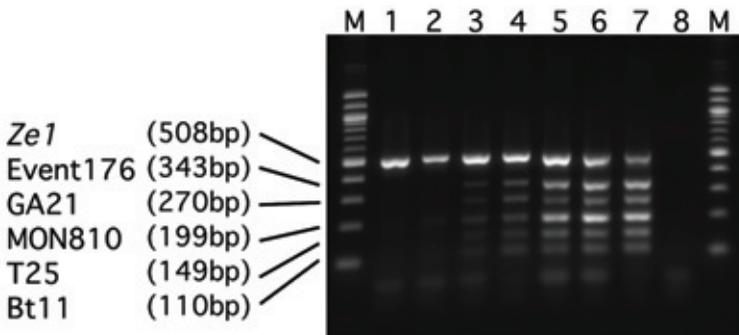


図 9 MultiplexPCR 法を用いた GM トウモロコシ 5 系統の検知
 M:DNA 分子量マーカー, 1:non-GM トウモロコシ, 2-7:non-GM トウモロコシに 5 系統 GM トウモロコシ (Event176, Bt11, T25, MON810 及び GA21) の混合物を順に, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 20% 含む, 8: ネガティブコントロール (DNA なし)
 ターゲットとした組換え体と予想されるバンドの長さ示した。

な程度に精製されており,かつ分解を受けていないことを確認するためのダイズ内在性遺伝子 *Lel* 検知用のプライマー対を作製した. 予想される増幅 DNA の長さは,それぞれ 513bp および 818bp である. $1 \times$ PCR 緩衝液 (宝酒造株), 0.23mmol/L dNTP, 1.75mmol/L 塩化マグネシウム, $1\mu\text{mol/L}$ プライマーおよび 1.25 units DNA ポリメラーゼを含む液に,抽出 DNA を 250ng を加え,全量を 25 μL にして PCR を行った. 増幅は, 94°C に 3 分保った後, 96°C で 0.5 分, 62°C で 1 分, 74°C で 0.5 分に設定し, 45 サイクル行った. PCR 後, 電気泳動を行ったところ, RRS が 0.5% 含まれるダイズ粉末から調製した豆腐まで,組換え遺伝子を検知することが可能であった (図 10).

納豆 (丸ダイズ) は 131°C で 25 分間蒸煮処理した後, 発酵処理を行ったものについて検討した. 蒸煮処理後のダイズと納豆から DNA を抽出し, 豆腐と同様に組換え遺伝子の検知を行ったところ, *Lel* 遺伝子, 組換え遺伝子ともに検知できなかった. 一方, 挽割り納豆は 115°C で 17 分間蒸煮処理した後, 発酵処理を行った. 蒸煮処理後のダイズから抽出した DNA を鋳型にして *Lel* 遺伝子の検知を行ったところ, 増幅されたバンドが検知できた. 発酵後の挽割り納豆から抽出した DNA 溶液については, *Lel* 遺伝子のバンドは検知できなかった. このことから DNA の分解は加工温度に影響を受け, 高温処理される食品については DNA が分解を受けるため, 組換え遺伝子の検知は難しくなると考えられた. 特に納豆のような発酵食品ではさらに DNA の分解が進み, 検知がきわめて難しくなると考えられた. 現在は, 定量分析法で開発した PCR 産物の長さが 118 bp と短いプライマー対を用い, PCR の温度条件や組成等を変更することにより, 納豆からも内在性遺伝子の検知が可能となっている.

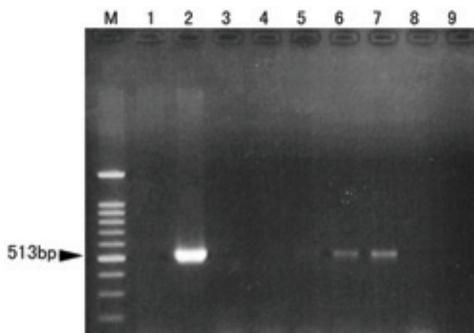


図 10 RRS 含有豆腐からの組換え遺伝子の検知
 M:DNA 分子量マーカー, 1:non-GM ダイズ,
 2:RRS, 3-7:RRS 含有豆腐 (順に, 0.01%, 0.05%,
 0.1%, 0.5%, 5% 含む), 8-9: ネガティブコントロール (順に, DNA なし, プライマーなし)
 矢戻は, 予想されるバンドの長さ示した.

6. 遺伝子組換え体検知技術を用いた食品表示モニタリング

GM 食品の表示制度が始まることに伴って、筆者らの開発した定量分析法および定量分析法用に設計したプライマーを用いた定性分析法は、独立行政法人農林水産消費技術センター（以下、「センター」とする）発行の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品の検査・分析マニュアル（JAS ハンドブック）」に採用・公開されるとともに、厚生労働省でも、筆者らの開発した定量分析法および CBH351 系統を検知するための定性分析法が、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法（厚生労働省検査法）」に採用・公開されている。これらは併せて、我が国の標準分析法となっている。

ここでは、GM 農作物の栽培と流通の現状と、センターが実施した遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査分析結果を紹介する。

6.1 GM 農作物の栽培と流通の現状

米国の農家は一軒で一農作物を百ヘクタール規模で栽培しており、使用する品種はリスク分散のために複数採用している。商品化が認可された GM 系統由来の品種の種子は、安全性審査が終了し他の品種と同様のルートで販売されているので、畑では GM 品種と non-GM 品種が混在して栽培されていることが多い。ダイズ、トウモロコシといった穀物は品種毎ではなく、食用油、飼料等の目的別に流通されるため、IP ハンドリングを行わない限り、農家が栽培した農作物は収穫段階から複数品種が混在することになる。GM 食品の表示制度においては、IP ハンドリングのためのマニュアル「アメリカ及びカナダ産のバルク輸送非遺伝子組換え原料（ダイズ、とうもろこし）確保のための流通マニュアル」および「非遺伝子組換えばれいしょにより製造されたばれいしょ加工品確保のための流通マニュアル」を（財）食品産業センターが配布しており、分別流通を実施しても非意図的に混入してくる組換え体の許容限度と、国内の輸送、加工時における管理方法について説明している。農林水産省では、その組換え体混入限度値を、ダイズおよびトウモロコシについては、最大 5%としている。

6.2 （独）農林水産消費技術センターでの遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査分析結果

センターでは、JAS 法に基づく表示や JAS 規格（JAS マーク）が適切に実施されているかどうかのモニタリングや指導、食に関する情報の提供等を行っている。本調査は、平成 13 年度に GM 食品の表示状況および食品表示に関する調査の一環として行った結果である。

6.2.1 調査方法

遺伝子組換えの義務表示対象品目であって「遺伝子組換えでない」との表示があるもの、または遺伝子組換えについての表示がないもの（「遺伝子組換えでない」

との表示は任意表示のため、当該表示がないものは遺伝子組換えではないと理解される)を対象とし、305 商品を一般小売店から購入した。DNA を抽出し、GM サイズ 1 系統 (RRS) および GM トウモロコシ 5 系統 (Bt11, GA21, T25, Event176, MON810) を検知対象とした定性 PCR 分析を行った。組み換えられた DNA が検出されたものについては、分別生産流通管理の実態確認を行うとともに、サイズ、トウモロコシ乾燥品およびトウモロコシ半加工品 (トウモロコシグリッツ、トウモロコシフラワーおよびトウモロコシミール) である場合には、定量分析可能であるため定量 PCR 分析を行った。

6.2.2 調査結果の概要

305 商品の定性 PCR 分析の概略を以下に示し、詳細を表 4 に示す。

組み換えられた DNA が検出されなかったもの 212 商品 (全商品の 69%)

組み換えられた DNA が検出されたもの 80 商品 (全商品の 26%)

なお、残り 13 商品については、加工工程中の加熱等で遺伝子が分解されており DNA 分析が出来なかった。以外の商品について、分別生産流通管理の実態確認を行ったところ、1 商品 (コーングリッツ) 以外は適切に実施されており、表示が適正であることが確認された。

まとめ

本稿では、PCR を用いた遺伝子組換え体の検知技術の開発について述べた。我が国で輸入可能な GM サイズ 4 系統およびデント種 GM トウモロコシ 11 系統 (害虫に強い GM トウモロコシと除草剤の影響を受けない GM トウモロコシの交配種を除く) のうち、実際に米国で種子として広く販売されている GM サイズ 1 系統 (RRS) および GM トウモロコシ 5 系統 (Bt11, GA21, T25, Event176, MON810) について DNA の抽出法を検討し、定性分析法の開発を行った。さらに、組換え体が特異的に持つことを確認した DNA 配列をプラスミドに導入し、それを標準物質として使用して定量を行い、妥当性確認試験によって信頼性と実用性の高い定量分析法の確立を行った。さらに、安全性審査未了の GM トウモロコシ CBH351 系統の定性分析法および Multiplex PCR による 5 系統 GM トウモロコシの定性分析法等の開発を行った。これらの分析法は、JAS ハンドブックおよび厚生労働省検査法に採用され、モニタリング法として利用されている。

現在、各国が GM 食品の表示制度を決めており、同時にその監視等に必要な検知技術の標準化も検討されている。これまでに、標準的分析法を決めた国は、日本、韓国とドイツ、スイス (定性試験法のみ) くらいに限られている。多くの GM 農作物を開発し我が国に輸出している米国、カナダにおいては、未だに詳細な分析法を明らかにしていない分析会社への依頼が行われており、輸出国と輸入国で異なる分析法を使用しているために分析結果を巡る問題が生じかねない状態になっている。

表 4 遺伝子組換え食品に係る表示内容の確認調査結果（平成 13 年度）

| 品 目 | 調 査 商 品 数 | 組み換えられた DNA の 検出の有無 | | | 最終結果 | |
|------------------------|--------------|------------------------|-------|---------------|--|--|
| | | 不検出 | 検出 | DNA 分 析不可能 | 適正な 表示 +（及び のうち、分別 生産流通管理 が適切に行わ れていたもの） | 不適正な 表示 （及びのう ち、分別生産 流通管理が不 適切であった もの） |
| 生 | | | | | | |
| 大豆、枝豆、大豆もやし | 11 | 9 | 2 | 0 | 11 | 0 |
| とうもろこし | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 大豆加工品 | | | | | | |
| 豆腐 | 64 | 40 | 24 | 0 | 64 | 0 |
| 油揚げ類 | 42 | 23 | 19 | 0 | 42 | 0 |
| 凍豆腐 | 10 | 7 | 3 | 0 | 10 | 0 |
| おから | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| ゆば | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 0 |
| 納豆 | 19 | 15 | 0 | 4 | 19 | 0 |
| 豆乳類 | 10 | 7 | 2 | 1 | 10 | 0 |
| みそ | 20 | 15 | 3 | 2 | 20 | 0 |
| 大豆煮豆 | 12 | 10 | 1 | 1 | 12 | 0 |
| 大豆缶詰及び瓶詰 | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 0 |
| きな粉 | 10 | 8 | 2 | 0 | 10 | 0 |
| 大豆炒り豆 | 4 | 3 | 1 | 0 | 4 | 0 |
| 大豆（調理用）を主な原材料とするもの | 3 | 2 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 大豆粉を主な原材料とするもの | 4 | 2 | 2 | 0 | 4 | 0 |
| 大豆たん白を主な原材料とするもの | 7 | 2 | 5 | 0 | 7 | 0 |
| 枝豆を主な原材料とするもの | 4 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 大豆もやしを主な原材料とするもの | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| その他 | 7 | 5 | 2 | 0 | 7 | 0 |
| とうもろこし加工品 | | | | | | |
| コーンスナック菓子 | 23 | 16 | 4 | 3 | 23 | 0 |
| コーンスターチ | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 0 |
| ポップコーン | 6 | 5 | 1 | 0 | 6 | 0 |
| 冷凍とうもろこし | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| とうもろこし缶詰及び瓶詰 | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| コーンフラワーを主な原材料とするもの | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| コーングリッツを主な原材料とするもの | 5 | 1 | 4 | 0 | 4 | 1（注 2） |
| とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの | 6 | 4 | 0 | 2 | 6 | 0 |
| その他 | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 合計 | 305 | 212 | 80 | 13 | 304 | 1 |
| | | | （注 1） | （注 1） | | |

（注 1） 組み換えられた DNA（安全性審査済みの遺伝子組換え農産物由来のもの）が検出された商品（80 商品）及び DNA 分析ができなかったもの（13 商品）については、分別生産流通管理の実施確認を行ったところ、注 2 に示した 1 商品以外の 92 商品については、分別生産流通管理が適切に実施されていたことから、表示が適正であることが確認された。

（注 2） コーングリッツを主な原材料とするとうもろこし加工品のうち 1 商品（コーングリッツ）については、定量分析の結果、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の目安である 5% を上回っていた（6%）ことから、センターから改善の指示を行った。

このため、我が国が採用したプラスミドを利用する標準分析法を輸出国においても幅広く利用されるように努力することが重要と考えられる。

(農林水産消費技術センター神戸センター 微量物質調査課 松岡 猛)
(食品総合研究所 企画調整部食品衛生対策チーム 日野 明寛)

参考文献

- 1) 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 (第一報)*, *食衛誌*, **40**, 149-157(1999)
- 2) Matsuoka T., Kawashima Y., Miura H., Kusakabe Y., Isshiki K., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Hino A., A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified Maize., *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **41**, 137-143 (2000)
- 3) Matsuoka T., Kuribara H., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshiki K., Toyoda M. and Hino A., A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically Modified Maize., *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **42**, 24-32 (2001)
- 4) 松岡猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 三浦裕仁, 日下部裕子, 穂山浩, 合田幸広, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛, *遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統からの組換え遺伝子の検知法*, *食衛誌*, **42**, 197-201 (2001)
- 5) Kuribara H. Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Hino A., Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean, *J. AOAC Int.*, **85**(5), 1077-1089 (2002)
- 6) Shindo Y., Kuribara H., Matsuoka T., Futo S., Sawada C., Shono J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Hino A., Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules, *J. AOAC Int.*, **85**(5), 1119-1126 (2002)
- 7) Matsuoka T., Kuribara K., Takubo H., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshiki K., Toyoda M. and Hino A., Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*), *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2100-2109 (2002)