ノート

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

(平成 12 年 4 月 10 日受理)

門間 公夫^{*1} 佐々木城子^{*2} 牛尾房雄^{*1} 齋東由紀^{*1}
市川久次^{*1} 松岡 猛^{*3} 西島基弘^{*1} 日野明寛^{*3}

Detection Rate of Glyphosate Tolerance Gene in Foreign and Domestic Soybeans and Tofu Products

Kimio MONMA^{*1}, Kuniko SASAKI^{*2}, Fusao USHIO^{*1}, Yuki SAITOH^{*1}, Hisatsugu ICHIKAWA^{*1},
Takeshi MATSUOKA^{*3}, Motohiro NISHIJIMA^{*1} and Akihiro HINO^{*3}

(^{*1}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; ^{*2}Tokyo University of Pharmacy and Lifescience: 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan; ^{*3}National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: 2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan)

The existence of glyphosate tolerance gene was surveyed in 26 soybean samples and 66 tofu products, which were mostly obtained from Tokyo markets from October 1998 to August 1999, using a recently developed PCR method to detect this gene in soybeans. The gene was detected in 2 of 7 American soybean samples and it was not detected in any domestic, Canadian or Chinese soybeans in a total of 19 samples. The two positive American samples were further tested to evaluate the content of genetically modified soybeans by examining 20 individual soybeans. The glyphosate tolerance gene was detected in 9 of 20 IOM soybean grains (45%) and 20 of 20 Roundup Ready soybean grains (100%). Among tofu products, the glyphosate tolerance gene was detected in 2 of 19 kinugoshi tofu samples (10.5%), 6 of 23 momen tofu samples (26.1%), 6 of 12 packed tofu samples (50%) and 2 of 12 other tofu (16.7%).

(Received April 10, 2000)

Key words: PCR polymerase chain reaction; 遺伝子組換え農産物 genetically modified organism; グリホサート耐性遺伝子 glyphosate tolerance gene; ダイズ soybean; 豆腐 tofu

緒 言

近年、遺伝子組換え技術によって種々の作物が開発され、市場に流通しつつある。我が国においては、平成 8 年 8 月に除草剤耐性ダイズ、害虫抵抗性トウモロコシなど、7 品種の遺伝子組換え農作物の安全性が厚生省により確認されて以来、現在 29 品種の農作物の安全性が確認されている。遺伝子組換え技術を応用した食品については、安全性に対する不安や食品選択の自由を確保するため消費者を中心に表示を求める声が強くなっている。これを受け、農林水産省は遺伝子組換え農作物、遺伝子組換え不分別農作物及びこれらを使用した一部加工品について、平成

12 年 4 月より表示義務制度を施行した¹⁾。そこで、今回著者らは最近発表された PCR 法²⁾を使用し、輸入比率の高い農作物であるダイズ及びその加工品である豆腐について、除草剤ラウンドアップの活性成分であるグリホサートに対する耐性遺伝子の検知を行ったので報告をする。

材料及び実験方法

1. 試 料

国産ダイズは平成 10 年 10 月から平成 11 年 8 月にかけて、東京都内の新宿区 (5 種)、渋谷区 (2 種)、杉並区 (2 種)、板橋区 (1 種)、武蔵野市 (2 種) 及び神奈川県川崎市 (4 種) のデパート、スーパーマーケットなどの小売店より購入した。豆腐は平成 11 年 6 月から 7 月にかけて東京都内の新宿区 (20 種)、北区 (13 種)、足立区 (7 種)、杉並区 (4 種)、豊島区 (4 種)、世田谷区 (3 種)、武蔵野市 (5 種)、八王子市 (3 種)、府中市 (3 種) 及び

^{*1} 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*2} 東京薬科大学: 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

^{*3} 農林水産省食品総合研究所: 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-2

神奈川県横浜市（4種）のデパート、スーパーマーケットなどの小売店より購入した。輸入ダイズ（10種）は平成11年7月に大鳳商事（株）より分与されたものを検査に供した。検査の標準試料には遺伝子組換えダイズとしてはモンサント社が開発した除草剤成分グリホサートに耐性のラウンドアップ・レディ・ダイズである Variety 63639-58 RR (Stein 3264) を、非組換えダイズとしてはオハイオ州産の非組換え品種保証書付きダイズを用いた。

2. 試 薬

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（25:24:1, pH 6.7, 分子生物学用）はナカライテスク（株）製を用いた。蒸留水（遺伝子工学用）、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0, 遺伝子工学用)、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0, 遺伝子工学用)、イソプロパノール（特級）及びエタノール（特級）は和光純薬工業（株）製を用いた。セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 及びリボヌクレアーゼ A（クロマトグラフ精製品）は Sigma 社製を用いた。DNA ポリメラーゼはパーキンエルマジャパン・アプライバイオシステムズ社製の Ampli Taq Gold™ DNA Polymerase を、dNTP 及び 10×の PCR 緩衝液は Ampli Taq Gold™ DNA Polymerase 付属のものを用いた。50×TAE は Prime 社製を用いた。アガロースは H14「TAKARA」宝酒造（株）製を用いた。100 bp ラダーマーカー及び制限酵素 *Sph*I はアマシャムファルマシアバイオテク社製を用いた。

プライマーはグリホサート耐性遺伝子検知用として CaMV 03-5'(5'-CCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATA-3')³⁾ と EPSPS 01-3'(5'-ATCCTGGCGCCCATGGCCTGCATG-3')³⁾ のペアを、ダイズに内在するレクチン遺伝子の検知には *Lel* 01-5'(5'-GGCTGATAACACACTCTATTATTGT-3')²⁾ と *Lel* 01-3'(5'-TGATGGATCTGATGAATTGACGTT-3')⁴⁾ のペアを使用した。なお、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ゲルろ過精製品を用いた。

3. 装 置

小型粉砕器：柴田科学（株）製の SCM-40A、試験管ミキサー：ヤマト科学（株）製の MT-31、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 製の TDS-15、ボラロイドカメラ：フナコシ（株）製の DS-300L、サーマルサイクラー：Perkin Eimer Applied Biosystems 社製の Gene Amp® PCR System 9700、分光光度計：Beckman 社製の DU-7500 を用いた。

4. DNA 溶液の調製

4.1 試料の前処理

ダイズ 250 g、約 1,000 粒を小型粉砕器で粉末状に破碎した後 50 mg を 1.5 mL 容チューブにひょう量し、DNA の抽出を行った。豆腐は 300 mg を 1.5 mL 容チューブ

にひょう量後、6,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した後、DNA の抽出を行った。

4.2 DNA の抽出

松岡ら²⁾の方法にほぼ準じて CTAB 法により DNA の抽出を行った。すなわち、前処理を行った、試料が入った 1.5 mL 容チューブに CTAB 緩衝液 600 μ L を入れ 55°C で 30 分間保持をした。次いで、500 μ L のフェノール-クロロホルム (1:1) を加え、試験管ミキサーで混和後、14,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を別の 1.5 mL 容チューブに取り、500 μ L のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールを加え試験管ミキサーで混和後、14,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を更に別の 1.5 mL 容チューブに取り、等容量のイソプロパノールを加え混和後、14,000 rpm で 10 分間遠心した。上澄み液を除去後、500 μ L の 70% エタノールを加え、14,000 rpm で 1 分間遠心した。上澄み液を除去後、乾燥させた沈殿に 50 μ L の TE 緩衝液を加え試験管ミキサーで混和後、リボヌクレアーゼ A 溶液 5 μ L を加え 37°C で 30 分間加温した。次いで、200 μ L の CTAB 緩衝液と 250 μ L のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールを加え試験管ミキサーで混和後、14,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を別の 1.5 mL 容チューブに取り、200 μ L のイソプロパノールを加え、14,000 rpm で 15 分間遠心した。上澄み液を除去後、乾燥させた沈殿に 50 μ L の TE 緩衝液を加え溶解し DNA 溶液とした。

なお波長 260 nm における吸光度から DNA の収量を算出したところ、ダイズ 50 mg からは 38~183 μ g、豆腐 300 mg からは 60~356 μ g の DNA が抽出された。

4.3 PCR の反応条件

PCR は DNA の非特異的増幅を避けるためホットスタート法⁵⁾により行った。反応液の最終濃度が 1×の PCR 緩衝液、0.23 mmol/L dNTP、1.75 mmol/L 塩化マグネシウム、1 μ mol/L プライマー及び反応液 25 μ L 当たり 1.25 units の DNA ポリメラーゼになるように混合し、100 ng/ μ L に調整した DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、全量を 25 μ L にした。なお、プライマーとしてグリホサート耐性遺伝子用のプライマー対とレクチン用のプライマー対を加える Multiplex PCR 法により行った。PCR 反応は 95°C に 10 分間保持後、96°C 1 分間、62°C 1 分間、72°C 2 分間を 1 サイクルとして 45 サイクルの増幅反応を行った後、72°C 10 分間保持した。

4.4 グリホサート耐性遺伝子の検知

PCR 反応液 8 μ 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 513 bp の断片が観察された場合にグリホサート耐性遺伝子を含んでいる試料と推察した。なお今回用いた方法による検知感度はダイズで 0.1%、豆腐で 0.5% である。

4.5 制限酵素による PCR 産物の処理

電気泳動により 513 bp の断片が観察された豆腐につい

Table 1. Detection of Glyphosate Tolerance Gene from Soybeans

No.	Sample	Glyphosate tolerance gene
Domestic soybean		
1	Hokkaido	—
2	Tsurunoko soybeans	—
3	Tochigi	—
4	Clear hilum soybeans (Shirome)	—
5	Japan	—
6	Clear hilum soybeans (Nishiki Shirome)	—
7	Ibaraki	—
8	Tsurunoko soybeans, Tokachi	—
9	Tsurunoko soybeans	—
10	Tsurunoko soybeans, Tokachi	—
11	Tokachi	—
12	Clear hilum soybeans (Shirome), Hokkaido	—
13	Japan	—
14	Tsurunoko soybeans, Tokachi	—
15	Tanba soybeans	—
16	Tsurunoko soybeans	—
Imported soybean		
17	U.S. Organic Vinton, Minnesota	—
18	U.S. Chemical free, Iowa	—
19	U.S. Chemical free DB-200, Iowa	—
20	U.S. Chemical free DB-300 & DB-400, Iowa	—
21	U.S. SBB-200, North Dakota	—
22	U.S. IOM Indiana, Ohio and Michigan	+
23	Roundup Ready, U.S.A.	+
24	Canadian lage size clear hilum, Quebec	—
25	Chinese HeFeng, Heirong Jiang	—
26	Chinese Dong Nong for Natto, Heirong Jiang	—

ては確認のため、再度、組換え遺伝子検出用のプライマー対を単独に用い PCR を行った。制限酵素反応液は 10×制限酵素緩衝液 (BioLabs Inc.) 2 μ L, 制限酵素 *Sph*I 1 units, PCR 生成物 5 μ L を加えた後、水で 20 μ L にし、37°C の恒温槽で 3 時間処理を行った後、1.5% アガロースを使用し、電気泳動を行い、遺伝子組換えダイズの切断パターンと比較した。

結果及び考察

1. ダイズからのグリホサート耐性遺伝子の検知

国産ダイズ 16 検体及び輸入ダイズ 10 検体についてのグリホサート耐性遺伝子の検知結果を Table 1 に示した。今回検査を行った国産品として販売されていた大豆 16 検体からはグリホサート耐性遺伝子は検知されなかった。現在国内では遺伝子組換えダイズの生産は行われていないとされており、この事実を支持する結果となった。

輸入ダイズでは 10 検体中、米国産の 2 検体からグリホサート耐性遺伝子が検知された。グリホサート耐性遺伝子が検知された米国産の IOM ダイズはインディアナ、オハイオ及びミシガン州で収穫されたダイズが集積されたものである。このダイズは遺伝子組換えダイズと従来の非遺伝子組換えダイズの区別なく取り扱われることからグリホ

Table 2. Detection of Glyphosate Tolerance Gene in Tofu Products

Labeled as "made by domestic soybeans"	Number of samples	Number of positives	Detection rate (%)
Yes	26	3	11.5
No	40	13	32.5
Total	66	16	24.2

サート耐性遺伝子が検知されたものと考えられた。また、ラウンドアップ・レディ・ダイズは米国モンサント社が開発した遺伝子組換えダイズである。グリホサート耐性遺伝子が検知されなかった米国産 5 種、中国産 2 種及びカナダ産 1 種のダイズは厳密に分別流通を行っていると考えられている。したがって、分別流通は有効に機能し組換えダイズの混入を防いでいるものと推察された。

2. グリホサート耐性遺伝子検知ダイズの混入比率

グリホサート耐性遺伝子が検知されたダイズ 2 検体については混入比率を調べるため、新たにそれぞれ、ダイズ 20 粒についてグリホサート耐性遺伝子の検知を行った。その結果 IOM ダイズでは 20 粒中 9 粒 (45%) から、ラウンドアップ・レディ・ダイズでは 20 粒中 20 粒 (100%) からグリホサート耐性遺伝子が検知された。

米国における遺伝子組換えダイズの作付け面積は近年全米でのダイズ作付け面積の 5 割に達すると言われている。このことから考えると分別流通のなされていない IOM ダイズでの組換え遺伝子の混入率が 45% であったことはほぼ妥当な値と考えられた。

3. 豆腐からのグリホサート耐性遺伝子の検知

豆腐からのグリホサート耐性遺伝子の検知結果を Table 2 に示した。豆腐 66 検体中 16 検体 (24.2%) からグリホサート耐性遺伝子が検知された。今回著者らが使用したプライマーで増幅された 513 bp の DNA 断片の塩基配列を調べた結果、制限酵素 *Sph*I で 307 bp と 206 bp の DNA 断片に切断される切断部位が存在することが判明した。そこで、グリホサート耐性遺伝子が検知された 16 検体については間違いなくグリホサート耐性遺伝子であるか確認をするため再度、グリホサート耐性遺伝子検出用プライマー単独で PCR を行った後、制限酵素 *Sph*I で処理を行った。次いでアガロースゲル電気泳動し、遺伝子組換えダイズの切断パターンと比較した。その結果、16 検体すべての制限酵素切断パターンが 307 bp と 206 bp の DNA 断片を生じる遺伝子組換えダイズ由来のものと一致した。一部検体のアガロースゲル電気泳動の結果を Fig. 1 に示した。この結果より豆腐の検査において検知された 513 bp の DNA 断片はグリホサート耐性遺伝子であると判断した。

国産表示の有無でグリホサート耐性遺伝子の検知状況を見ると国産表示のある検体では 26 検体中 3 検体 (11.5%)、国産表示のない検体では 40 検体中 13 検体 (32.5%) から

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products and those digested with restriction endonuclease *Sph*I from tofu samples
M: 100 bp Ladder, Lane 1~7: Sample 1~7, Lane 8: Roundup ready soybean DNA, Lane 9~15: Sample 1~7 (*Sph*I digestion), Lane 16: Roundup ready soybean DNA (*Sph*I digestion)

Table 3. Detection of Glyphosate Tolerance Gene from Various Types of Tofu

Type of tofu	Number of samples	Number of positives	Detection rate (%)
Momen tofu	23	6	26.1
Kinugoshi tofu	19	2	10.5
Packed tofu	12	6	50.0
Others	12	2	16.7

遺伝子が検知され、国産表示のない検体の方がグリホサート耐性遺伝子の検出率が高い値となった。今回豆腐を購入した時点では、豆腐製造業界の自主基準で 50% 以上国産ダイズを使用していれば国産ダイズ使用の表示が可能とされていた。したがって、国産ダイズ使用の表示がある豆腐からグリホサート耐性遺伝子が検知されたものと考えられる。

4. 豆腐の種類別のグリホサート耐性遺伝子の検知結果

豆腐の種類別のグリホサート耐性遺伝子の検知結果を Table 3 に示した。絹ごし豆腐では 19 検体中 2 検体 (10.5%) から、木綿豆腐では 23 検体中 6 検体 (26.1%) から、充てん豆腐では 12 検体中 6 検体 (50.0%) から、焼き豆腐などのその他の豆腐では 12 検体中 2 検体 (16.7%) からグリホサート耐性遺伝子が検知され、豆腐の種類によって検知比率が異なった。採油用のダイズには米国産が多く使用されているが、採油後の脱脂ダイズは充てん豆腐などの食用に利用される場合がある。充てん豆腐でグリホサート耐性遺伝子の検知比率が高かった理由としては、米国産の脱脂ダイズを原料とする製品が多いことによるものと考え

えられた。

今後は他の加工食品における組換え遺伝子の検知や組換え遺伝子の定量法の検討、更に我が国で安全性の確認を受けていない遺伝子組換え食品の流入の可能性も指摘されていることから、未承認の遺伝子組換え作物の検査法の開発を行う必要がある。

文 献

- 1) 農林水産省食品流通局長通知 “加工食品品質表示基準等の制定について” 平成 12 年 4 月 4 日, 12 食流第 599 号 (2000).
- 2) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A., A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, 149-157 (1999).
- 3) Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hübner, P., Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne 《Roundup Ready™》. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **88**, 164-175 (1997).
- 4) Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P., Lüthy, J., Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, **203**, 339-344 (1996).
- 5) Birch, D. E., Kolmodin, L., Laird, W. J., McKinney, N., Wong, J., Young, K. K. Y., Zangenberg, G. A., Zoccoli, M. A., Simplified hot start PCR. *Nature*, **381**, 445-446 (1996).