

納豆における原料ダイズの遺伝子組換え判定

奥村 史朗*¹ 執行 修司*² 富岡 寛治*²

Detection of Gene-modified Soybean of Natto

Shiro Okumura, Shuji Shigyo and Kanji Tomioka

現在日本においては6種類の遺伝子組換えダイズが認可されている。遺伝子組換えに対する消費者の関心は高く、多くの遺伝子組換え判定の需要があり、JASが定めた規定法により判定されているが、納豆においてはこの規定法で判定できない場合が多く報告されている。そこで納豆の遺伝子組換えダイズの高感度判定キットの開発を最終的な目的とし、納豆においてJAS規定法で判定できない原因について検討を行った。その結果、納豆からのDNA抽出物にはダイズのDNAだけでなく、納豆菌由来のDNAが含まれており、この納豆菌由来DNAがダイズDNA検出のためのPCR反応を阻害していることが確認された。

1 はじめに

現在日本においては、ジャガイモ、ダイズ、てんさい、トウモロコシ、なたね、わた、アルファルファ、食品添加物について、合計98種類の遺伝子組換え作物および食品が認可されている¹⁾。これらの遺伝子組換え作物については、安全性が確認されているにもかかわらず、いまだ国内では生産されておらず、もっぱら輸入されたものが市場に流通し消費されている。このうちダイズについては、国内生産割合が全消費量の約5%と低く、その多くが輸入されており、輸入先はアメリカ合衆国、ブラジル、カナダの3カ国で98%を占めている。特にアメリカからの輸入は70%と突出しているが、アメリカにおいては生産されているダイズの大半が遺伝子組換え作物となっており、2005年には生産量の93%が遺伝子組換え作物であった。輸入された遺伝子組換えダイズの大半は搾油用途で、みそ、醤油、豆腐、納豆などの形で消費されるものについては非組換えダイズが主体と考えられているが、組換えダイズを使用している場合も法的には表示義務はない。このため、多くの遺伝子組換えダイズが加工食品に使われている可能性が指摘されており、これらのダイズ加工食品に対する消費者の遺伝子組換え判定について多くの需要がある。遺伝子組換え作物の組換え判定についてはPCR法によるJASの規定²⁾が定められているが、特に納豆については、遺伝子判定が困難なことが知られており³⁾、遺伝子組換え判定を行った場合20~40%で判

定できないと言われている。そこで、納豆原料における遺伝子組換えの高感度判定キットを開発することを目的とし、まずは、納豆においてJAS法による遺伝子組換え判定が困難な理由について検討を行った。

2 研究, 実験方法

2-1 材料・機器

遺伝子組換えダイズおよび非組換えダイズについては、遺伝子組換え大豆検査GMOシリーズ(Strategic Diagnostics Inc.)の大豆定量用参照標準セット(組換えダイズであるラウンドアップレディダイズ(除草剤耐性の遺伝子組換えダイズ)混入率がそれぞれ0%, 0.3%, 1.25%, 2.5%の4種類を含むセット)および遺伝子組換えダイズを95%以上使用した納豆である「納豆のススメ」(有限会社A-Hit Bio)を用いた。JAS法によるラウンドアップレディダイズの判定は、ニッポンジーンの内在性遺伝子(Lel1)検知用、NOS terminator検知用のプライマーを用いた。内在性遺伝子(Lel1)はダイズが本来持っている遺伝子で非組換え体ダイズの検知に、NOS terminatorは組換え体ダイズの挿入遺伝子の終端部分で組換え体ダイズの検知に用いた。また判定用PCRにおいては、ポジティブコントロール(内在性遺伝子(Lel1)およびNOS terminator検知用の両方のプライマーのテンプレートとなる配列を備えたプラスミド:ニッポンジーン)を用いた。PCR反応においては試薬にTakara EX Taq(タカラバイオ)を、実験装置にTakara PCR Thermal Cycler MP(タカラバイオ)を用いた。リアルタイムPCR反応においては試薬にTakara EX Taqを、実験装置にLightCycler ST300(ロシュ・ア

*1 生物食品研究所

*2 国立久留米工業高等専門学校

プライド・サイエンス)を用いた。

2-2 納豆からの納豆菌由来DNAの検出

納豆菌由来の遺伝子を検出するためにナットウキナーゼ (Genbank No. FJ374767.1) の遺伝子に対して増幅物をつくるプライマーをPrimer3を用いて4種類設計し (表1), これを用いて納豆から抽出したDNAに納豆菌由来のDNAが含まれているかどうかを検討した。

表1 納豆菌由来DNA検出用プライマー一覧

名称	配列	増幅物の長さ
NK1F	5'-GGGCCATTTCACAATATG-3'	249 bp
NK1R	5'-AGCTCAGAACCTACGCTGGA-3'	
NK2F	5'-TGCGCAATCTGTTCTTATG-3'	249 bp
NK2R	5'-CCCAGAACACCGATTGAGTT-3'	
NK3F	5'-GGGCCATTTCACAATAT-3'	250 bp
NK3R	5'-AGCTCAGAACCTACGCTGGA-3'	
NK4F	5'-CCATCCAAAGCACACTTCCT-3'	216 bp
NK4R	5'-ATTGTGCAGCTGCTGTACG-3'	

肉エキス培地 (1% Defco Beef Extract, 1% ポリペプトン, 0.2% NaCl, pH7.6) で培養した納豆菌 (*Bacillus natto* strain *Naruse*), 2.5%のラウンドアップレディダイズを含むダイズ粉末, 流水でよく洗浄した納豆 (納豆のススめ) からDNeasy Maxi Plant Kit (キアゲン) を用いてDNAを抽出し, これをテンプレートとして, 表1のプライマーを用いて, Takara EX Taqを用いてPCRを行った。PCR反応は95°C 5min加熱後に94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30sの処理を35サイクル繰り返した。PCR反応液はNovex 20% TBE Gel (インビトロジェン) で電気泳動し, エチジウムブロマイドで蛍光染色して解析した。

2-3 ダイズDNAの検出における納豆菌DNAによる阻害

ニッポンジーンのパジティブコントロールをテンプレートとして用意し, これに培養した納豆菌から得た納豆菌由来のDNAを添加して, 内在性遺伝子 (Le1) 検知用およびNOS terminator検知用のプライマーを用いてTakara EX TaqでPCR反応を行った。添加する納豆菌由来DNAは18.6 μ g/mLで用意し, 3倍希釈で5段階用意した。パジティブコントロールは内在性遺伝子検知では5.2ng/mLで, NOS terminator検知では3.3e-10ng/mLで用いた。PCR反応は95°C 5min加熱後に94°C 30s, 63°C

30s, 72°C 30sの処理を40サイクル繰り返した。PCR反応液はNovex 20% TBE Gelで電気泳動し, エチジウムブロマイドで蛍光染色して解析した。

さらに, 同様の検討をTakara EX Taqを用いて, リアルタイムPCR法を用いて行った。PCR反応全量 20 μ Lで行い, 95°C 1min加熱後に95°C 10s, 60°C 10s, 72°C 10sの処理を75サイクル繰り返した。添加する納豆菌由来DNAは18.6 μ g/mLで用意し, 1, 2, 3, 9, 27倍希釈で5段階用意した。

3 結果と考察

3-1 納豆からの納豆菌由来DNAの検出

納豆菌, 納豆, ダイズから抽出したDNAをテンプレートとして, 表1に示したプライマーセットを用いてそれぞれに納豆菌由来のDNAが含まれているかどうかを検討したところ, 納豆菌と納豆からは納豆菌由来のDNAが検出されたが, ダイズからは検出されなかった (図1)。納豆については, JAS法²⁾に基づき流水で十分に洗浄したものをサンプルとして用いたが, 洗浄にかかわらず, 納豆菌由来のDNAが含まれていることが確認できた。

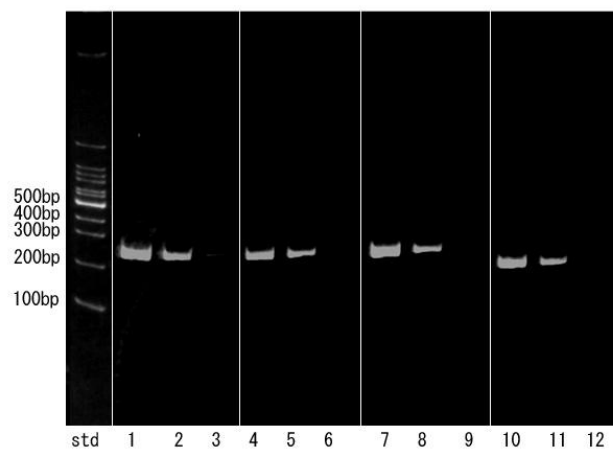


図1 納豆菌, 納豆, ダイズから抽出したDNAをテンプレートとした納豆菌由来遺伝子の検出: 1~3はNK1, 4~6はNK2, 7~9はNK3, 10~12はNK4をプライマーとして用いた。1, 4, 7, 10は納豆菌から得たDNA抽出物を, 2, 5, 8, 11は納豆から得たDNA抽出物を, 3, 6, 9, 12はダイズから得たDNA抽出物をテンプレートとしてPCR反応を行い, 20% アクリルアミドゲルで電気泳動を行った。

3-2 ダイズDNAの検出における納豆菌DNAによる阻害

ニッポンジーンのパジティブコントロールをテンプレートとして、内在性遺伝子 (Le1) 検知用およびNOS terminator検知用のプライマーを用いてPCR反応を行い、その際にPCR反応阻害物として納豆菌由来のDNAを濃度を変えて添加した。それぞれの反応液を20%アクリルアミドゲルで電気泳動して解析したところ、納豆菌由来DNAを原液で添加したサンプルについては、所定の増幅物が得られなかった(図2)。このことは、納豆菌由来DNAがダイズ遺伝子検出のためのPCR反応を阻害していることを示している。

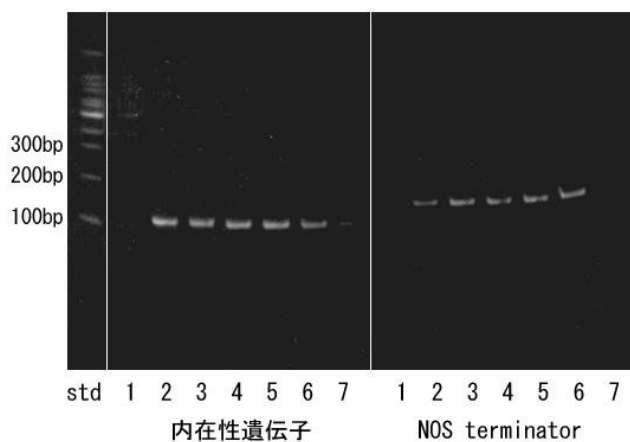


図2 ダイズの内在性遺伝子およびNOS terminator検知用プライマーによるPCR反応の納豆菌DNAによる阻害効果：1~5は納豆菌由来DNAを1, 3, 9, 27, 81倍希釈して添加したもの。6は納豆菌由来DNAを添加していないもの。7はテンプレートを加えていないもの。

3-3 リアルタイムPCRによる阻害の解析

3-2で示したダイズ由来DNAの検出における納豆菌由来DNAによる阻害を、リアルタイムPCR法により遺伝子の増幅を経時的に測定して解析した。図3はダイズ内在性遺伝子 (Le1) 検知用プライマーを用いた場合の遺伝子増幅の様子を示している。阻害の目的で納豆菌由来DNAを希釈なしに用いた場合、75サイクルまで遺伝子の増幅が見られなかった。3-2の試験においては3倍希釈から81倍希釈までの範囲で遺伝子増幅量の差が不明であったが、リアルタイムPCRによる解析により、加えた納豆菌由来DNAが多いほど、遺伝子の増幅が遅くなることが示された。

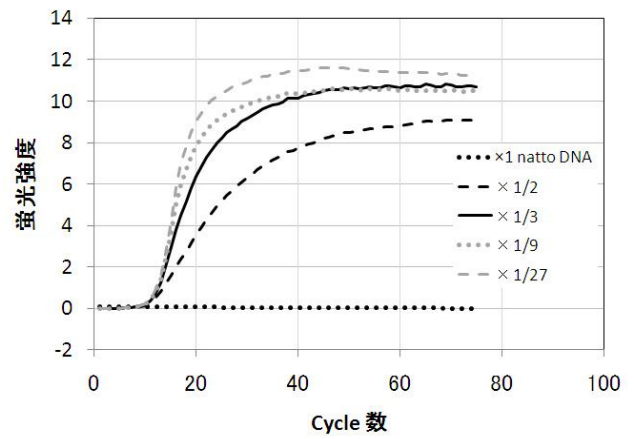


図3 ダイズ内在性遺伝子 (Le1) 検知用プライマーを用いた遺伝子増幅における納豆菌由来DNAの阻害効果

組換え体ダイズの遺伝子組換え部分であるNOS terminatorを検出するプライマーを用いて、同様にリアルタイムPCRで検討したところ、ダイズ内在性遺伝子 (Le1) 検知用プライマーを用いた場合に比較して、より低い納豆菌由来DNAの濃度で大きな阻害を示すことが判明した(図4)。

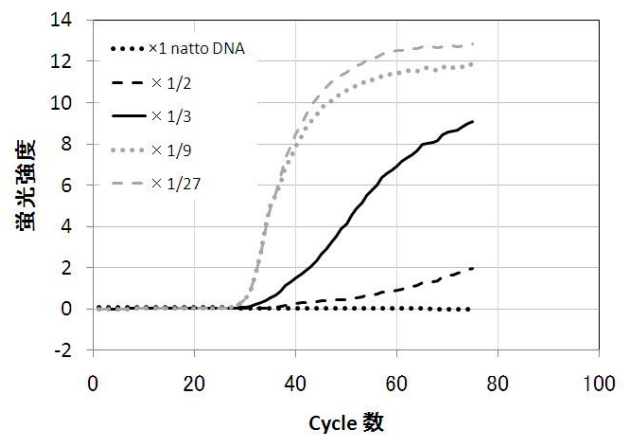


図4 NOS terminator検知用プライマーを用いた遺伝子増幅における納豆菌由来DNAの阻害効果

PCR反応に用いるプライマーは、完全一致する配列にのみ結合することを想定しがちだが、実際には若干配列が異なる部分にも結合が起こる。この場合、完全一致の配列に対して結合力および結合量は低くなると考えられるが、テンプレートに含まれるゲノムの種類が増えると、一部配列が異なる配列の種類も増えることから、完全一致の配列以外にもプライマーが結合する配列が多くなる。こうした目的外の配列に少しずつ

プライマーが結合すると、結果として目的の配列に結合するプライマーの量が不十分となり、PCR反応が阻害されるものと考えられる。こうした阻害はプライマー濃度を上げることで回避が可能のように思われるが、実際には、プライマー濃度を上げると、非特異的な増幅物が増加して、判定がさらに困難になる場合がほとんどである。このため、目的の配列に対する増幅物を確実に得るためには、テンプレートに含まれる目的外のDNAを取り除く必要があると考えられる。

4 まとめ

JAS法で納豆における原料の遺伝子組換え判定を行う際に判定不能に陥る原因について検討を行い、納豆から抽出したDNAサンプル中に含まれる納豆菌由来のDNAがダイズ由来の遺伝子判定を阻害することを示した。今後は納豆におけるダイズ遺伝子の判定のために、納豆由来のDNAから納豆菌由来のDNAを取り除き、ダイズ由来のDNAのみを特異的に抽出する手法の開発し、判定不能率の改善を行う手法に取り組んでいく。

5 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部：安全性審査の手續を経た遺伝子組換え食品及び添加物一覧(2008)
- 2) 独立行政法人農林水産消費技術センター：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(2002)
- 3) 松岡猛，日野明寛：食糧—その科学と技術—，42，pp. 55-71(2004)