

納豆を検体とする遺伝子組換え食品検査についての一考察
(平成26～27年度)

北村雅美, 浅田幸男, 赤木正章, 難波順子, 吉岡敏行 (衛生化学科)

【調査研究】

納豆を検体とする遺伝子組換え食品検査についての一考察 (平成26～27年度)

A Study of Method for Detection of Genetically Modified Organisms in Natto
(Apr.2014-Mar.2016)

北村雅美, 浅田幸男, 赤木正章, 難波順子, 吉岡敏行 (衛生化学科)

Masami Kitamura, Yukio Asada, Masaaki Akaki, Junko Namba, Toshiyuki Yoshioka
(Food and Drug Chemical Research Section)

要 旨

平成26年度に大豆加工食品の遺伝子組換え食品検査を行ったが、納豆検体においては大豆内在性遺伝子である *LeI* が検出できなかったため、検査不能と判定された。原因究明のため、3種の国産大豆穀粒について、それぞれ粉末納豆菌を用いて納豆に加工し、工程ごとのDNA収量を比較した。その結果、DNA収量は加工工程が進むとともに減少し、特に蒸煮工程では、加工前と比較して9割程度も減少することが確認された。また、5%の米国産遺伝子組換え大豆 (RRS: Roundup Ready Soybean) を含む大豆試料の抽出DNA溶液に、納豆菌抽出DNA溶液を段階的に添加し、*LeI* 及び RRS 遺伝子を検出するリアルタイムPCRを実施したところ、両測定値は納豆菌抽出DNA溶液の添加量に依存して低下した。これらの結果から、平成26年度に納豆検体が検査不能と判定された一因として、加工工程で大部分のDNAが分解されること、また納豆菌抽出DNA溶液には何らかのPCR阻害物質が含まれることが考えられた。

[キーワード: 遺伝子組換え食品, *LeI*, RRS, 定量PCR]

[Key words: Genetically modified organisms, Lectin gene *LeI*, RRS, Quantitative PCR]

1 はじめに

遺伝子組換え作物の世界での栽培面積は、2014年時点で全作物栽培面積の12%を占めており¹⁾、世界的にも遺伝子組換え作物の栽培が増加する中、日本では、生物多様性への影響や、食品や飼料としての安全性について、最新の科学的知見により評価を行い、安全性が確認されたもののみが使用 (栽培、輸入等) できる仕組み (安全性審査) を導入している。日本は2014年には大豆、セイヨウナタネ及びトウモロコシ約2000トンを入力しているが、そのうちの1500トン程度が遺伝子組換え品種と推定されており²⁾、もはや遺伝子組換え作物は日常生活の中で欠かせないものとなってきている。

岡山県では、平成14年度から遺伝子組換え食品の検査を行っており、平成24年度からは大豆加工食品である豆腐や油揚げについて、「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」(平成24年11月16日付け消食表第201号消費者庁次長通知) 別添「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」2.1.2 定量PCR法に従い、食品衛生法に基づく収去検査 (検査項目: 安全性審査済の遺伝子組換え大豆であるRRS (Roundup Ready Soybean)) を行っている。大豆を対象としたRRSの定量

PCRにおいては、大豆に普遍的に存在するレクチン遺伝子 (*LeI*) を指標 (内在性遺伝子) としてRRSの混入率を求めるが、平成26年度に新たに大豆加工食品として「納豆」を対象に検査を実施したところ、検体全てにおいて*LeI* が検出できなかったため、検査不能と判定された。今回我々は、その原因を究明するため、納豆の加工工程におけるDNA分解状況及び納豆菌抽出DNA溶液による大豆DNA (*LeI* 及び RRS) を標的とするリアルタイムPCR阻害の可能性について検討した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

大粒大豆 (平成26年産宮城県産ミヤギシロメ)、中粒大豆 (平成26年産北海道産トヨマサリ)、小粒大豆 (平成26年産北海道産スズマル) を原料とし、家庭用高橋納豆素 (乾燥粉末納豆菌) でそれぞれ納豆に加工し、分析試料に供した。

また、アメリカ産不分別大豆 (RRS 80.4%) 及びアメリカ産分別大豆から抽出したDNA溶液並びに納豆菌抽出DNA溶液を用いてリアルタイムPCRで遺伝子増幅を確認した。

2.2 試薬等

DNeasy Plant Mini Kit, Genomic-Tip 20/G, RNaseA (100mg/mL), Proteinase K, AP1 緩衝液, AP2 緩衝液, AP3/EtOH 混液, AW/EtOH 混液, G2 緩衝液, QBT 緩衝液, QC 緩衝液, QF 緩衝液: QIAGEN 製, 滅菌水 (超純水を滅菌), エタノール (99.5%), イソプロピルアルコール (99.5%): ナカライテスク製, Trypticase Soy Agar (TSA 培地): BD 製, GM サイズ (RRS) プラスミドセット-ColEI/TE-, サイズ内在性 DNA *LeI* オリゴヌクレオチドセット, GM サイズ (RRS) 系統別 DNA RRS オリゴヌクレオチドセット: ニッポンジーン製, TaqMan Universal PCR Master Mix, MicroAmp Optical Reaction Plate, Optical Adhesive Cover, Optical Cover Compression Pad: ABI 製

2.3 調査

2.3.1 測定条件等

使用機器 分光光度計: Thermo Fisher Scientific
NanoDrop 2000

リアルタイム PCR: ABI PRISM 7900HT 96well

DNA 抽出法及びリアルタイム PCR 測定条件

平成 24 年 11 月 16 日付け消食表第 201 号消費者庁次長通知準拠及び 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 3 版 (2012) 一部参照

2.3.2 PCR 標的 DNA のコピー数の算出方法

「安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法」(平成 24 年 11 月 16 日付け消食表第 201 号消費者庁次長通知) 別添「安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法」2.1.2 定量 PCR 法に規定されている, 標準プラスミド DNA 溶液を標準物質として用い, コピー数を算出した。

2.3.3 PCR 増幅阻害率の算出方法

納豆由来 DNA による *LeI* 及び RRS 遺伝子の PCR 阻害率は次のように算出した。

$$\text{PCR 阻害率 (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

A= RRS 5% 大豆の *LeI* (RRS) 遺伝子の増幅量 (コピー数)

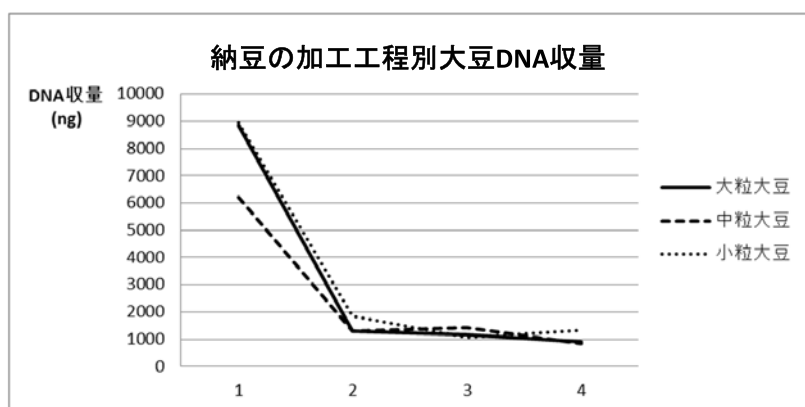
B= 納豆菌由来 DNA 添加試料の *LeI* (RRS) 遺伝子の増幅量 (コピー数)

2.3.4 納豆加工工程における DNA 分解状況調査

検査試料に用いる大豆の量は, 質量で規定されているため, 試料中の大豆 DNA のコピー数は大豆の粒の大きさに依存する (平成 26 年度の事例では, 大豆内在性遺伝子 *LeI* のコピー数は, 大粒 46.3, 中粒 94.7, 小粒 79.4, 極小粒 1020)。そこで, 大粒, 中粒, 小粒の 3 種類の大豆について, 乾燥粉末納豆菌を用いて納豆に加工³⁾し, ①納豆加工前, ②蒸煮 (200kPa, 1hr) 後 (通常の製法では 9 時間蒸煮), ③納豆菌発酵 (40 ± 2°C, 24hr) 後, ④熟成 (4 ± 3°C, 24hr) 後の 4 段階で試料を採取し, 各々 DNA 抽出 (使用キットは, ①は DNeasy Plant Mini Kit, その他は Genomic-Tip 20/G) を行い, Thermo Fisher Scientific NanoDrop2000 を用い, 260nm における吸光度から DNA 濃度を求め, 得られた DNA 収量の比較を行った。

2.3.5 納豆菌 DNA によるリアルタイム PCR 阻害調査

乾燥粉末納豆菌 0.1g を 2mL の滅菌水に溶解し, TSA 培地に接種後, 40 ± 2°C のふ卵器中で 18 時間培養し, 培地から採取したコロニーについて Genomic-Tip 20/G で納豆菌由来 DNA を抽出した。また, アメリカ産不分別大豆 (RRS 80.4%) と分別大豆を RRS の質量比が 5% となるよう混合調整した大豆試料から DNA を抽出した。次に, 大豆由来 DNA の濃度が一定となるよう, 納豆菌由来 DNA 量を段階的に添加調整して試料とした。すなわち, 大豆由来 DNA 濃度が 16.9ng/μL, 納豆菌由来 DNA 濃度がそれぞれ 1.8ng/μL, 3.4ng/μL, 6.9ng/μL となるよう試料を



- 1 納豆加工前 (生大豆)
- 2 蒸煮 (200kPa, 1hr) 後
- 3 発酵 (納豆菌接種) 後
- 4 熟成 (4 ± 3°C, 24hr) 後

図 1 納豆の加工工程別大豆 DNA 収量

調整した。対照として、同濃度の大豆 DNA のみ及び納豆菌 DNA のみを含む試料も調整した。これらについてリアルタイム PCR を行い *Le1* 及び RRS 遺伝子の増幅について確認を行った。

3 結果および考察

3.1 納豆加工工程における DNA 分解状況調査結果

大粒大豆、中粒大豆及び小粒大豆の納豆加工工程における試料 0.5g から得られた DNA 収量を比較したグラフを図 1 に示す。大粒、中粒、小粒とも全て蒸煮後の試料で DNA 収量が 9 割程度落ちていた。小粒大豆が蒸煮後の

DNA 収量が最も多かったが、納豆菌発酵後ではその差も無くなっていた。これまで、蒸煮工程のない豆腐を検体とする場合は、問題なく検査が行われてきているので、納豆加工工程のうち、蒸煮工程が大豆 DNA に与える損傷は非常に大きいと考えられた。更に納豆を工業的に生産する場合は、蒸煮釜と呼ばれる高圧力の釜が蒸煮工程で用いられるので、本調査以上に大豆 DNA の受ける損傷は大きくなると推察される。DNA 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分解を受ける⁴⁾こと、加えて納豆のような発酵食品ではさらに DNA の分解が進む⁵⁾ことも知られており、本調査においてもそのことが確認された。

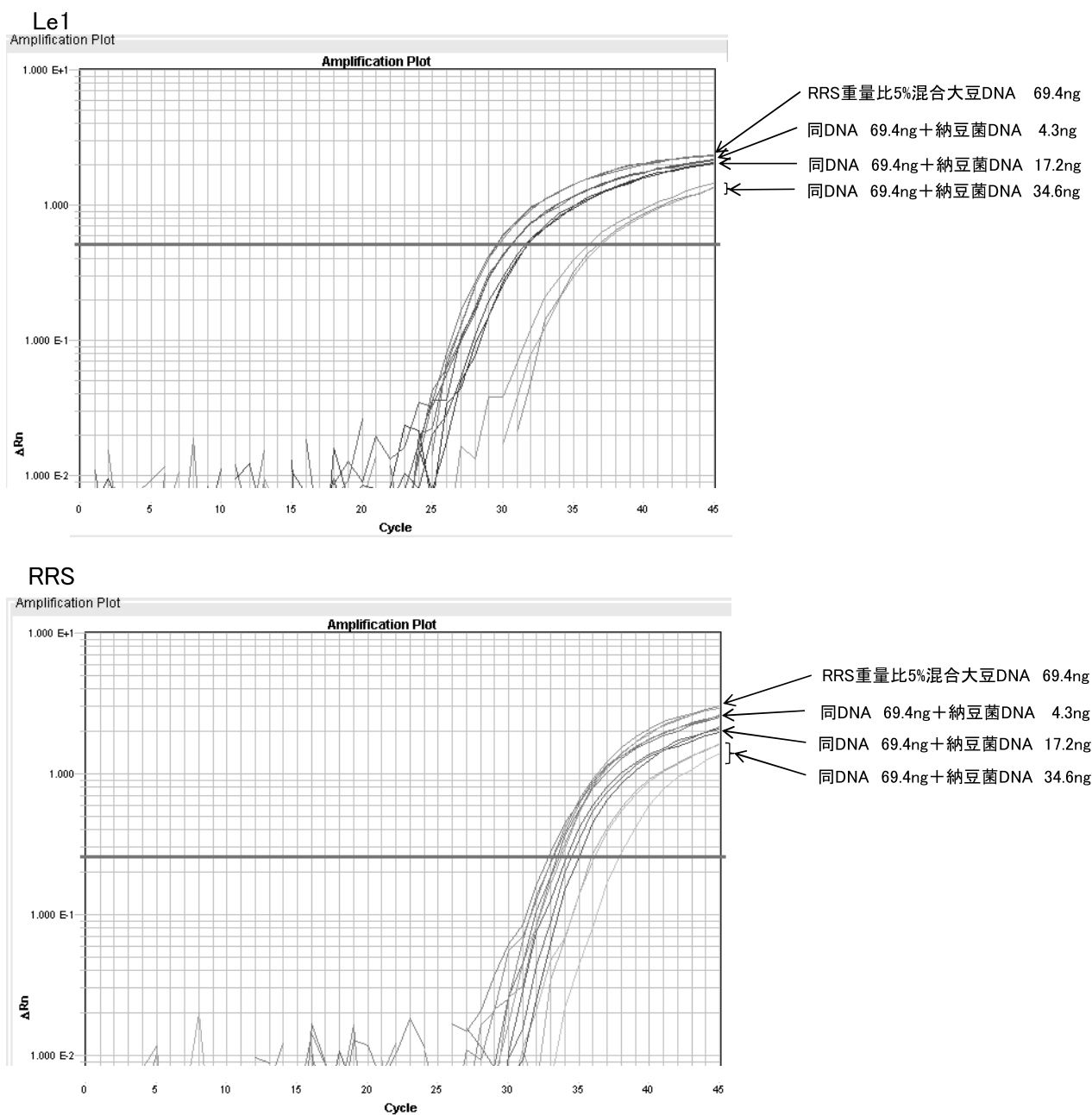


図 2 amplification Plot

3.2 納豆菌由来 DNA によるリアルタイム PCR 阻害調査結果

LeI 遺伝子及び RRS 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 結果 (amplification plot) を図 2 に示す。分別大豆 DNA のみ、分別大豆の 1/16・1/4・1/2 の各量納豆菌 DNA を添加した試料のそれぞれの Ct (Threshold cycle) 平均値は、30.00, 30.79, 31.98, 37.09 で蛍光の発現が段階的に遅れており、またそれぞれの DNA の増幅量(コピー数)の平均値は、4035, 2422, 1119, 42 と減少しており、添加した納豆菌由来 DNA の量が多いほど PCR 増幅が阻害されていることが分かった。また、納豆菌抽出 DNA 溶液から受ける PCR 阻害の割合が、*LeI* 遺伝子の方が RRS 遺伝子に比べて大きくなっており、PCR 標的遺伝子により阻害の程度が異なる様子も見られた。(図 3)

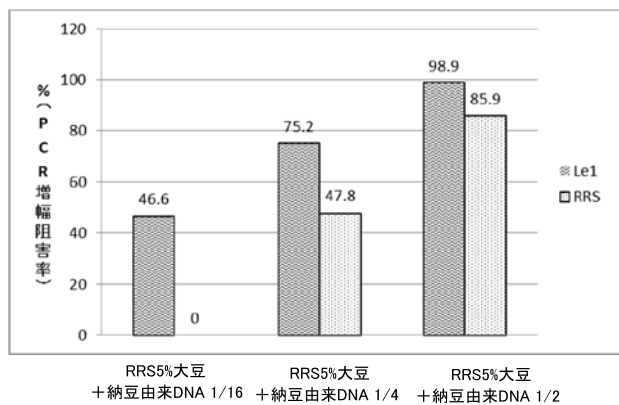


図 3 納豆由来 DNA による *LeI* 及び RRS の PCR 増幅阻害率 (大豆 DNA のみの *LeI* 及び RRS の PCR コピー数を阻害率 0% として換算)

4 まとめ

納豆を検体とする遺伝子組換え食品検査において、遺伝子組換え食品のモニタリングを目的として独立行政法人農林水産消費安全技術センターにより示された検査法⁹⁾では、15 分間流水でぬめりを取った後、滅菌水ですすぐことになっているが、平成 26 年度の納豆検体では、このとおり洗浄を行っても検査不能となった。他県の例でも、JAS 法に基づき流水で十分に洗浄したものをサンプルに用いても、大豆 DNA 抽出液への納豆菌由来 DNA の混在が確認されている⁷⁾ことから、納豆については、その加工工程(特に蒸煮工程)において DNA の分解が起こることに加え、納豆菌抽出 DNA 溶液に含まれる何らかの PCR 阻害因子から *LeI* 遺伝子及び RRS 遺伝子を標的とした PCR の阻害も受けることで検査不能となると推測された。また、*LeI* 遺伝子と RRS 遺伝子で PCR 阻害を受ける程度が異なる(RRS の方が *LeI* よりも納豆菌由来 DNA 溶液の影響を受けにくい)ことから、リアルタイム PCR の結果が良好であっても、RRS 混入率の算出は不正確になると考えられた。

本調査では、リアルタイム PCR の阻害因子の特定には至らなかったが、DNA ポリメラーゼの活性阻害、標的遺伝子と類似配列を持つ DNA によるプライマー・プローブの競合阻害等、様々な可能性が考えられるため、今後の検討課題としたい。

文 献

- 1) 国際アグリバイオ事業団 (ISAAA) : Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops : 2014
- 2) 小島正美:誤解だらけの遺伝子組換え作物, エネルギーフォーラム出版 (2015)
- 3) 全国納豆協同組合連合会納豆 PR センター HP「納豆ができるまで」
<http://natto.or.jp/make/index.html>
- 4) 松岡猛, 日野明寛: 農産物遺伝子組換え体の検知・判定技術, 食糧 - その科学と技術 -, No.42, 55-71, 2004
- 5) 小川美緒, 若林沙織ら: 遺伝子組換え農産物の食品原材料とその加工食品実態調査, 鳥取県衛生環境研究所報, 第 44 号, 42-45, 2004
- 6) 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 3 版 (2012)
- 7) 奥村史朗, 執行修司, 富岡寛治: 納豆における原料サイズの遺伝子組換え判定, 福岡県工業技術センター研究報告, No.21, 31-34, 2011