

STHクロマトPASを利用した、 加工食品における農作物の品種判定検査

門 田 有 希

岡山大学大学院環境生命科学研究科 助教

緒 言

農作物の品種判定は、食の安心・安全に関わる重要な検査である。近年、食品偽装や不正表示などが頻繁に新聞やニュース等でも取り上げられ、消費者の食品安全に対する関心は非常に高まっている。そのため、野菜や果物などの農作物、あるいは食品に含まれる原料品種を正確に判定できる技術の開発が必要とされている。一方で、日本には品質の高い農作物品種が多く、高級品として海外へ輸出されている。しかしながら、品種の盗用や偽装表示など日本のブランド力が悪用される事態が発生している。農作物の品種は育成者権によって保護されており、第三者による無許可での栽培や販売は禁止されている¹⁾。このような諸外国での無断使用や品種の盗用を防止するため、税関、あるいは農作物や食品の製造・運搬現場等で、正確かつ簡便に判定できる品種判定法の開発が求められている。

しかし、いまだに実用的な技術は開発されていない。さまざまな問題点が指摘されており、例えば、野菜や果物の見た目や香りなどの特徴では明確に区別ができない、ジュースやジャム、小麦粉など一度加工されてしまうと、そこに含まれる原料品種を特定できない、などがあげられる。また、SSR (Simple Sequence Repeat) や CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) など既存のDNA判定法では、複数のマーカー情報を組み合わせることで判定していたため、操作が煩雑になり、いくつかの品種がブレンドされると正確な判定ができない。さらにDNAを検出するうえで専用の高額機器や設備も必要である。よってこれらの問題点を克服した、簡便かつ正確に品種を判定可能な技術の開発が望まれる。

最近の研究結果から、レトロトランスポゾンというゲノム中に存在する複製配列を利用することで複数の品種がブレンドされた加工品からでも原料品種を正確に特定できることが示されている^{2,3)}。レトロトランスポゾンとはゲノム中に散在する複製配列であり、一度挿入され

ると安定して遺伝する⁴⁾。そのため、品種特異的な挿入部位は、品種を特定するうえで有効なマーカーとなる。このマーカーはレトロトランスポゾンの挿入の有無で判定するため明確な判定が可能であり、アズキ、イチゴ、サツマイモ、コムギ等さまざまな作物種で開発が進められている^{2,3,5-7)}。実際にこれまでの研究において、アズキの「しゅまり」と「きたのおとめ」という品種を対象に開発されたマーカーを用いることで、品種がブレンドされた加工品からでも原料のアズキ品種を正確に判定可能なことが報告されている²⁾。また、近年はより簡便な検査を実現するため、C-PAS (Chromatographic Printed Array Strip) 法という新しいDNAシグナル検出法も注目されている。この手法は、専用の器具や設備を必要とせず、マッチ棒サイズのクロマト紙でシグナルを検出する。シグナル検出も短時間(15分間)で終わるため、実用性が極めて高いと考えられる。著者らはこの手法を利用し、イチゴ単体サンプルについては極めて簡便に品種を特定できることを示している⁸⁾。

そこで本研究では、レトロトランスポゾンマーカーを利用し、さらにC-PAS法やLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法等も組み合わせることで、複数品種がブレンドされた加工品からでも、簡便かつ正確に原料品種を特定可能な技術の開発を試みる。これにより、実用化に向けた加工食品からの品種判定を試験的に実証する。

実験方法

供試材料はアズキ品種の「きたのおとめ」と「しゅまり」とする。本研究では、これら品種が含まれる加工品から二種類の方法によりDNAを抽出した。一つはGenCheck DNA Extraction Reagent kit (株式会社ファスマック)を用いた方法である。まずは餡10mgに対してGenCheck[®] DNA Extraction Reagent bufferを100 μ L加え、ボルテックスでよく攪拌した。100 $^{\circ}$ Cで10分間加

温した後、水中で1分間静置し冷却した。15,000 gで遠心分離した後、上澄みを回収し、分析用試料とした。もう一つは水抽出法である。こちらは、餡300 mgに対して滅菌水を300 μ L加え、ボルテックスで良く攪拌した後5分間静置した。再度ボルテックスで攪拌した後、同様に5分間静置した。13,000 rpmで2分間遠心分離した後、上澄みを回収し、分析用試料とした。DNAの濃度測定にはNano drop 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

これらDNAサンプルを用い、LAMP法によりDNAの増幅反応を行った。LAMP法とは栄研化学が独自に開発したDNA増幅法であり、これを用いれば一定温度の反応で効率的にDNAを増幅させることが可能である (<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>)。DNA抽出液2 μ Lに Isothermal Master Mix (増幅用酵素等含む)を5 μ L、プライマー mixtureを3 (あるいは6) μ L混合し、ヒートブロックを用いた65 $^{\circ}$ Cの等温反応によってDNAを増幅した。DNA増幅産物は1.5%アガロースゲルによる電気泳動で確認した。また、C-PASによる検出法では、DNA増幅産物にクロマト紙を1秒浸した後、色素と展開液を混合した反応液20 μ Lに15分間浸し、室温にてクロマト展開を行った。なお、プライマー配列は各種特異的なDNA配列を基にすでに設計済みのものを用いた (データ非公開)。

結果

本研究では二種類のDNA抽出方法を用い、各手法について2回ずつ抽出作業を行った。回収されたDNA濃度はGenCheckを用いた場合「きたのおとめ」が79.4および94.4 ng/ μ L、「しゅまり」が145.8および62.8 ng/ μ L、水抽出を用いた場合「きたのおとめ」が58.6および85.0 ng/ μ L、「しゅまり」が293.0および43.5 ng/ μ Lであった。いずれの方法においても簡易に十分量のDNAを抽出することができた。これらDNAを対象にLAMP法によるDNA増幅を行った後、C-PAS法によるシグナル検出を行った。

まずは「きたのおとめ」についてGenCheckで抽出したDNAをさまざまな濃度に希釈し、LAMP反応を行った (表1)。LAMPで増幅した産物を1.5%アガロース電気泳動で確認したところ、希釈したDNA溶液を用いた場合に増幅が確認された (図1A)。これら増幅産物を用いC-PAS法によるシグナル検出を行ったところ、アガロース電気泳動の結果と同様、希釈したDNA溶液を用

表1 GenCheckで抽出した「きたのおとめ」のDNA濃度と希釈後濃度

| 番号 | 濃度 (ng/ μ L) | 備考 |
|----|------------------|------|
| 1 | 94.4 | 希釈無し |
| 2 | 79.4 | |
| 3 | 60.0 | 希釈 |
| 4 | 40.0 | |
| 5 | 20.0 | |
| 6 | 5.0 | |

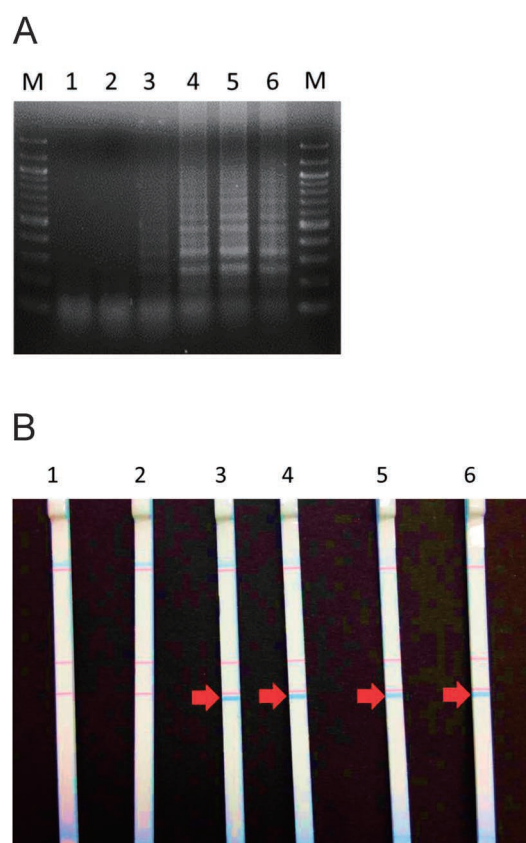


図1 GenCheckにより抽出した「きたのおとめ」のシグナル検出。(A) アガロース電気泳動の結果。(B) C-PASによる検出の結果。Mは100 bp ladder、1~6は表1に対応する。C-PASの赤矢印は目的のシグナルが確認されていることを示す。

いた場合にシグナルが確認された (図1B)。また「しゅまり」についても同様にLAMP反応とシグナル検出を行ったが、増幅は確認されなかった。「しゅまり」検出用のプライマーは「きたのおとめ」検出用のプライマーと比較し、増幅効率が低いことが示唆されたため、プライマー量を2倍にする、あるいはLAMPの反応時間を1.5倍長くするなどの条件検討を行った。その結果、「しゅまり」の場合はプライマー mixtureを2倍量の6 μ L加えれば、安定してシグナルを検出できることが示され

表2 GenCheckで抽出した「しゅまり」のDNA濃度と希釈後濃度

| 番号 | 濃度 (ng/μL) | 備考 |
|----|------------|------|
| 1 | 62.8 | 希釈無し |
| 2 | 40.0 | 希釈 |
| 3 | 20.0 | |
| 4 | 5.0 | |

表3 水抽出法で得られたDNAの希釈後濃度

| 番号 | 品種 | 濃度 (ng/μL) |
|----|--------|------------|
| K1 | きたのおとめ | 60.0 |
| K2 | | 40.0 |
| K3 | | 20.0 |
| K4 | | 5.0 |
| S1 | しゅまり | 60.0 |
| S2 | | 43.5 |
| S3 | | 20.0 |
| S4 | | 5.0 |

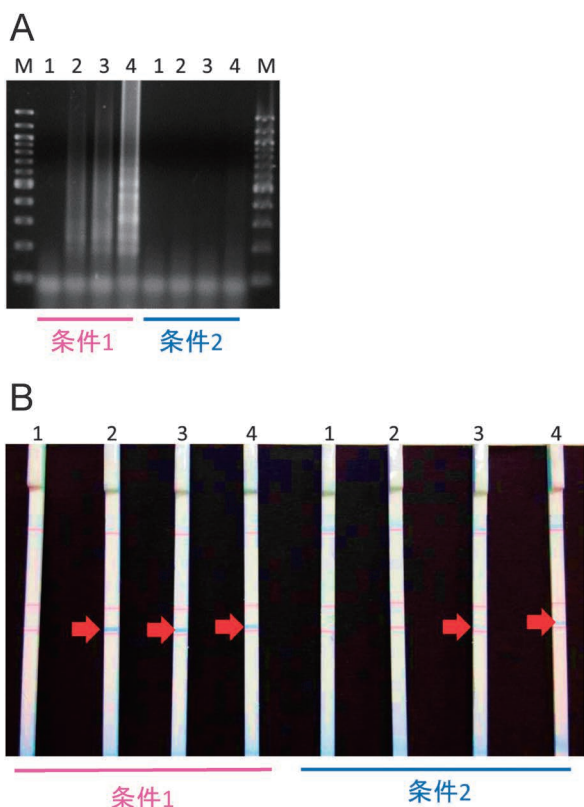


図2 GenCheckにより抽出した「しゅまり」のシグナル検出。(A) アガロース電気泳動の結果。(B) C-PASによる検出の結果。Mは100 bp ladder、1~4は表2に対応する。C-PASの赤矢印は目的のシグナルが確認されていることを示す。なお、条件1では使用するプライマー量を2倍にし、条件2では反応時間を1.5倍にした。条件1の方がシグナルが検出されやすい傾向にあった。

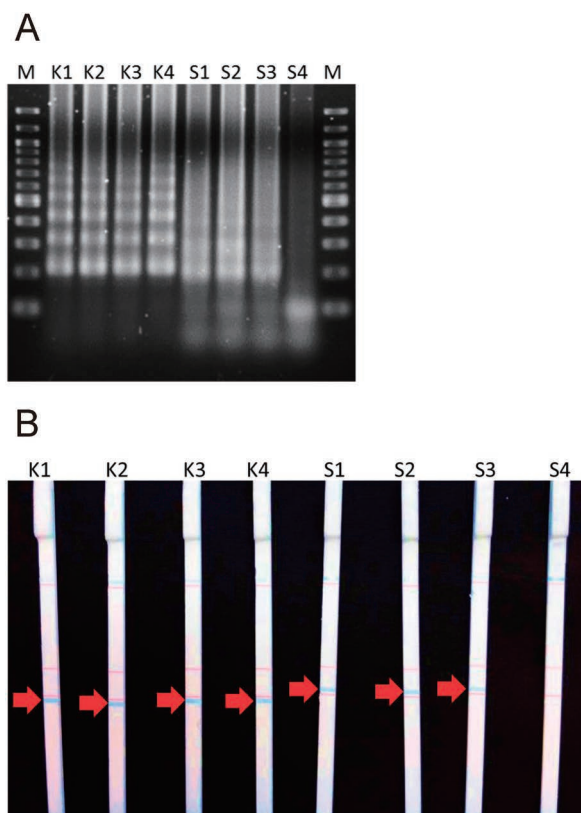


図3 水抽出で得られたDNAのシグナル検出。(A) アガロース電気泳動の結果。(B) C-PASによる検出の結果。Mは100 bp ladder、K1~K4およびS1~S4は表3に対応する。C-PASの赤矢印は目的のシグナルが確認されていることを示す。

た(表2、図2A、B)。また、「きたのおとめ」、「しゅまり」のいずれもDNAの濃度を5~60 ng/μLに調整すれば、水抽出法で得られたDNAサンプルでも十分な増幅反応が見られ、大体的場合シグナルを検出することができた(表3、図3A、B)。ただし「しゅまり」では最小量の5 ng/μLではシグナルが見えず、DNA量が少なすぎると増幅が起こりにくいと考えられた。

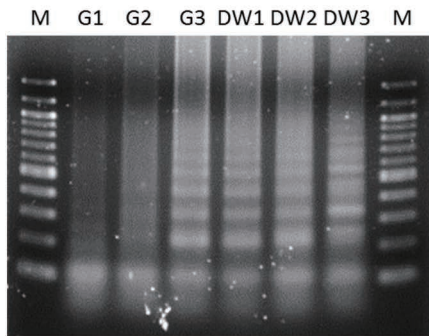
単独サンプルでのシグナル検出に成功したため、続いて混合サンプルでもC-PAS法によるシグナル検出が可能かを検証した。GenCheckおよび水抽出で得られた

「きたのおとめ」と「しゅまり」のDNAサンプルを1:1の比で混合し、LAMP反応を行った。その際、「しゅまり」の方が増えにくいため、「しゅまり」のプライマーを2倍量とした。アガロース電気泳動での増幅は確認されたが、C-PAS法による検出では「しゅまり」のシグナルが得られなかった(表4、図4A、B)。「きたのおとめ」については明瞭なシグナルが確認されたことから(図4B)、「きたのおとめ」のみ増幅したと考えられた。そこで「しゅまり」のプライマー量を3倍量に調整し、

表4 混合サンプルの濃度

| 番号 | 抽出法 | 濃度 (ng/ μ L) |
|-----|----------|------------------|
| G1 | GenCheck | 40 |
| G2 | | 20 |
| G3 | | 5 |
| DW1 | 水抽出 | 40 |
| DW2 | | 20 |
| DW3 | | 5 |

A



B

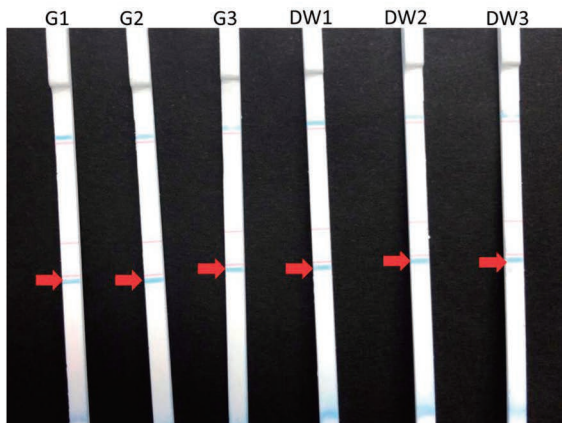


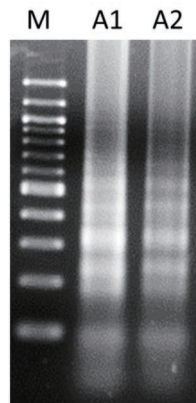
図4 混合サンプルのシグナル検出。(A) アガロース電気泳動の結果。(B) C-PASによる検出の結果。Mは100 bp ladder、G1~G3およびDW1~DW3は表4に対応する。C-PASの赤矢印は目的のシグナルが確認されていることを示す。

LAMP反応を行った。その結果「しゅまり」でも増幅が確認され、両品種について明瞭なシグナルを確認することに成功した (図5A、B)。

考 察

本研究ではアズキ品種の「きたのおとめ」と「しゅまり」を対象にLAMP法によるDNA増幅、C-PAS法によるシグナル検出を行い、試験的な品種判定検査を行っ

A



B

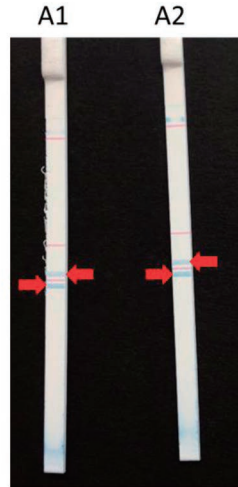


図5 条件検討後の混合サンプルのシグナル検出。(A) アガロース電気泳動の結果。(B) C-PASによる検出の結果。Mは100 bp ladder、A1とA2は混合サンプルであり、それぞれ20 ng/ μ L、5 ng/ μ Lに調整した。C-PASの赤矢印は目的のシグナルが確認されていることを示す (上側がしゅまり、下側がきたのおとめに該当)。

た。その結果、単独サンプルと混合サンプルいずれの場合でも明瞭なシグナルの検出に成功した。従来のPCRによるDNA増幅反応では、複数の温度条件下で反応を起こす必要があるため、専用の機器が必要である。一方LAMP法の場合は一定温度の反応でよいため、簡易なヒートブロックやウォーターバス (あるいはお湯) でDNA増幅が可能である。また電気泳動によるシグナル検出では、ゲル作成、電気泳動、染色等必要であり、準備から検出まで2時間程度はかかる。それに対してC-PAS法はクロマト紙を反応液に15分間程度浸すだけで終わるため、操作も簡便で、大幅に時間も短縮できる。つまり、LAMP法とC-PAS法を導入すれば、高額な実験機器や設備も不要で、極めて短時間に検査を行うことができる。また、本研究ではGenCheckおよび水抽出の二種類の方法でDNAを抽出したが、どちらの方法でも簡易に十分量のDNAを抽出できた。ただし、C-PAS法で明瞭なシグナルを検出するにはDNA濃度やプライマー量等を調整しなければならず、用いるサンプルやプライマーによってはいくつかの条件検討が必要であることが示唆された。以上のことから、適切な条件を設定すれば、本手法は現場検査に対応し得る極めて実用的な手法であると考えられた。

要 約

本研究では、加工食品から簡便かつ正確に原料品種を特定する技術の開発を目的とし、加工餡を対象にその検証実験を行った。その結果、LAMP法とC-PAS法を用いることで、高額な機器や設備も不要で、短時間にアズキ品種を正確に特定できることが示された。従来の手法と比較した本手法の利点を以下に示す。

1. PCRによるDNA増幅では複数の温度条件下で反応させる必要があり、サーマルサイクラー等専用の機器が必要である。一方LAMP法では、一定の温度条件下（65℃）の反応でDNA増幅が可能であり、簡易なヒートブロック、ウォーターバス（お湯）等が良い。
2. 従来の電気泳動によるシグナル検出では、アガロースゲルの作成、電気泳動、染色などの操作が必要であり、トータルで2時間程度はかかる。加えてUVトランスイルミネーター等専用の機器が必要である。一方C-PAS法によるシグナル検出では、操作も簡便で15分間の反応で終わる。またマッチ棒サイズのクロマト紙があれば検査が可能で、場所も選ばない。

今回は加工餡から試験的に原料アズキ品種を特定したが、本手法はその他のさまざまな食品や農作物種（例え

ば、ジャムやジュースなどに含まれる果物品種や、小麦粉に含まれるコムギ品種等）に適用可能である。今後はより詳細な実験条件の検討や他の食品での試験を行い、実用的な技術の開発を目指す。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。また、株式会社ファスマック事業開発部の高崎一人副部長にはプライマー配列の設計や実験条件の検討に関するアドバイスのご提供など、非常にお世話になりました。この場をお借りし、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 種苗法（総務省法令データ提供システム：<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H10/H10HO083.html>）
- 2) 中川藍ほか：DNA多型, **17**, 85–91, 2009.
- 3) 田原誠ほか：DNA多型, **15**, 122–125, 2007.
- 4) A. Kumar, J. L. Bennetzen: *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 479–532, 1999.
- 5) 秋竹広翔ほか：DNA多型, **21**, 64–72, 2013.
- 6) 門田有希ほか：DNA多型, **21**, 47–54, 2013.
- 7) 門田有希ほか：DNA多型, **22**, 60–65, 2014.
- 8) Y. Monden, et al.: *J. Biotech.*, **185**, 57–62, 2014.