

# 核酸クロマトグラフ法を利用した産地判別技術の簡易迅速化に関する検討

清水健志

## Study on Quick Determination Method for the Geographic Origin of Food Using Nucleic Acid Chromatography

Takeshi Shimizu

### 要 旨

函館地域に特徴的な塩基配列を持つマコンプについて構築した PCR 判別法をモデルに、核酸クロマトグラフ法を利用した簡易迅速化について検討した。その結果、核酸クロマト法による判別は、既存法と同等の正確性であると評価された。さらに検出に要する時間は、電気泳動（約 80 分間）と比較して大幅に短縮（約 15 分間）できることが分かった。一方で、核酸クロマト用のプライマーは、特殊配列とビオチンの付加による影響と考えられる増幅性の低下が見られたことから、核酸クロマト用に PCR 条件の構築が必要と考えられた。

農水畜産物の多くは、産地により品質やブランド価値が異なっている。そのため産地情報は、消費者が購入する際の指標の一つになっている<sup>1)</sup>。しかしながら、近年、産地のブランド力を利用した虚偽表示が社会的な問題となり、消費者と生産者の双方から、産地を確認できる科学的・客観的な技術の開発が求められている。

現在までに、様々な食品原料について産地や品種を判別する技術が開発されており、DNA の塩基配列情報が多く利用されている<sup>2,3)</sup>。しかしながら、DNA を利用するためには、専用の装置や煩雑な操作が必要となることから、簡便且つ正確に判別できる技術の開発が求められている。近年、PCR 等で増幅した DNA を検出するための新たな手法として、核酸クロマトグラフ法（以下、核酸クロマト法）が注目されている<sup>4)</sup>。専用メンブレンに PCR 後の反応液を吸収させるだけの簡便な操作により、増幅 DNA をシグナルとして検出することが可能であり（図 1）、DNA 分析による産地判別技術の簡便化が

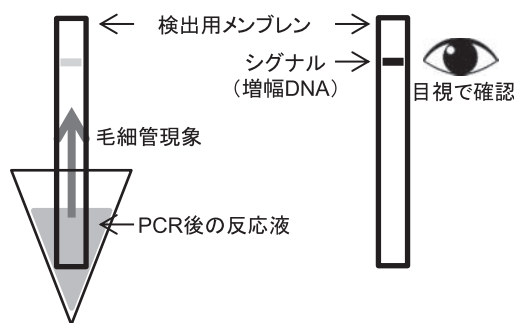


図 1 核酸クロマトグラフ法の原理

期待される。

函館地域は、コンブの一大産地であり、国内のコンブ漁獲量の約 3 割を占めている。水揚げされる種類は、主にマコンプである。北海道では、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンプ、ナガコンブ、ガッガラコンブ、ミツイシコンブ等、様々な種類が漁獲されているが、マコンプは、特に旨味・甘味が強いため、コンブの中でも高級品として扱われている。現在、中国産や韓国産のマコンプも市場に流通して

いるが、これらに比べて函館産は、ブランド価値が高く、高値で取引されており、地域コンブ製品の付加価値向上にも貢献している。現在、函館市や市内漁業協同組合が中心となり、名称を「函館真昆布」に統一して、函館産マコンブのブランド価値の更なる向上に努めている。

これまでに我々は、地域資源のブランド形成に貢献する技術開発を目的に、mtDNA 分析によるコンブの原産国判別技術を開発している<sup>5)</sup>。その中で、マコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブは、mtDNA の塩基配列に違いがほとんど見られないが、函館産のマコンブでは、塩基配列の一部が欠失した mtDNA (以下、欠失タイプ) を持つ個体が存在することを確認している (図 2)。

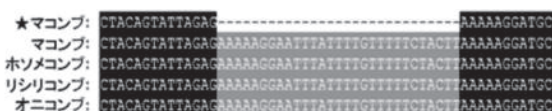


図 2 函館産マコンブに存在する mtDNA の塩基配列の欠失  
★で示したマコンブは、塩基が欠失している。

これまでのところ、中国産及び韓国産のマコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブで確認されるのは、欠失のないタイプ (以下、標準タイプ) であり、欠失タイプは、函館産であることを示す有効な DNA マーカーとして期待できる。

そこで本研究では、マコンブ mtDNA の欠失・標準タイプの判別をモデルに、核酸クロマト法を利用した産地判別技術の簡易迅速化について検討した。

試料には、函館市内で採取したマコンブ 5 個体 (No. 1~No. 5) を用い、それぞれ約 50 mg を採取し、GM quicker 2 (株ニッポンジーン) を用いてプロトコールに準じて DNA を抽出した後、mtDNA のタイプ判別法として既に構築した Multiplex PCR (以下、既存法) により、各個体の mtDNA のタイプを確認した。既存法は、標準タイプの塩基配列 (205 bp) だけを増幅する判別プライマー (図 3)、及び両タイプに共通に存在する塩基配列 (571 bp) を増幅するユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、2%アガロースゲル電気泳動により各プライマーに由来する増幅 DNA の有無を確認した。なお PCR の条件は、94°C 2 分のプレヒート後、94°C 10 秒、50°C 30 秒、68°C 30 秒を 35 サイ

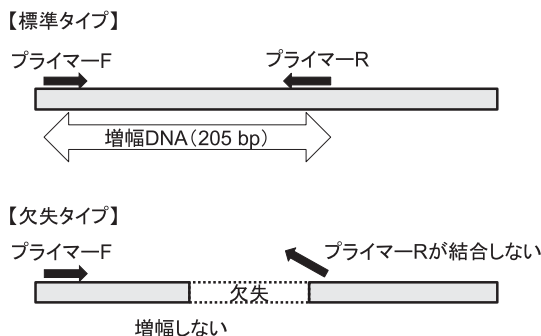


図 3 判別プライマーを用いた PCR による標準タイプと欠失タイプの増幅

クルで行った。

函館産マコンブ 5 個体から抽出した各 DNA について、既存法により判別した結果を図 4 に示す。レーン 1 からレーン 5 の全てでユニバーサルプライマーによる増幅サイズ (571 bp) に相当するバンドが確認されたことから、各 DNA は、mtDNA を含んでおり、且つ PCR による増幅反応が問題なく進んだことが確認できた。また判別プライマーによる増幅サイズ (205bp) 相当のバンドが、レーン 2 からレーン 5 で確認されたことから、マコンブ 5 個体のうち、No.1 が欠失タイプ、残り 4 個体が標準タイプであることが分かった。

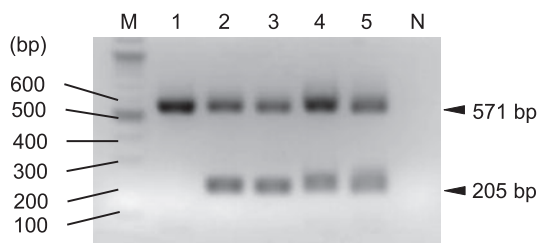


図 4 既存法によるマコンブ 5 個体の DNA 増幅

M: 分子量マーカー、1~5: マコンブ No. 1~No. 5、N: ネガティブコントロール

次いで、各抽出 DNA を試料とし、核酸クロマト法による mtDNA タイプの判別を検討するため、以下の実験を行った。

まず核酸クロマト法の試料調製のための PCR は、既存法のプライマー配列に特殊配列とビオチンを付加した核酸クロマト用プライマーを使用した以外は、既存法と同じ条件で行った。PCR 後の各試料について、2%アガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無及び増幅性を確認した。その結果、各試料のバンドパターンは、全て既存法

と一致することを確認した。一方、判別への影響はないものの、判別プライマーによる増幅性は、既存法に比べて低下していることが分かった (図 5)。この原因は、特殊配列とビオチンの付加が影響したものと考えられ、核酸クロマト用に PCR 条

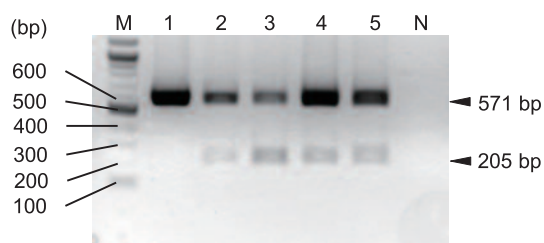


図 5 核酸クロマト用プライマーによる DNA の増幅

M : 分子量マーカー、1~5 : マコンブ No. 1~No. 5、N : ネガティブコントロール

件を構築する必要があることが分かった。

次いで核酸クロマト法を用いた検出実験を以下の方法により行った。まず核酸クロマト法には、C-PAS シリーズ (糊TBA) を使用し、プロトコールに準じ、PCR 反応液 10  $\mu$ l、展開液 10  $\mu$ l、ラテックス溶液 1  $\mu$ l の混合液に検出用メンブレンの先端を 10 分間浸漬した後、青色のシグナルの有無を目視により確認した。その結果、ネガティブコントロールを除く全ての試料において、ユニバーサルプライマーによる増幅 DNA (シグナル A) が検出された。また増幅量が低下した判別プライマーによる DNA (シグナル B) も試料 2 から試料 5 の全てで検出できたことから、検出感度及び正確性は既存法と同等であると考えられた (図 6)。

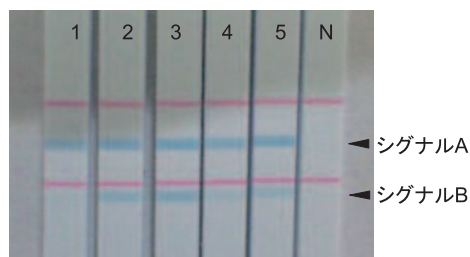


図 6 核酸クロマト法による mtDNA タイプの判別

1~5 : マコンブ No. 1~No. 5、N : ネガティブコントロール、シグナル A : ユニバーサルプライマーによる増幅 DNA、シグナル B : 判別プライマーによる増幅 DNA

また約 15 分間でシグナルの目視確認が可能であり、電気泳動に要する時間 (約 80 分間) に比べて大幅に短縮できることが分かった。

以上の結果から、既存の mtDNA タイプの判別において、核酸クロマト法は、簡易迅速化に有効であることを確認した。我々がこれまでに開発したコンブ原産国判別法も mtDNA の塩基配列の差異を利用した方法であり、今後、本研究で得られた核酸クロマト法に関する技術知見を利用して簡易迅速化を図ることで、技術普及の拡大に繋がるものとする。

### 謝辞

本研究に使用したマコンブの採集についてご協力頂いた南かやべ漁業協同組合の皆様へ感謝いたします。

### 参考文献

- 1)株式会社ネオマーケティング : 令和 3 年度食品表示に関する消費者意向調査報告書、消費者庁 (2022)、p. 33
- 2)太田英明、湯川剛一郎、丹敬二、土肥由長 : 食品鑑定技術ハンドブック (株式会社サイエンスフォーラム) (2005) pp. 47-135
- 3)福田裕、渡部終五、中村弘二 : 水産学シリーズ 149. 水産物の原料・産地判別 (恒星社厚生閣) (2006)、pp. 54-66
- 4)Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T: A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstickDNA chromatography after a six-hour enrichment culture in abroad-range food pathogen enrichment broth. Biomed. Res. Int. (2013), Article ID 295050
- 5)清水健志、八十川大輔 : コンブの原産国判別方法並びにプライマー及びプライマーを含むキット、特許第 6323829 号 (2018)