

## 水産加工食品の原材料の DNA 鑑定の有効性

水野剛志\*・平林雄一郎\*\*・石黒直哉\*\*\*

### Effectiveness of DNA tests for raw materials of fishery processed food

Tsuyoshi Mizuno\*, Yuichirou Hirabayashi\*\*, Naoya Ishiguro\*\*\*

**Abstract:** The Japan Agricultural Standard (JAS) law revised in 1999 obligates correct labeling of quality representation. To ensure correct labeling, it is necessary to establish scientifically clear methods for classifying foods and to check the labeling. The method of using DNA is very useful for food classification and to check the labeling. However, as for DNA analysis, a technical and financial burden is large. Therefore we tested use of Chelex method for DNA extraction. Chelex method is a simple and low-cost method. We applied Chelex method to white meat fish's fry. We were able to identify *Macruronus novaezealandiae* and *Theragra chalcogramma*. The present results show that Chelex method is able to use for DNA analysis.

**Keywords:** DNA analysis, food labeling, species identification, PCR

#### 1. 序論

1999 年に行われた農林資源の規格及び品質表示の適正化に関する法律(JAS 法)の改正により、翌 2000 年 7 月から市販される全ての飲食料品に品質表示が義務づけられた。生鮮食品では、「生鮮食品品質表示基準」に基づき、「名称」・「原産地」の表示、さらに、水産物については、「解凍」・「養殖」に関する記載、加工食品では、「加工食品品質表示基準」に基づき、「名称」「原材料名」「内容量」「賞味(消費)期限」「保存方法」「製造者」に関する記載が必要となった。しかしながら、一部の食料品では、特定の種(品種)や国産品を好む消費者心理を利用するために、食品表示の偽装が起り問題となっている。食品品質表示の真正性の評価は、商品の外観からの判断では困難である。そのため、これらの表示に対し科学的手法に基づいて客観的に検査する様々な方法が開発されてきた。その中でも DNA を用いた食品原材料の鑑定は特に有効である。DNA を用いた鑑定は、生体からだけではなく、冷凍保存、乾燥保存されたサンプルのみならず、加熱されたサンプルでも解析が可能である。また、解析に必要な試料がごくわずかであるため、従来のタンパク質を指標とした解析法に代えて多くの種判別法に用いられている。DNA を用いた鑑定は、塩

---

\* 応用理化学専攻学生    \*\* 環境生命化学科学生    \*\*\* 環境生命化学科

基配列の差異を指標とした分析・開発が主である。最も単純な方法は、対象生物種の塩基配列を決定する方法である。塩基配列を決定する方法は、決定した領域の塩基配列データ全てを他種との塩基配列の差異の評価に用いることが出来、最も正確に生物種を明らかにすることが出来る。さらに、DNA データバンク (DDBJ/ EMBL/ GenBank) 内のデータとの比較により、未知試料の同定に用いることが出来る。しかしながら、塩基配列の決定には高価な分析試薬・分析機器が必要となり、より簡便・安価な方法の開発が望まれている。塩基配列の決定を行わずに塩基配列の差異の評価・DNA を用いた食品原材料の鑑定を行うには以下の方法が考えられる。

種特異的プライマーを使った方法: 目的とする生物種のための DNA を PCR により増幅するプライマーを用いる方法である。種特異的プライマーを使った方法には、対象生物種ごとに異なる長さの PCR 産物が増幅されるようにプライマーを設計することにより、同時に複数種の検出が可能となるマルチプレックス PCR、一定温度の反応で DNA の増幅・確認が行える LAMP (Loop mediated isothermal amplification) 法などが挙げられる。

PCR の増幅産物の多型を指標とする方法: PCR 増幅産物の多型を指標とする方法には、まず、マイクロサテライトをマーカーとする方法が挙げられる。マイクロサテライトは、一般に短い縦列反復配列であり、その反復数に大きな変異を持つ。マイクロサテライトをマーカーとする方法は、親子鑑定・個体識別などにも用いられており、品種鑑定などに有効な手段であると考えられる。また、PCR 産物を制限酵素により切断し、その多型を指標とする PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) も DNA を用いた食品原材料の鑑定に有効な手段である。

2007 年に起こった牛ミンチ偽装事件の際、生肉や加工食品中の肉の鑑定に DNA を用いた鑑定が用いられたことは記憶に新しい。また、飛騨牛の産地偽装事件の際 DNA 鑑定が行われている。DNA を用いた食品原材料の鑑定法は、その他にも、タイ<sup>1)</sup>、マグロ<sup>2)</sup>、サバ<sup>3)</sup>、ウナギ<sup>4)</sup>、カキ<sup>5)</sup>などの魚介類、ブドウ<sup>6)</sup>、タマネギ<sup>7)</sup>などの農産物でも開発されており、特に、イネではマイクロサテライトマーカーの利用により、日本で栽培されている 59 品種の大部分が識別可能であると報告されている<sup>8, 9)</sup>。また、得られた塩基配列の情報を対象生物種の遺伝的集団構造と照らし合わせるにより、そのサンプルがどの集団に属するか、すなわち、対象となる食品原材料の大まかな産地の調査が可能となる。しかしながら、一般的に DNA を用いた食品原材料の鑑定法は PCR を前提としており、高度に精製された DNA が必要である。その為、DNA 抽出の際、専用の DNA 抽出キットの購入、もしくは、フェノール・クロロホルムを用いた煩雑な操作が必要となる。また、その後の PCR では、サーマルサイクラー等専用の機器が必要であり、民間・地方自治体での DNA を用いた食品原材料の鑑定は事実上不可能である。

そこで我々は、DNA を用いた食品原材料の鑑定に関わる技術的・金銭的負担を軽減する一助として、Chelex 法により抽出した DNA を用いた食品原材料の鑑定を行った。Chelex はキレートイオン交換樹脂のひとつであり、PCR の主たる阻害要因である重金属を吸着除去することが知られている<sup>10)</sup>。Chelex 法による DNA の抽出は、サンプルを 5% Chelex 液中で、95℃で 15 分間ボイルするのみと非常に簡便である。また Chelex 自体も安価な試薬である。我々の知る限りでは、加工食品

に対し、Chelex 法により抽出した DNA を用いて DNA 鑑定を行ったという報告は無い。本研究の DNA 鑑定の対象には、白身魚のフライを用いた。一般的に白身魚のフライには、ホキとスケトウダラが使用されているが、明確に表記されているものは少ない。また、食味も非常に似ているため、これらを外見・味から判別することは不可能である。DNA を用いた食品原材料の鑑定は塩基配列を決定することにより行う。塩基配列決定の成否には、PCR 産物のクオリティーが関与している。そのため、塩基配列決定が可能な DNA 溶液が抽出されていれば、他の DNA を用いた食品原材料の鑑定法にも用いることが出来ると考えられる。そこで、本研究では、市販されている白身魚のフライに対し Chelex 法による DNA の抽出を行い、塩基配列を決定することにより、使用されている白身の判別を行った。

## 2. 材料と方法

### 2-1 サンプル

本研究では、マクドナルド、モスバーガー、本家かまどや、ほっかほっか亭で用いられている白身魚のフライを実験に供した。なお、マクドナルドでは、スケトウダラ、モスバーガーでは、ホキを使用しているとホームページ上で公開している<sup>11, 12)</sup>。本家かまどや、ほっかほっか亭では、公表されていない。

DNA の抽出は、サンプルである白身魚のフライから衣をはぎ取り、白身の部分のみを用いた。採取した白身を 5%Chelex 液中で、95℃で 15 分間ボイルし、DNA 試料溶液とした。

### 2-2 PCR によるミトコンドリア DNA 16S リボソーム RNA 遺伝子領域部分配列の増幅

抽出された DNA 試料溶液を鋳型とし、PCR 法によりミトコンドリア DNA 16S リボソーム RNA 遺伝子領域部分配列の約 900bp の増幅をおこなった。プライマーは L2188-16s: 5'-AGTGGGCCTAAAAGCAGCCA-3'、H3084-16s: 5'-AGATAGAAACTGACCTGGAT-3' を用いた。PCR には *TaKaRa Ex Taq*® (タカラバイオ) を用い、DNA 溶液 1  $\mu$  l、プライマー各 1  $\mu$  l (5pmol/  $\mu$  l)、10  $\times$  Ex Taq® buffer 1  $\mu$  l、dNTP Mixture (2.5mM each) 0.8  $\mu$  l、*Takara Ex Taq*® 0.05  $\mu$  l 加え、全量 10  $\mu$  l で以下のプログラムにより反応を行った: 初期変性を 94℃で 2 分行い、熱変性 94℃20 秒、アニーリング 50℃20 秒、伸長反応 72℃60 秒のサイクルを 35 サイクル、その後 72℃で 2 分間伸長反応を行い、10℃で保存した。PCR 反応の後、1%アガロースゲルを用いて 100V 30 分間の電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射によって目的領域の増幅を確認した。

### 2-3 塩基配列の決定

増幅が確認出来た PCR 産物に対し ExoSAP-IT (GE ヘルスケアバイオサイエンス) により酵素的に精製を行った、ExoSAP-IT は原液を 16 倍に希釈し 2  $\mu$  l PCR 産物に加えた。その後、精製を行った PCR 産物を鋳型とし、BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems)

とプライマーL2188-16s、H3084-16sを用いて塩基配列の決定を行った。反応溶液は、PCR産物を濃度に応じて、1~2  $\mu$ l、プライマーを0.7  $\mu$ l、BigDye® Terminator v1.1, 3.15×Sequencing Buffer 1.15  $\mu$ l、BigDyeを0.5  $\mu$ l加え、全量7  $\mu$ lとなるように滅菌蒸留水を加えた。反応条件は以下のプログラムにより行った：初期変性を95℃2分、熱変性95℃30秒、アニーリング55℃10秒、伸長反応60℃4分のサイクルを25サイクル、その後10℃で保存した。反応終了後、エタノール沈澱法によりシーケンス産物の精製を行った。精製を行ったシーケンス産物をABI PRISM310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によりキャピラリー電気泳動を行い、塩基配列を決定した。決定した塩基配列はSequence Scanner ver. 1.0 (Applied Biosystems)、MEGA4<sup>13)</sup>により編集を行った。

## 2-4 相同性検索

決定した塩基配列に対し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による、DNA データバンク (DDBJ/ EMBL/ GenBank) 内のデータとの比較を行い、白身魚のフライに使用されている白身の判別を行った。

## 3. 結果

マクドナルドで用いられている白身魚フライからは約480bp、モスバーガー、本家かまどや、ほっかほっか亭で用いられている白身魚フライからは約630bpのミトコンドリアDNA 16S リボソームRNA 遺伝子領域部分塩基配列を決定することが出来た。決定した塩基配列を比較したところ、モスバーガー、本家かまどや、ほっかほっか亭のそれは同一であった。決定した塩基配列に対しBLASTによる相同性検索を行ったところ、マクドナルドのサンプルから得られた塩基配列はスケトウダラ *Macruronus novaezelandiae* (Accession No. FJ215156) の、モスバーガー、本家かまどや、ほっかほっか亭のサンプルから得られた塩基配列はホキ *Theragra chalcogramma* (Accession No. EF119325) の16S リボソームRNA 遺伝子領域と100%一致した。マクドナルドではスケトウダラが、モスバーガーではホキが使用されていることはホームページ上で公開されており<sup>11, 12)</sup>、今回の結果はこれと一致する。本家かまどや、ほっかほっか亭のサンプルはモスバーガー同様ホキであることが明らかになった。

## 4. 考察

本研究の結果、加工食品である白身魚のフライからChelex法によるDNAの抽出を用いたDNA鑑定が可能であることが明らかになった。Chelex法によるDNAの抽出は、簡便・安価なDNAの抽出法であり、DNAを用いた食品原材料の鑑定に関わる技術的・金銭的負担の軽減に有効な手段であると考えられる。本研究の結果、マクドナルドではスケトウダラが、モスバーガー、本家かまどや、ほっかほっか亭ではホキが使用されていることが明らかとなったが、スケトウダラ、ホキに関する集団遺伝学的研究は行われていないため、どの海域で採取されたものかまでは推定出来

ない。本研究で用いたスケトウダラ、ホキなど安価な食品では、地域によるブランドが存在しないが、産地によるブランドが存在する食品については、産地偽装が問題視されており、その追求手段の開発は急務である。産地特定には遺伝的集団構造解析が有効な手段であり、早急な遺伝的集団構造のデータ蓄積が望まれる。

本研究では、塩基配列の決定による食品原材料の鑑定を行ったが、Chelex 法により抽出を行った DNA に、PCR-RFLP、マルチプレックス PCR、LAMP を組み合わせることにより、さらなるコストカット、解析時間の短縮が可能であり、応用の幅も広い。特に LAMP 法は、反応に温度変化が必要なく、一定温度のインキュベーションのみで結果を知ることが出来るというメリットが大きい。今回行った Chelex 法による DNA の抽出も LAMP 法同様、一定温度のインキュベーションのみで DNA の抽出が出来きするため、これらを組み合わせるとサーマルサイクラー等特別な機器の無い現場でも DNA 鑑定を行うことが出来る。LAMP プライマーの開発支援ソフトも開発されおており、プライマー開発に関する専門知識がなくても容易にプライマーが設計出来る。Chelex 法と LAMP 法を組み合わせた DNA 鑑定は、技術的・金銭的負担が最も小さい DNA 鑑定法であると考えられる。

近年 DNA データベースが充実されつつあり、DNA を用いた食品原材料の鑑定法の開発が行いやすい環境が整いつつある。しかしながら、我々が口にする食品全てを判別出来るまでのデータは蓄積されていない。加工原料として用いられ、消費量の多い種については、DNA 塩基配列及びその集団構造の調査は、その原料の産地の把握を可能とすると同時に、循環可能な消費を目的とした計画的な資源消費の指標となると考えられる。多様な食品を網羅する DNA データベースの構築は、安全な食を安定に供給するにあたり、重要な課題であると考えられる。

## 引用文献

- 1) 槇智之, 小岩智宏, 今田敬子, 豊田正俊, 杉村豊裕, 池田達哉, 矢野博. 2005. ミトコンドリアチトクロム *b* 遺伝子の DNA 分析によるタイ科魚類の種判別. 日水誌. 52: 366-372.
- 2) Chow, S., S. Inoue. 1993. Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull. Nat. Inst. Far Seas Fish.* 30: 207-224.
- 3) 瀬崎啓次郎, 久保島康子, 三谷勇, 福井篤, 渡部終五. 2001. ミトコンドリア・シトクロム *b* 遺伝子によるマサバおよびゴマサバの種判別とホルマリン固定浮遊卵同定への応用. 日水誌. 67: 17-22.
- 4) 若尾卓也, 疋田雄一, 常吉俊宏, 梶真壽, 久保田裕明, 久保田隆之. 1999. PCR-制限断片多型を用いたウナギ種簡易 DNA 鑑定. 日水誌. 65: 391-399.
- 5) 飯塚祐輔, 荒西太士. 2008. 九州に分布するイタボガキ科カキ類の DNA 鑑定. *LAGNA*. 15. 69-76.
- 6) 近藤真理, 山本俊哉, 池谷裕幸, 三谷正則, 別所英男, 松田長生, 林建樹. 1999. SSR 分析によるブドウの品種識別. 園芸学会雑誌 68: 60.
- 7) 谷川毅, 高儀雅俊, 井眞比古. 2002. RAPD 法によるタマネギの品種識別並びに遺伝的多様性の評価. 園芸学会雑誌 71: 249-251.
- 8) Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura. 1996. Microsatellite DNA markers for rice

- chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1071-1077
- 9) Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura. 1997. Highly polymorphic microsatellite of rice consist of AT repeats and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* 94: 61-67
- 10) Walsh, P. S., Metzger D. A., R. Higuchi, 1991. Chelex 100 as a Medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 10: 506-51.
- 11) 日本マクドナルド株式会社ホームページ. <http://www.mcdonalds.co.jp/index.html>.
- 12) 株式会社モスフードサービスホームページ. <http://www.mos.co.jp/index.php>
- 13) Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumer. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599

(平成 23 年 3 月 31 日受理)