

# 1. DNA 分析によるコンブ加工製品の品種判別技術の開発

食品技術科 清水健志、吉岡武也  
バイオテクノロジー科 大坪雅史、青木 央

## 1. 研究の背景

近年、食品の信頼性が損なわれるような虚偽表示問題が発生しており、消費者から使用原料の品種や産地を確認できる科学的・客観的な技術が求められている。また、加工製品では産地や品種の異なる原料を使い分けることで差別化を図っているものも多いが、外観からは識別が困難であり、製造・販売業者からも品種や産地を証明できる技術が求められている。北海道が主産地であるコンブにも品種や産地の違いによる品質や価格の差がある。様々な種類のコンブが「乾燥昆布」、「昆布巻」、「昆布佃煮」などに加工されているが、品種や産地を見分けることは困難である。そこで我々は、コンブ加工製品の品種判別技術の開発について取り組んだ。

## 2. これまでの結果と課題

DNA は、細胞内の核、葉緑体、ミトコンドリアに含まれている。特にミトコンドリアの DNA は、細胞あたりの数が多いため抽出しやすく、変異速度の速さから品種間で違いを見つけやすいことが知られており、多くの食品の品種・産地判別に利用されている。我々がこれまでに生コンブについて行った研究でも、コンブ属のミトコンドリア DNA 内に 4 種類のコンブ（マコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、アツバコンブ）が判別可能と思われる塩基配列が見出されている（図 1）。当初、この結果を基に、生コンブと同じ方法でコンブ加工製品の DNA 分析を試みたが分析可能な DNA を得ることができなかった。その要因として、加工製品では加熱やその他の加工処理による DNA の分解が考えられた。そこで本研究では、加熱試験や加工試験から抽出した DNA の増幅性を調べるとともに判別精度についても検討を行った。

```
ラウスコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAAGCAATTTATTTTGTTTTCTACTTA  
ミツイシコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAAGAAATTTATTTT--TTT-ATACTTA  
アツバコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAATATTTTATTTTCTCT----TTA  
マコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAAGCA-----  
ナガコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAAGAAATTTATTTT--TTTATACTTA  
リシリコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAAGCAATTTATTTTGTTTTCTACTTA  
ホソメコンブ : CCTACAGTATTAGAGAAAAAGCAATTTATTTTGTTTTCTACTTA
```

図1 コンブ属7種の塩基配列の比較

黒枠内：全ての品種で一致している塩基の箇所  
枠無し：品種により異なる塩基が見られる箇所  
-：塩基が欠失している箇所

## 3. 実験方法

### 3.1 コンブ試料の調製

加熱試験では、生のマコンブを 100℃-30 分間、100℃-60 分間およびレトルトを想定した 121℃-15 分間で処理した試料を使用した。また、加工試験では、昆布巻の製造工程を参考に、乾燥コンブ（原料）、酢酸浸漬試料（漬け前工程）、調味加熱試料（最終製品）をモデル試料とした。さらに市販品による試験として、道南地域のコンブ加工業者や量販店から入手したコンブ加工製品（昆布巻、昆布佃煮、酢昆布など）を試料として用いた。

### 3.2 ミトコンドリア DNA の調製と増幅性試験

各試料 1g（生コンブ重量で換算）から植物用 DNA 抽出キットと DNA 精製キットを用いてミトコンドリア DNA を調製し、PCR 法により長さの異なるミトコンドリア DNA 領域（1500 塩基、1000 塩基、600 塩基、200 塩基）を増幅することで、各試験での処理による DNA の分解程度を調べた。また、PCR 法で増幅できなかった試料は、さらに Nested PCR 法（2 段階の PCR 法を行う方法）により 200 塩基以下の増幅を検討した。

### 3.3 コンブのミトコンドリア DNA の比較

ミトコンドリア DNA の塩基配列を指標とした品種判別の精度を調べるため、産地の異なる「乾燥昆布」としてマコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、アツバコンブおよびマコンブ系コンブ（ホソメコンブ、リシリコンブ、

ラウスコンブ)の塩基配列を解読し、塩基配列の比較解析を行った。

#### 4. 実験結果と考察

##### 4.1 コンブ加工製品におけるミトコンドリア DNA の増幅

加熱試験の結果、生コンブでは全ての長さの DNA を増幅することができたが、100 -30 分および 100 -60 分で処理したものは、1000 塩基以下でなければ増幅は確認できず、生コンブに比べ増幅量も減少していた。また、121 -15 分では 200 塩基でも増幅が見られなかったことから、加熱が強いほど DNA の分解が進んでいると考えられる。また、加工試験では、酢酸浸漬工程後で DNA の増幅が見られなくなったことから、酢酸により DNA の分解が起こることも確認された。しかし、これら PCR 法により増幅の見られなかった 3 試料 (121 -15 分、酢酸浸漬後、調味加熱後) について、Nested PCR 法を試みたところ 200 塩基以下の DNA であれば増幅できることが分かった (図 2)。市販品試験についても検討したところ、同様に、Nested PCR 法で約 200 塩基の DNA を増幅することが可能であった。

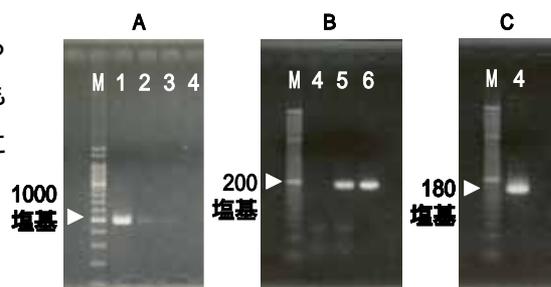


図 2 加工処理試験の増幅性

A : PCR 法で 1000 塩基を増幅

B と C : Nested PCR 法で 200 塩基以下を増幅

M : 分子量マーカー

1 : 生コンブ                    2 : ボイル-30 分

3 : ボイル-60 分            4 : 121 -15 分

5 : 酢酸浸漬後              6 : 調味加熱後

##### 4.2 ミトコンドリア DNA 分析による品種判別の精度

様々な産地で生産された「乾燥昆布」についてミトコンドリア DNA の塩基配列を調べた結果、産地の違いに限らず欠失している塩基数はミツイシコンブで 3 塩基、ナガコンブでは 9 塩基、アツパコンブでは 4 塩基であることが確認された。一方、マコンブでは異なる 2 タイプが確認されており、29 塩基が欠失しているタイプは、道南のマコンブにのみ見られたが、欠失のないタイプは、道南の他、東北や外国産である中国・韓国のマコンブでも見られ、マコンブ系コンブであるホソメコンブ、リシリコンブ、ラウスコンブとも同じであった (図 3)。以上の結果、欠失数を指標にすることで、ミツイシコンブ、ナガコンブ、アツパコンブや一部のマコンブを判別することが可能と考えられる。また、欠失塩基数を指標にコンブ加工製品の分析を行った結果、何れかのタイプに分けることが可能であった。

品種	産地	DNA領域内の欠失
ミツイシコンブ	北海道 道南	-3
	北海道 日高	-3
ナガコンブ	北海道 道東	-9
アツパコンブ	北海道 道東	-4
マコンブ	北海道 道南	-29 または 0
	青森県	0
	岩手県	0
	中国 威海	0
	中国 煙台	0
	中国 大連	0
	中国 福建	0
韓国 莞島	0	
ホソメコンブ	北海道 道南	0
	岩手県	0
	宮城県	0
リシリコンブ	北海道 道北	0
ラウスコンブ	北海道 道東	0

図 3 各産地のコンブの塩基配列

マイナスの数字は、塩基の欠失を示す。

0 は、欠失が無いことを示す。

#### 5. まとめ

本研究では、Nested PCR 法を用いることにより、使用した「乾燥昆布」、「昆布巻」、「昆布佃煮」、「酢昆布」から約 200 塩基の DNA 領域を増幅できたことから、様々なコンブ加工製品に DNA 分析が利用できると考えられる。また、品種判別のために選択した約 200 塩基の DNA 領域は、欠失塩基数を指標にすることで、ミツイシコンブ、ナガコンブ、アツパコンブや一部のマコンブの判別が可能と考えられる。今後、塩基配列の解読以外の DNA 分析法や複数品種が混ざっている製品の分析法についても検討を加え、多くのコンブ加工製品に適用できる技術開発を確立したいと考えている。