

加工処理コンブから抽出したDNAのPCR増幅性

清水健志, 大坪雅史, 木下康宣, 吉岡武也,
青木央, 宮崎俊一

PCR Amplification of Extracted DNA from Process Konbu

Takeshi Shimizu, Masashi Ootsubo, Yasunori
Kinoshita, Takeya Yoshioka, Hiroshi Aoki and
Shun-ichi Miyazaki

要 旨

加工処理条件がコンブのDNAに与える影響を調べるため、PCR増幅性試験による評価を行った。ボイル処理30分間以上では、PCR産物の増幅量が減少し、121℃、15分間の高温高圧処理では、PCR産物が確認できないことから、DNAの熱分解が考えられた。また、酢酸浸漬処理試料についても、PCR産物を確認することができなかった。そこでPCR増幅が困難な試料についてnested PCRを行った結果、全ての試料について0.2 kbp以下のサイズでの増幅が可能であった。これらの結果から、高圧滅菌や酸処理などのDNAの分解の影響が大きい加工処理が施された製品では、0.2kbp以下の識別手法を開発する必要がある。

1. はじめに

道南地域において、コンブ類は重要な水産資源のひとつであり、干し昆布、ボイル塩蔵昆布、昆布巻など加工品の種類の多い海藻類である。しかしながら、加工品の多くは、細断、粉碎などの処理が施されているため、最終製品の外観から原料コンブの種類や産地を識別することは困難であり、差別化、ブランド化を確立する上で障害となっている。

近年、食品原料の種や産地を識別する手法について多くの報告があり^{1), 2)}、そのひとつにDNA解析による識別法が挙げられる。DNA解析には、塩基配列を解読するシーケンシング法、ランダムプライマーによるPCR増幅産物の差異を電気泳動で検出するRAPD法、PCR増幅産物を制限酵素処理後に電気泳動で検出するCAPS法など多くの方法が開発されているが、そのほとんどが遺伝子増幅法であるPCRを利用することを基本としている^{3), 4)}。しかしながら、加工食品では、PCRによるDNAの増

幅が見られない場合も多く、その要因として、加熱や調味といった加工処理による試料中のDNAの分解やDNA合成酵素の阻害などが考えられているが、これらに関して研究された報告は少ない。⁵⁾

そこで、本試験では、コンブ加工品へのDNA解析の利用を目的に、加工処理の施されたコンブから抽出したDNAについて、PCRによるDNAの増幅性試験を行った。

2. 実験方法

2.1 加熱試料の調製

供試試料は、2005年8月に函館市根崎町の沿岸で採集された生のマコンブを用いた。約10cm角にカットした後、沸騰水浴中で30分間および60分間ボイルした試料、レトルト製品のモデルとして、オートクレーブにより、121℃で15分間の処理を行った試料をそれぞれ作製した。また、生コンブ加工品として、1分間のボイル後冷却し、試料重量に対し40%のNaClを添加し、4℃で24時間保存

して作製したボイル塩蔵コンブを試料として用いた。

2.2 加工試料の調製

コンブ加工品の中で加工工程の多い昆布巻をモデル試料とし、原料である乾燥コンブの他、乾燥コンブを1%酢酸溶液に数秒間浸漬し、液切りして4°Cで一昼夜保管したあんじょう工程試料およびあんじょう工程試料を90分間ボイルし、さらに沸騰調味液中で90分間の加熱後に耐熱性フィルムに入れ、90°Cで60分間の加熱殺菌処理により作製された昆布巻き（最終製品）を試料とした。

2.3 DNAの抽出および精製

各試料を液体窒素で凍結後、シェイクマスターイーザー-BMS-12EA（(株) バイオメディカルサイエンス）を用いて凍結粉碎した。粉碎試料1gから、DNA抽出装置であるQuickGene-800（富士写真フィルム(株)）とDNA抽出キットであるQuickGene DNA tissue kit Sを用いてtotal DNAの抽出を行った。得られたtotal DNA溶液は、DNA精製キットであるGENECLEAN SPIN KIT（Qbiogene社）を用いて精製を行った。

2.4 PCRによる増幅性試験

各試料から抽出および精製したtotal DNAをそれぞれ鋳型とし、PCRによりミトコンドリアDNAの部分配列を増幅した。DNA polymeraseには、KOD Dash（東洋紡績（株））を用い、サーマルサイクラーには、Chromo4リアルタイムPCR解析システム（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ（株））を用いた。プライマーには、増幅産物のサイズが0.2 kbp, 0.6 kbp, 1.0 kbp, 1.5 kbpとなるよう設計した4組のプライマーペア、LjF1-LjR1, LjF2-LjR2, LjF2-LjR3, LjF3-LjR3をそれぞれ用いた（図1）。PCRの反応条件は、94°Cで3分のプレヒート後、94°Cで30秒、各プライマーに適したアニーリング温度（59.4または69°C）で30秒、72°Cで30秒を30サイクル行い、最後に72°C7分の伸長反応を行った。PCRによる増幅産物の確認は、LjF1-LjR1を3%、その他のプライマーペア（LjF2-LjR2, LjF2-LjR3, LjF3-LjR3）を1.5%のアガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色して行った。

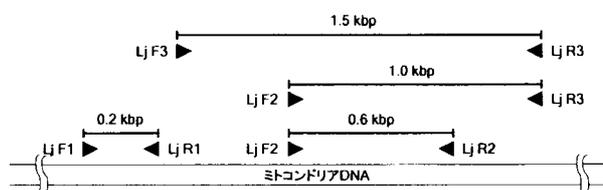


図1 プライマーの位置と増幅産物のサイズ

2.5 nested PCRによる増幅性試験

PCR増幅性試験により増幅産物が確認できなかった試料について、nested PCRによる増幅性試験を行った。nested PCRとは、図2に示すように、外側のプライマーペアで増幅される標的配列の内側に第2のプライマーを設計し、第1のPCRで増えた生成物を新たな鋳型とした第2のPCRを行う方法であり、この第2の反応をnested PCRという。nested PCRでは、第1のPCRでわずかに増えた生成物を鋳型にさらに増幅することができるため、PCRのみでは鋳型となるDNA量が少なく増幅が困難な試料に対して有効な方法とされている。

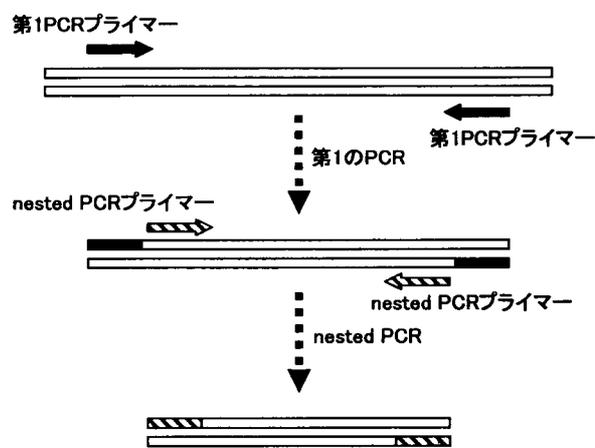


図2 nested PCRの原理

そこで、ミトコンドリアDNA上に増幅サイズが約2.0kbpとなるよう設計したプライマーペアLjF0-LjR0によるPCRを行った後、PCR反応液1 μlを鋳型にLjF2-LjR3, LjF3-LjR3の2組を用いてnested PCRを行った。また、LjF0-LjR0でのnested PCRによる増幅が困難な試料については、LjF0-LjR4またはLjF1-LjR1によるPCRを行い、それぞれの反応液を鋳型としてLjF1-LjR1およびLjF1-LjR5によるnested PCRを行った（図3）。PCRおよびnested PCRには、KOD DashとChromo4リアルタイムPCR解析システムを使用し、25 μlの反応系にて行った。PCRの条件は、94°Cで3分のプレヒート後、94°Cで

30秒, 59.4°Cで30秒, 72°Cで30秒を30サイクル行った後, 72°Cで7分の反応を行った。nested PCRの条件は, PCR条件のアニーリング温度のみ各プライマーペアに適した温度に変更し, 1.5%あるいは3%のアガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド染色により増幅産物を確認した。

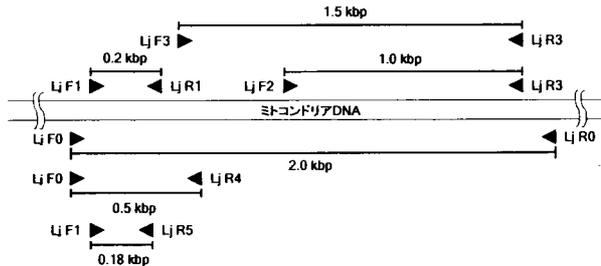


図3 nested PCRにおけるプライマーの位置と増幅産物のサイズ

3. 結果と考察

3.1 PCR増幅性における加熱の影響

加熱試料およびボイル塩蔵コンブにおけるPCR増幅性試験の結果を図4に示した。未加熱試料では, LjF1-LjR1, LjF2-LjR2, LjF2-LjR3およびLjF3-LjR3の全てのプライマーペアで, 目的としたサイズである0.2kbp, 0.6kbp, 1.0kbp, 1.5kbpの増幅産物が確認された。また, ボイル塩蔵コンブについても, 未加熱試料と同様, 全てのサイズにおいて増幅が確認された。これら2試料は, エチジウムブロマイド染色から推定される増幅量についてもほとんど変化が見られなかったことから, ボイル塩蔵コンブについては, DNAの損傷やPCR反応の阻害は起こらず, 長い領域についてDNA解析が可能であることが分かった。

加熱試料のうち, ボイル30分間の加熱処理試料では, 0.2kbpの増幅で未加熱試料と同程度の増幅が確認されたものの, 0.6kbpおよび1.0kbpの増幅では, 増幅量が減少していることが確認され, 1.5kbpの増幅については, 増幅産物を確認することができなかった。一方, 加熱時間を60分間に延長した試料では, 30分間のものと比較すると, 0.2kbp, 0.6kbpおよび1.0kbpにおいて増幅量の減少が確認された。1.5kbpを増幅した場合, ボイル30分試料と同様, 増幅産物を確認することができなかった。レトルト製品を想定して行った121°C, 15分間の加熱試料では, 使用した全てのプライマー

ペアで増幅産物を確認することができなかった。この要因として, 長時間の加熱によりDNAの断片化が進んでいるものと考えられた。また, 121°C・15分間の処理では, 0.2kbpの増幅産物も確認できなかったことから, DNAの分解は, より激しいことが分かった。

これらの結果から, コンブ加工品についてDNA解析を行う場合, 高温・長時間の加熱工程を含む加工品に対しては, 長い領域についてDNA解析を行うことは困難であると考えられた。

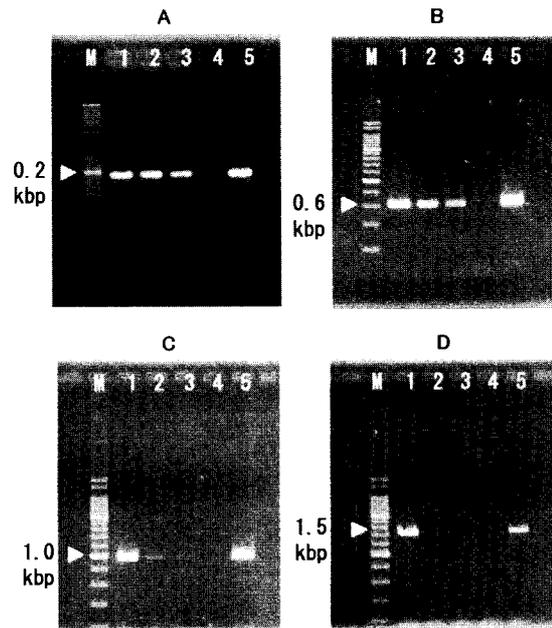


図4 加熱処理におけるPCR増幅性

A : LjF1-LjR1(0.2kbp), B : LjF2-LjR2(0.6kbp),
C : LjF2-LjR3(1.0kbp), D : LjF3-LjR3(1.5kbp)
M : 分子量マーカー(A : 20bp ladder, B~D :
200bp ladder), 1 : 加熱未処理, 2 : ボイル30分
間, 3 : ボイル60分間, 4 : 121°C15分間, 5 : ボ
イル塩蔵(ボイル1分間)

3.2 PCR増幅性における加工処理の影響

コンブ加工品のモデルとして選択した昆布巻に関し, 原料, あんじょう工程試料および最終製品について増幅性試験を行った結果を図5に示した。原料である乾燥マコンブは, LjF1-LjR1, LjF2-LjR2, LjF2-LjR3, LjF3-LjR3の全てのプライマーペアで, 0.2kbp, 0.6kbp, 1.0kbp, 1.5kbpの増幅産物が確認された。しかし, あんじょう工程試料および最終製品試料かでは, 全てのプライマーペアで増幅産物を確認することができなかった。

その要因として, あんじょう工程試料については加熱処理が行われていないにもかかわらず, DNAの増幅が確認されなかったことから, DNAの

分解には酢酸が大きく影響していることが分かった。また、最終製品までには、ボイルおよび調味煮込み、殺菌工程として90°C以上の加熱が合計240分間行われており、すでに行った加熱試料における増幅性試験の結果と同様、DNAの熱分解も進んでいるものと考えられた。

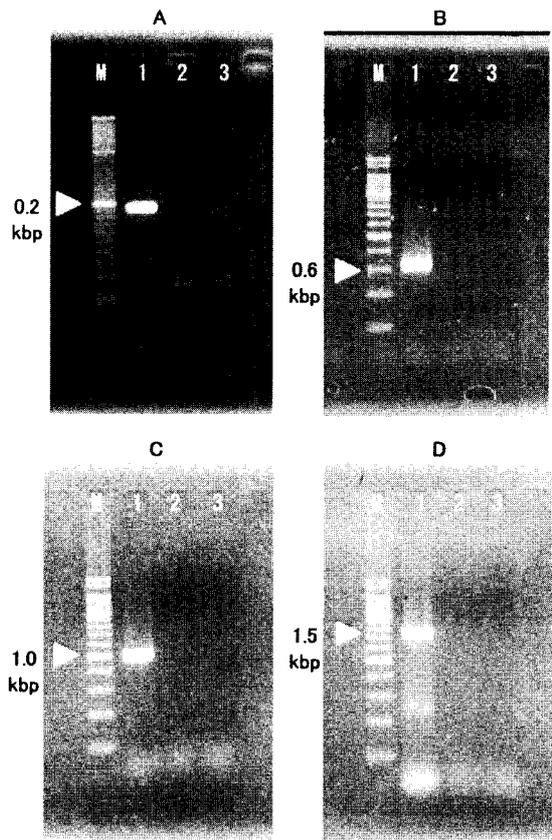


図5 加工処理におけるPCR増幅性

A : LjF1-LjR1(0.2kbp), B : LjF2-LjR2(0.6kbp),
C : LjF2-LjR3(1.0kbp), D : LjF3-LjR3(1.5kbp)
M : 分子量マーカー(A : 20bp ladder, B~D :
200bp ladder), 1 : 乾燥コンブ, 2 : あんじょう
工程, 3 : コンブ巻き(最終製品)

3.3 nested PCRによるコンブ加工品のDNA解析の可能性

そこで、増幅困難であった試料に対し、微量のDNAを増幅する方法であるnested PCRにより、さらに詳細なDNAの分解程度を調べ、DNA解析の可能性について検討を行った。PCRでの増幅が困難なボイル30分、ボイル60分、121°C-15分、昆布巻きあんじょう工程試料、昆布巻き最終製品について、プライマーペアLjF0-LjR0 (2.0kbp) を用いたPCR後、LjF3-LjR3およびLjF2-LjR3によるnested PCRを行った結果を図6に示した。ボイル30分および60分では、それぞれ1.5kbpと1.0kbpの増幅産物が確認された。あんじょう工程試料についても、わずかながら増幅が認められた。しかし、121°C-15

分および昆布巻き最終製品については、どちらの増幅産物も確認することはできなかった。この結果から、121°C-15分、あんじょう工程および殺菌工程試料では、鋳型となるDNAが2.0kbp以下のサイズに分解されていると考えられた。

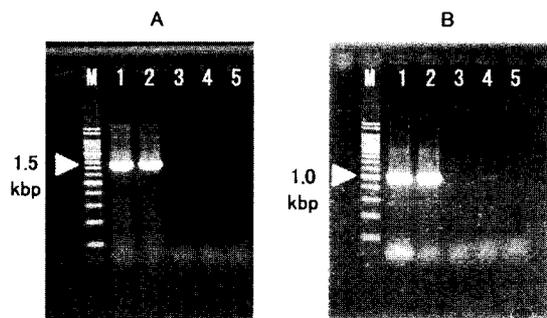


図6 nested PCRによる増幅性試験

A : LjF0-LjR0とLjF3-LjR3によるnested PCR,
B : LjF0-LjR0とLjF3-LjR3によるnested PCR,
C : LjF2-LjR3(1.0kbp), D : LjF3-LjR3(1.5kbp)
M : 分子量マーカー(20bp ladder), 1 : ボイル30
分間, 2 : ボイル60分間, 3 : 121°C-15分間, 4 :
あんじょう工程, 5 : コンブ巻き(最終製品)

そこで、増幅困難な3試料 (121°C-15分、あんじょう工程、昆布巻き最終製品) について、プライマーペアLjF0-LjR4により約0.5kbpの領域を増幅した後、LjF1-LjR1 (約0.2kbp) によるnested PCRを行い、結果を図7-Aに示した。あんじょう工程と最終製品では、目的の増幅産物が認められたものの、121°C-15分については確認できなかった。この結果から、121°Cで15分間の加熱による鋳型DNAは、酢酸や昆布巻き製品よりも分解が進んでおり、0.5kbpのサイズ以下に断片化しているものと考えられた。

121°C-15分処理試料についてさらに短い領域を増幅するため、LjF1-LjR1 (0.2kbp) での増幅し、LjF1-LjR5 (0.18kbp) によるnested PCRを行った。その結果、121°C-15分で処理した試料についても増幅産物が確認できたことから、0.2kbp程度のDNAは残存していることが確認された (図7-B)。これらの結果から、コンブ加工品のDNA解析による種や産地の識別を考えた場合、特に高圧滅菌や酸処理などのDNAの分解の影響が大きいと思われる加工品では、0.2kbp以下の短い領域での識別手法を開発することが必要である。また、おぼろ昆布やとろろ昆布といった加工品についても酢酸浸漬工程を含んでおり、DNAの分解が進んでいるものと考えられるため、これらの詳細な分析が今後の課題である。

参考文献

- (1) 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)
- (2) 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)
- (3) 谷口武利: 無敵のバイオテクニカルシリーズ-改訂PCR実験ノートみるみる増やすコツとPCR産物の多彩な活用法 (株式会社羊土社), (2005)
- (4) 佐々木博己: 注目のバイオ実験シリーズ-ここまでできるPCR最新活用マニュアル (株式会社羊土社), (2005)
- (5) M. Uchino, T. Noguchi and K. Takano: Thermostability of DNA from wheat in heated food products. Food Preservation Sci., Vol. 30, No. 4, (2004), P195-198

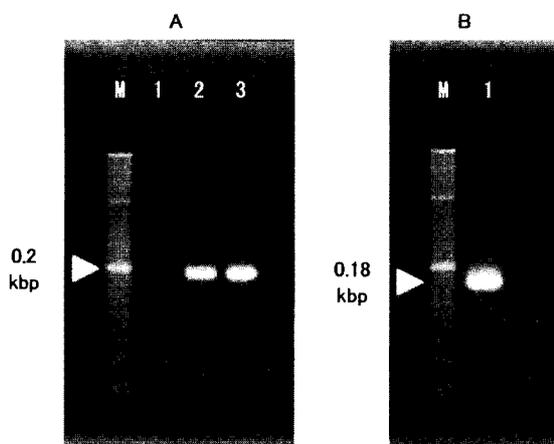


図7 nested PCRによる0.2kbp以下での増幅性試験

A: LjF0-LjR4とLjF1-LjR1によるnested PCR, B: LjF1-LjR1とLjF1-LjR1によるnested PCR, M: 分子量マーカー(20bp ladder), 1: 121°C-15分間, 2: あんじょう工程, 3: 昆布巻き(最終製品)

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、試料の収集にご協力して頂きました、函館市漁業協同組合根崎支所、株式会社かまだ商店、また、昆布巻の製造についてご指導して頂きました、マルキチ食品株式会社に心から感謝いたします。なお、本研究は平成17年度関連機関支援強化事業の一環として実施致しました。