

3. DNA 分析によるコンブ類の原産地判別技術の開発と 検査キットの製品化に向けた取り組み

食産業技術支援グループ

応用技術支援グループ

道総研食品加工研究センター

北海道大学大学院水産科学研究院

農林水産消費安全技術センター

株式会社ファスマック

○清水 健志、加藤 佑基、大坪 雅史

高村 巧、小林 孝紀

○八十川 大輔

井上 晶、尾島 孝男

井口 潤

○原口 浩幸

1. はじめに

食品表示は、食の安全性を支えるために必要なものであるが、産地や品種に関するブランドの信頼性を担保する一手段としても重要である。しかしながら、近年、食品表示の信頼性が損なわれるような虚偽表示問題が発生していることから、生産者と消費者の双方から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、原料本来の形状が保たれていない商品では、使用原料の産地や品種による差別化を外観から識別することが困難であるため、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。近年、コメの品種やウナギの産地など様々な食品原料に関する判別技術が開発されており、ブランドの維持や向上に利用されている。

そこで、本研究では、道内生産量の約3割を占め、函館地域の重要な水産物のひとつであるコンブ類について、ブランドを「守る・育てる」ことを目的に、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 分析による原産地判別技術の開発を検討した。また現在、開発した判別技術の普及に向けた検査キットの製品化について、株式会社ファスマックと連携して取り組んでいるところであり併せて紹介する。

2. 実験方法

2.1 実験試料

北海道・東北で生産された乾燥コンブ(マコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガツガラコンブ、チヂミコンブ、ガゴメ、トロロコンブ)及び中国・韓国産の乾燥マコンブをコンブ類試料として用いた。なお本研究では、近年の研究から支持されているコンブ類の分類体系に従い、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブの3種類もマコンブとして扱った。

2.2 コンブ類の DNA 抽出及び増幅条件の検討

乾燥コンブから約0.01gの葉片を採取し、0.4 mlの50 mM EDTA-5 mM リン酸バッファー (pH 8.0) と Proteinase K を添加し、55 °Cで1時間、95 °C-100 °Cで10分間の処理を行なったものを試料として用いた。次いで、北海道大学大学院水産科学研究院にて調製された *Flavobacterium* 属由来のアルギン酸分解酵素を加え、35°Cで1時間処理した後、市販の DNA 抽出キットである Charge Switch® gDNA Plant Kit (Life Technologies 社) を用いて DNA 溶液を調製した。また、対照試験としてアルギン酸分解酵素処理を行わない試料から DNA 溶液を調製した。次いで、DNA 溶液と2種類の市販 DNA 増幅キット (KOD Dash 及び KOD FX、東洋紡績株式会社) を用い、mtDNA の一部の領域の塩基配列を PCR 法で増幅して増幅効率を比較した。

2.3 コンブ類の原産地に特異的な塩基配列の探索

国産のコンブ類(マコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガツガラコンブ、チヂミコンブ、ガゴメ、トロロコンブ)及び中国・韓国産のマコンブの各1個体から調製した DNA 溶液を用い、mtDNA の塩基配列を DNA シーケンサーで解読した後、種類または原産地の異なる試料間での比較解析を行った。さらに、種類または原産地間で塩基配列の違い(多型)が見られた領域について、7種類のコンブで共通に使用できるプライマーを設計し、各種類及び原産国の複数個体についてそれぞれ解読した。

3 実験結果と考察

3.1 コンプ類の DNA 抽出技術の開発

アルギン酸分解酵素で処理した場合、使用した全てのコンプ類で mtDNA の増幅が確認できた。一方、アルギン酸分解酵素で処理しない場合、一部のコンプで増幅が見られなかった（図 1）。この結果から、DNA 溶液へのアルギン酸の混入が DNA の増幅を阻害していると考えられ、さらにアルギン酸を簡易に除去する方法として分解酵素の利用が有効であることが確認できた。また本方法で調製した DNA 溶液は、精製することなく使用できることも確認しており、簡易な DNA 抽出技術を開発できたと考えている。

また DNA 増幅条件について検討したところ、KOD FX を用いて DNA を増幅した場合、KOD Dash よりも増幅効率が良いことが確認されており、mtDNA を安定に増幅できる条件を確立することができた。

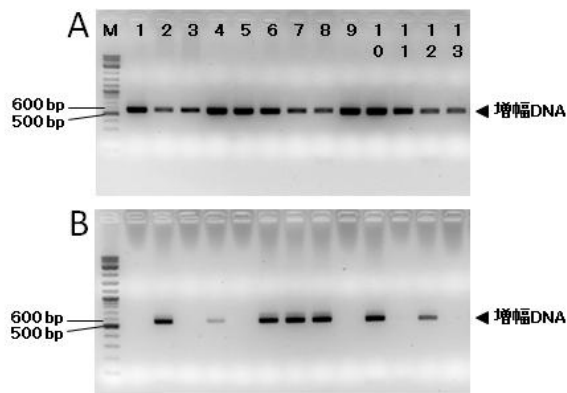


図 DNAの増幅におけるアルギン酸分解酵素の効果

A: アルギン酸分解酵素で処理したDNA溶液を使用, B: アルギン酸分解酵素で処理していないDNA溶液を使用.
M: サイズマーカー, 1: マコンプ, 2: ホソメコンプ(マコンプ変種), 3: リシリコンプ(マコンプ変種), 4: オニココンプ(マコンプ変種), 5: ミツイシコンプ, 6: ナガコンプ, 7: ガッガラコンプ, 8: チヂミコンプ, 9: ガゴメ, 10: トロロコンプ, 11: 中国産マコンプ, 12: 韓国産マコンプ, 13: スジメ

3.2 塩基多型を指標とした DNA 原産地判別技術の開発

7 種類のコンプ類について mtDNA の塩基配列を解読したところ、マコンプ、ミツイシコンプ、ナガコンプ、ガッガラコンプ、チヂミコンプ、ガゴメ、トロロコンプはそれぞれに特徴的な塩基配列を持っており、種類を明確に判別することが可能であった。国内で流通している 7 種のコンプ類の内、マコンプ以外の 6 種は全て日本が原産地であることから、マコンプであるか否かの識別は国内外産の判別に利用できることが分かった。さらに日本、中国、韓国の 3 地域で生産されているマコンプについて mtDNA の塩基配列を比較した結果、多型塩基が集中している領域を見出すことができた。この領域について国産 377 個体、中国産 201 個体、韓国産 75 個体のマコンプを用いて調べた結果、多型塩基のパターンにより日本産の全てを日本産、中国産の 96.5% を中国産、韓国産の 94.7% を韓国産として判別可能であることを明らかにした（表 1）。

表 mtDNAの塩基配列による原産地判別の結果

| 試料 | 多型パターン | 原産地判別率 |
|----|--------|--------------------------|
| 日本 | 道南 | 日本型 |
| | 道央 | 日本型 |
| | 道北 | 日本型 |
| | 道東 | 日本型 |
| | 東北 | 日本型 |
| | | 100% (377試料) |
| 中国 | 煙台 | 中国型 |
| | 威海 | 中国型 |
| | 大連 | 中国型 |
| | 福建 | 中国型 |
| | | 96.5% (201試料) |
| 韓国 | 莞島 | 韓国型 |
| | | 日本型 |
| | | 94.7% (75試料) |

4. まとめと今後

本研究により、コンプ類の DNA 分析を安定的に行なうための抽出技術及び多型塩基を指標とした高精度な原産地判別技術を開発することができた。また、それぞれの技術は 4 研究室（工業技術センター、食品加工研究センター、農林水産消費安全技術センター本部及び神戸センター）での共同試験により分析法として妥当であることを確認しており、今後、コンプ原料の種類や原産地を確認するための科学的手法として利用可能であると考えている。

一方、課題としては、本研究で使用したアルギン酸分解酵素は自家調製のため一般入手が困難なことが挙げられるが、現在、株式会社ファスマックと分析試薬としての工業生産及び検査キットの製品化について取り組んでおり、今後、どこでも安定した結果が得られるコンプ類の DNA 判別技術として普及できるものと期待している。

なお、本研究の一部は、文部科学省の地域イノベーション戦略支援プログラム（函館マリンバイオクラスター事業）により実施しました。本研究を遂行するにあたり、ご協力いただきました関係者の皆様に心より感謝いたします。