

DNA分析によるのりの原産地判別法の検討

澤田 桂子¹, 井口 潤¹, 浪越 充司²

Keiko Sawada, Jun Iguchi, Atsushi Namikoshi

要 約

乾のり、焼きのり及び味付けのり（板のり）を対象とした DNA 分析によるのりの原産地判別法について、Touhata らの報告を参考にして一部を変更し、判別が可能であるかどうか検討を行った。

PCR 及び PCR-RFLP 法により日本産の板のりでは全て日本型と判別され、韓国産及び中国産の板のりでは一部の日本型となった試料を除き、韓国型又は韓国・中国型と判別されたことから、FAMIC の表示監視業務に適した日本産と韓国及び中国産ののりの産地判別が可能であった。また、おにぎり等の加工品に使用された板のりにおいても、電気泳動パターンによる判別が可能であった。

1. はじめに

加工食品は「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律(JAS 法)」（昭和 25 年 5 月 11 日法律第 175 号）に基づく加工食品品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 513 号）により名称、原材料等の表示が義務付けされており、干のり等（細切若しくは細刻したもの又は粉末にしたものを除く）は、同基準により原料原産地表示の対象加工食品となっている¹⁾。主な原材料となるのりについて、国産品にあっては国産である旨を、輸入品にあっては原産国名を記載することとされている。

のりの大部分は、乾のりとして生産される。乾のりは、養殖した原藻をミンチ機で細断、調合及び抄製後、脱水及び乾燥を行い生産する。焼きのりへ加工する場合は、「火入れ」と称する加熱処理後、150-170℃で 20-40 秒間焙焼する。さらに、味付けのりへ加工する場合は、焙焼したのりに味付けたれを塗布する²⁾。日本の乾のりの生産量は、平成 25 年において約 80 億枚であった³⁾。のりは輸入割当品目であり、輸入枠は韓国及び中国のみに割当されている。平成 25 年において韓国から約 3.1 億枚、中国から約 1.3 億枚が輸入されており、その輸入品の 1 枚あたりの平均 CIF 価格は概ね 6 円程度であった⁴⁾。それに対し、日本産の共販平均価格は概ね 9 円程度⁵⁾と差があり、産地の偽装が懸念されている。そこで、のりの原産地表示の真正性を確認するために、日本産と韓国産、中国産ののりを判別する科学的検証法が求められていた。

独立行政法人水産総合研究センターと独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）の Touhata らは、DNA 分析による日本産と韓国及び中国産の乾の

1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

りの原産地判別法を開発した⁶⁾。Touhata らの解析では、日本産、韓国産及び中国産の 3 産地間で核ゲノム由来の 18S リボソーム RNA (18S rRNA) 遺伝子領域と 5.8S リボソーム RNA (5.8S rRNA) 遺伝子領域の間に位置する内部転写スペーサー (internal transcribed spacer1; ITS1) 領域の塩基配列に違いがあることが報告されている。Touhata ら及び Niwa ら⁷⁾により、日本産の乾のりのほぼ全てはアマノリ属スサビノリ (*Pyropia yezoensis*) の養殖品種であるナラワスサビノリであり、また中国産と韓国産ではナラワスサビノリとは塩基配列が異なる品種や、韓国産の一部にはスサビノリとは塩基配列が異なる種が使用されている⁶⁾旨が報告されている。そこで、本研究においても ITS1 領域を用いることとした。

今回、乾のり、焼きのり及び味付けのり(「板のり」とする)を対象として、FAMIC の表示監視業務でを使用することを目的として、Touhata らの方法から、試料の採取方法と制限酵素を変更し、分析法の安定化、迅速化、判別率の向上を検討した結果について報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

各産地の電気泳動パターンを調べるために日本産 75 件、中国産 38 件及び韓国産 26 件の板のりを用いた。また、判別法の適用可能性の確認のため、その他の加工品に使用された板のりとして、刻みのり 1 件、あられに巻かれたのり 1 件及びおにぎりに巻かれたのり 2 件を用いた。

2. 2 DNA 抽出

Touhata ら⁶⁾は乾のりを蒸留水中で膨潤させ 1 葉片(葉状体破片、細断された原藻)ごとに分離し、複数枚について分析を行っている。焼きのりについても同様に 1 葉片ごとに分析を行っているが、DNA 抽出の際の収量が乾のりと比べて 18%と低い⁸⁾という報告がある。市販品には焼きのりや味付けのりが多いことから、試料の種類によらず同じ分析条件で安定した DNA 収量を得ることができるよう全て 5 mm 角で分析を実施した。

試料は目視でのり以外と分かるものは取り除き、5 mm 角を乳鉢に採取した。DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により行った。50 µL の滅菌水を試料の上へ添加し、1 分間程度静置し試料が膨潤後、乳鉢で破碎した。その後 Buffer AP1 を 400 µL 添加し試料を溶解後、マイクロチューブに全量移して、以降はプロトコールに従って DNA を抽出した。なお、DNA の溶出では、100 µL の Buffer AE を負荷し、室温で 1 分間静置後、室温で 8000 ×g で 1 分間遠心し、溶出した DNA 溶液を PCR に供した。

2. 3 PCR

判別には、Touhata ら⁶⁾に従い ITS1 領域を用いた。プライマーは、フォワードプライマー algassuFw+ (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT-3') 及びリバースプライマー algassuRv- (5'-CAAGATATCCACCGCTAAGAGTTGTAT-3') を用いた。

PCR 反応液の組成は、0.5 units の DNA ポリメラーゼ *TaKaRa Ex Taq*[®] HS(タカラバイオ)、1 × *Ex Taq* Buffer (20 mM Mg²⁺ plus)、0.2 mmol/L dNTP Mixture、0.5 µmol/L プラ

イマーセットを含む反応液系に 2.0 μL の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。

PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp[®] PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。PCR の温度サイクルは、最初の熱変性として 94 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分、次に (1) 熱変性として 94 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、(2) アニーリングとして 55 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、(3) 伸長反応として 72 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 30 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分反応させた。

2. 4 PCR産物の電気泳動

電気泳動は、エチジウムブロマイド (10 mg/mL) (和光純薬) をゲル 100mL あたり 5.0 μL 添加した 3.0 % (w/v) アガロースゲル (Agarose L03 「TAKARA」 (タカラバイオ)) に、PCR 後の PCR 反応液 2.5 μL を供し、電気泳動装置 Mupid exU (アドバンス) により行った。

電気泳動緩衝液は TAE 緩衝液 (40 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L EDTA) を、分子量マーカーは 100 bp Ladder (New England Biolabs) を使用した。電気泳動後のゲルは、電気泳動撮影装置 AE-6931FXCF (アトー) 又は MOLECULAR IMAGER FX (Bio-Rad Laboratories) により撮影を行った。

PCR 産物で約 350 bp のバンド (他のバンドが検出される場合も含む) が確認される試料の電気泳動パターンは、韓国型 (図 2 a, 試料 4 及び 5) とした。

2. 5 制限酵素処理及び制限酵素処理後の電気泳動

2. 4 の電気泳動において、約 350 bp の PCR 産物が検出されず約 430 bp の PCR 産物が確認された試料は、さらに制限酵素処理を実施した。約 430 bp の PCR 産物 (図 2 a, 試料 1 ~ 3) について、Touhata らは日本産と韓国産の一部試料が切断される制限酵素 MspI により処理を行っている。今回の研究では報告された塩基配列 (図 1) を基に、日本産は切断されず、韓国及び中国産は約 160 bp 及び約 270 bp に切断される制限酵素 FspBI に変更して処理を行った。

制限酵素処理反応液の組成は、5 units の FspBI (Thermo Fisher Scientific)、1 \times 制限酵素用緩衝液を含む反応液に 7.5 μL の PCR 反応液を加え、滅菌水で全量を 15 μL とし、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間処理した。

制限酵素処理後のアガロースゲル電気泳動は 2. 4 と同様に実施し、制限酵素処理溶液 7.5 μL を電気泳動に供した。

FspBI により PCR 産物が切断されない試料の電気泳動パターンは日本型 (図 2 b, 試料 1) と、PCR 産物が一部でも切断されて約 160 bp 及び約 270 bp の DNA 断片が確認される試料の電気泳動パターンは韓国・中国型 (図 2 b, 試料 2 及び 3) とした。

3. 結果及び考察

3. 1 DNA抽出

DNA 抽出に供する試料量について、Touhata ら⁶⁾ は乾のりを1葉片に分離し、1葉片ごとと複数枚について DNA 抽出に供していた。本研究では、DNA 収量が低い焼のりや味付のりの分析にも適する 5mm 角を DNA 抽出に供した。その結果、各産地の板のりやおにぎり等の加工品に使用された板のりも含め、全ての試料で安定した DNA 収量を得ることができた。試料の種類によらず同じ条件で分析が可能であり、市販品分析に適すると考えられた。また、板のり 5mm 角あたり平均 60 葉片程度が含まれているが、5mm 角で分析した場合、複数の種や品種が混合されている状態においてもまとめて判別ができることから、1葉片ごとに分析を行うよりも迅速に DNA 抽出ができるようになった。

3. 2 PCR及びPCR-RFLP法による判別

ITS1 領域を PCR 法により増幅し、得られた PCR 産物を電気泳動して増幅長パターンを確認した。その結果、日本産及び中国産では、全ての試料で約 350 bp は検出されず、約 430 bp の PCR 産物が検出された。韓国産では、26 件中 8 件の試料で約 350bp の PCR 産物が検出されたため韓国型と判別されたが、これらは全て約 350 bp の他に約 430 bp の PCR 産物が確認された (図 2 a, 試料 5)。

Touhata らにより、日本産、中国産及び韓国産の PCR 産物の増幅長は、韓国産の一部のみが約 350 bp であり、他は約 430 bp であること、韓国産では複数の種又は品種が混合される場合が多く、約 350 bp 及び約 430 bp の両方の PCR 産物が検出される場合もある旨が報告されており、その報告と一致する結果となった。これらより、ITS1 領域の PCR 産物で約 350 bp のバンド (他のバンドが検出される場合も含む) が確認される試料の電気泳動パターンを韓国型 (図 2 a, 試料 4 及び 5) と判別することは適切であると考えた。

2. 4 の電気泳動において、約 350 bp の PCR 産物が検出されず約 430 bp の PCR 産物が確認された試料 (図 2 a, 試料 1 ~ 3) について、制限酵素 FspBI で処理を行ったところ、想定どおり日本産は切断されず 432 bp のまま (図 2 b, 試料 1) であるのに対して、韓国及び中国産では約 160 bp 及び約 270 bp に切断された 2 種類の DNA 断片が検出されたもの (図 2 b, 試料 2) と、これらの切断された 2 種類の DNA 断片に加えて切断されず 432 bp のままの PCR 産物が検出されたもの (図 2 b, 試料 3)、日本産と同様に切断されず 432 bp のまま (図 2 b, 試料 1) のものがあつた。Touhata らにより板のりでは複数品種等が混合されている場合がある旨が報告されており、本研究においても韓国産及び中国産で複数品種等が混合されていると考えられる試料があつた。これらの複数品種等が混合されている試料においても制限酵素の変更が可能であり、MspI による処理では韓国産の一部と日本産の区別がつかなかったが、FspBI による処理に変更することで、韓国産と日本産を判別することが可能となった。

日本産	1	CACAAACTATTGACACAAACACACGCGAACCAAATCGTCCGCACAGGTGG	50
中国産	1CA..	50
韓国産1	1CA..	50
韓国産2	1CA..	50
日本産	51	TGGCAATGAAAGAGAGAATCTGCATGTCGCCTTTCGGGGTATAGCAAGCA	100
中国産	51C.....--..	98
韓国産1	51T.....--..T..	98
韓国産2	51C.....--..	98
日本産	101	GCACTCTTTTGCCATCGCCTCTGTG CCGG CGGTAAATTCTCATTGAGAGG	150
中国産	99C.....A.....C.....	148
韓国産1	99C.....A.....C.....	148
韓国産2	99C.....C.....	148
日本産	151	ATGTGAGGGCACCCACAGGAAGCTTTTCCACAGGAAGTCGCCATCCTTCTC	200
中国産	149	198
韓国産1	149T.....	198
韓国産2	149T.....	198
日本産	201	CCTCCACGGCGGGCGCTTCTGTGCTTGGCAGTTTTTTTTTTTTGCCTTCCAG	250
中国産	199---..... .T..	248
韓国産1	199---..... .T..	248
韓国産2	199---..... .T..	248
日本産	251	GGAGGATGCCGCCAATGGAGCCCCATATAATATATACATCATCATATGCC	300
中国産	249T.....-	297
韓国産1	249-	297
韓国産2	249-	297

図1 Touhataらにより報告された日本産、中国産、韓国産のITS1領域の一部の塩基配列
報告された配列のうち、各産地の制限酵素切断部位の典型的な例を示した。
ドット(・)は日本産と同一塩基、ダッシュ(－)は欠失を表す。

PCR-RFLP 法による判別では、日本産は 75 件全ての試料が切断されず日本型と判別された(日本型:図2 b,試料 1)。中国産は 38 件中 36 件が切断されて韓国・中国型と判別され、韓国産は PCR 増幅長により韓国型と判別されなかった 18 件中 9 件が、切断されて韓国・中国型と判別された(韓国・中国型:図2 b,試料 2 及び 3)。これらの結果より、FspBI により PCR 産物が切断されない試料を日本型、PCR 産物の一部でも切断されて約 160 bp 及び約 270 bp の DNA 断片が確認される試料を韓国・中国型とすることが適切であることが確認できた。

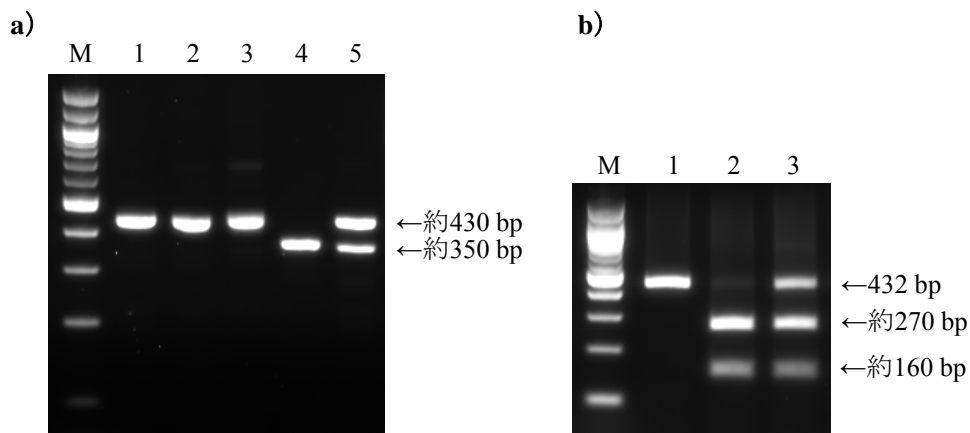


図2 PCR及びPCR-RFLP電気泳動像

a) PCR産物の電気泳動像 b) 制限酵素FspBI処理後の電気泳動像
M : 100 bp Ladder 1 : 日本型 2,3 : 韓国・中国型 4,5 : 韓国型
(4はTouhataらの試料。想定される電気泳動パターンの例として示した。)

表1 各産地の電気泳動パターンの判別結果

	試料数	日本型	韓国・中国型	韓国型
日本産	75	75	0	0
中国産	38	2	36	0
韓国産	26	9	9	8

PCR 及び PCR-RFLP 法により判別を行った結果を表1に示した。日本産では75件全てが日本型となり、韓国型及び韓国・中国型と判別されなかった。一方、中国産38件では、2件の日本型となった試料を除き36件（中国産の94.7%）が韓国・中国型と判別された。韓国産26件では、日本型が9件、韓国型が9件、韓国・中国型8件と全ての型に判別され、韓国型と韓国・中国型を合わせると17件（韓国産の65.4%）となった。

Touhata らは韓国産及び中国産で日本産と同じ塩基配列となった試料について、近年日本から移植されたことを示唆している⁶⁾。

また、判別法の適用可能性の確認のため、その他の加工品（刻みのり、あられに巻かれたのり及びおにぎりに巻かれたのり）に使用された板のりについても分析を行った。刻んだのりやおにぎりの水分を含んだのりを含め、全ての試料でPCR増幅し、電気泳動パターンによる判別は可能であった（表2）。

表2 その他の加工品における判別の可否

品目	判別可能件数/試料件数
刻みのり	1/1
あられに巻かれたのり	1/1
おにぎりに巻かれたのり	2/2

以上のことから、PCR 及び PCR-RFLP 法を用いて電気泳動パターンの違いを判別することにより、FAMIC の表示監視業務の市販品検査に適した日本産と韓国及び中国産ののりの原産地の判別が可能であった。

4. まとめ

板のり5mm角からDNAを抽出し、ITS1領域をPCR及びPCR-RFLP法により分析した。複数の種や品種が混合されている試料、加工品に使用された試料等全てで電気泳動パターン違いを比較することにより判別が可能であった。Touhata らによる制限酵素 MspI による処理では日本産と判別できない韓国産の一部試料が、FspBI による処理に変更することで、両者を判別することが可能となった。日本産の板のりを日本型と判別した割合は100%となり、韓国型及び韓国・中国型と判別されなかった。一方、韓国及び中国産板のりを韓国型又は韓国・中国型と判別する割合は韓国産で65.4%、中国産で94.7%であり、DNA分析による日本産と韓国及び中国産ののりの原産地判別が可能であった。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所水産物応用開発研究センター安全性評価グループの皆様からは、技術指導を含め多大なるご支援をいただいたので感謝を申し上げます。

6. 文 献

- 1) 加工食品品質表示基準改正（原料原産地表示等）に関するQ & A
- 2) 乾し海苔, 焼き海苔, 味付け海苔, 「全国水産加工品総覧」福田裕、山澤正勝、岡崎恵美子監修, 光琳 2005;525-531
- 3) 漁業・養殖業生産統計
- 4) 財務省貿易統計
- 5) 全国漁連のり事業推進協議会資料
- 6) Touhata,K., Namikoshi,A., Suzuki,T., Iguchi,J., Mizusawa,N., Hara,T., Imamura,S., Yabu,T., Yamashita,Y. and Yamashita,M. :Origin identification of dried seaweed product "nori" by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Pyropia yezoensis* in the internal transcribed spacer ITS-1 region. Fisheries Science.2013;79:865-875
- 7) Niwa,K., Aruga,Y., :Identification of currently cultivated *Porphyra* species by PCR-RFLP analysis. Fisheries Science. 2006;72:143-148.
- 8) 山下倫明,山下由美子,原産地判別用微量元素及びDNA等の情報の収集・整備「平成20年度漁場環境・水産資源持続的利用型技術開発事業報告書」2008;35-38