

DNA分析によるマカロニ類の原料小麦判別法の検討

澤田 桂子, 高嶋 康晴
Keiko Sawada, Yasuharu Takashima

要 約

マカロニ類の原材料に普通小麦が混合されているか否かを確認する手法として、リアルタイム PCR 装置を用いた DNA 分析による判別が可能であるか否かの検討を行った。

普通小麦の混合割合を漸増したマカロニ類を用い、普通小麦プライマープローブセットと普通小麦とデュラム小麦に共通のプライマープローブセットを用いたリアルタイム PCR を実施した。各試料の普通小麦の混合割合に対する ΔCt 値（普通小麦の Ct 値 - 普通小麦・デュラム小麦共通の Ct 値）を比較したところ、普通小麦の混合割合に対して ΔCt 値は負の相関が見られたことから、マカロニ類中に普通小麦が混合されているかを判別する可能性が示唆された。

1. はじめに

加工食品は、平成 25 年 6 月に制定された食品表示法（平成 25 年 6 月 18 日法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）により名称、原材料名等の表示が義務付けられている。

マカロニ類は、食品表示基準において、「デュラム小麦のセモリナ若しくは普通小麦粉又は強力小麦等のファリナ若しくは普通小麦粉に水を加え、これに卵、野菜等を加え又は加えないで練り合わせ、マカロニ類成形機から高圧で押し出した後、切断し、及び熟成乾燥したものをいう。」と定義されており、めんの太さや管状、棒状、帯状など形状により、「マカロニ」、「スパゲッティ」、「バーミセリー」、「ヌードル」の 4 つに分類されている。なお、デュラム小麦及び強力小麦等は小麦の種類を、セモリナ、普通小麦粉及びファリナは小麦粉の粒度を指している。

また、「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）に基づくマカロニ類の日本農林規格（昭和 48 年 12 月 26 日農林省告示第 2633 号）では、マカロニ類の原材料に使用できる小麦はデュラム小麦のみ（デュラム小麦のセモリナ及びデュラム小麦の普通小麦粉）とされている。マカロニ類の国内生産量は平成 26 年において約 15 万 5 千トン¹⁾ であり、平成 18-22 年の JAS 格付は国内生産量の 40 %程度である²⁾。JAS 格付を受けていない市販のマカロニ類においても、原材料に「デュラム小麦」のみを使用している旨を記載している商品が多く見られる。しかし、原材料に使用した小麦がデュラム小麦のみか否かについて目視や官能のみで判別することは難しいため、原材料表示の真正性を科学的に検証する方法が求められている。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

マカロニ類の主な原材料であるデュラム小麦について、日本では、全量をアメリカとカナダから輸入しており³⁾、平成 26 年では 99 %以上がカナダからの輸入となっている⁴⁾。

普通小麦の混入を判別する方法について、PCR 産物をアガロースゲル等による電気泳動で検知する DNA 分析の手法では、超微量のコンタミネーションであっても意図して使用した場合と同様に PCR 増幅されて検知する場合がある。そこで、試料に含まれる初期量を判別するために蛍光色素を利用して PCR 増幅過程をモニタリングすることができるリアルタイム PCR 装置を用いた DNA 分析法による判別を検討することとした。

デュラム小麦（デュラムコムギ *Triticum durum*）はゲノムが AABB の 4 倍体（2n=28）の小麦であり、普通小麦（パンコムギ *T. aestivum*）はゲノム AABBDD の 6 倍体である。

普通小麦遺伝子⁵⁻⁹⁾並びにデュラム小麦及び普通小麦共通遺伝子⁷⁻⁹⁾領域を増幅するリアルタイム PCR 用プライマープローブセットについては複数の報告があり、Iida らは、遺伝子組換えコムギ検知のための普通コムギ特異的内在性遺伝子配列の探索において、普通小麦に存在する D ゲノム上の Waxy 遺伝子の配列を用いたプライマープローブセット（Wx012）の検討を行っている⁵⁾。また、Wx012 によるリアルタイム PCR は普通小麦で増幅し、デュラム小麦では増幅しなかったと報告している⁶⁾。

また、Imai らは、プロリンリッチプロテイン遺伝子の配列を用いたプライマープローブセット（PRP）によるリアルタイム PCR では普通小麦及びデュラム小麦で増幅した旨を報告している⁷⁾。

Matsuoka らは Starch SynthaseII 遺伝子の D ゲノムにコードされている配列を用いたプライマープローブセット（SSII-D）並びに A、B 及び D ゲノム上にある共通の配列を用いたプライマープローブセット（SSII-ex7）を用いてリアルタイム PCR を行い、普通小麦は SSII-D 及び SSII-ex7 で増幅し、デュラム小麦は SSII-D で増幅せず、SSII-ex7 で増幅された旨を報告している⁸⁾。

今回、マカロニ類を対象として、独立行政法人農林水産消費安全技術センターの表示監視業務で使用することを目的として、既報⁵⁻⁹⁾のプライマープローブセットを用いてリアルタイム PCR により原料小麦の判別を検討した結果について報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

普通小麦プライマープローブセット Wx012 の特異性を確認するため、デュラム小麦穀粒 8 品種（ARCOLA:2 点, COULTER:1 点, KRASNOKUTKA 6:1 点, KYLE:2 点, SARATOVSKAYA 57:1 点, SARATOVSKAYA ZOLOTIS:1 点, WAKOOMA:1 点, WASCANA:2 点）11 点を用いた。

また、マカロニ類の普通小麦の配合割合に対するリアルタイム PCR の傾向を調べるために普通小麦の配合割合を 10 %から 100 %まで順次漸増したマカロニ類（普通小麦 17 点とデュラム小麦 13 点を組合せて作

表 1 マカロニ類の試料数

普通小麦の 配合割合 (%)	Wx012及びPRP SSIID及びSSIIex7 試料数	
	※()内は市販品で内数	
10	4	2
20	2	1
25	1	0
30	1	1
35	1	0
40	2	1
45	1	0
50	3 (1)	3 (1)
55	1	0
60	3	2
70	3	1
80	2 (1)	2 (1)
85	1	0
90	3	2
95	1 (1)	1 (1)
100	6 (4)	4 (2)

成した模擬試料 28 点及び市販品 7 点) を 35 点用いた (表 1)。

2. 2 模擬試料の作成

普通小麦及びデュラム小麦の小麦粉を重量比で混合し、さらに小麦粉の総重量に対して 30 %の水を加えて混合後、切断し、乾燥機中で 70 °C、5 時間乾燥させて、マカロニ類の模擬試料を作成した。

2. 3 DNA 抽出

デュラム小麦穀粒の DNA 抽出は、GM quicker 2 (ニッポンジーン) により行った。穀粒の表皮の洗浄のため、穀粒の概ね 3 倍容以上の 1 % SDS Solution (10 % SDS Solution (ニッポンジーン) を希釈) を添加して激しくかくはん後、穀粒を滅菌水に移し、2 回以上泡が出なくなるまですすいだ。1 粒をラップで包み、ハンマーで粉砕した。粉砕した試料に GE1 Buffer を 250 µL 添加し、20 分以上静置後、ProteinaseK を 10 µL、RNase A を 5 µL、α-Amylase を 2 µL 添加した。かくはん後 65 °Cにて 15 分加温し、ペッスルで試料を破砕後、65 °Cで胚乳が溶解するまで加温した。GE2-K Buffer を 40 µL 添加し、以降はプロトコールに従って DNA を抽出した。

マカロニ類の DNA 抽出は、GM quicker 4 (ニッポンジーン) により行った。試料約 400 mg に GE1 Buffer を 1000 µL 添加し、30 分以上静置後、ProteinaseK を 20 µL、RNase A を 10 µL、α-Amylase を 2 µL 添加した。かくはん後 65 °Cにて 2 時間以上加温し、ペッスルで試料を破砕後、65 °Cで溶解するまで加温した。GE2-M Buffer を 200 µL 添加し、以降はプロトコールに従って DNA を抽出した。

抽出した DNA 溶液は、分光光度計 NanoDrop (ND-1000、Thermo Fisher Scientific) を用いて吸光度から DNA 濃度を測定し、10 ng/µL となるよう調製してリアルタイム PCR に供試した。

2. 4 リアルタイムPCR

2. 4. 1 プライマープローブセット

使用したプライマープローブセットを表 2 に示した。

表 2 本検討で使用したプライマープローブセット

種類	プライマー・プローブセット名	プライマー又はプローブ名	プライマー及びプライマーの種類	配列 (5'-3')	増幅長 (bp)
普通小麦	Wx012	Wx012F ⁷⁾	フォワードプライマー	5'-GGTCGCAGGAACAGAGGTGT-3'	102
		Wx012R ⁷⁾	リバースプライマー	5'-GGTGITCCTCCATTGCGAAA-3'	
	SSIID	Wx-Taql ⁷⁾	TaqManプローブ	5'-FAM- CAAGCGGCCGAAAATAGGTTGCC-TAMRA-3'	121
		SSII-D 1769U ⁸⁾	フォワードプライマー	5'-CACCATCAGTGAAGGAATGAATG-3'	
デュラム小麦・普通小麦共通	PRP	SSII-D 1889L ⁸⁾	リバースプライマー	5'-GGCGATATTGGTACCTAATTGAAG-3'	117
		PRP8F ⁷⁾	フォワードプライマー	5'-GCACCCATGATGAGTACTACTATTCTGTA-3'	
	SSIIex7	PRPds6R ⁷⁾	リバースプライマー	5'-TGCAAACGAATAAAAGCATGTG-3'	114
		PRP-Taqs ⁷⁾	TaqManプローブ	5'-FAM- CTGTGCACATGACTCAGTGTCTTTCGTG-TAMRA-3'	
	SSIIex7	SSIIex7-U ⁸⁾	フォワードプライマー	5'-GGATGGAATCTGGTGT-3'	114
		SSIIex7-L ⁸⁾	リバースプライマー	5'-ACCATAATGGACCGAGTGTAC-3'	
		SSIIex7-T82 ⁸⁾	TaqManプローブ	5'-FAM- CTCCTGCCTGCTATCTGAAAGCAT-TAMRA-3'	

2. 4. 2 リアルタイムPCRの反応条件

リアルタイム PCR 反応液の組成は、フォワード及びリバースプライマー (FASMAC) を 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、TaqMan Probe (Thermo Fisher Scientific) を 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 12.5 μL 、10 ng/ μL の DNA 溶液を 5.0 μL 、滅菌水により全量を 25.0 μL とした。

リアルタイム PCR 反応は、ABI PRISM 7900HT (Thermo Fisher Scientific) を用いて、9600 emulsion mode で行った。リアルタイム PCR 温度サイクルは、Wx012 及び PRP では、50 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間保持した後、95 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加温するホットスタート法で反応を開始後、(1) 95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒、(2) 60 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分の (1) ~ (2) を 1 サイクルとして 45 サイクル実施した。SSIID では、95 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間保持した後、(1) 95 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、(2) 60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒の (1) ~ (2) を 1 サイクルとして 45 サイクル実施した。SSIex7 では、95 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間保持した後、(1) 95 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、(2) 55 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間の (1) ~ (2) を 1 サイクルとして 45 サイクル実施した。

2. 4. 3 ΔCt 値

各試料の各プライマープローブセットによるリアルタイム PCR について、一定の蛍光強度となる PCR のサイクル数 (Ct 値) を求めた。蛍光強度のしきい値 (Threshold Line) は 0.2 とした。

試料毎に普通小麦プライマープローブセットでの Ct 値からデュラム小麦・普通小麦共通プライマープローブセットでの Ct 値の差を ΔCt 値としてを求めた。 ΔCt 値の検討は、Wx012 と PRP の組合せと、SSIID と SSIex7 の組合せの 2 通りについて行った。普通小麦の混合割合を 10 % から 100 % まで順次漸増したマカロニ類 (模擬試料等) 35 点を用いて、Wx012 の Ct 値から PRP の Ct 値を引いた ΔCt 値 (Wx012 Ct 値 - PRP Ct 値) を、マカロニ類 (模擬試料等) 20 点を用いて、SSIID の Ct 値から SSIex7 の Ct 値を引いた ΔCt 値 (SSIID Ct 値 - SSIex7 Ct 値) を求めた。

3. 結果及び考察

3. 1 リアルタイムPCRによるデュラム小麦増幅確認

デュラム小麦穀粒から抽出した DNA を用いて、普通小麦 Wx012 プライマープローブセットによるリアルタイム PCR により増幅されないことの確認を行った。デュラム小麦の穀粒 8 品種 11 点全てでリアルタイム PCR の指数関数的な増幅曲線は検出されず、Wx012 の特異性を確認できた。

3. 2 リアルタイムPCRによるマカロニ類の ΔCt 値

本研究では、マカロニ類について、既報⁵⁻⁹⁾を参考にして、Wx012、PRP、SSIID 及び SSIex7 のプライマープローブセットによるリアルタイム PCR を実施し、Threshold Line (しきい値) を 0.2 とした場合の Ct 値を求め、Wx012 及び PRP、SSII-D 及び SSII-ex7 の組合せで、 ΔCt 値を求めた (表 3)。

表3 各配合割合における ΔCt 値

普通小麦の 配合割合(%)	Wx012及びPRP 試料数	ΔCt 値(Wx012 Ct値-PRP Ct値)		SSIID及びSSIlex7 試料数	ΔCt 値(SSIID Ct値-SSIlex7 Ct値)	
		平均値	標準偏差		平均値	標準偏差
10	4	4.486	0.321	2	5.128	0.44
20	2	3.716	0.257	1	5.039	—
25	1	3.253	—	0	—	—
30	1	3.219	—	1	4.088	—
35	1	3.093	—	0	—	—
40	2	2.218	0.911	1	2.907	—
45	1	1.994	—	0	—	—
50	3	1.920	0.326	3	3.076	0.218
55	1	1.634	—	0	—	—
60	3	1.331	0.190	2	2.485	0.145
70	3	1.153	0.114	1	2.549	—
80	2	0.554	0.324	2	2.155	0.052
85	1	0.918	—	0	—	—
90	3	0.490	0.127	2	1.909	0.213
95	1	0.150	—	1	1.948	—
100	6	-0.013	0.180	4	1.653	0.102

供試したマカロニ類（模擬試料等）35点の普通小麦の配合割合（%）とWx012及びPRPの組合せから求めた ΔCt 値（Wx012 Ct値-PRP Ct値）の傾向を確認した。その結果、普通小麦の配合割合（%）に対して ΔCt 値（Wx012のCt値-PRPのCt値）は負の相関（相関係数 $R=-0.9709$ 、決定係数 $R^2=0.9426$ ）が見られた（図1 a）。

また、 ΔCt 値（Wx012 Ct値-PRP Ct値）の傾向の確認のために、Wx012及びPRPの組合せに使用したマカロニ類（模擬試料等）のうち20試料を用い、試料中の普通小麦の配合割合（%）とSSIID及びSSIlex7の組合せから求めた ΔCt 値（SSIID Ct値-SSIlex7 Ct値）の傾向についても確認した。その結果、Wx012及びPRPの組合せ同様に普通小麦の配合割合（%）に対して ΔCt 値（SSIID Ct値-SSIlex7 Ct値）は負の相関（相関係数 $R=-0.9536$ 、決定係数 $R^2=0.9093$ ）が見られた（図1 b）。

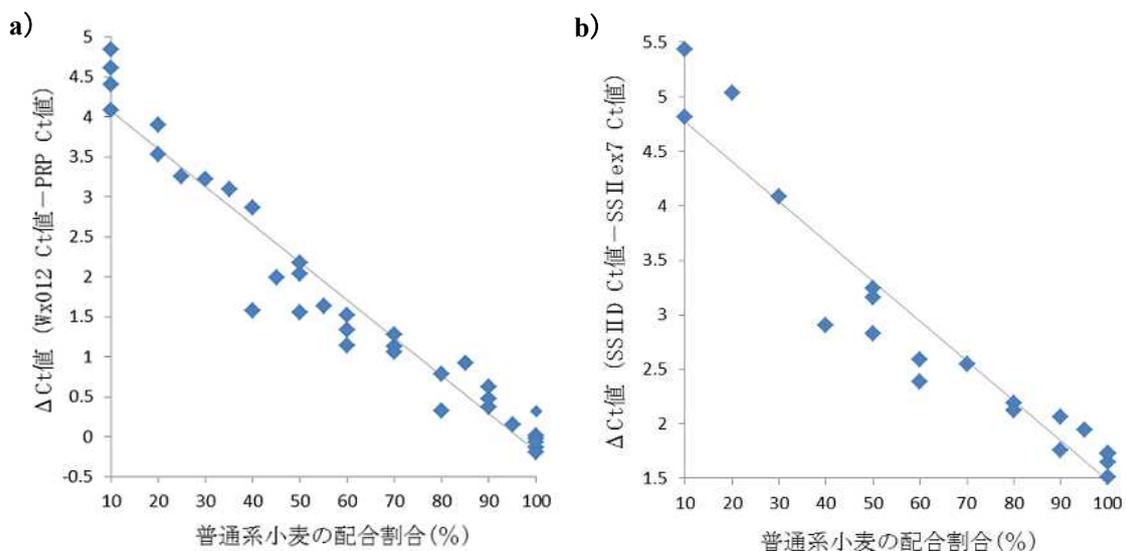


図1 普通小麦の配合割合（%）に対するリアルタイムPCRから算出した ΔCt 値の相関
a) ΔCt 値(Wx012 Ct値-PRP Ct値) b) ΔCt 値(SSIID Ct値-SSIlex7 Ct値)

図1 a 及び図1 b に共通する試料を用い、 ΔCt 値 (Wx012 Ct 値 - PRP Ct 値) と ΔCt 値 (SSIID Ct 値 - SSIIex7 Ct 値) を比較したところ、正の相関 (相関係数 $R=0.9754$ 、決定係数 $R^2=0.9515$) が見られた (図2)。このことから、リアルタイム PCR により求めた ΔCt 値は、プローブセットが異なる場合でも安定してマカロニ類の原料の配合を反映していると考えた。

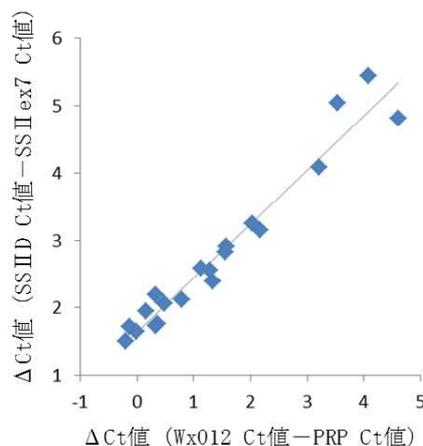


図2 ΔCt 値 (Wx012 Ct 値 - PRP Ct 値) と ΔCt 値 (SSIID Ct 値 - SSIIex7 Ct 値) の相関

3. 3 リアルタイムPCRによるマカロニ類の $\Delta \Delta Ct$ 値

リアルタイム PCR により、一定量以上混入しているか否かを判定する方法について、飼料関係通知遺伝子組換え小麦 (MON71800) の暫定検査法では、定性リアルタイム PCR 法で MON71800 陽性と判定された試料は、1 %混入判定試験を行っている。1 %陽性対照液を作成し、試料と 1 %陽性対照液について小麦共通遺伝子及び MON71800 検出の両プライマープローブセットによるリアルタイム PCR の Ct 値の差 (ΔCt 値) を比較することにより MON71800 が 1 %を超えて混入しているか否かを確認している^{10,11)}。

今回の検討においても、普通小麦プライマープローブセットによりリアルタイム PCR で増幅した試料については、普通小麦を一定量混合した試料を基準試料としてリアルタイム PCR を実施し、試料の ΔCt 値と基準試料の ΔCt 値との差 ($\Delta \Delta Ct$ 値 = 試料 ΔCt 値 - 基準試料 ΔCt 値) を求め、負の値となれば基準試料よりも普通小麦の割合が上回っているとの判別を行うことにより、マカロニ類中に一定量以上の普通小麦が混合されているかを判別できる可能性がある。このため、今回の検討で用いたマカロニ類試料の ΔCt 値 (Wx012 Ct 値 - PRP Ct 値) について、各配合割合の試料の ΔCt 値の平均値を基準試料として、基準試料より配合割合の高い試料の ΔCt 値の平均値との $\Delta \Delta Ct$ 値を求めたところ、5 %の配合割合の差の試料では、80 %試料の ΔCt 値の平均値より 85 %試料の ΔCt 値の平均値が大きく $\Delta \Delta Ct$ 値は正の値となったが、それ以外の配合割合の試料間では負の値となった。さらに 10 %の配合割合の差では全ての試料間の $\Delta \Delta Ct$ 値は負の値となった。一方で、各試料毎の ΔCt 値について比較すると、いくつかの試料間で $\Delta \Delta Ct$ 値が正の値となる事例があった。最も配合割合が離れた試料間で $\Delta \Delta Ct$ 値が正の値となったケースは、40 %試料 (ΔCt 値 1.5737) と 15 %差がある 55 %試料 (ΔCt 値 1.6343) で、 $\Delta \Delta Ct$ 値は 0.0606 であった。この 40 %試料では、20 %以上差のある 60 %以上配合された

いずれの試料との $\Delta \Delta$ Ct 値で負の値となった。よって、混入と判断する配合割合に対して少なくとも 20 %以上多い試料を基準試料とすることで、偽陽性のない判別が可能となると考えられた。

一般的に混合物の加工品では製品や各原材料の製造過程で各原材料が受ける DNA の精製や損傷具合が異なり、今回の検討の対象も小麦の混合物の加工品であるマカロニ類であるため、試料によっては配合割合が多い試料よりも Δ Ct 値が低く、 $\Delta \Delta$ Ct 値で負となり偽陽性となることから、判別を行う配合割合に対して加工の影響も考慮して基準試料を選択する必要がある。

今回、実際に加工品であるマカロニ類で普通小麦の配合割合に対する Δ Ct 値を求めたことから、図 1 に示した普通小麦の配合割合に対する Δ Ct 値の相関等を参考として、必要に応じて試料を追加し、判別を行う配合割合の試料よりも配合割合が多く Δ Ct 値が低い試料を基準試料として選択することで、マカロニ類中に一定量以上の普通小麦が混入しているか否かの判別が可能であると考えられた。

4. まとめ

マカロニ類から DNA を抽出し、リアルタイム PCR により分析を行った。原材料中の普通小麦の割合に対して、 Δ Ct 値（普通小麦の Ct 値－普通小麦・デュラム小麦共通の Ct 値）は負の相関が見られ、マカロニ類中に普通小麦が混合されているかを判別できる可能性が示唆された。

なお、本判別法を使用するに際しては、特許^{6,9,12)} 使用許諾を得る必要がある。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、北海道立総合研究機構中央農業試験場遺伝資源部よりデュラム小麦の種子を分譲いただき、また、ご協力やご助言をいただきましたすべての皆様に感謝を申し上げます。

6. 文 献

- 1) 一般社団法人日本パスタ協会
- 2) 農林物資規格調査会総会 平成 25 年 3 月 22 日開催 調査会配布資料
- 3) 塚本 守「パスタ入門」日本食糧新聞社.2000;64
- 4) 財務省貿易統計
- 5) Iida,M., Yamashiro,S., Yamakawa,H., Hayakawa,K., Kuribara,H., Kodama,T., Furui,S., Akiyama,H.,Maitani,T. and Hino,A. :Development of Ttaxon -Specific Sequences of Common Wheat for the Detection of Genetically Modified Wheat. Journal of Agricultural & Food Chemistry.2005;53 (16) :6294-6300
- 6) コムギ内在性 DNA 配列の検出・定量方法,特許第 4717807 号
- 7) Imai,S., Tanaka,K., Nishitsuji,Y., Kikuchi,Y., Matsuoka,Y., Arami,S., Sato,M., Haraguchi,H.,

- Kurimoto,Y., Mano,J., Furui,S. and Kitta K. :An Endogenous Reference Gene of Common and Durum Wheat for Detection of Genetically Modified Wheat. 食品衛生学雑誌.2012;53(5):203-210
- 8) Matsuoka,Y., Arami,S., Sato,M., Haraguchi,H., Kurimoto,Y., Imai,S., Tanaka,K., Mano,J., Furui,S. and Kitta,K. :Development of Methods to Distinguish between Durum/Common Wheat and Common Wheat in Blended Flour Using PCR.食品衛生学雑誌.2012;53(5):195-202
- 9) 普通系コムギを定性的及び定量的に検出する方法、特許第 5625211 号
- 10) 橋本仁康、笠原正輝、會田紀雄：遺伝子組換え小麦（MON71800）の 1 %混入判定試験法の検討.飼料研究報告.2014;39:68-73
- 11) 遺伝子組換え小麦（MON71800）の暫定検査法（追加）（平成 25 年 9 月 9 日・25 消安第 1707 号-1）
- 12) コムギ内在性遺伝子の検出及び定量方法、特許公開 2011-125306