

## DNA 分析による大豆加工品の原料大豆の品種判別法の開発

石原 敏史<sup>1</sup>, 岸根 雅宏<sup>2</sup>, 高嶋 康晴<sup>3</sup>, 豊田 正俊<sup>1</sup>, 澤田 桂子<sup>1</sup>,  
井伊 悠介<sup>4</sup>, 小岩 智宏<sup>4</sup>

Toshifumi Ishihara, Masahiro Kishine, Yasuharu Takashima, Masatoshi Toyoda, Keiko Sawada,  
Yusuke Ii, Tomohiro Koiwa

### 要 約

大豆加工品における原料大豆の品種判別を可能とするため、品種特異的な塩基の挿入又は欠失をターゲットとして、Tetra-Primer ARMS-PCR 法によるフクユタカ、ユキシズカ等の検査用プライマーの開発を行った。またフクユタカ検査用プライマーについては、検査における偽陽性の発生を防止するため、大豆加工品における異品種の混入が、生産・流通段階や製造段階における少量の混入か否かを判別する手法の検討を行った。キャピラリー電気泳動装置による電気泳動結果の解析を行うことにより、少量の混入か否かを判別することが可能となり、表示された品種以外の品種の混入の有無を判別する検査法を開発することができた。

### 1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）第 7 条により、使用した原材料が特色のあるものである旨を表示する場合又は製品の名称が特色のある原材料を使用した旨を示すものである場合は、その割合が 100%である場合を除き、その重量の割合を表示することが義務づけられており、品種名のみを表示する場合は、その品種の使用割合が 100 %でなければならないとされている。使用した大豆の品種表示のある商品は、通常の商品と比較して値段が高いため、表示が偽装される懸念があるが、それを確認する検査法は確立していなかった。そこで、原料大豆の品種名が表示された大豆加工品について、表示された品種以外の品種（以下「異品種」という。）が混入されているか否かを判別するための検査法の開発を行った。また、一般的に DNA 分析は高感度であることから、生産・流通段階や製造段階における少量の異品種の混入でも検知してしまい「陽性」と判定される恐れがある。そのため、原料大豆の生産・流通段階や大豆加工品の製造段階における少量の異品種の混入の可能性が高いか否かの判定を行うための検討を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料の収集

大豆の各品種の遺伝子型の確認等を行うことを目的に、判別対象 13 品種（ユキホマレ、リュウホウ、タチナガハ、フクユタカ、エンレイ、ミヤギシロメ、ユキシズカ、スズマル、納豆小

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>2</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品分析研究領域

<sup>3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現）神戸センター

<sup>4</sup> 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（現）本部

粒、里のほほえみ、ナカセンナリ、タマホマレ及び丹波黒) について道府県の農業試験場等から原種又は原々種の収集を行った。収集した大豆の種子 1 粒ずつから DNA を抽出して、各品種の標準 DNA 溶液を作製し、開発した検査用プライマーの性能等の確認に使用した。

## 2.2 モデル試料の製造

大豆加工品への適用検討等を行うことを目的に、異品種の混入率(重量比)の異なる大豆加工品のモデル試料を製造した。また、混入した大豆の品種の違いによる影響を確認するため、異なる大豆の品種を混入させた大豆加工品のモデル試料を製造した。異品種の混入率の異なるモデル試料は、フクユタカを原料品種として、異品種(エンレイ)を種子の重量比で混入率 5%、10%及び 20%となるように加えて、豆乳、おから、豆腐及び油揚げを製造した。混入した大豆の品種の違いによる影響を確認するためのモデル試料は、フクユタカを原料品種として、エンレイ、ユキシズカ、ミヤギシロメ及びタチナガハをそれぞれ種子の重量比で混入率 5%となるように加え豆乳及び豆腐を製造した。

## 2.3 DNA 抽出

### 2.3.1 大豆の種子からの DNA 抽出

大豆の種子 1 粒からの DNA 抽出は GM quicker (ニッポンジーン) を使用し、「100 mg ダイズ種子粉砕試料からの DNA 抽出プロトコール」を一部改変して行った。まず、大豆 1 粒をチャック付きポリエチレン袋にとり、滅菌水を加え冷暗所で一昼夜静置した後、滅菌水を取り除きハンマーで細かく粉砕したものを 100~150 mg を 2.0 mL チューブに採取し、1200 µL の GE1 Buffer および 8 µL の RNase A をそれぞれ添加した後、ボルテックスミキサーにて 30 秒間かくはんし 5 分間室温で静置した。続いて、150 µL の GE2 Buffer を添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ良くかくはんした後、5 分間水冷した。次に遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 5 分間遠心を行った後、上澄み 800 µL を新しい 2.0 mL チューブに移し、300 µL の GE3 Buffer 及び 300 µL のイソプロパノールを添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、良く混和した。この混合液を 650 µL ずつ Spin Column に移し、遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 30 秒間遠心した後、通過液を廃棄する操作を繰り返し、混合液全量を Spin Column に移した。次に Spin Column に 600 µL の GW Buffer を添加し、遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 60 秒間遠心した後、通過液を廃棄し、Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移した。Spin Column に 50 µL の TE(pH8.0)を滴下した後、3 分間室温で静置し、遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 60 秒間遠心して通過液を回収し DNA 溶液とした。抽出した DNA 溶液は 260 nm の吸光度を測定し、1 O.D. 260 nm を 50 ng/µL DNA 溶液として DNA 濃度を算出し、滅菌水で 2.5 ng/µL になるように希釈して PCR 用の希釈 DNA 溶液を調製した。分光光度計は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

### 2.3.2 大豆加工品からの DNA 抽出

製造したモデル試料からの DNA 抽出は、「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第 3 版」の「DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」により行った。豆乳及びおからはそのまま 1 g を DNA 抽出に供した。豆腐及び油揚げは等量の滅菌水を加えてホモジナイザーを用いて細かく粉砕したものを 1 g を DNA 抽出に供した。抽出した DNA 溶液は 260 nm の吸光度を測定し、1 O.D. 260 nm を 50 ng/µL DNA 溶液として DNA 濃度を算出し、滅菌水で 2.5 ng/µL になるように希釈して PCR 用の希釈 DNA 溶液を調製した。分光光度計

は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

## 2.4 PCR

PCR 反応液の組成は、0.02 units の DNA ポリメラーゼ KOD FX Neo (TOYOBO)、1 × Buffer for KOD FX Neo (2.0mM Mg<sup>2+</sup> plus)、0.2 mmol/L dNTP Mixture 及び品種ごとのプライマーセット (表 1 参照) を含む反応液に、希釈 DNA 溶液を 2.0 μL 加え、滅菌水で全量を 10μL とした。PCR はサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。PCR の温度サイクルは、最初の熱変性として 94 °C で 2 分、次に (1) 熱変性として 98 °C で 4 秒、(2) アニーリングとして 66 °C で 30 秒、(3) 伸長反応として 68 °C で 15 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 30 サイクル、最後に伸長反応として 68 °C で 2 分反応させた。

## 2.5 キャピラリー電気泳動装置による電気泳動

PCR により得られた PCR 産物は、キャピラリー電気泳動装置 QIAxcel Advanced System (QIAGEN) により電気泳動を行った。カートリッジは QIAxcel DNA Screening Kit を使用し、Alignment Marker として QX Alignment Marker 15 bp/500 bp を使用し、分子量マーカーとして QX DNA Size Marker 25–500 bp を使用した。得られた電気泳動結果から異品種特異的バンドのピーク強度 (Height) を共通バンド、品種特異的バンド及び異品種特異的バンドのピーク強度 (Height) の合計で割ったピーク強度比を求め、解析に用いた。

# 3. 結果及び考察

## 3.1 検査用プライマーの開発

品種特異的な塩基の挿入又は欠失 (以下「InDel」という。) をターゲットとして、表示品種か異品種かを 1 回の PCR で判別するため、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (以下「農研機構」という。) との共同研究により、Tetra-Primer ARMS-PCR 法<sup>1)</sup>による検査用プライマーの開発を行った。なお、検査用プライマーの設計に必要な多型情報や配列に関する情報は、農研機構次世代作物開発研究センターで取得されたものを試料提供契約により入手した。

Tetra-Primer ARMS-PCR 法では、2 つのプライマー対を使用することで、2 つの異なる一塩基多型 (SNP) に由来する長さの異なる DNA 断片を同時に増幅することが可能であり、得られた DNA 断片の長さからそれぞれの多型の有無を確認することができる。これを応用し、今回の検査用プライマーでは品種特異的な InDel の有無により、長さの異なる DNA 断片が増幅するように設計を行った (図 1)。品種特異的な InDel をはさむように Outer Primer (図 1 黄色の矢印) を設計し、InDel の有無により選択的にアニーリングするように Inner Primer (図 1 水色と赤色の矢印) を設計することにより、表示品種と異品種で異なる長さのバンドが増幅するよう設計を行った (表 1)。これにより、品種にかかわらず増幅する共通バンド、表示品種のみで増幅する表示品種特異的バンド、異品種のみで増幅する異品種特異的バンドの 3 種が増幅することになり、異品種特異的バンドの有無により異品種の混入の有無を確認することができる。

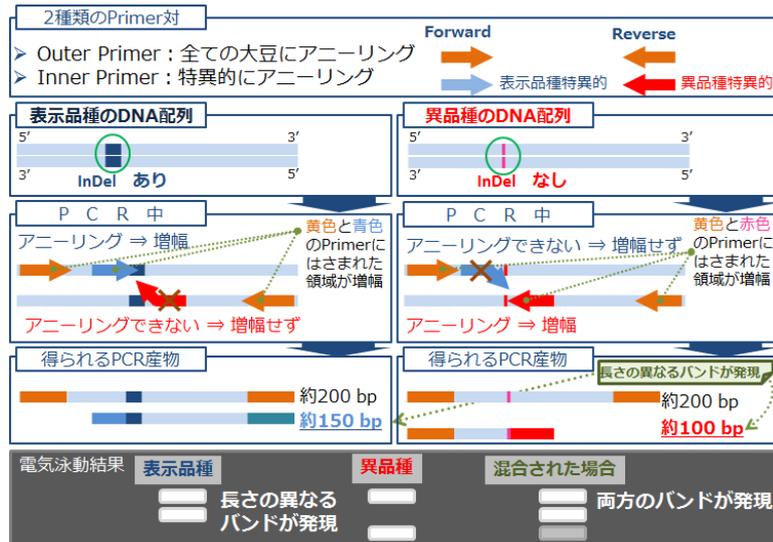


図1 Tetra-Primer ARMS-PCR法 模式図

表1 開発した検査用プライマー

Marker	Primer Name	Type	配列 (5'→3')	終濃度 (μM)	増幅長 (bp)
フクユタカ 検査用プライマー	FU-OF2	Outer F	GCACGCCGATGTCATGTTC	0.25	186/185 148 89
	FU-ORk2	Outer R	AAAACCAAGTTCAATCTCCGGCAGTGTTA	0.25	
	FU-IFk2	Inner F	AACCTTTTGATATTCTTTTGCTGTTAG	0.25	
	FU-IRk1	Inner R	AAGTCAAATTAGTAAGCCCACACTT	0.25	
ユキシズカ 検査用プライマー	YS-OF	Outer F	GCTGGATGCACAACCATTGAC	0.25	180/179 135 88
	YS-ORk1	Outer R	GCACTTACTTCGTTTATTGGCGGTG	0.25	
	YS-IFk3	Inner F	CCAAACTCAAACCTTCTCCAACAA	0.25	
	YS-IRk1	Inner R	AGGAAGTCAAGGTGGTAATGTG	0.25	
ナカセンナリ 検査用プライマー	NA-OFk1	Outer F	CCTCAGCCCTTTTGACCACCA	0.25	186/179 147 83
	NA-ORk1	Outer R	AAGGGAGACAGGATAGATAAACATCAGAAG	0.25	
	NA-IF3	Inner F	AACCATTTTCTATACAGGTGGTACAAATACC	0.25	
	NA-IRk1	Inner R	CACCTTTGGGGTTCAGTTGT	0.25	
ユキホマレ 検査用プライマー	YK-OF	Outer F	GATCACTCCTCCTCCTCTCA	0.2	199/187 147 84
	YK-OR2	Outer R	CGTGGAGAAGCTTGTGGGAGA	0.25	
	YK-IF2	Inner F	CTTCTCCTCACATGACCCTCCA	0.25	
	YK-IR	Inner R	TCGGGAGGTGGGAGGAGGA	0.2	
タチナガハ ユキシズカ 検査用プライマー	TCYS-OFk3	Outer F	GAATATTTTCAGGTGAAATGCTCGCAACAG	0.375	192/188 148 90
	TCYS-ORk3	Outer R	TGGTGATGTACATATATCTATAATTGTGAACCGTC	0.625	
	TCYS-IFk2	Inner F	TTTTGGAGTTGAGAGTATGCCATGTTG	0.25	
	TCYS-IRk2	Inner R	TTTTTCTATACCTTCTTAAGAGTGGAGCAAAGCA	0.5	

※ 終濃度欄はPCR時の1 tubeあたりの各Primerの終濃度  
 増幅長欄は上段：共通バンド、中段：表示品種特異的のバンド、下段：異品種特異的のバンド

### 3.2 開発した検査用プライマーによる電気泳動結果

開発した検査用プライマーによる電気泳動結果は図2のとおり。設計したとおり対象品種と異品種で異なるバンドパターンとなった。

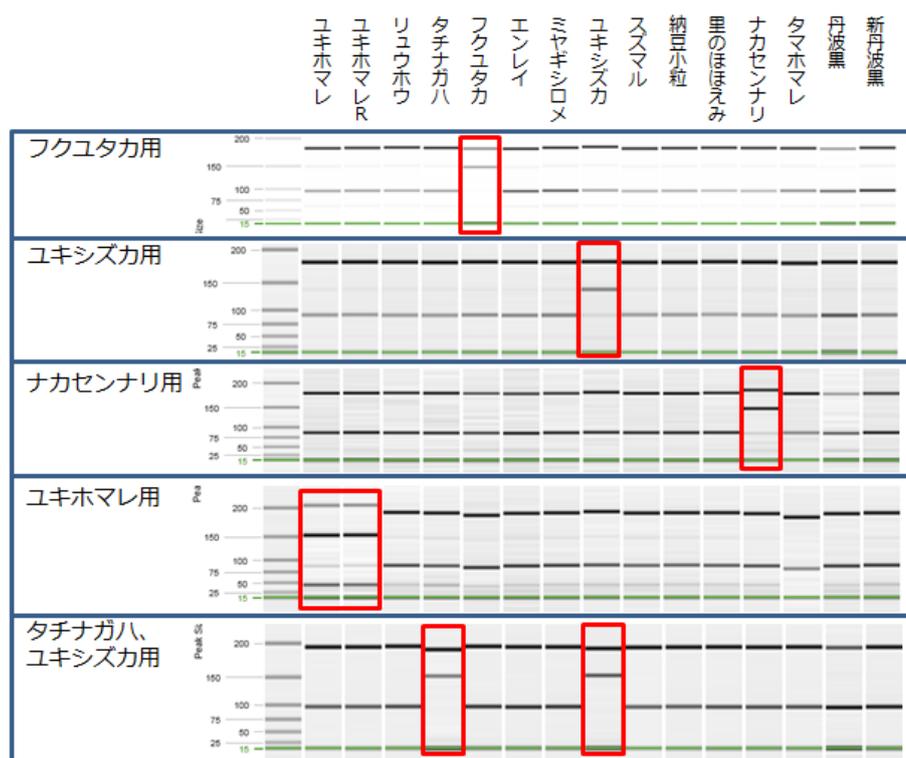


図2 キャピラリー電気泳動装置による電気泳動結果

赤枠は検査対象品種のバンドパターン

共通バンド（最上段のバンド）、品種特異的バンド（上から2段目のバンド）、異品種特異的バンド（上から3段目のバンド）、Alignment Marker（最下段の緑色のバンド）、Size Marker（一番左のレーン）

### 3.3 大豆加工品の検査への適用検討

検査における偽陽性の発生を防止するため、大豆加工品における異品種の混入が、生産・流通段階や製造段階における少量の混入か否かを判別する手法の検討を行った。具体的には、フクユタカ検査用プライマーについて、フクユタカとエンレイの原種から抽出した DNA 溶液を用いて異品種の混入率（0～50%）の異なる DNA 溶液を作製し、ピーク強度比と異品種の混入率の相関について確認を行った。また、大豆加工品の検査へ適用するため、モデル試料を用いて品目間差の確認及び混入した大豆の品種の違いによる影響の確認を行った。

#### 3.3.1 ピーク強度比と異品種の混入率の相関

異品種の混入率（0～50%）が異なる DNA 溶液による電気泳動結果は図3のとおり。得られたデータから異品種特異的バンドのピーク強度比を求め、異品種混入率との相関を求めた（図3）。異品種の混入率の増加（赤矢印）に伴い、異品種特異的バンドのピーク強度比も大きくなる（青矢印）ことが分かった。これは今回の反応系が競合的 PCR の一種であることから、PCR 初期の指数増加期における PCR 生成物は、初期鋳型量の割合（異品種の DNA 量/全ての DNA 量）を反映して増幅されるため、異品種の DNA に由来する PCR 産物も、初期鋳型量の割合を反映するためであると考えられる。このことから、PCR の結果を解析することにより得られる異品種特異的バンドのピーク強度比を指標とすることで、異品種の混入が少量の混入か否かを判別することが可能である事が示唆された。

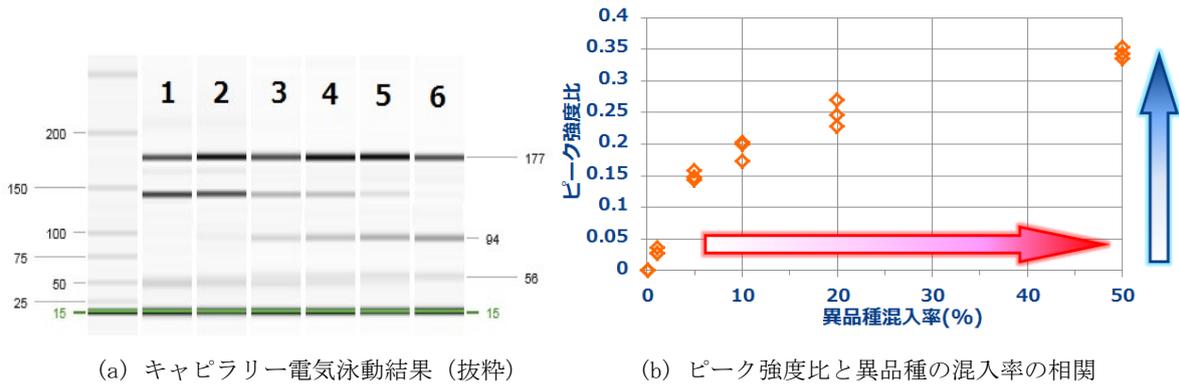


図3 ピーク強度比と異品種の混入率の相関  
 異品種混入率：1: 0%, 2: 1%, 3: 5%, 4: 10%, 5: 20%, 6: 50% ((b)は各4点のPCR結果をプロット)

### 3.3.2 モデル試料による大豆加工品の品目間差の確認

ピーク強度比について、異品種の混入率の異なるモデル試料により、大豆加工品の品目間差の確認を行った。各混入率及び各品目について8点の試料を分析した結果は図4のとおり。品目に関わらず異品種の混入率が増加するとピーク強度比も増加する傾向があり、また、大豆加工品の品目間でも混入率が同程度ならばピーク強度比も同程度であった。以上のことから、今回確認を行った品目では、加工工程の違い等によるピーク強度比への影響は大きくないと考えられた。

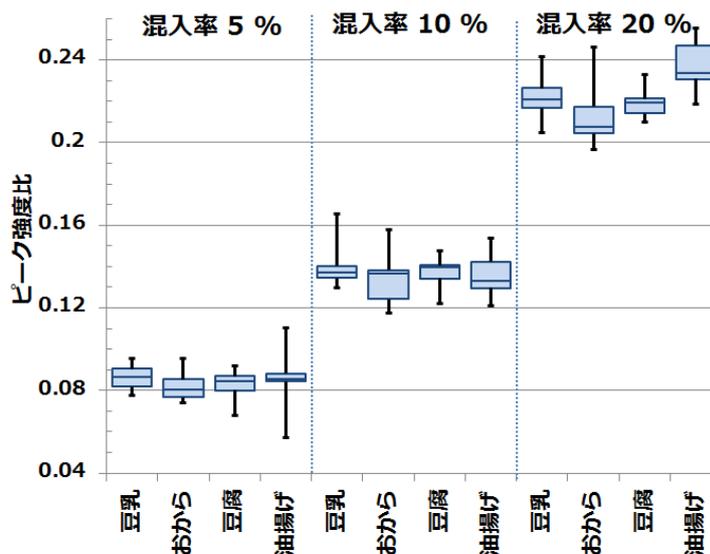


図4 大豆加工品の品目間差の確認結果 (箱ひげ図、N=各8点)

### 3.3.3 混入した大豆の品種の違いによる影響の確認

混入した大豆の品種の違いによるピーク強度比の比較は図5のとおり。異品種を5%混入したモデル試料のピーク強度比には混入した大豆の品種の違いによる大きな差はみられなかった。これらのモデル試料のピーク強度比と混入率10%のモデル試料を比較した場合、両者には大きな差があることから、混入した品種によらずピーク強度比により少量の混入か否かを判別することが可能であることが示唆された。

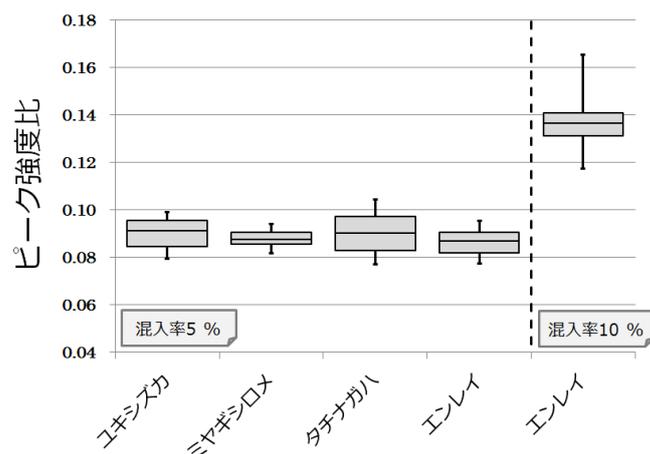


図5 混入した大豆の品種の違いによるピーク強度比の変化（箱ひげ図、N=各8点）

#### 4. まとめ

品種名が表示された大豆加工品について、異品種が使用されているか否かを判別するため、農研機構との共同研究により、Tetra-Primer ARMS-PCR 法による検査用プライマーの開発を行った。その結果、豆乳や豆腐等、複数の品種が混ぜられる可能性がある加工品についても、異品種が混入しているか否かを、一度の PCR により判別することが可能な検査用プライマーを開発することができた。また、一般的に DNA 分析は高感度であることから、生産・流通段階や製造段階における少量の混入でも「陽性」と判定される恐れがあるため、フクユタカ検査用プライマーについて、加工食品の検査への適用検討を行った。その結果、豆乳や豆腐等の品目や混入された異品種の品種によらず、異品種の混入率の増加に伴いピーク強度比も増加することから、異品種のピーク強度比を指標とすることで生産・流通段階や製造段階における少量の混入の可能性が高いか否かを判別できることが示唆された。このことから、PCR の結果を解析することにより得られる異品種のピーク強度比を指標として判定を行うことにより、偽陽性の発生の防止に貢献できることが示唆された。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、検査用プライマーの設計に必要な多型情報や配列に関する情報をご提供くださいました農研機構次世代作物開発研究センター畑作物形質評価ユニットの加賀秋人先生、並びに大豆の原種及び原々種をご提供くださいました道府県の農業試験場等の皆様に心よりお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Ye, S.; Dhillon, S.; Ke, X.; Collins, A. R.; Day, I. N. M.: An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.*, **29**(17), e88(2001)
- 2) Newton, C. R.; Graham, A.; Heptinstall, L. E.; Powell, S. J.; Summers, C.; Kalsheker, N.; Smith, J. C.; Markham, A. F.: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, **17**(7), 2503-2516(1989)