

# DNA 分析による複数の品種が混合されたダイズ加工品における 混入割合推定法の開発

豊田 正俊<sup>1</sup>, 澤田 桂子<sup>2</sup>, 足立 静香<sup>3</sup>, 石原 敏史<sup>4</sup>, 岸根 雅宏<sup>5</sup>

TOYODA Masatoshi, SAWADA Keiko, ADACHI Shizuka, ISHIHARA Toshifumi, KISHINE Masahiro

## 要 約

原料ダイズに「フクユタカ」のみを使用している旨が表示された豆腐について、品種表示の真正性確認のために、リアルタイム PCR を用いた検査法を検討した。デジタル PCR による先行研究を参考に、リアルタイム PCR 用に設計した検出系及びプライマーを用いた  $\Delta\Delta Ct$  法により、フクユタカ型以外の品種の混入割合を推定する検査法を開発した。

## 1. はじめに

一般加工食品の表示においては、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 パーセントである場合を除き、その重量の割合を表示することが義務づけられている。

ダイズ加工品には、原料ダイズが特定の品種であることを強調した商品が見られる。一方、ダイズ加工品に使用された品種を目視や食味等で判別することは困難であるため、DNA を分析対象とした品種判別方法の確立が求められてきた。そこで、FAMIC では、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。）食品研究部門と共同で、ダイズ加工品のうち豆腐、豆乳、おから及び油揚げを対象に Tetra-Primer ARMS-PCR 法を用いて「フクユタカ」、「ユキホマレ」及び「ユキシズカ」表示の真正性を確認する方法を開発した<sup>1)</sup>。しかしながら、Tetra-Primer ARMS-PCR 法を用いた方法は定性分析法であるため、表示された品種以外の品種がどの程度混入しているかはわからない。このため、表示された品種以外の品種の混入割合を推定する新たな検査方法の開発が望まれている。

定量的な品種判別法を実現する手法としては、デジタル PCR とリアルタイム PCR が考えられる。デジタル PCR は、基準試料を用いることなく絶対的な定量を可能とする最新の技術である。これまでに、豆腐を対象として、「フクユタカ」及び「エンレイ」のデジタル PCR による定量的品種判別法が報告されている<sup>2)</sup>。一方、リアルタイム PCR は、定量に基準試料が必要となるが、遺伝子組換え食品の検査方法<sup>3)</sup>等に広く採用されている。また、現時点では、リアルタイム PCR 装置はデジタル PCR 装置と比較して広く普及していると考えられる。そこで本研究では、豆腐を

<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> 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>3</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

<sup>4</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現）福岡センター

<sup>5</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

ダイズ加工品の代表とし、豆腐の原料品種として強調されることの多い「フクユタカ」を対象に、リアルタイム PCR を用いた異品種（フクユタカ以外の品種）の混入割合推定方法を検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料及び DNA 抽出

リアルタイム PCR のプライマー設計、直線性、増幅効率及び特異性の検証には、ダイズ原種種子を用いることとし、「フクユタカ」原種種子は福岡県農林業総合試験場から、「リュウホウ」原種種子は山形県農業総合研究センターからそれぞれ分与されたものを用いた。種子からの DNA 抽出には、GM quicker（ニッポンジーン）を用いた。

豆腐試料は、市販の「フクユタカ」、「エンレイ」及び「ユキホマレ」種子並びに農業協同組合から入手した「里のほほえみ」及び「おおすず」種子を原料として、川瀬ら<sup>4)</sup>の手法に準拠して作製したのものを用いた。このうち、フクユタカと異品種（エンレイ、ユキホマレ、里のほほえみ及びおおすず）の混合豆腐試料は、原料中の異品種を種子の重量比で 5%、10%、30%及び 50%となるように混合して作製した（表 1）。なお、作製に用いる種子重量は計 12 g とした。豆腐試料からの DNA 抽出には、GM quicker 4（ニッポンジーン）を用いた。

抽出 DNA 溶液の濃度測定には、NanoDrop ND-1000（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

### 2.2 リアルタイム PCR 及びデジタル PCR

DNA マーカーには、岸根ら<sup>2)</sup>のデジタル PCR を用いた方法と同様に、フクユタカの第 14 染色体に存在する 3 塩基の欠失部位（Gm14\_01747305D）を用いた。挿入・欠失（Indel）マーカーに係る情報は、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。なお、フクユタカ以外にも同じ欠失を持つ品種があるため<sup>2)</sup>、以降、この欠失を持つ品種を「フクユタカ型」、持たない品種を「異品種型」と呼ぶ。令和元年度における国産大豆の検査数量上位 20 銘柄<sup>5)</sup>では、「とよまさり」構成品種の「トヨハルカ」及び「とよみづき」並びに「タンレイ」がフクユタカ型であり、その他の銘柄・品種は異品種型である。

リアルタイム PCR には、表 2 に示すプライマーを用いた。PCR 反応液は、5.0  $\mu$ L の PowerUP SYBR Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific）にフォワード及びリバースプライマーを最終濃度 0.5  $\mu$ mol/L となるよう混合し、12.5 ng の抽出 DNA を加え、滅菌水で全量を 10  $\mu$ L とした。3 反応分をまとめて調製し、PCR プレートの 3 ウェルに分注した。リアルタイム PCR 装置は、Applied Biosystems<sup>TM</sup> 7500 リアルタイム PCR システム（Thermo Fisher Scientific）を用いた。PCR は、UNG 処理として 50  $^{\circ}$ C 2 分及び最初の熱変性として 95  $^{\circ}$ C 2 分で保持後、熱変性 95  $^{\circ}$ C 15 秒、アニーリング及び伸長反応 60  $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルで行った。PCR 終了後、DNA の増幅に伴い増加する蛍光強度が閾値に達した際のサイクル数（Threshold cycle、以下「Ct 値」という。）をウェルごとに算出した。蛍光強度の閾値は 0.2 とした。

デジタル PCR は岸根ら<sup>2)</sup>の方法に準拠し、Digital PCR Chip v2（Thermo Fisher Scientific）及び QuantStudio<sup>TM</sup> 3D デジタル PCR システム（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。なお、蛍光強度による陽性・陰性判定の閾値は、VIC : 1200、FAM : 2000 とした。

表 1 作製した豆腐試料

試料名	原料ダイズ (重量比)				試料名	原料ダイズ (重量比)			
FU	フクユタカ	100 %			SH10	フクユタカ	90 %	里のほほえみ	10 %
EN5	フクユタカ	95 %	エンレイ	5 %	SH30	フクユタカ	70 %	里のほほえみ	30 %
EN10	フクユタカ	90 %	エンレイ	10 %	SH50	フクユタカ	50 %	里のほほえみ	50 %
EN30	フクユタカ	70 %	エンレイ	30 %	OS10	フクユタカ	90 %	おおすず	10 %
EN50	フクユタカ	50 %	エンレイ	50 %	OS30	フクユタカ	70 %	おおすず	30 %
EN100			エンレイ	100 %	OS50	フクユタカ	50 %	おおすず	50 %
YK10	フクユタカ	90 %	ユキホマレ	10 %					
YK30	フクユタカ	70 %	ユキホマレ	30 %					
YK50	フクユタカ	50 %	ユキホマレ	50 %					

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー

検出する系	プライマー名	向き	配列 (5'-3')	増幅長 (bp)
異品種型	FuN-F	フォワード	ACGGGAATATGAATTCATCGAAGAC	53
	FuN-R	リバース	CAATGGCGACGATGGCTTG	
共通配列	Gm14C-F	フォワード	ACCCCGCTATAGCATTTCCTG	51
	Gm14C-R	リバース	AAGGAGCGGGTATCGTTCC	

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 リアルタイム PCR 用プライマーの設計

まず、デジタル PCR による報告<sup>2)</sup>と同じプライマー・プローブを用いて、デュアルプローブ法によるリアルタイム PCR を行ったところ、フクユタカ型の PCR 効率が悪いことが判明した（データ省略）。フクユタカの Gm14\_01747305D 近辺の塩基配列をダイレクトシークエンス法で解析したところ、フクユタカとリファレンスゲノム<sup>6)</sup>の間には、Indel 領域の直前部位に 1 塩基多型が複数存在することがわかった（データ省略）。

そのため、リアルタイム PCR による検出には、SYBR Green を用いた検出系を採用し、異品種型を検出する系（以下「FuN」という。）と、フクユタカ型及び異品種型の共通配列を検出する系（以下「Gm14C」という。）の 2 つの系を設計した（図 1）。FuN のプライマーは、DNA マーカーの Indel 領域及びその直前の 1 塩基多型領域（以下「特異的配列領域」という。）上に作製した（図 1、表 2）。Gm14C のプライマーは、特異的配列領域の直後にあるフクユタカ型及び異品種型の両方で塩基配列が共通している領域上に作製した（図 1、表 2）。なお、全ての試料において、FuN と Gm14C は同一ランで測定を行った。

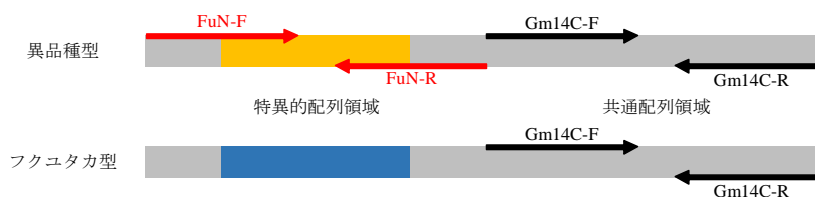


図 1 リアルタイム PCR による検出系

異品種型検出用のプライマー（赤矢印）は、異品種型の特異的配列領域に結合するが、フクユタカ型の特異的配列領域には結合しない。一方、共通配列検出用のプライマー（黒矢印）は、両者の共通配列領域に結合する。

### 3.2 リアルタイム PCR の直線性、増幅効率及び特異性の検証

リュウホウ原種種子の抽出 DNA 溶液を滅菌水で希釈し、鋳型 DNA が 1 ウェルあたり 0.1、0.5、2.5、12.5、25 ng になるように反応液に添加して 3 ウェル併行でリアルタイム PCR を行った。解析して得られた Ct 値を縦軸に、鋳型 DNA 量の常用対数を横軸にプロットして作成した検量線を図 2 に示す。また、検量線の傾き、相関係数 ( $R^2$ ) 及び増幅効率を表 3 に示す。

FuN 及び Gm14C とともに検量線の相関係数 ( $R^2$ ) は 0.99 以上であり、直線性は良好であった。

増幅効率は、FuN は 98.6 %、Gm14C は 99.7 % であり、理論値の 100 % にかなり近い値であった。

また、フクユタカ原種種子の抽出 DNA (12.5 ng) を鋳型とした場合は、Gm14C ではリュウホウ原種種子と同様の Ct 値が得られたが、FuN では増幅曲線が得られなかったことから、FuN 用プライマーの特異性を確認できた (データ省略)。

なお、本研究で採用した SYBR Green を用いた検出系では、測定値が非特異的な増幅の影響を受ける可能性があるため、リアルタイム PCR 後に融解曲線解析を行い、非特異的な増幅が起きていないことを確認することとした。本研究で設計した検出系では、融解曲線解析において単一のピークのみが得られ、非特異的な増幅は起きていないことが確認されている (データ省略)。

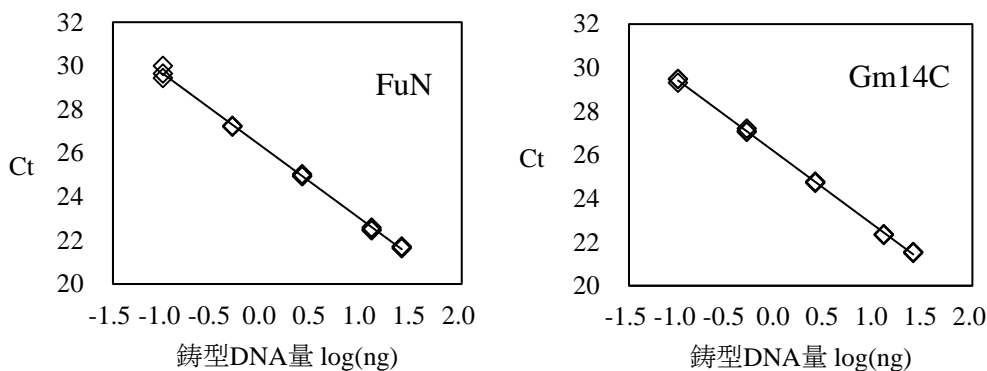


図 2 異品種型種子の抽出 DNA の希釈系列による検量線

リュウホウ種子から抽出した DNA の希釈系列を用いて、FuN 及び Gm14C のリアルタイム PCR を行い、得られた Ct 値から検量線を作成した。

表 3 PCR の増幅効率等

	FuN	Gm14C
検量線の傾き	-3.36	-3.33
検量線の相関係数 ( $R^2$ )	0.998	0.999
増幅効率	98.6 %	99.7 %

### 3.3 豆腐を用いた推定混入率の検証

DNA 希釈系列により増幅効率が理論値に近いことや非特異的な増幅が起きていないこと等を確認できたため、豆腐試料における推定混入率の検証を行った。まず、リアルタイム PCR により、表 1 に示した豆腐の抽出 DNA 溶液を水で希釈して、鋳型 DNA が 1 ウェルあたり 12.5 ng になるように反応液に添加して 3 ウェル併行で測定を行った。増幅曲線の例を図 3 に示す。推定混入率

の算出は、3 ウェルの Ct 値の平均値を用いて  $\Delta\Delta Ct$  法により行った（下式参照）。なお、異品種 100% である  $\Delta\Delta Ct$  算出の基準試料には、エンレイのみを用いて作製した豆腐（試料：EN100）を用いた。また、対象試料の FuN から増幅曲線が得られない場合は異品種混入率 0% とした。この方法による推定混入率と試料作製時の異品種混合率は、異品種混合率が高くなるにつれて差が大きくなるものの一定の相関を示した（表 4）。また、供試した 4 種の異品種では、混合した品種の違いに関わらず概ね同様の推定混入率が得られた（表 4）。

（ $\Delta\Delta Ct$  法による推定混入率の算出方法）

1. 対象試料と基準試料のそれぞれについて  $\Delta Ct$  を計算する。

$$\Delta Ct = Ct_{FuN} - Ct_{Gm14C}$$

$Ct_{FuN}$  : 異品種型検出の Ct 値 (3 ウェルの平均値)

$Ct_{Gm14C}$  : 共通配列検出の Ct 値 (3 ウェルの平均値)

2.  $\Delta\Delta Ct$  を計算する。

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{対象試料}} - \Delta Ct_{\text{基準試料}}$$

3. 対象試料の推定混入率を計算する。

$$\text{推定混入率 (\%)} = 100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

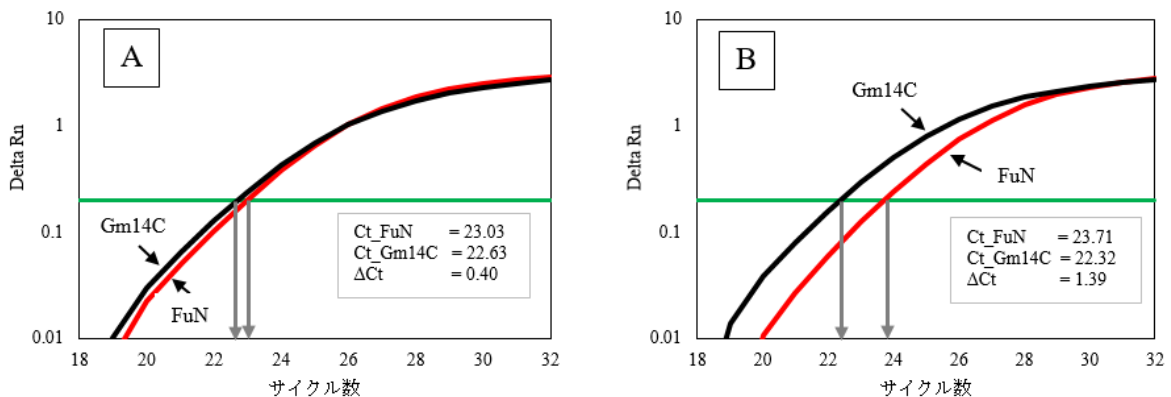


図 3 リアルタイム PCR による増幅曲線

A : 「エンレイ」100% の豆腐試料、B : 「フクユタカ」と「エンレイ」の混合豆腐試料（エンレイ 50%）

表 4 EN100 を基準試料とした  $\Delta\Delta Ct$  法による豆腐試料の推定混入率

異品種 混合率	エンレイ混合豆腐		ユキホマレ混合豆腐		里のほほえみ混合豆腐		おおすず混合豆腐	
	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率
0 %	FU*	0 %*						
10 %	EN10	11.8 %	YK10	10.7 %	SH10	10.1 %	OS10	11.2 %
30 %	EN30	33.3 %	YK30	33.7 %	SH30	31.7 %	OS30	36.7 %
50 %	EN50	52.5 %	YK50	57.1 %	SH50	56.7 %	OS50	63.1 %

\*異品種混合率 0% の試料（フクユタカ 100% 試料 FU）の結果は「エンレイ混合豆腐」の欄に記載した。

次に、デジタル PCR による推定混入率の検証を行った。リアルタイム PCR の場合と同じ抽出 DNA 溶液を用いて、既報<sup>2)</sup>に準拠してデジタル PCR で測定し解析した結果を表 5 に示す。既報と同様に、推定混入率と試料作製時の異品種混合率は高い相関を示した。また、供試した 4 種の異

品種では、混合した品種の違いにかかわらず同様の推定混入率が得られた。特に異品種 50%混合試料においては、リアルタイム PCR による結果と比較して、異品種混合率により近い値が得られた。また、基準試料を用いることなく混入率を正確に推定できるという、デジタル PCR の有効性を改めて確認できた。

表 5 デジタル PCR を用いた絶対定量法による豆腐試料の推定混入率

異品種 混合率	エンレイ混合豆腐		ユキホマレ混合豆腐		里のほほえみ混合豆腐		おおすず混合豆腐	
	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率
10%	EN10	11.9%	YK10	10.6%	SH10	9.5%	OS10	9.4%
30%	EN30	32.9%	YK30	28.9%	SH30	28.3%	OS30	30.7%
50%	EN50	51.2%	YK50	51.0%	SH50	47.1%	OS50	51.1%

### 3.4 市販の豆腐を標準試料として用いることの検証

リアルタイム PCR による  $\Delta\Delta Ct$  法では基準試料が必須となる。本分析法の検証では、基準試料にはフクユタカを含まないことを確認した豆腐を用いたが、このような豆腐を検査機関で自ら作製することは煩雑であると考えられる。そこで、「ユキホマレ」等、異品種型ダイズのみを使用した旨を表示している市販の豆腐を基準試料として用いることができるかどうかを検証した。まず、フクユタカ型ダイズを特異的に検出するプライマー（表 6）を作製し、これを用いて本研究と同様のリアルタイム PCR を行い、この豆腐からフクユタカが検出されないことを確認した。次に、この豆腐を基準試料として表 1 の豆腐の異品種混入率を推定した結果、エンレイのみで我々が作製した豆腐（EN100）を基準試料とした場合と同様に推定できることが明らかとなった（表 7）。

以上より、フクユタカ型が検出されない市販の豆腐を基準試料として用いることが可能であると考えられた。

表 6 フクユタカ型ダイズを特異的に検出するプライマー

検出する系	プライマー名	向き	配列 (5'-3')	増幅長 (bp)
フクユタカ型	FuP-F	フォワード	GAATATGAATTCATCCAAAACATTGTGC	51
	FuP-R	リバース	GGTACAATGGCGATGGCTTC	

表 7 市販豆腐を基準試料とした  $\Delta\Delta Ct$  法による豆腐試料の推定混入率

異品種 混合率	エンレイ混合豆腐		ユキホマレ混合豆腐		里のほほえみ混合豆腐		おおすず混合豆腐	
	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率
0%	FU*	0%*						
5%	EN5	4.0%						
10%	EN10	11.8%	YK10	9.4%	SH10	8.4%	OS10	8.5%
30%	EN30	31.4%						
50%	EN50	48.3%						
100%	EN100	99.2%						

\*異品種混合率 0% の試料（フクユタカ 100% 試料 FU）の結果は「エンレイ混合豆腐」の欄に記載した。

#### 4. まとめ

原料ダイズに「フクユタカ」のみを使用している旨が表示された豆腐について、リアルタイム PCR を用いてフクユタカ型以外の品種の混入割合を推定する検査方法の開発を行った。デジタル PCR によるフクユタカ判別方法<sup>2)</sup>と同様の DNA マーカーを用いて、リアルタイム PCR による測定に適した検出系及びプライマーを設計した。フクユタカ型以外の品種で特異的に増幅する PCR と、全ての品種で増幅する PCR を同時に行い、 $\Delta\Delta Ct$  法により推定混入率を算出した結果、推定混入率と異品種混合率は一定の相関を示した。また、供試した 4 種の異品種では、混合した品種の違いにかかわらず概ね同様に推定できることが明らかになった。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、DNA マーカーに係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、ダイズの原種種子をご提供くださいました福岡県農林業総合試験場及び山形県農業総合研究センターの皆様、並びに大豆の種子を提供くださいました全国農業協同組合連合会青森県本部及び JA 庄内みどりの皆様に心よりお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 石原敏史, 岸根雅宏, 高嶋康晴, 豊田正俊, 澤田桂子, 井伊悠介, 小岩智宏: 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, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **42**,17-23(2018)
- 2) 岸根雅宏, 岡崎法子, 石原敏史, 加賀秋人, 橘田和美: デジタル PCR を用いたダイズおよびその加工品の定量的品種判別法の開発, 日本食品科学工学会誌, **66**(9),341-345(2019)
- 3) 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法, 消費者庁
- 4) 川瀬眞市朗, 猿田正恭, 菊池彰夫, 高田吉丈, 岡部昭典: 豆腐加工適性評価のための少量大豆子実による豆腐物性測定手法, 近畿中国四国農業研究センター2010年成果情報 (2010)
- 5) 令和元年度大豆の農産物検査結果, 令和2年3月31日現在(確定値), 農林水産省
- 6) Glycine max Wm82.a2.v1, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> (2020年10月21日確認)