DNA 分析による大豆加工品の原料原産地判別法の検討

豊田　正俊[1]，山﨑　実緒[2]，岸根　雅宏[3]
TOYODA Masatoshi, YAMAZAKI Mio, KISHINE Masahiro

要約

大豆加工品の原料となる食用大豆は国内需要量の多くを輸入大豆に依存しており、原料原産地表示の科学的検証法開発が望まれている。そこで本研究では、大豆の原産地表示が「国産」である豆腐を対象として、北米産大豆の混入割合推定方法を確立するために、リアルタイム PCR を用いた定量的原料原産地判別法を検討した。*GmTfl1* 遺伝子の第 1 イントロンに存在する計 6 塩基の挿入･欠失により大豆を a 型と b 型に分類する DNA マーカーを利用して､a 型に特異的な配列と、両者に共通する配列を同時に増幅することで a 型大豆の相対定量を行った。その結果、入手が容易な市販豆腐を相対定量法の標準試料として用いて、北米産に多く見られる a 型大豆の混入割合を検量線法及び ΔΔCt 法のどちらでも概ね推定することに成功した。

1.　はじめに

日本の食生活に欠かせない豆腐、納豆、みそ、しょうゆ等の大豆加工品の原料となる食用大豆は、国内需要量の多くを輸入大豆に依存している。平成 28 年度～令和 2 年度における食用大豆の国内需要量は年間平均 101.3 万トンであった。一方、同期間に食品向けに用いられた国産大豆の量は年間平均 22.0 万トンにすぎなかった[1)]。また、国産大豆の取引価格は、例年、輸入大豆より高値で推移し、気象災害の影響等による生産量の減少に伴い価格が大きく変動することもある[1)]。

このような状況の中、豆腐や納豆を主として、「国産大豆使用」等の表示をしている大豆加工品が市場で多く見られる。また、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）において名称等のほか、国内で製造したものは原料原産地の表示が義務付けられ、原料原産地については原則、国産原料を使用した商品にあっては国産である旨を、輸入原料を使用した商品にあっては原産国名を表示しなければならない。

加工食品の原料原産地表示の真正性を確認するためには科学的検証法が必要である。そのため、農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）では、DNA 分析、元素組成分析、炭素安定同位体比分析、ストロンチウム安定同位体比分析等の手法を用いた検証法を報告している[2~5)]。大豆加工品についても、原料原産地表示の真正性を確認する科学的検証法が必要とされている。

これまでに、大豆の産地判別法として、FAMIC と国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の共同研究により、大豆の無限／有限伸育を決める遺伝子である *GmTfl1* の第 1 イントロンに存在する挿入・欠失を DNA マーカーとする方法が報告されている[6)]。この方法は、DNA 分析により大豆品種の国産・外国産（米国産及びカナダ産）を推定できる手法である。

[1] 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部横浜事務所
[2] 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部
[3] 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

大豆加工品の原料原産地判別に当たっては、外国産大豆の混入割合を推定できる手法が望まれている。混入割合を推定することで、外国産大豆が意図的に混入されたのか否か等を検証する際の判断材料となり得る。しかしながら、既報 [6)]は従来のエンドポイント PCR により行われており、大豆加工品への適用や a 型大豆の混入割合推定は検討されていない。

そこで本研究においては、フクユタカ豆腐の異品種混入割合推定法 [7)]を参考として、リアルタイム PCR を用いることで大豆加工品の定量的原料原産地判別法の確立を目指すこととした。また、標準試料には、入手が容易な市販の加工食品を用いることとした。

本研究では豆腐を大豆加工品のモデルとし、大豆の原産地表示が「国産」である豆腐を対象に検量線法及び ΔΔCt 法による検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1　試料及び DNA 抽出

国産大豆は、農業協同組合から入手した「エンレイ（新潟県）」、「おおすず（青森県）」、「里のほほえみ（栃木県）」、「とよみづき（北海道）」、「トヨムスメ（北海道）」、「フクユタカ（佐賀県）」、「ユキホマレ（北海道）」及び「リュウホウ（岩手県）」を用いた。

米国産及びカナダ産（以下「北米産」という。）大豆は、商社から入手した 8 試料を用いた。米国産は、イリノイ州産、インディアナ州産、オハイオ州産、ミシガン州産及びミネソタ州産各 1 試料を用いた。カナダ産は、オンタリオ州産 2 試料及びケベック州産 1 試料を用いた。

模擬混入豆乳試料及び模擬混入豆腐試料は、川瀬ら [8)]の手法に準拠して作製した。模擬混入豆乳試料は、原料中の北米産大豆を穀粒の重量比で 50 %となるように混合して作製した（表 1）。国産大豆と北米産大豆の両者を原料として用いた模擬混入豆腐試料は、原料中の北米産大豆を穀粒の重量比で 5 %、10 %、50 %となるように混合して作製した（表 2）。なお、作製に用いる穀粒重量は計 12 g とした。

市販豆腐試料は、原料原産地表示が「カナダ又はアメリカ」と記載された「もめん豆腐」1 試料を小売店で購入した。

大豆試料の DNA 抽出には、GM quicker（ニッポンジーン）又は DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いた。このうち DNeasy Plant Mini Kit による抽出は、消費者庁の遺伝子組換え農産物の検査法「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」[9)]に従って行った。GM quicker による抽出は同検査法を一部改変して行った。豆乳試料及び豆腐試料の 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。市販豆腐試料以外の抽出 DNA 溶液は、滅菌水で 10 ng/μL に希釈したものをリアルタイム PCR の鋳型 DNA とした。市販豆腐試料の抽出 DNA 溶液は、滅菌水でまず 16 ng/μL に調製し、さらにこれを滅菌水で 4 倍（4 ng/μL）、16 倍（1 ng/μL）、64 倍（0.25 ng/μL）に希釈した。この希釈系列をリアルタイム PCR における検量線作成用の鋳型 DNA とした。

2.2　リアルタイム PCR

プライマーは、表 3 に示すものを受託会社に発注して合成した。すべて逆相カラム精製品を用いた。

PCR 反応液は全量 20 μL とし、10 μL の PowerUP™ SYBR® Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific）、1 μL の 20×プライマーMix（表 3 参照）及び 9 μL の鋳型 DNA を混合した。PCR 反応液は 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。なお、20×プライマー

Mix は、フォワード及びリバースプライマーの終濃度が 0.5 μmol/L となるように調製した。

リアルタイム PCR 装置は、Applied Biosystems™ 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 °C 2 分及び最初の熱変性として 95 °C 2 分で保持後、95 °C 15 秒、60 °C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で行った。PCR 終了後、Ct 値（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）をウェルごとに算出した。蛍光強度の閾値（Threshold line）は 0.2 に設定した。また、本方法は SYBR Green 色素を用いたインターカレーター法であるため、PCR 後には融解曲線分析を行い、曲線の形状や Tm 値（加熱により 2 本鎖 DNA の半分が 1 本鎖に解離するときの温度）から、プライマーダイマー等の非特異的な増幅産物に由来する蛍光を検出していないかどうかを確認した。

表 1 作製した模擬混入豆乳試料

試料名	原料大豆（重量比）[a]			
	国産（b 型）		北米産（a 型）	
TN-1	とよみづき	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-2	ユキホマレ	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-3	リュウホウ	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-4	フクユタカ	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-5	おおすず	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-6	トヨムスメ	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-7	里のほほえみ	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-8	エンレイ	50 %	カナダ（オンタリオ州）1	50 %
TN-9	エンレイ	50 %	米国（インディアナ州）	50 %
TN-10	エンレイ	50 %	米国（オハイオ州）	50 %
TN-11	エンレイ	50 %	米国（ミシガン州）	50 %
TN-12	エンレイ	50 %	米国（イリノイ州）	50 %
TN-13	エンレイ	50 %	米国（ミネソタ州）	50 %
TN-14	エンレイ	50 %	カナダ（オンタリオ州）2	50 %
TN-15	エンレイ	50 %	カナダ（ケベック州）	50 %

a) 国産試料は品種名を示す。北米産試料は産地名及び枝番を示す。

表 2 作製した模擬混入豆腐試料

試料名	原料大豆（重量比）[a]			
	国産（b 型）		北米産（a 型）	
TF0	フクユタカ	100 %	−	
TF5-1	エンレイ	95 %	カナダ（ケベック州）	5 %
TF5-2	リュウホウ	95 %	カナダ（オンタリオ州）2	5 %
TF10-1	エンレイ	90 %	カナダ（ケベック州）	10 %
TF10-2	リュウホウ	90 %	カナダ（オンタリオ州）2	10 %
TF50-1	エンレイ	50 %	カナダ（ケベック州）	50 %
TF50-2	フクユタカ	50 %	米国（ミネソタ州）	50 %
TF50-3	里のほほえみ	50 %	米国（イリノイ州）	50 %
TF50-4	ユキホマレ	50 %	米国（インディアナ州）	50 %
TF50-5	リュウホウ	50 %	カナダ（オンタリオ州）2	50 %
TF100	−		米国（イリノイ州）	100 %

a) 国産試料は品種名を示す。北米産試料は産地名及び枝番を示す。

表 3 使用したプライマー

検知する系	プライマー名	配列（5' → 3'）	終濃度（μmol/L）	増幅長（bp）
a 型	TFL1-a-F	GAAAAAACTTAAGCTGTTGCCAGTG	0.5	68
	TFL1-R	GACATACCGTGTGACCATGATTAC	0.5	
b 型	TFL1-b-F	AAGAGAAGATTTTTTTTGCCAGTGTG	0.5	68
	TFL1-R	GACATACCGTGTGACCATGATTAC	0.5	
共通配列	Gm-C-F	CACACGGTATGTCTCTTTTATTGGAG	0.5	74
	Gm-C-R	CCGAAAAAGGGGGACATTTGC	0.5	

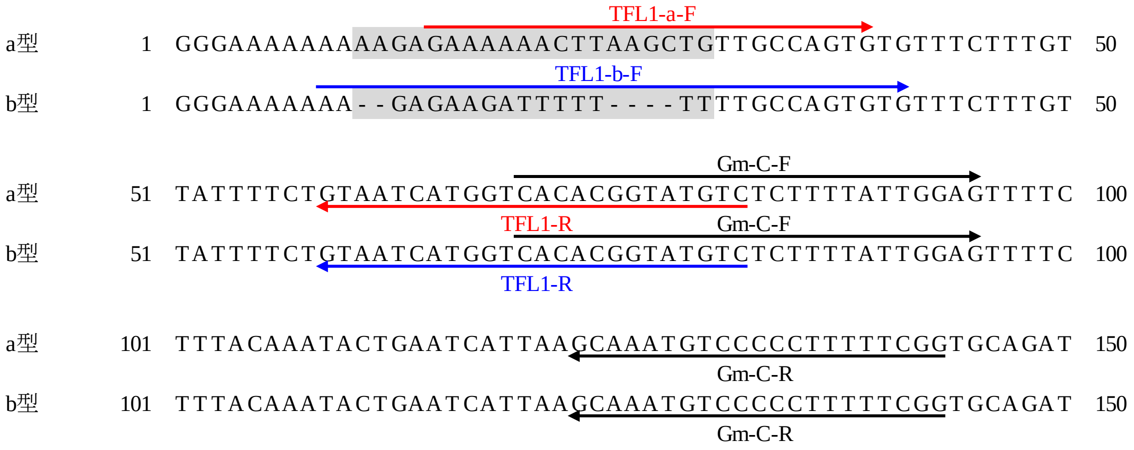


図 1 *GmTfl1* 遺伝子第 1 イントロンの挿入・欠失付近の部分配列とプライマーの設計

3.　結果及び考察

3.1　検知系の設計

判別に用いる DNA マーカーには、既報 [6] と同様に大豆の *GmTfl1* 遺伝子の第 1 イントロンに存在する挿入・欠失部位を利用した。すなわち、第 1 イントロンに計 6 塩基の欠失がない遺伝子型を a 型、欠失がある遺伝子型を b 型とした。なお、既報 [6] において、国産大豆の主要品種はほぼ全てが b 型であり、北米産大豆の多くは a 型であることが示されている。

リアルタイム PCR による検知系には、a 型を検知する系（以下「a 型検知」という。）、b 型を検知する系（以下「b 型検知」という。）、両者の共通配列（リファレンス配列）を検知する系（以下「共通配列検知」という。）の 3 つの系を構築することとした。そこで、*GmTfl1* 遺伝子の第 1 イントロンの配列情報（図 1）に基づいて、表 3 に示すプライマーを設計した。a 型検知においては、DNA マーカーの挿入領域上にフォワードプライマーを設計した。同様に、b 型検知においては、DNA マーカーの欠失領域上にフォワードプライマーを設計した。リバースプライマーは両検知系において共通のものを設計した。

共通配列検知用のプライマーは、フクユタカ豆腐の異品種混入割合推定法 [7] を参考として、挿入・欠失領域の直後に設計した。共通配列検知は、リアルタイム PCR において相対定量を行う場合に必須となるリファレンス遺伝子の検知に相当するものである。なお、加工食品では製造時の加熱や加圧等によって DNA の断片化がランダムに起こるため [10]、本研究では PCR 産物の増幅長を 75 bp 以下とすることで DNA 断片化の影響を抑えた。

これらのプライマーと、既報[6)]の方法により遺伝子型を確認した大豆の抽出 DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR を行い、プライマーの特異性を確認した。その結果、a 型の大豆は、a 型検知において指数関数的な増幅が見られ、b 型検知では増幅が見られない又は PCR 終盤（Ct 値 35 以上）に増幅が見られた。一方、b 型の大豆は、b 型検知において指数関数的な増幅が見られ、a 型検知では増幅が見られない又は PCR 終盤（Ct 値 35 以上）に増幅が見られた。さらに、共通配列検知においては、a 型の大豆と b 型の大豆の両者において指数関数的な増幅が見られた。また、リアルタイム PCR 後の融解曲線分析の結果、いずれの検知系においても、増幅の見られた試料については単一のピークのみが得られた。さらに、試料間及びウェル間の Tm 値の差異は 1.0 ℃ 未満であった。なお、Ct 値 35 は、後述する検量線法では検量線の範囲外となる。

以上の結果から、Ct 値が 35 以上の場合は不検知、35 未満の場合を検知とすることで設計した各プライマーの特異性に問題はなく、プライマーダイマー等の非特異的な増幅は起きていないと考えられた。

3.2　北米産大豆試料の遺伝子型確認

本研究に供試した北米産大豆試料（表 1）の遺伝子型が a 型のみであるかどうかを検証した。既報[6)]において北米産大豆の多くは a 型の遺伝子型であったが、b 型の大豆も少数確認されている（57 試料中 1 試料）ことから、3.1 で設計した a 型検知及び b 型検知を用いて遺伝子型を確認した。この確認においては大豆試料から GM quicker を用いて DNA を抽出し、両検知系ともに Ct 値が 35 未満の場合を「検知」として判定した。

その結果、本研究に供試した北米産大豆試料は、全ての試料において a 型のみを検知し、b 型は検知しなかった。そのため、これらの試料は模擬混入豆乳試料及び模擬混入豆腐試料の a 型大豆原料として使用できると判断した。

3.3　市販豆腐を用いた標準試料の検証

検査現場において、標準試料を容易に入手できることは重要である。そこで、フクユタカ豆腐の異品種混入割合推定法[7)]を参考に、市販豆腐を標準試料として使用できるかどうかを検証した。

原料原産地が「カナダ又はアメリカ」と表示された市販豆腐試料について、DNA を抽出し、a 型検知及び b 型検知の両検知系を用いて遺伝子型を確認した結果、a 型のみを検知した。このため、当該市販豆腐試料は a 型 100 %であると判断し、以下の検証を行った。

この市販豆腐試料の抽出 DNA 溶液の希釈系列（表 4）を用いて、a 型検知及び共通配列検知の検量線を作成し、直線性及び PCR の増幅率を検証した。検量線は、縦軸を Ct 値、横軸を相対 DNA 量の常用対数として作成した（図 2）。相対 DNA 量は、希釈系列のうち濃度の低いものから順に 1、4、16、64 とした。

その結果、直線性及び PCR の増幅率ともに問題ないことが確認された。a 型検知及び共通配列検知ともに検量線の相関係数（R^2）は 0.999 であった（表 5）。検量線の傾きから計算される PCR の増幅率は、a 型検知では 1.975、共通配列検知では 1.999 であり、いずれも理論値の 2 に近い値であるとともに、両検知系の増幅率はほぼ同じであることが示された（表 5）。一般に、リアルタイム PCR を用いて相対定量を行う方法には、検量線法と ΔΔCt 法がある。ΔΔCt 法は、2 つの試料の増幅曲線を比較し、両者の Ct 値の差が 1 の場合、理論的には初期鋳型量に 2 倍量の差（Ct 値の差が n の場合、2^n 倍量の差）があることを利用した方法である。ΔΔCt 法は検量線を引く必要がなく効率のよい測定方法であるが、PCR の増幅率が 2 に限りなく近い必要がある。今回の結果は、ターゲット（a 型検知）とリファレンス（共通配列検知）の増幅率が 2 に近く、増幅率が同等であ

るため、どちらの方法でも市販豆腐試料を標準豆腐試料として a 型の相対定量が可能であることが示唆された。

表 4 豆腐抽出 DNA の希釈系列

	溶液 1	溶液 2	溶液 3	溶液 4
DNA 濃度	0.25 ng/µL	1 ng/µL	4 ng/µL	16 ng/µL
相対 DNA 量	1	4	16	64
相対 DNA 量（$\log_{10}$）	0	0.602	1.204	1.806

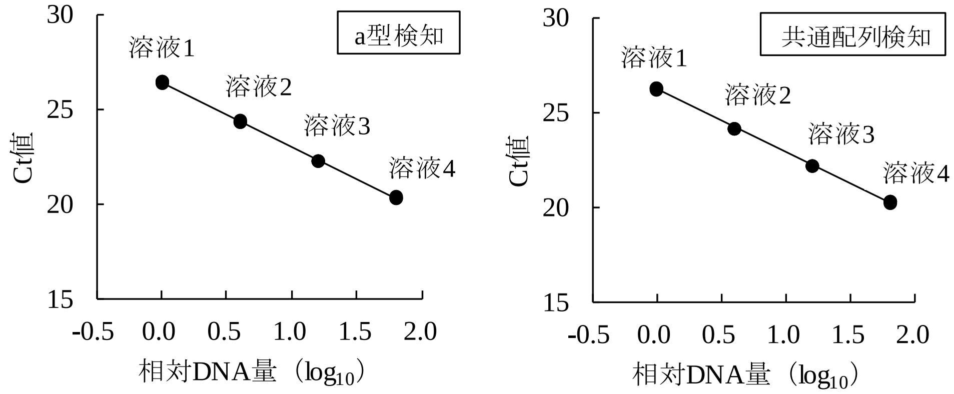


図 2 豆腐抽出 DNA の希釈系列による検量線

表 5 PCR の増幅率等

	a 型検知	共通配列検知
検量線の傾き	-3.38	-3.33
検量線の相関係数（R^2）	0.999	0.999
PCR の増幅率	1.975	1.999

3.4　a 型大豆の推定混入率の検証

市販豆腐を標準豆腐試料として用いて相対定量を行える可能性が示されたため、模擬混入豆乳試料（表 1）及び模擬混入豆腐試料（表 2）を作製し、a 型大豆推定混入率の検証を行った。

推定混入率は、試料中の *GmTfl1* 遺伝子に占める a 型の割合から求めた。具体的には、下式の通り、①検量線を用いた方法及び②ΔΔCt 法で算出した。ΔΔCt 法の計算に当たっては、3 ウェルの Ct 値の平均値を用いた。また、対象試料の a 型検知から増幅曲線が得られない場合は、推定混入率を 0 %とした。

（検量線法による推定混入率の算出方法）

1. 標準試料（0.25 ng/µL、1 ng/µL、4 ng/µL、16 ng/µL）の測定値を用いて検量線を作成する（3.3 を参照）。
2. 検量線から対象試料の a 型検知と共通配列検知のそれぞれについて相対 DNA 量を計算する。

3. 対象試料の推定混入率を計算する。
   推定混入率（%）= 100 ×（a 型検知の相対 DNA 量 / 共通配列検知の相対 DNA 量）

（ΔΔCt 法による推定混入率の算出方法）

1. 標準試料（16 ng/μL）と対象試料のそれぞれについて ΔCt を計算する。
   ΔCt = Ct_a 型検知－Ct_共通配列検知
2. ΔΔCt を計算する。
   ΔΔCt = ΔCt_対象試料－ΔCt_標準試料
3. 対象試料の推定混入率を計算する。
   推定混入率（%）= $100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$

この方法で算出される推定混入率と、実際の大豆の重量比で計算した混入率を比較するため、まず、模擬混入豆乳試料による予備検証を行った。原料中の北米産大豆を穀粒の重量比で 50 %となるように混合して作製した試料（表 1）と上述した標準試料を用いて、混合する品種・試料の違いによる推定混入率への影響がどの程度あるのかを検証した。

b 型大豆に国産 8 品種を用い、a 型大豆に同一試料（カナダ・オンタリオ州産 1）を用いて作製した模擬混入豆乳試料の推定混入率を表 6 に示す。検量線法で算出した推定混入率の平均値は 52.0 %、最小値は 47.3 %、最大値は 56.5 %であった。ΔΔCt 法で算出した推定混入率の平均値は 52.7 %、最小値は 47.9 %、最大値は 57.3 %であった。

これとは逆に、b 型大豆に国産 1 品種（エンレイ）を用い、a 型大豆に北米産 8 試料を用いて作製した模擬混入豆乳試料の推定混入率を表 7 に示す。検量線法で算出した推定混入率の平均値は 50.0 %、最小値は 45.1 %、最大値は 52.6 %であった。ΔΔCt 法で算出した推定混入率の平均値は 49.5 %、最小値は 44.5 %、最大値は 52.2 %であった。

このように、混合する品種・試料によって推定混入率に若干の差があるものの、概ね模擬混入豆乳試料作製時の混合率である 50 %に近い値が得られた。また、検量線法と ΔΔCt 法のどちらを用いても同様な値が得られた。このことから、今回検討した方法は、原料大豆の品種や試料の違いに関わらず、重量比による混入率を推定するために有用であることが示唆された。また今回検討した市販豆腐試料は標準豆腐試料として用いることが可能と判断した。

模擬混入豆乳試料による予備検討で良好な結果が得られたため、次に、模擬混入豆腐試料における推定混入率を検証した。表 2 に示した模擬混入豆腐試料と標準試料を用いてリアルタイム PCR を行い、a 型大豆の推定混入率を計算した結果を表 8 に示す。増幅曲線の例を図 3、PCR 後の融解曲線分析の例を図 4 に示す。

いずれの試料においても、推定混入率と試料作製時の a 型大豆混合率は近い値を示し、本研究で検討した方法が有効であることが示された。また、模擬混入豆乳試料の場合と同様に、検量線法と ΔΔCt 法のどちらを用いても同様な値が得られた。ΔΔCt 法は、検量線作成のための DNA 希釈系列を測定する必要がないため、検査の省力化の観点からも有効である。

本研究では豆腐を対象としたが、今回設計した検知系を用いることで、他の大豆加工品を対象とした a 型大豆混入率の推定も可能となると考えられる。加工食品は加工方法によって DNA の断片化程度が異なるが [10]、今回設計した検知系は、a 型検知と共通配列検知の増幅場所が極めて近いこと、増幅長が 75 bp 以下と短いことから、他の品目においても有効であると考えられる。

表 6 a 型大豆を 50 %混合した模擬混入豆乳試料の推定混入率（b 型大豆に国産 8 品種を使用）

a 型大豆混合率	試料名	b 型の原料大豆 [a]	推定混入率	
			検量線法	ΔΔCt 法
50 %	TN-1	とよみづき	53.0 %	53.7 %
50 %	TN-2	ユキホマレ	53.7 %	54.5 %
50 %	TN-3	リュウホウ	54.9 %	55.6 %
50 %	TN-4	フクユタカ	47.7 %	48.2 %
50 %	TN-5	おおすず	51.5 %	52.1 %
50 %	TN-6	トヨムスメ	56.5 %	57.3 %
50 %	TN-7	里のほほえみ	51.5 %	52.1 %
50 %	TN-8	エンレイ	47.3 %	47.9 %

a)　a 型大豆には、カナダ・オンタリオ州産 1 を用いた。

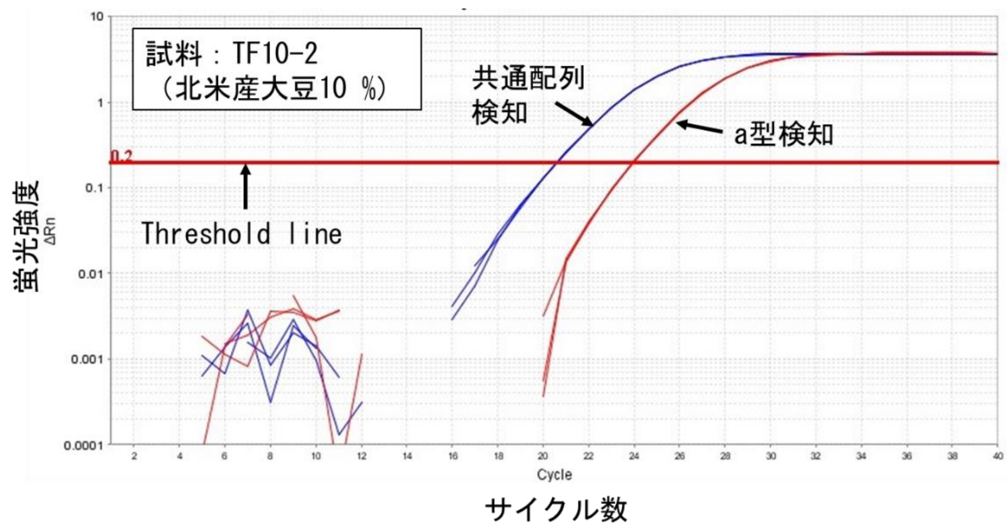
表 7 a 型大豆を 50 %混合した模擬混入豆乳試料の推定混入率（a 型大豆に北米産 8 試料を使用）

a 型大豆混合率	試料名	a 型の原料大豆 [a]	推定混入率	
			検量線法	ΔΔCt 法
50 %	TN-8	カナダ（オンタリオ州産）1	50.5 %[b]	50.0 %[b]
50 %	TN-9	米国（インディアナ州）	51.7 %	51.3 %
50 %	TN-10	米国（オハイオ州）	51.0 %	50.5 %
50 %	TN-11	米国（ミシガン州）	51.8 %	51.3 %
50 %	TN-12	米国（イリノイ州）	50.6 %	50.0 %
50 %	TN-13	米国（ミネソタ州）	46.6 %	46.1 %
50 %	TN-14	カナダ（オンタリオ州）2	52.6 %	52.2 %
50 %	TN-15	カナダ（ケベック州）	45.1 %	44.5 %

a)　b 型大豆には、エンレイを用いた。 b) 表 6 の TN-8 とは別の日に測定した。抽出 DNA 溶液は同一である。

表 8 模擬混入豆腐試料の推定混入率

a 型大豆混合率	試料名	推定混入率	
		検量線法	ΔΔCt 法
0 %	TF0	0.0 %	0.0 %
5 %	TF5-1	3.8 %	3.5 %
5 %	TF5-2	5.9 %	5.6 %
10 %	TF10-1	8.2 %	7.8 %
10 %	TF10-2	10.5 %	10.1 %
50 %	TF50-1	42.5 %	41.8 %
50 %	TF50-2	45.4 %	44.7 %
50 %	TF50-3	50.0 %	49.2 %
50 %	TF50-4	50.0 %	49.3 %
50 %	TF50-5	48.7 %	48.0 %
100 %	TF100	95.4 %	95.0 %



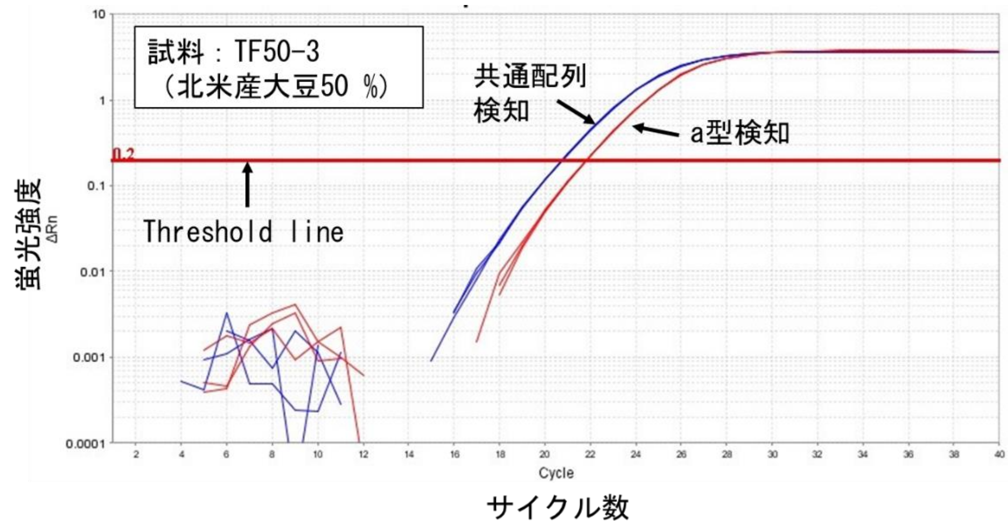


図 3 リアルタイム PCR による増幅曲線

上図：模擬混入豆腐試料 TF10-2（北米産大豆 10 %混合）

下図：模擬混入豆腐試料 TF50-3（北米産大豆 50 %混合）

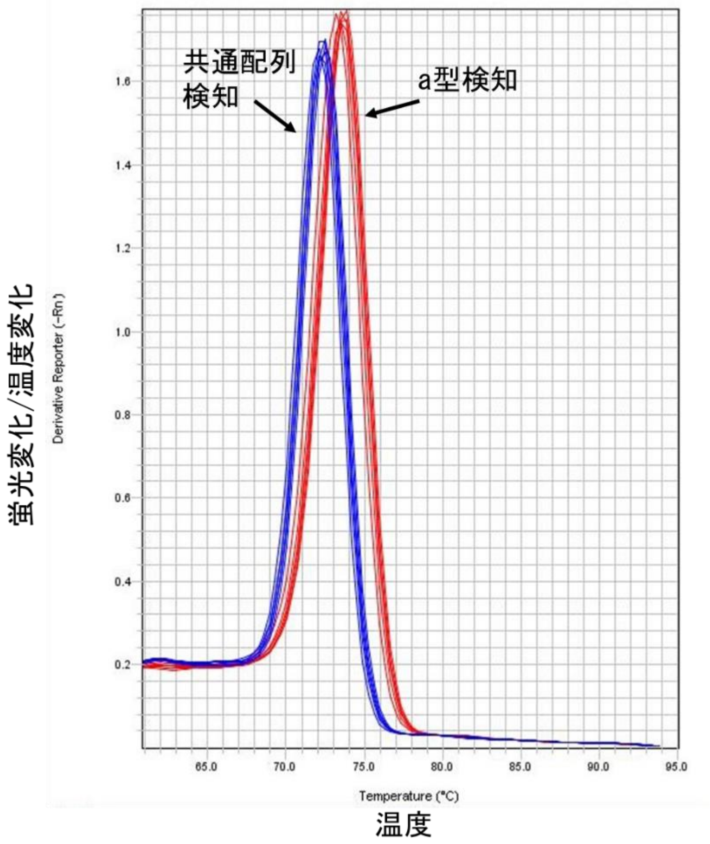


図 4 PCR 後の融解曲線分析

4. まとめ

本研究では、大豆の原産地が国産である旨表示された豆腐を対象として、北米産大豆の混入割合を推定するために、リアルタイム PCR を用いた定量的原料原産地判別法を検討した。*GmTfl1* 遺伝子の第 1 イントロンに存在する計 6 塩基の挿入・欠失により大豆を a 型と b 型に分類する DNA マーカーを利用し、a 型に特異的な配列と、両者に共通する配列を同時に増幅することで a 型大豆の相対定量を行った。その結果、入手が容易な市販豆腐を相対定量法の標準試料として用いて、北米産に多く見られる a 型大豆の混入割合を検量線法及び ΔΔCt 法のどちらでも推定することに成功した。混合する品種・試料によって推定混入率に若干の差があるものの、概ね、模擬混入豆腐試料作製時の重量比による混合率に近い値が得られた。

以上の結果から、大豆の原産地が国産である旨表示された豆腐を対象とした北米産大豆の混入割合の推定方法を確立した。

本研究では豆腐を対象としたが、今回設計した検知系及びプライマーを用いることで、他の大豆加工品を対象とした a 型大豆混入率の推定も可能となると考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料の提供にご協力いただきました農業協同組合、商社の皆様に心より御礼申し上げます。

文　献

1) 農林水産省：大豆をめぐる事情（令和4年12月版），2023-01-17，<https://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/attach/pdf/index-13.pdf>

2) 澤田桂子，井口潤，浪越充司：DNA分析によるのりの原産地判別法の検討，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**38**，16-22 (2014)

3) 高嶋康晴，松野和久：元素分析による乾燥ひじきの原料原産地判別法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**44**，1-7 (2020)

4) 寺田昌市，一色摩耶：炭素安定同位体比分析による小麦加工品の原料小麦の原産地判別法の検討，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**45**，24-32 (2021)

5) 井伊悠介，後藤祐之介，石井修人，申基澈，陀安一郎：ストロンチウム安定同位体比分析による切干大根の原料原産地判別法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**42**，1-9 (2018)

6) 石原敏史，岸根雅宏，岡崎法子，豊田正俊，澤田桂子，橘田和美：Dt1遺伝子座に基づくダイズの国産・外国産判別検査法の開発，日本食品科学工学会誌，**68**，235-241 (2021)

7) 豊田正俊，澤田桂子，足立静香，石原敏史，岸根雅宏：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，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**44**，35-41 (2020)

8) 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)

9) 消費者庁：食品表示基準について（平成27年3月30日付け消食表第139号消費者庁次長通知）別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法（最終改正2021年9月15日）」

10) Mano, J.; Nishitsuji, Y.; Kikuchi, Y.; Fukudome, S.; Hayashida, T.; Kawakami, H.; Kurimoto, Y.; Noguchi, A.; Kondo, K.; Teshima, R.; Takabatake, R.; Kitta, K.: Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR. *Food Chemistry*, **226**, 149-155 (2017).