

○ 静岡あや子、西純市、小峰愛理、竹下明子、小林宏行

株式会社生活品質科学研究所

## 背景および目的

- 海藻類はアレルギー物質を含む食品の検査方法のスクリーニング検査（ELISA法）において、非特異的吸着に起因する偽陽性反応が生じやすい。
- 海藻類は確認検査（PCR法）において、DNA抽出は可能であっても、生物分類の特性上、植物・動物DNA検出用プライマーで内在性遺伝子が増幅されないことが多い。
- 最終結果判定が「陰性」ではなく「検知不能」となり、検査結果の評価が困難である点が問題となっている。

そこで

海藻類の内在性遺伝子を網羅的に検出可能なプライマーを作成し、ELISA法による偽陽性反応に対して明確な判断を可能にすることを目的とし、検討を実施した。

## 材料および方法

**サンプル** 緑藻類・紅藻類・褐藻類のうち、過去にELISA法で偽陽性が確認された海藻類、および一般的に流通している海藻類の中から代表的なものを選択した。

分類	サンプル名	産地	これまで確認された偽陽性反応事例					
			卵	乳	小麦	そば	落花生	
緑藻類	アオサ	国産						
	アオリ	国産					●	
紅藻類	ノリ1	韓国産	●	●	●	●	●	
	ノリ2	国産	●	●	●	●	●	
褐藻類	マコブ	国産	●	●	●	●	●	
	ヒダコブ	国産	●	●	●	●	●	
	リシコブ	国産	●	●	●	●	●	
	ワカメ1	国産	●	●	●	●	●	
	ワカメ2	中国産	●	●	●	●	●	
	メカブ	国産	●	●	●	●	●	

**プライマー** 葉緑体ゲノム上のribulose 1,5-bisphosphatecarboxylase (rbcl) 遺伝子をGenBankより取得し、増幅長が同一になるよう各海藻類を検出対象とする8種4対のプライマーを作成した。

対象	名称	配列 (5'-3')	増幅長 (bp)	本検討での検出対象
緑藻類	緑藻類検出プライマー(F)	TTGTAGGTAACGTTTTTTGGTTTT	218	アオサ、アオリ
	緑藻類検出プライマー(R)	ACATTTCATAAACAGCACGTCAT		
紅藻類	紅藻類検出プライマー(F)	TTATTGGTAACGTTTTTTGGTTTT	218	ノリ
	紅藻類検出プライマー(R)	GCCTTCGTATACAACCTCTCCGTA		
褐藻類	褐藻類検出プライマー-A(F)	TTATTGGTAACGTTTTTTGGTTTT	218	コブ、ワカメ
	褐藻類検出プライマー-A(R)	ACCTTCATAAACACACGTCGTA		
	褐藻類検出プライマー-B(F)	TCATCGGTAATGATTTTGGTTTTA		
	褐藻類検出プライマー-B(R)	ACCTTCGTAAACACACGACCA		

**プライマー混合比** 同時検出を可能とするため、作成したプライマーを複数混合して使用した。

プライマー名	プライマーの種類・混合比			
	緑藻	紅藻	褐藻A	褐藻B
4対混合プライマー	1	1	1	1
2対混合プライマー	-	1	3	-

## 海藻類の検出確認

**DNA抽出**

イオン交換樹脂タイプキット法 (QIAGEN Genomic-Tip20/G使用) を用いたDNA抽出

10種すべての海藻類から、20ng/μL以上のDNAが抽出できた。

**PCR** (※1, ※2)

酵素: KOD FX Neo (TOYOBO)

プライマー:

- 植物・動物プライマー
- 各海藻類検出プライマー
- 4対混合プライマー
- 2対混合プライマー

**シーケンス解析 相同性検索**

- ダイレクトシーケンス法による解析
- BLAST検索

(※1) PCR反応液20μL中、20ng/μLのDNA溶液2μL使用 (「アレルギー物質を含む食品の検査方法について (消費表第286号)」記載濃度)  
(※2) PCR反応液20μL中、1ng/μLのDNA溶液2μL使用

## 結果① 植物・動物DNA検出用プライマーを用いた検出

**植物DNA検出用プライマー (※1)**

**動物DNA検出用プライマー (※1)**

すべての海藻類の内在性遺伝子は検出されなかった。

## 結果② 海藻類検出プライマー単独使用での検出

海藻類検出プライマー (単独使用) (※1)

緑藻類 紅藻類 褐藻類A

相同性検索

分類	サンプル名	Accession No.	生物種	遺伝子名	相同性 (%)
緑藻類	アオサ	JQ867404	アオサ	rbcl	100 (172bp/172bp)
	アオリ	KX342867	Enteromorpha prolifera	rbcl	100 (172bp/172bp)
紅藻類	ノリ1	KC517072	スピル	rbcl	100 (172bp/172bp)
	ノリ2	KC517072	Pyropia yezoensis	rbcl	100 (171bp/171bp)
褐藻類	マコブ	JQ405663	マコブ	rbcl	100 (170bp/170bp)
	ヒダコブ	AY851554	ミヤシコブ	rbcl	100 (171bp/171bp)
	リシコブ	JX442489	リシコブ	rbcl	100 (171bp/171bp)
	ワカメ1	KP298002	Saccharina ochotensis	rbcl	100 (171bp/171bp)
	ワカメ2	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)
	ワカメ2	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)
	メカブ	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)
	メカブ	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)

- 各プライマーを用いて各検出対象に対応する海藻類を検出できた。
- 各海藻類の増幅産物の塩基配列はテンプレートDNAで使用した海藻類由来のrbcl遺伝子と最も相同性が高かった。

## 結果③ 混合プライマーを用いた検出

4対混合プライマー (※1)

2対混合プライマー検出対象外であるアオサ・アオリDNAについて

- 緑藻類検出プライマーを用いた増幅産物
- 2対混合プライマーを用いた増幅産物

共通した配列

(緑藻類検出プライマーを用いた増幅産物)と(2対混合プライマーを用いた増幅産物)の配列は、プライマー結合領域を除いて100%一致していた

2対混合プライマー (※2)

相同性検索

分類	サンプル名	Accession No.	生物種	遺伝子名	相同性 (%)
緑藻類	アオサ	JQ867404	アオサ	rbcl	100 (172bp/172bp)
	アオリ	KX342867	Enteromorpha prolifera	rbcl	100 (172bp/172bp)
紅藻類	ノリ1	KC517072	スピル	rbcl	100 (172bp/172bp)
	ノリ2	KC517072	Pyropia yezoensis	rbcl	100 (171bp/171bp)
褐藻類	マコブ	JQ405663	マコブ	rbcl	100 (170bp/170bp)
	ヒダコブ	AY851554	Saccharina japonica	rbcl	100 (171bp/171bp)
	リシコブ	JX442489	リシコブ	rbcl	100 (171bp/171bp)
	ワカメ1	KP298002	Saccharina ochotensis	rbcl	100 (171bp/171bp)
	ワカメ2	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)
	ワカメ2	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)
	メカブ	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)
	メカブ	KP298002	Undaria pinnatifida	rbcl	100 (171bp/171bp)

- 4対混合プライマーでは褐藻類の一部から検出されなかった。
- 2対混合プライマーでは検出対象外の緑藻類を含め、すべての海藻類から検出された。
- 2対混合プライマーを用いた各海藻類の増幅産物の塩基配列は、結果②で得られた配列と完全に一致しており、検出対象外である緑藻類の検出も可能であることが確認できた。

## 総括

- 緑藻類、紅藻類、褐藻類をそれぞれ検出するプライマーを作成した。
- プライマー混合数を4対から2対に減らすことでPCRの反応性が向上し、検出対象外の緑藻類を含む、すべての海藻類を検出することができた。
- 紅藻類検出プライマーと褐藻類検出プライマー-Aの2対混合プライマーを用いて検出対象外である緑藻類の検出も可能であった。

紅藻類検出プライマーと褐藻類検出プライマー-Aの2対混合プライマーは広範囲の海藻類を検出可能であることが示唆された。