小麦検出用プライマーセットの開発

内野昌孝[§], 増渕菜美子, 黒澤有希子, 野口智弘*, 高野克己

東京農業大学応用生物科学部

* 東京農業大学食品加工技術センター

Specific Primer for Detection of Wheat

Masataka Uchino[§], Namiko Masubuchi, Yukiko Kurosawa,
Tomohiro Noguchi* and Katsumi Takano

Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo
University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* Food Processing Center, Tokyo University of Agriculture,
Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Because wheat contains a protein that can trigger allergies, the presence of wheat must be indicated on food products in Japan. One method for detection of wheat is by PCR. However, in the general detection method, only one primer set is used. In this study, we developed a new primer set for detection of wheat to protect against false results. Two wheat primer sets, 1 and 2, were constructed. The PCR product using set 1 showed a band around the same molecular weight not only as wheat and rye-wheat containing an allergen compound, but also rye. Two amplified DNA sequences specific to wheat and rye-wheat, using primer set 2, 800 bp and 500 bp, were cloned and the sequences were determined. Two STS primer sets, K800 and K500, were reconstructed based on these sequences. PCR conducted using these sets showed specific bands, 800 bp, 500 bp and 450 bp. These were useful for testing of food products containing wheat. In addition, our results showed that the K500 set was superior to the K800 set.

(Received Jun. 26, 2006 ; Accepted Oct. 26, 2006)

Keywords : Wheat, Detection, Primer, PCR

キーワード : 小麦, 検出, プライマー, PCR

食品の安全性に関して国はいくつかの法律を定めているが、そのうち食品衛生法は2001年に改正され、アレルギー物質を含む食品として小麦、そば、卵、乳、落花生の5品目を義務表示、20品目を推奨表示する旨が記載されている (<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/>)。この中で小麦は主食となる主要穀物の1種であり、平成15年度の国内流通は約650万トンと5品目の中で最も多く、この量から考えても表示に対する正確性は重要と考える。この検出に関し、公定法ではまず、ELISA法で確認し、陽性の場合にはさらにPCR法で確認することが明記されている。

近年、PCR法による食品の材料判別法が数多く報告されている^{1)~8)}。しかし、食品の種類や加熱履歴によりDNAの状態が異なり⁹⁾、その結果偽陰性を出す可能性が考えられる。一方、公定法による小麦のPCR検出では1プライマーセットのみ記載され擬陽性、偽陰性が懸念される。さ

らに、結果への信頼性向上を考慮すると複数のプライマーセットを用意することが望ましいと考える。そこで、本研究では新たな小麦検出用プライマーセットを開発することを目的とした。

実験方法

1. 実験材料

小麦試料として代表的な国内麦の1つであるホクシンをを用いた。また、対照として近縁で小麦アレルゲンを含有するライ小麦の他、うるち米（コシヒカリ）、雑穀類（大麦、アワ、キビ、栽培ヒエ、モロコシ、ライ麦）、系統的に離れた微生物（*Aspergillus kawachii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*）、マウス血液および大豆を用いた。

2. DNA抽出およびPCR増幅性の確認

DNA抽出および精製はGen Elute Plant Genomic DNA Kit（シグマ社）を用いた。ただし、マウス血液はフェノール・SDS法¹⁰⁾、微生物3種は、ISOPLANT（日本ジーン社）を用いて行った。DNA量および精製度の確認は紫外

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), muchino@nodai.ac.jp

部における吸光度より求め¹¹⁾、精製度 O.D. 260 nm/O.D. 280 nm が 1.5 を超えた DNA を以後の試験に用いた。なお、すべての DNA に対する PCR 増幅性は 18S rDNA 領域の増幅より確認した¹²⁾。

3. 小麦特定用プライマーを利用した小麦特異的バンドの検出

小麦特定用プライマーの検索のため、著者らの研究室で作成した穀類、微生物の特定遺伝子領域を増幅するプライマーセット、約 20 種（フォワードとリバーズ計 40 プライマー）を組み合わせて検討を行った（結果省略）。その結果、以下の 2 種類の組合せが有効と思われた。すなわち、小麦 1（フォワード：UNI2f, 5'-TGAACSTCGTGTCGTC-3', リバーズ：VIEr, 5'-AGCTTCATGTAGGCGA-3'）および小麦 2（フォワード：WHEf, 5'-AGTTCGGAAGAGATCAGACAA-3', リバーズ：GBSSf, 5'-ATCACATGGC-AAGCATCACA-3'）。なお、UNI2f, GBSSf はそれぞれ、穀類、小麦のデンブン合成遺伝子を増幅するためのユニバーサルフォワードプライマー、WHEf は小麦の同遺伝子を増幅するためのフォワードプライマー、VIEr は *Bacillus vietnemensis* 特定用リバーズプライマーとして構築されたものである。小麦の反応液は鋳型 DNA (100 ng/μl) 1 μl, 10×PCR 緩衝液 5 μl, 2.5 mM dNTP 混合液 4 μl, プライマー (20 pM/μl) 各 0.5 μl, Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5 U/μl, タカラバイオ社) 0.2 μl, 超純水 38.8 μl の計 50 μl とした。PCR 反応条件は初期変性を 94℃, 5 分行い、変性 94℃, 0.5 分, 会合 51℃, 1.0 分, 伸長 72℃, 1.5 分を 30 サイクル後, 72℃, 7 分で最終伸長反応を行った。なお, PCR 装置は Genamp 9700 (アプライドバイオシステム社) を使用した。PCR 後の増幅産物の確認はアガロースゲル電気泳動にて行った。染色はエチジウムブロマイドで行い、紫外線照射にてバンドを確認した。分子量の推定は市販の分子量マーカーを利用し、ゲルプロアナライザー (プラネトン社) にて解析した。

4. 小麦特異的バンドのクローニングおよび塩基配列の決定

小麦 2 セットで PCR 反応後確認された小麦特異的バンドを紫外線照射下で切り出し、LaboPass Gel (北海道システムサイエンス社) にて増幅産物の回収および精製を行った。精製後の増幅産物を pGEM-T Easy Vector System1 (プロメガ社) を用いてプラスミドにライゲーションし、*E. coli* JM 109 株に Micropulser (バイオラッド社) を使用し、エレクトロポレーション法にて遺伝子導入を行った。形質転換した大腸菌を培養し、新鮮菌体からアルカリ SDS 法¹¹⁾ にてプラスミドの抽出を行った。抽出プラスミド上の目的遺伝子のシーケンス反応は M13 プライマーおよび Big Dye ver. 3.1 を使用して Geneamp 9700 (アプライドバイオシステムズ社) にて行った。反応後の増幅産物を精製後、DNA オートシーケンサー (ABI 3100 Avant,

アプライドバイオシステムズ社) につけて、DNA 塩基配列を決定した。決定した塩基配列の相同性検索は BLAST および FASTA (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)¹²⁾ を利用した。

5. STS プライマーの設計と特異的 PCR 増幅性の確認

決定した塩基配列と相同性検索でスコアの高い配列情報を Clustal W を用いてアライメントし¹⁴⁾、特異配列性、GC 含量や DNA 長を考慮して STS プライマーを設計した。設計したプライマーおよび STS 化の基になったプライマーの組み合わせにより、小麦特定のための試験を行った。なお、PCR 条件を検討した結果、K800 ではアニーリング温度が 50℃, K500 では 55℃ の反応条件が適しており、前述の PCR 条件のアニーリング温度のみ変えて試験した。

6. 構築したプライマーを用いた小麦含有食品での PCR 増幅性

実験試料として食パン (内層を使用)、茹でうどん、茹でラーメン、そうめん (乾物) および小麦粉を用いた。試料を乳鉢で搗り潰した後、DNA を Gen Elute Plant Genomic DNA Kit (シグマ社) で抽出・精製した。プライマーは 5 で構築したプライマーセットを利用した。また、PCR 反応液組成や反応条件、電気泳動での増幅産物の確認は前述と同じ条件で行った。

実験結果および考察

1. 小麦特定バンドの検出

小麦 1 セットプライマーで試料の DNA を PCR 増幅し、電気泳動した結果を Fig. 1 に示した。小麦、ライ小麦およびライ麦にて 410 bp, モロコシおよび *A. kawachii* にてそれぞれ 700 bp および 500 bp のバンドを確認した。また、小麦 2 セットプライマーで試験した結果を Fig. 2 に示した。小麦、米、大麦、アワ、栽培ヒエ、モロコシ、ライ麦、および *A. kawachii* で数本のバンドが確認された。小麦とライ小麦では他の試料とは異なる 800 bp および 500 bp のバンドを確認した。

小麦のアレルギー物質は小麦だけでなく小麦とライ麦を交雑してつくられたライ小麦にも含まれている。このことから小麦およびライ小麦に特徴的なバンドの検索が重要である。小麦 1 セットでは他の試料には見られない小麦ならびにライ小麦に特徴的なバンドが確認されているが、ライ麦も同分子領域に確認できるため、この段階では小麦とライ小麦の特定が困難である。しかし、小麦 2 セットでは小麦およびライ小麦に特徴的なバンドが 2 本確認できるため、これらの 2 試料の特定には小麦 2 セットが望ましいと考える。なお、今回用いた小麦 1 セットおよび 2 セットを組み合わせることによりライ麦の特定も可能となった。

2. 小麦 2 セットによる増幅産物の塩基配列とプライマーの設計

PCR 結果から小麦の推定を容易にするには、PCR 後に小

Fig. 1 Electrophoresis of amplified DNA using WHEf-GBSSf primer set

Abbreviations : 1, Wheat ; 2, Non-glutinous rice ; 3, Barley ; 4, Foxtail millet ; 5, Proso millet ; 6, Japanese barnyard millet ; 7, Sorghum ; 8, Rye-wheat ; 9, Rye ; 10, *A. kawachii* ; 11, *S. cerevisiae* ; 12, *S. pombe* ; 13, Rat ; 14, Soybean ; M, Molecular weight marker.

Fig. 2 Electrophoresis of amplified DNA using UNI2f- VIEr primer set

Abbreviations : 1, Wheat ; 2, Non-glutinous rice ; 3, Barley ; 4, Foxtail millet ; 5, Proso millet ; 6, Japanese barnyard millet ; 7, Sorghum ; 8, Rye-wheat ; 9, Rye ; 10, *A. kawachii* ; 11, *S. cerevisiae* ; 12, *S. pombe* ; 13, Rat ; 14, Soybean ; M, Molecular weight marker.

麦およびライ小麦のみ増幅バンドが確認されるのが望ましい。前述の結果を考慮すると、小麦 2 セットで増幅した小麦特定バンドから特定プライマーについて検討した。小麦 2 セットで確認された 800 bp および 500 bp の各バンド（以下 K800, K500 とする）の塩基配列を決定した（Table 1）。なお、決定した塩基配列を相同性検索した結果（FASTA および BLAST, DNA query vs. DNA database), K800, K500 とともに高い相同性を示すものはヒットしなかった（10% 以下）。そこで、GC 含量などを考慮し、新たな STS プライマーを構築した。なお、800 bp を基にしたものは塩基配列の 5'末端側が他の登録配列と類似性が高かったため、小麦セット 2 フォワードを利用し、3'末端側のみ作成した。作成したプライマーは K800r（5'-CGTGACAGAAGGTGATGAGGCT-3'）である。また、500 bp を基にしたものはフォワードが K500f（5'-TCGTGTTTCGTCATCATCGTC-3'）でリバー스가 K500r（5'-CTTCATGTAGGCGAAACCGA-3'）である。これらのプライマーを利用して各 DNA を PCR 増幅した結果を Fig. 3 に示した。なお、K800 のフォワードは

1. K800 (UNI2f-K800r primer)

2. K500 (K500f-K500r primer)

Fig. 3 Wheat-specific bands amplified with STS primer

Abbreviations : 1, Wheat ; 2, Non-glutinous rice ; 3, Barley ; 4, Foxtail millet ; 5, Proso millet ; 6, Japanese barnyard millet ; 7, Sorghum ; 8, Rye ; 9, Rye-wheat ; 10, *A. kawachii* ; 11, *S. cerevisiae* ; 12, *S. pombe* ; 13, Rat ; 14, Soybean ; M, Molecular weight marker.

Table 1 Sequences of two wheat-specific bands amplified with UNI2f-VIEr primer sets

GGGCTATCGTCTTGGTGCCTAGCAAGAAGTGTCTGGAATACTCATGGCA
CACGATTAGTCTCGCAAAATGCGTTGTTCATCAATCACCACAACTTAGG
GATAAATATGTCTTACAATCTCCCTTTTGGTGGATTGATGACAAAG
CGGATTTGCACAAGGAAAATATACTATTAAGTAAAAGGCAAAACCCCTC
CCTCTCTATAATATAGATGGGCTCCCTAAATGTGTGCCACCTAGATG
AGCACGAATACTAGGAACAGAGCTCCCTATATTATATAGACAAGGCA
AATTTATCACTAGACAAGATAGTACAGACATAAGATAACTAAGATAGAT
AGAGTGCATATGTCTTACACCATATGGAGGATAGGTCTCGAAGGCACAA
ACCGAACAAAAGCAAACGAGGCAAAACAGGTTCAAACGACAAAGCAA
ACAAACACACCAAGCAGCAGACACAACGCAAAATCCCTACACTCTCTCCC
CTTTGGCATCGAGACGCCAAAAAGGCAGAGAGGACACCTACACACAC
GGGGTGGCTCAGGCAGAGAAGTCTGCTCCCTGCTCCTCGTCTCCTCG
TCAGACTCAGCAGGCGGGGATAGTCTCCTCAATGTCTCCTCTGAAGT
GTCCACTTGTAGCCCTGCTTTGACATCCAGGCAGCnTaCAGGTGTGATG
ACGTCTCAGACCCGCCAGACACATCCGATCCAAAGAGCCTCATCAC
TTCTGTACAGGCGGAGACTCTCTGTGATGAC

TTGAACGTCGTGTTTCGTCATCATCGTCATGGTAGTTGTGCCTGGG
TTATGTTGTAGCCGACCGTGTCTCAGGCTCTCACGGTGGATGGTT
CTTGCTTTTCATGCATTGTGCTTCACTTTTGTCTTAATCTAGGATGG
GTTGGATCTTCTTATAGTTTGGATCGATGATTCAGAGAGTCTGA
TGTGCAACTCTCCTACATATGGTTAGGAAAAAACTATGAACACTA
GGGGCAGGGTGTCAAACACTAGTGGGAAGCTTTTCTAGTCAACTG
CCCCACGTCGCTGCCTAGGCGACTCAGGCGGCCACCCATCCT
CGTCGCCGAGGGTGGTCTCCTCACTTCCCTCCCTCATCGTCATT
GTGCGATTGACGCCACCGGGGATCTGCCCTAGAGGACGATGGTG
GTGGCGAGCCATCTTCTCTCGTCTACATGCTCCGACATCCTTT
CTGATGAGGCCTCCCTATCGGTTTCGCCTACATGAAGCTA

Sequences of amplified product located at 800 bp.

Sequences of amplified product located at 500 bp.

Fig. 4 Application of wheat-specific STS primer to commercial food products

Abbreviations : 1, Bread ; 2, Noodle ; 3, Chinese noodle ; 4, Soumen ; 5, Strong flour ; 6, Cake flour, M ; Molecular weight marker.

UNI2fを使用した。K800については小麦とライ小麦にのみ800 bpの増幅産物を確認した。また、同様にK500についても小麦とライ小麦のみにバンドが見られたものの、500 bpの主バンドの他に450 bp付近にうすいバンドが確認された。なお、結果には示していないが、理論上食品中に小麦が0.01%以上含まれていれば検出ができることを確認している。

以上より、構築したプライマーセットの利用によりPCRにて小麦およびライ小麦を特定できることが明らかとなった。

3. 食品への適用

K800およびK500のプライマーセットを小麦含有食品に適用した結果をFig. 4に示した。K800については増幅バンドに差が見られるものの、すべての試料で800 bpに確認された。また、K500についても強力粉で若干バンドが薄いものの、すべての試料で濃いバンドが500 bpに、薄いバンドが450 bpに確認された。K800およびK500の電気泳動写真を比較するとK500の方が試料間で均一で明確

であるため、食品中の小麦の検出にはK500が適していると考ええる。

PCRは一部食品の材料特定の方法として、その簡便性や迅速性が優れているものの、DNAの精製度や量が不十分のために偽陰性を示す場合がある。そのため、今回のプライマーセットだけでなく、他のプライマーも併用してPCR増幅性を確認した方が良いと考える。我々はPCR増幅性の確認のために真核生物のすべてが持ち、原核生物は持たない18S rDNA領域のPCR増幅性をその目安に適しているとの報告をした¹⁵⁾。このことからK500と18S rDNA領域の両方の増幅性で小麦が食品に含まれるかを判断するのが望ましいと考える。また、食品の多くはその加工過程で加熱をするが、我々の実験からDNA自身を加熱すると120℃から130℃で分解が起こりPCR増幅できないが、食品の中心から抽出したDNAはクッキーのような加熱条件の厳しいものからでもPCR増幅することが分かった。そのため、実際に食品を検査する場合には熱履歴を考慮し、温度ができるだけかからない部分の使用が望まれる。

要 約

食品衛生法で表示義務が定められている小麦について、PCR 法における新しいプライマーセットの開発を行った。その結果、UNI2f と VIEr プライマーの組合せで、約 800 bp と 500 bp に小麦および小麦アレルゲンを含有するライ小麦に特徴的なバンドを示した。特徴バンド以外にもバンドが存在するため、検出時の判定の簡便化のために両バンドをクローニング、シークエンスを行った。決定した配列を基に STS プライマーを設計した。構築したプライマーのうち、K500 は加工食品由来 DNA で試験した際にバンドが明瞭であった。以上、本研究では新しい小麦検出用プライマーセット K500 を開発した。

文 献

- 1) Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, I., Perez-Martin, R.I., Rey-Mendez, M. and Mackie, I.M., Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food. Chem.*, **46**, 1662-1669 (1998).
- 2) Martinez, I. and Danielsdottir, A. K., Identification of marine mammal species in food products., *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 527-533 (2000).
- 3) Mihalov, J.J., Marderosian, A.D. and Pierce, J.C., DNA identification of commercial ginseng sample. *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 3744-3752 (2000).
- 4) Miguel, A.P. and Begona, P.-V., Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chem.*, **86**, 143-150 (2004).
- 5) 中村澄子, 鈴木啓太郎, 原口和朋, 与座宏一, 奥西智哉, 大坪研一, 松井崇晃, 石崎和彦, 吉井洋一, もち加工品におけるもち米の品種判別および異種穀類の混入検出技術の開発, 農化, **78**, 984-993 (2004).
- 6) Saez, R., Sanz, Y. and Toldra, F., PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science*, **66**, 659-665 (2004).
- 7) Maria, L.-A., Laura, L., Amado, G.-P., M. Isabel P. and Antonio, P., Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **339**, 73-82 (2005).
- 8) 内野昌孝, 山岸 亨, 辻井良政, 高野克己 RAPD 法によるもち精米の品種判別について. 日食保蔵誌, **29**, 47-50 (2003).
- 9) Uchino, M., Noguchi, T. and Takano, K., Thermostability of DNA from wheat in heated food products. *Food Pres. Sci.*, **30**, 195-198 (2004).
- 10) Saito, H. and Miura, K., Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochem. Biophys. Acta*, **72**, 619-629 (1963).
- 11) Watson, J.C. and Thompson, W.F., Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. In "Methods for Plant Molecular Biology." eds. Weissbach, A. and Weissback, H., Academic Press, Inc, pp. 57-76 (1988).
- 12) Okada, G., Takematsu, A. and Takamura, Y., Phylogenetic relationships of the hyphomycete genera *Chaetopsia* and *Kinochaeta* based on 18S rDNA sequences. *Mycoscience*, **38**, 409-420 (1997).
- 13) Tateno, Y., Saitou, N., Okubo, K., Sugawara, H. and Gojobori, T., DDBJ in collaboration with mass-sequencing teams on annotation. *Nucleic Acids. Res.*, **33**, D25-D28 (2005).
- 14) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680 (1994).
- 15) 内野昌孝, 野口智弘, 高野克己. 抽出 DNA の PCR (Polymerized Chain Reaction) 増幅性の確認. 日食保蔵誌, **29**, 335-338 (2003).

(平成 18 年 6 月 26 日受付, 平成 18 年 10 月 26 日受理)