

飲料用植物粉末の DNA 分析における種識別の検討

杉島 紋子*, 大田 朋樹*, 中山 清貴*

Species identification of plants of vegetable powder for green juice by DNA analysis

Ayako MATSUSHIMA*, Tomoki OTA* and Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Amid rising health awareness, various vegetable powders are being used as raw materials of green juice in recent years. It is necessary to identify the plant species of these vegetable powders for customs work such as HS classification, however, it is difficult to identify the vegetable powders based on morphological observation. Therefore, we examined whether the vegetable powders could be identified by DNA-based analysis. To extract DNA from the vegetable powders, it was effective to use the CTAB method. We tried to identify vegetable powder samples (ten commercially obtained samples) by the direct sequencing method using several regions (*rbcL*, *matK*, *trnL* and ITS1) using available DDBJ (DNA Data Bank of Japan) data. As a result, all of the samples were successfully identified at the genus level and six were identified at the species level.

1. 緒 言

近年、健康志向の高まりを背景に、野菜不足の解消や美容・健康のため、またサプリメントとして、手軽に摂取のできる植物飲料が数多く流通している。中でも、飲料用植物粉末は、使いやすく、種類も豊富である。これらの植物粉末の原料となる植物は、ケールや大麦若葉、アルファルファなど様々である。

植物粉末の関税率表上の分類は、その植物粉末の原料となる植物によって異なる。たとえば、ケールであれば、その他の野菜として第 07.12 項、大麦若葉であれば、その他の植物性生産品として第 12.12 項、アルファルファであれば、第 12.14 項に分類される。これらの間には、税率格差もあることから、植物粉末の原料植物種の識別は、関税分類における重要な分析である。しかし、植物粉末の状態では、形態学的な特徴はほとんど残っておらず、外観での識別は困難である。そのため、種の識別には DNA 分析が有効であると考えられる。

これまでの研究で、広範囲の植物に使用のできるユニバーサルプライマーがいくつか知られており、その中でも、植物種の違いを反映する特定の遺伝子領域の塩基配列を用いて、種の同定を行う DNA バーコーディングの研究が進められている^{1)~8)}。陸上植物のバーコード領域としては、葉緑体 DNA の *rbcL* 領域及び *matK* 領域が提案されているが^{4), 8)}、これら 2 領域だけでは、種の識別が困難な場合もあり、他の領域を用いた識別法の研究もおこなわれている^{6), 7), 9)}。

本研究では、植物粉末からの DNA の効率的な抽出法を検討すると共に、ユニバーサルプライマーを利用した DNA 分析により、市場に流通している各種飲料用植物粉末の原料植物種の識別が可能であるかを検討した。植物種の識別では、葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子の部分領域(以下、*rbcL* 領域)、*matK* 遺伝子の部分領域(以下、*matK* 領域)、*trnL* (UAA) 遺伝子のイントロン領域(以下、*trnL* 領域)及び核リボソーム DNA の internal transcribed spacer の前半領域(以下、ITS1 領域)の塩基配列を決定し、インターネット上の DDBJ (DNA Data Bank of Japan) で Blast (Basic Local Alignment Search Tool) 検索を行い、各種飲料用植物粉末が、科、属、種又は変種のいずれまで識別可能かについて調査した。

2. 実 験

2.1 試料

試料は、市販の飲料用植物粉末(10 検体)を用いた。いずれの検体も形態学的な知見から種の特定はしておらず、検体名は商品のラベルに表示されていた名称を用いた。詳細については Table 1 に示す。

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 Vegetable powder samples analyzed in this study and their identification result

試料名	Sample name	Origin	Appearance	Identification result
大麦若葉	Young barley leaves	no info.	green powder	<i>Hordeum vulgare</i>
桑	Mulberry	no info.	green powder	<i>Morus</i> spp.
アルファルファ	Alfalfa	Argentina	greenish brown powder	<i>Medicago sativa</i>
小麦若葉	Young wheat leaves	Australia	green powder	<i>Triticum</i> spp.
ケール	Kale	Japan	green powder	<i>Brassica oleracea</i>
ゴーヤ	Bitter gourd (or Bitter melon)	China	light brown powder	<i>Momordica charantia</i>
アシタバ	Angelica keiskei	South Korea	olive green powder	<i>Angelica</i> spp.
モロヘイヤ	Jew's mallow (or Nalta jute)	Egypt	greenish brown powder	<i>Corchorus olitorius</i>
キダチアロエ	Aloe arborescens	Japan	olive green powder	<i>Aloe</i> spp.
お茶	Green tea leaves	Japan	green powder	<i>Camellia sinensis</i>

2.2 プライマー及び分析装置

プライマー

rbcl 領域

*rbcl*_a-F⁴⁾ 5' - ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'

*rbcl*_a-R⁴⁾ 5' - GTAAATCAAGTCCACCRCG-3'

matK 領域

3F_KIM f⁴⁾ 5' - CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'

1R_KIM r⁴⁾ 5' - ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'

trnL 領域

*trnL*_c¹⁾ 5' - CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'

*trnL*_d¹⁾ 5' - GGGATAGAGGGACTTGAAC-3'

ITS1 領域

ITS-A²⁾ 5' - GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS-C²⁾ 5' - GCAATTACACCAAGTATCGC-3'

分光光度計: GeneQuant RNA/DNA Calculator

(Amersham Pharmacia Biotech)

PCR 増幅装置: Veriti 96well Thermal cycler (Applied Biosystems)

画像解析装置: BIO-PROFILE System2 (VILBER LOURMAT)

DNA シークエンサー: 3500 XL Genetic Analyzer

(Applied Biosystems)

2.3 実験

2.3.1 DNA 抽出方法の検討

予めポリビニルピロリドン約 20 mg 及びジルコニア・ビーズ 1 個を入れた 2 ml 容のエッペンチューブに試料をそれぞれ約 10 mg 量り取り、CTAB 法で DNA を抽出した。また、試料をそれぞれ約 10 mg 量り取り、DNeasy® Plant Mini kit (以下、キット法) で DNA を抽出した。キット法による DNA 抽出は、添付のプロトコルに従い、最終容量を 100 µl とした。各抽出方法で得られた DNA 抽出液について、260 nm における吸光度 (A_{260}) を測定し、DNA の収量を求めた。DNA の収量は、 $A_{260} = 1$ のとき、DNA 濃度 50 ng/µl として算出した。また、DNA 抽出液の精製度は、280 nm にお

ける吸光度に対する 260 nm における吸光度比 (A_{260}/A_{280}) 並びに 230 nm における吸光度に対する 260 nm における吸光度比 (A_{260}/A_{230}) より評価した。DNA の収量及び精製度の確認は、2 点並行で行い、その平均値を用いた¹⁰⁾。

2.3.2 PCR法によるユニバーサル領域の増幅及び塩基配列の決定

各試料から抽出した DNA を鋳型として、*rbcl* 領域、*matK* 領域、*trnL* 領域及び ITS1 領域の 4 領域をそれぞれ TaKaRa Ex Taq polymerase を用いて PCR 法で増幅した。PCR の反応溶液は、いずれの領域においても、DNA 抽出液 (約 100 ng/µl): 1 µl、10 × Ex Taq buffer: 3.0 µl、dNTP mixture (2.5 mM each): 2.4 µl、プライマー (20 µM): 各 0.5 µl、Ex Taq polymerase (5 U/µl): 0.1 µl、滅菌水: 22.5 µl (合計 30 µl に調製) とした。PCR の反応条件は、いずれの領域においても、熱変性 95 (4 分) を行った後、94 (30 秒)、55 (1 分)、72 (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した後、伸長反応 72 (10 分) を行った。

2% アガロースゲル電気泳動により、増幅した DNA 断片 (PCR 産物) の有無を確認した後、得られた PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、PCR 反応と同じプライマーを用いて、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit で、添付のプロトコルに従いサイクルシークエンス反応を行った。

サイクルシークエンス反応後、エタノール沈殿法により未反応蛍光色素を除去し、DNA シークエンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列からプライマー配列を除去した後、インターネット上の DDBJ で Blast 検索を行った。

3. 結果及び考察

3.1 DNA 抽出方法の検討

飲料用植物粉末からの効率的な DNA 抽出方法を検討するため、CTAB 法及びキット法の 2 つの方法で DNA 抽出を行った。各試料から得られた DNA の収量及び DNA 抽出液の精製度を Table 2 に示す。

Table 2 Yields and purity of DNA extracted from vegetable powders, comparison of the CTAB method and Kit method

	CTAB method			Kit method		
	Absorbance ratio		Yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Absorbance ratio		Yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	
Young barley leaves	1.80	1.75	3.45	0.98	1.66	0.35
Mulberry	1.57	1.79	2.78	0.62	1.79	0.35
Alfalfa	1.33	1.76	1.53	0.73	1.68	0.35
Young wheat leaves	2.04	1.78	6.14	1.39	1.65	0.92
Kale	1.56	1.76	3.34	0.66	1.76	0.28
Bitter gourd	1.19	1.73	2.50	0.30	1.60	0.24
Angelica keiskei	0.87	1.76	1.23	0.67	1.70	0.36
Jew's mallow	1.36	1.73	2.64	0.42	1.69	0.21
Aloe arborescens	1.08	1.75	1.25	0.49	1.68	0.20
Green tea leaves	1.31	1.76	1.85	1.01	1.68	0.48

Kit means DNeasy® Plant Mini kit (QIAGEN)

Yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = $A_{260} \times 50 \times \text{extract volume (ml)} / \text{amount of sample (mg)}$

DNA の収量は、全ての試料において、キット法よりも CTAB 法で抽出した方が 3-12 倍高かった。また、DNA の精製度においては、タンパク質除去の指標となる A_{260}/A_{280} は、1.2-2.5 の範囲内であることが原則とされている¹⁰⁾が、全ての試料において、キット法で 1.6-1.8、CTAB 法で 1.7-1.8 であることから、いずれの方法においても良好であることが示された。一方、 A_{260}/A_{230} は、糖、フェノール等の低分子化合物由来の夾雑物の指標とされており、値が 2 未満ものは夾雑物の影響により PCR 反応が阻害されることがあると報告されている¹⁰⁾。 A_{260}/A_{230} は、キット法では、ほとんどの試料において 1 以下であり、CTAB 法では、ほとんどの試料において 1-2 となった。いずれの抽出方法においても、植物由来の糖やポリフェノールなどの夾雑物の影響により PCR 反応が阻害される可能性が示唆された。しかし、キット法に比べ、CTAB

法の方が、 A_{260}/A_{230} の値が大きいため、CTAB 法を用いて抽出した DNA 抽出液の方がキットを用いた抽出液よりも夾雑物の影響が小さいと考えられる。

以上の結果から、植物粉末からの DNA の抽出には、CTAB 法を用いる方法が有効であることが分かった。

3.2 飲料用植物粉末の DNA の状態

CTAB 法を用いて抽出した DNA の状態をアガロース電気泳動法にて調べた結果を Fig.1 に示す。小麦若葉及びお茶では約 10 kbp にバンドが観察され、比較的断片化していない DNA が抽出された。一方、他の 8 試料については、スメア状のバンドが観察され DNA の断片化が進んでいることが判明した。

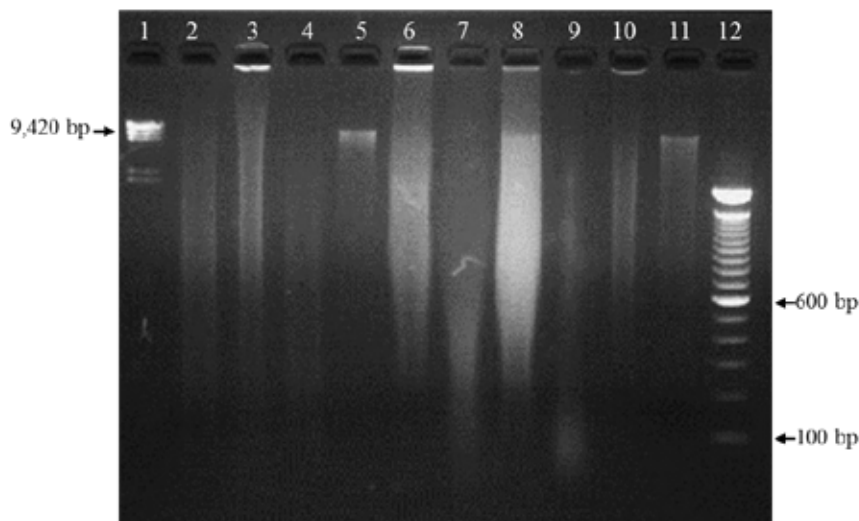


Fig.1 Qualities of the DNA extracted by CTAB method

Lane 1: λ /Hind digested, Lane 2: Barley young leaves, Lane 3: Mulberry, Lane 4: Alfalfa, Lane 5: Wheat young leaves, Lane 6: Kale, Lane 7: Bitter gourd, Lane 8: Angelica keiskei, Lane 9: Jew's mallow, Lane 10: Aloe arborescens, Lane 11: Green tea leaves, Lane 12: 100 bp DNA ladder
The electrophoresis was performed on 2 % agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

3.3 PCR産物の電気泳動

各試料の植物種の識別を行うため、近年、陸上植物のバーコード領域として公開されている葉緑体DNAの *rbcL* 領域及び *matK*

領域^{4), 8)}並びに比較的近縁種の識別に利用されている葉緑体DNAの *trnL* 領域及び核リボソームDNAのITS1領域の計4領域のプライマー^{1), 2), 4)}を用いてPCRを行った (Fig.2)。

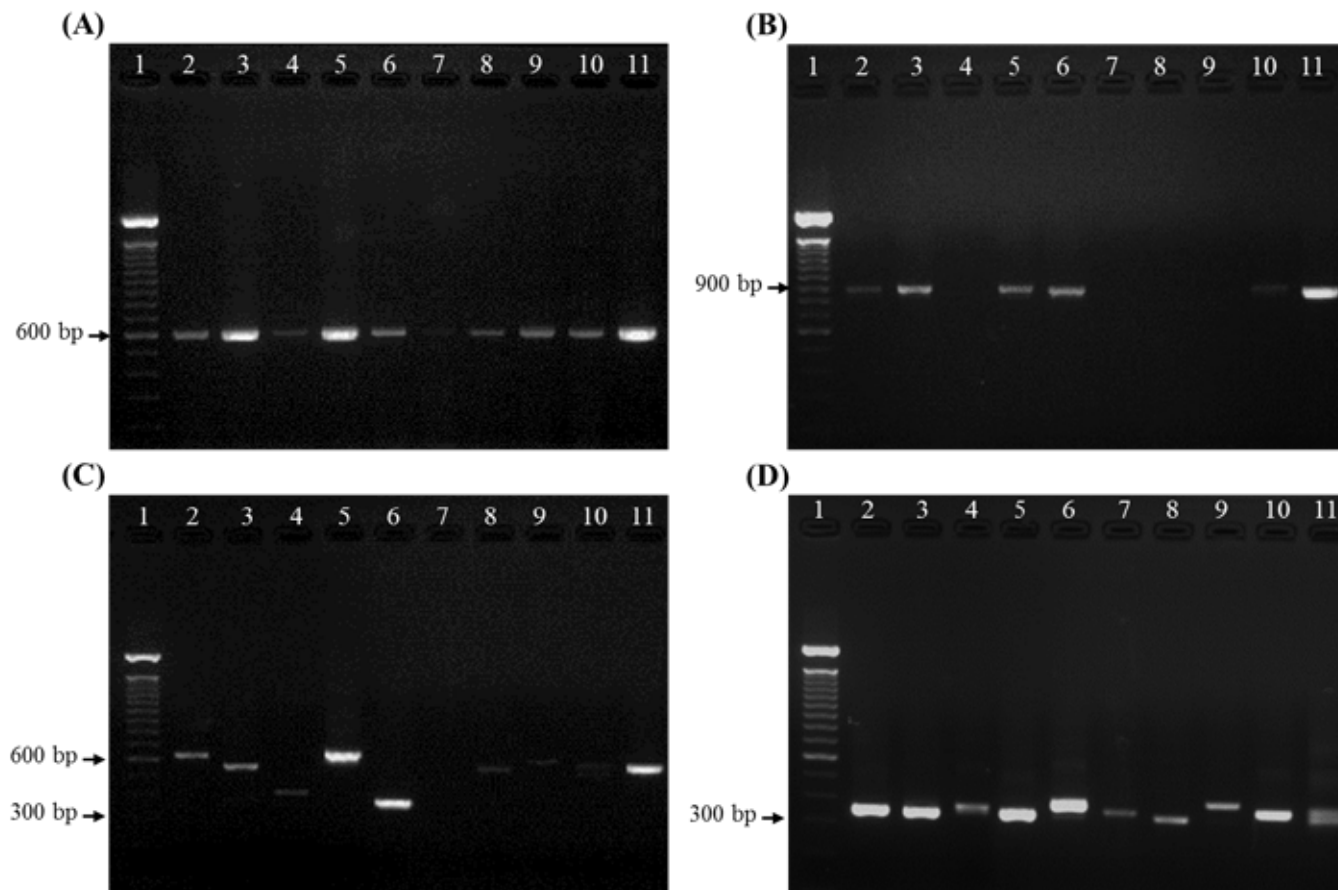


Fig.2 PCR amplification of DNA extracted from the vegetable powder samples for 4 regions, A: *rbcL* region, B: *matK* region, C: *trnL* region and D: ITS1 region

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: Barley young leaves, Lane 3: Mulberry, Lane 4: Alfalfa, Lane 5: Wheat young leaves, Lane 6: Kale, Lane 7: Bitter gourd, Lane 8: Angelica keiskei, Lane 9: Jew's mallow, Lane 10: Aloe arborescens, Lane 11: Green tea leaves

Each electrophoresis was performed on 2% agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

rbcL 領域では、全ての試料で 600 bp 付近に単一なバンドが確認された。*matK* 領域では、アルファルファ、ゴーヤ、アシタバ及びモロヘイヤの4試料において、バンドが確認されなかったが、他の6試料については 900 bp 付近に単一なバンドが確認された。*trnL* 領域では、キダチアロエで2本のバンドが確認され、ゴーヤでバンドが確認されなかったが、他の8試料においては、300-600 bp で単一なバンドが確認された。ITS1 領域では、お茶で2本のバンドが確認されたが、他の9試料においては 300 bp 付近に単一なバンドが確認された。

3.4 塩基配列の決定及びデータベースとの照合

単一のバンドが確認された各 PCR 産物について、DNA シークエンサーにより塩基配列を決定し、得られた塩基配列を用いて、インターネット上の DDBJ で Blast 検索を行った。それぞれの最も相溶性が高い登録データは、以下のとおりである。

(1) 大麦若葉

<i>rbcL</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (オオムギ)	HQ600432	相溶性(100%)
<i>matK</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (オオムギ)	HQ600011	相溶性(100%)
<i>trnL</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (オオムギ)	KF600708	相溶性(100%)
ITS1	<i>Hordeum vulgare</i> (オオムギ)	FJ593180	相溶性(100%)

試料は、オオムギ(*Hordeum vulgare*)と識別される。

(2) 桑

<i>rbcL</i>	<i>Morus indica</i>	DQ226511	相溶性(100%)
	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	KF031063	相溶性(100%)
<i>matK</i>	<i>Morus indica</i>	DQ226511	相溶性(100%)
	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	AB038183	相溶性(100%)
<i>trnL</i>	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	AF400592	相溶性(99%)
ITS1	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	HQ144174	相溶性(100%)
	<i>Morus bombycis</i> (ヤマグワ)	AM042006	相溶性(100%)

試料は、クワ属(*Morus spp.*)と識別される。

(3) アルファルファ

<i>rbcL</i>	<i>Medicago sativa</i> (アルファルファ)	HQ590181	相溶性(100%)
-------------	----------------------------------	----------	-----------

matK バンドがないため塩基配列を決定できなかった
trnL *Medicago sativa*(アルファルファ) JN617183 相同性(100%)
 ITS1 *Medicago sativa*(アルファルファ) AF053142 相同性(100%)
 試料は、アルファルファ(*Medicago sativa*)と識別される。

(4) 小麦若葉

rbcL *Triticum turgidum* HQ894421 相同性(100%)
Triticum aestivum(パンコムギ) HQ590312 相同性(100%)
matK *Triticum aestivum*(パンコムギ) AF164405 相同性(100%)
Triticum spelta HQ8944243 相同性(100%)
trnL *Triticum aestivum*(パンコムギ) KC912694 相同性(100%)
 ITS1 *Triticum aestivum*(パンコムギ) FJ609737 相同性(100%)
 試料は、小麦属(*Triticum spp.*)と識別される。

(5) ケール

rbcL[†] *Brassica oleracea*(ヤセイカンラン種)
 HQ619736 相同性(100%)
Brassica rapus(ラバ種) GQ861354 相同性(100%)
matK[†] *Brassica oleracea*(ヤセイカンラン種)
 JN584952 相同性(100%)
Brassica rapus(ラバ種) JF807906 相同性(100%)
trnL[†] *Brassica oleracea ver. Capitata*(キャベツ)
 AY752712 相同性(100%)
Brassica oleracea ver. Gemmifera
 AJ854543 相同性(100%)
 ITS1[†] *Brassica oleracea ver. Botrytis* GQ891876 相同性(100%)
 試料は、ヤセイカンラン種(*Brassica oleracea*)と識別される。

(6) ゴーヤ

rbcL[†] *Momordica foetida* DQ535829 相同性(99%)
Momordica charantia JN407272 相同性(99%)
matK[†] バンドがないため塩基配列を決定できなかった
trnL[†] バンドがないため塩基配列を決定できなかった
 ITS1[†] *Momordica charantia* GQ845154 相同性(99%)
 試料は、ナガレイシ種(*Momordica charantia*)と識別される。

(7) アシタバ

rbcL[†] *Angelica apaesis* HQ686932 相同性(100%)
Angelica dahurica GQ436629 相同性(100%)
matK[†] バンドがないため塩基配列を決定できなかった
trnL[†] *Angelica gmelini* GQ244570 相同性(100%)
 ITS1[†] *Angelica gigas* DQ647697 相同性(99%)
Angelica dahurica ver. Formosana
 JX022910 相同性(99%)
 試料は、シシウド属(*Angelica spp.*)と識別される。

(8) モロヘイヤ

rbcL[†] *Oceanopapaver neocaledonicum*
 AF523842 相同性(99%)
matK バンドがないため塩基配列を決定できなかった
trnL[†] *Corchorus longipedunculatus* AM159144 相同性(98%)
Corchorus lconfusus AM159146 相同性(98%)
 ITS1 *Corchorus olitorius* FJ161701 相同性(100%)

試料は、モロヘイヤ(*Corchorus olitorius*)と識別される。

(9) キダチアロエ

rbcL *Aloe arborescens*(キダチアロエ)
 JX572272 相同性(100%)
Aloe ferox(アロエフェロックス) JQ025022 相同性(100%)
matK *Aloe humilis* AY323719 相同性(98%)
Aloe glauca AJ511396 相同性(98%)
trnL バンドが2本のため塩基配列を決定できなかった
 ITS1 *Aloe ferox*(アロエフェロックス) JQ025327 相同性(100%)
Aloe challsii JQ025355 相同性(100%)

試料は、アロエ属(*Aloe spp.*)と識別される。

(10) お茶

rbcL *Camellia oleifera*(ツバキ) GQ436646 相同性(100%)
Camellia sinensis(チャノキ) AF380037 相同性(100%)
matK *Camellia sinensis*(チャノキ) AF380077 相同性(100%)
trnL *Camellia sinensis*(チャノキ) KF562708 相同性(99%)
Camellia oleifera(ツバキ) JQ975031 相同性(100%)
 ITS1 バンドが2本のため塩基配列を決定できなかった
 試料は、チャノキ(*Camellia sinensis*)と識別される。

[†] 該当の種又は変種の塩基配列がデータベースに登録されていない

[†] 該当の属の塩基配列がデータベースに登録されていない

以上の相同性検索の結果から、大麦若葉(*Hordeum vulgare*)、アルファルファ(*Medicago sativa*)、モロヘイヤ(*Corchorus olitorius*)及びお茶(*Camellia sinensis*)については種レベルの識別が可能であった。ケール(*Brassica oleracea var. acephala*)及びゴーヤ(*Momordica charantia var. pavel*)は、種よりも下位の分類である変種である。これらは、種レベルの識別は可能であるが、変種間の塩基配列にほとんど差がないことから同種内の別変種との識別には至らなかった。桑(*Morus spp.*)、小麦若葉(*Triticum spp.*)、アシタバ(*Angelica keiskei*)及びキダチアロエ(*Aloe arborescens*)については、種間の塩基配列にほとんど差がないこと又は登録データの不足により種の識別には至らなかったが、属レベルの識別は可能であった。

4. 要 約

飲料用の植物粉末からのDNA抽出方法を検討した結果、CTAB法での抽出方法が有効であることがわかった。市販の飲料用植物粉末を対象として、広範囲の植物種に利用できる複数のユニバーサルプライマー(*rbcL*領域、*matK*領域、*trnL*領域及びITS1領域を対象とする)を用いてダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定し、種の識別が可能であるか検討した。その結果、今回用いた試料において、種の識別が可能なものは6試料(大麦若葉、アルファルファ、モロヘイヤ、お茶、ケール及びゴーヤ)属までの識別が可能なものは4試料(桑、小麦若葉、アシタバ及びキダチアロエ)であった。

文 献

- 1) Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J: *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105 (1991).
- 2) Blattner F R: *BioTechniques*, **27**, 1180 (1999).
- 3) Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell J M, Kesanakurthi R P, Haidae N, Savolaine V: *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B Biological Sciences*, **360**, 1889 (2005)
- 4) CBOL Plant Working Group: *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 12794 (2009).
- 5) Li F W, Kuo L Y, Rothfels C J, Ebihara A, Chiou Q L, Windham M D, Pryer K M: *PLos ONE*, **6**, e26597 (2011).
- 6) de Groot G A, During H J, Maas J W, Schneider H, Vogel J C, Erkens H J: *PLos ONE*, **6**, e16371 (2011).
- 7) Hollingsworth P M, Graham S W, Little D P: *PLos ONE*, **6**, e19254 (2011).
- 8) Bafeel S O, Arif I A, Bakir M A, Al Homaidan A A, Al Farhan A H, Khan H A: *Genetics and Molecular Research*, **11**, 1934 (2012)
- 9) 松木吏弓, 阿部聖哉, 島野光司, 竹内亨, 梨本真: 日本生態学会誌, **58**, 105 (2008)
- 10) 新家薫子, 清水隆二, 芹川俊彦, 安田和弘, 竹田正美, 大西道代: 石川県保健環境センター研究報告書, **48**, 42 (2011).