

PCR 法による羊毛とカシミヤの鑑別

福田ゆか^{*1} 橋村靖彦^{*2} 坂川登^{*1}

Identification of Wool and Cashmere fibers using PCR method

Yuka FUKUDA Yasuhiko HASHIMURA Noboru SAKAGAWA

Owari Textile Research Center,AITEC^{*1},Planning and Coordination Division,AITEC^{*2}

現在、実用化されている獣毛の鑑別方法としては、熟練者の光学顕微鏡を用いた外観観察により行われている。そこで、本研究では遺伝子技術の一つである PCR 法を用い、それぞれの DNA の特異的な部分を分析することにより、羊毛とカシミヤを鑑別する手法を研究した。その結果、PCR 法を用いて羊毛とカシミヤにそれぞれ特異的な部分の DNA を増幅することにより、羊毛とカシミヤの鑑別が可能であることが分かった。また、製品でも鑑別が可能であることから、この方法が実用的なものであることが示唆された。

1. はじめに

家庭用品品質表示法の改正が行われ、繊維製品品質表示規程の中で、従来は、毛の表示しかできなかったものが獣毛の種類を表示することができるようになり、獣毛の鑑別および混用率の測定は増加している。また、羊毛の延伸加工や脱スケール加工などの開発や獣毛の多様化により、よりいっそう高度な鑑別技術が求められてきている。

しかし現在、実用化されている獣毛の鑑別方法としては、熟練者の光学顕微鏡を用いた外観観察により行われている。電子顕微鏡を用いた画像処理による方法、アミノ酸分析による方法などの研究も行われている。しかし、電子顕微鏡による画像解析は、羊毛と種々の獣毛の形状の違いを判別するための精度を上げることと判定の自動化が難しい。また、アミノ酸分析等による方法は、獣毛の化学的性質が、それらが全てタンパク質から合成されていることから極めて近く、鑑別は困難である。そのため、どちらも実用化には至っていない。よって、特殊な技能を持っているもの以外は測定が不可能であり、これを一般的な測定技術で解決することができれば、熟練者でなくとも獣毛の鑑別および混用率の測定が可能となる。

近年の分子生物学の進歩はめざましく、DNA の解析は医学・農学の分野での研究に用いられているだけでなく、

食品の分野では加工食品中に使用される食肉の種類¹⁾²⁾の鑑別および定量に既に実用化され、広い分野で一般的に用いられている。また、獣毛の鑑別についても一部報告がある。³⁾⁴⁾⁵⁾

そこで、本研究では遺伝子技術の一つである PCR 法を用い、それぞれの DNA の違いを分析することにより、羊毛とカシミヤを鑑別する手法を研究した。

2. 実験方法

2.1 試料

試料としては、平均繊維直径約 29 μm のメリノ種の羊の原毛（以下羊毛）と約 19 μm のカシミヤヤギの原毛（以下カシミヤ）を、ジエチルエーテルでソックスレー抽出して脱脂し、洗浄・乾燥した試料を用いた。

2.2 DNA の抽出

試料約 250mg にバッファー（50mM Tris-HCl(pH8.0)・25mM EDTA(pH8.0)・0.5% SDS・150mM NaCl)5ml と 2-メルカプトエタノールを 25 μl 加え、試料の煮沸処理（10 分間）を行った。その後、proteinaseK(20mg/ml)を 25 μl 加え、55 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間インキュベートし、RnaseA(4mg/ml)を 25 μl 加えてさらに 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートし、遠心分離後、約 3.5ml の上清を新しいチューブに移した。

*1 尾張繊維技術センター応用技術室 *2 企画連携部

イソプロパノール 7ml とグリコーゲン溶液 (20mg/ml) 25 μ l を加えて混合し、遠心分離した。上清を廃棄し 70% エタノール溶液で洗浄した後、市販の DNA 精製用のフィルターキット (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, amarsham pharmacia biotech 製) を用いて DNA の精製を行い、50 μ l の TE (pH8.0) バッファーに溶解した。抽出した DNA は 10 μ l の抽出 DNA 溶液を 2% アガロースゲルにより、電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。その後、UV 照射装置上で画像解析装置を使用して、ゲルの写真撮影を行い、抽出した DNA の検出を行った。

2.3 PCR 反応の条件

まず、食肉検定用キット (DNA Animal Consensus Standard Gene Scan) を用いた PCR 反応液は、キットに付

属の反応液 19.9 μ l に Taq DNA polymerase (Ampli Taq Gold) を 0.1 μ l、抽出した DNA 1 μ l、水 4 μ l を加えて全量を 25 μ l とした。

次に、キットを用いない条件として、10 \times PCR buffer 10 μ l、dNTP 10 μ l、それぞれのプライマー 0.5 μ l、Taq DNA polymerase (Ampli Taq Gold) 0.5 μ l、水 77.5 μ l に抽出した DNA 1 μ l 加えて全量を 100 μ l とした。

この反応液を、核酸増幅装置 (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems 製) により、94 $^{\circ}$ C に 10 分保った後、94 $^{\circ}$ C 30 秒間・58 $^{\circ}$ C 30 秒間・72 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

使用したプライマーの配列、増幅領域、増幅サイズは表 1 に示す。

表 1. 使用したプライマーの配列、増幅領域、増幅サイズ

	プライマー	配列	増幅領域	増幅サイズ
食肉検定用キット	Cyt-b1	5' -CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	cytochrome b 14816-14841	359
	Cyt-b2	5' -GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	cytochrome b 15149-15174	
羊毛	Sheep1	5' -GCACTATACTCCGTTCTCTCTA-3'	alpha-lactalbumin 1325-1346	107
	Sheep2	5' -AAGTGAAGCTTCAGAATTGGCAA-3'	alpha-lactalbumin 1408-1430	
カシミア	Goat 1	5' -CCAGCACTATACTCCGTTCTA-3'	alpha-lactalbumin 2028-2048	105
	Goat 2	5' -AAGTGAAGCTTCGAAATTGGAAG-3'	alpha-lactalbumin 2110-2132	
カシミア	Goat 1	5' -CCAGCACTATACTCCGTTCTA-3'	alpha-lactalbumin 2028-2048	290
	Goat 3	5' -TAGTGGAGTAAGGCCATTTTC-3'	alpha-lactalbumin 2296-2317	

2.4 DNA 増幅断片の検出

5 μ l または 10 μ l の PCR 反応液を 2% アガロースゲルにより、電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。その後、UV 照射装置上で画像解析装置を使用して、ゲルの写真撮影を行い、増幅された DNA 断片の検出を行った。

2.5 制限酵素処理

食肉検定キットにより増幅した PCR 反応液 10 μ l に、制限酵素 (Hae I) を 1 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションを行った。

制限酵素による切断断片の確認のために、5 μ l の制限酵素処理後のサンプルを 2% アガロースゲルにより、電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。その後、UV 照射装置上で画像解析装置を使用して、ゲルの写真撮影を行い、制限酵素により切断された DNA 断片の検出を行った。

3. 結果及び考察

3.1 DNA の抽出

獣毛はスケールで覆われているため、バッファーと蛋

白質分解酵素のみでは、充分分解されず電気泳動では検出できなかった (図 1-羊毛 1, カシミア 1)。そこで、前処理として 2-メルカプトエタノールを加え煮沸処理することにより獣毛は充分分解された。電気泳動の結果、約 500bp ~ 1000bp の長さの DNA が抽出できたことがわかった (図 1-羊毛 2, カシミア 2)。

3.2 食肉検定用キット

PCR 反応後、電気泳動で確認した結果、羊毛から抽出した DNA およびカシミアから抽出した DNA を鋳型として、ともに約 359bp の DNA 断片が増幅されたことがわかった (図 2)。

増幅した DNA 断片サンプルを制限酵素で処理した結果、羊毛とカシミアはそれぞれ異なる長さの断片に切断されていることがわかった (図 3)。よって、羊毛とカシミア



図 1. 抽出 DNA の電気泳動

の鑑別が可能であることが示唆された。

食肉用検定キットでの羊毛とカシミアの鑑別は可能であると考えられるが、羊毛とカシミアの2種類が混ざり合った試料の場合、電気泳動のバンドが複雑になる。その他の獣毛も含めて考えると数種類が混ざり合った状態では判定しにくいことも考えられる。

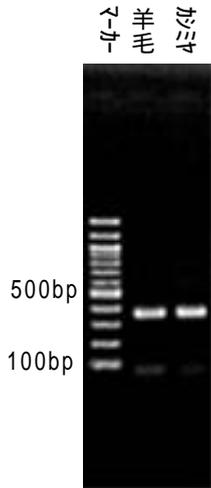


図2. 食肉検定キットの PCR 生成物の電気泳動

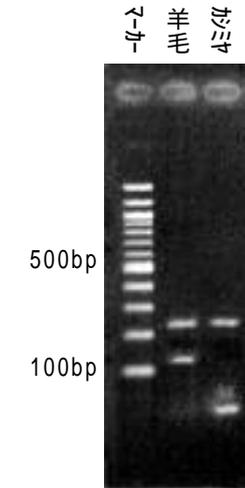


図3. 食肉検定キットの制限酵素処理後の電気泳動

3.3 特異的プライマー

PCR 反応後、PCR 生成物を電気泳動で確認した結果、羊毛から抽出した DNA を鋳型とした PCR 反応では、羊に特異的なプライマー〔 Sheep1, Sheep2 の組み合わせ〕の反応液で、予測する増幅サイズである約 100bp の断片を確認できた(表 2 / 図 4-1)。カシミアから抽出した DNA を鋳型とした PCR 反応では、ヤギに特異的なプライマー〔 Goat1, Goat2 の組み合わせ〕の反応液で、予測する増

幅サイズである約 100bp の断片を確認できた(表 2 / 図 4-5)。さらに、羊毛・カシミアともに非特異的なプライマーの組み合わせ〔羊毛の DNA を鋳型とした場合 Goat1, Goat2 の組み合わせ、カシミアの DNA を鋳型とした場合 Sheep1, Sheep2 の組み合わせ〕では、増幅しないことも確認できた(表 2 / 図 4-2, 4)。

Sheep1, Sheep2 の組み合わせと Goat1, Goat2 の組み合わせで増幅した断片はほぼ同じサイズであるため、羊毛とカシミアが混ざっている場合、2種類ともに存在することを 1 反応液中で示すことができない。そこで、予測される増幅サイズの異なる、ヤギに特異的なプライマー〔 Goat1, Goat3 の組み合わせ〕を試みた。Goat1, Goat3 の組み合わせのプライマーでカシミアから抽出した DNA を鋳型とした PCR 反応を行った結果、予測する増幅サイズである約 300bp の断片を確認できた(表 2 / 図 5-6)。このプライマーの組み合わせでは、羊毛から抽出した DNA を鋳型とした PCR 反応で、増幅しないことも確認した(表 2 / 図 5-3)。

さらに、羊に特異的なプライマーとヤギに特異的なプライマーをどちらも一つの反応液に加えた、4 種類のプライマーの組み合わせ〔 Sheep1, Sheep2, Goat1, Goat3 の組み合わせ〕で PCR 反応を行った。羊毛から抽出した DNA のみを鋳型とした PCR 反応では、予測する増幅サイズである約 100bp の断片のみを、カシミアから抽出した DNA のみを鋳型とした PCR 反応では、予測する増幅サイズである約 300bp の断片のみをそれぞれ確認できた(表 3 / 図 6-7, 8)。羊毛およびカシミアから抽出した 2 種類の DNA を鋳型とした PCR 反応では、予測する増幅サイズである約 100bp および約 300bp の断片、2 種類ともに確認できた(表 3 / 図 6-9)。

表 2. 鋳型 DNA とプライマーの組み合わせと増幅の有無

試料番号	鋳型 DNA	プライマー-1	プライマー-2	予測増幅サイズ	増幅サイズ
1	羊毛	Sheep 1	Sheep 2	107	約 100
2	羊毛	Goat 1	Goat 2		増幅なし
3	羊毛	Goat 1	Goat 3		増幅なし
4	カシミア	Sheep 1	Sheep 2		増幅なし
5	カシミア	Goat 1	Goat 2	105	約 100
6	カシミア	Goat 1	Goat 3	290	約 300

表 3. 2 組のプライマーを同時に用いたときの鋳型 DNA と増幅の有無

試料番号	鋳型 DNA	鋳型 DNA2	プライマー	予測増幅サイズ	増幅サイズ
7	羊毛	-	Sheep 1	107	約 100
8	カシミア	-	Sheep 2	290	約 300
9	羊毛	カシミア	Goat 1	107, 290	約 100, 300
			Goat 3		

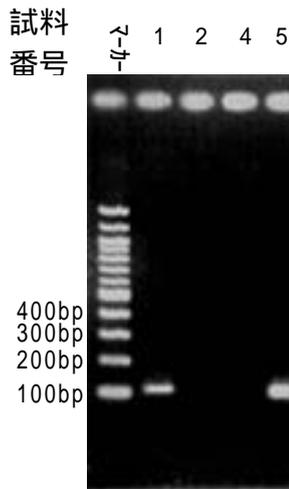


図4. 特異的プライマーを用いたときのPCR生成物の電気泳動

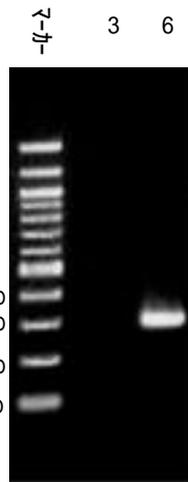


図5. 特異的プライマーを用いたときのPCR生成物の電気泳動

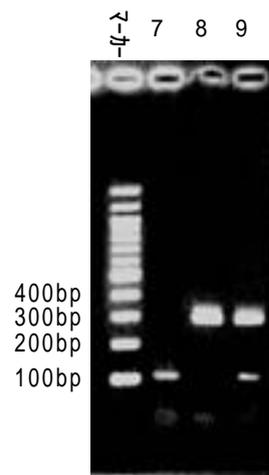


図6. 2組のプライマーを同時に用いたときのPCR生成物の電気泳動

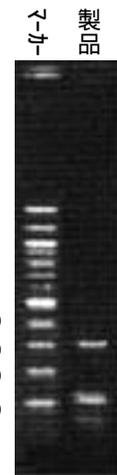


図7. 製品から抽出したDNAを鋳型としたPCR生成物の電気泳動

羊毛、カシミアともに抽出したDNAを鋳型として、それぞれに特異的なプライマーでの増幅の有無で鑑別が可能であることが分かった。羊毛とカシミアから抽出したDNAを鋳型として増幅するPCR生成物の断片を異なる長さになるようにプライマーを設計することにより、1反応液で双方一度に判定することが可能であるとわかった。

最後に、羊毛とカシミア混の製品から抽出したDNAを鋳型として〔Sheep1, Sheep2, Goat1, Goat3〕の組み合わせでPCR反応を行った。その結果、羊毛を含む製品から増幅されると予測できる、約100bpの断片と、カシミアを含む製品から増幅されると予測できる、約300bpの断片をともに確認することができた(図7)。

4. 結び

食肉検定用キットの共通プライマーを用いて増幅させ、制限酵素で切断しその断片で判定する方法、羊毛・カシミアにそれぞれ特異的なプライマーを用いて、増幅の有無で判定する方法、ともに鑑別の手法としては可能であることが分かった。しかし、食肉検定用キットを用いたとき、獣毛数種類が混ざり合った試料では、より複雑になる。また、特異的なプライマーを用いる方法のほうが制限酵素による処理が必要でないため、より簡便である。よって、PCR法を用いた羊毛とカシミアの鑑別には、種に特異的なプライマーを用いて行う方法が最も適していると考えられる。また、羊毛とカシミアそれぞれに特異的なプライマーを、PCR生成物の断片長さが異なるよう設計することにより、2種類のDNAが混在していても、1反応液中で一度に2種類の鑑別ができることが

わかった。またPCR反応後の断片長さを変えたプライマーを設計することにより、1反応液中での3種類以上の獣毛のDNAを鋳型とした鑑別の可能性も示唆された。

5. 謝辞

この研究を進めるにあたって、貴重なご意見、提案など多大なご協力をいただきました、食品工業技術センターの北本則行主任研究員をはじめ、同所の方々に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Meyer, R.他 : Polymerase Chain Reaction Fragment Length Polymorphism Analysis : A simple method for species identification in food. J.of ACAC Int. 78 (6), 1542-1551, 1995.
2. Kocher, T.D.他 : Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 6196-6200, 1989.
3. Appley, J.M.他 : PCR amplification of the RuBisCo small subunit genes and their novel application to plant tissue identification. Heredity, 79(6), 557-563, 1997.
4. Hamlyn, P.F.他 : Molecular speciation of animal fibres. JSDC, 144, 78-80, 1998.
5. 加藤三貴: 獣毛のDNA鑑別方法の研究調査, 財団法人日本化学繊維検査協会研究調査報告書, No.1002, 1999.