

DNA 解析による種々の獣毛の鑑別

福田ゆか^{*1}、三輪幸弘^{*2}、坂川 登^{*3}

Identification of Animal fibres using DNA amplification method

Yuka FUKUDA, Yukihiro MIWA and Noboru SAKAGAWA

Owari Textile Research Center, AITEC^{*1} Central Citizen Affairs Plaza^{*2}

現在、実用化されている獣毛の鑑別方法としては、主に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2種類の遺伝子増幅技術を用いて、それぞれのDNAの特異的な部分を分析することにより、獣毛を鑑別する手法を研究した。一つは現在主流で用いられているPCR法である。もう一つは、近年新規に開発され、安価であるなどメリットの大きいLAMP法を用いた。その結果、PCR法では羊毛、カシミア、アンゴラ、モヘヤ、アルパカの鑑別が、LAMP法では羊毛、カシミア、アンゴラ、モヘヤの鑑別が可能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、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・農学分野での研究に用いられているだけでなく、食品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、遺伝子組み替え大豆やトウモロコシ等の鑑別³⁾⁴⁾⁵⁾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実用化されつつある。

そこで、本研究では遺伝子増幅技術で、従来用いられているPCR法と、近年新規に開発され、安価な解析ができる、特異性が高いと報告されているなど種々のメリットを持つLAMP法⁶⁾⁷⁾⁸⁾を用い、それぞれのDNAの違い

を分析することにより、種々の獣毛の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、メリノ種の羊の原毛(以下羊毛)、カシミアヤギの原毛(以下カシミア)、アンゴラウサギの原毛(以下アンゴラ)、アンゴラヤギの原毛(以下モヘヤ)、キヤメルの原毛(以下キヤメル)、アルパカの原毛(以下アルパカ)、ヤクの原毛(以下ヤク)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 μ l加え、試料の煮沸処理(10分間)を行った。その後、proteinaseK(20mg/ml)を25 μ l加え、55 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートし、RnaseA(4mg/ml)を25 μ l加えてさらに37 $^{\circ}$ 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。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(GFXTMPCR 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。

2.3 PCR法の反応の条件

まず、食肉検定用キット(DNAnimal Consensus

^{*1}尾張繊維技術センター 応用技術室 ^{*2}中央県民生活プラザ

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。

この反応液を、核酸増幅装置 (Gene Amp PCR System 9700、Applied Biosystems 製) により、94 に 10 分保った後、94 30 秒間・58 30 秒間・72 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。

2.4 LAMP 法の反応の条件

10 \times Thermopoli Buffer 5.0 μ l、100mM MgSO₄ 1.0 μ l、10mM dNTPs 2.0 μ l、4M Betaine 12.5 μ l、水 7.5~16.5 μ l、鋳型 DNA 1.0~10.0 μ l、混合プライマー 10.0 μ l (BIP:FIP:B3:F3=4:4:1:1)の割合で反応溶液を調整した。反応液は全量を 50 μ l とした。

この反応液を、95 の湯浴で 10 分処理した後、反応温度は 60 ~65 で変更し、反応時間は 1~4 時間で変更した。それぞれの条件の湯浴でインキュベートし、増幅反応を行った。

2.5 DNA 増幅断片の検出

10 μ l の PCR 反応液および 5 μ l の LAMP 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。

2.6 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) を 1 μ l 加え、37 で 1 時間インキュベートを行った。

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 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、カシミア、アンゴラ、モヘヤ、アルパカは長さ 359bp の DNA 断片が増幅されていたが、キャメルは増幅されなかった (図 1)。

キャメルが増幅されなかった理由としては、鋳型 DNA 精製後も色素が残っていたためそれが PCR 反応の阻害物質になったことも考えられる。また、キャメルからは DNA が抽出しにくいとも考えられる。

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、カシミア、アンゴラ、モヘヤ、アルパカはそれぞ

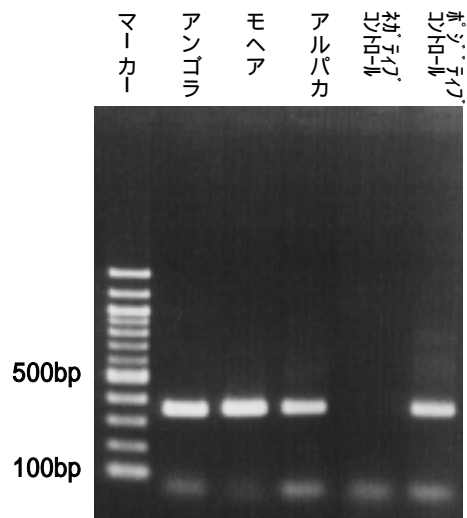


図 1 食肉検定用キットの PCR 生成物の電気泳動

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 2)。しかし、同じヤギ科である、カシミアとモヘヤは同様の長さに切断された。よって、両者の鑑別が困難であるとわかった。

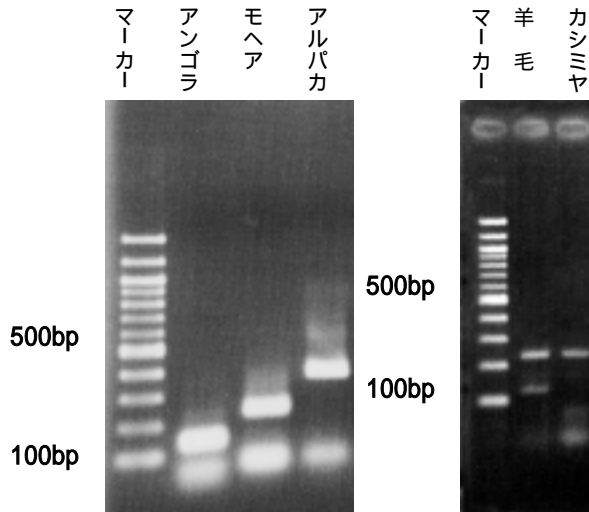


図 2 食肉検定用キットの制限酵素処理後の電気泳動

食肉用検定キットでの獣毛の鑑別は可能であると考えられるが、2 種類以上の獣毛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。よって、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。

3.2 LAMP 法による獣毛の鑑別

菌を用いた文献によると、反応開始時のみ鋳型 DNA の 2 重らせんを解き、プライマーが結合しやすくするため、反応溶液を 95 の湯浴での 10 分間の前処理は必要ない

とのことであったため、比較を行った。その結果、前処理は必要であることがわかった。

まず、羊毛とカシミアの鑑別について検討を行った。鑄型DNAは1.0~10.0 μ lのどの範囲でも増幅が起こるが、文献に比べ増幅効率が悪いので、羊毛とカシミアの鑑別の精度を上げるためにはより多い量の鑄型DNAが必要であると考えられる。反応温度は60~65の範囲ではあまり変化が無いことがわかった。

反応時間は1時間では電気泳動で確認できる反応が起こらず、逆に4時間と長いとミスマッチでも反応するため非特異的な反応が促進されて、全てにおいて増幅が起こることがわかった。反応時間は2時間~3時間の間で行うのが良い。(図3,4,表1)

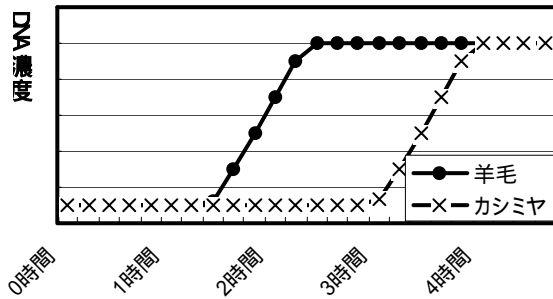


図3 羊毛に特異的なプライマーを用いたときの濃度変化の模式図と鑑別可能範囲

表1 電気泳動目視による反応液DNA濃度

	反応時間	反応時間と反応後DNA濃度	鑄型DNA量	鑄型DNA量と反応後DNA濃度	反応温度	反応時間と反応後DNA濃度
	電気泳動目視による反応液DNA濃度	1時間	見えない x	1 μ l	薄い	60
	2時間	薄い	5 μ l	濃い	63	濃い
	3時間	濃い	10 μ l	濃い	65	濃い
	4時間	非特異的反応 x		直接目視判定は不可		直接目視判定は不可

プライマー
LAMP Sheep1 ; LAMP Goat1

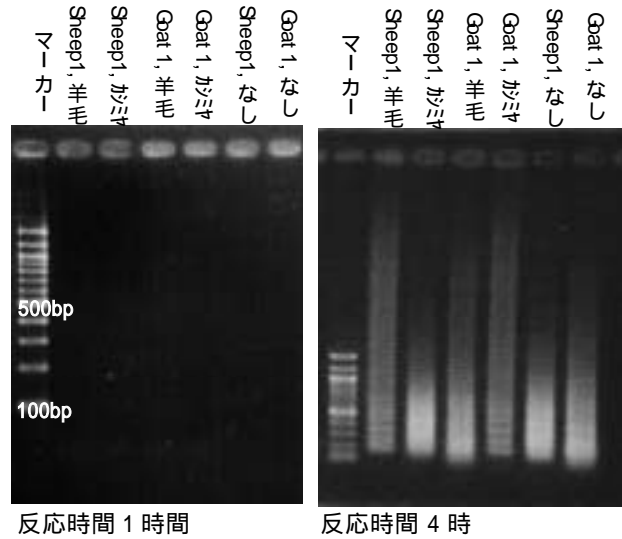
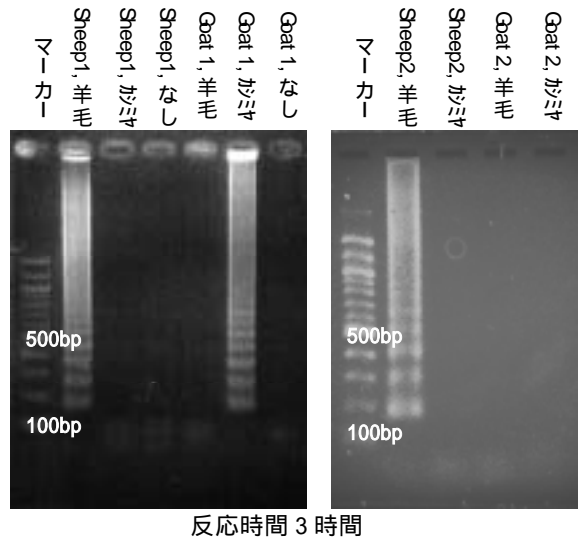


図4 LAMP法を用いた羊毛とカシミアの鑑別反応時間の比較

プライマー
LAMP Sheep1
LAMP Goat1

プライマー
LAMP Sheep2
LAMP Goat2



反応時間3時間

図5 LAMP法を用いた羊毛とカシミアの鑑別プライマーの比較

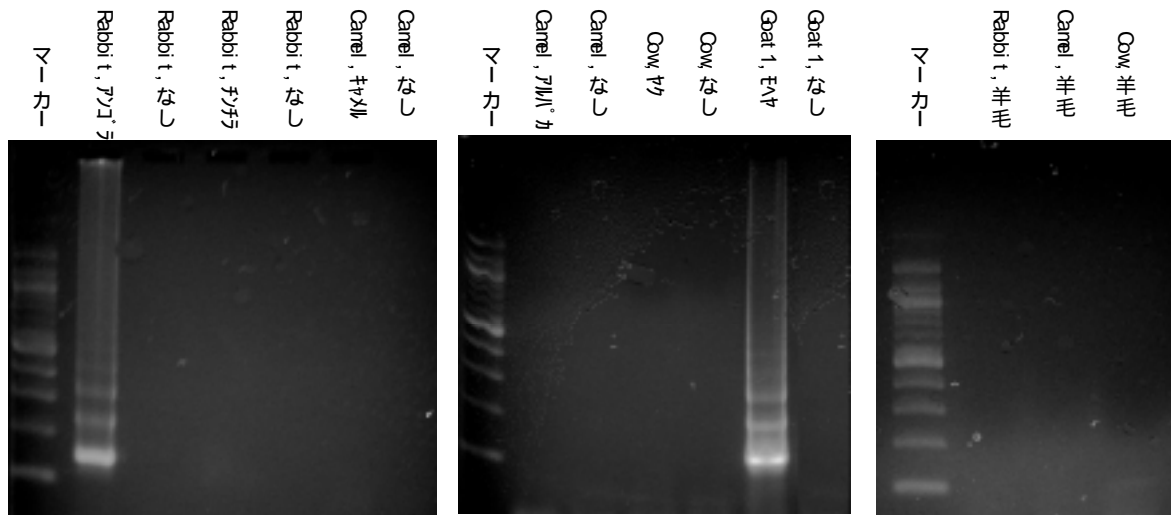


図6 LAMP法を用いたその他の獣毛の鑑別

反応時間3時間

羊毛とカシミヤのプライマーの設計は LAMP Sheep1、LAMP Sheep2 と LAMP Goat 1、LAMP Goat2 のそれぞれ2種類ずつ行った。LAMP Sheep1、LAMP Sheep2、LAMP Goat 1のプライマーでそれぞれ特異的な反応がおり、鑑別が可能であると考えられる。LAMP Goat2についてはカシミヤの鋳型 DNA を用いたときも増幅が起こらなかった(図5)。

その他の獣毛の鑑別については、羊毛とカシミヤの鑑別でもっとも良いと考えられる条件で行った。プライマーは、アンゴラを対象とした LAMP Rabbit、アルパカ、キヤメル等を対象とした LAMP Camel、ヤク等を対象とした LAMP Cow をそれぞれ設計した。アンゴラは LAMP Rabbit のプライマーで特異的な増幅をした。モヘヤは LAMP Goat 1のプライマーで特異的な増幅をした(図6)。アルパカ、キヤメル、ヤク、チンチラはそれぞれ増幅されると考えられるプライマーを用いても特異的な増幅は起こらなかった。(図6)

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では、羊毛、カシミヤ、アンゴラ、モヘヤ、アルパカはそれぞれに特徴的な断片を得ることができ、獣毛の鑑別の可能性が示唆された。

LAMP法を用いた、羊毛・カシミヤの鑑別は、それぞれ特異的なプライマーでのみ増幅し、鑑別可能であることがわかった。アンゴラ、モヘヤについても、それぞれ特異的なプライマーで増幅し鑑別が可能であることがわかった。アルパカ、キヤメル、ヤク、チンチラはそれぞれ増幅されると考えられるプライマーを用いても特異的な

増幅は起こらなかった。よって、プライマーを再検討する必要がある。

また、どちらの方法を用いた場合でも、カシミヤとモヘヤはおなじヤギ科の動物であるため区別することは難しいとわかった。

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.
- 6) 高野弘. 他 : 新しい遺伝子増幅法 : LAMP 法, Bioベンチャー. 1(1). 109-115, 2001.
- 7) 納富継宣. 他 : 新規遺伝子増幅法(LAMP法)の原理と応用, BIOINDUSTRY. 18(2), 15-23, 2001.
- 8) Tsugumori, Notomi. 他 : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28(12), e63, 2000.