

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15475

研究課題名(和文)大麻の系統分類に資するSNPマーカーの探索とその迅速検査法の確立

研究課題名(英文) Search for SNP markers for strain classification of cannabis and establishment of their rapid detection method

研究代表者

山室 匡史 (Yamamuro, Tadashi)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：80646555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大麻草の系統を分類するための指標としてゲノム情報に着目し、次世代シーケンシング技術を活用し、遺伝子マーカーとなり得る一塩基多型(SNP)の探索を行った。

収集した大麻サンプル144点について、24,135箇所のSNPを検出することに成功し、北海道における野生産の大麻が本州の日本在来種と全く異なるグループに分類されることなど、系統に関する様々な興味深い知見を明らかにした。さらに、SNP情報を活用し、日本の在来種大麻(産業用大麻を含む)を他の系統から識別する迅速検出系を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたSNP情報は、向精神成分の含有量、亜種、産地、銘柄、地域、個体等、様々な角度からの解析が可能であり、目的に応じたSNPマーカーを選択し、複数の識別検査系の構築に応用できる。例えば、産業用大麻の遺伝子汚染の有無の確認や汚染源の特定を行い、有益な品種を保護することや、犯罪捜査における押収物の流通ルートの推定を行い、大麻事犯の取り締まりを強化することなど、大麻に関する効果的な検査の実用化に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on genomic information as an indicator for classifying cannabis strains, and utilized next-generation sequencing technology to search for single nucleotide polymorphisms (SNPs) that could serve as genetic markers.

We succeeded in detecting 24,135 SNPs in 144 collected cannabis samples, and revealed various interesting findings about strains, such as the fact that wild cannabis in Hokkaido is classified into a completely different group from the native Japanese species in Honshu. In addition, we were able to construct a rapid detection system that discriminates Japanese native cannabis (including industrial hemp) from other strains using the SNP information.

研究分野：分子生物学

キーワード：大麻 系統分類 SNPマーカー 裁判化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大麻取締法違反による検挙人員が増加傾向にあり、看過できない重大な社会問題となっている。大麻取締法において、大麻とは「大麻草(カンナビス・サティバ・エル)及びその製品」(ただし、大麻草の種子及び成熟した茎を除く)として定義され、向精神成分の多寡やその品種の区別なく取り締まりの対象とされている。犯罪捜査上の鑑定においては、外観検査と含有成分検査の併用により、大麻証明を行っているが、近年、犯罪形態の多様化により、栽培目的の大麻草種子が大量に押収されるような事例が発生しており、それ自体は幻覚成分を含有せず、大麻取締法上の「大麻」に該当しない大麻草の種子からでも何らかの情報を得られれば、捜査上非常に有用である。

また、大麻取締法による厳しい規制の一方で、大麻は古くから麻繊維の獲得や神事のために栽培されてきた歴史を有し、諸外国においては医薬品として処方されるなど、文化的・薬学的に重要な植物でもある。麻繊維に用いられる向精神成分を含まない「繊維種」の大麻と嗜好品や医薬品として用いられる「薬物種」の大麻は同一の植物種であり、それぞれに改良された品種が無数に作出されているものの、その識別のための統一的な指標が存在せず、品種管理の観点からは非常に立ち遅れている。

以上の背景から、大麻のゲノム情報を利用した遺伝子マーカーの構築という本研究の着想を得た。

2. 研究の目的

上述の通り、産業用の繊維種大麻と薬物種大麻で作出されたそれぞれの品種がどのような特徴を有するかは不明瞭であり、各品種の明確な識別手段は存在しない。また同様に、大麻にはインディカ種、ルデラリス種という亜種が知られているが、それらについても、主に形態的特徴から区別されているのみであり、こちらも識別指標が存在していない。

大麻の識別を目的とした遺伝子マーカーとして、縦列型反復配列をはじめとしていくつかの先行研究が知られている(Kohnemann, S. *et al.*, *Int. J. Legal Med.*, 126, p601-606, 2012)が、大麻のように品種改良や交配が盛んに行われる植物においては、世代交代が非常に早く、今後、PCR産物が得られなくなるヌルアレル変異が出現する可能性も高い。すなわち、長期的なニーズに応えるためには、より頑健性の高い遺伝子マーカーを複数構築することが必要となってくる。

そこで本研究では、次世代シーケンス解析技術を活用し、大麻系統分類のための指標となり得る一塩基多型(SNP)を網羅的に探索し、選抜した有用なSNPマーカーの検査法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の解析のために、144の大麻サンプルの収集を行った。内訳は、実際の事件で押収された大麻62点、海外で嗜好用に用いられている薬物種の銘柄30点、日本在来種や北海道野生種、とちぎしろなど国内に由来する大麻23点、健康食品として市販されている大麻種子11点、鳥の餌として市販されている大麻種子10点、インディカ種大麻2点、ルデラリス種大麻2点、その他4点(タイ産麻縄、ネパール産麻縄、中国産麻子仁、中国産おがら)である。これら的大麻サンプルからDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて、プロトコールに従って全ゲノムを抽出した。

得られたゲノムについて、次世代シーケンス解析の一つであるMultiplexed ISSR Genotyping by sequencing(MIG-seq)法による解析を行った。MIG-seq法は、SNP検出を迅速・簡便・安価に実現する手法として、2015年に東北大学の陶山佳久氏により発表された手法であり、2回のPCRとNGSランにより、微量・低品質なDNAサンプルからであっても、ISSR(単純反復配列間領域)に存在するSNPを網羅的に検出することができる。実験条件については既報(Suyama & Matsuki, *Sci. Rep* DOI: 10.1038/srep16963)を参考とし、得られた配列からプライマー配列の除去、低品質配列の除去、リード長の統一処理を行った後、配列解析ソフトウェアStacks(Ver 2.2)を用いてSNP情報と系統情報の出力を行った。

得られた系統情報から系統樹を作成して解析を行うとともに、有用なマーカー候補となるSNPの探索を行った。選択されたSNPについて、検査系を構築した。

4. 研究成果

(1) MIG-seq法による解析結果

MIG-seq法により、144の大麻サンプルから総リード数144,034,315の配列が得られ、24,135箇所のSNPが検出された。試料の状態によっては、高品質なDNAを確保できず、十分な解析結果が得られなかったもの(検出SNP数:50箇所)もあったが、1サンプルにつき、概ね100万リードの配列情報、4,000箇所のSNPを検出することができた。

(2) 系統樹の作成

検出された SNP から、系統ごとの特徴を反映した SNP として、同一個体内でホモ接合であった SNP 5,698 箇所を抽出し、系統樹を作成した（図 1）。本研究の解析から明らかとなった大麻系統に関する知見を下記に列挙する。

鳥飼用種子であっても、フランス産のものは中国産と大きく異なり、欧米産の健康食品に近いグループとなり、産地の影響が大きく反映されていた。

カナダの健康食品に用いられている銘柄は、インディカ種大麻に近い系統であることが示唆された。

北海道の野生産大麻は、他の日本産銘柄と全く異なるグループとなり、欧米産の繊維種大麻に近いグループであった（ただし、北海道の野生産大麻は薬物種であった）。

国内で流通する大麻種子製品のうち、中国産のものとオーストラリア産のものは互いに近い系統であった。

国内唯一の繊維種銘柄であるとちぎしろは、日本在来種が品種改良されたものであり、非常に近いグループとなることが確かめられた。しかし、日本の在来種銘柄は全て薬物種であり、生理種や含有成分プロファイルの違いは系統の類似性と必ずしも一致していなかった。

実際の事件で押収された大麻は、同一事件由来のものや同一パッケージのものが同一グループに分類された。また、特定の海外産嗜好品銘柄と類似性が示され、銘柄推定が可能な場合が存在した。同様に、押収時に標榜されていた大麻の銘柄名について、その信憑性を系統樹から考察できる場合があることが示された。

(3) 有用な遺伝子マーカーの絞り込み

検出された 24,135 箇所の SNP について、様々な観点から、有用なマーカー候補の絞り込みを行った。一例を下記に示す。

大麻の個体識別に有用な領域の探索

配列ごとに存在する SNP 数に着目して解析を行った結果、連続する 50塩基中に 16箇所の SNP が存在する領域が発見された。本領域の配列解析を行うことで、高いレベルでの識別が可能となるほか、同様の領域をさらに追加することで、識別精度を高めることも可能である。

北海道野生種大麻の識別に有用な SNP の探索

北海道野生種大麻 8 個体について、他の銘柄・産地のものと比べて特徴的な SNP（出現頻度 < 0.7）が 537 箇所発見された。また、オホーツク管内の地域 A で得られた 4 個体と同管内の異なる地域 B で得られた 4 個体を分けて解析をすすめたところ、地域による差異が確認された SNP が 97 箇所発見された。さらに、それら 8 個体の間で個体差が確認された SNP も 315 箇所発見され、「産地」「地域」「個体」という異なるレベルでの識別が可能となることが期待された。

亜種の識別に有用な SNP の探索

インディカ種大麻 2 個体に特徴的な SNP（出現頻度 < 0.7）を探索したところ、221 箇所発見された。その内、インディカ種以外の試料で全く確認されない特異的な SNP は 43 箇所であった。一方、ルデラリス種大麻 2 個体に特徴的な SNP は 494 箇所、うち、他の系統で確認されない特異的な SNP は 184 箇所であった。インディカ種大麻は、個体サイズが小さく、屋内栽培に向いているため、海外嗜好品用銘柄として薬物種とのハイブリッド品種が数多く作出されているという背景があり、今回解析したサンプルにもハイブリッド品種が含まれることから、特異的な SNP 数が少なくなっているものと考察された。一方で、ルデラリス種は、嗜好品用銘柄にほとんど用いられないことから、他のサンプルと大きく異なる特異的な SNP が数多く検出されたものと推察された。

日本産大麻の識別に有用な SNP の探索

日本産大麻に特徴的な SNP（出現頻度 < 0.7）が 168 箇所、特異的な SNP が 94 箇所発見された。なお、上述の通り、北海道野生種大麻は系統が大きく異なるため、「日本産大麻」とは異

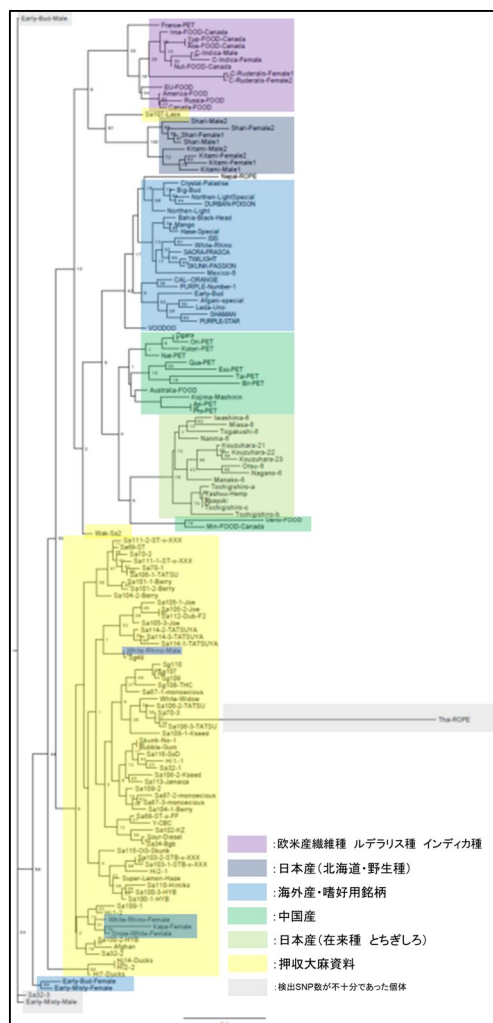


図 1 SNP 情報に基づく大麻系統樹

なる扱いとした。日本産大麻のうち、繊維種大麻であるとちぎしろ 5 個体に絞って解析すると、特徴的な SNP は 97 箇所、特異的な SNP は 22 箇所であった。これらの SNP を利用することで、とちぎしろと日本在来種銘柄を識別することも可能であったことから、品種管理を行う上で非常に有用なマーカーとなることが期待された。

(4) SNP 検査系の構築

SNP 情報をもとにプライマーの設計を行い、特定の SNP を有する場合のみバンドが検出されるアレル特異的 PCR 法による簡便な検査系の構築を試みた。まず、予備検討として、テトラヒドロカンナビノール酸およびカンナビジオール酸合成酵素の遺伝子配列上にある既知の SNP 配列を利用して、薬物種大麻と繊維種大麻を識別する系を確立した。そして、日本産大麻に特徴的な SNP 配列を利用して、当該 SNP を有する場合のみ PCR 増幅が起こる系を確立した。構築された検査系による結果を図 2 に示す。メキシコ産大麻、大津在来種大麻、とちぎしろの 3 銘柄の種子各 8 粒から抽出した DNA を一斉に分析したところ、メキシコ産と大津在来種の個体は全て薬物種、とちぎしろは繊維種であることが確認され、さらに、大津在来種ととちぎしろの個体は全て、日本産大麻識別の検査系において特異的なバンドが検出された。このように、二つの検査系を組み合わせることで、3 銘柄の大麻を種子 1 粒の状態から効果的に識別することが可能であった。

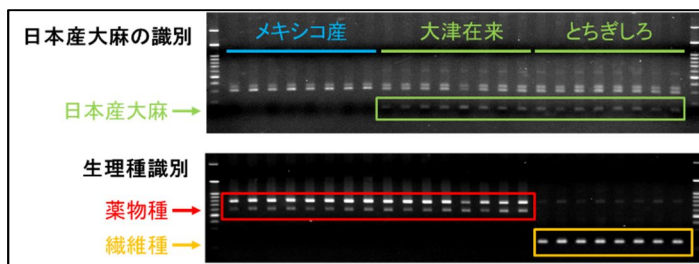


図 2 SNP 検査系の構築

さらに、本研究で得られた SNP 情報を活用することで、向精神成分の含有量、亜種、産地、銘柄、地域、個体等、様々な識別目的に応じた SNP マーカーを選択し、検査系を構築することが可能となる。それにより、産業用大麻の遺伝子汚染の有無の確認や汚染源の特定を行い、有益な品種を保護することや、犯罪捜査における押収物の流通ルートの推定することなど、大麻に関する効果的な検査の実用化に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamuro Tadashi, Miyamoto Shigehiko, Kitamura Masashi, Muro Tomonori, Iwata Yuko T., Segawa Hiroki, Kuwayama Kenji, Tsujikawa Kenji, Kanamori Tatsuyuki, Inoue Hiroyuki	4. 巻 291
2. 論文標題 Development of simple and accurate detection systems for Cannabis sativa using DNA chromatography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2018.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamuro Tadashi, Segawa Hiroki, Kuwayama Kenji, Tsujikawa Kenji, Kanamori Tatsuyuki, Iwata Yuko T.	4. 巻 318
2. 論文標題 Rapid identification of drug-type and fiber-type cannabis by allele specific duplex PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 110634 ~ 110634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2020.110634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山室匡史、宮本重彦、岩田祐子、瀬川尋貴、桑山健次、辻川健治、金森達之、井上博之
2. 発表標題 核酸クロマトグラフィーを用いた大麻草DNA特異的検出系の開発 - 3領域一斉検出系の性能評価 -
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山室匡史、瀬川尋貴、岩田祐子、桑山健次、辻川健治、金森達之、井上博之
2. 発表標題 アレル特異的PCR法を利用した大麻種子のDNA解析 - 薬物種/繊維種の識別及び雌雄判別 -
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山室匡史, 荒金眞佐子, 中村耕, 岩田祐子, 岡田侑己, 瀬川尋貴, 桑山健次, 辻川健治, 金森達之
2. 発表標題 銘柄の異なる大麻のDNA解析による識別
3. 学会等名 日本法中毒学会第39年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山室匡史, 岡田侑己, 瀬川尋貴, 桑山健次, 辻川健治, 金森達之, 岩田祐子
2. 発表標題 呈色反応とDNA検査の併用による大麻種子鑑定法の検討
3. 学会等名 日本法科学技術学会第26回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山室匡史, 岩田祐子, 岡田侑己, 瀬川尋貴, 桑山健次, 辻川健治, 金森達之
2. 発表標題 MIG-seq法を用いた大麻の系統解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------