

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871151

研究課題名(和文) DNA解析による有毒野草バイケイソウと食用山菜の迅速識別法の開発

研究課題名(英文) Species identification of False Helleborine (*Veratrum album*) using real-time PCR and LAMP

研究代表者

吉川 ひとみ (Kikkawa, Hitomi)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：20392269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：バイケイソウは、誤食による中毒の発生件数が日本で最も多いものである。本研究は、種特異的なDNA領域を利用することにより、迅速正確な特定を目指した。DNAバーコーディング領域の解析を行った結果、バイケイソウの種判別にはtrnH-psbA及びtrnL-trnF領域を用いるのが妥当と考えられた。バイケイソウDNAのリアルタイムPCRによる試験を行ったところ、trnH-psbAについては1pg から、trnL-trnFについては10pgから種特異的な検出ができた。trnL-trnF領域についてLAMP法プライマーを設計し試験したところ、80pgのDNAからバイケイソウ特異的な検出が可能であった。

研究成果の概要(英文)：Veratrum album is one of the most common causative plants of poisoning by accidental ingestion in Japan. In this study, rapid and specific detection methods for identification of *V. album* by real-time PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) were developed. First, direct sequencing of specific loci for plant species identification, known as DNA barcoding to search for species-specific regions was performed, and the results indicated that trnH-psbA and trnL-trnF regions were useful for identification of *V. album*. I next developed real-time PCR to detect *V. album*. 2 primer sets utilizing species-specific sequences in trnH-psbA and trnL-trnF were designed. One primer set, utilizing trnH-psbA, could detect 1 pg *V. album* DNA, and another primer set, utilizing trnL-trnF, could detect 10 pg DNA. Both primer sets were specific for *V. album*. Finally, the LAMP primer set for trnL-trnF region was designed. The detection limit was 80 pg, and the primer set was specific for *V. album*.

研究分野：分子生物学、法科学

キーワード：バイケイソウ 誤食 食中毒 DNA real-time PCR LAMP DNAバーコーディング

## 1. 研究開始当初の背景

日本国内において野生の有害植物は200種あるといわれている。それらの中でもバイケイソウによる、山菜と誤認して食したことによる中毒事案は最も発生件数が多いものである。中毒事案発生時には、形態や機器分析により検査が行われているが、調理等により形態学的な特徴が失われていたり、胃内容物など機器分析のための前処理が難しい場合がある。このような場合でも、他の検査法により分析可能となれば、中毒事案の解明に役立つと考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、DNA解析による植物種同定法が盛んに報告されている。DNAを用いることにより、従来解析困難であった事案でも死因の推定が可能となれば、法医学に多大な貢献ができる。さらに、迅速な中毒原因判明により、患者の適切な治療、救命につながることを期待できる。本研究は、種特異的なDNA領域を利用することにより、バイケイソウの迅速正確な特定を目指す。

近年、DNAを用いた植物種の同定方法として、種のレベルで保存されている領域の配列を決定する方法(DNAバーコーディング)がめざましい進歩を遂げており、2009年には陸上植物の標準的バーコード領域(CBOL推奨マーカー)が発表された。この領域の配列を利用することで正確な種の同定が期待できる。しかし、バイケイソウに関する解析はまだ研究途上であり、例えば、2012年10月現在、CBOL推奨マーカーの*trnH-psbA*については公開データベース(NCBI)上に配列が未登録であった。そこで、本研究では、まず、バイケイソウおよび近縁植物の各種バーコーディング領域(*rbcL*、*trnH-psbA*、*trnL*、*trnL-F*)の配列を解析し、遺伝的な位置づけを明らかにすることとした。

次に、得られた種特異的な配列を利用して、いずれもDNAによる迅速同定に用いられているTaqMan probeを用いたreal-time PCRによるバイケイソウ同定法及びLAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法による同定法の構築を行うことにした。TaqMan probe法は、PCR増幅にともない蛍光を発するTaqManプローブを利用して、ターゲットを検出する方法である。LAMP法とは、標的領域に対して設計した特殊なプライマーを

用いて、一定温度(65付近)で保温することにより反応が進む、高い特異性、増幅効率を持つ遺伝子増幅法であり、迅速で簡易に検査可能であることから、医療、食品、環境、農業、畜産といった幅広い分野において遺伝子検査法として用いられている。

## 3. 研究の方法

### (1)バイケイソウ類特異的DNA配列の解明

大学や公立の薬用植物園、山野草販売業者から入手した、バイケイソウをはじめとする有毒のシュロソウ属、近縁植物(メランチウム科)バイケイソウと形態が類似している山菜のオオバギボウシやギョウジャニンニク、および誤食されることのあるイヌサフラン、チョウセンアサガオ等を試料として用いて、試料からDNAを抽出し、葉緑体上の各種バーコーディング領域(*rbcL*、*trnH-psbA*、*trnL*、*trnL-F*)の配列を解析した。

### (2)real-time PCRによるバイケイソウ迅速同定系の開発

(1)で得られた種特異的な配列を利用して、TaqManプローブ法に基づく検出法を構築し、検出下限及び種特異性の確認を行った。

食中毒事案の試料を想定し、加熱等の調理処理を行った試料や人工胃液で処理した模擬胃内容物を作成し、当該試料についても検査を行った。

### (3)LAMP法を用いたバイケイソウ迅速同定系の開発

(2)と同様に、種特異的な配列を利用して、LAMP法による検出法を開発し、検出下限及び種特異性の確認を行った。

また、加熱等の調理処理を行った試料や人工胃液で処理した模擬胃内容物についても検査を行った。

## 4. 研究成果

### (1)バイケイソウ類特異的DNA配列の解明

配列解析の結果、解析を実施したすべての領域で種特異的な配列が見られた。そのうち、*rbcL*の種特異的な配列が、2塩基と一番少なかった。その他の3領域では、種特異的な配列がバーコーディング領域全体に散在していた。さらに*trnL*では種内変異が見られたが、*trnH-psbA*、*trnL-trnF*については種内変異は見

られず、DNAバーコーディングを利用して検出を行うには、この2領域が適切と考えられた。

#### (2)real-time PCR によるバイケイソウ迅速同定系の開発

(1)で得られた種特異的な配列を利用して、TaqManプローブ法に基づく検出法の構築を試みた。*trnH-psbA* (増幅長約100 bp) 及び *trnL-trnF*(増幅長約200 bp)、双方の特異的な配列をターゲットとしたプライマー設計が可能であった。設計したプライマーを用いて real-time PCRによる検出を試みたところ、*trnH-psbA*については1pgのDNAから、*trnL-trnF*については10pgのDNAから検出が可能であった。

バイケイソウおよび近縁植物、他の誤食の原因となる有毒植物、バイケイソウと形態が類似している山菜のオオバギボウシやギョウジャニンニクを用いて特異性の確認を行ったところ、ターゲット特異的な検出ができた。バイケイソウと同じく芽生えの形態がオオバギボウシやギョウジャニンニクに類似するために食中毒の原因となるイヌサフランや、食用のオオバギボウシ、ギョウジャニンニクについても陰性であった。よって、当該試験による疑陽性の危険性はないことが示唆された。

さらに、加熱等の調理処理を行った試料や人工胃液で処理した模擬胃内容物についても検査を行ったところ、当該試料についても同定可能であった。

#### (3)LAMP法を用いたバイケイソウ迅速同定系の開発

最終年度では、*trnL-trnF*上のバイケイソウ種特異的な領域を利用してLAMP法による検出を試みた。その結果、80 pg のDNAから検出可能であった。

Real-time PCRと同様に、バイケイソウおよび近縁植物、他の有毒植物、バイケイソウと形態が類似している山菜を用いて特異性の確認を行ったところ、ターゲット特異的な検出が可能であった。イヌサフランが陰性を示したことから、当該試験においても疑陽性の危険性はないことが示唆された。調理処理を行った試料や模擬胃内容物について検査を行った結果、LAMP法においても正しく同定可

能であった。

以上の結果から、本研究で開発した手法により、バイケイソウを少量から特異的に検出できると考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 4 件 )

吉川ひとみ, 杉田律子, 瀬戸康雄  
法科学的検査のための植物 DNA 抽出キットの比較.  
分析化学 査読有  
**63**(3)、2014、269-273

Hitomi S. Kikkawa, Kouichiro Tsuge, Ritsuko Sugita  
Real-Time PCR Quantification of Chloroplast DNA Supports DNA Barcoding of Plant Species.  
Molecular Biotechnology  
8(3), 2016,12-219

吉川ひとみ, 柘 浩一郎, 杉田 律子, 荒金眞佐子  
バイケイソウ ( *Veratrum album* ) の種特異的迅速識別法の開発  
DNA 多型 査読無  
2016 in press

吉川ひとみ, 柘 浩一郎, 杉田 律子  
リアルタイム PCR による法科学的検査のための植物由来 DNA 定量法の開発  
DNA 多型 査読無  
2016 in press

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

吉川ひとみ, 杉田律子, 瀬戸康雄  
法科学的検査のための DNA 抽出キットの比較  
表示・起源分析技術懇談会第9回講演会  
2013/7/4、農研機構・中央農業総合研究センター(茨城県つくば市)

Hitomi S. Kikkawa, Kouichiro Tsuge, Ritsuko Sugita.  
Quantitative analysis of botanical DNA by

real-time PCR for forensic discrimination and identification

American Academy of Forensic Sciences 67th annual scientific meeting

2015/2/19 アメリカ合衆国 オランダ

吉川ひとみ, 杉田律子

有毒野草バイケイソウのDNAバーコーディングによる識別

日本薬学会第135年会

2015/3/27 神戸サンボホール (兵庫県神戸市)

Hitomi S. Kikkawa, Hiromi itamiya,

Kouichiro Tsuge, Ritsuko Sugita

Species identification of False Helleborine

(*Veratrum album*) using real-time PCR

7th European Academy of Forensic Science

Conference

2015/9/6-11 チェコ共和国 プラハ

吉川ひとみ, 柘 浩一郎, 杉田 律子

リアルタイム PCR による法科学的検査のための植物由来 DNA 定量法の開発

日本DNA多型学会 第24回学術集会

2015/11/19-20 岡山大学 (岡山県岡山市)

吉川ひとみ, 柘 浩一郎, 荒金 眞佐子,

杉田 律子

バイケイソウ (*Veratrum album*) の種特異的迅速識別法の開発

日本DNA多型学会 第24回学術集会

2015/11/19-20 岡山大学 (岡山県岡山市)

吉川ひとみ, 荒金眞佐子, 窪田聡, 杉田律子

LAMP 法を用いたバイケイソウ (*Veratrum album* subsp. *oxysepalum*) の迅速識別法の開発

日本植物分類学会第 15 回大会

2016/3/6-8 富山県富山市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川ひとみ (Hitomi S. Kikkawa)

科学警察研究所・法科学第三部化学第四研究室・主任研究官

研究者番号：20392269