

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660212

研究課題名(和文)より簡便・迅速・正確な分子種判別法の構築

研究課題名(英文) New molecular discrimination for animal species using DNA polymorphism

研究代表者

西堀 正英 (Masahide, NISHIBORI)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：80237718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：加工食品やその原材料に対する食品検査や生活圏に生息する動物による社会問題などの対策として動物種の特定が必要となる場合が存在する。家畜、野生動物、愛玩動物を対象とした分子種判別法を構築したが、加熱、加工、劣化した検体等においては検出が困難であった。本研究では状態の悪い検体においても正確な種判別が行えるように家畜、野生動物、愛玩動物について種特異的PCR primerを設計した。Multiplex PCRとPAS(Printed array strip)を組み合わせることで種判別を行った。対象の全ての動物種について幅広い検体において状態に左右されず、正確な種判別が十分実施可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Food problems are various, contamination of the food, such as animal hair, even for such repellent foods such as problems which are allergies, religion and culture, the interest is high not only in Japan but also over the world. In these methods many problems occurred, such as the minute size, poor preservation conditions and absence of DNA for analysis. Here, we used Multiplex PCR that can analyze many samples simultaneously. In addition, printed array strip (PAS) was also used which made analysis quick, simple and cheap. We have designed specific PCR primers in each animal species (domestic, wild and pet animals), and PCR products for all animal species were obtained. So, this method was very useful for species discrimination from fresh, processed meat and food made from domestic and wild animals. Also it was useful for forensics identification of human and animals. Therefore it was possible to construct a fast, simple and high sensitive detection method in molecular discrimination.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：分子種判別 動物 ミトコンドリアDNA DNA鑑定 簡便・迅速・正確 PAS検出 共通性と特異性 種特異的PCR primer

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の社会的・学術的背景

WWF 報告書『Wildlife Crime Scorecard: Assessing Compliance with and Enforcement of CITES Commitments for Tigers, Rhinos and Elephants(野生動物犯罪に関するスコアカード: 象牙、犀角、虎骨取引を CITES で規制するための法令遵守と法施行)』。は、「ワシントン条約(絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引における条約)」会議に向け、絶滅危惧種および野生動物への犯罪、密輸密猟に警鐘を鳴らすものになっている。右の



写真(密猟・密輸啓発)が表しているように、国際空港や港などでは種判別を用いた検疫によって野生動物の密輸密猟を未然に防ぐことが期待されている。現行の方法では、検疫の現場で PCR

電気泳動 染色 検出

の一連の作業を行うには時間と手間がかかりすぎるなどの問題が残っている。また、種判別法のうち分子種判別法は検疫だけでなく、2013年 EU で明らかになった牛肉への馬肉混入事件のような肉種を偽った事件の捜査にも適用されている。肉種の優れた検知法あるいは種判別法は、不正競争やその予防に大きな社会的効果があると報告されている(Haider *et al.*, 2012)。ゆえにこれまでの種判別法にもまして**迅速かつ正確な種判別法の確立は社会貢献度も大きく、また食の品質の観点からも新たな種判別法の確立は急務**である。申請者は、これまでゲノム情報を用いたニワトリ、家畜、魚類など多くの動物について、動物のゲノム解析・分子系統学的解析の実績を積んできた(Rose *et al.*, 2013, カイアシ類; Islam and Nishibori, 2012, ニワトリ; 西堀ら, 2012, ブタ; Shimogiri *et al.*, 2012, ニワトリ; Wada *et al.*, 2010, シカ; Yoshita *et al.*, 2009, マンボウ; Nishibori *et al.*, 2005, ヤケイとニワトリ)。この経験を生かし、種判別対象の動物ゲノムの特異的領域がミトコンドリアゲノム(ミトゲノム)の 16S および 12S ribosomal DNA 領域に存在することを明らかにしている(Nishibori *et al.*, 2002; 2005)。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

公開されている全ゲノム情報から分子種判別に最適な DNA 領域を動物種毎に確定する。

作業を簡略化させて迅速でかつ誤判定のほとんどない正確な分子種判別法、特に電気泳動を行わないクロマトペーパー法を利用した検出方法 PCR DNA クロマトグラフィ(PAS; printed-array-strip)を開発する。さらに、判定法の保証には、デジタル PCR を利用した質および量的な裏付けを実施する。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

これまでの分子種判別法は、時間と解析機器にお金をかけて正確な分子種判別を行われてきた。しかし本研究ではこれまでとは逆に時間とお金をかけずに簡易かつ容易に正確な種判別ができることが期待できる。これには技術的のみならず実用的に大きな意義があり、動物検疫等では野生動物の密猟防止効果も期待でき、社会的に大きな意義を持つ。絶滅危惧動物および野生動物の保護・保全にも繋がり、学術的にも大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

国際空港や港などでは種判別を用いた検疫によって野生動物の密輸密猟を未然に防ぐことが期待されている。現行の方法ではその簡便性、迅速性および正確性の点で多くの問題が残っている。また、種判別法のうち分子種判別法は検疫だけでなく、2013年 EU で明らかになった牛肉への馬肉混入事件のような肉種を偽った事件の捜査にも適用されている。ゆえに簡便、迅速、正確な種判別法の確立は社会貢献度も大きく、食の品質の観点からも新たな種判別法の確立は急務である。本研究は、**公開されている全ゲノム情報から分子種判別に最適な DNA 領域を確定し、PCR 電気泳動 染色 検出の一連の作業を簡略化させて迅速でかつ誤判定のほとんどない正確な分子種判別法を開発することを目的とする。**

3. 研究の方法

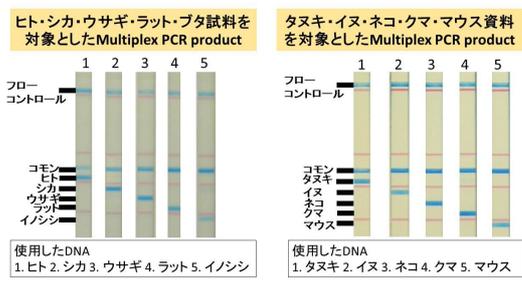
本研究では、(1)ミトゲノム情報が報告されている家畜および野生動物の全ミトゲノム配列をアライメントし、**特異性と共通性**領域を明らかにする。絶滅危惧あるいは希少種については全ミトゲノム配列を Nishibori *et al.* (2002); Wada *et al.* (2010) に従って決定した上で、その特異性と共通性領域を明らかにする。

(2)この**特異性と共通性**領域情報から PCR プライマーを動物種毎に合成し、DNA クロマトグラフィである PAS(printed-array-strip)を作製する。(1)と(2)で作製できた PCR プライマーおよび PAS を利用し、分子種判別を実施する。

(3)本分子種判別法の正確性と担保するために、作製した PCR プライマーを利用して、デジタル PCR を実施し、質および量的な裏付けを実施する。

4. 研究成果

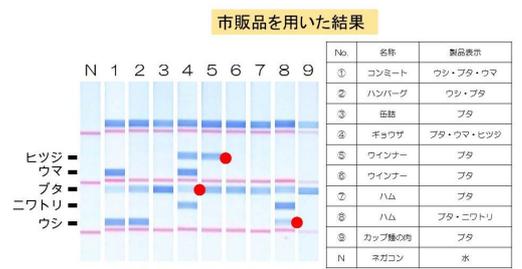
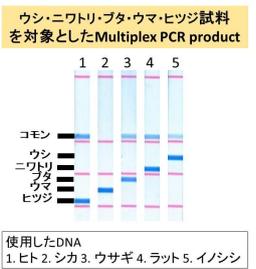
本研究で設計した PCR primer set を用いた Multiplex PCR において、それぞれの動物種に対して種特異的 PCR 産物および共通 PCR 産物が得られた。PAS 法においても、それぞれの動物種において種特異的 PCR 産物由来の PAS バンドを、指定された PAS ペーパーの位置に検出することができた。市販の食品および加熱処理した試料では、ウシ、ブタ、ニワトリ、イヌ、クマ、マウス、ヒト、シカ、ウサギにおいて PAS 法による種判別が可能であった。



本研究では PCR 産物が 120 bp 以下のサイズになるように primer set の設計を行い、PAS 法においても種判別が十分可能であった。

加熱、加工などの劣化した試料において DNA は断片化されるが本研究で設計した primer set を用いることで劣化により断片化が進行した DNA についても PCR で十分検出が可能となる。

市販の食品および加熱処理を行った試料の検出検討においては、検出されない動物種も存在した。今後は試料の加熱処理の条件設定や DNA 抽出方法なども含めたさらに総合的な検討が必要となる。



④では製品表示には無い「ニフトリ」、⑤では「ヒツジ」、⑧では「ウシ」が検出された。表示義務のない微量成分だと考えられる。

本研究で再検討および再構築した PAS 法を用いることにより、加熱、加工、腐敗などにより劣化し DNA が断片化された試料に対しても種判別を行うことが可能となる。加えて本研究は従来の種判別法と比較して迅速、簡便、高感度かつ安全に実施できる。そのため食品の食品検査や我々の生活圏に生息する野生動物の対象動物種の特定などにおける正確な種判別法として有用であると大きく期待される。

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 2 件)
1. 伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．生活圏に生息する動物種を対象とした分子種判別法の利活用に関する研究. DNA 多型, 24:印刷中. 2016. (査読無)
 2. 伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．Multiplex PCR 法と簡易検出法を組み合

わせた動物の分子種判別法に関する研究. DNA 多型, 23: 61-63. 2015. (査読無)
[学会発表](計 9 件)

1. 伊藤文香・大西諒貴・山下裕樹・安江博・西堀正英．簡易検出法による分子種判別方法の検討およびその利活用．日本畜産学会第 121 回大会, 2016 年 3 月 27 日～30 日, 日本獣医生命科学大学, 武蔵野市．
2. 伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．生物圏に生息する動物を対象とした分子種判別法の利活用に関する研究. 日本 DNA 多型学会, 2015 年 11 月 19 日～20 日, 岡山大学津島キャンパス「創立五十周年記念館」岡山市．
3. 大浦孟士・竹中崇洋・佐々木隆弘・久戸瀬哲也・小林美紀・日野大樹・中山英樹・森好浩行・森川俊雄・中木真一・伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．PAS を用いた新しい動物種判別法の法医学分野への応用．日本法科学技術学会第 21 回学術集会, 2015 年 11 月 12 日～13 日, 柏の葉カンファレンスセンター, 柏市．
4. 伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．生物圏に共存する動物を対象とした分子種判別法の検討およびその利活用. 日本動物遺伝育種学会第 16 回大会, 2015 年 11 月 6 日～8 日, 神戸大学大学院農学研究科, 神戸市．
5. 浦崇明・野田亜矢子・南心司・安江博・西堀正英．PAS を用いた家禽の非侵襲的な分子性判別法の構築．日本家禽学会 2015 年春季大会, 2015 年 3 月 30 日, 宇都宮大学, 宇都宮市．
6. 伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．Multiplex PCR 法と簡易検出法を組み合わせた分子種判別法の構築．日本畜産学会, 2015 年 3 月 28 日～30 日．第 119 回日本畜産学会大会, 宇都宮大学, 宇都宮市．
7. 伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英．Multiplex PCR 法と簡易検出法を組み合わせた動物の分子種判別法に関する研究. 日本 DNA 多型学会, 2014 年 11 月 26 日～27 日, 愛知県産業労働センターウインクあいち, 名古屋市．
8. 浦崇明・野田亜矢子・南心司・西堀正英．鳥類の分子性判別技術に関する研究．日本動物遺伝育種学会第 15 回大会, 2014 年 10 月 30 日～11 月 1 日, 独立行政法人理化学研究所, 和光市．
9. 大西諒貴・伊藤文香・川瀬三雄・丹羽孝介・安江博・西堀正英．PAS(Printed-array-strip)を用いた新たな家畜種判別法の開発．日本動物遺伝育種学会第 15 回大会, 2014 年 10 月 30 日～11 月 1 日, 独立行政法人理化学研究所, 和光市．

[その他]
ホームページ等
<http://www.rcas.hiroshima-u.ac.jp/index.html>

「日本型(発)畜産・酪農技術開発センター」(吉村幸則センター長(大学院生物圏科学研究科 教授))では、「安全で高い生産機能を発揮する先進畜産技術開発の教育研究」を目的とし、国内外の研究ネットワークを形成しながら、最新の基礎研究を活かしたイノベーションにより畜産・酪農を新産業化し、食料増産を介して世界(特にアジア地域)に貢献することを目指しています。

優秀研究賞・発表賞受賞(計 2件)

(1)伊藤文香・大西諒貴・山下裕樹・安江博・西堀正英. 簡易検出法による分子種判別方法の検討およびその利活用. 日本畜産学会第121回大会, 2016年3月27日~30日, 日本獣医生命科学大学, 武蔵野市.

(2)伊藤文香・大西諒貴・安江博・西堀正英. 生物圏に生息する動物を対象とした分子種判別法の利活用に関する研究. 日本DNA多型学会, 2015年11月19日~20日, 岡山大学津島キャンパス「創立五十周年記念館」岡山市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

西堀 正英 (NISHIBORI Masahide)

広島大学大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号: 80237718