

博士学位論文内容要旨

Abstract of Dissertation

専攻 Major	応用生命科学専攻	氏名 Name	崔 巍 (サイ ギ)
論文題目 Title	反復配列を用いたサケ類およびサバ類の簡便で高感度な検出法の開発		

背景・目的

日本で「サケ・サバ類」は食品表示法により「特定原材料に準ずるもの」に指定されており、加工食品中に含まれる場合、その表示が推奨されている。また、サケ・サバアレルギー患者にとっては、たとえ微量なサケ・サバを摂食しても、アレルギーが発症する可能性がある。微量なサケ・サバを検出するためには高感度な検出法が必要である。現在、それらの検出法は PCR と電気泳動法を組み合わせた方法または real-time PCR 法によってゲノム DNA 上およびミトコンドリア DNA (mtDNA) 上の遺伝子を標的として構築されている。そこで、本研究は従来法よりも簡便で高感度なサケ・サバ特異的または種特異的な検出法を開発することを目的とした。標的遺伝子のコピー数が多いほど、検出方法の感度が高くなるため、我々はコピー数の多いサケ特異的な高感反復配列である *Hpa I* family、サバのゲノム DNA 上の反復配列である internal transcribed spacer (ITS) を用いて、real-time PCR 法又は loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を使用して、検出法の開発を行った。

試料・方法

本研究ではサケ科サケ属の 8 種、大西洋サケ属の 2 種、イワナ属の 3 種、イトウ属の 1 種、サバ属の 4 種を試験の対象とした。また、原材料表示にサケを含む 16 加工食品、サケを含まない 5 加工食品、サバを含む 14 加工食品、サバを含まない 4 加工食品を検出法の実用性の評価対象とした。検出法について、SYBR Green による real-time PCR 法または LAMP 法を使用した。

結果・考察

サケ科魚類の検出法について、本研究はゲノム DNA 上に存在するサケ科特異的な短鎖散在反復配列 *Hpa I* family、mtDNA またはゲノム DNA 上のリボソーム DNA (rDNA) この 3 種の多コピー遺伝子のコピー数を最初に比較した。まず、サケ科魚類の RAG1 配列が 1 コピー遺伝子であることを証明し、RAG1 配列を内在性対照として、本研究で設計した *Hpa I*、ミトコンドリアの *Cytochrome b* および 18S rDNA の各プライマーペアを用い、サケ科 11 種の *Hpa I*、*Cytochrome b* および 18S rDNA のコピー数を算出した。その結果、*Hpa I* は 15,000 前後、*Cytochrome b* は 100 前後、18S rDNA は 1,000 前後のコピー数を有していることがわかった。Real-time PCR 反応効率の違いによって引き起こされるコピー数の変動を考慮しても、*Hpa I* のコピー数は他の 2 つよりもはるかに高いことが明らかとなり、より多いコピーを持つ *Hpa I* family をサケ科高感度検出法における PCR 増幅対象にした。サケ *Hpa I* 検出プライマーを用い、多様な生物種 DNA からなる DNA mixture 20 ng を鋳型として、20 fg までのサケ DNA が検出でき、mtDNA をターゲットにした既存法よりも 100 倍高い検出感度を達成した。また、サケを原材料に含む加工食品 16 種についても特異的検出に成功した。開発したサケ科魚類特異的な検出法は

感度が高く、従来法では検出できない程の微量なサケ DNA の検出に成功した。

サバ属 4 種の検出法について、サバ属は特異的な短鎖散在反復配列が不明であるため、なるべくコピー数の多い rDNA の高度可変部位である ITS 領域を標的として検出法を開発した。当研究室で解析されていたサバ 4 種の ITS 配列の情報を基にサバ特異的または種特異的な検出 PCR プライマーを設計した。これらのプライマーを用いた real-time PCR では、サバ以外の生物 78 種の DNA は検出されず、標的のサバ DNA のみを特異的に検出できた。絶対検出限界はサバ DNA 1 pg、相対検出限界はサバ肉含有量比 0.001%であった。日本では表示義務食品と表示推奨食品を定め、表示閾値をタンパク質 10 µg/食品 1 g (対応するアレルゲン可溶性タンパク質重量/食品重量) と定めている。開発したサバ検出法は、混合物から抽出した DNA を使用して食品混合物 1 g あたり 10 µg (0.001%) のサバ肉が存在する場合に、食品混合物からサバを検出できることを実証しており、日本におけるアレルギー食品表示の基準を十分に満たす感度を有していると考えられた。なお、10 µg のサバ肉に含まれるアレルゲンタンパク質量は 10 µg よりも相当少ない量しか含まれていないため、開発したサバ検出法は日本で規定されているアレルギー表示閾値をはるかに下回る非常に高感度な検出法であると言える。

サバ類の検出について、さらに簡便な LAMP 法による検出法も開発した。サバ類特異的 (サバ 4 種共通) あるいはサバ種特異的検出のための LAMP プライマーをサバ rDNA の ITS 上に設計し、65°C で 35~60 分間のインキュベーションし、目視試薬 Hydroxy Naphthol Blue が紫色から青色へ変化することにより標的サバ特異的な検出が可能であることを確認した。その検出限界は少なくともサバ DNA 100 pg であった。Real-time PCR に比べて感度は劣るが、特別な機器を必要としないため、汎用性は非常に高いと考えられる。また、real-time PCR 検出系も LAMP 検出系もサバを原材料に含む加工食品の特異的検出に成功した。Real-time PCR 検出系は検出感度が高く、LAMP 検出系は簡便で汎用性が高いので、目的に応じた使い分けが可能である。