

博士学位論文要約  
Summary of Dissertation

専攻 Major	応用生命科学専攻	氏名 Name	崔 巍
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		

問題設定

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。魚全体が明らかな状態であれば、ある程度、形態学的特徴により魚種を識別できるが、加工後は魚を目視で識別することはできず、消費者は食品表示からのみ「サケ・サバ類」の存在を知ることができる。つまり、加工食品中の成分を特定することは困難であるため、表示制度の信頼性を確保するには、加工食品中の「サケ・サバ類」を特異的に識別する信頼性の高い検出法の開発が必要である。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。

方法論

サケ科魚種検出法について、DNA 中に高頻度で反復して存在するサケ類特異的な短鎖散在反復配列 SINE である *Hpa* I、mtDNA 上の *Cytochrome b* と rDNA 上の 18S rDNA のコピー数を定量し、よりコピー数が多い DNA エレメントを real-time PCR 検出法の標的 DNA にすることを本研究では考えた。サバ属魚種検出法について、本研究室の先行研究でサバ 4 種間の ITS 領域の類似度は、ITS 1 配列で 64%、ITS 2 配列で 70% であることが明らかにされており、より類似度の高い ITS 2 配列内に real-time PCR 検出法のサバ特異的な検出プライマーペアを、より類似度の低い ITS 1 配列内に real-time PCR 検出法のサバ種特異的なプライマーペアを作製し、それらのプライマーペアの実用性の検証を実施した。一方、real-time PCR により構築されるサバ検出法は、複雑な機器や操作の必要があって、検査関連部門はサバ食品の表示の管理に多くの時間と人員を投資する必要がある。それに対して、60~65°C の定温で DNA が増幅できるという特徴がある LAMP 法はより簡便性が高い。この特徴によって、LAMP 反応はサーマルサイクラーのような機器を必要としない。簡易なインキュベーションを用いた反応が行える。加えて、LAMP 産物の生成の有無を目視で確認ができる。PCR 法と比べると、LAMP 法はより簡便なサバ検出法を開発することができた。

結論・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 のみの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。