

# ITS 1 領域塩基配列解析による植物種同定の一事例

山口県環境保健センター

立野幸治, 尾上史一\*1, 村田祥子, 岡本玲子, 戸田昌一, 宮垣明彦, 調恒明

\*1 : 現 薬務課

One case of the plant identification by the ITS 1 region base sequence analysis

Koji TACHINO, Fumikazu ONOUE\*1, Sachiko MURATA, Reiko OKAMOTO, Shoichi TODA,  
Akihiko MIYAGAKI, Komei SIRABE

*Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment*

*\*1 Pharmaceutical Division*

## 1 はじめに

平成 26 年 11 月, 県内において自然薯と思ひ, 種不明の植物の根(図 1)を食した男性が, 嘔吐, 下痢を発症した食中毒疑い事例が発生した。

しかしながら, 確保された原因食品は根のみであり, 当該植物の茎, 葉がなかったため形態学的には植物種同定に至らず, 食中毒の断定には至らなかった。その後, 参考文献<sup>1)</sup>により, 当該植物の根を用いて Internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域の塩基配列解析により植物種を同定したので報告する。

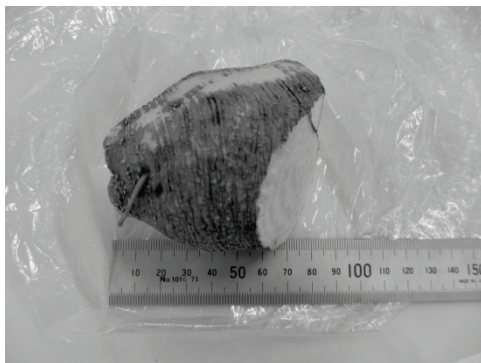


図 1 種不明の植物の根

## 2 使用機器

真空凍結乾燥機は, 株式会社東洋製作所製 ADVANTEC VF-35 を, 粉碎器は, 岩谷産業株式会社製, LaboMilser LM-2 を, 遠心分離器は, エッペンドルフ社製 Centrifuge 5415D を, 振とう器は EYERA 社製 CUTE MIXER CM-1000 を, PCR 増幅反応装置は, ライフテクノロジー社製 Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700 を, 分光光度計は, 島津製作所株式会社製

Bipspec-nano を, 電気泳動装置は, 株式会社アドバンス製 Mupid-exu を, サイクルシーケンス用サーマルサイクラーには, ライフテクノロジー社製 Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler を, 塩基配列解析装置は, ライフテクノロジー社製 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer を使用した。

## 3 使用試薬類

### (1) DNA 抽出用試薬

CTAB(Hexadecyltrimethylammonium)は, SIGMA-ALDRIC 社製を, 0.5 mol/L EDTA(pH8), 1 mol/L Tris-塩酸(pH8)は, ナカライテスク株式会社製分子生物学研究用を, 食塩は, 関東化学株式会社製特級を, PCI (フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール 25:24:1)は, ナカライテスク株式会社製を, クロロホルムは, 和光純薬工業株式会社製特級を, イソプロピルアルコール, エタノールは, 和光純薬工業株式会社製分子生物学用を, RNase A は, QIAGEN 社製を, プロテイナーゼ K は, PROMEGA 社製を, TE(10 mmol/L TrisHCl(pH8); 1 mmol/L EDTA(pH8)は, 株式会社ニッポンジーン製遺伝子工学研究用を使用した。なお, CTAB 緩衝液は, ビーカーに, 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 8 mL, 1 mol/L Tris-塩酸 (pH8.0) 20 mL, 5 mol/L 食塩水 56 mL を入れ, 約 150 mL となるように水を加え, 攪拌しながら CTAB 4g を加えて完全に溶解した。さらに水を加え, 200 ml として滅菌したものを用いた。

### (2) PCR 用試薬

DNAポリメラーゼは, ライフテクノロジー社製 AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with Buffer II and MgCl<sub>2</sub>

(Cat# N8080259)を使用した。プライマーは、株式会社ファスマック製植物異物同定用プライマーセット(Cat# F111-1K)を使用した。

(3) 電気泳動用試薬

泳動用緩衝液は、関東化学株式会社製 10× TBE緩衝液を、アガロースは、Roche Diagnostics GmbH製Agarose Leを、分子量マーカーは、タカラバイオ株式会社製100pb DNA Ladderを、ゲルローディング緩衝液は、タカラバイオ株式会社製6×Loading Bufferを、エチジウムブロミドはALDRICH社製を使用した。

(4) 塩基配列解析用試薬

PCR 産物の精製には、キアゲン社製 MinElute PCR Purification Kit(Cat# 28004)を、PCR 産物の蛍光標識には、ライフテクノロジーズ社製 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Cat#4337455)を、未反応蛍光色素の除去には、GE ヘルスケア社製 AutoSeq G-50 を使用した。

4 実験

(1) DNA 抽出

DNA 抽出はCTAB 法により 3 点並行で行った。

まず、種不明の植物の根を細切りした後、一昼夜凍結真空乾燥後 LaboMilser LM-2 で粉碎したもの 120 mg を、1.5 ml マイクロチューブに量りとり(検体 1-3)、CTAB 緩衝液 1.6 mL を加え、磨砕した後 60 °C、30 分間インキュベートし、14,000 rpm、3 分間遠心分離した。上清約 700 µl を採取して、新しいチューブへ移し試料溶液に等量の PCI を加え、2 分間激しく振り、14,000 rpm、15 分間遠心分離した。上層を新しいチューブに採取し等量の CIA を加え、2 分間激しく振り、14,000 rpm、3 分間遠心分離した。上層を新しいチューブに採取し試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、30 秒間チューブを転倒混和した後、12,000 rpm、3 分間遠心分離した。上清を捨て 70%エタノール 800 µl を加え、転倒混和し、3 分間静置した後、12,000 rpm、3 分間遠心分離した。上清を捨て、5 分間真空乾燥し、TE 100 µl、RNase A (10 mg/mL) 2 µl を加え、DNA を溶解した。37 °C で 30 分間静置した後、400 µl の CTAB 抽出液を加え、500 µl の CIA を加えて軽く混和し、12,000 rpm、15 分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取した。試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、30 秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、12,000 rpm、3 分間遠心分

離し、上清を捨て、5 分間減圧乾燥後、TE 50 µl を加え、DNA を溶解し、DNA 溶液とした。

次いで、分光光度計Bipspec-nanoで、DNAの純度及び量を確認した。

(2) PCR

反応液は表 1 に示す組成で、PCR は表 2 に示す条件で行った。なお、Template DNA は、DEPC 水で 20 ng/µl に希釈した。

表 1 反応液組成表

試薬	添加量 (µl/tube)	最終濃度
DEPC Water	14.875	—
10×PCR Buffer II (-MgCl <sub>2</sub> )	2.500	×1
dNTP mixture	2.500	0.2mM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.500	1.5mM
AmpliTaq Gold (5U/µl)	0.125	0.625U
F-primer (25µM)	0.500	0.5µM
R-primer (25µM)	0.500	0.5µM
Template DNA	2.500	20ng/µL
Total	25.000	

表 2 PCR 反応条件

温度	時間	
94°C	9 min	} 35 cycles
96°C	1 min	
58°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	hold	

(3) 電気泳動

Agarose Le を用い 2 %ゲルを作成し PCR 反応物 25µl にゲルローディング緩衝液を 5µl 加え、5 µl をゲルにアプライし、TBE を泳動用バッファーに用い電気泳動した。

(4) 塩基配列解析

PCR 産物は MinElute PCR Purification Kit で精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて表 3 の条件で、蛍光標識を行った。その後、AutoSeq G-50 を使用して未反応蛍光色素の除去を行い、3500 Genetic Analyzer により塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、DNA データベース (DDBJ: DNA Data Bank of

Japan) の BLAST 検索 (相同性検索) を実施し, 植物種の同定を行った.

表 3 サイクルシーケンス法反応条件

温度	時間	
96°C	1min	
96°C	10sec	} 25 cycles
50°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	Hold	

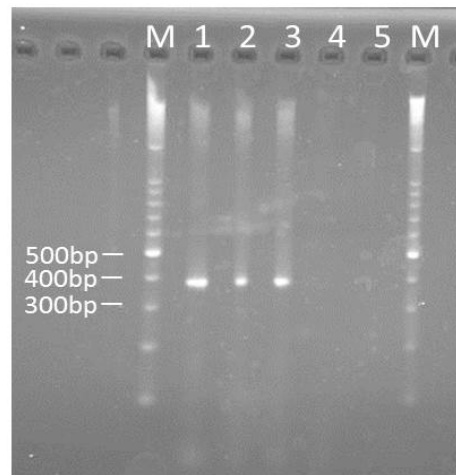


図 3 電気泳動結果

M:100 bp ラダーマーカー, 1~3:検体, 4: 陰性コントロール (プライマー無), 5: 陰性コントロール (TemplateDNA 無)

## 5 結果

### (1) DNA 抽出

分光光度計を使用し, DNA 溶液を, 200~320nm の紫外外部吸収スペクトルを測定した結果は図 2 のとおりであった. OD260 の吸光度は 8.63, OD280 の吸光度は 4.77, OD230 の吸光度は 5.88, OD320 の吸光度は 0.75 で, 核酸濃度 ((OD260-OD320) ×50ng/μl) は, 394.0ng/μl であり, OD260/OD280 は, 1.96 となり良好な精製度と考えられた.

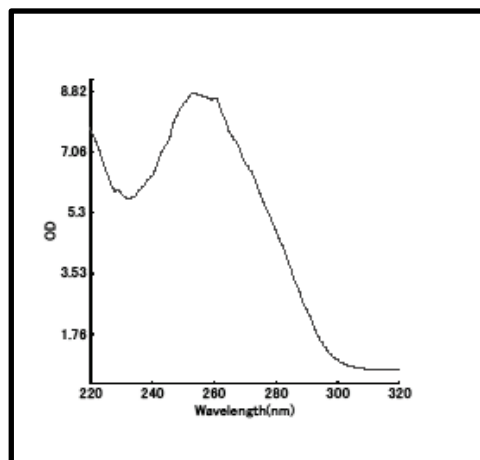


図 2 DNA 溶液の紫外外部吸収スペクトル

### (2) 電気泳動結果

検体 1-3 において, 350 ~ 400 bp にバンドが検出され, ITS1 領域が増幅されたことを確認した (図 3).

### (3) 塩基配列解析結果

PCR 産物について塩基配列解析を行った結果, 次の 387 bp の塩基配列が得られた.

>Yamaguchi-imo

```

TTGTCGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATT
AGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG
TGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCCC
AGCAGAACGACCCGCGAACATGTTATCACACATCG
GGAGGGGCGTCCGTTGCCCTCGGGCTTCGGCCACC
TCTCCTCGTCGGTGGGTGCTCCTCGTGGGTGCCTTC
CCGGCAAAACAACGAACCCCGCGCGGAATGCGC
CAAGGAACATGTACAATAGAGTGCCACCCCTCCATC
GGTACACCTATGGATGGGCGTGGCACCTAACTTGAG
TAATTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTC
TCGCATCGATGAAGAACGTATCGAAATGCGAAA
    
```

### (4) DDBJ Blast 検索 (相同性検索) 結果

得られた塩基配列について DDBJ BLAST 検索 (blastn) を行ったところ, 最も一致率の高かった Access. No. FJ980404 及び FJ980403 とは, 338 塩基中 1 塩基の違いであった (表 4). また, 上位 6 位まで *Phytolacca americana* (ヨウシュヤマゴボウ, 別名アメリカヤマゴボウ) と相同性が高く, 同族異種の *Phytolacca sanguinea* とは一致率が 95% であった. 以上のことから, 当該植物はヨウシュヤマゴボウである可能性が最も高いことが判明した.

表 4 Blast 結果

Access. No.	Sequence Entry	Score (bits)	E Value	Identities
FJ980404	Phytolacca americana ...	662	0.0	337/338 (99%)
FJ980403	Phytolacca americana ...	662	0.0	337/338 (99%)
DQ006023	Phytolacca americana ...	654	0.0	336/338 (99%)
EF079460	Phytolacca americana ...	609	e-170	313/315 (99%)
DQ317076	Phytolacca americana ...	597	e-167	321/325 (98%)
JX232573	Phytolacca americana ...	571	e-159	291/292 (99%)
KM491878	Phytolacca sanguinea ...	476	e-130	279/292 (95%)

## 6 まとめ

ヨウシュヤマゴボウは果実と根にフィトラッカサポニンEを主とする毒性成分を含み、生食すると腹痛・嘔吐・下痢を引き起こし、延髄に作用した場合死亡することもある植物である<sup>2)</sup>。したがって本件は、根を自然薯と間違えて生食したために起きた自然毒食中毒と推定された。

本事例は、形態学的に種類判別ができなかった植物種について、植物種ごとに特異的な領域 (ITS1) の DNA 塩基配列解析を行うことにより、種まで判定できた事例であった。

ITS1 領域の塩基配列解析は、本事例のように茎や葉のない根のみの検体にとどまらず、極微量の検体や加熱調理済みの検体においても、DNA の抽出及び PCR が可能であれば、植物種の同定が可能であり、今後の食中毒検査や異物検査に有用であると考えられる。

### 参考文献

1)Noriya Masamura, Ryo Kikuchi, Yasuaki Nagatomi, Developments of an identification method for foreign substances of plant origin using ITS 1 region, BUNSEKI KAGAKU, Vol63, No.3, PP.245-253(2014), © 2014 The Japan Society for Analytical Chemistry

2)厚生労働省ホームページ：自然毒のプロファイル：高等植物：ヨウシュヤマゴボウ