

## 15. 中毒原因植物に関する遺伝子検索法の検討

大分家畜保健衛生所

○病鑑 人見 徹

植物中毒の診断は、臨床症状と併せ採食の確認、毒物の検出が必要だが、診断の第一歩となる採食の確認は、残飼の喪失や、胃内容が半消化状態のうえ夾雑物が混在するなど確認は容易とは言えない。植物種の遺伝子学的判別法として、植物種に保存性の高い遺伝子を共通プライマーで増幅しシーケンスで比較するバーコーディングが行われ、野生動物の糞便から食性調査などに応用されている[1, 2]。しかし、牛の胃内容では複数種の植物が多量に混入しており、対象植物の形態が残っている場合を除いては共通プライマーでの有毒植物の同定に有効な遺伝子増幅は困難と考えられる。中毒植物の種を特定可能な特異的プライマーの報告や情報は少なく、畜産領域で利用可能な情報はほとんど見られない。そこで、家畜の中毒植物の特異的遺伝子を検出、同定が可能な専用プライマーの設計を試み、作成したプライマーの検証として野外で採取したサンプルを用いた検証を行った。市販のDNA抽出キットを用いて植物材料からの抽出、PCR結果の比較を行い検出感度を検討、PCR産物のシーケンスによる植物種遺伝子との相同性の比較、胃内容を想定した消化や夾雑物の影響について検討した。

### 【材料および方法】

**対象植物**：県内の牧野や河川敷に自生しており、容易に飼料へ混入するおそれのある中毒原因植物種として、ワラビ、カタバミ、ウマノアシガタ、ギシギシ、スイバの5種類の植物を対象としてプライマーの作成および検出試験を行った（図-1）。

**プライマー作成**：動物ではミトコンドリアの遺伝子が種の同定に使われていますが、植物のミトコンドリア遺伝子は種間変異が少なく利用出来ないため、データの蓄積されている植物遺伝子バーコーディングの利用領域を検討をした。対象の遺伝子領域はリボソームのITS1領域（Internal transcribed spacer 1領域：真核生物リボソーム



図-1 試験対象の植物

の18Sと5.8Sの間の領域)、rbcL領域 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxge rase領域：葉緑体遺伝子) およびmatK領域 (maturaseK領域：葉緑体遺伝子でイントロンを切り取る酵素をコード) で、それぞれ1,400塩基前後の配列からプライマー設計を行った。対象植物の各領域をBLASTで検索し、その塩基配列からprimerBLASTを用いて各植物で30個程度、候補となる配列を設計し、それらの配列をBLAST検索により、目的植物以外の種と3'末端が2塩基以上異なるプライマーを選抜した。

**遺伝子検出試験**：牧野等で採取した植物検体から葉を1cm<sup>2</sup>切り取りハサミで細切し、DWを500μl加え、-30℃で凍結・融解を3回くり返した後、ジルコニアビーズの入ったチューブに入れ細胞破碎装置で4,000rpmで60秒間破碎、5,000rpmで10分間遠心分離した上清をDNA抽出材料に用いた。DNA抽出は市販のキット (QIAamp DNA Mini Kit QIA GEN社、カネカ簡易DNA抽出キット カネカ社およびPlant DNA Isolation Regent タカラバイオ社)を用いて行い、今回作成した5種の植物専用プライマーおよび植物共通rbcL領域プライマー[3]について、PCR法 (Takara Ex Taq タカラバイオ社)による特異遺伝子の増幅を行なった。PCRのアニーリングは全て53℃で30秒間で行い、PCRの増幅産物はアガロースゲルの電気泳動確認および、一部の植物種はダイレクトシーケン スにより塩基配列を確認した。

**胃内容の影響検討**：胃内容中で植物が消化された場合や夾雑物が混ざった状態での特異遺伝子検出への影響についてカタバミとウマノアシガタの2種の植物を用いて検討した。消化の影響については、新鮮なルーメン液5mlに植物検体を50mg加え38℃で24時間回転混和を行ったものから植物断片を採取したものをルーメン液消化検体とした。また、夾雑物の影響については、ルーメン内容20mlに細胞破碎装置で破碎した植物検体を100mg (0.5%w/v)加え混和し、38℃で8時間静置したものから上清を採取しルーメン内容混合検体とした。それぞれの検体からキットの用法に従いDNAを抽出しPCRを行った。

表-1 試験対象植物の設計プライマー

植物種	プライマー	塩基配列	増幅産物 予想サイズ
ワラビ	W 1	Forward 5'-CTCAATTGGACGCAGCAGAC-3'	420bp
		Reverse 5'-CTAGCACAGCCCACGCTAAT-3'	
	W 2	Forward 5'-AGTCTTCGGAGCGTGTAAGTG-3'	949bp
		Reverse 5'-TAGCAGCGAAATTGGAGCCT-3'	
カタバミ	K 1	Forward 5'-CCCTATCCCATCCACCAGGA-3'	734bp
		Reverse 5'-GAATCCGCCAAGTAGGCTT-3'	
	K 2	Forward 5'-TCAGAAGGGCTTGCGGTTAT-3'	188bp
		Reverse 5'-TCCTGGTGGATGGGATAGGG-3'	
ウマノアシガタ	U 1	Forward 5'-CGACCAAATCCTTCGGTGGT-3'	180bp
	Reverse 5'-TAGTGAATCGGTCCAAGCCG-3'		
ギンギン	G 1	Forward 5'-CAGGGAAAAGGGATTCTGGCT-3'	150bp
	Reverse 5'-ATCCATGGGCCGATTTGATGA-3'		
スイバ	S 1	Forward 5'-ACGACTAAACCCGTTTCGTGG-3'	212bp
		Reverse 5'-TGCGTCAAATCGGCCAATA-3'	
	S 2	Forward 5'-TTGGGGTTAGCCTGTGGTTT-3'	399bp
		Reverse 5'-CAGCCCAGGTTGGCTTACTA-3'	

表-2 抽出キットごとの植物種同定プライマーおよびrbcLプライマーを用いたPCR結果

抽出キット	対象植物およびプライマー												
	ワラビ			カタバミ			ウマノアシガタ		ギンギシ		スイバ		
	W 1	W 2	rbcL	K 1	K 2	rbcL	U 1	rbcL	G 1	rbcL	S 1	S 2	rbcL
A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	-	-	-	+	+	+	+	+	-	NT	-	NT	NT

【成績】

プライマー作成：特異的プライマー作成のため、ITS1領域、rbcL領域およびmatK領域についてワラビおよびカタバミの塩基配列でプライマーの設計を試行した結果、rbcL領域とITS1領域では近縁種間の変異が少なく、科または属レベルの特異性のプライマー配列のみ設計可能であった。それに対し、matK領域では、種レベルの特異性のあるプライマーが作成出来ることが確認され

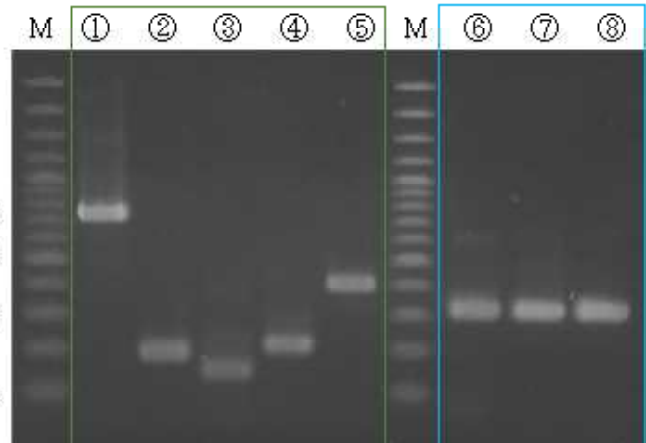


図-2 植物種同定プライマーおよびrbcLプライマーを用いたPCR

M:100bp ladder, ①カタバミ K1プライマー 734bp, ②カタバミ K2プライマー 188bp, ③ギンギシ G1プライマー 150bp, ④スイバ S1プライマー 212bp, ⑤スイバ S2プライマー 399bp, ⑥カタバミ rbcLプライマー 約300bp, ⑦ギンギシ rbcLプライマー 約300bp, ⑧スイバ rbcLプライマー 約300bp

たことから、この領域を用いて特異的プライマーを作成した。各対象植物の塩基配列から、ワラビ、カタバミおよびスイバは2種類、ウマノアシガタおよびギンギシは1種類のプライマーを設計、作成した（表-1）。

遺伝子検出試験：ワラビは不検出、カタバミとウマノアシガタは全ての抽出キットで検出され、ギンギシおよびスイバは1キットのみ検出、ワラビは全て陰性となった（図-2、表-2）。カタバミ、ギンギシおよびスイバの増幅産物をダイレクトシークエンスで塩基配列の確認を行った結果（表-3）、目的植物種に対し、カタバミおよびギンギシ特異的プライマーで行ったPCRの増幅産物はいずれもデータベースに保存されている対象植物の塩基配列と100%の相同性となった。しかし、スイバでは100%の相同性となった塩基配列においても対象植物以外の植物種が含まれ、属レベルの同定となった。

胃内容の影響検討：カタバミおよびウマノアシガタのルーメン液消化検体とルーメン内容混合検体の PCR

の結果、全ての検体で未処理の植物と同等の遺伝子断片増幅をしめすバンドが確認された（図-3）。

表-3 塩基配列に基づく相同性検索結果

植物種	プライマー	植物種	アクセッションNo.	相同性
カタバミ	K1	<i>Oxalis corniculata</i> (カタバミ)	MH551761.1	100.0%
	K2	<i>Oxalis corniculata</i> (カタバミ)	EU437337.1	100.0%
	rbcL	<i>Oxalis corniculata</i> (カタバミ)	MK936692.1	99.3%
ギンギシ	G1	<i>Rumex japonicus</i> (ギンギシ)	MK058527.1	100.0%
	rbcL	<i>Rumex</i> spp.(スイバ属)		100.0%
スイバ	S1	<i>Rumex</i> spp.(スイバ属)		100.0%
	S2	<i>Rumex</i> spp.(スイバ属)		100.0%
	rbcL	<i>Rumex</i> spp.(スイバ属)		100.0%

### 【考察】

中毒植物に特異的なプライマーの作成を試み、遺伝子検出の実用性について検討した。5種類の中毒植物、ワラビ、カタバミ、ウマノアシガタ、ギシギシ、スイバのmatK遺伝子領域に特異的なプライマーを設計、作成し試行したところ、ワラビを除き、特異的な遺伝子断片の増幅が確認された。

プライマー設計の対象領域については、動物ではミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素サブユニット(COI)

遺伝子が種レベルでの変異を多く含むため利用されているが、植物ではミトコンドリア遺伝子の種間変異が少なく利用出来ない。そのため、データの蓄積されているITS1領域や陸上植物の標準的バーコード領域として推奨されているrbcLとmatK領域から検討を行った。matK領域は、ヒトでのチョウセンアサガオやトリカブトなどを検知対象とした同定法にも利用が見られ(国立医薬品食品衛生研究所ホームページ)、家畜の中毒植物の多くでも種レベルの特異的なプライマー設計に利用可能と考えられ、今回対象とした植物種以外にも対応出来るよう検討を試みたいと考えた。

検出感度の向上のためDNA抽出キットについて比較したところ、ギシギシとスイバではカラム精製の行程があるもので検出結果が良好となった。これらの植物にはタンニンが多く含まれておりタンニンはPCR反応を阻害するため、他のキットでは反応が上手くいかなかった可能性が推察された。なお、ワラビはrbcLプライマーでも検出されなかったことから、DNA抽出法のさらなる改善も必要と考えた。

シーケンスによる塩基配列の確認を行ったところ、設計された特異的プライマーではrbcLプライマーと同等に、植物種あるいは属が特定され、目的の遺伝子領域が増幅されていることが確認された。スイバのように同属に多くの近縁種が含まれる植物については、他の領域でもプライマー設計を試み組み合わせで同定する必要もあると考えられた。

ルーメン内容からの有毒植物検出を想定した試験では、カタバミ、ウマノアシガタともにルーメン液24時間反応後の消化の進んだ状態で検出、ルーメン内容に微量に混合された場合にも検出された。夾雑物の多いルーメン内容でも、採食後、時間が経過したものや胃内容に少量の場合でも検出の可能性が考えられた。

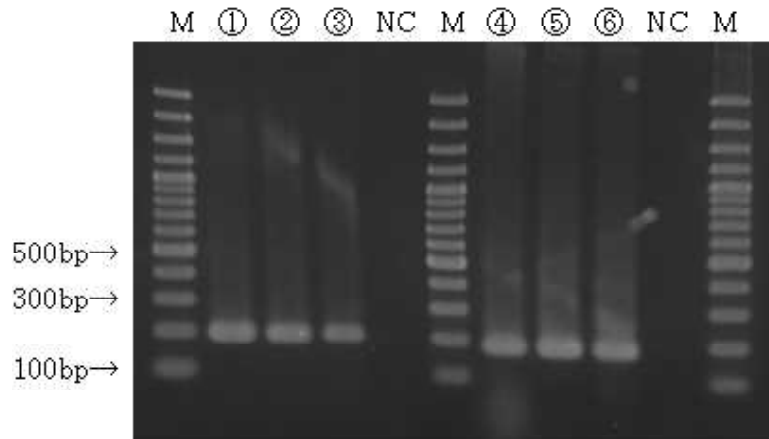


図-3 植物種同定プライマーおよびrbcLプライマーを用いたPCR

M:100bp ladder, ①:カタバミ K2プライマー 未処理188bp, ②:カタバミ K2プライマー ルーメン24時間反応, ③:カタバミ K2プライマー ルーメン内容混合, NC:カタバミ K2プライマー ルーメン内容のみ, ④:ウマノアシガタ U1プライマー 未処理180bp, ⑤:ウマノアシガタ U1プライマー ルーメン24時間反応, ⑥:ウマノアシガタ U1プライマー ルーメン内容混合, NC:ウマノアシガタ U1プライマー ルーメン内容のみ

以上の検討結果から、植物種特異的プライマーを用いた遺伝子増幅では目的植物の遺伝子が増幅されるため、共通プライマーを用いたバーコーディングに比較し夾雑物の多い胃内容からのサンプリングでは有効性が高いと考えられる。また、matK領域を対象として設計することで、効率的に他の植物種や胃内容中の微生物と交差の少ないプライマーを作成可能となった。各中毒植物に特異的な遺伝子検出の技術を確立する事により、今回作成した植物以外の中毒にも敏速にカスタムメイド可能であり、今後、抽出精度の向上により事故事例の原因究明などの一助になると考えた。

- [1]松木吏弓, 阿部聖哉, 島野光司, 竹野亨, 梨本真: 植物 rbcL 遺伝子データベースの構築と植食性動物の食性解析への適用, 日本生態学会誌 58:105-112 (2008)
- [2]小出水規行, 森淳, 嶺田拓也, 澤田英司, 渡部恵司, 竹村武士: 糞からの環境 DNA を利用したアカミミガメの食性解析, 農業農村工学会大会講演会講演要旨 2-27 (2015)
- [3]松木吏弓ら: イヌワシを頂点とする生態系の開発-DNA 解析による野生動物の糞内容物からの餌食物同定-: 電力中央研究所2-4, (2003)