

# DNA 分析による皮革の識別について

田中 康統\*, 松本 健志\*, 中山 清貴\*

## Identification of leather by DNA Analysis

Yasunori TANAKA\*, Tsuyoshi MATSUMOTO\*, Kiyotaka NAKAYAMA\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Identification of animal species in natural leather using optical and scanning electron microscopes sometimes face difficulties because of the morphological similarities among some kinds of animals and loss of morphological characteristics through manufacturing processes. In this study, we tried to identify vegetable tanned cow leather and chromium-tanned cow leather through DNA analysis. It was found that DNA extracted from the two kinds of leather samples was degraded to less than 200 bp. As a result of examining enzymatic treatments, DNA extraction, PCR conditions, etc., we successfully identified the leather samples by PCR-based detection and could also determine species in the vegetable tanned-leather sample by DNA sequencing analysis.

## 1. 緒 言

皮革は、輸入通関において、適正な関税分類のために、革製品か否かの確認を含め、原料種の確認が必要である他、ワシントン条約等規制対象品目かどうかの確認も必要となっている。

皮は表皮層と真皮層からなり、表皮層は人間の髪の毛にも含まれているケラチンを主成分とし、真皮層はコラーゲンを主成分としている<sup>1)</sup>。革は皮に鞣しを行ったものをいい、鞣しを行うことで耐熱性、微生物に対する抵抗性、柔軟性を与えることができる<sup>2)</sup>。鞣しとして代表的なものにタンニン鞣しとクロム鞣しがある。前者は植物に含まれているタンニンを鞣し剤として使用し、鞣しに時間がかかる分、丈夫な革に仕上がる。後者は塩基性硫酸クロムを鞣し剤とし、鞣しに時間がかからず、柔軟性のある革に仕上がる<sup>3)</sup>。

皮革の原料種の識別は、従来から、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡等を用いた形態観察により行っている<sup>4)</sup>。しかしながら、皮革の原料となる動物種の中には表皮等の構造が似ているものがある他、製革工程において形態学的特徴が失われているものがあり、それらを形態観察から識別することは困難である。

最近では、機器分析による皮革の鑑別が検討されており、DNA 分析も選択肢の 1 つと考えられている<sup>5-7)</sup>。皮革は、鞣し工程の中で加えられる熱処理や薬品処理により DNA 断片化されている他、なめし剤等、PCR 反応を阻害する物質を含むために、煩雑な DNA 抽出方法を必要とし、PCR 法による 100~400 bp 程度の短いバンド検出で判別する例が報告されている<sup>8-10)</sup>。

本研究では、タンニン鞣し及びクロム鞣しの牛革を対象に、皮

革試料の洗浄、酵素反応等を工夫すると共に、高反応性の PCR 酵素を使用することで、比較的簡易な DNA 抽出法で PCR 法に基づくバンド検出及び塩基配列比較による原料種の判別を行う方法を検討したので報告する。

## 2. 実 験

### 2.1 試 料

タンニン鞣し牛革、クロム鞣し牛革、ぬか鞣し牛革、牛肉、豚肉、羊肉、山羊肉（いずれも市販品）

### 2.2 試 薬

- ・塩化ナトリウム、クロロホルム、エタノール、2-プロパノール（いずれも試薬特級、和光純薬工業社製）
- ・1M Tris-HCl (pH8.0), 0.5M EDTA (pH8.0), TE buffer（いずれも遺伝子工学研究用 和光純薬工業社製）
- ・ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)（生化学用、和光純薬工業株式会社製）
- ・フェノール（結晶）、エチジウムブロマイド（いずれも和光純薬工業株式会社製）
- ・ポリビニルピロリドン（不溶性）（東京化成工業株式会社）
- ・プロテインナーゼ K（タカラバイオ社製）
- ・コラゲナーゼ（タイプ B, 動物由来物フリー）（コスモ・バイオ社製）
- ・電気泳動用アガロース : Agarose LO3（タカラバイオ社製）
- ・SYBR GREEN I（ロンザジャパン社製）

\* 財務省関税中央分析所 〒272-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

- DNA サイズマーカー：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ社製）， $\lambda$ /Hind III digest（タカラバイオ社製）
- Lysis Buffer  
終濃度が 50mM Tris-HCl (pH8.0)，50mM EDTA (pH8.0)，1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)，50mM NaCl になるように調整したもの

## 2.3 プライマー

Mexime ら<sup>10)</sup>の種特異的プライマーを使用した他，DDBJ（DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>）に登録された偶蹄類の mtDNA Cytochrome *b* の塩基配列から，保存された領域（Appendix 1）に新規に共通プライマーを設計した．本研究で使ったプライマーの情報を Table 1 に示す．

Table 1 Nucleotide sequences of primers used in this study<sup>7)</sup>

Name	Sequence 5'-3'	Anneal Temp.	Product Size	Target spices	Remarks
<b>PIG85L530</b> <b>PIG85ANCRI</b>	ACATACAAATATGTGACCCCA TTAATGCACGACGTACATAGG	55°C	87bp	Pig	Mexime <i>et al.</i> <sup>10)</sup>
<b>BOV8516335F</b> <b>BOV85REVIR</b>	ACCCCCAAAGCTGAAGTTCT TTTAATACTGATAAGGCTC	59°C	84bp	Cow	Mexime <i>et al.</i> <sup>10)</sup>
<b>ovisCR1F</b> <b>ovisCR1R</b>	CATAATGGTAAGCATGGGCAT CACGATACAGCAGATATGTC	55°C	61bp	Sheep	Mexime <i>et al.</i> <sup>10)</sup>
<b>CAP732F</b> <b>CAP732R</b>	ACTRTATATCTACCCTACAC CATAAAATGTAATGTACATACA	46°C	72bp	Goat	Mexime <i>et al.</i> <sup>10)</sup>
<b>ARcytb-F1</b> <b>ARcytb-R1</b>	GAGGACAAATATCATTCTGAGGAGC GGGTTGTTGGAKCCKGTTTCGTG	60°C	220bp	Artiodactyl	designed in this study
<b>ARcytb-F2</b> <b>ARcytb-R2</b>	CACGAAACMGGMTCCAACAACC GGTGTAGTTRTCTGGGTCTCC	60°C	171bp	Artiodactyl	designed in this study

## 2.4 装置

サーモミキサー：Eppendorf ThermoMixer comfort  
PCR 増幅装置：Veriti 96well Thermal cycler（Applied Biosystems）  
電気泳動装置：MUPID ミニゲル槽（ADVANTEC）  
画像解析装置：BIO-PROFILE System2（VILBER LOURMAT）  
DNA シークエンサー：3500 xL Genetic Analyzer（Applied Biosystem）

## 2.5 実験

### 2.5.1 試料の採取及び洗浄

タンニン鞣し牛革及びクロム鞣し牛革については，吉岡らの方法<sup>8)</sup>を参考に，まず表面及び裏面のコーティング層を滅菌したやすり等で除去した後，滅菌したカッター等で細分化した．この細片 25mg を 1.5 mL チューブに採取し，Lysis Buffer を 1 mL 程度加え，55°C の温浴上に置いた．液が濁るたびに遠心，デカンテーションを行い，濁りが無くなるまで繰り返し洗浄した．上記の作業工程を Fig. 1 に示す．

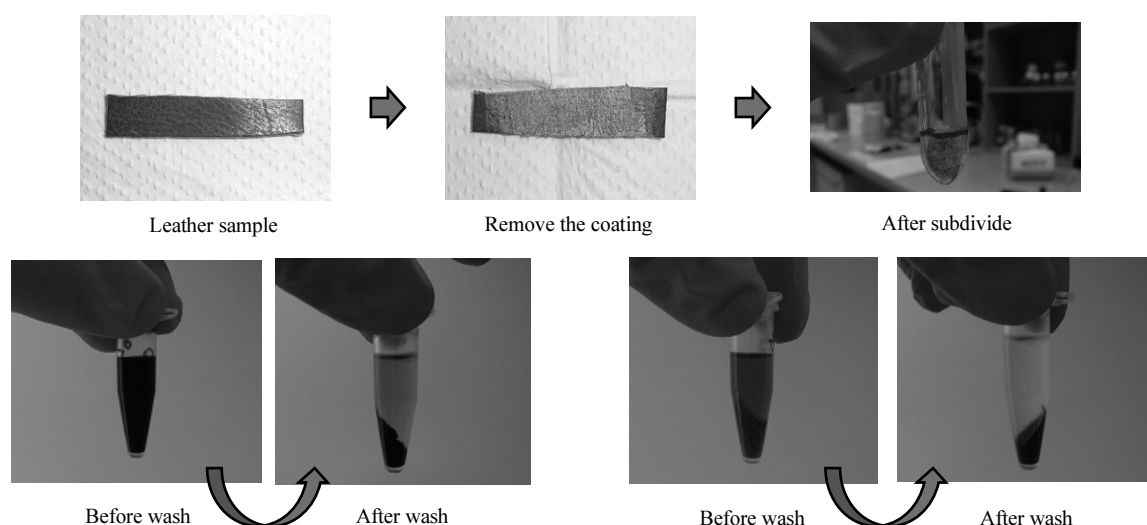


Fig. 1 Flow of sample washing

## 2.5.2 酵素処理

### 2.5.2.1 使用する酵素の検討

下記の 2 通りの方法で牛革試料の加水分解を行い、結果を比較した。

#### (1) コラゲナーゼのみを使用した場合

洗浄したタンニン鞣し牛革に Lysis Buffer を 600  $\mu$ L, ポリビニルピロリドン 20 mg, コラゲナーゼを 10 mg 加え、55°C の条件下で 12 時間処理後に上澄み (約 500  $\mu$ L) を新しい 1.5 mL チューブに採取し、CTAB 法で抽出を行った。

#### (2) コラゲナーゼとプロテイナーゼ K を併用した場合

洗浄したタンニン鞣し牛革に Lysis Buffer を 600  $\mu$ L, ポリビニルピロリドン 20 mg, プロテイナーゼ K を 5  $\mu$ L 加え、55°C の条件下で 12 時間処理後にコラゲナーゼを 10 mg 加え、さらに 12 時間処理後に上澄み (約 500  $\mu$ L) を新しい 1.5 mL チューブに採取し、CTAB 法で抽出を行った。

### 2.5.2.2 酵素処理時間の検討

洗浄したタンニン鞣し牛革に対して Lysis Buffer を 600  $\mu$ L, ポリビニルピロリドン 20 mg, プロテイナーゼ K を 5  $\mu$ L, コラゲナーゼを 10 mg 加え、55°C の条件下で 8 時間、16 時間及び 24 時間処理した他、比較のために酵素を加えずに 24 時間処理したものを用意した。酵素処理済の各溶液について CTAB 法で DNA 抽出を行い、酵素処理時間の違いで得られる DNA 量に影響があるか確認した。

## 2.5.3 DNA 抽出方法の検討

### 2.5.3.1 キット法

2.5.2 で得られた酵素処理液について、DNeasy®Blood Mini Kit (以下「キット法」という) を使用し、添付のプロトコルに従って DNA 抽出を行った。DNA 抽出物は、0.8% アガロースゲル電気泳動により分離した後、エチジウムブロマイドで染色し、確認した。

### 2.5.3.2 フェノール/クロロホルム法 (イソプロパノール沈殿)

2.5.2 で得られた酵素処理液に同量の平衡済フェノールを加えて 30 分間転倒攪拌させた後、遠心分離 (室温, 13,000 rpm, 10 分) した。水層を新しいマイクロチューブに移し、同量のクロロホルムを加えて 30 分間転倒攪拌した。再度同じ条件で遠心分離した後、水層 (約 400  $\mu$ L) を新しいマイクロチューブに移し、5M NaCl を 100  $\mu$ L 加え、攪拌後、遠心分離 (室温, 13,000 rpm, 15 分) し、上澄み (約 400  $\mu$ L) を新しいマイクロチューブに移した。溶液と同量のイソプロパノールを加えて攪拌し、遠心分離 (室温, 14,000 rpm, 15 分) 後、上澄みを除き、更に 70% エタノールを 750  $\mu$ L 加えて軽く攪拌した後、遠心分離 (4°C, 14,000 rpm, 10 分) した。溶液をデカンテーションで除き、乾燥させた後、TE buffer を 100  $\mu$ L 加え DNA 抽出液とした。DNA 抽出物の確認についてはキット法と同様の方法で行った。

## 2.5.4 PCR 反応

### (1) TaKaRa Ex Taq™ の場合

PCR 溶液は、TaKaRa Ex Taq™ に添付のマニュアルに従い、

DNA 抽出液 1  $\mu$ L, プライマー (5  $\mu$ M) 各 2  $\mu$ L の他、必要な試薬等を加え、30  $\mu$ L の系で調製した。PCR 反応は、熱変性 95°C (4 分) を行った後、95°C (30 秒), 46~59°C (1 分; Table 1 に記載の各プライマーの Annealing Temp. を参照), 72°C (30 秒) のサイクルを 40 回繰り返した後、15°C で保持した。

### (2) MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 の場合

PCR 溶液は、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 に添付のマニュアルに従い、DNA 抽出液 1  $\mu$ L, プライマー (5  $\mu$ M) 各 1.8  $\mu$ L の他、必要な試薬等を加え、30  $\mu$ L の系で調製した。PCR 反応は、熱変性 98°C (2 分) を行った後、98°C (10 秒), 46~59°C (40 秒; Table 1 に記載の各プライマーの Annealing Temp. を参照), 68°C (15 秒) のサイクルを 40 回繰り返し、15°C で保持した。

## 2.5.5 シーケンス反応

増幅が確認された PCR 産物について、以下の要領でイソプロパノール沈殿を行い、残存プライマーを除去した。

25  $\mu$ L の PCR 産物に対して 3  $\mu$ L の 5M-NaCl, 22  $\mu$ L の滅菌水, 50  $\mu$ L の 2-プロパノールを加えて混和した後、遠心分離 (室温, 14,000 rpm, 10 分) を行った。マイクロチューブから溶液を取り除いた後、90  $\mu$ L の 70% エタノール (-20°C) を加えて混和後、遠心分離 (4°C, 14,000 rpm, 10 分) し、溶液を取り除いた後、乾燥させた。これに PCR 産物の量に応じて TE buffer を 5~20  $\mu$ L 加えた。

上記の精製済 PCR 産物について、PCR 反応と同じプライマー (Table 1 参照) を用いて、Big Dye® Terminator v1.1 により、添付のマニュアルに沿って 5' 側及び 3' 側の両方向からサイクルシーケンス反応を行った。

サイクルシーケンス反応後、CENTRI-SEP カラム (PRINCETON SEPARATIONS 社製) を用いて未反応の蛍光色素を除去し、DNA シーケンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 酵素処理法の検討結果

2.5.2.1 の(1)及び(2)により、タンニン鞣された牛革から抽出した DNA の電気泳動像を Fig. 2(A)に、2.5.2.2 に沿って酵素処理時間を 8 時間、16 時間及び 24 時間とし、抽出される DNA 量を確認した結果を Fig. 2(B)に示す。

コラゲナーゼのみを使用して加水分解を行うよりも、プロテイナーゼ K とコラゲナーゼを併用した方が、電気泳動におけるバンドの濃さから DNA 抽出量が多いことがわかった。

酵素処理時間については、8 時間、16 時間及び 24 時間と延長しても、抽出される DNA 量にそれ程差異が見られなかったため、以後の実験の酵素処理時間は 8 時間とした。なお、酵素を添加せずに 24 時間保持したものからは、DNA を抽出することができなかった。

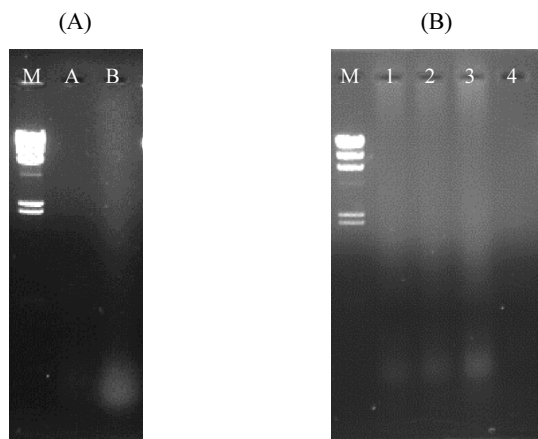


Fig. 2 Electrophoresis of vegetable-tanned cow leather's DNA extracted through: (A) different enzymatic digestion processes, and (B) different digestion times.

Lane A, Use collagenase only; Lane B, Use collagenase and proteinase K; Lane 1, 8-hour treatment; Lane 2, 16-hour treatment; Lane 3, 24-hour treatment; Lane 4, 24-hour treatment without enzyme, Lane M, DNA size marker ( $\lambda$ Hind III digest).

### 3.2 DNA 抽出方法の検討結果

牛革試料を 2.5.2.2 の方法でそれぞれ 8 時間酵素処理を行った後、2.5.3.1 のキット法及び 2.5.3.2 のフェノール法の各々で精製し、電気泳動法で分離した結果を Fig.3 に示す。

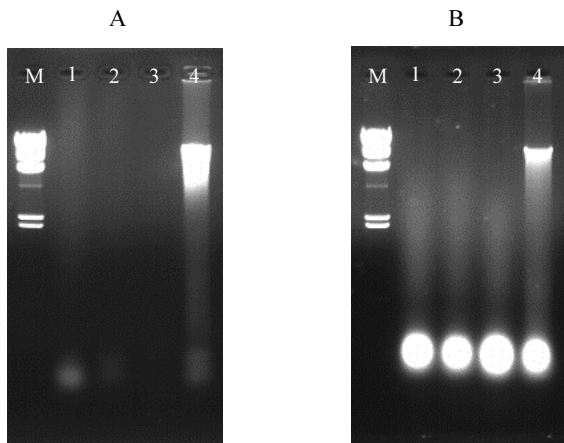


Fig. 3 Electrophoresis of vegetable-tanned cow leather's DNA extracted: (A) by kit method and (B) by phenol method

Lane 1, vegetable-tanned cow leather; Lane 2, chromium-tanned cow leather; Lane 3, rice bran-tanned cow leather; Lane 4, beef meat (reference); Lane M, DNA size marker ( $\lambda$ Hind III digest).

Fig.3 (A) の電気泳動像から、タンニン鞣し牛革、クロム鞣し牛革から抽出した DNA は、100~200 bp 程度に断片化されていることを確認した。

キット法及びフェノール法を比較すると、フェノール法を行った方が濃いバンドを示しているが、これは Lysis Buffer に含まれる塩等が DNA 抽出溶液中に残存し、電気泳動像にて発色した可能性があることから、単純に DNA 抽出量が多いとは言えない。

### 3.3 PCR 条件の検討

タンニン鞣し牛革からプロテイナーゼ K とコラゲナーゼの併用でそれぞれ 8 時間加水分解した後、フェノール法で抽出した DNA について、滅菌水で 5 倍、10 倍、30 倍、50 倍、100 倍希釈したもの及び精製したものを検体とし、ARcytb-F2 及び ARcytb-R2 を使用して、2.5.4 の(1)及び(2)の条件で PCR 反応を行った結果を Fig.4 に示す。

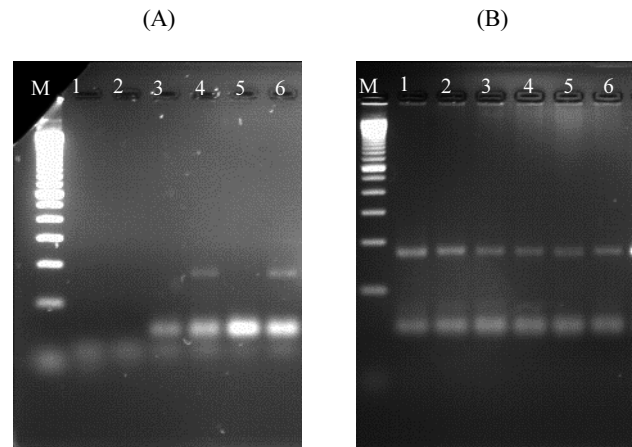


Fig. 4 PCR amplifications of vegetable-tanned cow leather using Artiodactyl common primer set (ARcytb-F2 and ARcytb-R2) with: (A) TaKaRa Ex Taq™ and (B) MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3

Lane 1, Diluted DNA ( $\times 5$ ); Lane 2, Diluted DNA ( $\times 10$ ); Lane 3, Diluted DNA ( $\times 30$ ); Lane 4, Diluted DNA ( $\times 50$ ); Lane 5, Diluted DNA ( $\times 100$ ); Lane 6, Refined DNA; Lane M, 100 bp DNA Ladder marker

TaKaRa Ex Taq™ を使用した場合、鞣した牛革を含む一部の検体から PCR 産物が得られなかったが、PCR 阻害物質に対する抵抗性の高い MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 を使用した場合は、全ての検体から PCR 増幅産物を確認することができた。このことから、以下の実験 (PCR 反応) は、抽出した DNA を 50 倍希釈し、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 を用いて行った。

### 3.4 種特異的プライマーを用いた PCR による皮革の原料種判別

各試料から 3.3 と同様の方法で DNA 抽出を行い、Mexime ら<sup>10)</sup>の種特異的プライマーを使用して PCR 反応を行った結果を Fig.5 に示す。

全ての牛革 (ぬか鞣し牛革, タンニン鞣し牛革, クロム鞣し牛革) について、牛特異的プライマーを用いた PCR でバンド検出できた他、リファレンスとして使用した牛肉、豚肉、羊肉及び山羊肉それぞれから採取した DNA についても、各種特異的プライマーを用いた PCR により、正常にバンド検出することが可能であった。このことから、本研究の DNA 抽出法と Mexime ら<sup>10)</sup>の種特異的プライマーとの組み合わせで、豚革、羊革及び山羊革についても対応できる可能性が示唆された。

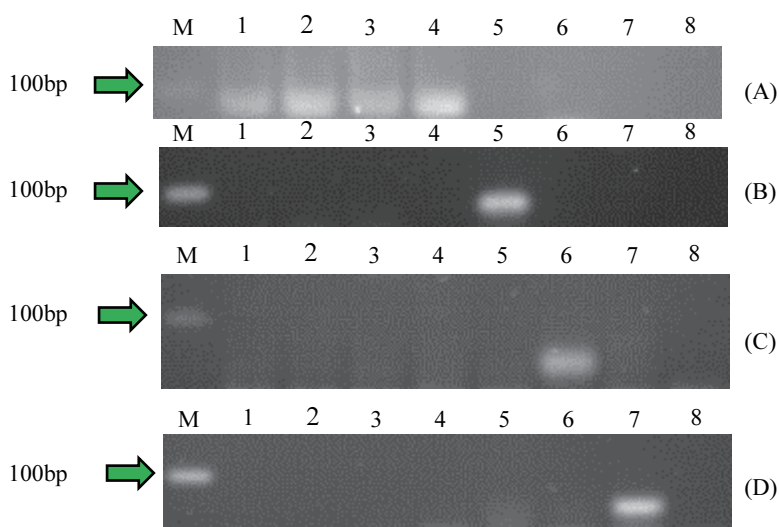


Fig. 5 Result of PCR detections using species-specific primer sets for (A) cow; (B) pig; (C) sheep; (D) goat, all of which are listed in Table 1.

Lane 1, vegetable-tanned cow leather; Lane 2, chromium-tanned cow leather; Lane 3, rice bran-tanned cow leather; Lane 4, beef; Lane 5, pork; Lane 6, mutton (sheep); Lane 7, chevon (goat); Lane 8, Water (negative control); Lane M, 100 bp DNA Ladder marker

### 3.5 塩基配列比較による皮革の原料種判別

3.4において、ぬか鞣し牛革、タンニン鞣し牛革、クロム鞣し牛革、牛肉、豚肉、羊肉、山羊肉から抽出した DNA について、ARcytb-F1 及び ARcytb-R1 を使い PCR 反応を行った結果を Fig.6 に示す。

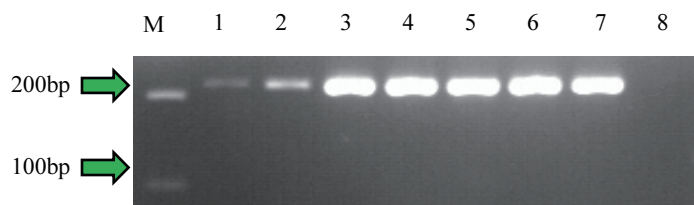


Fig. 6 Result of PCR amplification for leather samples and animal meats using the artiodactyl common primer set (ARcytb-F1 and ARcytb-R1) with MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3

Lane 1, vegetable-tanned cow leather; Lane 2, chromium-tanned cow leather; Lane 3, rice bran-tanned cow leather; Lane 4, beef; Lane 5, pork; Lane 6, mutton (sheep); Lane 7, chevon (goat); Lane 8, Water(negative control) ; Lane M, 100 bp DNA Ladder marker

各 PCR 増幅産物について、2.5.5 の要領でシーケンス反応を行い、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を解読したところ、クロム鞣し牛革を除く、全ての PCR 増幅産物の塩基配列を決定することができた。

得られた各 PCR 産物の塩基配列について、DDBJ の BLAST 検索サービスを利用して相同性検索を行った結果、原料種の識別を行うことが可能であった (Appendix 2 参照)。

今後は、クロム鞣し牛革についての条件検討の他、当該直接塩基配列決定法の再現性の確認を行うとともに、豚、羊及び山羊の鞣した革について実際に適応可能か確認が必要である。

## 4. 要 約

DNA 分析による鞣した牛革の原料種判別を検討した。タンニン鞣し牛革及びクロム鞣し牛革について、DNA 抽出方法を検討した結果、細片化した試料を Lysis Buffer で洗浄した後、プロテイナーゼ K とコラゲナーゼを併用してたんぱく質を加水分解処理し、フェノール/クロロホルム法 (イソプロパノール沈殿) で抽出することで、100~200 bp に断片化した DNA が得られた。

上記の抽出 DNA は、60~72 bp の増幅産物が得られる既知の種特異的プライマー及び PCR 阻害物質に強い DNA ポリメラーゼである MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 を使用することにより PCR 増幅が可能であり、SYBR GREEN I 染色した電気泳動ゲルにおいてバンドを明瞭に確認することができた。

更に、上記の DNA 抽出物については、新規開発した偶蹄類用の共通プライマー ARcytb-F1 及び ARcytb-R1 を使い、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 で PCR 増幅が認められ、クロム鞣し牛革を除く、すべての試料の塩基配列の決定と DDBJ を利用した相同性検索による種判別が可能であった。

今後は、クロム鞣し牛革について更なる条件検討を進める他、当該分析法の再現性の確認を行うとともに、豚、羊及び山羊の鞣した革について適用可能かどうか確認を進める必要がある。

## 文 献

- 1) 岡村 浩, 村田 正見: 新版 皮革科学 P.4, P.5 (日本皮革技術協会)
- 2) 岡村 浩, 村田 正見: 新版 皮革科学 P.46 (日本皮革技術協会)
- 3) レザーガイド P.11, P.14 (株式会社ストック小島)
- 4) 関税中央分析所ホームページ「404 皮革の分析試験法」([http://www.customs.go.jp/ccl\\_search/analysis\\_search/a\\_404\\_j.pdf](http://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_404_j.pdf))
- 5) Y. Izuchi, T. Takashima, N. Hatano: Mass Spectrom. **5**, A004b (2016).
- 6) A. Vuissoz, M. Worobey, N. Odegaard, M. Bunce, C.A. Machado, N. Lynnerup, E.E. Peacock: J. Archaeol. Res. **34**, 823 (2007).
- 7) A. Schlumbaum, P.F. Campos, S. Volken, M. Volken, A. Hafner, J. Schibler: J. Archaeol. Res. **37**, 1247 (2010).
- 8) 吉岡陽一郎: 天然皮革の DNA 鑑別 P127-P133 (皮革科学 第 49 巻 第 3 号 (平成 15 年 10 月))
- 9) 高瀬 和弥, 寺嶋 眞理子, 吉村 圭司: 皮革からの DNA 抽出法の検討 P.17 (皮革科学 第 58 巻 第 1 号 (2012))
- 10) M. Maxime, V. Stéphane, M. Thierry, H. Catherine: Res. J. Biotech. **10**, 65 (2015)

Appendix 1 Multiple alignment of Artiodactyls' mt cytochrome *b* partial sequence.

ARcytb-F1	
Bos taunas AF492351	401: CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCCATACATCGGCACAAATTTAGTCGAATGAATCTGAGGCGG 500
Bos taunas GQ129207	401:..... 500
Sus scrofa DQ518915	401: C..... T.. G..... A.. T.. AC..... T..... T..... A.. G. CC. C.. A..... G.. 500
Sus scrofa AF034253	401: C..... T.. G..... A.. T.. AC..... T..... T..... A.. G. CC. C.. A..... G.. 500
Ovis aries AF010406	401:..... T.. T..... C. T..... T..... T..... CC..... G.. A.. 500
Ovis aries AY858379	401:..... T.. T..... C. T..... T..... T..... CC..... R.. A.. 500
Bos taunas AF492351	501: ATTCTCAGTAGACAAAGCAACCCTTACCCGATTCTTCGCTTCCATTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCTC 600
Bos taunas GQ129207	501:..... 600
Sus scrofa DQ518915	501: C.. T.. C.. C..... C.. A..... C.. T.. C..... G..... C..... T. CC.. CC. C.. AGCC.. A.. T.. C..... G 600
Sus scrofa AF034253	501: C.. T.. C.. C..... C.. A..... C..... C..... G..... C..... T. CC.. CC. C.. AGCC.. A.. T.. C..... G 600
Ovis aries AF010406	501:..... T..... C..... T..... C.. T.. C..... TT. C..... C..... GC.. CC. C..... T..... C..... 600
Ovis aries AY858379	501:..... T..... C..... T..... C.. T.. C..... TT. C..... C..... GC.. CC. C..... T..... C..... 600
ARcytb-R1	
Bos taunas AF492351	601: CACGAAACAGGCTCCAACAACCCAACAGGAATTCCTCAGACGTAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATACCATTAAGGACATCTTAGGGGCCCTCT 700
Bos taunas GQ129207	601:..... 700
Sus scrofa DQ518915	601:..... C.. A..... T..... T.. C..... C.. A..... A..... T..... T..... A..... C.. T..... A..... TC..... A.. T.. A.. 700
Sus scrofa AF034253	601:..... C.. A..... T..... C..... C.. A..... A..... T..... T..... A..... C.. T..... A..... TC..... A.. T.. A.. 700
Ovis aries AF010406	601:..... A..... C..... C.. A.. G.. AC.. T..... T.. C..... T.. T.. C..... A..... C..... T.. TA.. C 700
Ovis aries AY858379	601:..... A..... C..... C.. A.. G.. AC.. T..... T.. C..... T.. T.. C..... A..... C..... T.. TA.. C 700

Note: alphabets and numbers after species names mean accession nos of Genbank.

## Appendix 2 Results of homology search

## • vegetable-tanned cow leather

>V00654|V00654.1 Bos taurus complete mitochondrial genome.

Length = 16338

Score = 327 bits (165), Expect = 4e-86

Identities = 172/173 (99%), Gaps = 1/173 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcacccaacaccttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14942 aacagtcacccaacaccttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 15001

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 120

|||||

Sbjct: 15002 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 15061

Query: 121 tatcctccatttatcatcagtagcaattgccatagtcacactactattcctc 173

|||||

Sbjct: 15062 tatcctccatttatcatca-tagcaattgccatagtcacactactattcctc 15113

>KU891849|KU891849.1 Bos taurus isolate MACT mitochondrion, complete genome.

Length = 16339

Score = 327 bits (165), Expect = 4e-86

Identities = 172/173 (99%), Gaps = 1/173 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcacccaacaccttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14943 aacagtcacccaacaccttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 15002

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 120

|||||

Sbjct: 15003 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 15062

Query: 121 tatcctccatttatcatcagtagcaattgccatagtcacactactattcctc 173

|||||

Sbjct: 15063 tatcctccatttatcatca-tagcaattgccatagtcacactactattcctc 15114

• **rice bran-tanned cow leather**

>V00654|V00654.1 Bos taurus complete mitochondrial genome.

Length = 16338

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatcacatcggcacaaatttagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14942 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatcacatcggcacaaatttagtcgaatg 15001

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattctcgcttccattt 120

|||||

Sbjct: 15002 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattctcgcttccattt 15061

Query: 121 tatcctccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 172

|||||

Sbjct: 15062 tatcctccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 15113

>KU891849|KU891849.1 Bos taurus isolate MACT mitochondrion, complete genome.

Length = 16339

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatcacatcggcacaaatttagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14943 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatcacatcggcacaaatttagtcgaatg 15002

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattctcgcttccattt 120

|||||

Sbjct: 15003 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattctcgcttccattt 15062

Query: 121 tatcctccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 172

|||||



・ **beef (reference sample)**

>V00654|V00654.1 Bos taurus complete mitochondrial genome.

Length = 16338

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14942 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 15001

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 120

|||||

Sbjct: 15002 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 15061

Query: 121 tatccttccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 172

|||||

Sbjct: 15062 tatccttccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 15113

>KU891849|KU891849.1 Bos taurus isolate MACT mitochondrion, completegenome.

Length = 16339

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14943 aacagtcacccaacctcttatcagcaatcccatatcggcacaaatttagtcgaatg 15002

Query: 61 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 120

|||||

Sbjct: 15003 aatctgaggcggattctcagtagacaaagcaaccctaccgattcttcgcttccattt 15062

Query: 121 tatccttccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 172

|||||

Sbjct: 15063 tatccttccatttatcatcatagcaattgccatagtcacactactattcctc 15114

**・ pork (reference sample)**

>KT626638|KT626638.1 *Sus scrofa* isolate SP89 cytochrome b (cytb)

gene, complete cds; mitochondrial.

Length = 1140

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 tacgggtcatcacaatctactatcagctatcccttatatcggaacagacctcgtagaatg 60

|||||

Sbjct: 429 tacgggtcatcacaatctactatcagctatcccttatatcggaacagacctcgtagaatg 488

Query: 61 aatctgagggggcctttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattcttcgccttcactt 120

|||||

Sbjct: 489 aatctgagggggcctttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattcttcgccttcactt 548

Query: 121 tatcctaccattcatcattaccgccctcgagccgtacatctcctattcctg 172

|||||

Sbjct: 549 tatcctaccattcatcattaccgccctcgagccgtacatctcctattcctg 600

>KJ476223|KJ476223.1 *Sus scrofa* isolate RCSP766-AQ cytochrome b

(cytb) gene, complete cds; mitochondrial.

Length = 1140

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 tacgggtcatcacaatctactatcagctatcccttatatcggaacagacctcgtagaatg 60

|||||

Sbjct: 429 tacgggtcatcacaatctactatcagctatcccttatatcggaacagacctcgtagaatg 488

Query: 61 aatctgagggggcctttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattcttcgccttcactt 120

|||||

Sbjct: 489 aatctgagggggcctttccgtcgacaaagcaaccctcacacgattcttcgccttcactt 548

Query: 121 tatcctaccattcatcattaccgccctcgagccgtacatctcctattcctg 172

|||||

Sbjct: 549 tatcctaccattcatcattaccgccctcgagccgtacatctcctattcctg 600

・ **mutton (sheep) (reference sample)**

>KY662385|KY662385.1 Ovis aries breed Afshari sheep cytochrome b  
(cytb) gene, complete cds; mitochondrial.

Length = 1140

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagttattaccaacctccttcagcaattccatatattggcacaacctagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 429 aacagttattaccaacctccttcagcaattccatatattggcacaacctagtcgaatg 488

Query: 61 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctcacccgattttcgctttcactt 120

|||||

Sbjct: 489 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctcacccgattttcgctttcactt 548

Query: 121 tattttccattcatcatcgagccctcgccatagttcacctactcttcctc 172

|||||

Sbjct: 549 tattttccattcatcatcgagccctcgccatagttcacctactcttcctc 600

>KY366508|KY366508.1 Ovis aries isolate 103Oo cytochrome b gene,  
partial cds; mitochondrial.

Length = 1059

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagttattaccaacctccttcagcaattccatatattggcacaacctagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 405 aacagttattaccaacctccttcagcaattccatatattggcacaacctagtcgaatg 464

Query: 61 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctcacccgattttcgctttcactt 120

|||||

Sbjct: 465 aatctgaggaggattctcagtagacaaagctaccctcacccgattttcgctttcactt 524

Query: 121 tattttccattcatcatcgagccctcgccatagttcacctactcttcctc 172

|||||

Sbjct: 525 tattttccattcatcatcgagccctcgccatagttcacctactcttcctc 576

・ **chevon (goat) (reference sample)**

>KY564269|KY564269.1 Capra hircus breed Early British Improved

haplogroup A2 mitochondrion, partial genome.

Length = 16594

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatacctaatactctttcagcaatcccatatattggcacaacctagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14532 aacagtcatacctaatactctttcagcaatcccatatattggcacaacctagtcgaatg 14591

Query: 61 aatctgagggggattctcagtagacaaagccactctcacccgattcttcgccttcactt 120

|||||

Sbjct: 14592 aatctgagggggattctcagtagacaaagccactctcacccgattcttcgccttcactt 14651

Query: 121 tatctcccattcatcatcacagccctcgccatagtcacactgctcttcctc 172

|||||

Sbjct: 14652 tatctcccattcatcatcacagccctcgccatagtcacactgctcttcctc 14703

>KY564268|KY564268.1 Capra hircus breed Old Scottish haplogroup A2

mitochondrion, partial genome.

Length = 16633

Score = 341 bits (172), Expect = 2e-90

Identities = 172/172 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacagtcatacctaatactctttcagcaatcccatatattggcacaacctagtcgaatg 60

|||||

Sbjct: 14571 aacagtcatacctaatactctttcagcaatcccatatattggcacaacctagtcgaatg 14630

Query: 61 aatctgagggggattctcagtagacaaagccactctcacccgattcttcgccttcactt 120

|||||

Sbjct: 14631 aatctgagggggattctcagtagacaaagccactctcacccgattcttcgccttcactt 14690

Query: 121 tatctcccattcatcatcacagccctcgccatagtcacactgctcttcctc 172

|||||

Sbjct: 14691 tatctcccattcatcatcacagccctcgccatagtcacactgctcttcctc 14742