

シーケンス等を活用した自然毒関連植物分析法の検討

橋口 祥子、遠藤 智哉^{*1}、森永 由加里、佐々木 麻里、廣田 剛

Examination of toxic plant analysis methods using sequencing

Shoko Hashiguchi, Tomoya Endo, Yukari Morinaga, Mari Sasaki, Tsuyoshi Hirota

Key word：毒キノコ poisonous mushroom、ツキヨタケ *Omphalotus guelpiniformis*、PCR、sequence

要 旨

2023年度の調査研究にて、有毒キノコのPCR法による遺伝子検査体制を確立したが、一部キノコ種において検査が困難な種があったため、キノコ共通プライマー（きのこユニバーサルプライマー）を用いて遺伝子を増幅しその塩基配列をシーケンスにより解読することにより、キノコの種類を推定する手技について検討した。

はじめに

気候変動、人の動向変化及び動画による誤情報の発信に伴い、自然毒とりわけ有毒キノコの喫食による食中毒リスクが高まっている。令和4年度に機器による有毒成分の一斉分析、令和5年度にPCR法による種の同定を行ってきた。令和6年度はシーケンスによる、形態学や症状から推定が難しい、あるいは残品が少量しか回収できなかった場合の検査方法を検討した。多様な食中毒の原因推定のための検査法が増えることにより、保健所による迅速かつ正確な食中毒の原因調査、及び県民への正確な情報提供・注意喚起の一助となると考え、本件検討に取り組んだ。

材料及び方法

1 材料

1.1 試料及び試薬

試料はツキヨタケ（西部保健所衛生課 提供）、クサウラベニタケ、テングタケ及びドクツルタケ（大分きのこ会 会長村上 康明 氏（理学博士）提供）を使用した。

また種が明らかな食材として、市販されているエリンギ、シメジ及びエノキタケを使用した。想定される喫食残品（キノコ鍋）の作成のため、干しシイタケが封入されただしパック他調味料を使用した。

試料からの抽出はDNeasy Plant mini Kits(QIAGEN社)を使用した。

遺伝子の増幅にはTaKaRa EX Taq HS（タカラバイオ社）、ニッポンジーン社の各種プライマー（表1）を使用した。

遺伝子の増幅確認のためにinvitrogen E-Gel（2% Agarose）（Thermo Fisher Scientific社）を使用した。

増幅産物の精製にMinElute PCR purification kit（QIAGEN社）、BigDye XTerminator Purification Kit（Thermo Fisher Scientific社）を使用した。

1.2 機器

遺伝子増幅のためにサーマルサイクラー(Bio-metra TRIO 48(Aanalytik Jena社))を、塩基配列の解読のためにシーケンサー(SeqStudio Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific社))を使用した。

2 方法

2.1 手順

検査手順の概要については図1のとおり。工程の詳細については以下に示す。

2.1.1 抽出・精製工程

DNeasy Plant mini Kitsを使用し、図2のとおり抽出・精製した。

2.1.2 増幅工程

TaKaRa EX Taq HS、ニッポンジーン社の各種プライマーを使用し、表2の条件で増幅した。PCR産

^{*} 福岡県工業技術センター

物を図3のとおり精製した。

2.1.3 サイクルシーケンス及び精製工程

MinElute PCR purification kit、BigDye XTerminator Purification Kitを使用し、表3及び図4の条件でサイクルシーケンス及び精製を行った。

3 結果

想定される喫食残品を含む各抽出液のきのこユニバーサルプライマーによる増幅をアガロース電気泳動で確認したところ、一部を除き単一バンドで増幅が確認された。（図5）

増幅産物のDNAテンプレートを用いてシーケンスを行ったところ、想定される喫食残品を含むすべての試料から塩基配列を読み取ることができた。

BLASTで塩基配列を検索したところ、ツキヨタケ、エリンギ、シメジ、エノキタケ、クサウラベニタケの一部については単品及び調理残品のいずれから、高い一致率で検索ができた。一方R5年度にPCR法でクサウラベニタケと断定できなかったもの

について、イッポンシメジ属であるものの特定には至らなかった。

4 考察

目的のPCR産物と同じサイズかつ単一の遺伝子増幅が確認できたため、図2、3及び表2の条件で抽出及び遺伝子の増幅が可能と考えた。サイクルシーケンスにより塩基配列を確認することができたため図4及び表3の条件でサイクルシーケンスが可能と考えた。単一のキノコから抽出した試料およびキノコを複数種調理した試料から得られた塩基配列は、BLAST検索が可能だったが、一部のクサウラベニタケについて、種の特が困難であった。今回試料として使用したクサウラベニタケは試料が僅少であり、機器による有毒成分の分析を行わなかったため、クサウラベニタケの毒性がないあるいは低い近縁種であった可能性がある。当センターにはBLASTの塩基配列データ登録も多い有毒種の持ち込みが想定されるため、本検査法が有毒キノコ種による食中毒の原因推定の一助となることが期待される。

表1 使用プライマー各種

対象種	バンド長	プライマー名	配 列
キノコ共通 (きのこユニバーサルITS)	800bp	NIHS-mush-ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
		NIHS-mush-ITS4B	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ツキヨタケ	107bp	OJSP-Tsukiyo-F	GTGCACGTTTCCTTTCAAT
		OJSP-Tsukiyo-R	AGAATCATCAACAGAGCTGC
クサウラベニタケ	110bp	ERSP-F	TTTGAGAACTGCTGTGAAAATC
		ERSP-R	GGCACAAAGTCCCTATATGTTTA
ドクツルタケ	103bp	AVSP-Dokutsuru-F	GCTCTCCTTGAATGTATTAGTGG
		AVSP-Dokutsuru-R	GGTTAGACAGCAGAGAGAACTAAC

表2 PCR条件

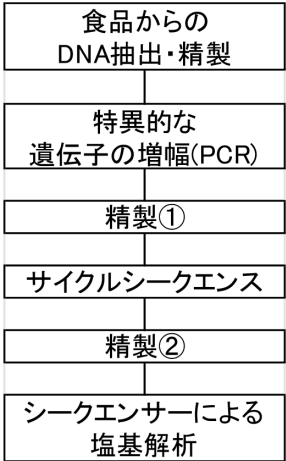
	きのこ ユニバーサル (μL)	各種キノコ (μL)
滅菌蒸留水	14.24	18.55
10× Ex Taq Buffer	2	2.5
dNTP mix	1.6	2
プライマー1 (20 μM)	0.5	0.625
プライマー2 (20 μM)	0.5	0.625
EX Taq HS (5U/μL)	0.16	0.2
テンプレート	1	0.5
Total	20	25

操作	きのこユニバーサル			各種キノコ		
	温度	時間	Cycle	温度	時間	Cycle
Inactivation	95.0 °C	3 min	1	95.0 °C	3 min	1
Denaturation	95.0 °C	30 sec	40	94.0 °C	30 sec	35
Annealing	55.0 °C	60 sec		60.0 °C	60 sec	
Extension	72.0 °C	60 sec		72.0 °C	60 sec	
終了	4.0 °C	-	1	4.0 °C	-	1

表3 シークエンス条件

反応試薬	1検体
RNase free Water	10.0μL
5 × BigDye Sequencing Buffer	3.0μL
BigDye Terminator v3.1	2.0μL
(Total)	(15.0μL)
1 μ M Primer	3.0μL
精製後PCR産物(検体)	2.0μL
Total	20.0μL

図1 検査手順の概要



操作	温度	時間	Cycle
Inactivation	96.0 °C	15 Sec	1
Denaturation	96.0 °C	10 Sec	25
Annealing	50.0 °C	5 Sec	
Extension	60.0 °C	2 min	

図2 抽出・精製工程

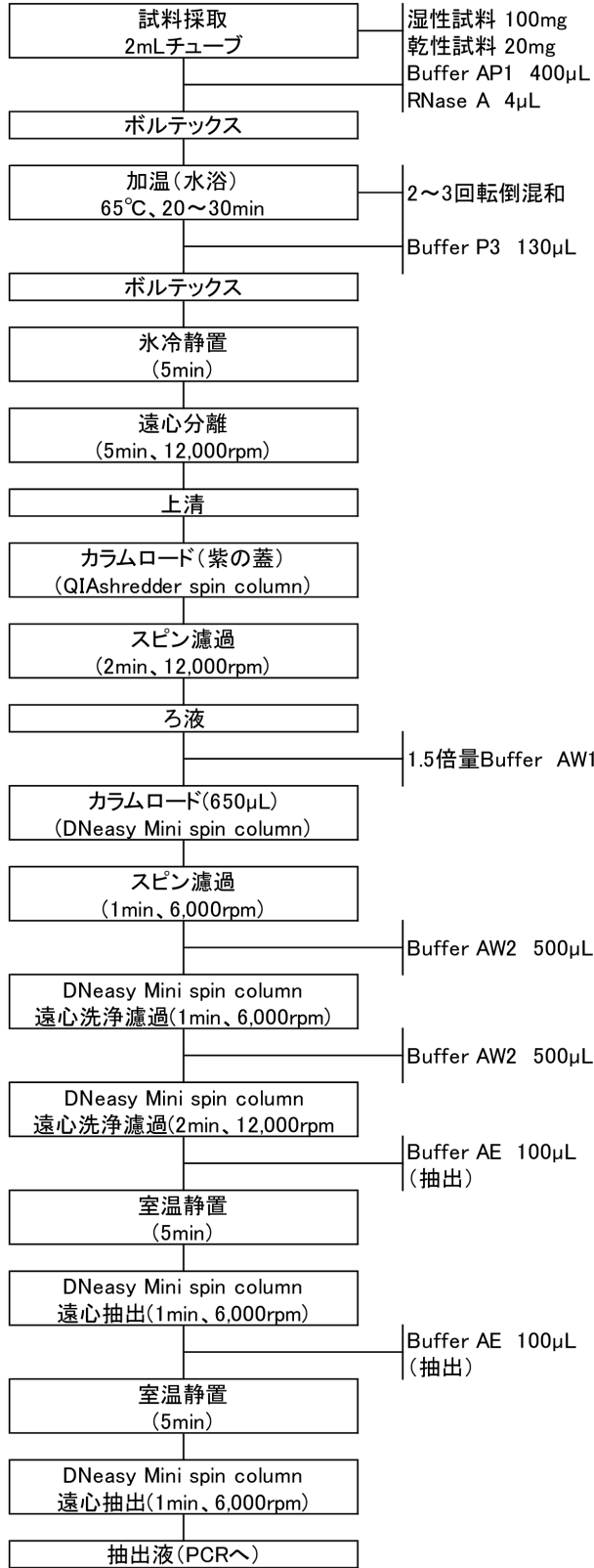


図3 PCR後精製工程（精製①）

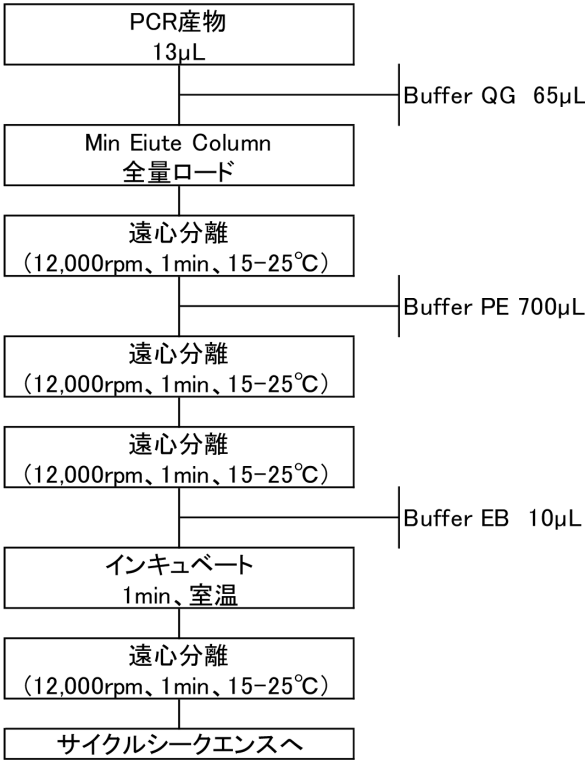


図4 サイクルシーケンス後精製工程(精製②)

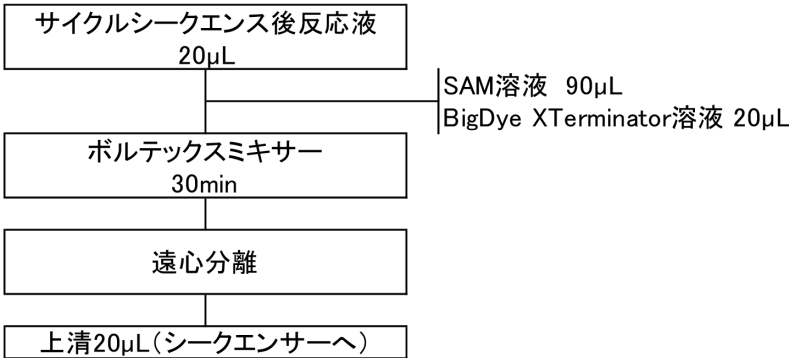
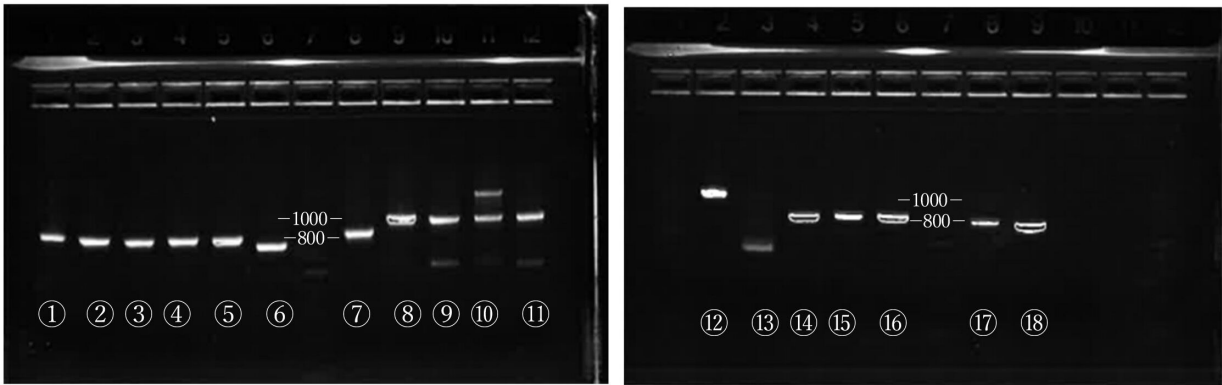


図5 アガロース電気泳動結果（きのこユニバーサルプライマー使用）



①～⑤：ツキヨタケ（調理品）
⑥：シメジ（調理品）
⑦：エノキ（調理品）
⑧～⑬：クサウラベニタケ

⑭～⑯：カキシメジ
⑰：テングタケ
⑱：ドクツルタケ