

2014 年度

修士論文

MALDI-TOF/MS 及び ARISA を用いた  
キノコ子実体迅速同定手法に関する研究

21334001 菅原 諒太

指導教員 食品微生物管理学 山口 昭弘 教授

村松 圭 准教授

酪農学園大学大学院 酪農学研究科

## 目次

諸言	1
第 I 章 自生キノコ子実体の遺伝子解析による同定と機能性データ	6
1. 序	6
2. 材料と方法	7
(1) 試料	7
(2) 試料の前処理法	7
(3) 遺伝子解析による自生キノコ種の同定	7
1) DNA 抽出	7
2) PCR 反応	8
3) アガロースゲル電気泳動	8
4) PCR 産物の精製	9
5) DNA 塩基配列解析	9
(4) $\beta$ -グルカン測定	10
1) 試薬	10
2) $\beta$ -グルカン抽出液の調製	11
3) 測定操作	12
4) 酵素法	12
(5) TPP 測定	12

1) 試薬	12
2) TPP 測定用試料液の調製	12
3) 測定操作	13
(6) DPPH ラジカル消去活性測定	13
1) 試薬	13
2) DPPH 測定用試料液の調製	14
3) 測定操作	14
(7) 統計処理	14
3. 結果	15
(1) DNA 塩基配列解析結果	15
(2) Congo Red 法による $\beta$ -グルカン測定結果	15
1) $\beta$ -グルカン検量線	15
2) セルロース ( $\beta$ -1,4-グルカン)の影響	15
3) 自生キノコの $\beta$ -グルカン量	16
(4) 酵素法との比較	16
(5) TPP 測定結果	17
(6) DPPH ラジカル消去活性測定結果	17
(7) $\beta$ -グルカン、TPP 及び DPPH ラジカル消去活性の相関	18
4. 考察	19
5. 要約	22

第Ⅱ章 MALDI-TOF/MSによるキノコ種の同定	23
1. 序	23
2. 材料と方法	25
(1) 試料	25
(2) 試薬調製	25
(3) タンパク質抽出	26
(4) MALDI-TOF/MS測定	26
(5) 個体差及び製造元間差	27
(6) 保存条件	27
(7) 脱塩処理	28
(8) SDS-PAGE	29
(9) データベースの作成	30
(10) パターンマッチング	30
3. 結果	32
(1) 試料採取部位	32
(2) 個体差及び製造元間差	32
(3) 保存条件	33
(4) 脱塩処理	33
(5) SDS-PAGE	34
(6) 市販栽培キノコ同士のパターンマッチング	34



(7) 遺伝子解析及びデータベース構築	35
(8) 形態類似キノコの比較	35
4. 考察	37
5. 要約	42
第Ⅲ章 ARISAによるキノコ種の同定	43
1. 序	43
2. 材料及び方法	45
(1) 試料	45
(2) ARISA解析	45
(3) キノコ混合物モデル	45
(4) 食中毒事例	46
3. 結果	47
(1) フラグメント長の比較	47
(2) キノコ混合物モデルの解析	47
(3) 食中毒キノコの解析	48
4. 考察	50
5. 要約	52

総括	53
Summary	57
謝辞	61
参考文献	62
図表	

## 諸言

キノコはその高い嗜好性から世界の国々で食されている代表的な菌類である。主に担子菌門に属する菌類で、肉眼で確認可能な大型の子実体を形成するものがキノコと呼ばれる[8]。我々が一般的に食しているのはこの子実体であるが、近年、生活習慣病の高リスク化や高齢化社会などの時代背景を反映して健康志向の機運が高まっており、キノコはその機能性についても注目を集めている[17]。キノコの代表的な機能性成分としてβ-グルカンの研究が広く進んでおり、免疫賦活作用や抗癌作用などが報告されている[16, 17]。また植物性食材の機能性成分として良く知られるポリフェノールがキノコにも多く含まれているとの報告がある[5]。

キノコは世界で5万種以上存在するとされており[20]、我が国においても南北に広く伸びた国土による多様な気候と先進国でもトップクラスの森林面積（7割）を持つことから数多くの自生キノコの生育が確認されている。紀元前2000年頃の縄文時代の遺跡からキノコを模倣した土製品が発見されるなどキノコ食用の歴史は古く、日本人は特にキノコを好む民族でもある[17]。現代においても愛好家は多く、秋を代表する食材としてキノコ狩りが風物詩となっている。食用としての利用価値が高いキノコ種も多く、栽培方法が古く

から研究されているものの、完全な人工栽培が行われているのは僅か十数種のみである[12]。そのため天然キノコは高級食材として珍重され、マツタケに至ってはその多くを海外からの輸入に頼っている。しかし実際に北米から輸入されるマツタケは日本産 (*Tricholoma matsutake*) とは別種 (*Tricholoma magnivelare*) であるなど、キノコ種の真正性には注意を要する場合がある。

キノコは食用として広く親しまれている一方で、強い毒性を持つ種あるいは食毒が不明な種も非常に多く、行政機関から注意喚起はなされるものの、毎年秋になると食用キノコとの誤食による食中毒事例が発生している現状がある[11]。日本における自然毒由来の食中毒の90%は毒キノコに起因するものと言われ、例年50件以上の食中毒事例が報告されている[25]。実際の食中毒発生時には、被害拡大防止のために原因食材・原因物質の同定が不可欠である。頭痛、嘔吐や下痢などの一般的な臨床症状のみで原因食材あるいは原因物質の特定は難しいため、原因を究明するためには科学的なアプローチが必要になる。例えば食材に個人が採取した自生キノコが含まれ、患者の発生が家庭内に限定的な場合はキノコ食中毒が強く疑われることになる。キノコは他の微生物とは異なり、肉眼で観察可能なため形態的特徴による鑑定が有効かつ重要である。しかし種によっては子実体の形態が極めて類似しており、安易な判別による食用キノ

コとの誤食が食中毒事故の原因となる場合も多い。現在、キノコ種の同定には形態鑑定及び遺伝子解析が主に用いられている[6]。遺伝子解析は現時点では最も信頼性高くキノコ種の同定が可能だが、鑑定までに日数を要することから即時的な対応を要する食中毒の現場ではその適用に限界がある。

近年、質量分析技術の進歩に伴い Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight / Mass Spectrometer (MALDI-TOF/MS)を用いたタンパク質ベースの新たな微生物同定手法が急速な発展を遂げている[2, 22]。測定原理はMALDI-TOF/MSによって得られるリボソームタンパク質を中心とする固有のマスペクトルを既存のデータベースとパターンマッチングすることによって種レベルでの同定を行うものである。この測定システムの大きな特徴としては操作が簡便であり、目的とする微生物コロニーさえあれば測定から同定結果を得るまで10分以内と迅速な同定が可能である点にある。現在、世界中の臨床微生物検査で導入が広まりつつある技術だが、ホタテやエビの品種同定の試みも報告されており、食品分野への応用にも期待が集まっている[18, 19]。これまで、キノコについては菌糸体を用いた同定法を検討した報告はあるが[7]、子実体に対してのMALDI-TOF/MSによる同定法についての報告はない。キノコ子実体のMALDI-TOF/MSによる迅速同定が可能となれ

ば、緊急性の高い食中毒事例への対応、あるいはその未然防止により大きな意義を持つことになる。

食中毒発生の際、原因となったキノコは調理の過程による変質あるいは患者の吐しゃ物が唯一の残された手がかりである場合など、本来の形態を保っていないことからキノコ種の判別が困難な事例は多い。特に解析対象であるキノコ以外に他種キノコを含む複数種の真菌類が混在している場合には、DNA塩基配列解析を直接適用できないためキノコ種の同定が困難となる。現時点ではツキヨタケなど典型的な毒キノコに対してのみ Real Time PCR による検出方法が提案されているのみである [24]。このような複数種の菌類が共存している状態はある種の微生物叢であるとも捉えることができる。微生物叢の解析には Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Spacer Analysis (T-RFLP) 及びメタゲノム解析など様々な手法が開発されているが、その中でも Automated rRNA Intergenic Analysis (ARISA) は低コストで実用的な方法であるとして最近注目を集めている。ARISA は rRNA 遺伝子の多型領域を蛍光標識プライマーを用いて PCR 増幅し、自動シーケンサを用いて 1 塩基長以上のフラグメントサイズの差から微生物種の識別を行う方法である。フラグメント長の解析結果のみから直接、種の同定はできないが微生物叢の

全体像を把握する上では有用性が高い。食材が原型をとどめていない吐しゃ物などから食中毒の原因物質を調査する際も、試料全体を混合した後、DNAを抽出しARISA解析を行うことで、照合する特定キノコ種の存在の有無を推定できるものと期待される。

自生キノコは自然環境の中の多種多様な相互作用を受けて生育しており、そのライフサイクルの大半を菌糸体・胞子の形で存在し、ほんの一時を子実体として過ごすのみである。その多くは人工栽培法が確立されておらず、我々は自然の恩恵に頼ることになる。幸い、北海道内には多くの自生キノコが生育しており、天然の貴重な資源ライブラリーからキノコ子実体入手することが可能である。そこで本研究では自生キノコ子実体を採取し、代表的な機能性として $\beta$ -グルカン [16]、total polyphenol (TPP) 及び 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去活性(抗酸化能)[5]を測定するとともに、実用的な食毒判別の観点からMALDI-TOF/MS及びARISAを用いるキノコ種の新規かつ総合的な同定手法の開発を試みた。

## 第 I 章 自生キノコ実体の遺伝子解析による同定と機能性データ

### 1. 序

採取した自生キノコについて形態観察・遺伝子解析による種の同定を行うとともにキノコの代表的な機能性成分である $\beta$ -グルカン、TPP 及び DPPH ラジカル消去活性を測定し、それぞれの特性を比較評価した。 $\beta$ -グルカンの測定に用いた Congo Red 法 [9] は元々、大麦由来の分岐構造を持つ $\beta$ -グルカンを定量する簡便法として報告されており、より一般的な方法としては総グルカン量から $\alpha$ -グルカン量を差し引く酵素法 [15] が用いられている。酵素法と比較して Congo Red 法は、はるかに簡便な操作で $\beta$ -グルカンを測定することができ、多試料のスクリーニングに有用であると考えられるが、現在、キノコを含めた食品への適用例は報告されていない。

本章では、自生キノコについて rRNA 遺伝子スペーサー (ITS) 領域の DNA 塩基配列解析により種を同定した後、Congo Red 法により $\beta$ -グルカンを測定し、代表的な機能性指標である TPP 及び DPPH ラジカル消去活性 (抗酸化能) とともにキノコの科あるいは種ごとの傾向を比較した。



## 2. 材料と方法

### (1) 試料

酪農学園大学キャンパス内で 2012 年から 2013 年に採取した自生キノコ 48 試料を用いた (Table1)。また  $\beta$ -グルカン測定値の比較には栽培条件が異なるアラゲキクラゲ 5 試料 (鹿児島工業高専提供) を使用した。キノコ試料は全て石突きを除いた子実体可食部を測定対象とした。

### (2) 試料の前処理法

採取した試料は水道水で洗浄した後、ペーパータオルで水分を除去し、ドライフードメーカー (AFD-550, アピックスインターナショナル) を用いて 8 時間の温風乾燥処理を行った。その後、乳鉢・乳棒あるいはミルサーを用いて粉碎し、常温保存したものを乾燥粉末試料とした。ドライフードメーカー内の温度は約 70°C であり、いずれのキノコも乾重量は湿重量の 1/10 程度となった。

### (3) 遺伝子解析による自生キノコ種の同定

#### 1) DNA 抽出

乾燥粉末試料約 20mg から ISOIL Beads Beating kit (ニッポンジーン) に添付された説明書にしたがって DNA を抽出し、キノコ DNA

溶液 100 $\mu$ L を得た。

## 2) PCR 反応

得られた DNA 溶液を鋳型とし、キノコの ITS 領域に対応するプライマー (Table 2) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 反応液は注射水 (大塚製薬) 14.1 $\mu$ L、 $\times 10$  Ex Taq Buffer 2 $\mu$ L、2.5mM dNTP 1.6  $\mu$ L、ExTaq 0.1 $\mu$ L (以上、RR006A, TaKaRa)、各 50 $\mu$ M Primer Mix (Forward + Reverse, ファスマック) 0.2 $\mu$ L を混合し、DNA 溶液 2 $\mu$ L を加え全量を 20 $\mu$ L とした。PCR 反応は初期熱変性を 94 $^{\circ}$ C・10 分間、サイクリングは熱変性を 94 $^{\circ}$ C・30 秒間、アニーリングを 55 $^{\circ}$ C・30 秒間、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C・30 秒間とし、サイクル数 30 とした。サーマルサイクラーは iCycler (Bio Rad) を用いた。

## 3) アガロースゲル電気泳動

PCR による増幅の程度とそのバンドサイズの確認をアガロースゲル電気泳動により行った。電気泳動には 0.5mg/mL のエチジウムブロマイドを含む 2%(w/v) アガロースゲル (Agarose KANTO, 関東化学)、同じく 0.5mg/mL のエチジウムブロマイドを含む  $\times 1$  Tris Acetate EDTA Buffer (TAE) (313-90035, ニッポンジーン) 泳動液を使用した。泳動に用いる  $\times 6$  Loading Buffer は、グリセリン (特

級;075-00616, 和光純薬) 15g、プロモフェノールブルー(021-02911, 和光純薬)15mg を蒸留水に溶解し、0.5mol/L EDTA (311-90075, ニッポンジーン) 3mL を加えた後、全量 50mL とした。PCR 産物 10 $\mu$ L に×6 Loading Buffer 2 $\mu$ L を混合し、0.5mg/mL の 100bp DNA Ladder(DM003-R500, GeneDireX)をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつゲル内のウェルへアプライし、100V で 30 分間、電気泳動 (Mupid-2Plus, ADVANCE)した。泳動終了後、UV ゲル撮影装置 (FAS-201, TOYOBO)を用いて増幅バンドを確認した。

#### 4) PCR 産物の精製

DNA 塩基配列解析に使用する PCR 産物の精製は PCR Clean up Kit (U0609B, TaKaRa)を用いて行った。PCR 産物 10 $\mu$ L に注射水 90 $\mu$ L を混合した 10 倍希釈溶液の全量を使用した。基本的な操作は添付の説明書に従ったが NT3 Buffer でスピンカラムを 2 回洗浄する行程ではカラムから液があふれるのを避けるためアプライ量を規定の 700 $\mu$ L から 650 $\mu$ L へ変更した。最終的に精製 PCR 産物 30 $\mu$ L を得た。

#### 5) DNA塩基配列解析

PCR増幅時に用いた ForwardあるいはReverseプライマーを、1.6

pmol/mLとなるようにTE Buffer (pH8.0)で希釈調製した。電気泳動で確認したバンドの濃さに基づき5倍から20倍に注射水で希釈した精製PCR産物10 $\mu$ L及び1.6pmol/mLプライマー4 $\mu$ Lを8連チューブに入れて混合し、塩基配列解析を依頼した(ファスマック)。得られた塩基配列データを確認後、BLASTによるデータベースとの相同性検索を行いキノコ種を同定した。97%以上の一致率を示した場合、同種であると判断した。なお子実体の形態からキノコ種が明らかな場合は、塩基配列解析の代わりに、後述するDNAフラグメント長解析(ARISA)を用いて同定した。

#### (4) $\beta$ -グルカン測定

##### 1) 試薬

Congo Red (Sigma) 74mg 及び Tris base (Sigma) 40g を蒸留水 400mL に溶解し、6mol/L HCl 約 33mL を加え pH8.0 に調整後、全量を 500mL として 0.2mmol/L Congo Red 溶液を調製した。 $\beta$ -グルカン標準品として大麦由来の Beta Glucan CFA Std (Megazyme) を用いた。蒸留水 20mL を 1 瓶に加えて 70-80 $^{\circ}$ C で加熱攪拌し溶解させた後、全量を 100mL として 400mg/mL 標準保存溶液を調製した。保存溶液から 400、200、100 及び 50mg/mL の標準溶液希釈系列を用いて調製し、検量線を作成した。

## 2) $\beta$ -グルカン抽出液の調製

乾燥粉末試料 0.5g に 2% KOH 10mL を加え、ホモジナイザー (ULTRA-TURRAX T-10, IKA)を用いて均質化した。次にオートクレーブ (SS-240, TOMY)を用いて 100°C-60min 加熱抽出を行い、10000 r/min-10 min-25°C で遠心分離 (CR21F, HITACHI)した上清をデカンテーションで分取した。

続いて、エタノール沈殿による $\beta$ -グルカンの精製を以下に従い行った。分取した上清 200 $\mu$ L を 1.5 mL チューブに採り 99.5%エタノール 800  $\mu$ L を加え 15000 r/min-10 min-25°C で遠心分離 (CF15D, HITACHI)し、上清を取り除いた。次に 80%エタノール 1mL を加え転倒混和にて沈殿を洗浄後、再度、遠心分離 (15000 r/min-10 min-25°C)し上清を取り除いた。この洗浄工程をもう一度繰り返し、スピンドウン (15000 r/min-1 min-25°C)によりチューブ底部に残った上清をマイクロピペットを用いて丁寧に取り除いた。得られた沈殿に蒸留水 1mL を加えウォーターバス (EX-B, TAITEC)を用いて 55°C-30min 加温溶解した。溶けにくい場合にはボルテックスを用いて可溶化し、 $\beta$ -グルカン抽出液とした。

### 3) 測定操作

試料抽出液 150 $\mu$ L を 96well マイクロプレートに採り (n=2)、Congo Red 溶液 100 $\mu$ L を加え、30 分間放置した後に 570nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Emax, Molecular Devices) を用いて測定した。また各試料について Congo Red 溶液を 0.66mol/L Tris buffer (pH 8.0) に置き換えたサンプルブランクの吸光度を差し引くことにより、抽出液の着色の影響を除いた。

### 4) 酵素法

アラゲキクラゲ 5 試料について、酵素法による  $\beta$ -グルカンの測定を依頼した(日本食品分析センター)。

### (5) TPP 測定

#### 1) 試薬

Folin-Denis 試薬(47742-100ML-F, Sigma)に蒸留水を加え、用時 5 倍希釈して比色定量に用いた。TPP 測定のポリフェノール標準品としてケルセチン(10005169, Cayman)を用いた。

#### 2) TPP 測定用試料液の調製

乾燥粉末試料 0.5g に対し 50%エタノール 10mL を加え、10 分間

激しく振とう (Model SA-31, Yamato) した後、  
10000r/min・10min・25℃で遠心分離した上清をデカンテーションで  
分取した。得られた上清に蒸留水を加え、用時 10 倍希釈して測定  
に用いた(試料 10 倍希釈液)。

### 3) 測定操作

試料 10 倍希釈液 50 $\mu$ L を 96well マイクロプレートに採り (n=2)、  
Folin-Denis 試薬 5 倍希釈液 50 $\mu$ L を加え混合した。さらに 4%  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 $\mu$ L を加え混合し、室温で 10 分間放置した後、650nm  
での吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。また各試料に  
ついて Folin-Denis 試薬を蒸留水で置き換えたサンプルブランクの  
吸光度を差し引き、検量線からポリフェノール濃度を求めた。

## (6) DPPH ラジカル消去活性測定

### 1) 試薬

DPPH (047-04051, Wako) 4.0mg を 99.5% エタノール 10mL を  
加え、アルミホイルで遮光した後、10 分間振とうし 1mmol/L DPPH  
反応試液を用時調製した。抗酸化能標準品には Trolox(238813,  
Sigma)を用いた。

## 2) DPPH ラジカル消去活性測定用試料液の調製

「(5)-2)TPP 測定液の調製」と同様の操作で行った。

## 3) 測定操作

DPPH 反応試液は 1mmol/L DPPH 3mL に 0.3mol/L MES Buffer pH 6.1 (M0164, Sigma) 3mL を加え用時調製した。試料 10 倍希釈液 50 $\mu$ L を 96well マイクロプレートに採り (n=2)、DPPH 反応試薬 100 $\mu$ L を

加え混合した。アルミホイルで遮光し 10 分間放置した後、550nm での吸光度を測定した。また DPPH 反応試液を蒸留水に置き換えたサンプルブランクを差し引き、Trolox(238813, Sigma)検量線から DPPH ラジカル消去活性を Trolox 相当量( $\mu$ mol TE/100g)として求めた。

## (7) 統計処理

統計処理には Prism 6 (Graph Pad software) を用いた。



### 3. 結果

#### (1) DNA 塩基配列解析結果

全 48 試料の内、塩基配列解析を行った 39 試料中 38 試料で種あるいは属レベルでの同定が可能であった。キノメリイグチ(形態観察)のみ DNA 塩基配列解析において良好なピークが得られず、BLAST による相同性検索が不可能であった。遺伝子解析の結果、48 試料の内訳は重複した同種(同属)を除くと 27 種(属)となった(Table 1)。

#### (2) Congo Red 法による $\beta$ -グルカン測定結果

##### 1) $\beta$ -グルカン検量線

代表的な検量線の例を Fig. 1 に示した。回帰式は二次曲線であり定量範囲は 10 から 300 $\mu$ g/mL であった。

##### 2) セルロース ( $\beta$ -1,4-グルカン) の影響

キノコに乾燥重量あたり 10% 程度存在する直鎖状の  $\beta$ -グルカンであるセルロース ( $\beta$ -1,4-グルカン) [10, 14] の影響を確認するために、透析用セルロースチューブ(和光純薬)及びカラムクロマト用担体の Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてアルカリ熱水抽出液を同様に調製し測定した。その結果、吸光度変化はな

くβ-グルカン測定値へのセルロースの影響がないことを確認できた。

### 3) 自生キノコのβ-グルカン量

全 48 試料のβ-グルカン定量値(mg/g)は  $8.6 \pm 6.3$  (Mean  $\pm$  SD)であった(Fig. 2-A)。最も高い値を示したのは No.28 タヌキノチャブクロの 25.1 であり、最も低い値を示したのは No.45 ニガクリタケの 1.1 であった。また、種ごとの比較では分散分析によりβ-グルカンは有意差を認め( $p < 0.0001$ )、ニガクリタケが  $2.0 \pm 1.0$  ( $n = 4$ )、*Cortinarius balteatocumatilis* が  $8.5 \pm 1.0$  ( $n = 4$ )、ハタケシメジが  $11.4 \pm 1.6$  ( $n = 3$ )、ムキタケが  $19.5 \pm 1.8$  ( $n = 3$ )及びタヌキノチャブクロが  $19.7 \pm 3.6$  ( $n = 4$ )であった(Fig. 3-A)。

### (4) 酵素法との比較

栽培培地が異なるアラゲキクラゲ 5 試料について Congo Red 法と酵素法によるβ-グルカンの定量結果(mg/g)を比較したところ、絶対値は酵素法が  $372 \pm 36$  (Mean  $\pm$  SD)と測定値にセルロースを含むことから Congo Red 法の  $6.4 \pm 1.4$  の約 50 倍高い結果となったが有意の相関関係( $p = 0.0127$ )が認められた(Fig. 4)。

#### (5) TPP 測定結果

全 48 試料の TPP 定量値 (mg/100g) は  $362 \pm 190$  (Mean  $\pm$  SD) であった (Fig. 2-B)。最も高い値を示したのは No.30 ハラタケ属キノコの 820 であった。一方、最も低い値を示したのは No.13 カワラタケの 44 であった。種ごとの比較では分散分析により TPP は有意差を認め ( $p = 0.0122$ )、ニガクリタケが  $412 \pm 134$ 、*C. balteatocumatilis* が  $259 \pm 51$ 、ハタケシメジが  $574 \pm 57$ 、ムキタケが  $384 \pm 73$  及びタヌキノチャブクロが  $500 \pm 113$  であった (Fig. 3-B)。

#### (6) DPPH ラジカル消去活性測定結果

全 48 試料の測定値 ( $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ ) は  $1170 \pm 776$  (Mean  $\pm$  SD) であった (Fig. 2-C)。最も高い値を示したのは No.30 ハラタケ属キノコの 3340 で TPP 測定と同様の結果であった。一方、最も低かったのも No.13 カワラタケで唯一検量線の定量範囲外であった。種ごとの比較では分散分析による有意差は認められなかった ( $p = 0.4106$ ) が、ニガクリタケが  $1320 \pm 676$ 、*C. balteatocumatilis* が  $576 \pm 74$ 、ハタケシメジが  $1830 \pm 355$ 、ムキタケが  $1320 \pm 876$  及びタヌキノチャブクロが  $1200 \pm 384$  と、TPP 同様に *C. balteatocumatilis* は低値傾向を示した (Fig. 3-C)。

(7)  $\beta$ -グルカン、TPP 及び DPPH ラジカル消去活性の相関

$\beta$ -グルカンと TPP 及び DPPH ラジカル消去活性の間には相関関係は見られなかった (Fig. 5)。一方、TPP とラジカル消去活性の間には強い正の相関関係が確認された ( $r = 0.8079$ ,  $p < 0.0001$ )。

#### 4. 考察

キノコ子実体の形態による鑑定結果を遺伝子解析により確認した (Table 1)。特徴的な形状から形態による鑑定が容易なムキタケやベニテングタケなどでは、ほぼ遺伝子解析結果と一致した。一方、生長段階での形状変化や形態が類似した種が多いフウセンタケ科などでは DNA 塩基配列によって初めて正確な同定が可能となった。一部、属レベルの同定にとどまるが ITS 領域の塩基配列解析により、ほとんどのキノコの同定が可能であった。唯一、キヌメリイグチと推定される試料で遺伝子解析による同定結果が得られなかった。塩基の種類に対応するシグナル重複が見られたことから他種キノコあるいはカビなどの真菌類の混在による影響と考えられた。

Congo Red 法での  $\beta$ -グルカン定量値 (mg/g) はアラゲキクラゲの  $6.4 \pm 1.4$  (Mean  $\pm$  SD) と、酵素法の  $372 \pm 36$  と比較してはるかに低い値となったが有意の正の相関は認められている (Fig. 4)。これは測定原理が全く異なることによると考えられる。Congo Red 試薬による  $\beta$ -グルカンの測定原理は、分岐構造を持つ  $\beta$ -1,3/1,6-グルカン及び  $\beta$ -1,3/1,4-グルカンがつくる三次元立体構造に Congo Red 分子が会合して起こる吸収波長のシフトを利用したものであるのに対して、酵素法 [15] では直鎖の  $\beta$ -1,3/1,4-グルカンも測定値に含まれる。従って植物体の構成成分として存在しているセルロースなどの直鎖状の

$\beta$ -グルカンは Congo Red 法の測定に影響を与えないことになる。本研究においても実際にセルロースが測定値に影響しないことを確認した。しかし、元々、測定したセルロース試料は抽出の段階でエタノールによる沈殿生成が目視できなかつたことから、今回の条件では抽出されていない可能性が高い。いずれにせよ Congo Red 法では一般に免疫賦活などの機能性成分としては捉えられていないセルロースが測定には含まれないことも大きな利点である。単一の分子構造を持たない $\beta$ -グルカンはその分子量や立体構造などが生体内での生理活性に大きく影響を及ぼすため、機能性という観点から多様な $\beta$ -グルカンの高次構造に関する情報を反映した Congo Red 法は酵素法とは異なる新たな知見が得られるものと期待される。

全 48 試料の Congo Red 法による自生キノコの $\beta$ -グルカン量 (mg/g)は  $8.6 \pm 6.3$  (Mean  $\pm$  SD)、範囲は 1.1 から 25.1 と種ごとに大きな変動が見られた。科内の比較ではハラタケ科の No.28 タヌキノチャブクロが 25.1 と高い値を示した一方、No.30 ハラタケ属のキノコは 1.3 と低い値であった (Fig. 2-A)。分散分析 - Tukey 検定による種間の比較では *C. balteatocumatilis* vs ハタケシメジ及びムキタケ vs タヌキノチャブクロを除き有意差を認めた。以上のことからキノコの $\beta$ -グルカンは種内での変動は小さく、生育環境や個体差による影響よりも種間の差が大きいことから種固有の値を持つこ

とが確認された。

全 48 試料の TPP(mg/100g)及び DPPH ラジカル消去活性( $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ )についても、それぞれ  $412 \pm 134$  (Mean  $\pm$  SD)及び  $1315 \pm 776$  と大きな変動が見られ、科レベルで一定の傾向は確認できなかった (Fig. 2-B,C)。TPP の種間の比較においては *C. balteatocumatilis* vs (ハタケシメジ、タヌキノチャブクロ) の間に有意差を認めたが、DPPH ラジカル消去活性においては種間の有意差が認められなかった。このことはムキタケの DPPH ラジカル消去活性の標準偏差が大きいことが影響しているが、試料の一部が 2012 年に調製されたものであり経年劣化が起っていた可能性が高い。

TPP と DPPH ラジカル消去活性の間に正の相関が見られたことからキノコの抗酸化性についてもポリフェノールが関与していることが示唆された (Fig. 5)。TPP と DPPH ラジカル消去活性はいずれも  $\beta$ -グルカンとの相関は全く示さず、同種内の変動はやや大きい傾向にあるが基本的には  $\beta$ -グルカンと同様に個体差よりも種間の差が大きいと考えられた。

## 5. 要約

本学キャンパス内の自生キノコ 48 試料について遺伝子解析による同定を行ったところ 47 試料が種あるいは属レベルで同定された。Congo Red 法による $\beta$ -グルカンの測定結果は、セルロースを含まないことから、酵素法と比べて小さい値となったが高次構造を反映した機能性成分として測定する上ではむしろ有用であると考えられた。また食材の機能性評価に汎用される TPP 及び DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、 $\beta$ -グルカンとの相関は認められなかったが、両項目の測定結果には正の相関が見られ、キノコの抗酸化性にはポリフェノールが関与していることが示唆された。 $\beta$ -グルカン、TPP 及び DPPH ラジカル消去活性のいずれの機能性指標においても科ごとに一定の傾向は見られず、種ごとに特徴的な値を示すことが確認された。



## 第 II 章 MALDI-TOF/MS によるキノコ種の同定

### 1. 序

キノコ種の分類及び識別は非常に複雑である。種の識別には形態観察に加えて最近では遺伝子解析などが用いられるが、これらは必ずしも万能な訳ではない[6]。科あるいは属レベルで異なるものの子実体は形態が極めて類似する場合や遺伝子解析で広く利用される領域に種を超えた共通配列が存在する場合もあり、これらが識別を困難にしている[4]。

子実体は形態のみならず第 I 章で述べたように機能性成分についても種ごとに多様性がある。β-グルカンについては複雑な高次構造をとることが知られており、この形成には複数のタンパク質が複雑に作用している[3]。そこで本章では形態観察や遺伝子解析とは原理的に異なる、タンパク質のプロファイル解析に基づく MALDI-TOF/MS による新しいキノコ種同定へのアプローチについて述べる。MALDI-TOF/MS による同定は量的に優勢なリボソームタンパク質を中心としたマスプロファイルを基に行われる[2, 22]。目的とする微生物コロニーさえあれば菌種同定までに要する時間が約 10 分程度と迅速であり操作も簡便であることから、現在、臨床微生物検査の場で急速に広まりつつある。また近年、エビ[18]やホ

タテ [19]などの海産物の同定に適用された例が報告されており、食品分野への導入も始まっている。キノコについては菌糸体を用いた同定の試みが報告されているのみであり [7]、本研究は子実体を用いたキノコ種同定へ MALDI-TOF/MS の応用を検討した初の研究となる。

## 2. 材料と方法

### (1) 試料

北海道内で採取した自生キノコ及び札幌・江別市内で購入した栽培キノコを試料とした。自生キノコ全 157 試料中 109 試料は札幌市清田保健所より提供を受け、残りの 48 試料は 2014 年 6 月から 10 月の間に酪農学園大学キャンパス内にて採取したものをを用いた (Table 3)。自生キノコは採取時に子実体の柄、傘、つば、ひだなどの形態的特徴に基づき鑑定を行った後、第 I 章で述べた遺伝子解析によって種あるいは属を同定した。また市販キノコにはナメコ、エノキタケ、タモギタケ、ブナシメジ、シイタケ及びエリンギの 6 種を用いた。

### (2) 試薬調製

MALDI-TOF/MS 測定の際に使用するマトリックス及びキャリブレーションスタンダードはそれぞれ Bruker Daltonics 社が推奨する HCCA portioned (成分名 :  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸, 8255344, Bruker Daltonics)、Bacterial Test Standard (BTS, 8255343, Bruker) を用い、同社の MALDI Biotyper トレーニングテキストに従って調製した。

### (3) タンパク質抽出

生のキノコ子実体を傘及び柄部位に分けて試料調製した。傘部位はひだを含めた子実体の傘の縁を切り取り、柄部位は中央部の表面から切り取った(Fig. 6)。各部位はそれぞれメス(No.10, フタバ)あるいは剃刀で5mm片程度に切り取り、極小ガラスビーズ(BZ-01, 井内盛栄堂)約300mg及びガラスビーズ(BZ-1, 井内盛栄堂)2個を含む2mLスクリーキャップチューブ(Beads beating tube)に加えた。その後、タンパク質抽出溶媒(70%ギ酸:アセトニトリル=1:1)400 $\mu$ Lを加え、細胞破碎装置(BC-20, セントラル科学貿易)を用いて2000 r/min-3minの条件で粉碎した。粉碎処理後、15000r/min-5min-25 $^{\circ}$ Cで遠心分離した上清をタンパク質抽出液とした。この抽出法は用時調製とした。

### (4) MALDI-TOF/MS測定

タンパク質抽出液1 $\mu$ Lをプレート(MTP384 target plate polished steel BC, Bruker)のスポット位置に滴下し、クリーンベンチ内で送風乾燥させた。その後、同じスポット上にマトリックス1 $\mu$ Lを重ねて滴下し、再度、乾燥させMALDI-TOF/MS測定を行った。測定は1試料につき4スポットを3重測定し計12スペクトルを得た。

TOF/MS 測定機器は Autoflex、測定用ソフトウェアは Flex Control 及び MALDI Biotyper Real Time Classification(RTC)、測定結果についてはデータ処理用ソフトウェア Flex Analysis 及び同定用ソフトウェア MALDI Biotyper (以上、Bruker)を使用した。

#### (5) 個体差及び製造元間差

市販栽培キノコ子実体を用いて製造元間及び購入時期による個体差について検討した。製造元間差の検討には江別市内の小売店にて販売されていた4社のシイタケを用いた。購入時期の検討にはシイタケ2試料及びエリンギ1試料を用い、2014年6月から2週間毎に購入し、計3回測定を行った。いずれも傘及び柄部位に分けて測定した。

#### (6) 保存条件

常温、乾燥粉末、冷蔵(4℃)及び冷凍(-30℃)の4保存条件について傘部位を用い0、1、2、4及び7日目の経時変化を追った。このうち乾燥粉末試料は約100mgをBeads beating tubeに計り取り、「(3) タンパク質抽出」の操作に従い試料調製した。

## (7) 脱塩処理

MALDI-TOF/MS 測定において塩などの夾雑物はイオン化の阻害に働く。塩による影響の有無を確認するために Ziptip (C18, ミリボア)による脱塩処理を行った。試料調製を「(3) タンパク質抽出」と同様に行い、抽出液 50 $\mu$ L を窒素気流化 40 $^{\circ}$ C で乾固後、同量の 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) に転溶し脱塩処理を行った。また窒素乾固及びマトリックスの影響を考慮し、以下の条件で比較した。

条件 1. 「(3) タンパク質抽出」と同様の操作

条件 2. 窒素乾固後に再度タンパク質抽出溶媒に溶解

条件 3. 窒素乾固後に 0.1% TFA に転溶

条件 4. 窒素乾固後に 0.1% TFA に転溶し脱塩処理

条件 2-4 では窒素乾固後、それぞれ同量のマトリックスに溶かした。

100% アセトニトリル (ACN) 10 $\mu$ L を吸引・廃棄を行った後、0.1%TFA / 50%ACN の吸引・廃棄を 2 回繰り返す、チップを膨潤させた。次に 0.1%TFA の吸引・廃棄を 3 回繰り返す平衡化した。0.1%TFA に転溶したタンパク質液を試料チューブ内で 5 回以上、吸引・排出しペプチドを吸着させた後、0.1%TFA 10 $\mu$ L を 3 回吸引・廃棄して支持体を洗浄することで脱塩を行った。最後にあらかじめ 0.5mL チューブに採った 3 $\mu$ L の溶出液 (0.1%TFA / 50%ACN) 中で吸

引・排出を 3 回以上繰り返し、全量をチップから溶出し MALDI-TOF/MS 測定に用いた。

#### (8) SDS-PAGE

TOF/MS 測定に係るタンパク質の存在を SDS-PAGE により確認した。溶媒を 2% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)に置き換え、「(3) タンパク質抽出」と同様に抽出した。このタンパク質抽出液 20 $\mu$ L に Laemmli sample buffer (Bio-Rad) 300 $\mu$ L と 2-メルカプトエタノール(和光純薬) 15 $\mu$ L を混合したサンプルバッファー 20 $\mu$ L を加え、恒温機(DNA AMPLIFIER, Sanyo)を用いて加熱(99 $^{\circ}$ C -5min)した。泳動装置にミニプロテイン TGX ゲル(4-15% グラジエント, Bio-Rad)をセットし、泳動バッファー(Bio-Rad)を満たした後、加熱処理した試料液 20 $\mu$ L 及び 0.03 $\mu$ g/mL 分子量マーカー(プレステイン D Broad, Apro) 5 $\mu$ L を各ウェルにアプライし、電気泳動(240V-40mA-30min)を行った。泳動終了後、ゲルを取り出し脱イオン水で 5 分間振とう洗浄する操作を計 3 回行い、CBB プラス(和光純薬)を加えて再度 30 分間振とうした。溶液を捨て、脱イオン水で 60 分間振とう洗浄を行った後、染色バンドを確認した。

#### (9) データベースの作成

同定用ソフトウェア MALDI Biotyper は MALDI-TOF/MS 測定で得られたマススペクトルを既存のデータベースと照合することによって種を同定する。一般的な細菌及び真菌類については汎用データベースが市販されているが、現在、キノコ子実体についてのデータベースは存在しない。そこで本研究では得られたマススペクトルから In-house database(自生キノコデータベース)を構築した。Mass Spectral Profile (MSP)の作成及びデータベースへの登録には同一株から 12 回の測定の内 6 スペクトル以上が得られたうえでの平均化を必要条件とした。また同種キノコについては各々の株(Strain)としてデータベースへ登録した。

#### (10) パターンマッチング

Biotyper を用いた同定はタンパク質プロファイルのパターンマッチングに基づき、データベースに登録された MSP との類似性が 0.000 から 3.000 までのスコアで示される。判断基準としてはスコアが 2.000 以上で種レベルでの一致、1.999 から 1.700 までは属レベルでの一致、それ以下では同定不可となっている(Fig. 7)。各実験結果においてパターンマッチングのスコアから種の同定に必要な 2.000 以上の値が得られる最適な試料条件についての検討を行った。



MSP とのパターンマッチングには各スポットの初回測定時に得られた 4 つのマススペクトルを使用し、最も高いスコアが得られたスポットを最終的な同定結果とした。

### 3. 結果

#### (1) 試料採取部位

市販栽培キノコ 3 種 4 試料(製造元の異なるシイタケ 2 試料、エリンギ及びブナシメジ各 1 試料)を用いて柄及び傘部位のマススペクトルを比較した(Fig. 8)。柄及び傘部位ともに全てのスポットからマススペクトルが得られた。全体的に傘部位は柄部位に比べ  $m/z$  2000 から 10000 付近に特徴的なピークを多く認める傾向を示した。さらに後述する「(5) SDS-PAGE」において傘部位の方が柄部位よりもタンパク質量が多い傾向が見られたことから MSP 作成には傘部位から得られたマススペクトルを用いることとした。各々の傘部位の MSP と柄部位の 4 スポットのマススペクトルを比較した結果、ブナシメジ(Fig. 8-A)及びシイタケ 1 試料(Fig. 8-B)でスコアが全て 2.00 以上だったもののエリンギ(Fig. 8-C)及び他のシイタケ(Fig. 8-D)では 1 スポットで 1.70-1.99 の値となった。予備検討ではシイタケ傘部位を測定した時、柄部位よりもマススペクトルが得やすい傾向にあった。またシイタケ柄部位からは 12 回の測定の内、1 測定しかマススペクトルが得られない現象が見られた。

#### (2) 個体差及び製造元間差

製造元の異なるシイタケ 4 試料の傘部位についてマススペクトル

を比較した結果、パターンマッチングにおいて 2.5 以上の高いスコアが得られ、製造元間の差はなかった (Table 4)。

また購入時期によっても得られるマススペクトルに大きな変動はなく、いずれのパターンマッチングにおいてもスコアは 2.2 以上を示した (Table 5)。

### (3) 保存条件

市販栽培キノコ 2 種 (シイタケ及びエリンギ) の傘部位について購入直後に測定した MSP をデータベース登録した。その後、各保存条件でのマススペクトルをパターンマッチングにより比較した (Fig. 9)。シイタケでは冷凍保存及び室温保存 4 日目、そして乾燥保存 1 日目においてシグナルが得られない、あるいはスコアが 1.99 以下を示すスポットが出現した。またエリンギにおいても冷凍保存及び室温保存 4 日目、そして乾燥保存 1 日目においてシイタケと同様の結果となった。いずれの条件下でも全ての測定でスコアが 2.00 以上となったのは冷蔵保存のみであった。なお室温保存 7 日目では子実体にカビが発生したため測定不能であった。

### (4) 脱塩処理

マススペクトルが得にくかったシイタケ試料についてタンパク質

抽出液の脱塩処理による改善が見られるかどうかを検討した。測定した4条件のいずれにおいてもマススペクトルに差はなく、キノコ実体のMALDI TOF/MS測定においては試料に含まれる塩の影響はないことが確認できた(Fig. 10)。

#### (5) SDS-PAGE

SDS-PAGEの結果、いずれのキノコにおいても傘部位のタンパク質量が柄部位と比較して多い傾向が見られた(Fig. 11)。またシイタケ2試料を比較すると同種内においてもタンパク質の量的な面では大きな差があることがわかった。

#### (6) 市販栽培キノコ同士のパターンマッチング

市販栽培キノコ6種(ナメコ、エノキタケ、タモギタケ、ブナシメジ、シイタケ及びエリンギ)から得られたマススペクトルをMSPとしてライブラリーへ登録後、パターンマッチングを行った。同種試料のマススペクトルとMSPの比較ではスコアが2.6以上であり、種レベルでの一致が確認された。また他種試料との比較ではスコアがいずれも1.3以下となり、種が異なることでスコアが1.99以下となることを確認できた(Table 6)。

## (7) 遺伝子解析及びデータベース構築

遺伝子解析の結果、全 157 試料中 137 試料が種あるいは属レベルでの同定が可能であった (Table 3)。同定できなかった 20 試料の内、7 試料は塩基配列の一致率が 96%以下であり、残り 13 試料は重複シグナルなどの良好なシグナルが得られず同定不能であった。自生キノコは生の子実体傘部位を使用し、マススペクトルの取得から MSP の登録を行った。全 157 試料中 6/12 測定以上のマススペクトルが得られたものは 113 試料、5/12 測定以下であったものは 22 試料、全く得られなかったものは 22 試料であった (Table 3)。構築した自生キノコデータベース内の種同士についてパターンマッチングを行ったところ、クリタケとクリタケモドキ及びシラゲアセタケとオオキノハダトマヤタケ (形態観察のみ) はスコアが 2.00 以上と同種と判別された。残りの 96% は全て別種キノコと正しく識別可能であった。また同種キノコ同士のパターンマッチングではムキタケを除き全て 2.0 以上のスコアを示したが、全体の 3 割ほどはスポット (測定回) によっては 1.7 から 1.99 の低いスコアを示す場合もあった。

## (8) 形態類似キノコの比較

誤食による食中毒発生事例のある [ムキタケ (食)・シイタケ (食)] vs ツキヨタケ (毒) 及び [ナメコ (食)・クリタケ (食)] vs ニガクリタケ (猛

毒)のマススペクトルについてデータベースと照合した結果、形態類似キノコ同士も含め、いずれも他種キノコとのパターンマッチングのスコアは 1.69 以下と確実に識別可能であった(Fig. 12, 13)。

また遺伝的に近縁関係にあり、形態による判別が困難なシロナメツムタケ、チャナメツムタケ及びキナメツムタケについて同様に照合を行った(Fig. 14)。その結果、互いのスペクトルパターンが大きく異なったことから、いずれも他種キノコとのパターンマッチングのスコアは 1.69 以下となり、明確な識別が可能であった。この内、シロナメツムタケと思われる No.142 の試料は BLAST 解析の結果、複数種が 98% の一致率を示し、遺伝子解析による識別は困難であったキノコである。

#### 4. 考察

キノコ子実体における MALDI-TOF/MS 測定条件の最適化について種々の検討を行った結果、試料採取部位及び保存条件がマススペクトルに大きく影響することわかった。柄及び傘部位からのマススペクトルの比較では、ブナシメジにおいて視覚的には明らかに異なる印象であったがパターンマッチングでのスコアの変動は 2.14 - 2.29 と予想外に小さかった。逆にエリンギではマススペクトルパターンに大きな違いは見られなかったもののパターンマッチングによるスコアでは 1.99 以下のスポットが存在した。

Biotyper では MSP を作成する際に 70 のシグナルがピックアップされ、その存在頻度、強度及び  $m/z$  値が平均化されて登録されるため、よりシャープなシグナルが多く存在している方が高いスコアを示すと考えられる。エリンギの場合、柄部位のシグナル強度が低く、 $m/z$  が 2000-4000 付近のシグナルとノイズが混在し MSP とのズレが生じてしまったことが低いスコアを招いた原因として考えられる。一方、ブナシメジのように傘部位において柄部位には見られない特徴的なシグナルが観察される現象についてはキノコの生活環に原因があると推察される。

キノコの生活環の中には孢子形成があり [17]、それは子実体の傘部位の裏側、つまり裏で行われる。この孢子由来のタンパク質が

MALDI-TOF/MS 測定時に柄部位には見られないスペクトルパターンの要因の 1 つになっている可能性が考えられる。また柄や傘部位などはキノコが生長していく中でそれぞれ異なる役割を担っていることから、発現するタンパク質にも差が生じることはむしろ当然である。グレバ[17]と呼ばれる胞子形成部位を傘とは別に持つ不明キノコ(No.67)について MALDI TOF/MS 測定を行った際、ゲル状のグレバ部位を測定することは困難であったため胞子形成機能を持たない傘様の部位を使用したが高マススペクトルを得ることができなかった。このことから傘部位の高マススペクトルへの胞子の寄与は少なからず存在する可能性がある。その確認には胞子のみの高マススペクトルとの比較が必要であり、本研究では未取得の菌糸体と合わせて、今後、検討を加える予定である。

保存条件の検討結果から 4℃冷蔵保存が高いスコアを得るうえで最適な方法であった。乾燥及び凍結保存では高マススペクトルパターンに変化があり、これは温風下での高温状態や凍結融解がタンパク質に与える影響によるものと考えられる。室温保存ではカビの発生も含めキノコの劣化が早く、保存条件としては元々適さない上に高マススペクトルパターンにも大きな変化が生じた。原因としては内在性酵素による自己消化や共存微生物の影響が考えられる。食品利用としてのキノコは冷蔵に加えて、透湿性や通気性が低い包装材料で



密閉保存することにより、呼吸による自己消化を抑制し鮮度が維持されるといった報告もあり [13, 23]、このマススペクトル変化との関連性を示すものと考えられ興味深い。

栽培キノコについて製造元間 (Table 4) 及び購入時期 (Table 5) の違いがパターンマッチング結果に影響を与えなかったことから同種・同部位におけるマススペクトルの変動は少ないものと考えられる。実際に栽培キノコ同士のパターンマッチングの結果からは他種キノコとの識別を高い信頼性で行うことが可能であった (Table 6)。しかし食用として一定の品質を保っている純粋培養の栽培キノコとは異なり、ムキタケ 2 試料でのパターンマッチングの不一致が示すように多様な生育環境にある自生キノコの場合には、同種内においても共存微生物などの影響を受ける可能性は充分考えられる。

脱塩処理の各条件で得られるマススペクトルに変動が見られず、キノコ子実体の場合は塩によるイオン化阻害の影響がないことがわかった (Fig. 10)。一方、SDS-PAGE では柄及び傘部位の間にタンパク質の量的な差が存在することが確認された (Fig. 11)。この点も両部位間でマススペクトルに差が生じた要因の一つと考えられる。また同種内においても個体によりタンパク質量に差を認めたが、同定には影響なかったことからマススペクトルプロファイルの変動は少なく、個体間ではあくまでも全体的なタンパク質量の差のみが生じ

るものと考えられる。データベースへ登録するための必要条件とした 6/12 測定以上のマススペクトルを取得できた自生キノコは全体の 72%であったことから、種あるいは個体によっては TOF/MS 測定の際、必要なタンパク質量が存在していなかった可能性がある。また採取段階でのキノコの劣化の進行度合いやビーズ粉砕が困難な硬質のキノコの存在なども測定に足るタンパク質が得られなかった原因として考えられる。キノコの形態は多様性に富んでおり、中にはヒラタケのように柄を形成しないものも存在する。これらのことから現実的により多くのキノコ種を MALDI-TOF/MS により網羅的に同定できる条件としては、生のキノコ子実体の傘部位の使用が望ましいと結論づけた。

このように自生キノコにおいても種の判別が可能であり、形態が類似した、あるいは遺伝的に近縁関係にある種においてもほとんどの場合で MALDI-TOF/MS による同定で確実な識別が可能であった (Fig. 12-14)。パターンマッチングのスコアは同属にある種同士では高くなる傾向にあるが、今回のチャナメツムタケ (No.141)、シロナメツムタケ (No.142) 及びキナメツムタケ (No.129) ではマススペクトルに類似性はなく、確実に種の識別が可能であった。一方、イタチタケ (No.99) 及びオオキヌハダトマヤタケの可能性のあるキノコ (No.148) を識別することができなかったが、オオキヌハダトマヤタ

ケは塩基配列解析においても塩基配列シグナルの重複から同定が困難であったため、実際には MALDI-TOF/MS の結果が示すように同種であった可能性もある。唯一、判別不可能であった形態的特徴が類似したクリタケとクリタケモドキの例を除き、Biotyper を用いた同定システムは形態 (Fig. 12, 13) 及び遺伝子解析 (Fig. 14) で識別困難な多くの類似キノコの同定に有効であった。

以上、本研究において構築した MSP データベースと MALDI-TOF/MS 測定によって得られた子実体のマススペクトルを照合することによって、迅速かつ信頼性の高いキノコ種の同定が可能であることが示された。

## 5. 要約

MALDI-TOF/MS を用いたキノコ子実体の迅速同定手法の開発を目的に、測定条件の最適化及びデータベースの構築を行った。柄と傘の部位分け、購入時期、製造元間差、保存条件、脱塩処理及び SDS-PAGE などの検討結果から MALDI-TOF/MS 測定には生のキノコ子実体傘部位を用いることとした。自生キノコ 113 試料 103 種についてマススペクトルを取得しデータベースを構築した。データベース内の種同士のマススペクトルを用いてパターンマッチングを行ったところ、96%のキノコ種の識別が可能であった。

### 第Ⅲ章 ARISAによるキノコ種の同定

#### 1. 序

食中毒の原因食品が完全な状態で残っている場合は極めて限られている。キノコにおいても同様であり、調理後の子実体の一部、あるいは患者の吐しゃ物などが唯一の手がかりとなることも多い。このような試料に対しては、形態観察や DNA 塩基配列解析などの一般的な同定手法を適用することは困難である。形態観察では原型をとどめない子実体を識別することは不可能であり、また塩基配列解析では他の夾雑物由来の DNA が解析を困難にする。そこで本章では微生物叢の新たな解析手法として注目されている ARISA(Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis) [1]を用いたキノコ種同定手法開発のための基礎検討を行った。自生キノコの固有フラグメント長を測定するとともに、複数キノコの混合物モデル及び実際の食中毒事例キノコの解析を試みた。

ARISA は rRNA 遺伝子の多型領域を PCR で増幅後、シーケンサを用いて 1 塩基以上のフラグメント長の違いを解析するものである。フラグメント長の違いのみでは種を同定することはできないため、同時に DNA 塩基配列解析などによる同定結果が必要となる。ここでは第Ⅰ章及び第Ⅱ章で得た塩基配列解析による同定結果にフラグ

メント長の測定結果を加え、新たに ARISA 用のデータベースを作成した。

## 2. 材料及び方法

### (1) 試料

2012年11月から2013年10月の間に酪農学園大学キャンパス内で採取した自生キノコ48試料、市販栽培キノコ1試料、2014年9月から10月に札幌市清田保健センターより提供を受けた2試料及び2014年10月に札幌市北保健センターより提供された食中毒の原因食材として疑われたキノコ1試料の計52試料を使用した(Table 7)。食中毒が疑われたキノコのみ生の子実体を、残りは全て乾燥粉末を用いた。

### (2) ARISA 解析

「第I章2-(3)-2) PCR反応」に従って目的とするDNA領域を増幅した。ARISA解析にはITS4 (Table 4)の5'側を蛍光標識し、濃度を1/2の25 $\mu$ mol/mLとしたプライマーを用いた。PCR産物10 $\mu$ Lについて自動シーケンサによるフラグメント解析を依頼した(ファスマック)。フラグメント長による同定の際は、フラグメント長の $\pm$ 0.1%の範囲であれば同種の可能性があると判断した。

### (3) キノコ混合物モデル

ナメコ、ニガクリタケ、イボテングタケ、シイタケ及びナラタケ

属キノコ(一般名、ボリボリ)(Table 1 の No.9, 13, 25, 29 及び 31)を使用して食毒を含めた複数のキノコが混在するモデルを作成した。まずニガクリタケとボリボリを使用し 1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1 の重量比で計 250mg となるように各試料を混合し DNA を抽出した(n=3)。次にこれら 5 種のきのこを 1:1:1:1:1 の割合で混合後、同様に DNA を抽出し ARISA により解析した。

#### (4) 食中毒事例

2014 年 10 月に札幌市内で毒キノコの誤食が原因と思われる食中毒事故が発生し、キノコ種の鑑定依頼を受けた。依頼を受けた時点で試料は室温で 1 週間以上放置されていたため、外見上の劣化が激しくカビも発生していた。残された試料は石突き付近のツボ部位が欠落していたため形態に基づいた同定は困難であったが毒キノコのカキシメジの可能性が推測された。柄及び傘の両部位から DNA を抽出し、塩基配列解析による同定を試みたが PCR 産物には複数のバンドが検出された。このため、直接の塩基配列解析においては重複シグナルを示し同定不能であった。そこで食中毒キノコについて ARISA 解析を行い、比較対照となるキノコの固有フラグメント長との比較から種の鑑別を行った。



### 3. 結果

#### (1) フラグメント長の比較

ARISAによって解析した52試料31種全てにおいてフラグメント長のデータが得られた(Fig.15)。複数のピークが存在した場合、シグナル強度が最も高いものをメインピークとした。このときメインピークのシグナル強度はおおよそ任意蛍光強度2000 - 12000の範囲にあった。形態観察とフラグメント長が一致した11試料については塩基配列解析による同定は省略した。フラグメント長が一致し、塩基配列解析結果が異なったキノコはTable 7のNo.10 vs 11, No.15 vs 16, No.15 vs 17, No.16 vs 17, No.19 vs 20, No.20 vs 21, No.20 vs 22及びNo.21 vs 22の組み合わせであった。逆に塩基配列解析結果が一致し、フラグメント長が一致しないケースはTable 8のNo.14 vs (No.15-17)及びNo.23 vs (No.24-25)の組み合わせであった。残りのケースは全て塩基配列解析結果と固有ARISAフラグメント長が一致した。

#### (2) キノコ混合物モデルの解析

ニガクリタケ及びボリボリの組成割合を変化させた混合物モデルではいずれの混合比率においても両種に対応する2つのピークが確認され、メインピークに対して10%以上の強度でもう一方が存在し

た(Fig. 16)。しかし、ボリボリの組成割合が 10、30 及び 90% の時にも、ボリボリ由来の強いピークが存在しており、ピーク比は必ずしも存在割合を反映するものではなかった。キノコ 5 種混合物の ARISA 解析ではシイタケ、ナメコ及びボリボリに対応したピークが得られたがニガクリタケ及びテングタケ由来のピークは確認されなかった。またナメコのピークもシグナル強度がメインピークに対して 10% 以下と低値であった。

### (3) 食中毒キノコの解析

食中毒が疑われたキノコは ARISA 解析の結果、柄及び傘部位ともに 2 つの共通ピークが確認された(Fig. 17)。共通ピークのフラグメント長(bp)は柄部位では 346.16 及び 388.66、傘部位では 346.22 及び 388.70 であった。ARISA データベース(Table 7)との照合では 346.22 のフラグメントは No.2 アセタケ属のキノコの 345.72 に最も近かったが形態的には明らかに異なっていた。さらにこれらは鑑別比較品のカキシメジとして提供された No.19 及び No.22 のキノコのフラグメント長とは一致しなかった。最終的にこのキノコについてはアガロースゲル上の 2 種類の PCR 産物に対応するバンドを切り出し、それぞれについて塩基配列解析を行った結果、キノコ種としてハイイロシメジ、シロハイイロシメジ及び *Leucopaxillus*

*compactus* (和名無し)の可能性が考えられた。同定候補とされた種はいずれも食毒が明らかではないことから本キノコが食中毒の原因となった可能性は低いと考えられた。これらのキノコはいずれも ARISA データベース内には登録されていない種であった。また ARISA 解析結果 388.7 bp のフラグメントは酵母 *Cryptococcus musci* と同定された。

#### 4. 考察

ARISA のフラグメント長が同じでも塩基配列解析結果が異なる場合が全 31 種中 10 種のキノコに見られた (Table 7)。これは ARISA の原理上、異なる種同士であっても偶然にフラグメント長が一致することが有り得るためと考えられる。実際、キノコ 13 種のフラグメント長 (bp) が 390-400 付近に集中する領域で、塩基配列結果との不一致が多く見られた (Fig. 15)。一方で、フラグメント長は異なるが塩基配列解析による同定結果が一致する例が 2 組のキノコで確認された。このときのフラグメント長の差は 1 ないし 2 bp 程度だったことから同種内の多型による可能性も考えられる。

キノコ 2 種混合物についての ARISA 解析は混合比率によってシグナル強度に大きな影響はなく、5 種混合物では明瞭なシグナルが得られたのは 2 種のみであった (Fig. 16)。各混合比率において濃度依存性が見られなかった原因としては、使用した乾燥粉末が微粉末ではなく、試料採取時に偏りが生じた可能性がある。また PCR の増幅強度が混合物の量的な差よりもキノコ種の塩基配列の違いに依存していることにも関連していると考えられる。今回の場合、シイタケが優位に PCR 増幅され、ナメコ、ニガクリタケ及びイボテングタケの増幅効率が低かったことが予想される。

食中毒が疑われたキノコの ARISA 解析結果をデータベースと比

較したところ形態が類似していた鑑別対象の毒キノコ 2 試料とはフラグメント長は一致しなかった (Fig. 17)。この鑑定結果の妥当性は最終的な塩基配列解析によって別の食毒を持たない 3 種のキノコの可能性が示されたことから推測できた。形態及び DNA 塩基配列解析によるキノコ種の同定が今回のように困難な場合、ARISA による解析は比較対照キノコとの鑑別に極めて有用であることが確認できた。

ARISA では他種同士であってもフラグメント長が一致することがあるため、この結果のみで種の同定を行うことには限界がある。しかしキノコ種によっては特徴的な固有フラグメント長を持つことから、信頼性の高い同定が可能なものも存在する。また今回のキノコ食中毒事例のようにカビや酵母などの他の真菌類が混在している場合、塩基配列解析を要しない ARISA による種の同定はとりわけ利用価値が高い。形態観察や DNA 塩基配列解析に加えて ARISA を適用することで、解析可能な試料範囲を拡げるとともに、より信頼性の高い種の即時的な同定が可能になると考えられる。

## 5. 要約

微生物叢の解析手法である ARISA を用いて固有フラグメント長によるキノコ種の同定及び複数キノコ混合物モデルへの応用可能性を検討した。乾燥粉末キノコ 51 試料からフラグメント長のデータが得られたが、全 31 種中 10 種でフラグメント長が一致し、キノコ 5 種混合モデルにおいては PCR プライマーの増幅効率の違いなどから、明確なフラグメントが確認されたのは 2 種のみであった。従って、ARISA のみでキノコ種の同定あるいは存在比率を推定することは困難であると考えられた。しかしながら、子実体の原型を留めず形態及び DNA 塩基配列解析の適用が困難な食中毒が疑われたキノコの鑑別においては、フラグメント長が鑑別対象の食毒キノコからは明確に区別された。この結果により食中毒の原因がキノコではなかった可能性を示すことができた。このように、固有のフラグメント長を持つキノコ種に対しては、劣化が進み他の真菌類が混在するような試料に対しても、ARISA は確実な同定が可能であり有用性が高いことが確認できた。

## 総括

北海道内の自生キノコを用いて遺伝解析子及びタンパク質プロファイルに基づいた新たな同定手法の開発を行うとともに $\beta$ -グルカンなどの代表的な機能性指標についても合わせて評価した。全 205 試料中、ITS 領域の DNA 塩基配列解析により 175 試料が種あるいは属レベルで同定可能であった。別に 9 試料については ARISA フラグメント長の一致を基にキノコ種を推定した。同定できなかった 21 試料の内 20 試料は遺伝子多型あるいは他種 DNA の混在により解析可能な塩基配列データが得られなかったものである。残り 1 試料は PCR 反応を阻害する成分の影響で解析不能であった。

機能性評価として $\beta$ -グルカン、TPP 及び DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、TPP と抗酸化能の間には強い相関関係が見られたが、 $\beta$ -グルカンと両項目との相関は認められなかった。いずれの測定項目においても科ごとの傾向は見られず、種ごとに多様性を示したが、個体ごとの差は小さかった。

MALDI-TOF/MS を用いたキノコ子実体の同定は試料採取部位、個体差及び脱塩処理等の検討結果から生のキノコ子実体傘部位を使用することによって最も高い信頼性を確保できた。キノコ子実体 113 試料について固有の MSP を取得しデータベースを構築した。デー

データベース内に登録されたキノコ同士は4試料を除き、正確な識別ができた。MALDI-TOF/MSによるタンパク質プロファイルに基づき、迅速かつ確実なキノコ種の同定が可能となった。

ARISAによるフラグメント長は全31種中10種で一致し、フラグメント長のみによる種の識別は不可能であった。しかし食中毒事例のように形態が原型を留めず、他の真菌が混在する塩基配列解析困難な混合物試料に対してはARISAによる種の判別は極めて有用であった。

本研究において、キノコ種の同定を目的に形態観察に加え、DNA塩基配列解析、MALDI-TOF/MS及びARISAによる比較検討を行った結果、各々の手法の長所及び短所が明確になった。形態観察は最も迅速で特別な装置を必要としないが、長年の経験を要するため一般化するのは困難である。キノコ子実体の形態は生育環境及び生長段階により多様に変化することから熟練者においても形態による鑑定が難しい場合がある。実際、今回の形態による推定結果は遺伝子解析による同定結果と一致しない例も多く存在した。現在のところ、DNA塩基配列解析が最も汎用性があり信頼性高く種の同定が可能な手法である。しかしながら同定には通常数日を要し即時性に欠くこと、特殊な操作及び装置が必要であること及び他真菌類のDNAが混在する状態では適用できないといった限界がある。



MALDI-TOF/MS では迅速、簡便かつ安価な同定が可能であり、遺伝子解析と同様にかんりの近縁種の識別にも威力を発揮する可能性が示された。MALDI-TOF/MS 測定装置は数千万円と非常に高価ではあるが、現在、臨床微生物検査において導入が急速に広まりつつあることから、食品検査分野への適用も追って進むものと期待される。本研究はキノコ子実体の同定を目的とした初のデータベース構築に関するものであり、今後キノコ種を増やし同定精度の向上を目指すものである。

ARISA では特徴的なフラグメントを有する場合を除き、この解析結果のみで直接のキノコ種同定は困難ではあるが、カビの発生などにより他の真菌類が混在するような場合、微生物叢の全体像を把握することが可能であり、実際、今回の食中毒事例のように食毒キノコの鑑別における有用性が証明されている。

本研究の中心課題である MALDI-TOF/MS によるキノコ種同定はこれまでにない迅速性と信頼性を併せ持つ画期的な方法であり、今後、このような質量分析に基づく品種鑑別などへの応用は食品分野においても、急速に発展していくことが予想される。しかし、いかに最新の分子生物学的手法を導入したとしても、形態的特徴や生化学的性状などの重要な要素を含めた総合的な判断が品種の鑑定に求められることは疑う余地はない。従って MALDI-TOF/MS によるキノ

ノコ種同定手法は決して既存の手法に完全にとって代わるものではなく、より信頼性の高い同定のための新たなアプローチの一つと捉えるべきである。

## Summary

Mushrooms provide contradict properties. One aspect is as a favorite food widely accepted in the world, and another is pathogenesis of food poisoning sometimes in lethal. The identification of mushroom was traditionally used morphological analysis. However identification of fungi, including mushroom, has been approached by genomic analysis in recent decade. This study focus on characterization and identification of wild mushrooms by functional metabolites, rDNA sequences and protein compositions. Especially, the probability of matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) based protein analysis is spotlighted for rapid and reliable identification of mushrooms.

Two hundreds and five samples of fruiting bodies, grown wild in Hokkaido island including a campus of our university, were collected from the period from June '12 to November '14. The samples, hot-air blowed and powdered, were extracted with alkaline hot water for beta-glucan, with 50% ethanol for total polyphenol (TPP) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

radical scavenging activity. The ISOIL beads beating kit (Nippon gene) was used for DNA analyses of sequencing or automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA). Ribosomal proteins, being mainly present, were extracted from the cap of raw fruiting bodies with formic acid-acetonitrile mixture (1+1) for MALDI-TOF/MS analysis.

The functional features were evaluated by colorimetric assays of Congo red reagent for beta-glucan, of Folin-Denis reagent for TPP and of DPPH radical scavenging activity for antioxidant ability. The rDNA inter spacer (ITS) regions were sequenced for the species identification and also submitted to a polymorphic evaluation by ARISA. The protein mass spectra were obtained by MALDI-Biotyper (Bruker daltnics).

Beta-glucan contents were shown clear differences from each species to species beyond genus and family, although TPP and DPPH radical scavenging activity were also recognized similar tendency but accompanied with a little ambiguity. The DNA sequencing identified 175 samples as independent species or genus, however failed to obtain sequencing data mainly due to mixed fluorescence signals for residual 21 samples. The protein

profiles obtained with MALDI-TOF/MS well distinguished not only species but also each part of fruiting bodies such as stem, cap or spore within the same sample.

The best spectrum was obtained from the extracts of cap-portion of fruiting bodies. Mushroom database of mass profiling spectrum (MPS) was finally constructed through the measurements of 113 species cap samples which provided data qualified. MALDI-TOF/MS analyses of these samples were achieved correct identification of between species as much as 109 samples (96%). The results of ARISA identification, discriminating 1bp size differences in DNA fragment within  $\pm 0.1\%$  accuracy, were well consistent with the result of sequencing identification, however 10 of 31 species were not differentiated from other species because of the same fragment sizes. However, ARISA was effectively applied for the evaluation of a mushroom suspected an origin of as the food poisoning. The mushroom was stored at room temperature for 1 week then the fruiting body was deteriorated from original shape ever accompanied with some fungi like microbe. DNA sequencing could not be applied for such mixed samples since

they provide complicated signals. The ARISA fragments of the mushroom clearly differentiated from the size of toxic mushrooms suspected as a candidate. This finding leads to the estimation of no relation of the mushroom to the cause of food poisoning.

For rapid and reliable identification of mushroom species, more importantly removal of toxic mushrooms, would be possible by verification with indicative-protein databases of fruiting bodies obtained by MALDI-TOF/MS. Further, ARISA would be useful to confirm the authenticity of mushroom-processed foods with expected or unexpected contamination of toxic mushrooms.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり終始懇切なるご指導を頂きました酪農学園大学応用微生物学研究室 山口昭弘教授及び 村松圭准教授に心より感謝を申し上げます。

本研究実施に際しまして、貴重な試料を恵与いただきました酪農学園大学生物教育研究室 干場敏弘教授、札幌市清田保健センター 栄坂貞夫氏、鹿児島工業高専 山内正仁教授、札幌市北保健センター 勝俣友了氏及び西尾香奈子氏、MALDI-TOF/MS 装置一式の使用機会をご提供下さいました酪農学園大学獣医生化学ユニット 横田博教授に深く感謝の意を申し上げます。またキノコ鑑定に際しまして有益なご指導をいただきました 干場敏弘教授、栄坂貞夫氏に重ねてお礼申し上げます。

最後に本研究を通して、多方面にわたりご協力いただきました応用微生物学研究室の皆様、遠く宮城から 6 年間の大学生活を支えてくださった私の家族に深くお礼申し上げます。

## 参考文献

1. Cardinale, M., L. Brusetti, P. Quatrini, S. Borin, A. M. Puglia, A. Rizzi, E. Zanardini, C. Sorlini, C. Corselli, and D. Daffonchio. Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *J Appl Environ Microbiol.* 70:6147-6156.
2. Carolis, E. D., A. Vella, L. Vaccaro, R. Torelli, P. Posteraro, W. Ricciardi, M. Sanguinetti, and B. Posteraro. 2014. Development and Validation of an In-House Database for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Yeast Identification Using a Fast Protein Extraction Procedure. *J Clin Microbiol.* 52:1453-1458.
3. Carpita, N. C., 2011. Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis : How Plant Make Cellulose and Other (1→4)-β-D-Glycan. *Plant Physiol.* 155:171-184
4. Eri, Hasegawa. 2011. Sequence-based identification and ecology of *Armillaria* species on conifers in Japan. 東京大学



博士論文

5. Finimundy, T. C., G. Gambato, R. Fontana, M. Camassola, M. Salvador, S. Moura, J. Hess, J. A. Henriques, A. J. Dillon, and M. Roesch-Ely. 2013. Aqueous of *Lentinula edodes* *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor. *Nutr Res.* 33:76-84.
6. 畠山敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀雅美, 山野哲夫, 清水充. 2012. 食中毒究明のための遺伝子解析によるキノコ鑑別. *食衛誌.* 53:237-242.
7. 濱田亮祐. 2014. MALDI-TOF-MS を用いた糸状菌類のタイピングにおける種間及び種内変異の検討. *農芸化学会大会要旨集.*
8. 五十嵐恒夫. 2009. 北海道のキノコ. 初版. 12. 北海道新聞社. 北海道.
9. 石川直幸, 大塚勝, 小玉雅晴, 加藤典子. 1998. 大麦育成のためのβ-グルカン簡易定量法 (Congo Red 法) の改良. *栃木農試研報.* 47:57-64
10. Kalac, P. 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric.* 93:209-218.
11. 金井美恵子, 松下亜由子. 2013. 毒キノコによる食中毒. 学校

- 給食. 64:72-73.
12. 北本豊. 1970. キノコの人工培養. 化学と生物. 8:320-321.
  13. Konno, N., and S. Yuichi. 2011. An endo- $\beta$ -1,6-glucanase involved in *Lentinula edodes* fruiting body autolysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91:1365-1373
  14. 倉沢新一, 菅原龍幸, 林淳三. 1982. キノコ類中の一般成分および食物繊維の分析. 日食工誌. 29:400-406.
  15. McCleary, B. V. and R. Codd. 1991. Measurement of (1-3) (1-4)- $\beta$ -D-glucan in barley and oats: a streamlined enzymic procedure. *J Sci Fd Agric* 55:303-312.
  16. 水野卓, 川合正允. 1992. キノコの化学・生化学. 初版. 372. 学会出版センター. 東京.
  17. 日本菌学会. 2013. 菌類の事典. 第1版. 457-461, 651-652. 朝倉書店. 東京.
  18. Salla V., K. K. Murray. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of shrimp. *Anal Chim Acta.* 794. 55-59.
  19. Stephan. R., S. Johlar, N. Oesterle, G. Naumann, G. Vogel, V. Pfluger. 2014. Rapid and reliable identification of scallops by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food control.* 46:6-9.

20. 高橋邦雄. 2012. 北海道きのこ図鑑. 初版. 344. 亜璃西社. 北海道
21. 竹内明子, 波多野弥生, 遠藤容子, 黒木由美子. 2013. キノコ中毒 I キノコ中毒の基礎; 統計及び同定法 キノコ中毒の統計. 中毒研究. 26:200-204.
22. TeKippe, E. M., S. Shuey, D.W. Winkler, M. A. Bulter, and C. D. Burnham. 2013. Optimizing Identification of Clinically Relevant Gram-Positive Organisms by use of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System. J Clin Microbiol. 51:1421-1427.
23. 富樫巖. 2004. マイタケ子実体の鮮度変化. 林産試験場報. 18:33-36
24. 鶴田小百合. 2010. ツキヨタケの DNA 鑑別法の開発. 千葉菌類談話会通信. 26. 7-9.
25. 山浦由郎. 2013. 日本における最近のキノコ中毒発生状況. 中毒研究. 26:39-43.

Table 1. 遺伝子解析による自生キノコ種の同定結果

Number	学名	一致率(%)*	和名	形態からの推定種	科	Sequence or ARISA**
1	<i>Inocybe lanatodisca</i>	100	-	オオキヌハダトマヤタケ	アセタケ	Sequence
	<i>I. maculata</i>	100	シラゲアセタケ			
2	<i>Inocybe geophylla</i>	99	シロトマヤタケ	コオトメノカサ	ditto	Sequence
3	<i>Tremella aurantialba</i>	100	-	不明	ウロコタケ	Sequence
	<i>Stereum hirsutum</i>	100	キウロコタケ			
4	<i>Sarcomyxa serotina</i>	100	ムキタケ	ムキタケ	ガマノホタケ	Sequence
5	<i>Sarcomyxa serotina</i>	100	ムキタケ	ムキタケ	ditto	Sequence
6	<i>Sarcomyxa serotina</i>	100	ムキタケ	ムキタケ	ditto	Sequence
7	<i>Rhodocollybia butyracea</i>	100	エセオリミキ	ハタケシメジ	キシメジ	Sequence
8	<i>Mycena galericulata</i>	96	クヌギタケ	不明(イチイタケ?)	ditto	Sequence
9	<i>Lyophyllum decastes</i>	100	ハタケシメジ	ハタケシメジ	シメジ	Sequence
10	<i>Lyophyllum decastes</i>	100	ハタケシメジ	ハタケシメジ 成菌	ditto	Sequence
11	<i>Lyophyllum decastes</i>	-	ハタケシメジ	ハタケシメジ 幼菌	ditto	ARISA
12	<i>Trametes versicolor</i>	99	カワラタケ	ミダレアミタケ	タマチョレイタケ	Sequence
13	<i>Trametes versicolor</i>	100	カワラタケ	カワラタケ	ditto	Sequence
	<i>T. velutina</i>	100	-			
14	<i>Amanita caesareoides</i>	100	タマゴタケ	タマゴタケ	テングタケ	Sequence
15	<i>Amanita rubescens</i>	97	ガンタケ	不明	ditto	Sequence
16	<i>Amanita caesareoides</i>	-	タマゴタケ	タマゴタケ	ditto	ARISA
17	<i>Amanita muscaria</i>	100	ベニテングタケ	ベニテングタケ	ditto	Sequence
18	<i>Amanita spissa</i>	100	ヘビキノコ	コテングタケモドキ	ditto	Sequence
		100	キリンタケ			
19	<i>Amanita muscaria</i>	-	ベニテングタケ	ベニテングタケ	ditto	ARISA
20	<i>Amanita ibotengutake</i>	-	イボテングタケ	テングタケ	ditto	ARISA
21	<i>Amanita ibotengutake</i>	100	イボテングタケ	テングタケ	ditto	Sequence
22	<i>Armillaria sinapina</i>	100	ワタゲナラタケ	ポリポリ	ナラタケ	Sequence
	<i>A. cepistipes</i>	100	クロゲナラタケ			
23	<i>Armillaria sinapina</i>	-	ワタゲナラタケ	ポリポリ?	ditto	ARISA
	<i>A. cepistipes</i>	-	クロゲナラタケ			
24	<i>Agaricus augustus</i>	99	-	ハラタケ科?	ハラタケ	Sequence
	<i>A. macrocarpus</i>	99	-			
	<i>A. excellens</i>	99	-			
25	<i>Agaricus nivescens</i>	98	-	シロフクロタケ	ditto	Sequence
	<i>A. macrocarpus</i>	98	-			
	<i>A. excellens</i>	98	-			
	<i>A. arvensis</i>	98	シロオオハラタケ			
	<i>A. silvicola</i>	98	-			
26	<i>Agaricus nivescens</i>	98	-	ハラタケモドキ	ditto	Sequence
	<i>A. macrocarpus</i>	98	-			
	<i>A. excellens</i>	98	-			
	<i>A. albolutescens</i>	98	-			
	<i>A. arvensis</i>	98	シロオオハラタケ			
27	<i>Bovistella radicata</i>	99	-	ツブホコリタケ?	ditto	Sequence
	<i>Lycoperdon lambinonii</i>	99	-			
	<i>L. umbrinum</i>	99	ツブホコリタケ			
28	<i>Morganella pyriformis</i>	-	タヌキノチャブクロ	ホコリタケ?	ditto	ARISA
29	<i>Morganella pyriformis</i>	-	タヌキノチャブクロ	ホコリタケ	ditto	ARISA
30	<i>Agaricus augustus</i>	-	-	ハラタケ科?	ditto	ARISA
	<i>A. macrocarpus</i>	-	-			
	<i>A. excellens</i>	-	-			
31	<i>Morganella pyriformis</i>	100	タヌキノチャブクロ	ホコリタケ	ditto	Sequence
32	<i>Morganella pyriformis</i>	100	タヌキノチャブクロ	ニカワシヨウロタケ	ditto	Sequence
33	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	100	-	カワムラフウセンタケ	フウセンタケ	Sequence
	<i>C. baltetus</i>	99	-			
	<i>C. badiolatus</i>	98	-			
34	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	100	-	パカマツタケ	ditto	Sequence
	<i>C. balteatus</i>	99	-			
35	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	99	-	不明	ditto	Sequence
	<i>C. cycneus</i>	99	-			
	<i>C. nemorensis</i>	98	モリノフジイロタケ			
	<i>C. langei</i>	98	-			
	<i>C. clelandii</i>	98	-			
36	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	100	-	ホンシメジ	ditto	Sequence
	<i>C. balteatus</i>	99	-			
	<i>C. badiolatus</i>	98	-			
37	<i>Cortinarius triumphans</i>	100	チャオビフウセンタケ	フウセンタケ科?	ditto	Sequence
38	<i>Cortinarius triumphans</i>	99	チャオビフウセンタケ	不明	ditto	Sequence
39	-	-	-	キヌメリイグチ	不明	Sequence

\*BLAST検索結果

\*\*DNA塩基配列解析による同定(Sequence)、DNAフラグメント長多型による同定(ARISA)

Table 1. 遺伝子解析による自生キノコ種の同定結果

2/2

Number	学名	一致率(%)*	和名	形態からの推定種	科	Sequence or ARISA**
40	<i>Lactarius necator</i>	100	ウグイスチャチチタケ	ウグイスチャチチタケ	ベニタケ	Sequence
41	<i>Lactarius hatsudake</i>	99	ハツタケ	不明	ditto	Sequence
	<i>L. quieticolor</i>	99	-			
42	Russulaceae	99	ベニタケ属	ヤブレベニタケ	ditto	Sequence
43	<i>Pholiota lundbergii</i>	97	-	不明	モエギタケ	Sequence
	<i>P. squarrosa</i>	97	-			
44	<i>Pholiota mixta</i>	98	-	キナメツムタケ	ditto	Sequence
45	<i>Hypholoma fasciculare</i>	100	ニガクリタケ	ニガクリタケ	ditto	Sequence
46	<i>Hypholoma fasciculare</i>	99	ニガクリタケ	ニガクリタケ	ditto	Sequence
47	<i>Hypholoma fasciculare</i>	-	ニガクリタケ	ニガクリタケ	ditto	ARISA
48	<i>Hypholoma fasciculare</i>	-	ニガクリタケ	ニガクリタケ	ditto	ARISA

\*BLAST検索結果

\*\*DNA塩基配列解析による同定(Sequence)、DNAフラグメント長多型による同定(ARISA)

Table 2. キノコのDNA塩基配列解析用PCRプライマー[6]

=

Primer pair	Forward/Reverse	増幅領域(bp)
Mush-1	ITS1 5'-tgyacacaccgcccgt ITS2 5'-gggttbccccatterg	rDNA ITS1 (400~700)
Mush-2	ITS3 5'-gtcgtacaagaagtagccgta ITS4 5'-gccaagcatccacc	rDNA ITS2 (300~600)

Table 3. 自生キノコのMALDI-TOF/MSデータベース

1/3

Number	学名*	和名	形態による推定種	科	Biotyper**
1	<i>Inocybe maculata</i>	シラゲアセタケ	イタチタケ	アセタケ	G
2	<i>Leccinum schistophilum</i> <i>L. Palustre</i>	-	ヤマイグチ	イグチ	G
3	<i>Leccinum scabrum</i>	ヤマイグチ	ヤマイグチ	ditto	P
4	<i>Boletus edulis</i>	ヤマドリタケ	ヤマドリタケ	ditto	G
5	<i>Boletus edulis</i>	ヤマドリタケ	ヤマイグチ	ditto	P
6	<i>Boletus edulis</i>	ヤマドリタケ	シロヤマイグチ	ditto	G
7	<i>Suillus sibiricus</i>	-	ゴヨウイグチ	ditto	G
8	<i>Leccinum versipelle</i> , <i>L. roseotinctum</i>	キンチャヤマイグチ	シロヤマイグチ	ditto	G
9	<i>Boletaceae sp.</i>	イグチ属	ウラグロニガイグチ	ditto	N
10	<i>Suillus aeruginascens</i>	カラマツイグチ	シロヌメリイグチ	ditto	P
11	<i>Boletus edulis</i>	ヤマドリタケ	<i>C. balteatocumatilis</i>	ditto	G
12	<i>Chalciporus piperatus</i>	コショウイグチ	コショウイグチ	ditto	G
13	<i>Leccinum melaneum</i> , <i>L. rotundifoliae</i> <i>L. scabrum</i>	-	ヤマイグチ	ditto	N
14	<i>Suillus luteus</i>	ヌメリイグチ	ヌメリイグチ	ditto	P
15	<i>Suillus luteus</i>	ヌメリイグチ	チチアワタケ	ditto	G
16	<i>Suillus greville</i>	ハナイグチ	コガネヤマドリ	ditto	G
17	<i>Suillus luteus</i>	ヌメリイグチ	ヌメリイグチ	ditto	N
18	<i>Clitopilus abortivus</i>	-	タマウラベニタケ	イッボンシメジ	G
19	<i>Entoloma sinuatum</i> (92%)	イッボンシメジ	クサウラベニタケ	ditto	G
20	<i>Entoloma abortivum</i>	タマウラベニタケ	タマウラベニタケ	ditto	G
21	<i>Sarcodon leucopus</i>	シシタケモドキ	シシタケモドキ	イボタケ	G
22	<i>Pluteus pouzarianus</i>	-	ウラベニガサ	ウラベニガサ	G
23	<i>Chroogomphus rutilus</i>	クギタケ	クギタケ	オウギタケ	G
24	<i>Agrocybe praecox</i> <i>A. erebia</i>	フミズキタケ ツチナメコ	コフミズキタケ	オキナタケ	G
25	<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	クロサカズキシメジ	クロサカズキシメジ	ガマノホタケ	G
26	<i>Marasmius purpureostriatus</i> (95%)	スジオチバタケ	オオホウライタケ	キシメジ	G
27	<i>Collybia dryophila</i>	モリノカレバタケ	モリノカレバタケ	ditto	G
28	<i>Collybia dryophila</i>	モリノカレバタケ	モリノカレバタケ	ditto	G
29	<i>Prpoloma macrocephalum</i> (96%)	-	ムレオオイテヨウタケ	ditto	P
30	<i>Armillaria sinapina</i> <i>A. gallica</i> <i>A. cepistipes</i> <i>A. tabescens</i> <i>A. borealis</i> <i>A. ostoyae</i> <i>A. bulbosa</i>	ホテイナラタケ ワタゲナラタケ クロゲナラタケ ナラタケモドキ - オニナラタケ ヤワナラタケ	ナラタケ	ditto	N
31	<i>Tricholoma portentosum</i> , <i>T. griseoviolaceum</i> <i>T. sejunctum</i>	シモフリシメジ - アイシメジ	アイシメジ	ditto	G
32	<i>Flammulina fennae</i>	-	エノキタケ	ditto	G
33	<i>Clitocybe connata</i>	オシロイシメジ	オシロイシメジ	ditto	G
34	<i>Tricholoma vaccinum</i> <i>T. imbricatum</i>	クダアカゲシメジ アカゲシメジ	カラマツシメジ	ditto	G
35	<i>Lepista flaccida</i>	コブミノカヤタケ	コブミノカヤタケ	ditto	G
36	<i>Armillaria gallica</i> <i>A. cepistipes</i> <i>A. sinapina</i> <i>A. calvescens</i> <i>A. borealis</i> <i>A. ostoyae</i> <i>A. gemina</i> <i>A. cepistipes</i> <i>A. nabsnona</i>	ワタゲナラタケ クロゲナラタケ ホテイナラタケ - - オニナラタケ - クロゲナラタケ ヤチナラタケ	ナラタケ	ditto	G
37	<i>Lyophyllum decastes</i>	ハタケシメジ	ハタケシメジ	ditto	G
38	<i>Ampulloclitocybe clavipes</i>	ホテイシメジ	ホテイシメジ	ditto	G
39	<i>Tricholoma saponaceum</i>	ミネシメジ	ミネシメジ	ditto	G
40	<i>Lyophyllum decastes</i>	ハタケシメジ	ハタケシメジ	ditto	G
41	<i>Lapista flaccida</i>	コブミノカヤタケ	キハツダケ	ditto	G
42	<i>Tricholoma pessundatum</i> <i>T. fulvum</i> <i>T. muricatum</i>	オオカキシメジ キヒダマツシメジ -	<i>C. balteatocumatilis</i>	ditto	P
43	<i>Mucidula brunneomarginata</i>	フチドリツエタケ	フチドリツエタケ	ditto	G
44	<i>Pleurella ardesiaca</i> (90%)	-	オドタケ	ditto	G
45	<i>Rhodocollybia butyracea</i>	エセオリミキ	エセオリミキ	ditto	G
46	<i>Tricholoma populinum</i>	ムレワシメジ	カキシメジ	ditto	G

\*DNA塩基配列による同定結果, 97%未満の一致率は()内に示した

\*\*Biotyperによるスコア 2.0以上の測定回数 : G = 6/12以上, P = 5/12以下, N = 0/12

Table 3. 自生キノコのMALDI-TOF/MSデータベース

Number	学名*	和名	形態による推定種	科	Biotyper**
47	<i>Tricholoma saponaceum</i>	ミネシメジ	ケシヨウシメジ	キシメジ	G
48		サクラタケなど	サクラタケ	ditto	G
49	<i>Catathelasma imperiale</i> <i>C. ventricosum</i>	オオモミタケ モミタケ	モミタケ	ditto	G
50	<i>Lepista sordida</i>	コムラサキシメジ	ハタシメジ	ditto	G
51	<i>Hypsizygus ulmarius</i>	シロタモギタケ	ブナシメジ	ditto	G
52	<i>Tricholoma flavovirens</i>	キシメジ	キシメジ	ditto	G
53	<i>Lepista nuda</i>	ムラサキシメジ	ムラサキシメジ	ditto	G
54	<i>Ampulloclitocybe clavipes</i>	ホテイシメジ	オオジョウゴタケ	ditto	G
55	<i>Leucopaxillus tricolor</i> , <i>Clitocybe robusta</i> , <i>Clitocybe nebularis</i>	- シロノハイイロシメジ ハイイロシメジ	ハイイロシメジ	ditto	G
56	<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	マツノコケイロヌメリガサ	マツノコケイロヌメリガサ	ditto	G
57	<i>Panellus edulis</i>	ムキタケ	ムキタケ	ditto	G
58	<i>Armillaria sinapina</i> <i>A. gallica</i> <i>A. calvescens</i> <i>A. borealis</i> <i>A. ostoyae</i> <i>A. borealis</i>	ホテイナラタケ ワタゲナラタケ - - オニナラタケ クロゲナラタケ	ツバナラタケ	ditto	G
59	<i>Tricholoma populinum</i> <i>T. ustale</i>	ムレワシメジ カキシメジ	マツシメジ	ditto	G
60	<i>Panellus edulis</i>	ムキタケ	ムキタケ	ditto	G
61	<i>Laccaria laccata</i> <i>L. trichodermophora</i>	キツネタケ -	キツネタケ	ditto	G
62	<i>Tricholoma terreum</i>	クマシメジ	ネズミシメジ	ditto	G
63	<i>Flammula alnicola</i> <i>Pholiota pinicola</i>	- -	キツムタケ	キンボウゲ モエギタケ	G
64	<i>Laetiporus cremeiporus</i>	マスタケ	マスタケ	サルノコシカケ	G
65	<i>Lyophyllum deliberatum</i>	-	カクミノシメジ	シメジ	G
66	<i>Tremella foriacea</i>	ハナビラニカワタケ	ハナビラニカワタケ	シロキクラゲ	G
67	<i>Phallus indusiatus</i> (80%) <i>Dictyophora phalloidea</i> (80%)	スッポンタケ -	マクヌギガサタケ	スッポンタケ	N
68	<i>Polyporus badius</i>	アシグロタケ	アシグロタケ	タコウキン	N
69	<i>Tyromyces chioneus</i> (96%)	オシロイタケ	オシロイタケ	ditto	P
70	<i>Tyromyces chioneus</i>	オシロイタケ	オシロイタケ	ditto	N
71	<i>Daedaleopsis confragosa</i> <i>Polyporus brumalis</i>	- オツネンタケモドキ	オツネンタケモドキ	タコウキン サルノコシカケ	N
72	<i>Aleuria rhenana</i>	キンチャワシタケ	キンチャワシタケ	チャワシタケ	G
73	<i>Omphalotus japonicus</i>	ツキヨタケ	ツキヨタケ	ツキヨタケ	G
74	<i>Amanita ibotengutake</i> <i>A. pantherina</i>	イボテングタケ テングタケ	テングタケ	テングタケ	G
75	<i>Amanita imazekii</i>	ミヤマタマゴタケ	ミヤマタマゴタケ	ditto	P
76	<i>Amanita imazekii</i>	ミヤマタマゴタケ	ミヤマタマゴタケ	ditto	G
77	<i>Amanita ibotengutake</i>	イボテングタケ	テングタケ	ditto	G
78	<i>Amanita citrina</i>	コタマゴテングタケ	コタマゴテングタケ	ditto	G
79	<i>Amanita oberwinklerana</i>	ニオイドクツルタケ	ドクツルタケ	ditto	N
80	<i>Amanita muscaria</i>	ベニテングタケ	ベニテングタケ	ditto	G
81	<i>Amanita silvifuga</i> (88%) <i>Psilocybe magnivelaris</i> (82%)	- -	ヒダホテイタケ	テングタケ モエギタケ	G
82	<i>Grifola frondosa</i>	マイタケ	マイタケ	トンビマイタケ	P
83	<i>Grifola frondosa</i>	マイタケ	マイタケ	ditto	P
84	<i>Coprinellus disseminatus</i>	イヌセンボンタケ	キララタケ	ナヨタケ	G
85	<i>Suillus grevillei</i>	ハナイグチ	ハナイグチ	ヌメリイグチ	G
86	<i>Hygrophorus russula</i>	サクラシメジ	サクラシメジ	ヌメリガサ	N
87	<i>Hygrophorus pudorinus</i> (90%)	フキサクラシメジ	サクラシメジモドキ	ditto	G
88	<i>Hygrophorus pudorinus</i>	フキサクラシメジ	フキサクラシメジ	ditto	P
89	<i>Hygrophorus queletii</i>	-	オトメノカサ	ditto	P
90	<i>Hygrophorus sp.</i>	ヌメリガサ属	キヌメリガサ	ditto	G
91	<i>Agaricus campestris</i> <i>A. californicus</i>	ハラタケ -	シロシメジ	ハラタケ	G
92	<i>Agaricus alboluteus</i>	-	シロオオハラタケ	ditto	N
93	<i>Lycoperdon perlatum</i>	ホコリタケ	ホコリタケ	ditto	P
94	<i>Paxillus sp.</i>	ヒダハタケ属	ヒダハタケ	ヒダハタケ	P
95	<i>Psathyrella candolleana</i>	イタチタケ	イタチタケ	ヒトヨタケ	G
96	<i>Coprinopsis atramentaria</i>	ヒトヨタケ	ヒトヨタケ	ditto	N
97	<i>Lacrymaria glareosa</i> <i>L. lacrymabunda</i>	- ムジナタケ	ムジナタケ	ditto	G
98	<i>Psathyrella microrrhiza</i>	-	センボンクズタケ	ditto	P
99	<i>Psathyrella candolleana</i>	イタチタケ	イタチタケ	ditto	G
100	<i>Tremiscus Helvelloides</i>	-	アンズタケ	ヒメキクラゲ	G
101	<i>Tremiscus helvelloides</i>	ニカワジョウゴタケ	ニカワジョウゴタケ	ditto	N

\*DNA塩基配列による同定結果, 97%未満の一致率は( )内に示した

\*\*Biotyperによるスコア 2.0以上の測定回数 : G = 6/12以上, P = 5/12以下, N = 0/12



Table 3. 自生キノコのMALDI-TOF/MSデータベース

Number	学名*	和名	形態による推定種	科	Biotyper**
102	<i>Geastrum saccatum</i> (95%)	フクロツチガキ	ツチグリ	ヒメツチグリ	P
103	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ウスヒラタケ	ツチヒラタケ	ヒラタケ	G
104	<i>Otidea onotica</i>	ウスベニミミタケ	オオチャワンタケ	ピロネマキン	G
105	<i>Aleuria aurantia</i>	ヒイロチャワンタケ	ヒイロチャワンタケ	ditto	G
106	<i>Cortinarius ophiopus</i> , <i>C. crocolitus</i>	- キオビフウセンタケ	キオビフウセンタケ	フウセンタケ	G
107	<i>Gymnopilus penetrans</i> <i>G. hybridus</i>	キツムタケ -	チャツムタケ	ditto	G
108	<i>Cortinarius balteatus</i> <i>C. balteatocumatilis</i>	- -	<i>C. balteatocumatilis</i>	ditto	G
109	<i>Cortinarius ophiopus</i> <i>C. triumphans</i>	- チャオビフウセンタケ	キオビフウセンタケ	ditto	G
110	<i>Gymnopilus liquiritiae</i> <i>G. picreus</i>	チャツムタケ -	チャツムタケ	ditto	G
111	<i>Cortinarius ophiopus</i> <i>C. triumphans</i>	- チャオビフウセンタケ	キオビフウセンタケ	ditto	G
112	<i>Gymnopilus penetrans</i>	キツムタケ	キツムタケ	ditto	G
113	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	オオワライタケ	オオワライタケ	ditto	G
114	<i>Russula aeruginosa</i>	-	モエギタケ	ベニタケ	G
115	<i>Lactarius deliciosus</i>	アカモミタケ	アカモミタケ	ditto	P
116	<i>Lactarius deliciosus</i>	アカモミタケ	カラマツチチタケ	ditto	N
117	<i>Russula heterophylla</i>	ウグイスハツ	カワリハツ	ditto	G
118	<i>Lactarius lacunarum</i>	-	キチチタケ	ditto	P
119	<i>Russula foetens</i>	クサハツ	クサハツ	ditto	N
120	<i>Lactarius volemus</i> , <i>Lactarius crocatus</i>	チチタケ チリメンチチタケ	チチタケ	ditto	N
121	<i>Russula vinacea</i> <i>R. atropurpurea</i>	- ムラサキハツ	ドクベニタケ	ditto	N
122	<i>Lactarius uvidus</i>	トビチャチチタケ	トビチャチチタケ	ditto	G
123	<i>Lactarius lilacinus</i>	-	キチチタケ	ditto	G
124	<i>Russula cavipes</i>	-	ドクベニタケ	ditto	G
125	<i>Lactarius fennoscandicus</i> <i>L. deterrimus</i> <i>L. aurantiosordidus</i>	- アカハツモドキ -	アカハツ	ditto	G
126	<i>Clitocybula familia</i>	-	クヌギタケ	ホウライタケ	P
127	<i>Megacollybia marginata</i>	-	ウラベニガサタケ	ボロテレウム	G
128	<i>Hypholoma fasciculare</i>	ニガクリタケ	ニガクリタケ	モエギタケ	G
129	<i>Pholiota spumosa</i>	キナメツムタケ	キナメツムタケ	ditto	G
130	<i>Hypholoma capnoides</i>	クリタケモドキ	クリタケモドキ	ditto	G
131	<i>Pholiota lubrica</i>	チャナメツムタケ	チャナメツムタケ	ditto	G
132	<i>Pholiota adiposa</i> <i>P. aurivella</i> <i>P. limonella</i>	ヌメリスギタケ ヌメリスギタケ -	ヌメリスギタケモドキ	ditto	G
133	<i>Stropharia aeruginosa</i>	モエギタケ	モエギタケ	ditto	G
134	<i>Stropharia aeruginosa</i>	モエギタケ	モエギタケ	ditto	G
135	<i>Pholiota mixta</i> (96%)	-	キッコウスギタケ	ditto	G
136	<i>Pholiota squarrosa</i>	スギタケ	ツチスギタケ	ditto	G
137	<i>Pholiota abietis</i>	-	ヌメリスギタケ	ditto	G
138	<i>Pholiota microspora</i>	ナメコ	ナメコ	ditto	G
139	<i>Hypholoma sublateritium</i>	クリタケ	クリタケ	ditto	G
140	<i>Pholiota squarrosa</i>	スギタケ	ツチスギタケ	ditto	G
141	<i>Pholiota lubrica</i>	チャナメツムタケ	チャナメツムタケ	ditto	G
142	<i>Pholiota lenta</i> , <i>P. lubrica</i> <i>P. spumosa</i>	シロナメツムタケ チャナメツムタケ キナメツムタケ	シロナメツムタケ	ditto	G
143	<i>Hypholoma capnoides</i> <i>H. fasciculare</i>	クリタケモドキ ニガクリタケ	クリタケモドキ	ditto	G
144	-***	-	ヒカゲシビレタケ	-	P
145	-	-	チャツムタケ	-	G
146	-	-	シロシメジ	-	P
147	-	-	アシグロタケ	-	G
148	-	-	オオキヌハダトマヤタケ	-	G
149	-	-	サマツモドキ	-	N
150	-	-	ノボリリュウ	-	P
151	-	-	ハナビラタケ	-	N
152	-	-	ミナミハタケ	-	N
153	-	-	ミヤマトンビマイタケ	-	N
154	-	-	アイバシロハツ	-	G
155	-	-	アカゲシメジ	-	G
156	-	-	カバノアナタケ	-	N
157	-	-	ヒダホテイタケ	-	G

\*DNA塩基配列による同定結果, 97%未満の一致率は( )内に示した

\*\*Biotyperによるスコア 2.0以上の測定回数 : G = 6/12以上, P = 5/12以下, N = 0/12

\*\*\*重複シグナル or PCR増幅阻害により同定不能

Table 4. シイタケ栽培製造元間のパターンマッチング結果

=

	A社	B社	C社	D社
A社	2.7	2.5	2.6	2.6
B社	2.6	2.8	2.7	2.7
C社	2.6	2.7	2.8	2.7
D社	2.6	2.6	2.6	2.8

Table 5. シイタケ購入時期のパターンマッチング結果

=

	6月1日	6月16日	6月30日
6月1日	2.6	2.5	2.6
6月16日	2.4	2.7	2.4
6月30日	2.4	2.5	2.7

Table 6. 市販栽培キノコのパターンマッチング結果

	ナメコ	エノキタケ	タモギタケ	ブナシメジ	シイタケ	エリンギ
ナメコ	2.7	0.6	0.8	0.4	0.3	0.2
エノキタケ	0.6	2.8	1	0.3	0.4	1
タモギタケ	0.9	0.8	2.6	0.7	0.7	0.9
ブナシメジ	1.1	0.6	0.8	2.7	0.1	0.1
シイタケ	1.3	0	0.2	0.2	2.7	0.3
エリンギ	0.5	0.8	0.8	0	0.2	2.7

Table 7. 自生キノコのARISAフラグメント長データベース

Number	学名*	和名	形態推定種	科	フラグメント長(bp)**
1	<i>Amanita caesareoides</i>	タマゴタケ	タマゴタケ	テングタケ	335.78
2	<i>Inocybe lanatodisca</i> <i>I.maculata</i>	- シラゲアセタケ	オオキヌハダトマヤタケ	アセタケ	345.72
3	<i>Inocybe geophylla</i>	シロトマヤタケ	コオトメノカサ	アセタケ	364.54
4	<i>Trametes versicolor</i>	カワラタケ	ミダレアミタケ	タマチヨレイタケ	373.51
5	<i>Cortinarius triumphans</i>	チャオビフウセンタケ	不明	フウセンタケ	375.31
6	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i> <i>C.balteatus</i>	- -	バカマツタケ	フウセンタケ	381.90
7	<i>Amanita spissa</i>	ヘビキノコ キリンタケ	コテングタケモドキ	テングタケ	383.97
8	<i>Amanita rubescens</i>	ガンタケ	不明	テングタケ	385.08
9	<i>Pholiota nameko</i>	ナメコ	ナメコ	モエギタケ	387.02
10	<i>Tremella aurantialba</i> <i>Stereum hirsutum</i>	- キウロコタケ	不明	ウロコタケ	a-390.09
11	<i>Morganella pyriformis</i>	タヌキノチャブクロ	ニカワシヨウロタケ	ハラタケ?	a-390.47
12	<i>Pholiota lundbergii</i> <i>P.squarrosa</i>	- -	不明	モエギタケ	391.69
13	<i>Hypholoma fasciculare</i>	ニガクリタケ	ニガクリタケ	モエギタケ	392.85
14	<i>Sarcomyxa serotina</i>	ムキタケ	ムキタケ	ガマノホタケ	393.91
15	<i>Agaricus nivescens</i> <i>A.macrocarpus</i> <i>A.excellens</i> <i>A.arvensis</i> <i>A.silvicola</i>	- - - シロオオハラタケ -	シロフクロタケ	ハラタケ	b-394.84
16	<i>Lyophyllum decastes</i>	ハタケシメジ	ハタケシメジ	シメジ	b-394.87
17	<i>Bovistella radicata</i> <i>Lycoperdon lambinonii</i> <i>L.umbrinum</i>	- - ツブホコリタケ	ツブホコリタケ?	ハラタケ	b-394.98
18	<i>Agaricus augustus</i> <i>A.macrocarpus</i> <i>A.excellens</i>	- - -	ハラタケ科?	ハラタケ	b,c-395.54
19	<i>Tricholoma populinum</i>	ムレワシメジ	カキシメジ	キシメジ	c,d-396.11
20	<i>Pholiota mixta</i>	-	キナメツムタケ	モエギタケ	d,e-396.85
21	<i>Mycena galericulata</i> (96%)	クヌギタケ	不明	キシメジ	e-397.06
22	<i>Tricholoma populinum</i> <i>T.ustale</i>	ムレワシメジ カキシメジ	マツシメジ	キシメジ	e-397.08
23	<i>Amanita muscaria</i>	ベニテングタケ	ベニテングタケ	テングタケ	407.35
24	-	-	キヌメリイグチ	-	418.73
25	<i>Amanita ibotengutake</i>	イボテングタケ	テングタケ	テングタケ	421.71
26	<i>Russula</i>	ベニタケ属	ヤブレベニタケ	ベニタケ	426.79
27	<i>Lactarius necator</i>	ウグイスチャチチタケ	ウグイスチャチチタケ	ベニタケ	435.51
28	<i>Lactarius hatsudake</i> <i>L.quieticolor</i>	ハツタケ -	不明	ベニタケ	438.52
29	<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	シイタケ	キシメジ	453.91
30	<i>Rhodocollybia butyracea</i>	エセオリミキ	ハタケシメジ	キシメジ	456.51
31	<i>Armillaria sinapina</i> , <i>A.cepistipes</i>	ワタゲナラタケ クロゲナラタケ	ポリポリ	ナラタケ	563.95

\*DNA塩基配列による同定結果, 97%未満の一致率は()内に示した

\*\*同一フラグメント長と判断したものはアルファベットで示した

Table 8. 同種キノコのARISA解析結果

Number	学名*	和名	形態推定種	科	フラグメント長(bp)**
1	<i>Amanita caesareoides</i>	タマゴタケ	タマゴタケ	テングタケ	a-335.78
2	<i>Amanita caesareoides</i>	タマゴタケ	タマゴタケ		a-335.82
3	<i>Trametes versicolor</i>	カワラタケ	ミダレアミタケ	タマチヨレイタケ	b-373.51
4	<i>Trametes versicolor</i> <i>T. velutina</i>	カワラタケ -	カワラタケ		b-373.55
5	<i>Cortinarius triumphans</i>	チャオビフウセンタケ	不明	フウセンタケ	c-375.31
6	<i>Cortinarius triumphans</i>	チャオビフウセンタケ	フウセンタケ科?		c-375.32
7	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i> <i>C. balteatus</i>	- -	バカマツタケ	フウセンタケ	d-381.90
8	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i> <i>C. cycneus</i> <i>C. nemorensis</i> <i>C. langei</i> <i>C. clelandii</i>	- - モリノフジイロタケ - -	不明		d-381.91
9	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i> <i>C. balteatus</i> <i>C. badiolatus</i>	- - -	ホンシメジ		d-381.93
10	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i> <i>C. balteatus</i> <i>C. badiolatus</i>	- - -	カワムラフウセンタケ		d-381.93
11	<i>Morganella pyriformis</i>	タヌキノチャブクロ	ニカワショウロタケ	ハラタケ	e-390.47
12	<i>Morganella pyriformis</i>	タヌキノチャブクロ	ニカワショウロタケ		e-390.47
13	<i>Morganella pyriformis</i>	タヌキノチャブクロ	ホコリタケ		e-390.48
14	<i>Hypholoma fasciculare</i>	ニガクリタケ	ニガクリタケ	モエギタケ	f-391.80
15	<i>Hypholoma fasciculare</i>	ニガクリタケ	ニガクリタケ		g-392.81
16	<i>Hypholoma fasciculare</i>	ニガクリタケ	ニガクリタケ		g-392.84
17	<i>Hypholoma fasciculare</i>	ニガクリタケ	ニガクリタケ		g-392.85
18	<i>Sarcomyxa serotina</i>	ムキタケ	ムキタケ	ガマノホタケ	h-393.91
19	<i>Sarcomyxa serotina</i>	ムキタケ	ムキタケ?		h-393.95
20	<i>Sarcomyxa serotina</i>	ムキタケ	ムキタケ		h-393.98
21	<i>Agaricus nivescens</i> <i>A. macrocarpus</i> <i>A. excellens</i> <i>A. arvensis</i> <i>A. silvicola</i>	- - - シロオオハラタケ -	シロフクロタケ	ハラタケ	i-394.84
22	<i>Agaricus nivescens</i> <i>A. macrocarpus</i> <i>A. excellens</i> <i>A. albolutescens</i> <i>A. arvensis</i>	- - - - シロオオハラタケ	ハラタケモドキ		i-394.87
23	<i>Lyophyllum decastes</i>	ハタケシメジ	ハタケシメジ 成菌	シメジ	g-393.07
24	<i>Lyophyllum decastes</i>	ハタケシメジ	ハタケシメジ		i-394.87
25	<i>Lyophyllum decastes</i>	ハタケシメジ	ハタケシメジ		i-394.87
26	<i>Agaricus augustus</i> <i>A. macrocarpus</i> <i>A. excellens</i>	- - -	ハラタケ科?	ハラタケ	j-395.54
27	<i>Agaricus augustus</i> <i>A. macrocarpus</i> <i>A. excellens</i>	- - -	ハラタケ科?		j-395.54
28	<i>Amanita muscaria</i>	ベニテングタケ	ベニテングタケ	テングタケ	k-407.35
29	<i>Amanita muscaria</i>	ベニテングタケ	ベニテングタケ		k-407.41
30	<i>Amanita ibotengutake</i>	イボテングタケ	テングタケ		l-421.71
31	<i>Amanita ibotengutake</i>	イボテングタケ	テングタケ		l-421.73
32	<i>Armillaria sinapina</i> <i>A. cepistipes</i>	ワタゲナラタケ クロゲナラタケ	ポリポリ	ナラタケ	m-563.95
33	<i>Armillaria sinapina</i> <i>A. cepistipes</i>	ワタゲナラタケ クロゲナラタケ	ポリポリ		m-564.01

\*学名は遺伝子解析による同定結果を示した

\*\*同一フラグメント長と判断したものはアルファベットで示した

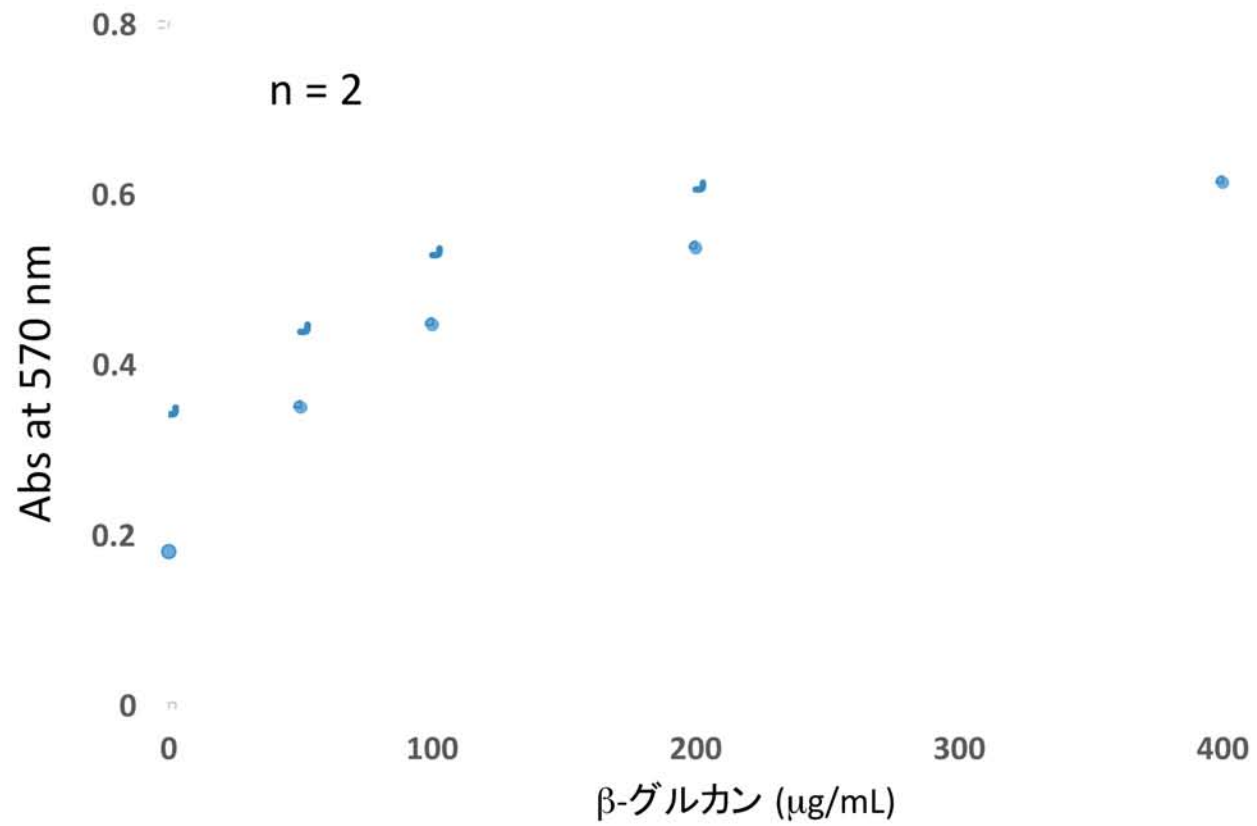


Fig. 1. Congo Red法による $\beta$ -グルカンの検量線

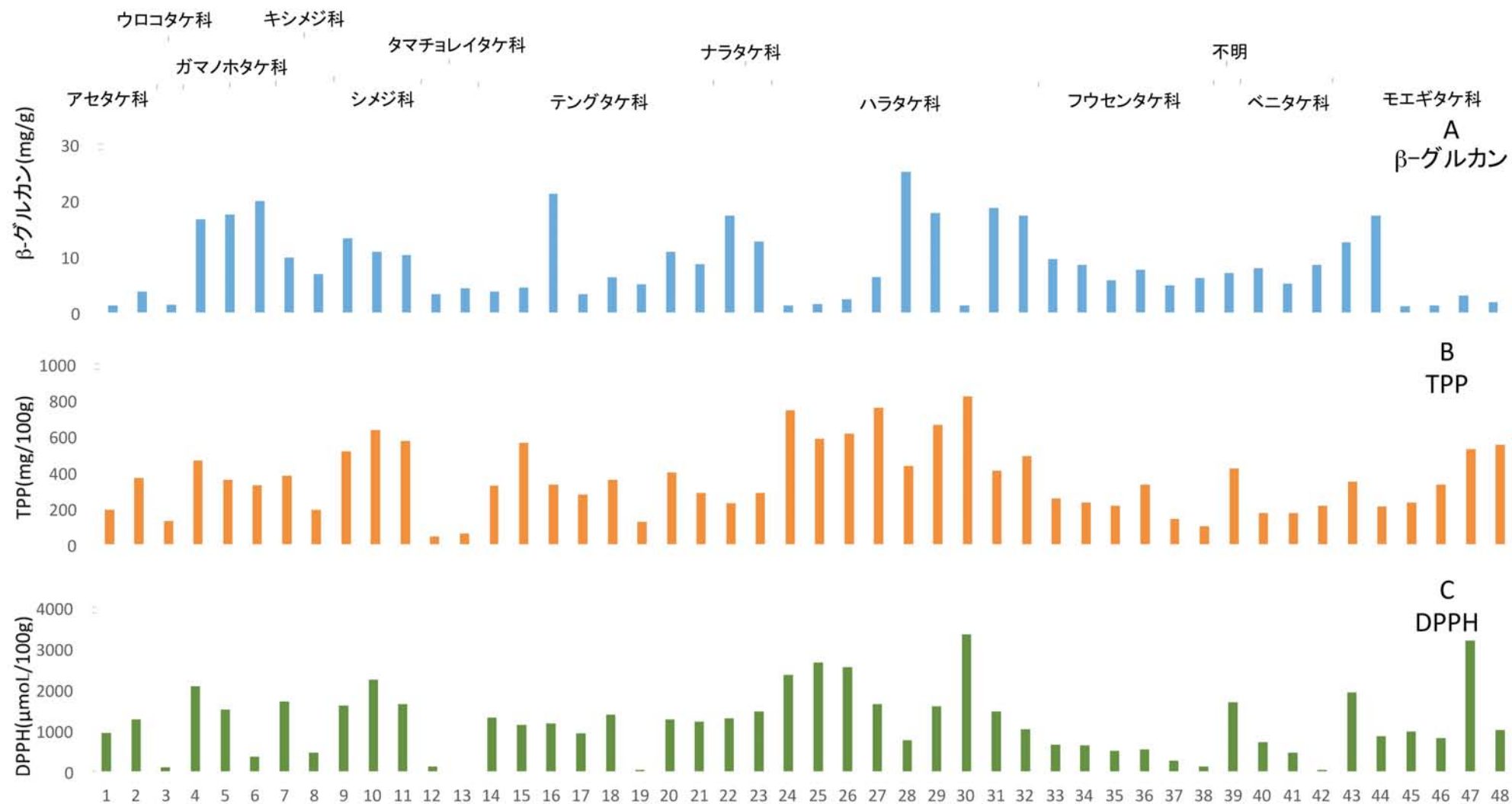


Fig. 2. 自生キノコの $\beta$ -グルカン、TPP及びDPPH測定結果



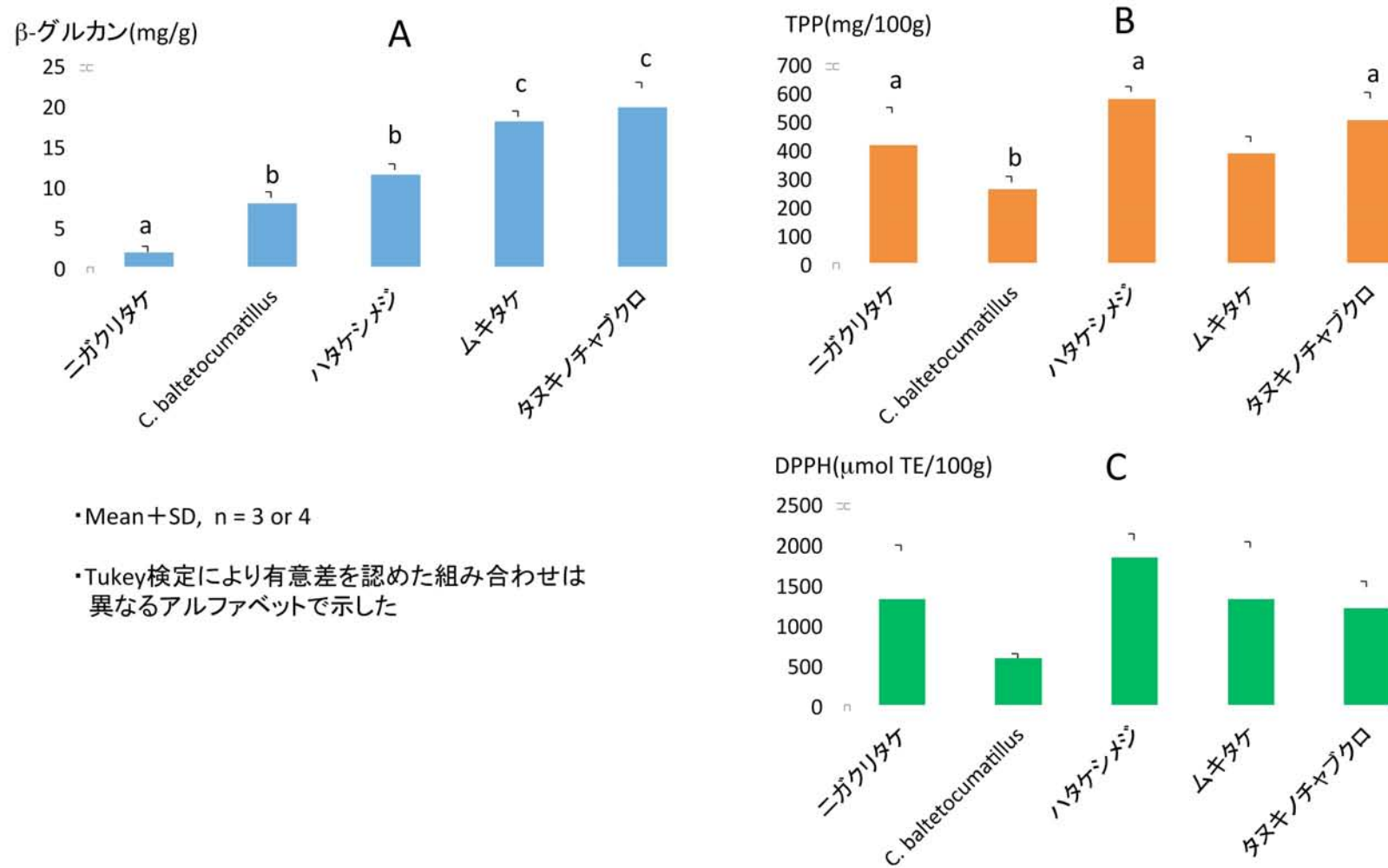


Fig. 3. キノコ種間のβ-グルカン、TPP及びDPPH測定結果比較

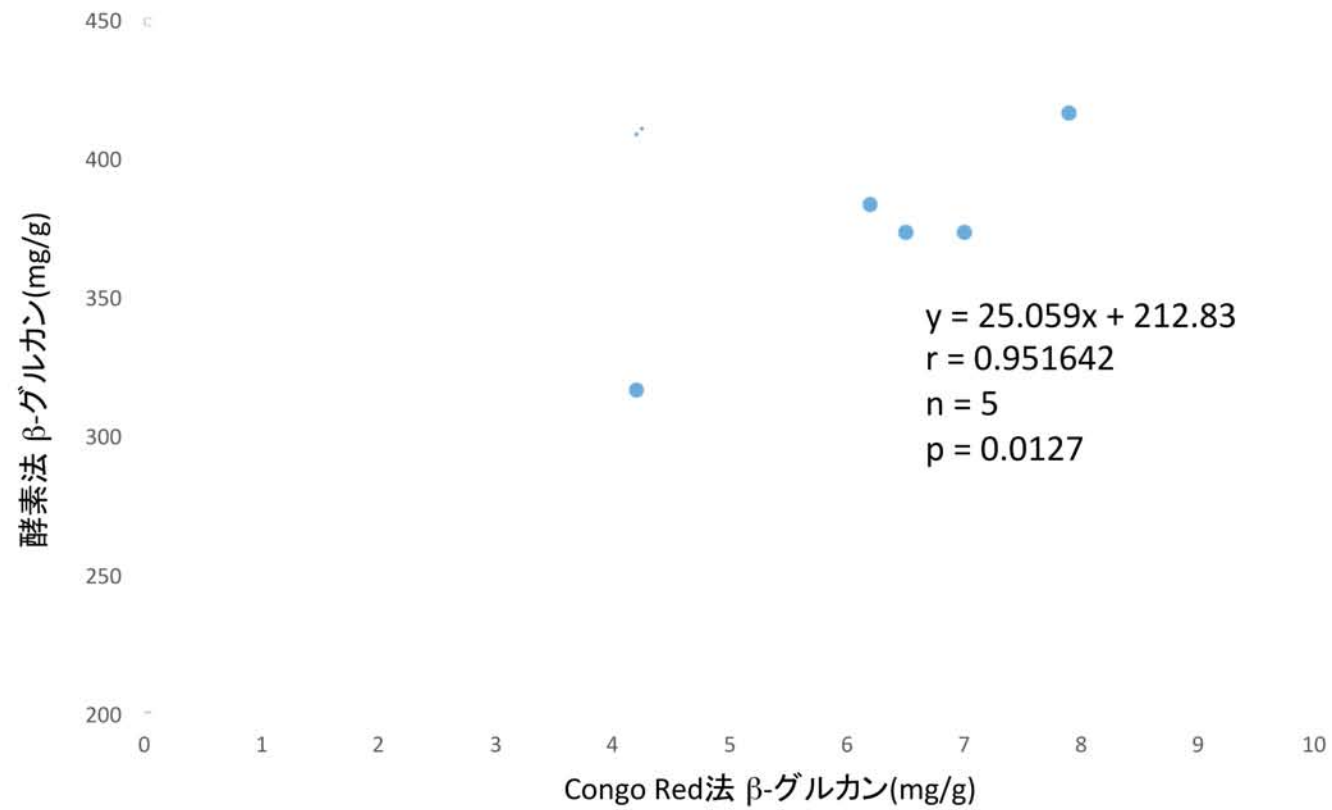


Fig. 4. Congo Red法と酵素法によるβ-グルカン量の相関

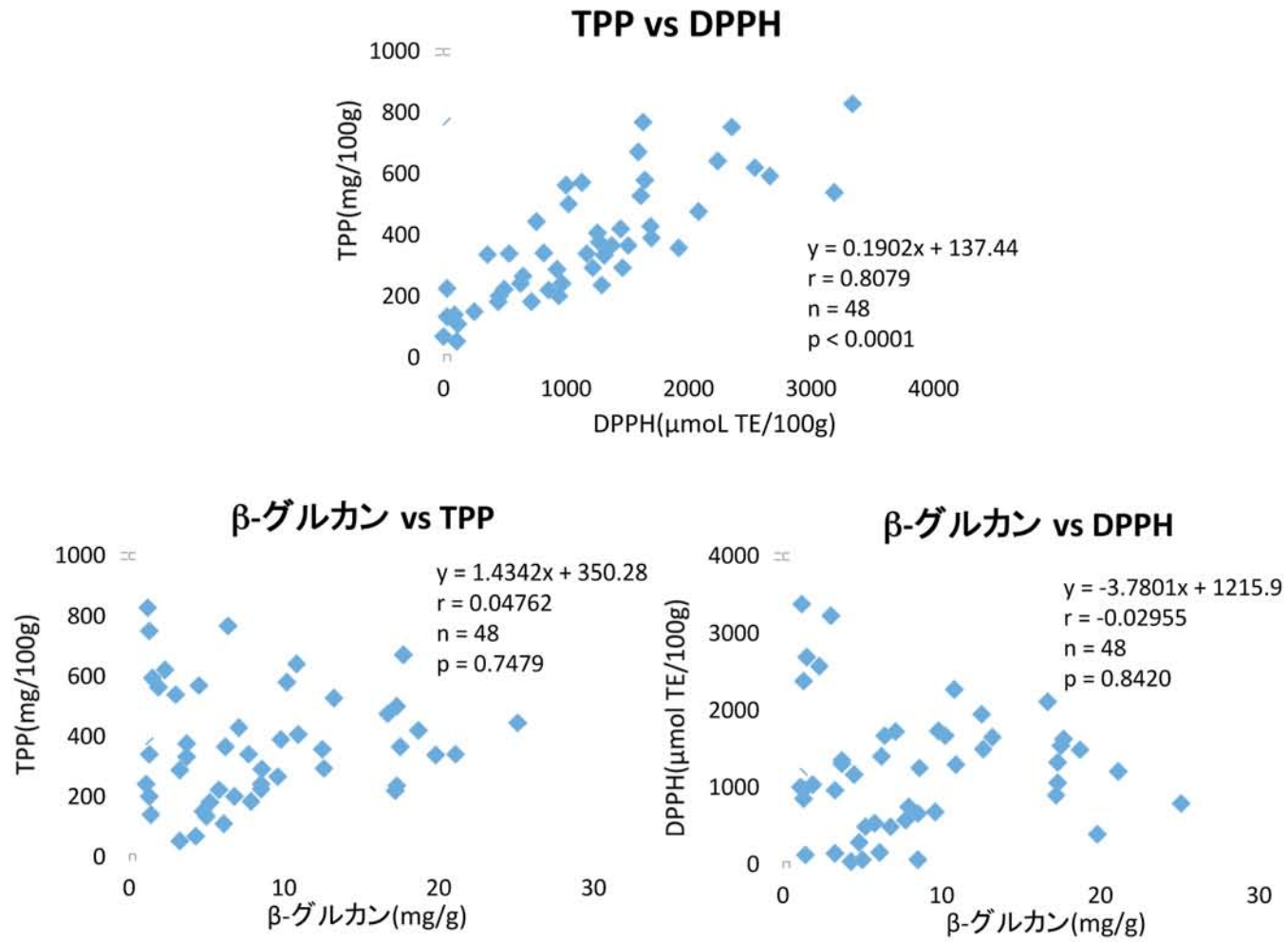


Fig. 5. 機能性各測定値の相関



Fig. 6. キノコ子実体の試料採取部位

スコア  
↓

Range	Description	Symbols	Color
2.30 — 3.00	Highly probable species identification	(+++)	green
2.00 — 2.99	Secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.70 — 1.99	Probable genus identification	(+)	yellow
0.00 — 1.69	No reliable identification	(-)	red

Fig. 7. Biotyperにおけるスコアと同定精度

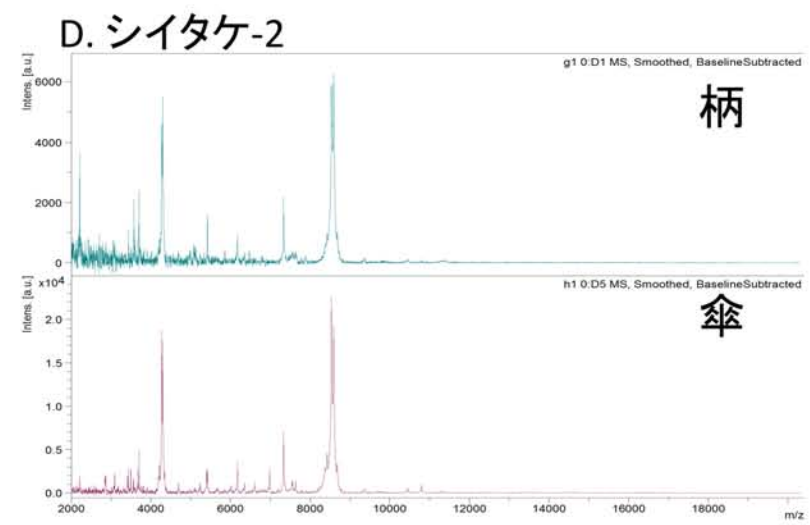
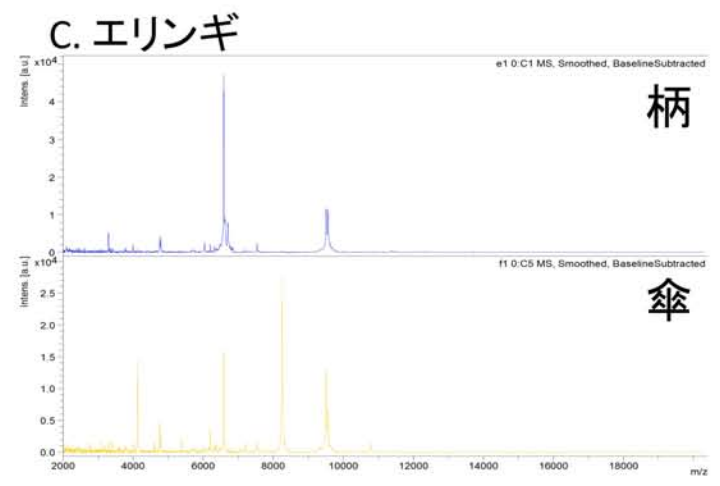
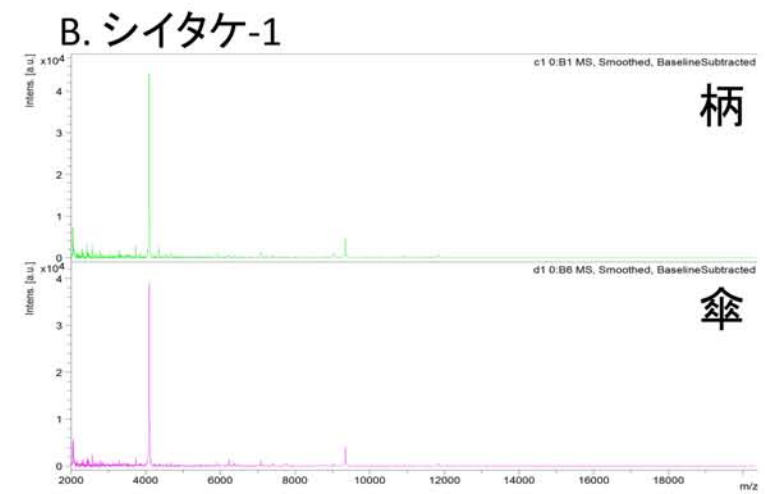
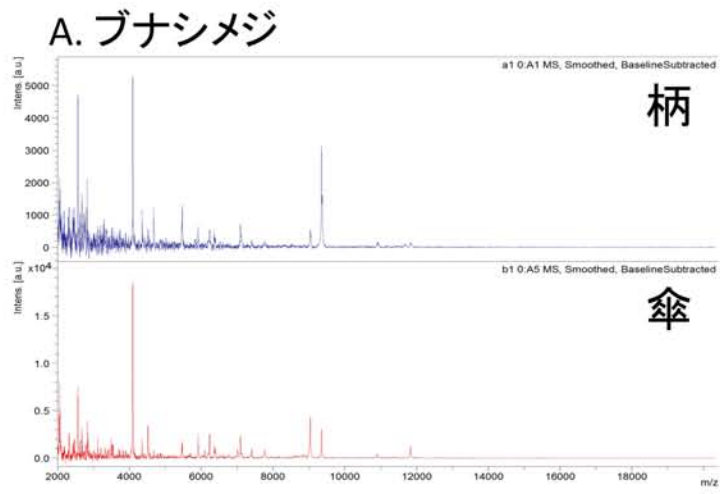


Fig. 8. キノコ子実体の代表的なマススペクトル

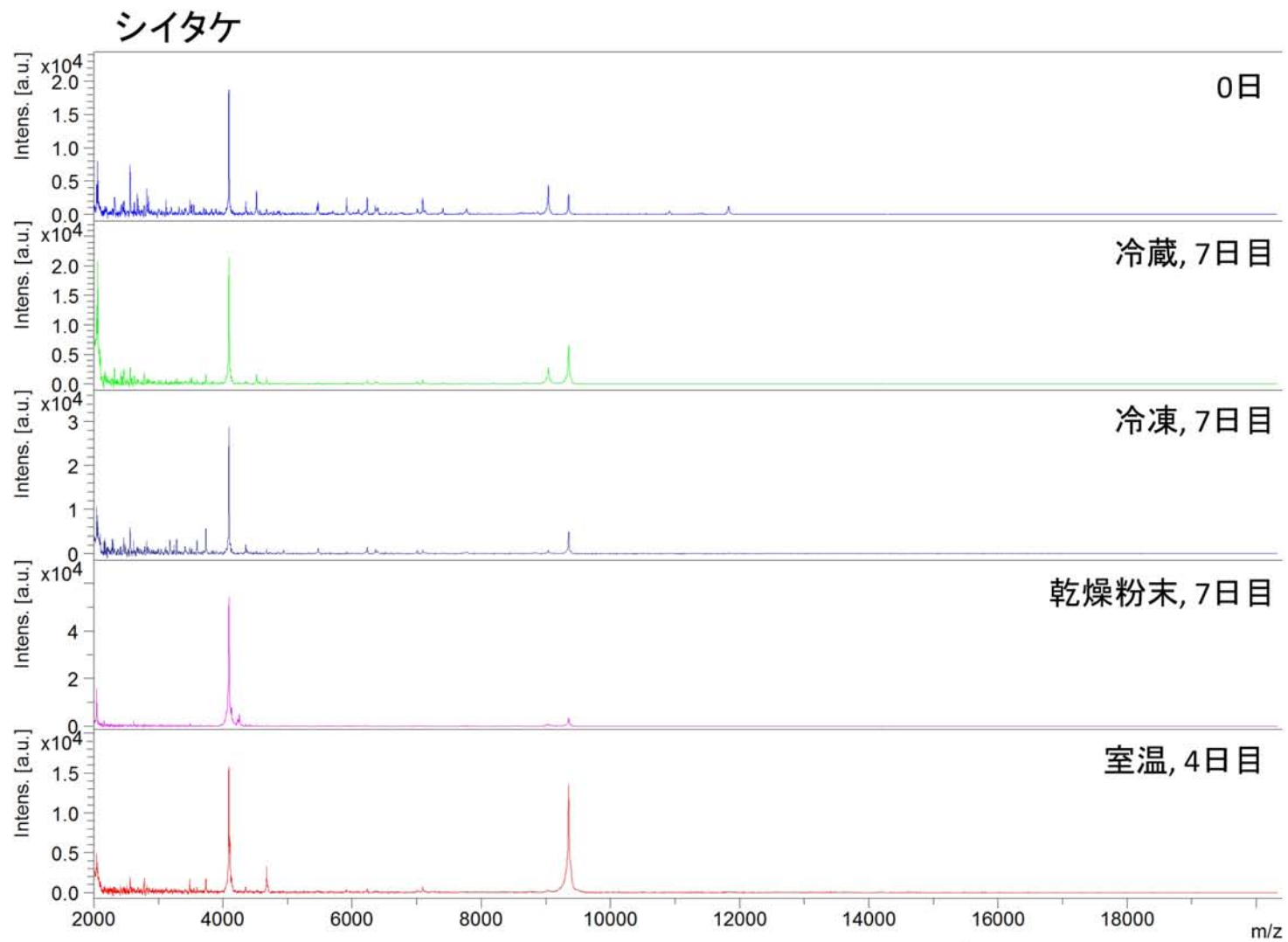


Fig. 9. 保存条件がマススペクトルに及ぼす影響

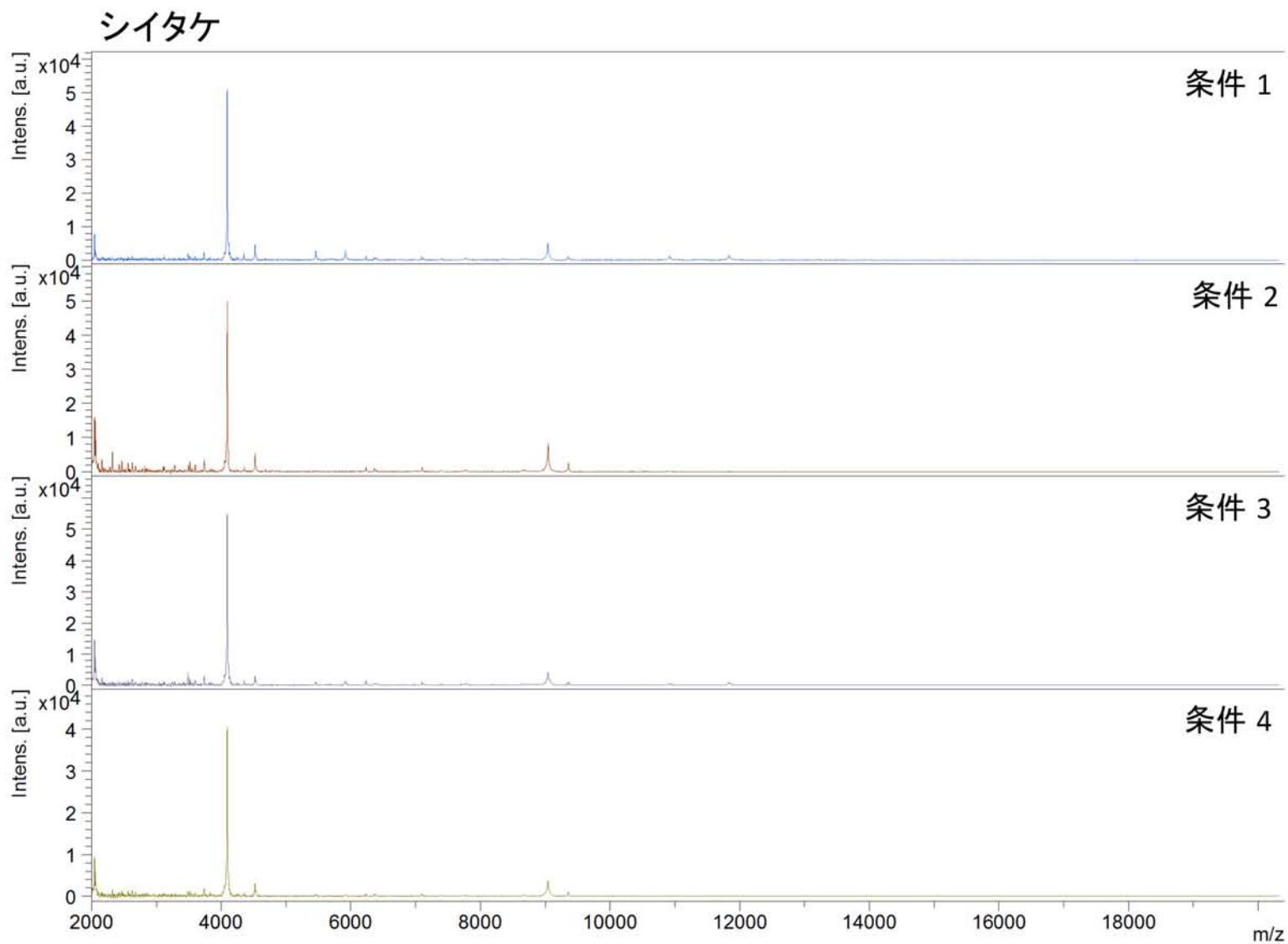


Fig. 10. タンパク質抽出液の脱塩処理がマススペクトルに及ぼす影響



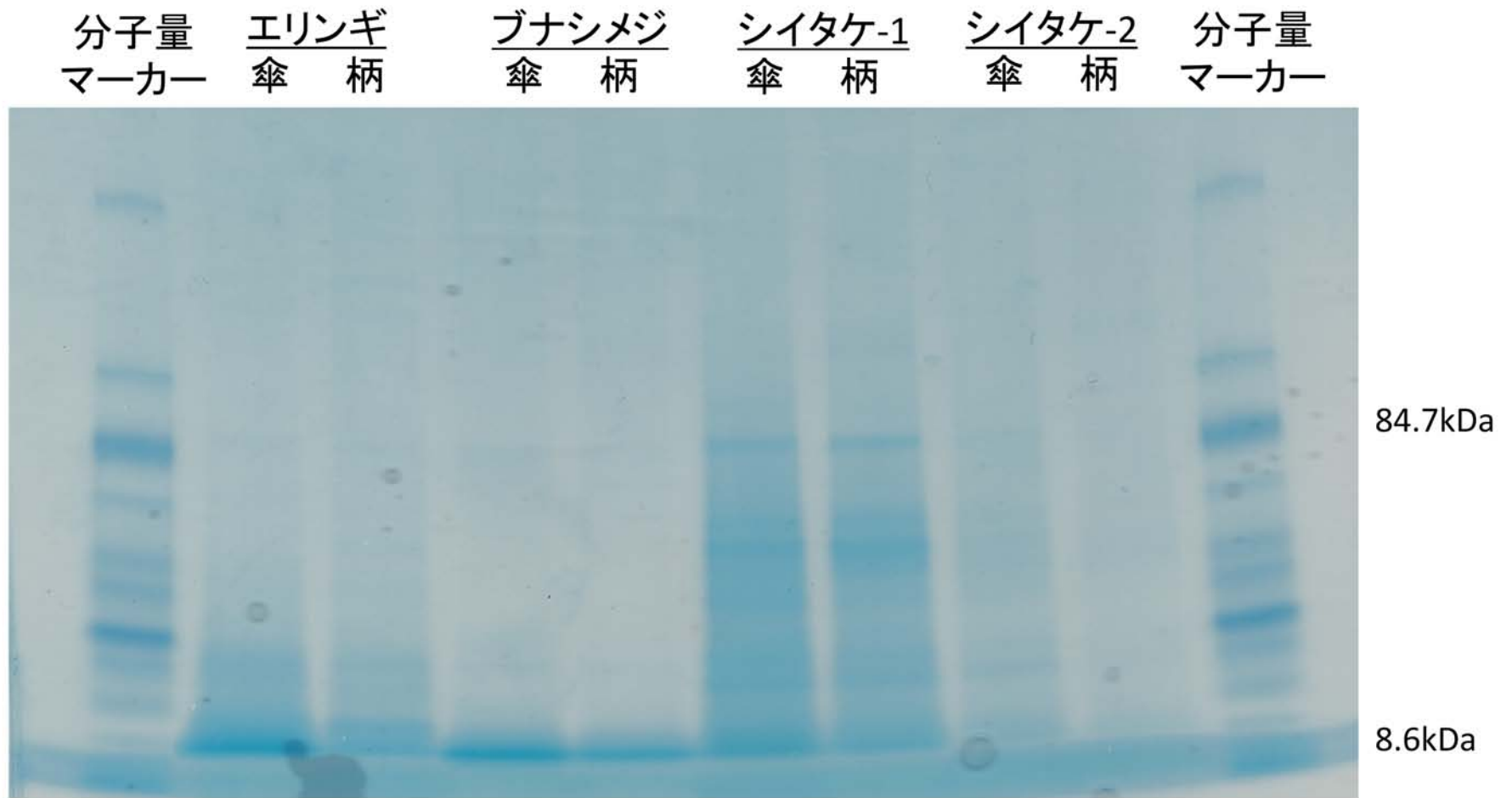
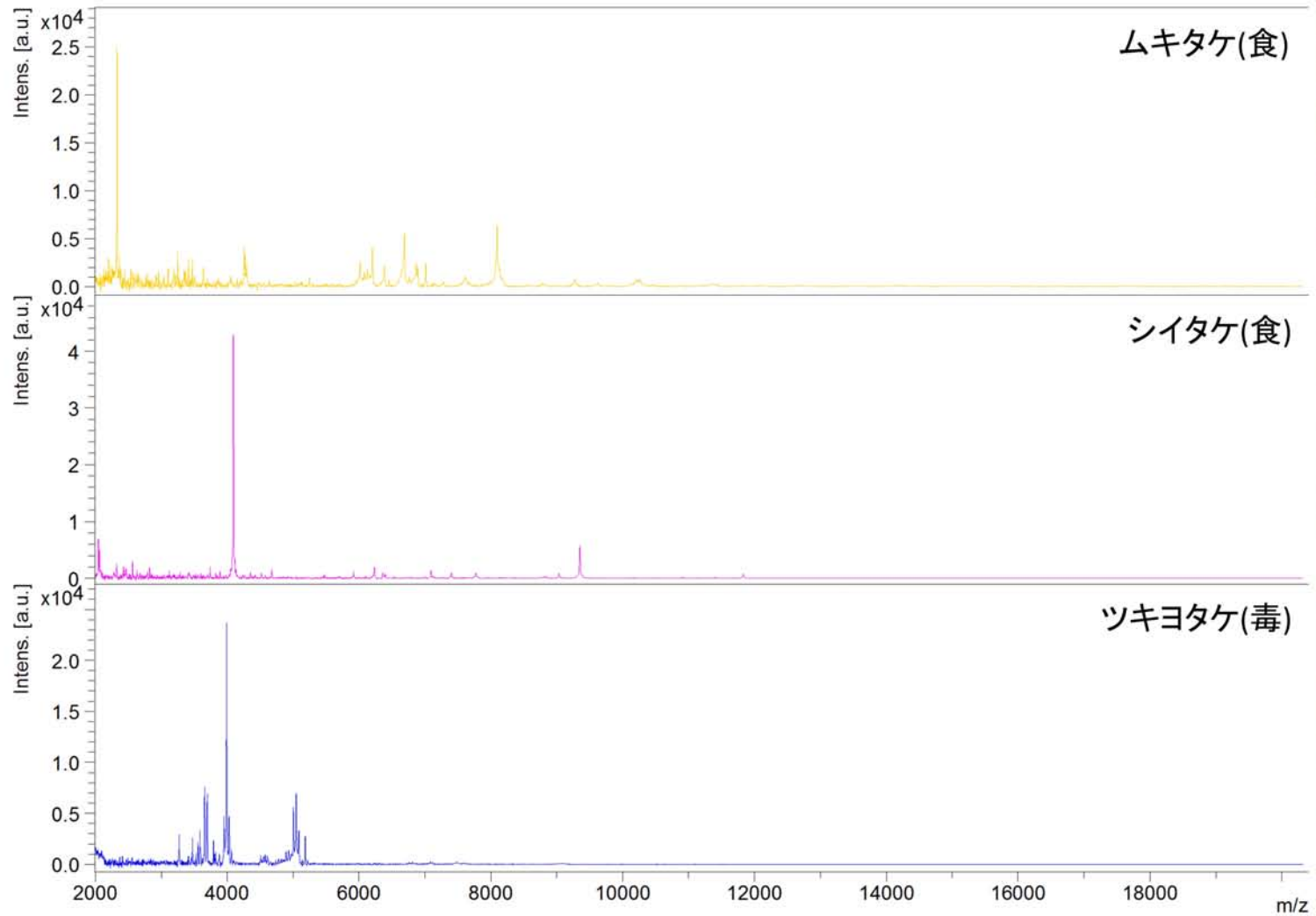


Fig. 11. キノコ子実体タンパク質のSDS-PAGEによる比較



ムキタケ(食)



シイタケ(食)



ツキヨタケ(毒)



Fig. 12. 形態類似キノコの比較(1/2)

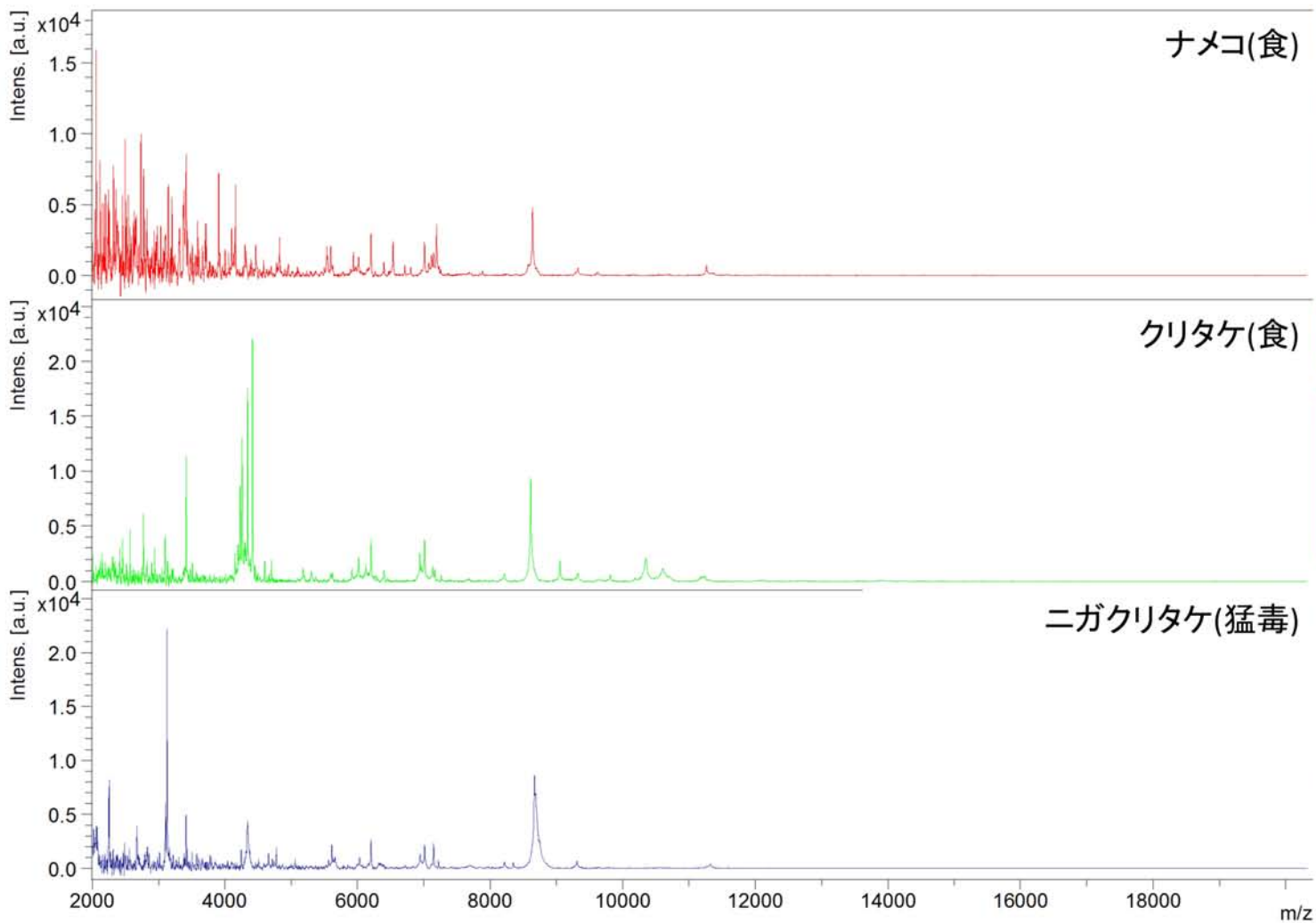


Fig. 13. 形態類似キノコの比較(2/2)

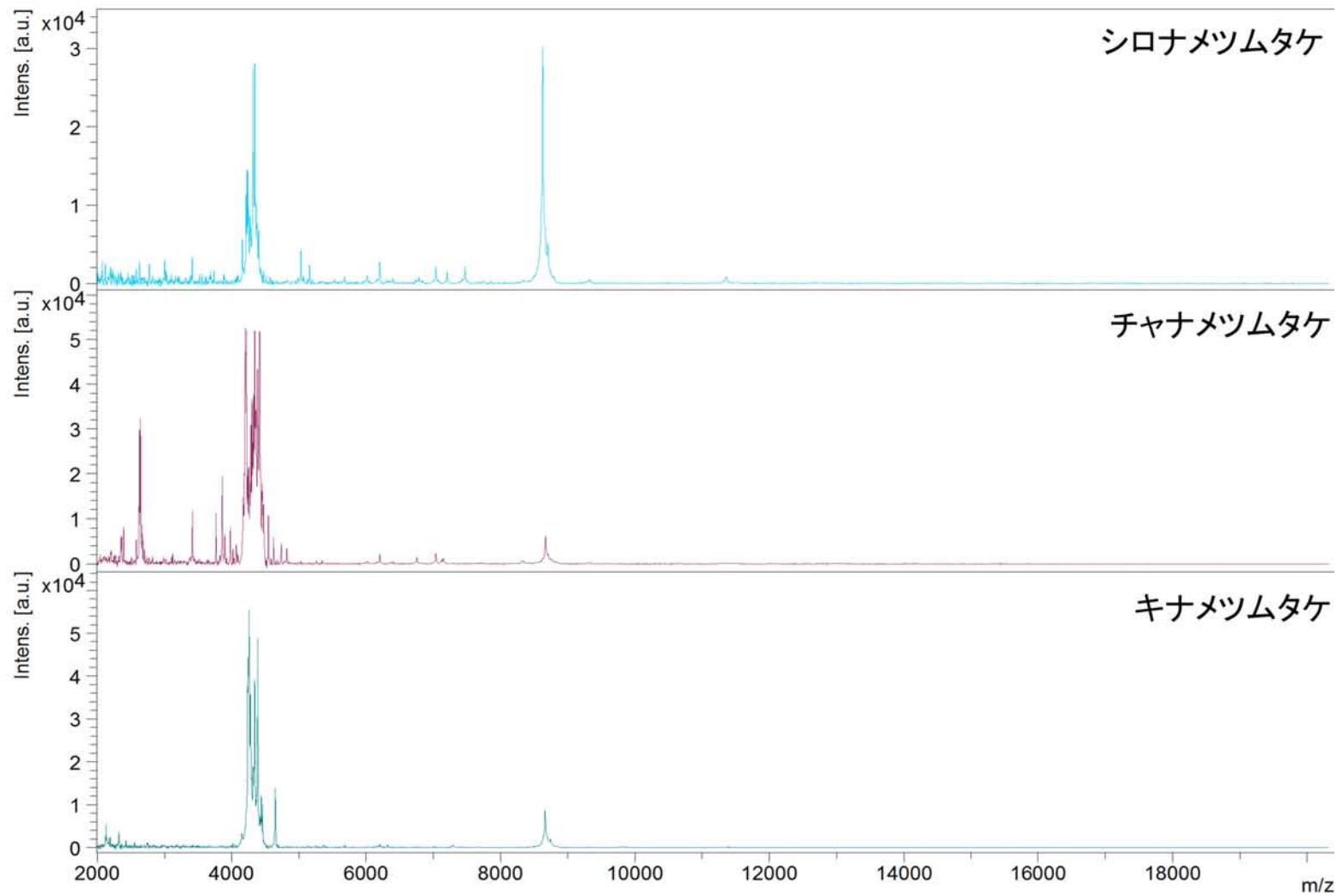


Fig. 14. 遺伝的近縁キノコの比較

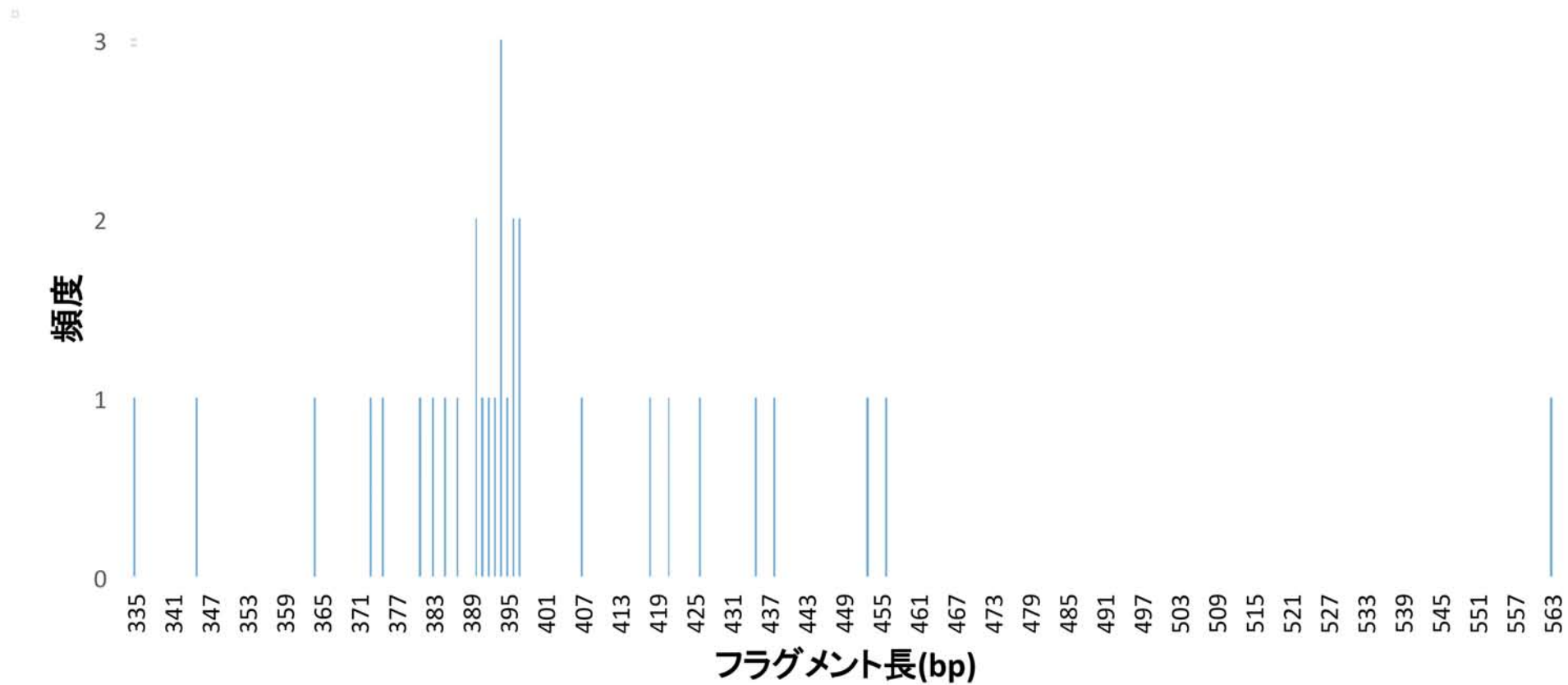


Fig. 15. 自生キノコARISAフラグメント長の分布

組成割合 ニガクリタケ:ポリポリ

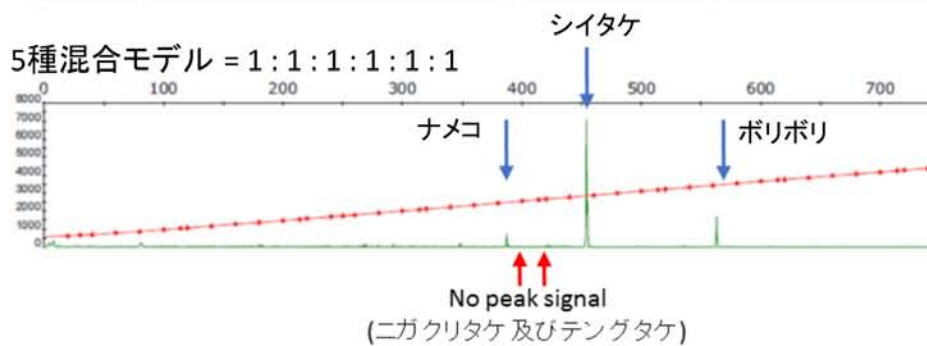
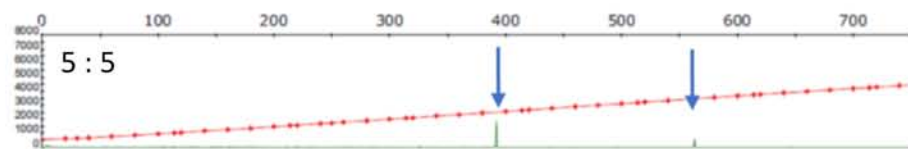
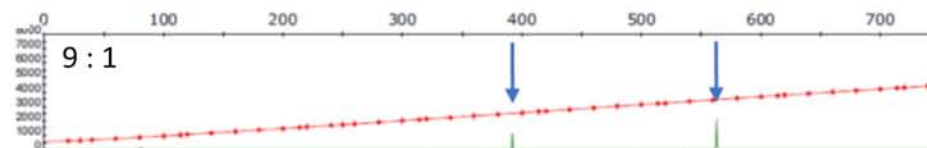
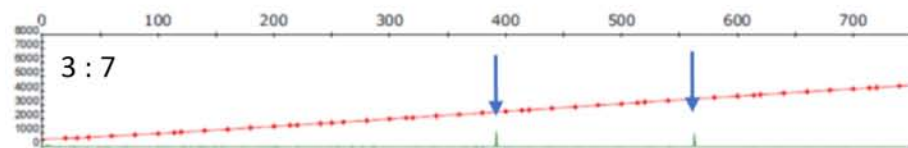
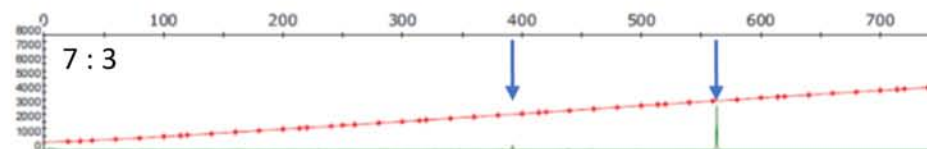
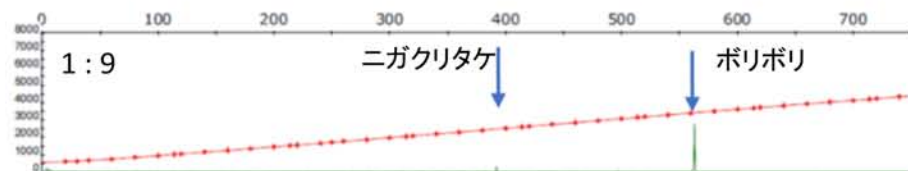


Fig. 16. キノコ混合物モデルのARISA解析結果



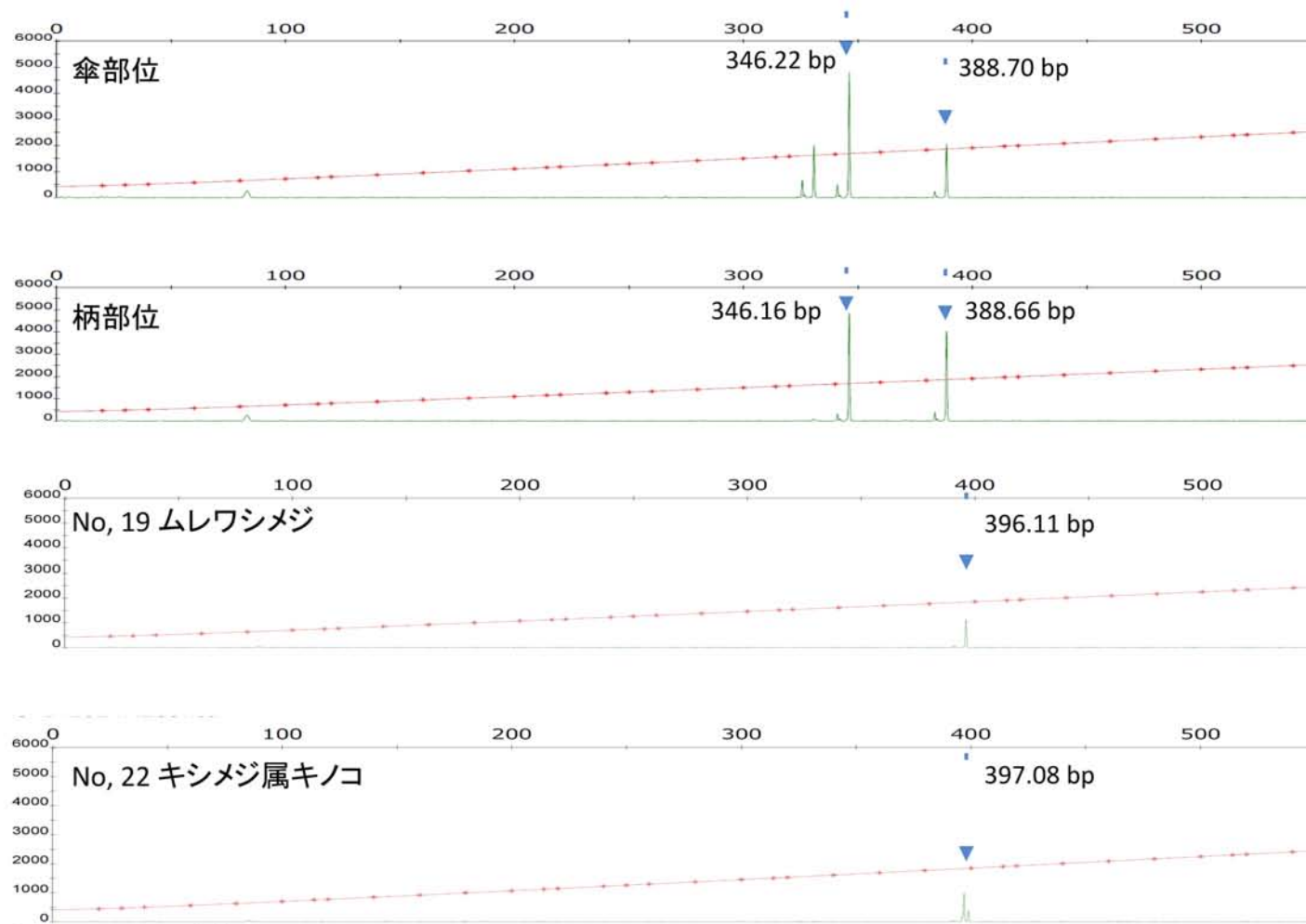


Fig. 17. 食中毒が疑われたキノコのARISA解析結果