

調査・資料

自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) によるキノコ種鑑別の検討と
カキシメジによる食中毒疑い事例への適用の試み

(平成27年8月18日受理)

菅原 諒太¹ 山田 さゆみ¹ 涂 志豪¹ 菅原 明子¹
干場 敏博¹ 栄坂 貞夫² 山口 昭弘^{1,*}Identification of Mushroom Species by Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis (ARISA) and
Its Application to a Suspected Case of Food Poisoning with *Tricholoma ustale*Ryota SUGAWARA¹, Sayumi YAMADA¹, Zhihao TU¹, Akiko SUGAWARA¹,
Toshihiro HOSHIBA¹, Sadao EISAKA² and Akihiro YAMAGUCHI^{1,*}¹ Department of Food Science and Human Wellness, Rakuno Gakuen University:

Midorimachi 582, Bunkyo-dai, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

² Sapporo City, Kiyota Ward Office, Health & Welfare Department:

1-1-2-1 Hiraoka, Kiyota-ku, Sapporo 004-8613, Japan;

*Corresponding author

Automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA), a method of microbiome analysis, was evaluated for species identification of mushrooms based on the specific fragment sizes. We used 51 wild mushroom-fruiting bodies collected in the centre of Hokkaido and two cultivated mushrooms. Samples were hot-air-dried and DNA were extracted by a beads beating procedure. Sequencing analysis of portions of the rRNA gene (rDNA) provided 33 identifications of mushrooms by genus or species. The results of ARISA identification based on the combination of the fragment sizes corresponding to two inter spacer regions (ITS2 and ITS1) of rDNA within $\pm 0.1\%$ accuracy showed that 27 out of the 33 species had specific fragment sizes differentiated from other species. The remaining 6 species formed 3 pairs that showed overlapping fragment sizes. In addition, within-species polymorphisms were observed as 1 bp differences among 32 samples of 13 species. ARISA was applied to investigate a case of suspected food poisoning in which the mushroom was thought to be a toxic Kakishimeji. The morphological identification of the mushroom was ambiguous since the remaining sample lacked a part of the fruiting body. Further, yeast colonies had grown on the surface of the fruiting body during storage. The ARISA fragment size of the mushroom showed 7 bp difference from that of the candidate toxic mushroom. Although ARISA could be a useful tools for estimation of mushroom species, especially in case where the fruiting bodies have deteriorated or been processed, further studies are necessary for reliable identification. For example, it may be necessary to adopt more informative genes which could provide clearer species-specific polymorphisms than the ITS regions.

(Received August 18, 2015)

Key words: DNA多型 DNA polymorphism; 品種鑑定 species identification; キノコ mushroom; 自然毒 natural toxin; 食中毒 food poisoning

緒 言

キノコは自然食材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毒性が不明な種も多く、行政機関から注意喚起はなされるものの、毎年秋になると時に死亡

例を伴う食中毒事例が発生している^{*1}。実際の食中毒発生時には、被害拡大を防ぐために原因食品および原因物質の速やかな同定が不可欠であるが、真菌類に属するキノコはほかの微生物とは異なり、肉眼で観察可能なため子実体の形態的特徴による鑑定が有効かつ重要である¹⁾。しかし

* 連絡先 yama-aki@rakuno.ac.jp

¹ 酪農学園大学 農食環境学群 食と健康学類: 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582² 札幌市清田区保健福祉部: 〒004-8613 札幌市清田区平岡1条1丁目2-1^{*1} 厚生労働省食中毒統計資料http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/kinoko/

種によっては子実体の形態が極めて類似しており、不注意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^{2),3)}。正確なキノコ種の形態鑑定には、高度な専門知識と長年の経験を要することに加え、実際の食中毒では、調理加工を経た食品残品あるいは患者吐しゃ物など子実体が原形をとどめていない事例も多く、形態からの鑑定にはおのずと限界がある。

最近ではほかの生物種と同様に、キノコ種の同定においても遺伝子解析が広く用いられるようになってきており^{4),5)}、キノコを含む真菌類に対しては、rRNA遺伝子(rDNA)周辺のInternal transcribed spacer (ITS)領域の塩基配列解析が汎用されている⁶⁾。食中毒の原因キノコ種同定を目的とした塩基配列解析は、残された唯一の手がかりが上述のような欠失あるいは変質した子実体に対して適用可能であり^{4),7)}、またツキヨタケなど典型的な毒キノコに対してはリアルタイムPCRによる定量的な検出方法も提案されている⁸⁾。ただし、塩基配列解析においては、複数キノコ種が混在する場合やキノコに酵母やカビなどの真菌類が大量に共存する場合には、シーケンサの塩基配列シグナルが重複するため、PCR産物のクローニングや次世代シーケンサによる解析などのより高度な手技が必要となる。また、キノコ種特異的プライマーを用いるリアルタイムPCR⁸⁾は、ツキヨタケなど一般的な毒キノコ数種の有無を確認するものであり、そのほかの多くの毒キノコや食毒不明キノコ種の検出には適用できない。

一方、このように複数の菌種が共存している状態は、ある種の微生物叢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) およびメタゲノム解析などさまざまな手法⁹⁾が用いられているが、その中でもAutomated rRNA Intergenic Spacer Analysis (ARISA)^{10)~14)}は簡便かつ経済的な方法として、最近、環境微生物分野を中心に注目を集めている。ARISAはrDNA周辺の多型領域をケイ光標識プライマーを用いてPCR増幅し、シーケンサによって測定される1塩基長(bp)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データのみから直接、種の同定はできないが微生物叢の全体像を把握するうえでは有用性が高い。したがって、複数のキノコ種が共存する調理加工食品や、子実体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を適用することで、特定あるいは不特定キノコ種の存在を推定できる可能性がある。

本報では、形態および塩基配列解析により同定した自生キノコ種に固有のARISAフラグメント長を真菌類の多型解析に汎用されているITS領域について求め、複数の菌種が共存する場合のキノコ種同定における有用性を評価するとともに、実際にカキシメジ中毒が疑われた事例へ応用した場合の解析結果についても述べる。

実験方法

1. 試料

(1) キノコ試料

道央圏の江別市に位置する酪農学園大学キャンパス内で2012年11月から2013年10月の間に採取したキノコ48試料、および2014年9月から10月に札幌近郊で採取した3試料の合計51試料の自生キノコを用いた。また栽培キノコは江別市内で購入したナメコおよびシイタケの各1試料を用いた(Table 1)。

(2) 前処理

採取したキノコは、表面を水道水で軽く洗浄し附着物を除去した後、ペーパータオルで水分を取り除いた。ドライフードメーカー (AFD-550, アビ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の後、乳鉢・乳棒あるいは粉碎機 (ミルサー 620DG, Iwatani) により粉碎し、常温保存したものを乾燥粉末試料とした。このとき、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十分の一程度となった。

(3) キノコ混合物モデル

形態的な類似性に基づき毒キノコのツキヨタケを含む混合モデル {ツキヨタケ, シイタケおよびムキタケ (それぞれTable 1のNo. 15, 29および32)} ならびに毒キノコのニガクリタケを含む混合モデル {ニガクリタケ, クリタケおよびナラタケ (それぞれTable 1のNo. 23, 24および31)} を作製した。両モデルとも3種キノコの乾燥粉末をそれぞれ10 mgずつ混合し30 mgとした後、DNAを抽出した。

(4) カキシメジと疑われたキノコ

2014年10月に札幌市内で、市民から種類不明の自生キノコを喫食後に下痢などの症状を呈したとの相談があり、キノコ種の鑑定を試みた。回収した時点で、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鑑別は困難であったが、色や形状は比較的、毒キノコのカキシメジに似ているように思われた。遺伝子解析を適用した際には、試料はその後、室温保存で1週間経過していたため、外見上の劣化が激しく表面に白いカビ様物質の発生を認めた (Fig. 1)。

2. 塩基配列解析によるキノコ種の同定

(1) DNA抽出

キノコの乾燥粉末試料、約20 mgから、細胞粉碎装置 (BC-20, (株) セントラル科学貿易) を用いてISOIL Beads Beating kit ((株) ニッポンジーン) に添付された説明書に従いDNAを抽出し、最終的にDNA溶液100 µLを得た。

(2) PCR反応

得られたDNA溶液を鋳型とし、キノコのITS2領域に対するプライマーペア⁴⁾ ITS 3/4 (5'-GCATCGATGAAG AACGCAGC/5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') あるいはITS1領域に対するプライマーペア⁴⁾ ITS 1/2 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/5'-GCT GCG TTC TTCATCGATGC-3') (以上、(株) ファスマックのカス

Table 1. Species specific fragment size of wild mushrooms obtained by ARISA

No.	Scientific name*	Score, Identity, %, Accession number*	Japanese common name	Family	Fragment size (bp) **	
					ITS2 region	ITS1 region
1	<i>Morganella pyriformis</i>	396, 219/219, 100%, AB11851	Tanukinochabukuro	<i>Agaricaceae</i>	a-390.47	338.58
2	<i>Agaricus nivescens</i>	558, 317/322, 98%, AY484670	—	<i>Agaricaceae</i>	b-394.84	g-363.31
	<i>A. macrocarpus</i>	554, 317/323, 98%, AY484686	—			
	<i>A. excellens</i>	553, 317/323, 98%, AY484682	—			
	<i>A. arvensis</i>	547, 311/316, 98%, JF797194	Shiroooharatake			
	<i>A. silvicola</i>	542, 315/322, 98%, AF059223	—			
3	<i>Bovistella radicata</i>	576, 321/322, 99%, DQ112608	—	<i>Agaricaceae</i>	b-394.98	354.93
	<i>Lycoperdon lambinonii</i>	576, 321/322, 99%, DQ112601	—			
	<i>L. umbrinum</i>	572, 320/322, 99%, EU833665	Tsubuhokoritake			
4	<i>Agaricus augustus</i>	576, 322/324, 99%, KC797151	—	<i>Agaricaceae</i>	b,c-395.54	g-363.08
	<i>A. macrocarpus</i>	571, 321/324, 99%, AY484686	—			
	<i>A. excellens</i>	567, 320/324, 99%, AY484682	—			
5	<i>Amanita caesareoides</i>	434, 240/240, 100%, FJ441038	Tamagotake	<i>Amanitaceae</i>	335.78	339.63
6	<i>Amanita spissa</i>	538, 298/298, 100%, AJ889924	Hebikinoko, Kirintake	<i>Amanitaceae</i>	383.97	352.02
7	<i>Amanita rubescens</i>	509, 302/311, 97%, KF245919	Gantake	<i>Amanitaceae</i>	385.08	314.35
8	<i>Amanita muscaria</i>	609, 337/337, 100%, KP866167	Benitengutake	<i>Amanitaceae</i>	407.35	272.80
9	<i>Amanita ibotengutake</i>	279, 154/154, 100%, KM052538	Ibotengutake	<i>Amanitaceae</i>	421.71	275.65
10	<i>Cortinarius triumphans</i>	205, 115/116, 99%, AY174799	Chabiofuusentakake	<i>Cortinariaceae</i>	375.31	307.65
11	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	563, 312/312, 100%, AY174801	—	<i>Cortinariaceae</i>	381.90	h-309.69
	<i>C. balteatus</i>	544, 309/313, 99%, AY669526	—			
12	<i>Inocybe lanatodisca</i>	358, 198/198, 100%, JQ408763	—	<i>Inocybaceae</i>	345.72	295.23
	<i>I. maculata</i>	358, 198/198, 100%, FJ904171	Shirogeasetake			
13	<i>Inocybe geophylla</i>	370, 209/210, 99%, AM882870	Shirotomayatake	<i>Inocybaceae</i>	364.54	351.17
14	<i>Lyophyllum decastes</i>	217, 120/120, 100%, JQ293099	Hatakeshimeji	<i>Lyophyllaceae</i>	b-394.87	306.60
15	<i>Omphalotus japonicus</i>	280, 155/155, 100%, KJ713987	Tsukiyotake	<i>Omphalotaceae</i>	458.51	h-310.11
16	<i>Trametes versicolor</i>	511, 289/293, 99%, KF313121	Kawaratake	<i>Polyporaceae</i>	373.51	257.26
17	<i>Russula sp.</i>	398, 223/225, 99%, AB769912	Benitake	<i>Russulaceae</i>	426.79	264.09
18	<i>Lactarius necator</i>	545, 302/302, 100%, AY606950	Uguisuchachichikitake	<i>Russulaceae</i>	435.51	304.78
19	<i>Lactarius hatsudake</i>	462, 257/258, 99%, AB253518	Hatsutake	<i>Russulaceae</i>	438.52	286.21
	<i>L. quieticolor</i>	461, 257/258, 99%, KT163424	—			
20	<i>Stereum hirsutum</i>	443, 245/245, 100%, KF313120	Kiurokotake	<i>Stereaceae</i>	a-390.09	261.61
21	<i>Pholiota nameko</i>	288, 161/162, 99%, FJ810174	Nameko	<i>Strophariaceae</i>	387.02	317.04
22	<i>Pholiota lundbergii</i>	387, 225/231, 97%, AF195607	—	<i>Strophariaceae</i>	391.69	321.28
	<i>P. squarrosa</i>	372, 222/231, 97%, JF908579	—			
23	<i>Hypholoma fasciculare</i>	387, 214/214, 100%, AB507904	Nigakuritake	<i>Strophariaceae</i>	d-392.85	ij-311.81
24	<i>Hypholoma sublateralitum</i>	188, 104/104, 100%, KR824074	Kuritake	<i>Strophariaceae</i>	d-393.33	i-311.18
25	<i>Pholiota mixta</i>	542, 315/323, 98%, HG007978	—	<i>Strophariaceae</i>	e,f-396.85	i-311.18
26	<i>Tricholoma populinum</i>	361, 207/210, 99%, EF493259	Murewashimeji	<i>Tricholomataceae</i>	c,e-396.11	k-312.74
27	<i>Mycena galericulata</i> (96%)*	416, 246/255, 96%, HG531386	Kunugitake	<i>Tricholomataceae</i>	f-397.06	ij-311.55
28	<i>Tricholoma populinum</i>	563, 323/329, 98%, EF493259	Murewashimeji	<i>Tricholomataceae</i>	f-397.08	ij-311.84
	<i>T. ustale</i>	554, 320/327, 98%, DQ974702	Kakishimeji			
29	<i>Lentinula edodes</i>	181, 100/100, 100%, LN714563	Shiitake	<i>Tricholomataceae</i>	453.91	h-309.98
30	<i>Rhodocollybia butyracea</i>	242, 134/134, 100%, EU486454	Eseorimiki	<i>Tricholomataceae</i>	456.51	344.84
31	<i>Armillaria sinapina</i>	728, 403/403, 100%, FJ652043	Hoteinaratake	<i>Tricholomataceae</i>	563.95	j,k-
	<i>A. cepistipes</i>	728, 403/403, 100%, KP162320	Kurogenaratake			312.16
32	<i>Sarcomyxa edulis</i>	556, 308/308, 100%, LC098752	Mukitake	<i>Typhulaceae</i>	393.91	343.33
33	(Not identified with mixed signal)	—	—	—	418.73	281.11

Wild mushrooms were collected in the centre of Hokkaido during November '12 to October '14 except for the commercially cultivated Nameko (No. 21) and Shiitake (No. 29).

*Species identified by DNA sequencing with concordance rate 97% or more in BLAST search.

**Fragment size recognized as the same group shares the same letter.

***No candidate with concordance rate 97% or more in BLAST search.

タム合成品)を用いてPCR増幅を行った。PCR反応液は注射水(大塚製薬(株))14.1 μL, ×10 Ex Taq Buffer 2 μL, 2.5 mM dNTP 1.6 μL, ExTaq 0.1 μL (以上, タカラバイオ(株)), 各50 μmol/L Primer Mix (Forward+Reverse, ファスマック) 0.2 μLを混合し, DNA溶液2 μLを加え全量を20 μLとした。PCR反応は初期熱変性を94°C-10分間, サイクリングは熱変性を94°C-30秒間, アニールを55°C-30秒間, 伸長反応を72°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 Laboratories, Inc.)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0.5 mg/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(関東化学(株)), 同じく0.5 mg/mLのエチジウムブロマイドを含む×1 Tris Acetate EDTA Buffer (TAE)((株)ニッポンジーン)泳動液を使用した。泳動に用いる×6 Loading Bufferは, グリセリン(和光純薬工

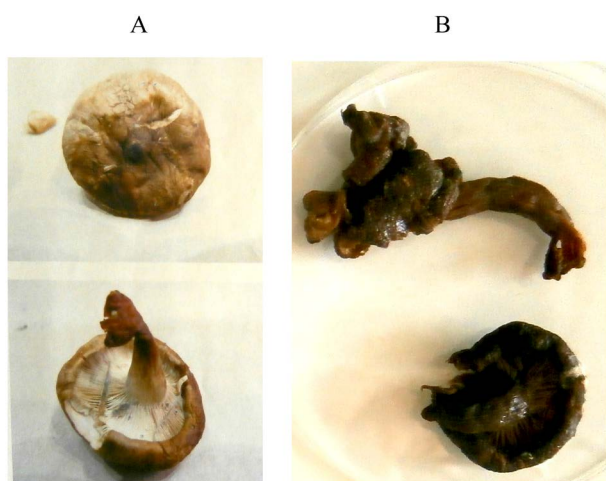


Fig. 1. A mushroom suspected as the source of food poisoning

A: at morphological evaluation, a couple of days after collection.

B: at DNA extraction, one week later, with some deterioration

業(株) 15 g, プロモフェノールブルー (和光純薬工業(株)) 15 mg を蒸留水に溶解し, 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0 ((株)ニッポンジーン) 3 mL を加えた後, 全量 50 mL とした. PCR 産物 10 μ L に $\times 6$ Loading Buffer 2 μ L を混合し, 0.5 mg/mL の 100 bp DNA Ladder (GeneDireX, Inc.) をそれぞれ 10 μ L ずつゲル内のウェルへアプライし, 100 V で 30 分間, 電気泳動 (Mupid-2Plus, (株) ミュービッド) した. 泳動終了後, UV ゲル撮影装置 (FAS-201, 東洋紡(株)) を用いて増幅バンドを確認した.

なお食中毒が疑われたキノコの複数 PCR 産物の分離精製には, 4% (w/v) NuSieve™ 3: 1 Agarose (Lonza Group Ltd.) を用い, ゲルとともに PCR 産物を切り出した後, 後述のスピンカラムによる精製および DNA 塩基配列解析による同定を行った.

(4) スピンカラムによる 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 (タカラバイオ(株)) を用いて行った. PCR 産物 10 μ L に注射水 90 μ L を混合し全量を使用した. 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 から 650 μ L へと変更した.

(5) DNA 塩基配列解析

PCR 増幅時に用いた Forward または Reverse プライマーを, 1.6 pmol/ μ L となるように TE Buffer (pH 8.0) 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 μ L および前述の 1.6 pmol/ μ L プライマー 4 μ L を 8 連チューブに入れて混合し, 塩基配列解析を (株) ファスマックに依頼した. 得られた塩基配列データを確認後, National Center

for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST による相同性検索に基づきキノコ種を同定した. キノコにおいては, 塩基配列の相同性が 97% 以上を示した場合に形態学的な同定結果と一致するとの昌山らの報告⁴⁾があることから, 相同性が 97% 以上を示したキノコは同種であると判断した.

3. ARISA によるフラグメント長測定

「2-(2) PCR 反応」に準じて目的とする DNA 領域を増幅した. ただし ARISA 解析の場合には, プライマーを二分の一濃度の 25 μ mol/L として, ITS4 プライマーおよび ITS2 プライマーの 5' 側を HEX ケイ光色素で標識して用いた. 得られたケイ光標識 PCR 産物について, シーケンサ (Genetic Analyzer 3130 \times 1, Applied Biosystems) および 1200LIZ サイズマーカーを用いたフラグメント解析を (株) ファスマックに依頼した. ARISA フラグメント長 (bp) 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¹⁴⁾と判断した.

結 果

1. ARISA フラグメント長の比較

ARISA によって解析した 33 種 52 試料すべてにおいてフラグメント長のデータが得られた (Table 1, 2). 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ケイ光強度 2,000~12,000 の範囲であった. キノコ種 33 種のうち, 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, ITS2 領域が (No. 1, 20), (No. 2, 3, 4, 14), (No. 4, 26), (No. 23, 24), (No. 25, 26) および (No. 25, 27, 28) の 6 組 12 種, 一方, ITS1 領域は (No. 2, 4), (No. 11, 15, 29), (No. 23, 25, 27, 28), (No. 23, 24, 27, 28, 31) および (No. 26, 31) の 5 組 12 種の組み合わせであった (Table 1). これら 2 領域のフラグメント長の組み合わせとしては 27 種が特異的であり, 種の判別が不能なものは残り 3 組 6 種であった.

同種キノコの異なる個体間でも同一のフラグメント長を示すかどうかを確認するため, 採取場所あるいは採取時期の異なる 13 種 32 試料のキノコ子実体を用いて, ARISA の再現性を評価した (Table 2). その結果, 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試料は, ITS2 領域はハタケシメジ No. 14-1 vs. (No. 14-2, 3) およびニガクリタケ No. 23-1 vs. (No. 23-2~4) の 2 種, ならびに ITS1 領域はハタケシメジ (No. 14-2) vs. (No. 14-1, 3) およびカワラタケ No. 16-1 vs. 16-2 の 2 種であり, いずれの場合も約 1 bp の差が認められた. 残りの試料はすべて塩基配列解析結果と固有 ARISA フラグメント長の対応が一致した.

2. キノコ混合物モデルの解析

ツキヨタケ, シイタケおよびムキタケの混合モデルの ITS2 領域の ARISA 解析において, ツキヨタケとシイタケの特異ピークは確認できたが, ムキタケ由来のピークは認

Table 2. Variation of ARISA fragment sizes within the same species of wild mushrooms obtained from different fruiting bodies

No.	Scientific name*	Score, Identity, %, Accession number*	Collected date and place**	Japanese common name	Family	Fragment size (bp) ***	
						ITS2 region	ITS1 region
1-1	<i>Morganella pyriformis</i>	396, 219/219, 100%, AB11851	131023	Tanukinochabukuro	<i>Agaricaceae</i>	a-390.47	m-338.58
1-2	<i>Morganella pyriformis</i>	632, 357/359, 99%, AB811851	131002**	Tanukinochabukuro	<i>Agaricaceae</i>	a-390.47	m-338.48
1-3	<i>Morganella pyriformis</i>	632, 357/359, 99%, AB811851	131002**	Tanukinochabukuro	<i>Agaricaceae</i>	a-390.48	m-338.40
2-1	<i>Agaricus nivescens</i>	558, 317/322, 98%, AY484670	130911	—	<i>Agaricaceae</i>	b-394.84	n-363.31
	<i>A. macrocarpus</i>	554, 317/323, 98%, AY484686	—	—	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	553, 317/323, 98%, AY484682	—	—	—	—	—
	<i>A. arvensis</i>	547, 311/316, 98%, JF797194	—	Shiroooharatake	—	—	—
	<i>A. silvicola</i>	542, 315/322, 98%, AF059223	—	—	—	—	—
2-2	<i>Agaricus nivescens</i>	535, 304/309, 98%, AY484670	130909	—	<i>Agaricaceae</i>	b-394.87	n-363.23
	<i>A. albolutescens</i>	531, 303/309, 98%, AY484675	—	—	—	—	—
	<i>A. macrocarpus</i>	529, 304/310, 98%, AY484686	—	—	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	529, 304/310, 98%, AY484682	—	—	—	—	—
	<i>A. arvensis</i>	517, 294/299, 98%, JF797194	—	Shiroooharatake	—	—	—
4-1	<i>Agaricus augustus</i>	576, 322/324, 99%, KC797151	130909	—	<i>Agaricaceae</i>	b-395.54	n-363.08
	<i>A. macrocarpus</i>	571, 321/324, 99%, AY484686	—	—	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	567, 320/324, 99%, AY484682	—	—	—	—	—
4-2	<i>Agaricus augustus</i>	601, 336/338, 99%, KC797151	130911	—	<i>Agaricaceae</i>	b-395.54	n-363.10
	<i>A. macrocarpus</i>	596, 335/338, 99%, AY484686	—	—	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	562, 334/338, 99%, AY484682	—	—	—	—	—
5-1	<i>Amanita caesareoides</i>	452, 250/250, 100%, KP004950	130919	Tamagotake	<i>Amanitaceae</i>	c-335.78	o-339.63
5-2	<i>Amanita caesareoides</i>	434, 240/240, 100%, FJ441038	130909	Tamagotake	<i>Amanitaceae</i>	c-335.82	o-339.48
8-1	<i>Amanita muscaria</i>	609, 337/337, 100%, KP866167	131002	Benitengutake	<i>Amanitaceae</i>	d-407.35	p-272.80
8-2	<i>Amanita muscaria</i>	580, 321/321, 100%, GQ914932	131014	Benitengutake	<i>Amanitaceae</i>	d-407.41	p-272.73
9-1	<i>Amanita ibotengutake</i>	279, 154/154, 100%, KM052538	130911	Ibotengutake	<i>Amanitaceae</i>	e-421.71	q-275.65
9-2	<i>Amanita ibotengutake</i>	232, 128/128, 100%, AB211057	130909	Ibotengutake	<i>Amanitaceae</i>	e-421.73	q-274.88
10-1	<i>Cortinarius triumphans</i>	205, 115/116, 99%, AY174799	130919	Chabiofuousentakake	<i>Cortinariaceae</i>	f-375.31	r-307.65
10-2	<i>Cortinarius triumphans</i>	190, 105/105, 100%, AY174799	130918	Chabiofuousentakake	<i>Cortinariaceae</i>	f-375.32	r-307.65
11-1	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	563, 312/312, 100%, AY174801	130919	—	<i>Cortinariaceae</i>	g-381.90	s-309.69
	<i>C. balteatus</i>	544, 309/313, 99%, AY669526	—	—	—	—	—
11-2	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	232, 130/131, 99%, AY174801	130918	—	<i>Cortinariaceae</i>	g-381.91	s-309.73
	<i>C. cycneus</i>	230, 129/131, 99%, GU222297	—	—	—	—	—
	<i>C. nemorensis</i>	228, 129/131, 98%, JF907849	—	Morinozufujirotake	—	—	—
	<i>C. langei</i>	228, 129/131, 98%, DQ083790	—	—	—	—	—
	<i>C. clelandii</i>	226, 130/132, 98%, JN942297	—	—	—	—	—
11-3	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	560, 310/310, 100%, AY174801	130911	—	<i>Cortinariaceae</i>	g-381.93	s-309.61
	<i>C. balteatus</i>	540, 307/311, 99%, AY669526	—	—	—	—	—
	<i>C. badiolatus</i>	531, 306/311, 98%, FJ717595	—	—	—	—	—
11-4	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	558, 309/309, 100%, AY174801	130918	—	<i>Cortinariaceae</i>	g-381.93	s-309.64
	<i>C. balteatus</i>	538, 306/310, 99%, AY669526	—	—	—	—	—
	<i>C. badiolatus</i>	529, 305/310, 98%, FJ717595	—	—	—	—	—
14-1	<i>Lyophyllum decastes</i>	217, 120/120, 100%, JQ293099	130918	Hatakeshimeji	<i>Lyophyllaceae</i>	h-393.07	t-305.56
14-2	<i>Lyophyllum decastes</i>	603, 334/334, 100%, AB269929	130918	Hatakeshimeji	<i>Lyophyllaceae</i>	i-394.87	306.60
14-3	<i>Lyophyllum decastes</i>	206, 114/114, 100%, JQ293099	130926	Hatakeshimeji	<i>Lyophyllaceae</i>	i-394.87	t-305.27
16-1	<i>Trametes versicolor</i>	511, 289/293, 99%, KF313121	131023	Kawaratake	<i>Polyporaceae</i>	j-373.51	257.26
16-2	<i>Trametes versicolor</i>	255, 141/141, 100%, KF573030	131003	Kawaratake	<i>Polyporaceae</i>	j-373.55	258.02
	<i>T. velutina</i>	255, 141/141, 100%, KF573020	—	—	—	—	—
23-1	<i>Hypholoma fasciculare</i>	389, 220/223, 99%, JQ685719	131002	Nigakuritake	<i>Strophariaceae</i>	391.80	u-311.48
23-2	<i>Hypholoma fasciculare</i>	396, 224/227, 99%, KM282284	130524	Nigakuritake	<i>Strophariaceae</i>	h-392.81	u-311.61
23-3	<i>Hypholoma fasciculare</i>	376, 213/216, 99%, FJ481034	121030	Nigakuritake	<i>Strophariaceae</i>	h-392.84	u-311.62
23-4	<i>Hypholoma fasciculare</i>	387, 214/214, 100%, AB507904	131003	Nigakuritake	<i>Strophariaceae</i>	h-392.85	u-311.81
31-1	<i>Armillaria sinapina</i>	728, 403/403, 100%, FJ652043	131003**	Hoteinaratake	<i>Tricholomataceae</i>	k-563.95	u-312.16
	<i>A. cepistipes</i>	728, 403/403, 100%, KP162320	—	Kurogenaratake	—	—	—
31-2	<i>Armillaria sinapina</i>	325, 180/180, 100%, AB510886	131003**	Hoteinaratake	<i>Tricholomataceae</i>	k-564.01	u-312.06
	<i>A. cepistipes</i>	325, 180/180, 100%, AB510862	—	Kurogenaratake	—	—	—
32-1	<i>Sarcomyxa edulis</i>	556, 308/308, 100%, LC098752	121101	Mukitake	<i>Typhulaceae</i>	l-393.91	v-343.33
32-2	<i>Sarcomyxa edulis</i>	549, 304/304, 100%, LC098752	131023**	Mukitake	<i>Typhulaceae</i>	l-393.95	v-342.25
32-3	<i>Sarcomyxa edulis</i>	583, 323/323, 100%, LC098752	131023**	Mukitake	<i>Typhulaceae</i>	l-393.98	v-343.21

*The first figure is corresponding to that in Table 1, and the second figure means different sample of fruiting body.

**All samples were collected in the campus of Rakuno Gakuen University on the noted date, although the 3 pairs (1-2 vs. -3, 31-1 vs. -2 and 32-2 vs. -3)

***Fragment size recognized as the same group shares the same letter.

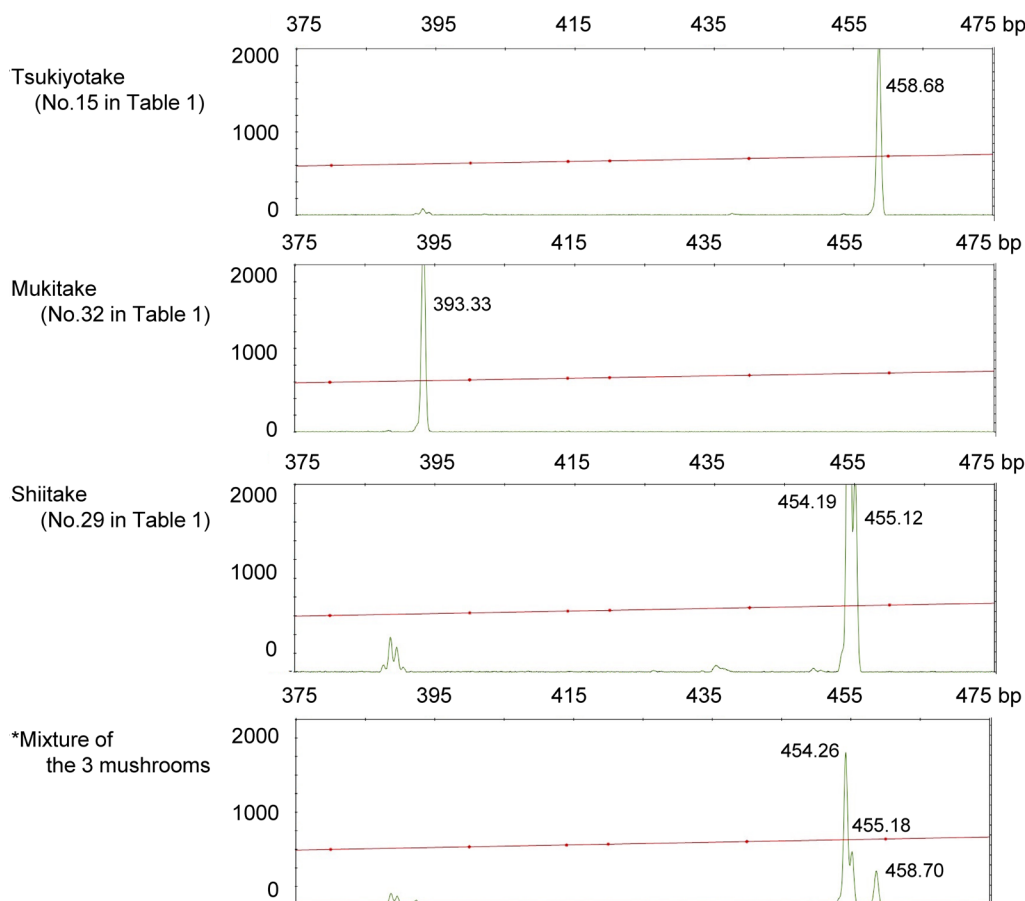


Fig. 2. ARISA profiles (ITS2 region) of electropherograms obtained from different species of mushrooms

- Mixing ratio of Tsukiyotake–Mukitake–Shiitake = 1 : 1 : 1 of each dried powder prior to DNA extraction
- Vertical axes: Fluorescence intensity in arbitrary unit
- Horizontal axes and numbers on accompanied peaks: PCR fragment size (bp)

められなかった (Fig. 2). 一方, ニガクリタケ, クリタケおよびナラタケの混合モデルのARISA解析では, ITS2領域におけるナラタケの特異ピークは確認できず, ニガクリタケとクリタケのフラグメント長の差は両ITS領域ともに1 bp以内であり, これらキノコの判別は困難であった.

3. カキシメジと疑うキノコの解析

柄および傘の両部位から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PCR産物に対する直接の塩基配列解析においては重複シグナルを認め同定は不可能であった.

カキシメジと疑われたキノコはITS2領域のARISA解析の結果, 柄および傘部位に共通するシグナルとして2つのメインピークが確認された (Fig. 3). 共通ピークのフラグメント長 (bp) は柄部位では346.16および388.66, 傘部位では346.22および388.70であり, とともにキノコのARISAフラグメント長データ (Table 1) に一致するキノコ種は存在しなかった. フラグメント長データの照合では346.22のフラグメントはアセタケ属のキノコ (No. 12) 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. これらは鑑別対象のカキシメジ (No. 28) の397.08 bpおよび形態からは毒キノコのマツシメジと推定

された近縁種のムレワシメジ (No. 26) の396.11 bpとは7 bp程度の差を示した.

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 (Fig. 4), それぞれについて塩基配列解析を行った. その結果, 388.66 bpのバンドは子実体由来でありキノコ種として *Clitocybe nebularis* (ハイロシメジ) または *Leucopaxillus compactus* (和名なし) の可能性が示唆された. これらはカキシメジやマツシメジと同じキシメジ科に属するが, いずれも食毒は知られていないキノコ種であった^{15)~17)}.

なお, 346.16 bpのフラグメントは, 同様にゲル切り出しバンドの塩基配列解析の結果, 酵母の *Cryptococcus musci* と同定された.

考 察

ARISAにおいては, キャピラリーシーケンサを用いて20 bp刻みのサイズマーカーを同時に泳動しフラグメント長を精密に測定するが, PCRおよび泳動の再現性を考慮したとき, ある程度の誤差を伴う¹¹⁾. 本研究のフラグメント長 $\pm 0.1\%$ の同定精度において, 33種のキノコのうち

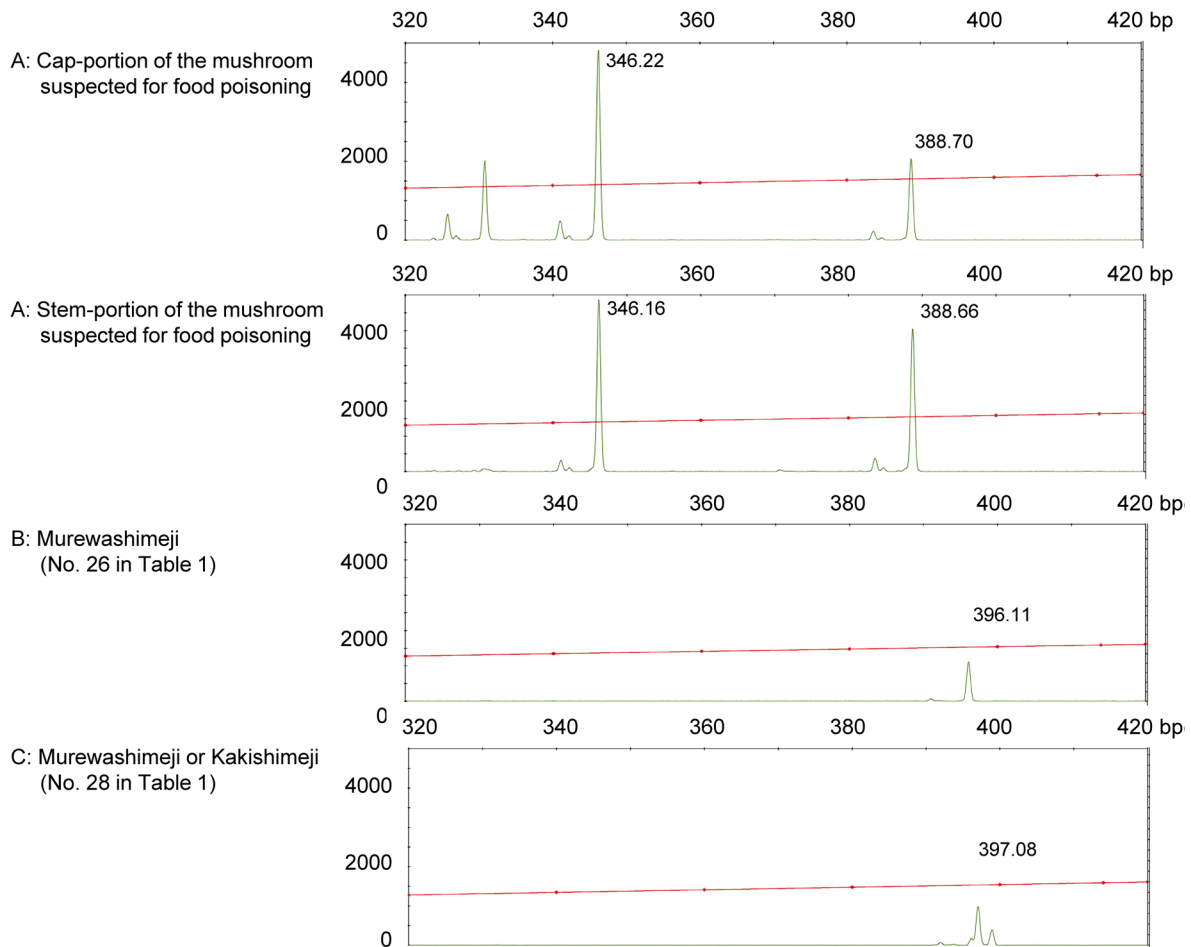


Fig. 3. ARISA profiles (ITS2 region) of electropherograms obtained from a mushroom suspected as the source of food poisoning (A) and reference mushrooms (B, C)

- ・ Vertical axes: Fluorescence intensity in arbitrary unit
- ・ Horizontal axes and numbers on accompanied peaks: PCR fragment size (bp)

ITS2領域6組12種およびITS1領域5組12種に種間で重複が認められた (Table 1). ITS領域は、種間で豊富な多型性^{5),6)}を示すことが知られているものの、フラグメント長の違いのみを利用するARISAにおいては、点変異などの塩基配列情報の違いは原理的に検出できないことから、その多様性に制約を受ける。実際、本研究で用いたキノコのフラグメント長は、ITS2領域が390 bp付近およびITS1領域が310 bp付近のそれぞれ狭い範囲に集中している。しかしながらナラタケ (No. 31) の563.95 bpやタマガタケ (No. 1) の335.78 bpのように、種によってはかなり特徴的なものも存在する (Table 1)。

一方、同種キノコの採取場所あるいは採取時期の異なる個体間での固有フラグメント長の再現性を13種のキノコで調べた結果、11種においては完全に一致したものの、2種のキノコ (ハタケシメジとニガクリタケ) において同定精度の誤差範囲を超える差を認めた。これらの結果から、ITS領域の同種内多型がある頻度で存在し、このときのフラグメント長の差は今回の限定的な解析結果からは1 bp程度と考えられる。

ツキヨタケ混合物モデルでは、シイタケが優位にPCR

増幅され、ツキヨタケの増幅は確認できるもののムキタケはほとんど増幅されていない (Fig. 2)。混合組成を反映したシグナル比が得られなかった原因としては、複数テンプレートが混在するマルチプレックスPCRの宿命として、PCRの増幅強度がプライマー配列とキノコ種の塩基配列の親和性に影響されるためと考えられる。またニガクリタケ混合物モデルにおいても、もともと、ニガクリタケとクリタケをフラグメント長で区別できないことから有用性は示せていない。したがってこれら混合物モデルの結果から、本研究で用いたプライマーを用いるARISAのシグナル強度比は、混合組成を正確に反映するものではなく、ツキヨタケやニガクリタケのような毒キノコが混入した調理加工品などへの適用は、現実的には困難であることが判明した (Fig. 2)。この点を改善するためには、より多くのキノコ種に対して同程度の増幅強度を与えるユニバーサルプライマーの設計、あるいはITS領域以外の判別可能な多型性を示す遺伝子領域を新たに探索する必要がある。

カキシメジと疑われたキノコのARISAフラグメント長は、形態からその可能性が示唆されていた鑑別対照の毒キノコ (No. 28カキシメジ) のフラグメント長とは7 bp

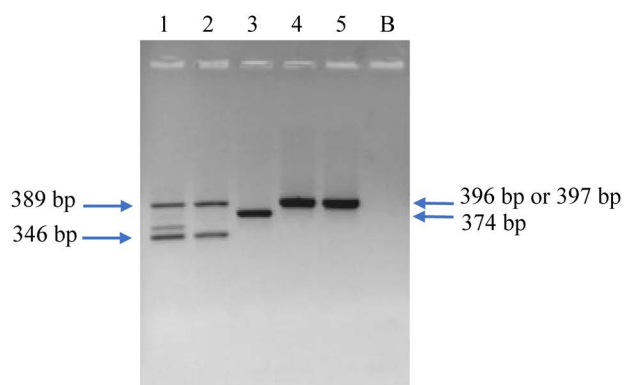


Fig. 4. Separation of PCR products amplified for total DNAs extracted from cap and stem portions of a mushroom suspected as the source of food poisoning by 4% agarose gel electrophoresis

- 1: Cap portion of a mushroom suspected as the source of food poisoning
 2: Stem portion of a mushroom suspected as the source of food poisoning
 3: Kawaratake (No. 16 in Table 1)
 4: Murewashimeji (No. 26 in Table 1)
 5: Murewashimeji or Kakishimeji (No. 28 in Table 1)
 B: Water as the reagent blank of PCR
 Each band size represents from the corresponding fragment size of ARISA.

程度の差を認めた (Fig. 3)。この結果は切り出したPCR産物の塩基配列解析によって別の明らかな毒性は持たないキノコの可能性が示されたことと矛盾しない。また本キノコからは酵母が合わせて検出されているが、もともとキノコに共生していた可能性あるいは採取後に汚染を受けた可能性も含め、摂食時には増殖を認めていないことから、今回の発症への関与は低いものと考えられる。本事例のように子実体がある程度原形をとどめ単一のキノコ種であることが確認できる場合で、変容した形態およびDNA塩基配列解析によるアプローチが複雑な状況においては、より直接的なARISAによる解析は特徴的な固有フラグメント長を持つキノコに対しては比較対照キノコとの鑑別に有用である可能性が示唆された。

しかしながら、ここで用いたITS領域に対するARISAにおいては異なる種であってもフラグメント長が一致することがあるため、また逆に種内多型を認める場合もあるため、この結果のみで種を確定することには限界がある。

以上、従来用いられてきたキノコ子実体の形態観察や塩基配列解析に加えてARISAを適用することで、劣化した試料などへ解析範囲を広げる可能性は示唆されたものの、より信頼性の高いキノコ種の判別のためには、真菌類の多型解析に一般的に用いられているここで検討したITS領域ではなく、種特異的な多型情報が得られるほかの遺伝子領域の探索が必要である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり多大なご尽力をいただきました札幌市衛生研究所の花井潤師博士、キノコ種鑑定の機会をいただきました札幌市北区保健福祉部の勝俣友了氏および西尾香奈子氏、ならびに本研究を進めるにあたり貴重なご助言をいただきました酪農学園大学の横田 博教授、小野寺秀一教授および村松 圭准教授に心より感謝を申し上げます。また、本研究の一部は、文科省科研省私立大学戦略拠点事業（酪農学園大学大学院2013～2017年）の一環として実施されたものである。

文 献

- 1) 長澤栄史. “1.3菌類の同定”. 菌類の事典. 日本菌学会編. 第1版. 東京, 朝倉書店, 2013, p. 406-411. (ISBN 978-4-254-17147-1)
- 2) Yamaura, Y. Mushroom poisoning in Japan—Recent and future considerations—. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **51**, 319-324 (2010).
- 3) Yamaura, Y. Recent trends of mushroom poisoning in Japan. *The Japanese Journal of Toxicology*, **26**, 39-43 (2013).
- 4) Masayama, A., Murakami, T., Sakuma D., Ki, M., Yamano, T., Shimizu, M. Discrimination of mushrooms causing food-poisoning incidents by using DNA sequence analysis. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.)*, **53**, 237-242 (2012).
- 5) Hosaka, K., Species identification of mushrooms using molecular data. *The Japanese Journal of Toxicology*, **26**, 205-209 (2013).
- 6) Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 6241-6246 (2012).
- 7) Maeta, K., Mochida, Y., Komatsu, M., Ochi, T., Nagase, M., Aimi, T. DNA authentication of cooked mushrooms. *Mushroom Sci. Biotech.*, **16**, 123-128 (2008).
- 8) Maeta, K., Ochi T., Tokimoto, K., Shimomura, N., Maekawa, N., Kawaguchi, N., Nakaya, M., Kitamoto, Y., Aimi, T. Rapid species identification of cooked poisonous mushrooms by using real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3306-3309 (2008).
- 9) Fujisawa, T. Comparison of intestinal bacteria composition identified by various analytical methods. *Japanese Journal of Bacteriology*, **69**, 331-348 (2014).
- 10) Saito, A., Ikeda, S., Noritake, C., Akasaka, M., Fujishiro, K., Ando, K., Minamisawa, K. Evaluation of microbial diversity using ribosomal intergenic spacer analysis. *Bi-seibutsu Seitai*, **22**, 59-71 (2007).
- 11) Popa, R., Mashall, M. J., Nguyen, H., Tebo, B. M., Brauer, S. Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. *J. Microbiol. Methods*, **78**, 111-118 (2009).
- 12) Kovacs, A., Yacoby, K., Gophna, U. A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial rich-

- ness. Res. Microbiol., **161**, 192–197 (2010).
- 13) Saro, C., Ranilla, M. J., Cifuentes, A., Rossello-Mora, R., Carro, M. D. Technical note: Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis and denaturing gradient gel electrophoresis to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, **92**, 1083–1088 (2014).
 - 14) Jami, E., Shterzer, N., Mizrahi, I. Evaluation of automated ribosomal intergenic spacer analysis for bacterial fingerprinting of rumen microbiome compared to pyrosequencing technology. *Pathogens*, **3**, 109–120 (2014).
 - 15) Beitenbach, J., Kränzlin, F., eds. *Boletes and agarics 1st part. Fungi of switzerland*. Lucerne. Mykologia, 1991, p. 162–216. (ISBN 978-0916422806)
 - 16) 五十嵐恒夫. 北海道のキノコ. 札幌, 北海道新聞社, 2009, p. 374 (ISBN 978-4-89453-390-5)
 - 17) 高橋邦雄. 北海道きのこ図鑑新装改版. 札幌, 亜璃西社, 2012, p. 362 (ISBN 978-4-906740-01-7)