

## 36. 自然毒中毒事件における毒キノコの遺伝子解析による同定

○岡山 明子（奈良県保健研究センター）

### 【目的】

自然毒による食中毒は 1 件あたりの患者数は少ないが死亡例の多いことが特徴である。中でもキノコ毒による死者は全自然毒中毒死者の 31.5%を占め、フグ毒に次ぐ。通常、病因物質は質量分析計など高性能な機器を用いて特定するが、キノコ毒標準物質は入手困難であったり毒成分が特定されていなかったり機器分析技術を適用できないことが多い。奈良県では、平成 9 年にアセタケ、平成 23 年にドクササコによるキノコ食中毒事件が発生した。いずれも近隣の山野で採取したキノコが原因食材であった。これらの食中毒事件では、それぞれの病因物質の同定を試みたが、アセタケのムスカリンは低分子の第 4 級アンモニウム塩であり、分析は困難を極めた。最終的に通常用いることのできる注入口熱分解ガスクロマトグラフィーで検出した。また、標準物質の入手が困難なドクササコは、外部の専門家に鑑定を依頼した。診察した医師が独自にキノコの鑑定を依頼しているという情報もあり、奈良県の地理的特徴を勘案すれば潜在的なキノコの食中毒事件は他にもあったと考えられる。

食中毒事件の残食は、キノコ採取から時間が経過しており、また調理済みであることが多く、図鑑等で鑑別できるようなキノコ本来の形態を呈していない。そのため、キノコを原因食材として疑った場合には、地方衛生研究所の通常持ちうる技術で残食のキノコを生物種として鑑定する必要がある。そこで近年充実しつつある担子菌類 DNA データベースを利用した遺伝子解析によるキノコの同定を実施することにした。本研究では、奈良県保健研究センターにおける毒キノコの同定能力を高めることを目的とする。

### 【方法】

#### 1. 試料

毒キノコは、平成 27 年 9 月から平成 28 年 9 月の期間に橿原神宮境内林、桜井市周辺の山間部、奈良公園等で入手し、関西菌類談話会の観察指導員による簡易同定を受けた。

食用キノコは市販のシイタケ、エリンギ、ブナシメジ、エノキダケ、ナメコを使用した。

#### 2. 試薬

TaKaRa Ex Taq HS (タカラバイオ株式会社製)、Ampdirect Plus (島津製作所製)、Agarose (低電気浸透、高ゲル強度、ナカライテスク製)、100bp DNA Ladder (TOYOBO 製)、GelRed (BIOTIUM 製)、Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス製)、BigDye Terminator Ver 1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems 製)、BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems 製)

PCR プライマー：White ら<sup>1)</sup>が示したプライマーセットを合成し、用いた。

その他試薬は、特級品を用いた。

#### 3. 装置

PCR 増幅装置：iCycler (BIO-RAD 製)

シーケンサー：ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 製)

ホモジナイザー：バイオマッシャー II (株式会社ニッピ製)

スペクトロフォトメーター：SmartSpec Plus (BIO-RAD 製)

電気泳動装置：Mupid-ex (株式会社ミューピッド製)

ゲル撮影装置：LED505-TR60W (株式会社美館イメージング製)

#### 4. キノコからの DNA 抽出

キノコを細切し、100 mg をバイオマッシャー II 用のチューブに採り抽出溶媒 100  $\mu$  L を加え、30 秒間ホモジナイズした。さらに抽出溶媒 100  $\mu$  L を加え 95°C で 10 分間加熱後、12,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を DNA 液とした。食用キノコを用い抽出溶媒 3 種類について、

それぞれの DNA 濃度と PCR 増幅状況を比較した。

抽出溶媒:① 1 M 塩化カリウム液及び 10 mM EDTA を含む 100 mM Tris-塩酸 Buffer (pH9.5)

② 50 mM 水酸化ナトリウム液

(95℃で 10 分間加熱後、1 M Tris-塩酸 Buffer (pH8.0)を添加し中和)

③ 水

## 5. アガロースゲル電気泳動

GelRed を含む 1.5%アガロースゲルを Tris-酢酸 EDTA Buffer (pH8.0)を用いて作製し、PCR 反応後の液(10  $\mu$ L)に×6 Gel Loading Buffer 1  $\mu$ Lを加え、その全量を well にアプライした。100 V で 25 分間電気泳動し、終了後ゲル撮影装置で増幅バンドを確認した。さらに、DNA 塩基配列解析用にゲルを切り出した。

## 6. DNA 塩基配列解析

電気泳動後、Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit を用いて、切り出したゲルから PCR 産物を精製した。次に BigDye Terminator Ver 1.1 Sequencing Kit を用いてシーケンス用 PCR を行った。さらに、BigDye XTerminator Purification Kit を用いて精製し、シーケンサーで塩基配列データを取得した。塩基配列データは、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の属及び種を確認した。

### 【結果】

#### 1. キノコからの DNA 抽出

食用キノコの 3 種類の抽出溶媒から得られた DNA 液中の DNA 濃度をスペクトロフォトメーターにより吸光度から測定した。これらは精製度の低い粗抽出液であるため、PCR 反応に影響があるかどうか、PCR 反応液 (10  $\mu$ L 反応系、図 1) への添加量を 0.1  $\mu$ L から 1.0  $\mu$ L の間で変化させ増幅の可否を確認した。プライマーセットは、キノコの rDNA 周辺の Internal transcribed spacer (ITS) I 及び ITS II を含む領域をターゲットとする ITS4 及び ITS5 を用いた。PCR 反応後はアガロースゲルによる電気泳動を行い、増幅の程度を確認した。表 1 に示したように、抽出溶媒①についてはキノコの種類を問わず増幅可能であった

が、DNA 液の量が TaKaRa Ex Taq HS の推奨 DNA 量の上限を超えると PCR 反応を抑制した。抽出溶媒②では、エノキ及びナメコで DNA 量に関係なく増幅されなかった。抽出溶媒③では、シイタケ以外のキノコでは増幅が見られなかった。

さらに、それぞれの DNA 液を水で 50 ng/ $\mu$ L に希釈し 1  $\mu$ L 添加、PCR 反応液に用いる Buffer を Ampdirect Plus に変更し、増幅を確認した。表 2 に示したように、抽出溶媒②のエノキ及びナメコも増幅が見られ、抽出溶媒③ではブナシメジ以外で増幅が可能であった。これらの結果により、抽出溶媒は①を用いることとし、PCR 反応に添加する DNA 液は 50 ng/ $\mu$ L に希釈することにした。

TaKaRa Ex Taq HS	0.05 $\mu$ L
×2 Ampdirect Plus Buffer	
(3 mM Mg <sup>2+</sup> , dNTPs 400 $\mu$ M each)	5.00 $\mu$ L
primer F (10 $\mu$ M)	0.50 $\mu$ L
primer R (10 $\mu$ M)	0.50 $\mu$ L
DW	2.95 $\mu$ L
DNA液(50 ng/ $\mu$ L)	1.00 $\mu$ L
	10.00 $\mu$ L

図1 PCR反応液の調製(10  $\mu$ L反応系)

表1 抽出溶媒によるPCR増幅の可否

キノコ	DNA濃度 (ng/ $\mu$ L)	DNA液 ( $\mu$ L)									
		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
シイタケ	196.3	++	++	++	++	+					
エリンギ	371.4	++			+						
ブナシメジ	214.6	++	++	+							
エノキ	417.6	++	++	++	++	+					
ナメコ	167.7	++									

キノコ	DNA濃度 (ng/ $\mu$ L)	DNA液 ( $\mu$ L)									
		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
シイタケ	290.1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
エリンギ	486.5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
ブナシメジ	363.2		+	+	++	++	++	+	+		
エノキ	507.8										
ナメコ	193.0										

キノコ	DNA濃度 (ng/ $\mu$ L)	DNA液 ( $\mu$ L)									
		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
シイタケ	225.7	+	+	++	++	++	++	++	+	+	
エリンギ	404.1										
ブナシメジ	281.6										
エノキ	481.1										
ナメコ	188.6										

\*網掛は、TaKaRa Ex Taq HSの推奨DNA量の上限に相当する。

表2 Ampdirect Plusを用いたPCR増幅

キノコ	抽出溶媒		
	①	②	③
シイタケ	+++	+++	+++
エリンギ	+++	+++	+
ブナシメジ	++	++	
エノキ	+++	++	++
ナメコ	++	++	+

DNA液を50 ng/ $\mu$ Lに希釈、1  $\mu$ L添加

## 2. PCR 条件

White ら<sup>1)</sup>が示したプライマーは、最近接塩基対法により  $T_m$  値を求めたところ  $58.3^\circ\text{C} \sim 68.4^\circ\text{C}$  となった。プライマーセットの組み合わせを考慮し、どの組み合わせでも増幅させられるようにアニーリング温度を  $60^\circ\text{C}$  とした。PCR 反応は、熱変性  $98^\circ\text{C}$  10 秒間、アニーリング  $60^\circ\text{C}$  30 秒間、伸長反応  $72^\circ\text{C}$  1 分間を 35 サイクルで行った。図 2 に、プライマー ITS4 及び ITS5 のセットを用い、ITS I 及び ITS II を含む領域を増幅させたキノコのゲル電気泳動図を示した。

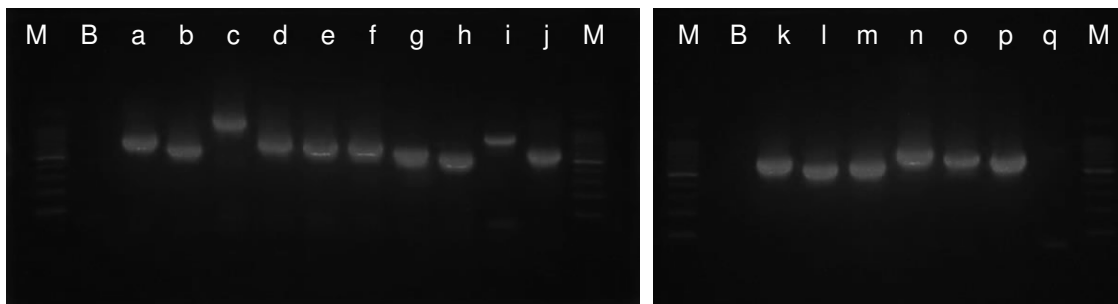


図 2 キノコの ITS 領域ゲル電気泳動図  
M:marker, B:blank, a~p:試料のキノコ, q:H23.10 採取のドクササコ

## 3. キノコの DNA 塩基配列解析

試料から得られた DNA の BLAST 検索結果を表 3 に示した。No.2 は、形態鑑別ではシロタマゴテングタケであり、図鑑の特徴からもシロタマゴテングタケと思われた。しかし、遺伝子鑑別ではミヤマタマゴタケであった。また、No.4 も明らかにシロオニタケの形態的な特徴を有していたが、相同性は 92%にとどまった。No.6、No.15 は、形態鑑別ではそれぞれコテングタケ及びフクロツルタケであった。形態鑑別と全く異なる属のキノコが検索されたものはなかった。

表3 キノコの相同性検索結果

Sample No.	学名	和名	Accession No.	相同性(%)
1	<i>Boletus aestivalis</i>	ヤマドリタケモドキ	DQ131611	92
2	<i>Amanita imazekii</i>	ミヤマタマゴタケ	AB509890	89
3	<i>Phylloporus sp. HKAS 74679</i>	イグチ科	JQ967271	86
4	<i>Amanita virgineoides</i>	シロオニタケ	AB015686	92
5	<i>Pulveroboletus ravenelii</i>	キイロイグチ	AB509565	98
6	<i>Amanita brunnescens</i>	和名なし	KT006762	93
7	<i>Ramariopsis helvola</i>	シロソウメンタケ科	KR673550	92
8	<i>Amanita similis</i>	チャタマゴタケ	AB750727	96
9	<i>Armillaria mellea</i>	ナラタケ	EU784174	95
10	<i>Hypocreaceae sp.</i>	ボタンタケ科	KJ471526	87
11	<i>Russula heterophylla</i>	ウグイスハツ	DQ422006	95
12	<i>Boletales sp.</i>	イグチの仲間	JF273554	95
13	<i>Gyroporus castaneus</i>	クリイロイグチ	GQ166901	91
14	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	オオシロカラカサタケ	KP012712	96
15	<i>Amanita clarisquamosa</i>	シロウロコツルタケ	FJ375331	86
16	<i>Polyporus tuberaster</i>	タマチョレイタケ	AB474086	96
17	<i>Lentinula edodes strain Shen4</i>	シイタケ	JQ797416	94
18	<i>Pleurotus eryngii strain FPEK-1</i>	エリンギ	JX429941	98
19	<i>Hypsizygus marmoreus voucher E141440</i>	ブナシメジ	KP765747	86
20	<i>Flammulina velutipes strain MC-FV001</i>	エノキタケ	KX058566	96
21	<i>Pholiota nameko</i>	ナメコ	LC149602	92

#### 4. 平成 23 年 10 月食中毒の原因となったドクササコ

食中毒事件後、管轄保健所及び当センターにおいて 5 年間冷凍保存されてきたドクササコを用い、遺伝子解析による同定を試みた。検体は黒く変色し、乾燥気味であった。約 50 mg を採り、抽出溶媒①100  $\mu$ L を加えたがホモジナイズできなかったため、さらに 500  $\mu$ L 追加した。この DNA 液を 50 ng/ $\mu$ L に希釈して ITS I 及び ITS II を含む領域の PCR を行ったところ、増幅は見られなかった (図 2)。そこで ITS I 領域をターゲットとするプライマーセット ITS2 と ITS5、ITS II 領域をターゲットとするプライマーセット ITS3 と ITS4 でそれぞれ PCR 反応を行ったところ、増幅が確認できた。この PCR 産物をゲルとともに切り出して精製し、DNA 塩基配列解析を行った。ITS I 領域及び ITS II 領域はいずれも Accession number AB301606 にそれぞれ 94%及び 93%の相同性を示した。図 3 に塩基配列の比較を示した。

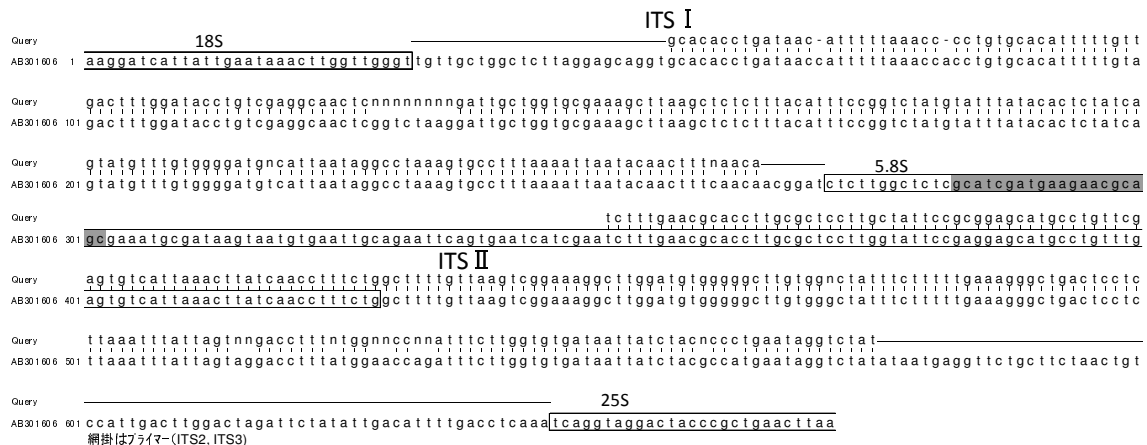


図3 平成23年10月から保存されてきたドクササコのAB301606との塩基配列比較

#### 【考察】

細胞から遺伝子を取り出すために組織細胞を破壊する方法として、凍結・融解を繰り返す方法、界面活性剤を用いて細胞の膜タンパクを融解する方法等がある。近年、膜タンパクを融解する方法と精製用の固相をセットにし、試薬メーカー各社から血液、臨床検体、培養菌株、動物細胞、植物細胞などそれぞれ生物試料に適した種々のキットが販売されている。これらを使用すれば精製度の高い DNA 液を得ることができるが、操作に時間がかかり使用期限もある。本研究では、食中毒事件において迅速に結果を提出することを目的としており、当センターに常備されている試薬類を用い、ホモジナイザーでキノコ組織を磨砕し 30 分以内に DNA 液を得る 3 種類の抽出溶媒について食用キノコを用い、比較検討した。食用キノコは、質の柔らかいもの、固いもの、粘液質を多く含むものをそろえた。

抽出溶媒①では、PCR Template として添加量を少量にすれば、いずれの食用キノコにも適用可能であった。抽出溶媒②では、エノキダケやナメコのような粘液質を多く含むキノコで増幅が不可能であった。抽出溶媒③は、最も簡便であるが増幅効率は良くなかった。これらの抽出溶媒を用いた加熱抽出は精製工程がないため、PCR 反応を阻害する物質も同時に存在していると考えられる。そこで、種々の臨床検体から直接 PCR 反応が可能である Ampdirect Plus を PCR Buffer に用いた。その結果、いずれの抽出溶媒でも増幅の効率が上がった。抽出溶媒①は EDTA を含み、加熱抽出工程においてもキノコ遺伝子の断片化を防止する効果が期待され、すべてのキノコで良好な結果が得られたため、抽出には①を用いることにした。

相同性が 97%以上の場合に形態学的な鑑定と一致するとの昌山ら<sup>2)</sup>の報告によれば、今回検査に供した試料の遺伝子検索結果は、あまり良くないと言える。また、塩基配列の解析時には塩基の重なりが観察された試料もあり、これはキノコの異核共存体であったかもしくは他の糸状菌の付着が考えられた。しかし、遺伝子解析技術を用いて毒キノコの可能性の高い Amanita 属 (テングタケ属) であるかどうかを判断できることは、専門家不在の地方衛生研究所においては非常

に有用である。試料 16 種類は道路脇の植栽や神社参道で採取したものであり、そのうちの 5 種類がテングタケ属であった。住民の身近に毒キノコが存在していることが明らかとなり、これらの結果は住民への啓発に用いたいと考えている。

遺伝子検査を実施したドクササコは、平成 23 年 10 月から保健所と当センターの施設の移転という試料保管に関しては悪条件の事態を経て冷凍保存されてきたものである。保健所への搬入当時からすでに黒く変色していたとのことであるが、遺伝子の断片化が認められるものの同定可能であったことは驚きに値する。食中毒事件の残食等は、どのような手法を用いるとしても鑑別に適した試料であるとは言い難い。遺伝子を用いた鑑別では、ITS I と ITS II 領域を含む概ね 1 kbp 未満の塩基配列をデータベースと相同性解析を行う。より大きなサイズの領域で相同性検索を実施する方が信頼性の高い結果が得られるが、ドクササコ冷凍保存検体の結果からは、ITS I 領域と ITS II 領域を分けて解析することも有効な手段であることがわかった。

ITS 領域の塩基配列の解析には、通常のアガロースゲル電気泳動の後、概ね 8 時間以上を要する。増幅フラグメントサイズで簡易同定できれば、より迅速な対応が可能となる。そこで、データベースとして蓄積されつつある生物の遺伝子情報を用い、数種類のプライマーを設計・合成し種特異的部位の PCR 増幅を試みた。結果として示さないが、いくつかの候補が得られ、今後改良を重ねていく予定である。さらに ITS 領域の塩基配列を解析する以外にも、複数の領域解析を組み合わせることで、より信頼性の高い同定方法としたい。

#### 【まとめ】

1. キノコからの遺伝子抽出溶媒に 1 M 塩化カリウム液及び 10 mM EDTA を含む 100 mM Tris-塩酸 Buffer (pH9.5)を用いた時、キノコの種類を問わず最も適した結果が得られた。
2. Ampdirect Plus を PCR 反応液に用いる Buffer として使用したところ、キノコの粗抽出液でも良好な遺伝子増幅が得られた。
3. ITS 領域を用いた相同性検索は、食中毒事件における鑑別の有用な手段となり得ることがわかり、当センターにおいても専門家の形態鑑別に替わる手法を取り入れることができた。

#### 【参考文献】

- 1) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds), PCR protocols. Pp.315-322. Academic Press, New York.
- 2) 昌山敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀雅美, 山野哲夫, 清水充: 食衛誌, 53, 237-242 (2012)

#### 【謝辞】

本研究に研究助成していただきました公益財団法人 大同生命厚生事業団に深謝いたします。また、本研究にあたり、多大なるご指導及び試料の採取にご協力をいただきました宗教法人大神神社 荒井滋先生をはじめ関西菌類談話会の先生に厚く御礼申し上げます。

#### 【経費使途明細】

使途	金額
Ampdirect Plus (島津製作所)	23,760 円
ゲル撮影用デジタルカメラ (オリンパス)	75,060 円
Ex Taq HS (タカラ)	78,537 円
FastGene Gel/PCR Extraction	11,016 円
ブロックヒーター (フナコシ)	73,440 円
NBRC 菌株分譲手数料及び振込手数料	17,928 円
GelRed	17,496 円
その他ラテックスグローブ等消耗品	2,763 円
合計	300,000 円