

塩基配列決定法による種推定の検討

高嶋 康晴

Yasuharu Takashima

要 約

食品として流通する主なきのこ類 17 種について核 DNA の特定遺伝子領域（18S rRNA, ITS1, 5.8SrRNA, ITS2 及び 28S rRNA の各遺伝子領域を含む）を増幅するプライマーを用いた塩基配列決定法による当該遺伝子領域の塩基配列の決定の可否を検討した。検討した 17 種すべての種について 5 試料中 3 試料以上について PCR 産物が検出可能であった。検出された PCR 産物を用い塩基配列の決定を行ったところ、17 種中 12 種については、全ての PCR 産物について塩基配列の決定が可能であったが、エノキダケ及びマイタケの一部試料とハタケシメジ、ナメコ及びヤマドリダケモドキの全 PCR 産物について部分的な配列の決定にとどまった。解析可能な領域を比較すると、同属内で、98.0 %以上の配列相同性を有する種が存在したため、種を推定することは困難であると考えられた。他属間での、配列相同性は 80 %以下であり、属レベルでの推定は可能であると考えられた。これにより、販売時に記載されている「名称」及び「原材料名」の真正性を確認することが可能であると考えられた。

1. はじめに

きのこ類とは、菌類のうち大型の子実体を形成するグループを指す俗称であるが、子実体を可食部とする菌類の一般的な名称として広く使用されているため本報告においても「きのこ類」の用語を用いる。きのこ類のうち生鮮食品として販売されるものについては、生鮮食品品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 514 号）に基づき「名称」の記載が義務付けられている。また乾燥等の加工を加えたきのこ類についても加工食品品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 513 号）に基づき「原材料名」の記載が義務付けられている。きのこ類の中には形態的に判別するのが困難な種が存在し、さらに、切断等の加工で、より判別が困難となるため、その表示の真正性を検証する科学的な分析法の開発が求められてきた。近年、魚介類^{1,2)}、鳥類³⁾、植物⁴⁾等で特定の遺伝子領域の塩基配列を比較することで種の推定を行う研究が広く行われ、フグやカワハギの種の判別等に用いる事例も報告されている⁵⁾。菌類でも特定の領域を用いた解析が広く進められているところである^{6,7)}。本研究では、菌類の特定遺伝子領域を増幅するプライマーを用い、市販される主なきのこ類 17 種について PCR 増幅及び塩基配列の解析の可否を確認し、更に、明らかにした塩基配列の相同性から種の推定を行い、当該分析法による食品表示の監視業務への活用の可否を検討した。

2. 実験方法

きのこ類の種推定法については、生鮮又は乾燥きのこの試料から DNA を抽出し、その DNA を鋳型として、核 DNA の特定遺伝子領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物の有無を確認した。また、PCR 産物が得られた試料については、PCR 産物を鋳型として、ダイレクトシーケンス法により PCR 産物中の塩基配列を決定できるかどうかを確認した。更に、決定した塩基配列を DNA データベース上のデータと比較を行った。

2. 1 試料

生鮮きのこ及び乾燥きのことして販売されているきのこ類17種について各5個体以上を入手し、品名を参考に形態的特徴から種を判断できるものを試料として用いた (表1)。キクラゲ、アラケキクラゲ及びヤマドリダケモドキについては、形態的に種を同定することはできなかったため、入手時は「キクラゲ」及び「ポルチーニ茸 (ヤマドリダケを含む *Boletus* 属の一般名)」として販売されている試料を使用した。

表1. 試料に用いたきのこ類

科	属	和名	学名	試料状態	試料数(N)
キシメジ科	シメジ属	ホンシメジ	<i>Lyophyllum shimeji</i>	生鮮	5
		ハタケシメジ	<i>Lyophyllum decastes</i>	生鮮	5
	シロタモギダケ属	ブナシメジ	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	生鮮	5
	マツタケ属	マツタケ	<i>Tricholoma matsutake</i>	生鮮	5
	エノキダケ属	エノキダケ	<i>Flammulina velutipes</i>	生鮮	5
ヒラタケ科	ヒラタケ属	ヒラタケ	<i>Pleurotus ostreatus</i>	生鮮	5
		エリンギ	<i>Pleurotus eryngii</i>	生鮮	5
		タモギダケ	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	生鮮	5
	マツオウジ属	シイタケ	<i>Lentinula edodes</i>	乾燥	5
モエギタケ科	スギタケ属	ナメコ	<i>Pholiota nameko</i>	生鮮	5
キクラゲ科	キクラゲ属	キクラゲ	<i>Auricularia auricula</i>	乾燥	5
		アラケキクラゲ	<i>Auricularia polytricha</i>	乾燥	5
ハラタケ科	ハラタケ属	ツクリタケ	<i>Agaricus bisporus</i>	生鮮	5
イグチ科	ヤマドリタケ属	ヤマドリダケモドキ	<i>Boletus reticulatus</i>	乾燥	5
サンゴハリタケ科	サンゴハリタケ属	ヤマブシダケ	<i>Hericium erinaceum</i>	生鮮	5
ハナピラタケ科	ハナピラタケ属	ハナピラダケ	<i>Sparassis crispa</i>	生鮮	5
トンビマイタケ科	マイタケ属	マイタケ	<i>Grifola frondosa</i>	生鮮	5

2. 2 DNA 抽出

DNA 抽出はマツタケについては、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) 及び Maxwell® 16 DNA Purification Kits (プロメガ) を用いその他の試料については Maxwell® 16 DNA Purification Kits により抽出を行った。

DNeasy Plant Mini Kit を用いる場合は、試料 10 mg ~ 25 mg を採取し、400 µL の Buffer AP1 (キット添付試薬) 及び 4.0 µL の RNase A (キット添付試薬) を加え、65 °C で 10 分間保温後に、130 µL の Buffer AP2 (キット添付試薬) を添加し、混和後、氷上に 5 分以上静置した。室温、20,000 ×g で 5 分間遠心し、その上澄み液を付属カラム QIAshredder Mini spin column (キット添付) に負荷後、室温、20,000 ×g で 2 分間遠心した。ろ過され

た液に対して 1.5 倍量の Buffer AP3/E を添加し、混和後に DNeasy Mini spin column (キット添付) に負荷し、室温、6,000 ×g で 1 分間遠心した。DNeasy Mini spin column の洗浄のために、500 μL の Buffer AW を負荷し、室温、6,000 ×g で 1 分間遠心し、さらに、500 μL の Buffer AW を負荷し、室温、20,000 ×g で 2 分間遠心した。DNA 溶出には、100 μL の Buffer AE (キット添付試薬) を負荷し、室温で 1 分間静置後、室温、6,000 ×g で 1 分間遠心し、もう 1 度 Buffer AE を 200 μL 加え、1 回目の溶出液と合わせて遠心操作を行い、溶出液を DNA 溶液とした。

Maxwell® 16 DNA Purification Kits を用いる場合は、生鮮試料で 25 mg ~ 50 mg 及び乾燥試料で 10 mg ~ 25 mg を採取し、キットに供した。抽出操作は核酸・タンパク質自動精製システム Maxwell® 16 (プロメガ) を用い装置の動物・植物組織用のプログラムにより DNA 抽出を行った。

2. 3 PCR

PCR 反応液の組成は、0.5 Units の DNA ポリメラーゼ TaKaRa Ex Taq®(タカラバイオ社)、1×Ex Taq® Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) (Ex Taq® 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture(Ex Taq® 添付試薬)、0.25 μmol/L プライマーセットを含む反応液系に 1.0 μL の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。プライマーセットには、5' プライマーとして ITS1F : CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 及び 3' プライマーとして ITS4:TCCTCCGCTTATTGAT ATGC を用いた (図 1)。PCR の温度サイクルは、最初の熱変性として 95 °C で 1 分、次に(1) 熱変性として 95 °C で 30 秒、(2) アニーリングとして 55 °C で 15 秒、(3) 伸長反応として 72 °C で 30 秒の(1)~(3)を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 7 分反応させた。PCR 反応は、サーマルサイクラー PTC 220(Bio-Rad 社)を用いて行った。

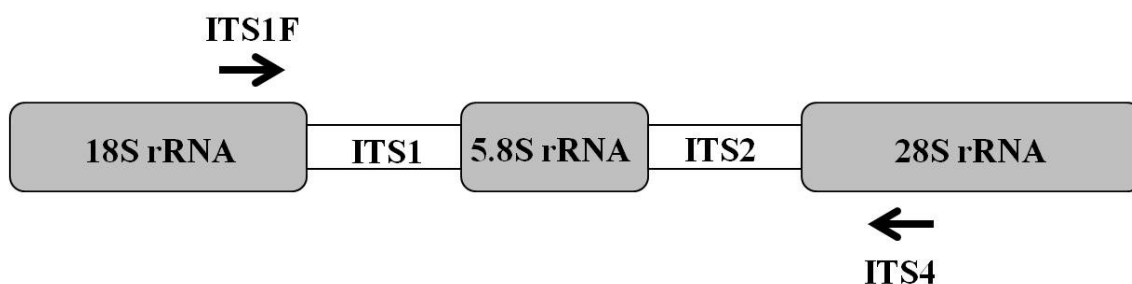


図1 解析領域の模式図

2. 4 電気泳動

電気泳動は Agarose LE(和光純薬)を用い、PCR 産物の有無の確認を行った。ゲルの濃度は 1.5 ~ 3.0 %(w/v)とし、エチジウムブロミド(和光純薬)をゲル 100 mL 当たり 2 μL 使用し、電気泳動緩衝液は TAE 緩衝液を用いた。分子量マーカーとして 100 bp ラダー(プロメガ社)を使用した。電気泳動装置は、MupidexU(アドバンス)を使用した。電気泳動結果は電気泳動撮影装置 AE-6931FXCF(アトー)を用いて画像データで記録した。なお、TAE 緩衝液は、8 mmol/L Tris-HCl, 8 mmol/L 酢酸, 0.2 mmol/L EDTA で調製したものをを用いた。

2. 5 シーケンス法

「2. 4 電気泳動」において PCR 増幅が検出された試料は DNA の塩基配列を決定するため、PCR 産物の精製、ラベリング反応、余分な蛍光色素の除去を行った後に自動 DNA シーケンサにより PCR 産物の塩基配列の決定を行った。

PCR 産物精製には、ExoSAP-IT (GE ヘルスケアバイオサイエンス)、ラベリング反応には、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)、過剰な蛍光色素の除去には、AutoSeq[™] G-50 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) による精製後、自動 DNA シーケンサ Applied Biosystems 3130xl (Life Technologies) を用いて得られた PCR 産物の塩基配列を決定した。

2. 5. 1 PCR 産物の精製

PCR 産物の精製には、ExoSAP-IT[®] (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いた。反応液の組成は、2.0 μL の ExoSAP-IT[®] を 3.0 μL の滅菌水で希釈した後に、PCR 反応原液 5.0 μL を加えた。反応温度は、サーマルサイクラー PTC 220[™] (Bio-Rad) を用い 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間酵素処理した後 85 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加熱して酵素を不活性化させた。

2. 5. 2 ラベリング反応

ラベリング反応は、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いた。反応液の組成は、2.0 μL の Terminator Ready Reaction Mix (キット添付試薬)、3.0 μL の BigDye[®] Sequencing Buffer (5x) (キット添付試薬)、0.6 μL プライマー (5 μM)、2.0 μL の ExoSAP-IT 処理液を滅菌水で全量を 20 μL とした。反応温度は、サーマルサイクラー PTC 220 (Bio-Rad 社) を用い、最初の熱変性として 96 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分、次に(1) 96 $^{\circ}\text{C}$ で 20 秒、(2) 55 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒、(3) 60 $^{\circ}\text{C}$ で 4 分の(1)~(3)を 1 サイクルとして 25 サイクルで反応させた。

2. 5. 3 余分な蛍光色素の除去

余分な蛍光色素の除去には AutoSeq[™] G-50 を用いた。AutoSeq[™] G-50 カラム (キット添付品) に 10 μL の 100 μM EDTA 加えたのちに、室温、2,000 $\times\text{g}$ で 1 分間遠心した。反応後、「2. 5. 2 ラベリング反応」におけるラベリング反応液全量をカラムに負荷し、室温、2,000 $\times\text{g}$ で 1 分間遠心した。

2. 5. 4 PCR 産物の塩基配列決定

塩基配列の決定には DNA シーケンサ Applied Biosystems 3130xl (Life Technologies) を用いた。DNA データベース上のデータとの比較には、オンライン上の検索ツール nucleotide Blast (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/Welcome-j.html>) を使用し、配列の並び替えにはフリーソフト BioEdit[®] を使用した。

3. 結果及び考察

プライマーを含めて各種 5 試料ともに PCR 産物が検出されたのは、17 種中 11 種 (表 2) であり、検出できなかった試料がある 6 種においても 5 試料中 3 試料以上は PCR 産

物が検出されており、今後、反応条件を再検討することで、分析の再現性は向上されるものと考えられた。シーケンス反応を行った試料のうち、ハタケシメジ、ナメコ、ヤマドリダケモドキについては解析した全試料、エノキダケ、マイタケのうち各1試料では、同一子実体内に複数の塩基配列が存在するため複数の蛍光色素を検出し、目的領域の全塩基配列を決定することができなかった。配列決定が可能だった試料について、データベース上の該当種との比較を行ったところ、各試料の塩基配列の相同性は98.0%～100%であった。

種を判別する基準については、フグの判別⁴⁾や鳥類に関する研究⁸⁾で報告されているが、きのこの類の判別基準の設定については、当該解析領域の進化速度に関するデータやきのこ類各種の同種内の多様性に関するデータ等を考慮した更なる検討が必要となる。

表2 各試料のPCR産物検出の可否と解析塩基配列のDNAデータベースとの相同性

属名	和名	PCR産物の検出		DNAデータベース Accession No.	塩基配列相同性 (%)
		検出件数	PCR産物の塩基長(bp)		
シメジ属	ホンシメジ	5/5	687	AB301604	98.0
	ハタケシメジ	5/5	-	FJ810160	-
シロタモギダケ属	ブナシメジ	3/5	721	JX046026	99.7～100*
マツタケ属	マツタケ	5/5	693	AB368502	99.5～99.7
エノキダケ属	エノキダケ	4/5	805	JN234854	99.6～100
ヒラタケ属	ヒラタケ	5/5	684	HM561974	98.0～98.6
	エリンギ	5/5	684	HQ286596	100
	タモギダケ	3/5	669	AY265852	99.0
マツオウジ属	シイタケ	5/5	786	AB366150	98.7*
スギタケ属	ナメコ	3/5	-	AB286990	-
キクラゲ属	キクラゲ	5/5	636	HQ388388	99.5～100
	アラケキクラゲ	5/5	609	FJ617292	99.1
ハラタケ属	ツクリタケ	5/5	742	JN222415	100
ヤマドリタケ属	ヤマドリダケモドキ	3/5	-	EU554661	-
サンゴハリタケ属	ヤマブシダケ	5/5	667	FJ810169	99.0
ハナピラタケ属	ハナピラダケ	5/5	680	HQ604825	98.1
マイタケ属	マイタケ	3/5	660	JX009181	100*

*塩基配列の相同性を確認したDNAデータベース上の塩基配列が部分配列のもの

当該領域の遺伝子型を複数持つ可能性のある種については、各種解析可能な2領域（領域1：18S rRNA～ITS1の一部領域、領域2：ITS2～28S rRNAの一部領域）について比較した結果を表3に示した。両領域では、エリンギ、ヒラタケ及びタモギダケのヒラタケ属内で配列相同性が最も高く、98.6%以上の配列相同性が見られた。このため、同属内では、種の推定が困難な事例もあることが明らかとなった。一方、ヒラタケ属とその他きのこ類との配列相同性の比較では、両領域とも80%以上の相同性を持つ事例が見られないことから属レベルの推定は可能であると推測された。きのこ類は分類上の多様性が高いことから、当該分析法ではきのこ類を初期スクリーニング分析法として十分に真正性を検証する分析法として使用可能であると思われる。

表3 ヒラタケと近縁7種間の欠損・挿入塩基数、相異塩基数及び配列相同性

属名	種名	欠損・挿入塩基数	異なる塩基数	相同性(%)
ヒラタケ属	ヒラタケ	0	0	100
		0	0	100
	タモギダケ	0	0	100
		0	0	100
	エリンギ	0	0	100
		0	3	98.6
シメジ属	ホンシメジ	5	32	71.9
		20	51	75.8
	ハタケシメジ	4	30	73.7
		18	59	72.3
シロタモギダケ属	ブナシメジ	5	25	78.1
		19	48	77
マツオウジ属	シイタケ	9	31	72.1
		10	91	60.9
マツタケ属	マツタケ	7	30	72.3
		11	55	74.1

上段：領域1（18S rRNA～ITS1の一部領域：112塩基）、

下段：領域2（ITS2～28S rRNAの一部領域：214塩基）

その他9種は配列の欠損・挿入塩基が多く配列相同性を困難なため省略した。

4. まとめ

食品として流通する主なきのこ類17種各5試料について核DNAの特定遺伝子領域を増幅するプライマーを用い、塩基配列決定法による当該遺伝子領域の塩基配列の確認を行ったところ、全17種で5試料中3試料以上のPCR産物が検出された。検出されたPCR産物から12種では全てのPCR産物で全塩基配列の決定が可能であり、決定した各試料の塩基配列とDNAデータベース上の各種のきのこ類との塩基配列を比較したところ、98.0%以上の配列相同性を有しており、他種間では95.0%以上の配列相同性を有するデータが見られなかったことからおおむね種の推定が可能であると考えられた。残りのエノキダケ及びマイタケの一部とハタケシメジ、ナメコ及びヤマドリダケモドキの全PCR産物では複数の塩基配列を重ねて検出することから当該領域の全塩基配列の決定はできなかった。決定可能な領域の塩基配列の比較からは、同属内の種を推定することは困難であるが、属レベルの推定は可能であると考えられた。このため、販売時に記載されている「名称」（及び）「原材料名」の真正性を確認することが可能であると考えられた。

5. 文 献

- 1) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, and Vrijenhoek R: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1994, 3(5):294-299.
- 2) Miya M, Nishida M: Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogent. Evol.* 200017:437-455.
- 3) Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2(10) e312.
- 4) Sang T, Crawford D, Stuessy T: Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia*(Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 1997, 84:1120–1136.
- 5) 「魚類乾燥品等のフグ混入検査について（平成 20 年 4 月 25 日食安輸発第 0425005 号）」
- 6) Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kausrud H: ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 2010, 10:189.
- 7) Conrad L. Schoch, Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, and Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *PNAS* 2012, 109 (16):6241-6246.
- 8) Hall TA.. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser*, 1998, 41: 95–98.