

ツキヨタケのDNA鑑別法の開発

福岡市保健環境研究所 鶴田 小百合

はじめに

キノコは秋の味覚の代表であり、近年のアウトドア志向を背景に全国でキノコ狩りが盛んにおこなわれています。昔はキノコを採って食べるという習慣があまりなかった九州でも、キノコ狩りを楽しむ人が増えてきました。その反面、毎年キノコ狩りの季節になると、全国でキノコによる食中毒事件が発生しています。図1に示すとおり、中毒を起こす原因毒キノコの種類別発生割合（1996～2005年）はツキヨタケが最も多く（31.6%）、次にクサウラベニタケ（20.2%）、カキシメジ（10.2%）と続きます。これらの毒キノコによる食中毒は、毒キノコを食用キノコと誤って食べた場合がほとんどです。例えばツキヨタケは、未熟な知識ではシイタケ、ムキタケ、ヒラタケなどの類似する食用キノコと誤認されやすく、食中毒発生件数が非常に多い原因となっています。

ツキヨタケによる食中毒について

ツキヨタケ（学名 *Omphalotus guepiniformis*）はキシメジ科のキノコで、ブナやナラ等の倒木や朽木などに発生します。摂食後約30分から3時間程度で嘔吐、下痢、腹痛などの胃腸症状を呈し、主な毒性分はイルージンSとされています。毒キノコによる毒

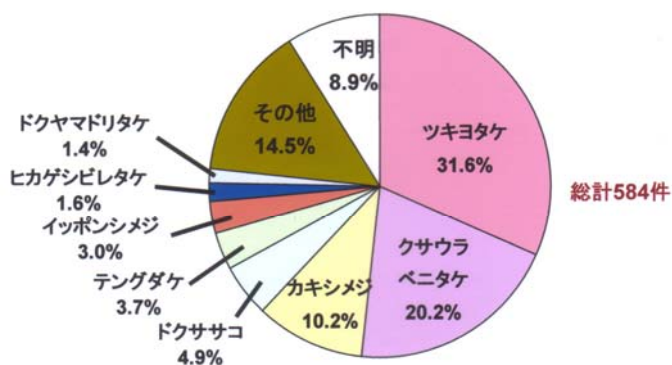


図1 毒キノコの種類別中毒発生状況（1996年から2005年）
食品衛生学雑誌, 第50巻第5号 p. J-303より抜粋

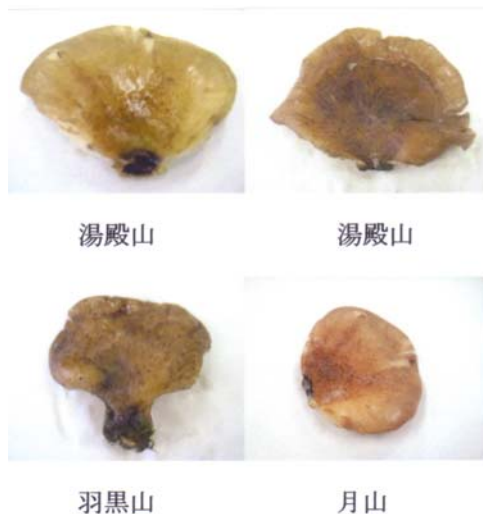


図2 山形県内の山々から採集されたツキヨタケ
（試料提供：山形県衛生研究所の笠原義正先生）

①粉砕した試料
から DNA を抽出



②抽出した DNA と
プライマー等の試薬を混合



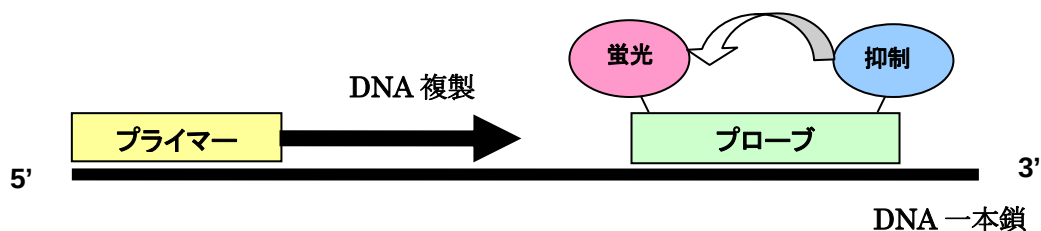
③リアルタイム PCR
を実施



図3 開発したツキヨタケの DNA 鑑定法のフロー図

- ・ 目的の DNA のみに結合するプライマーとプローブを設計する
- ・ プローブは蛍光を発するものと抑制するものを標識する

- ① 95℃で DNA の二本鎖を一本鎖に変性する
- ② 温度を降下させてプローブとプライマーを DNA に結合させる
- ③ プライマーの部位に DNA 合成酵素が結合して、DNA が複製されていく



- ④ プローブが分解されて、蛍光が検出できる
- ⑤ この蛍光強度を検出することにより増幅された DNA 量を測定することができる

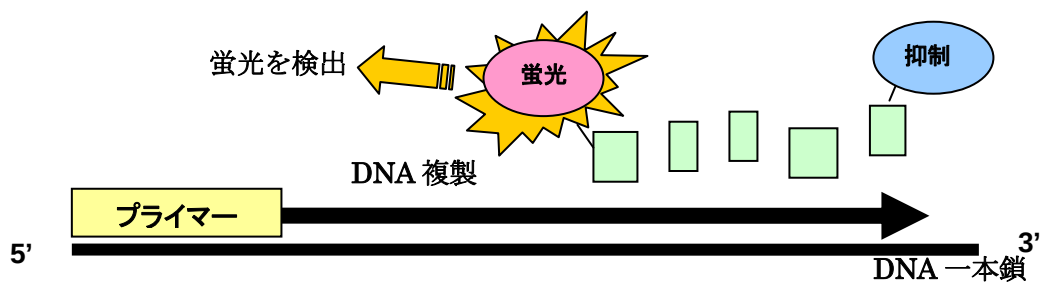


図4 リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) の原理

の原因食品を同定する方法については、一般的には臨床症状から原因を推定し、調理残のキノコについて形状を目視的に鑑定、または孢子の顕微鏡観察を行います。しかし、調理後のキノコは形状を目視的に鑑定することは困難な場合もあるため、理化学的鑑別法やDNA鑑別法の活用も望まれています。ツキヨタケについては、理化学的鑑別法として毒成分であるイルージンSをLC-MS/MS¹で分析する方法が報告されていますが、イルージンSの標準品は市販されておらず、入手が困難です。そこで、調理したキノコでもツキヨタケを簡単に同定できる方法として、DNA鑑別法による検査法の開発を検討しました。

ツキヨタケのDNA鑑別法の開発

ツキヨタケを同定するDNA鑑別法として、リアルタイムPCR²法を用いました（開発したDNA鑑定法のフロー図は図3）。リアルタイムPCR法は蛍光によりDNAの増幅をリアルタイムに検出することができ、従来のPCR法と比較して高感度、特異的で、より短時間に測定できます（リアルタイムPCRの原理は図4）。ツキヨタケを検出するリアルタイムPCR法を開発するため、種間で変異の多い18S-5.8S rDNA ITS-1領域においてプライマーとプローブという試薬をツキヨタケのDNAにのみ結合するように設計しました。これらのプライマーとプローブを使用してリアルタイムPCRを行った場合、ツキヨタケのDNAにはプライマーとプローブが結合してDNAが増幅されますが、ツキヨタケ以外のDNAには結合せずDNAが増幅されません。そのため、種が不明のサンプルであっても、DNAを抽出しリアルタイムPCRを用いて検査を行えば、DNAの増幅の有無によってツキヨタケであるかを判定することができます。

また、焼く、煮る等の調理したツキヨタケであっても、本法によりDNAが増幅されることを確認しています。この開発したDNA鑑別法が食中毒の原因食品をツキヨタケと同定す

るための一つの方法となればと考えています。今後の予定としては、会員の皆様方からクサウラベニタケ、カキシメジ、ドクササコなどの毒キノコとそれらと類似する食用キノコを提供して頂きましたので、今後はこれらの毒キノコについても研究を進めていきたいと思っています。クサウラベニタケ、カキシメジ、ドクササコなどの毒キノコとそれらと類似する食用キノコ（ウラベニホテイシメジ、チャナメツムタケ、カヤタケ等）は、研究のためにこれからも産地が異なるものを多く集めたいと思っておりますので、皆様からご協力を頂ければ幸いです。

1 LC-MS/MS : Liquid Chromatography / Mass

Spectrometry 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置

LC/MS/MSは高速液体クロマトグラフ（HPLC）と質量分析計（MS）を結合させた装置です。LC部で成分を分離した後、MS部の1段目のMSで分離した試料成分をイオン化し、質量ごとにわけます。さらに分離されたイオンを衝突室で衝突させて解離させ、そのイオンを2段目のMSで分析します。これらのイオンの質量を手がかりに分子量や分子構造の情報を得ることができます。

2 PCR : Polymerase Chain Reaction ポリメラーゼ連鎖反応

PCRはプライマーとよばれる短い一本鎖DNAとDNAポリメラーゼ（DNA合成酵素）をDNAと反応させて、目的のDNA領域を大量に増幅させる技術です。3つのステップである、①DNAの熱変性による2本鎖から1本鎖への解離、②一本鎖DNAへのプライマーの結合、③DNAポリメラーゼによるDNA鎖の合成、の3過程を30～40回繰り返すことで、目的のDNAを指数関数的に増幅させます。