

北朝鮮及びその周辺国のまつたけ (*Tricholoma matsutake*) の 遺伝的多型に関する調査

竹元 賢治*, 渡邊 裕之*, 三枝 朋樹*

Investigation of Genetic Polymorphism of Matsutake (*Tricholoma matsutake*) of North Korea and Its Neighboring Countries

Kenji TAKEMOTO*, Hiroyuki WATANABE* and Tomoki SAEGUSA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

For imported matsutake (*Tricholoma matsutake*), analyzing its genetic polymorphism is an effective way to determine which of North Korea and its neighboring nations is its country of origin. We amplified chromosomal regions sandwiched between long terminal reiterated sequences (σ_{marY1}) of retrotransposons found abundantly in matsutake DNAs, and examined the genetic polymorphism of matsutake of North Korea and its neighboring countries on the basis of differences in number and length of fragments. As a result, it was confirmed that in a genealogical tree, matsutake tended to form one cluster for each area of production. This procedure could be used to distinguish the country of origin after collecting a large number of matsutake of known origin to substantiate the genealogical tree and conducting verification tests.

1. 緒 言

2. 実 験

2006 年 10 月、北朝鮮が地下核実験を強行したことを受けて政府は、制裁措置の一つとして北朝鮮からの全貨物の輸入を禁止する措置をとった。これを受けて、税関では、第三国を経由した北朝鮮産品の迂回輸入がなされることのないよう、北朝鮮周辺国から輸入される貨物等に係る原産地の確認など、厳正な審査・検査を実施することとしている。

まつたけは、北朝鮮からの輸入品の中で、金額的に大きな割合を占めており、輸入されるまつたけの原産地を科学的に識別できれば、より厳正な審査・検査が可能になると考えられる。

まつたけの識別については、まつたけの染色体上に多数存在するレトロトランスポゾンを用いた個体識別法が村田らによって報告されており、まつたけの個体識別が可能であり、更には産地判別も可能ではないかと示唆されている¹⁾。

本研究では、まず村田らが開発した個体識別法に従い、アガロースゲル電気泳動を行うことで、北朝鮮及びその周辺国のまつたけの産地判別を試みた。しかしながら、アガロースゲル電気泳動では、得られた DNA 断片の相同性を確認することが困難であることから、DNA シークエンサーによるフラグメント解析を行い、得られた結果について分子系統解析を行い、系統樹を作成した。その結果、産地ごとに集団を形成する傾向があったので、報告する。

2. 1 試料

産地の判明しているまつたけ (17 検体)

日本・茨城産 2 検体 (JP01,02)、北朝鮮産 1 検体 (NK06)、
中国産 2 検体 (CN02,03)、ブータン産 1 検体 (BH01)

(以上、(独) 森林総合研究所提供)

韓国産 5 検体 (KR01~05)、北朝鮮産 5 検体 (NK01~05)、
中国・雲南省産 1 検体 (CN01)

(以上、税関見本採取品及び輸入者から直接購入したもの)
市中で購入したまつたけ (7 検体)

北朝鮮産と称するもの 3 検体

(大田区内の市場 1 検体 (reNK01)、柏市内のスーパー2
検体 (reNK02,03))

中国産と称するもの 4 検体

(台東区内の小売店 3 検体 (reCN01~03)、松戸市内の
スーパー1 検体 (reCN04))

試料は、いずれも傘の開いていないものを 1 検体につき 1 本使用した。

2. 2 分析装置及びプライマー

PCR 増幅装置 : Gene Amp[®] PCR system9700 (Applied Biosystems)

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

社製)

DNA シークエンサー: 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製)

プライマー-pS48 (-)

GAGGTGGGGAAAAATATGGGACGAAC¹⁾

プライマー-pL281 (+)

CTTCACATATACTGGGCATCAGCAAGGG¹⁾

2. 3 実験

各検体について、傘の内側にあるヒダ状の部分 2mm×2mm×4mm 程度採取した。CTAB 法により DNA 抽出を行い、レトロトランスポゾン末端反復配列である σ_{marY1} (308bp) に挟まれた領域をプライマー-pS48 及び pL281 を用いて、PCR 法で増幅した。PCR 反応溶液は、鋳型 DNA: 約 30ng、プライマー: 各 5 μ M、dNTP mixture: 250 μ M、Taq polymerase (Gene Taq NT、ニッポンジーン (株)): 0.5U、添付の Universal buffer、滅菌水 (合計 15 μ l に調製) とした。PCR 反応条件は、以下のとおり。1×94°C/2min、25×(94°C/30sec、62°C/30sec、72°C/5min)、1×72°C/10min。増幅した DNA 断片について、アガロース電気泳動によりフラグメントパターンを解析することにより、まつたけの個体ごとに違いがあるか否かを確認した。

また、5' 末端を 6-FAM で蛍光標識したプライマーを用いて同領域を PCR 法で増幅したものを、GeneScan 1200LIZ Size Standard を使用して、DNA シークエンサーにより、フラグメント解析を行った。次に、各検体のフラグメント解析結果を基に、データ解析を行い、産地判別を試みた。データ解析法は以下のとおりである。まず、各検体について 100~1000bp の間を 1.2bp 毎に区切り、合計 215 種類のフラグメントを検出した。次に、各検体についてフラグメントの有無を行列化した。そして、産地の判明している 17 検体のデータを基に、近隣結合法により無根系統樹を作成した。更に、市中で購入したまつたけのフラグメント解析結果を加えた系統樹を作成し、産地判別が可能か否かを検討した。系統解析については、Clustal W (Thompson et al. 1994) を用いて行った。

3. 結果及び考察

3. 1 電気泳動法によるフラグメント解析

各検体の PCR 産物について、アガロースゲル電気泳動を行った結果を Fig.1 に示す。24 検体のまつたけについて全く同じフラグメントパターンを示すものは存在せず、まつたけの個体識別が可能であった。特に中国及びブータンの検体 (CN01~03、BH01) は、他とは大きく異なるフラグメントパターンを示し、約 220bp~550bp の範囲において、フラグメントが検出されないという特徴があった。また、中国及びブータンの検体 (CN01~03、BH01) と市中で購入した中国産と称する検体 (reCN01~04) を比較すると、reCN01~04 においては、約 220bp~550bp の範囲にかけても、複数のフラグメントが検出された。従って、これら市中で購入した検体のうち、中国産と称するものが、中国産ではない可能性が示唆された。しかしながら、アガロースゲル電気泳動では、バン

ドパターンが複雑であり、得られた DNA 断片の相同性を確認することが困難であったので、DNA シークエンサーによるフラグメント解析を試みた。

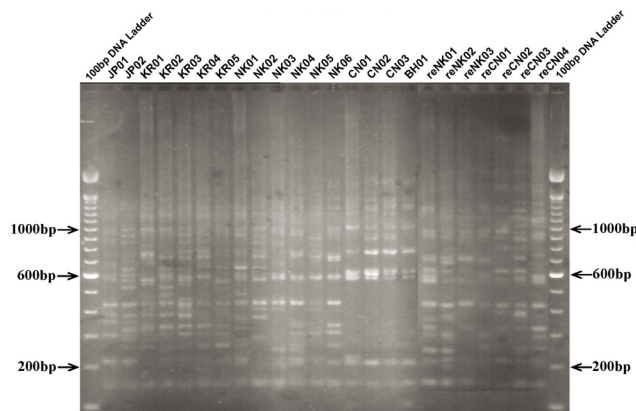


Fig. 1 Polymorphisms of strains of *Tricholoma matsutake* generated by PCR with primers pS48/pL281.

3. 2 DNA シークエンサーによるフラグメント解析

蛍光標識プライマーを用いた各検体の PCR 産物について、DNA シークエンサーによりフラグメント解析を行った。24 検体のうち、中国・雲南省産の検体 (CN01) と、松戸市内のスーパーで購入した中国産と称する検体 (reCN04) の結果を Fig.2 に示す。CN01 と reCN04 を比較すると、CN01 では約 220bp~550bp の範囲においてフラグメントが検出されなかったが、reCN04 においては約 220bp~550bp の範囲にかけても多数のフラグメントが検出された。この結果は、電気泳動法によるフラグメント解析結果と一致する。また、電気泳動法による解析と比較して、より多くのフラグメントを 1bp 単位で検出することができた。

次に、各検体のフラグメント解析結果を基に、データ解析を行い、産地判別を試みた。産地の判明している 17 検体のデータを基に分子系統解析を行い、作成した無根系統樹を Fig.3 に示す。分子系統解析の結果、中国及びブータンの検体 (CN01~03、BH01) は、一つのグループを形成した。また、日本の検体 (JP01、02) も、一つのグループを形成した。北朝鮮 (NK01~06) 及び韓国の検体 (KR01~05) は、一部例外 (NK01) はあったものの、その他の検体については、各々一つのグループを形成した。

更に、17 検体のデータに、市中で購入した北朝鮮産と称する検体及び中国産と称する検体 (reNK01~03、reCN01~04) のデータを各々加えて分子系統解析を行った結果を Fig.4~10 に示す。その結果、市中で購入した北朝鮮産と称する検体 (reNK01~03) 及び中国産と称する検体 (reCN01~04) は、全て北朝鮮産のグループともっとも高い相同性を示した。従って、市中で購入した中国産と称する検体 (reCN01~04) は、北朝鮮産のまつたけを中国産として偽って販売されていた可能性が示唆された。

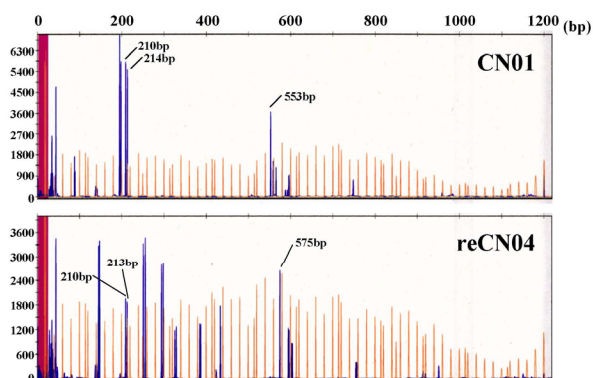


Fig. 2 Comparison of the result of fragment analysis between CN01 and reCN04. The vertical axis indicates signal intensity, and the horizontal axis the length of DNA fragment. The blue signal is derived from each sample, and the orange signal from the size standard.

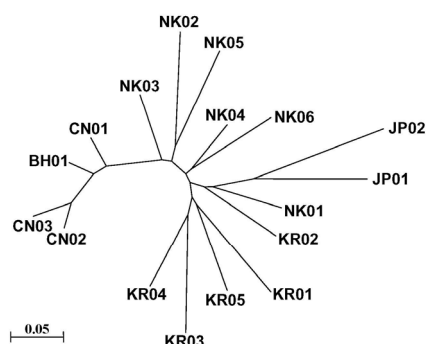


Fig. 3 Phylogenetic relationships among 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

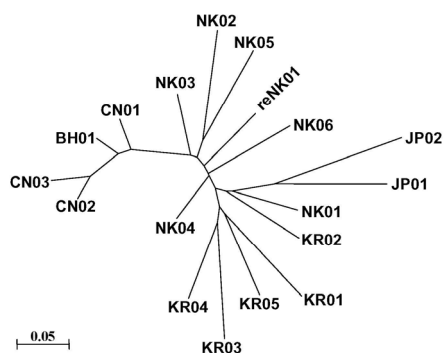


Fig. 4 Phylogenetic relationships among reNK01 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

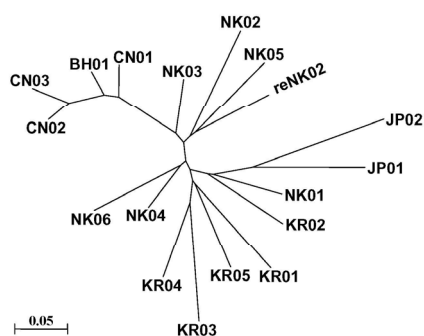


Fig. 5 Phylogenetic relationships among reNK02 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

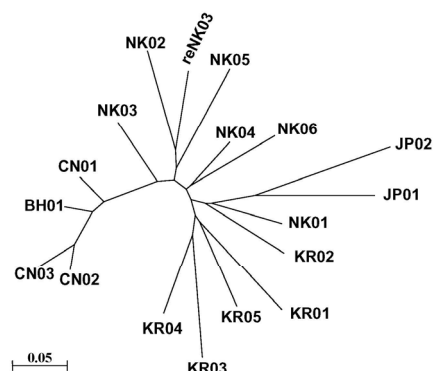


Fig. 6 Phylogenetic relationships among reNK03 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

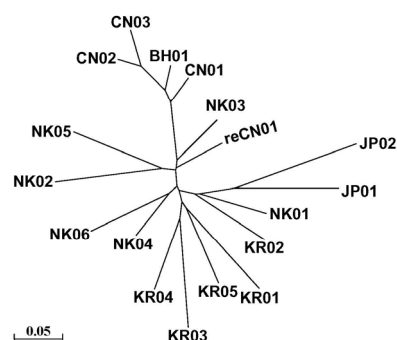


Fig. 7 Phylogenetic relationships among reCN01 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

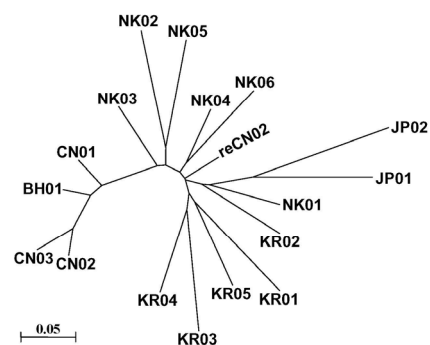


Fig. 8 Phylogenetic relationships among reCN02 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

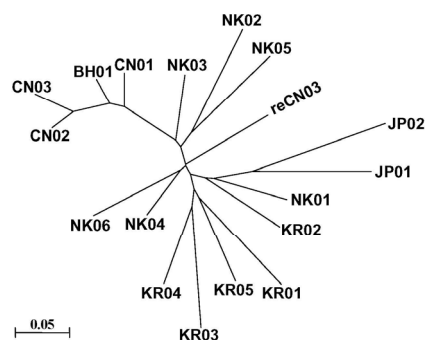


Fig. 9 Phylogenetic relationships among reCN03 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

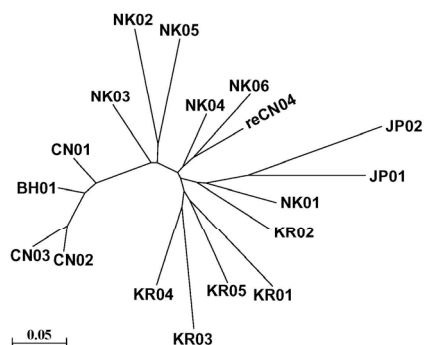


Fig. 10 Phylogenetic relationships among reCN04 with 17 standard *Trichloma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.

3. 3 考察

フラグメント解析の結果、市中で購入した中国産と称する検体（reCN01～04）については、北朝鮮産のまつたけを中国産として偽って販売されていた可能性が示唆された。しかし、reCN01～04が「北朝鮮産と推定される」と言えるかという、現段階では、偶然の可能性も否定できず、産地の推定という水準にまでは至っていないと考えられる。しかしながら、産地毎に遺伝的特徴に近い集団を系統樹で形成する傾向があったため、今後産地の判明している検体を多数入手し、系統樹を充実させ、検証実験を実施することで産地判別法として確立することができるのではないかと考えられる。

今後、入手し検討すべき検体だが、アジアにおける主なまつたけ産地は、日本、中国、ブータン、北朝鮮及び韓国の五カ国である。そのうち中国では、雲南省、四川省及び西藏自治区といった南西部と黒竜江省及び吉林省の東北部が主な産地である (Fig.11)。今回研究に用いた中国のまつたけ三検体のうち、一検体 (CN01) は、雲南省産のものである。他の二検体 (CN02,03) については、産地が不明だが、系統樹において、CN01 よりも北朝鮮産の検体 (NK01~05) から離れたところにグループを形成したため、これら二検体も南西部産のものであると推測される。従って、今後は北朝鮮や韓国に地理的に近い東北部のまつたけを入手して、解析する必要がある。

北朝鮮及びその周辺国を見ると (Fig.12)、中国の吉林省では、北朝鮮との国境にある長白山がまつたけの産地である。韓国では江原道、慶尚北道が主な産地であり、中でも江原道の襄陽と慶尚北道の奉化、蔚珍、盈徳の生産量が多い。他にも、慶尚南道、忠清南道及び忠清北道などで生産されている。北朝鮮では、江原道の高城、平安南道の陽徳、咸鏡南道の栄光及び咸鏡北道の富寧が主な産地だが、松が成長している全ての地域でまつたけを取ることができると言われている。北朝鮮、中国及び韓国のまつたけの産地は接近しており、特に北朝鮮との国境近くの高城や江原道では、遺伝的にも北朝鮮のものと非常に近いことが予想される。従って、これらの地域のまつたけも入手し、系統樹を充実させることで、より精度の高い産地判別が可能になると考えられる。

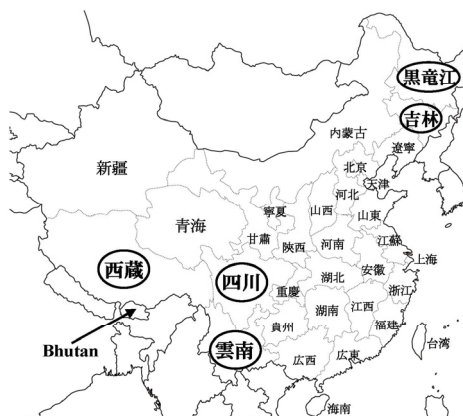


Fig. 11 Production area of *Trichloma matsutake* in China.



Fig. 12 Main production area of *Trichloma matsutake* in the Korean Peninsula and its neighborhood.

4. 要 約

まつたけ DNA 中に多数存在するレトロトランスポゾン¹の末端反復配列 (σ_{marYI}) に挟まれた染色体領域を増幅し、そのフラグメントの数及び長さの違いから北朝鮮及びその周辺国のまつたけの産地判別を試みた。その結果、系統樹において、まつたけの産地毎に一つの集団を形成する傾向が確認できた。従って、今後産地の明確なまつたけを多数入手し、系統樹を充実させるとともに、検証実験を実施することで、産地判別法として確立することができるのではないかと考えられる。

(謝 辞)

本研究に当たって、ご指導及び試料を提供して頂いた森林総合研究所の村田氏及び馬場崎氏に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) H.Murata, K.Babasaki, A.Yamada: *Mycorrhiza*, 15, 179 (2005).