

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

上野 勝*, 三浦 誠*, 三浦 徹*, 渡邊 裕之*, 三枝 朋樹*

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

Masaru UENO*, Makoto MIURA*, Toru MIURA*, Hiroyuki WATANABE* and Tomoki SAEGUSA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

The possibility of discriminating the country of origin of imported matsutake (*Tricholoma matsutake*) was examined by investigating the genetic polymorphism of *T. matsutake*. Many samples of *T. matsutake*, whose origins were known, were used to verify whether the matsutake from North Korea could be distinguished from the matsutake from other regions. A different fragmentation pattern was obtained from each matsutake by amplification of the area placed between σ MarY1, which is the end repetition array of retrotransposons, by the PCR method, and analysis of the fragmentation. A molecular phylogeny analysis was carried out based on these fragmentation data. The results showed that although this method could identify whether a matsutake was from North Korea or from the southwest region of China, it was not possible to discriminate between a matsutake from North Korea and a matsutake from the northeast region of China or from South Korea.

1. 緒 言

2006年10月、北朝鮮が核実験を強行したことで、同月14日より、政府は北朝鮮からの全貨物の輸入を禁止する措置をとった。この措置は2007年10月、2度目の継続が閣議決定された。税関では、この輸入禁止措置を引き続き的確に実行するため、特に、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、周辺国から輸入される貨物について、原産地証明書等による原産地確認を一層強化し、厳正な審査、検査を実施することとしている。

北朝鮮からの主要な輸入品目の一つであったまつたけを、DNA情報を利用した解析により、原産地判別が可能か否かが、昨年、検討された¹⁾。産地判別方法としては、まつたけの染色体上に数多く存在するレトロトランスポソンの個体間の異なる配置特性に着目した個体識別法を応用したものである。その結果、フラグメントパターンから分子系統解析を行い、系統樹を作成することで、産地ごとに遺伝的特徴に近い集団を形成する傾向が示唆された (Fig.1)。

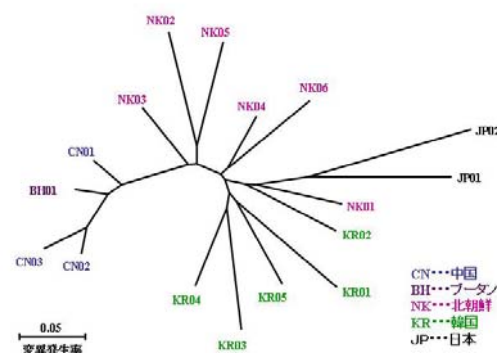


Fig.1 Phylogenetic relationships among 17 standard *Tricholoma matsutake* based on polymorphisms generated by PCR with pS48/pL281.1)

本研究では、系統樹を充実させるため、新たに産地の判明している中国産まつたけ、南西部の四川省産、雲南省産、東北部の黒竜江省産、吉林省産を追加し、昨年の研究データと併せて検証実験を実施した。

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試料

産地の判明している中国産まつたけ (96 検体)

四川省産 24 検体 (以下 SI01~SI24 とする)

雲南省産 24 検体 (以下 YU01~YU24 とする)

黒竜江省産 24 検体 (以下 HE01~HE24 とする)

吉林省産 24 検体 (以下 JI01~JI24 とする)

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。各産地の位置は Fig.2 に示す。



Fig.2 Locations of provinces in China where *T. matsutake* samples were collected in this study.

2. 1. 2 試薬

Gene Taq NT (ニッポンジーン(株))

Gene Scan 1200LIZ Size standard (Applied Biosystems)

2. 2 分析装置及びプライマー

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

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

プライマー-pS48 (-)

5'-GAGGTGGGGAAAAATATGGGACGAAC-3'²⁾

プライマー-pL281 (+)

5'-CTTCACATATACTGGGCATCAGCAAGGG-3'²⁾

2. 3 実験方法

2. 3. 1 DNAの抽出

まつたけはエタノールを含ませた脱脂綿で拭き、滅菌したメスで縦に 4 等分した。続いて、傘部内側のヒダを 2mm×2mm×4mm 程度採取し、CTAB 法により DNA を抽出した。これを RNase で処理後、100 μ l TE buffer に溶かし、試料溶液とした。

2. 3. 2 PCR条件

レトロトランスポゾン末端反復配列 σ MarY1 に挟まれた領域を増幅するプライマーを用いて PCR 反応を行った。反応溶液は 10×Gene Taq Buffer :1.5 μ l, dNTPs (2.5mM) :1.5 μ l, プライマー (50

μ M) :各 1.5 μ l, Gene Taq ポリメラーゼ (5U/ μ l) : 0.1 μ l 及び DNA 溶液:1 μ l を滅菌水で 15 μ l に調製した。PCR 反応は 94℃ の初期加熱後、94℃30 秒、62℃30 秒、72℃5 分を 25 回繰り返し、72℃10 分の条件で行った。

2. 3. 3 シークエンサーによる測定

HiDi Formamide 9.0 μ l, 1200LIZ Size standard 0.5 μ l, 10 倍希釈した PCR 産物 0.5 μ l を混合し、10 μ l とした。この溶液を 95℃ で 3 分間保持した後、氷上で 5 分間冷却したものを測定溶液とし、フラグメント解析を行った。

2. 3. 4 系統樹の作成

今回得られたフラグメントデータ、各産地のまつたけ 24 検体に、昨年の研究で得られたフラグメントデータである日本産 2 検体、韓国産 5 検体、北朝鮮産 6 検体を併せて合計 37 検体で一つの系統樹を作成した。

まず、37 検体からすべてのフラグメントピークを読み込み、100 bp~1000 bp の間を約 1 bp ごとに区切っていった。次に各検体についてフラグメントの有無を行列化した。この行列をもとに近隣結合法により無根系統樹を作成した。分子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 DNAシークエンサーによるフラグメント解析

シークエンサーによるフラグメント解析により、すべての検体からフラグメントデータを得ることができた。また、サイズスタンダードから、それぞれの検体のフラグメントのサイズが決定され、1bp 単位でピークを検出することができた。各産地の検体から得られたフラグメントピークの例を Fig.3 に示す。

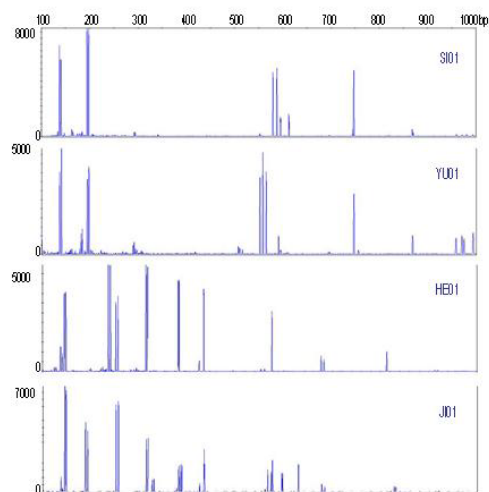


Fig.3 Comparison of the results of fragment analysis among four samples from each province. The vertical axis indicates signal intensity, and the horizontal axis indicates the length of DNA fragment.

3. 2 分子系統解析

フラグメント解析結果を基に分子系統解析を行った。共通祖先を考慮せずに、現存種どうしの関係を示す無根系統樹を近隣結合法により作成した。作成された無根系統樹を Fig.4~Fig.7 に示す。

Fig.4 は四川省産のまつたけと日本産、韓国産及び北朝鮮産のまつたけから作成された無根系統樹である。この図から四川省産のまつたけは、日本産、韓国産及び北朝鮮産のまつたけ検体とは離れた位置に集団を形成することがわかる。雲南省産のまつたけに関しても同様の結果が得られた。(Fig.5)

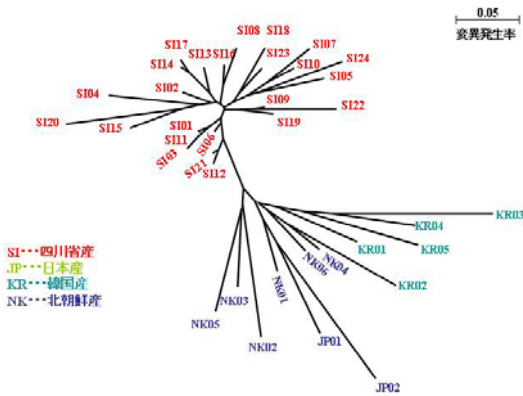


Fig.4 Phylogenetic tree generated from *T.matsutake* samples from Sichuan Province, Japan, South Korea and North Korea by the neighbor-joining method.

しかしながら、黒竜江省産 (Fig.6) 及び吉林省産 (Fig.7) のまつたけから得られた系統樹に関しては、他の検体と離れて集団を形成することはなく、韓国産は吉林省産、北朝鮮産は黒竜江省産と吉林省産の分布の中に混在する形となった。

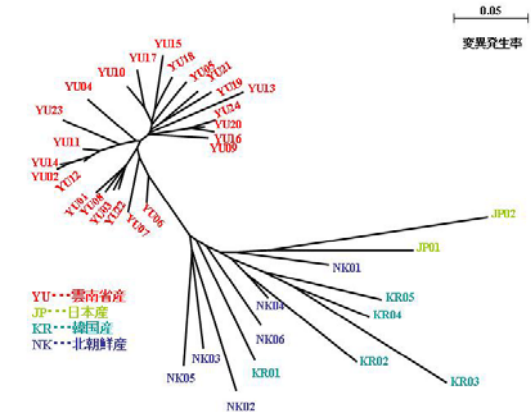


Fig.5 Phylogenetic tree generated from *T.matsutake* samples from Yunnan Province, Japan, South Korea and North Korea by the neighbor-joining method.

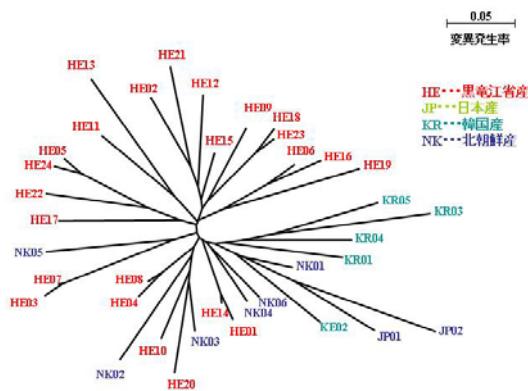


Fig.6 Phylogenetic tree generated from *T.matsutake* samples from Heilongjiang Province, Japan, South Korea and North Korea by the neighbor-joining method.

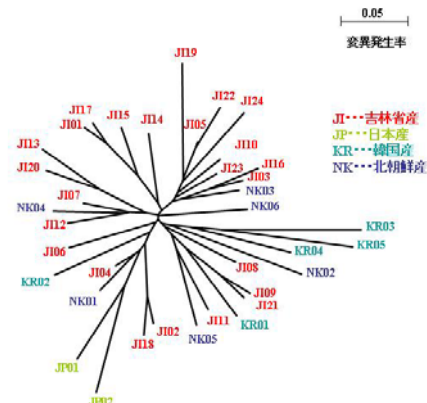


Fig.7 Phylogenetic tree generated from *T.matsutake* samples from Jilin Province, Japan, South Korea and North Korea by the neighbor-joining method.

3. 3 考察

本研究において、北朝鮮産まつたけとその周辺国からの輸入まつたけの原産地判別が可能か否かを検討した。その結果、中国の南西部産のまつたけであれば、北朝鮮産まつたけとの判別は可能であるが、産地が隣接している中国の東北部及び韓国産のまつたけは、北朝鮮産まつたけとの判別は困難であることがわかった。

今回、それぞれのまつたけのレトロトランスポソンの配置特性は個体ごとに違いが見られたものの、北朝鮮と地理的に近い産地のまつたけを判別できなかった。これは、まつたけ子実体は、胞子を散布するための器官であって、空中に胞子を飛ばし風による散布を行っており、隣接する地域では遺伝情報の交流がおこっているためであると考えられる。特に、中国と北朝鮮との国境にある長白山一帯はどちらの国にとってもまつたけの産地であり、この一帯を産地とするまつたけの原産国の判別は困難であると考

えられる。

4. 要 約

まつたけの遺伝的多型に関する調査を行い、原産地判別が可能か否かを検討した。北朝鮮産のまつたけと他の産地のまつたけとを識別できるかを検証するために、産地の判明しているまつたけを多数使用した。レトロトランスポソンの末端反復配列である、 σ MarY1 に挟まれた領域を PCR 法で増幅し、フラグメント解析を行うことで、すべてのまつたけから異なるフラグメントパターンを得ることができた。これらのフラグメントデータを基に分子系統解析を行った。その結果、この方法では、北朝鮮産のまつたけと中国南西部を産地とするまつたけであれば識別できるが、中国東北部及び韓国産との間での識別は困難であった。

文 献

- 1) 竹元 賢治、渡邊 裕之、三枝 朋樹：関税中央分析所報、47、5 (2007).
- 2) H.Murata, K.Babasaki, A.Yamada: Mycorrhiza, **15**, 179 (2005).