

## 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 (続報)

三浦 徹\*, 片山 貴之\*, 三枝 朋樹\*

### Investigation of Genetic Diversity of Matsutake (*Tricholoma matsutake*) of the North Korea and Neighboring Countries (continued report)

Toru MIURA\*, Takayuki KATAYAMA\*, Tomoki SAEGUSA\*,

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

Since 2006, DNA analysis for identifying the country of origin of matsutake (*Tricholoma matsutake*) has been researched in the Central Customs Laboratory. In April 2008, a method of identifying the country of origin by the band pattern of agarose gel electrophoresis was reported by Murata et al. of the Forestry and Forest Products Research Institute. We applied this method to samples whose countries of origin were known, and found the following: (1) Southwest Chinese ones are easily distinguished from Far East ones; (2) In the Far East, the band patterns changes gradually in accordance with the latitude of origin; and (3) Some samples show the same band pattern although their origins are different.

### 1. 緒 言

2006 年 10 月に北朝鮮が核実験を強行したことの対抗措置として、北朝鮮からの全貨物の輸入禁止、北朝鮮から第 3 国への仲介貿易取引の禁止等の措置が引き続き行われているところである。そのため税関においては、北朝鮮籍の貨物が日本に入らないよう水際で阻止するため、厳重な審査及び検査が行われている。

輸入禁止措置施行以前に北朝鮮からの主要輸入品目であったまつたけについて、2006 年以降関税中央分析所において原産地判別が可能か否かが検討されてきた<sup>1)2)</sup>。これは、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、北朝鮮と中国南西部の識別はできたが、北朝鮮と韓国及び中国北東部の識別は困難なものであった。また分析にシーケンサーを用いるため、この装置を所有していない税関は、所有している分析所にサンプルを送付する必要がある。これには、分析に時間を要するため、鮮度が重要であるまつたけでは、問題が残る。

そこで、シーケンサーを用いない村田らにより報告された方法<sup>3)</sup>がこの問題を解決するものと思われる。この方法は、レトロトランスポソンの配置特性に着目し、その末端反復配列である *σmarY1* に基づく領域を PCR により増幅することには変わりはない。

相違点はプライマーを改良したことであり、これにより、増幅される領域が激減することからシーケンサーを用いるフラグメント解析の必要が無く、電気泳動像のみによる解析が可能であるというものである。具体的には、2 組のプライマーセットにより、それぞれ PCR を行い、電気泳動を行う。これにより得られるバンドパターンを基に Table 1 及び Fig. 1 のように、東アジアにおいて地理的タイプを判別するという手法である。地理的タイプは、極東地域の A タイプと中国南西部一ブータン地域の B タイプに分類され、さらに極東地域内でサブタイプとして A1~A4 タイプに分類されるというものである。

本研究では、この方法の検証実験を実施した。

Table 1 Specifications of the *σmarY1*-based *Tricholoma matsutake* geographical types in East Asia by Murata et al.

Geotype and subtype	Primer set							Geographical distribution
	pDGL313-1 / pS48						pDGL719-2 / pS48	
	573 bp	493 bp	450 bp	337 bp	299 bp	273 bp	457 bp	
A	V	+	V	+	V	V	V	Far east
A1	-	+	-	+	-	V	-	Japan
A2	-	+	+	+	+	V	V	Japan
A3	-	+	-	+	-	V	+	Korean peninsula
A4	+	+	V	+	V	V	+	China (northeastern provinces)
B	-	-	-	-	-	+	-	China (southwestern provinces)-Bhutan

(+ : band detection, - : no band, v : different result in samples)

\* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

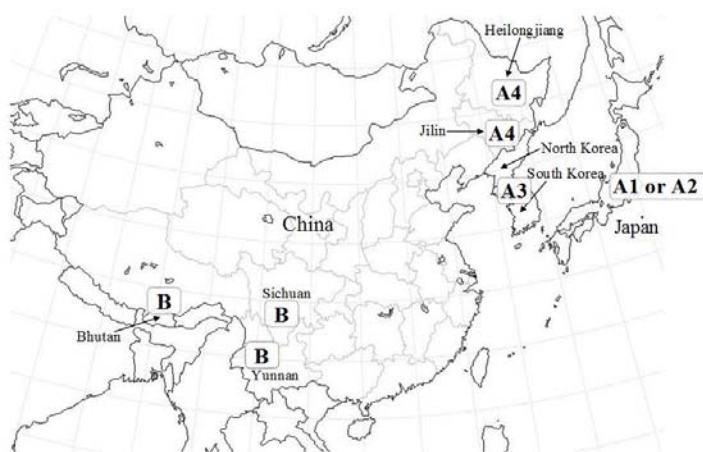


Fig. 1 Distribution of  $\sigma$ marY1-based *T. matsutake* and locations of provinces where *T. matsutake* samples were collected in this study in East Asia

## 2. 実験

### 2. 1 試料及び試薬

#### 2. 1. 1 試料

日本・茨城産 2 検体、北朝鮮産 1 検体、中国産 2 検体、ブータン産 1 検体 (以上、(独) 森林総合研究所提供)

韓国産 5 検体、北朝鮮産 5 検体、中国・黒龍江省産 24 検体、中国・吉林省産 24 検体、中国・四川省産 24 検体、中国・雲南省産 25 検体 (以上、税関提供品及び輸入者から直接購入したもの)

なお、(独) 森林総合研究所により提供されたものは、抽出済み DNA の状態である。その他のものについては、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.1 のとおりである。

#### 2. 1. 2 試薬

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Gene Taq NT (ニッポンジーン)

NuSieve GTG Agarose (Lonza)

NuSieve 3:1 Agarose (Lonza)

### 2. 2 分析装置及びプライマー

PCR 増幅装置: Gene Amp<sup>®</sup> PCR system9700 (Applied Biosystems)

電気泳動法: FB200 (パワーサプライ、Fisher Scientific)

BE-521 (泳動槽、Bio Craft)

BIO-PROFILE System2 (画像解析装置、VILBER LOURMAT)

プライマー-pS48

5'-GAGGTGGGAAAAATATGGGACGAAC-3'

プライマー-pDGSL313-1

5'-CGATGTATGTGGCTGTGCCAGTACCAT-3'

プライマー-pDGSL719-2

5'-TGGGCCGCCCTTGATGGCTCATATT-3'

## 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、DNeasy Plant Mini Kit に添付のプロトコル「植物組織からのトータル DNA 精製」に従い DNA を抽出した。

### 2. 3. 2 PCR

PCR 反応溶液は、鋳型 DNA : 約 50 ng、プライマー各 50pmol、dNTPs (2.5mM) : 5  $\mu$ l、10×Gene Taq Universal Buffer : 5 $\mu$ l、Gene Taq NT (5unit/ $\mu$ l) : 0.5 $\mu$ l、滅菌水 : (合計 50  $\mu$ l に調整) とした。PCR 反応条件は、pDGSL313-1/pS48 セットでは、94°C2 分→(94°C30 秒→62°C30 秒→72°C2 分)×30 回→72°C10 分、pDGSL719-2/pS48 セットでは、94°C2 分→(94°C30 秒→68.5°C30 秒→72°C1 分)×30 回→72°C10 分で行った。

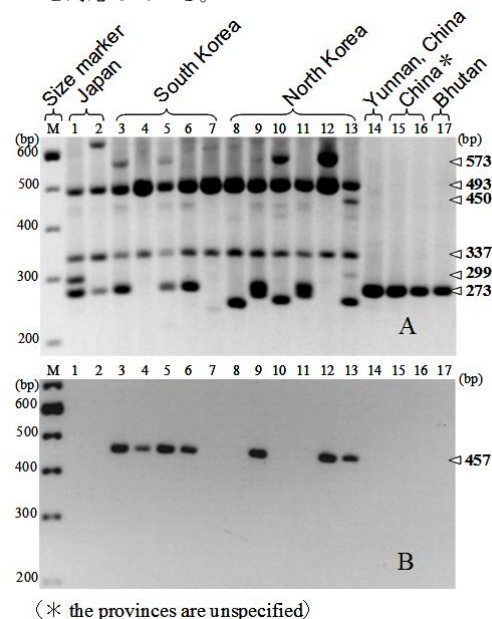
### 2. 3. 3 電気泳動法

0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイドを含む 1.9% アガロースゲル (Nusieve GTG Agarose / Nusieve 3:1 Agarose = 0.7 / 1.2) を用いて、PCR 産物 12  $\mu$ l をローディングバッファ 2  $\mu$ l と混和したものを電気泳動した。泳動条件は、150V (上限電流 0.16A) とし、ローディングバッファ中のプロモフェノールブルーがゲルの末端 1cm 手前に到達したところをもって泳動終了とした。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 電気泳動法によるバンドパターン解析

日本、韓国、北朝鮮、中国及びブータン産のまつたけの分析により得られた電気泳動像を Fig.2 に示す。Fig.2 中の No.15 及び 16 の中国 (地域不特定) は中国国内での産地が不明なまつたけである。この電気泳動像をもとにバンドの有無を表にまとめたものを Table 2 に示す。なお、表中のパターンは、同一の記号のものは、同一のバンドパターンを有するものである。また、以降の全ての表のパターンと対応している。



(※ the provinces are unspecified)

Fig. 2 Electrophoretic profiles of *T. matsutake* by PCR (A: with primers pDGSL313-1/pS48, B: with primers pDGSL719-2/pS48)

Table 2 Band patterns obtained from electrophoretic profiles (Fig. 2)

No.	Geographical origin	Primer set							pattern
		pDGS�313-1 / pS48						pDGS�719-2 / pS48	
		573 bp	493 bp	450 bp	337 bp	299 bp	273 bp	457 bp	
1	Japan(Ibaraki)01	—	+	—	+	+	+	—	P01
2	Japan(Ibaraki)02	—	+	—	+	—	+	—	P02
3	South Korea01	+	+	—	+	—	+	+	P03
4	South Korea02	—	+	—	+	—	—	+	P04
5	South Korea03	+	+	—	+	—	+	+	P03
6	South Korea04	—	+	—	+	—	+	+	P05
7	South Korea05	—	+	—	+	—	—	—	P06
8	North Korea01	—	+	—	+	—	—	—	P06
9	North Korea02	—	+	—	+	—	+	+	P05
10	North Korea03	+	+	—	+	—	—	—	P07
11	North Korea04	—	+	—	+	—	+	—	P02
12	North Korea05	+	+	—	+	—	—	+	P08
13	North Korea06	—	+	+	+	—	—	+	P09
14	China(Yunnan)01	—	—	—	—	—	+	—	P10
15	China02	—	—	—	—	—	+	—	P10
16	China03	—	—	—	—	—	+	—	P10
17	Bhutan01	—	—	—	—	—	+	—	P10

(+ : band detection, - : no band)

同じく、中国の北東地域に位置する黒龍江省及び吉林省、南西地域に位置する四川省及び雲南省の結果を Fig.3、4 及び Table 3 に示す。

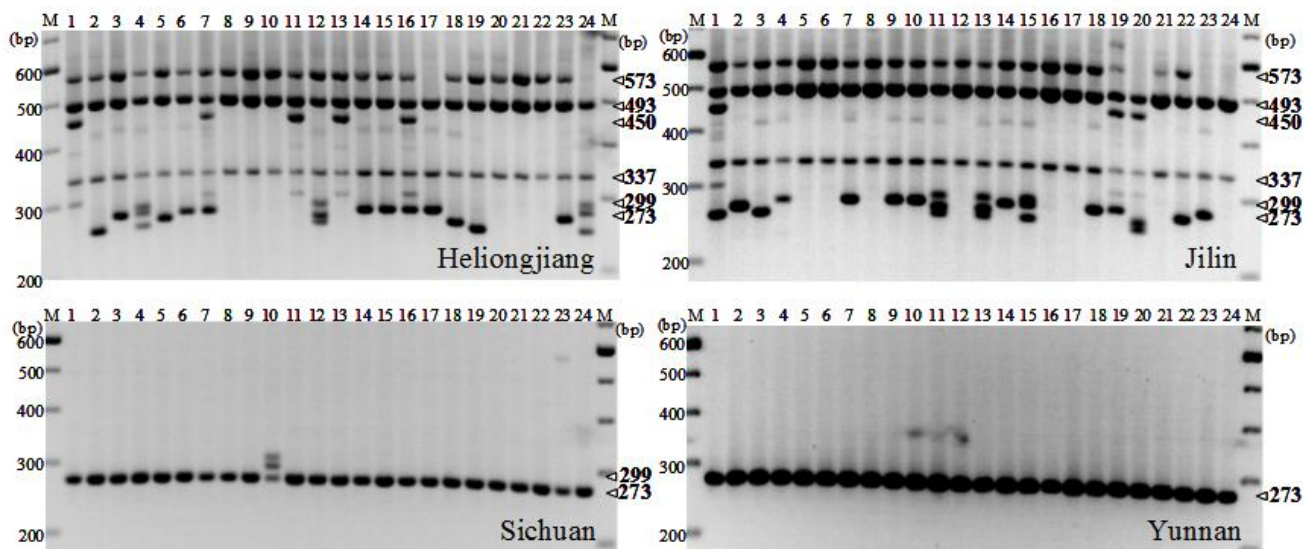
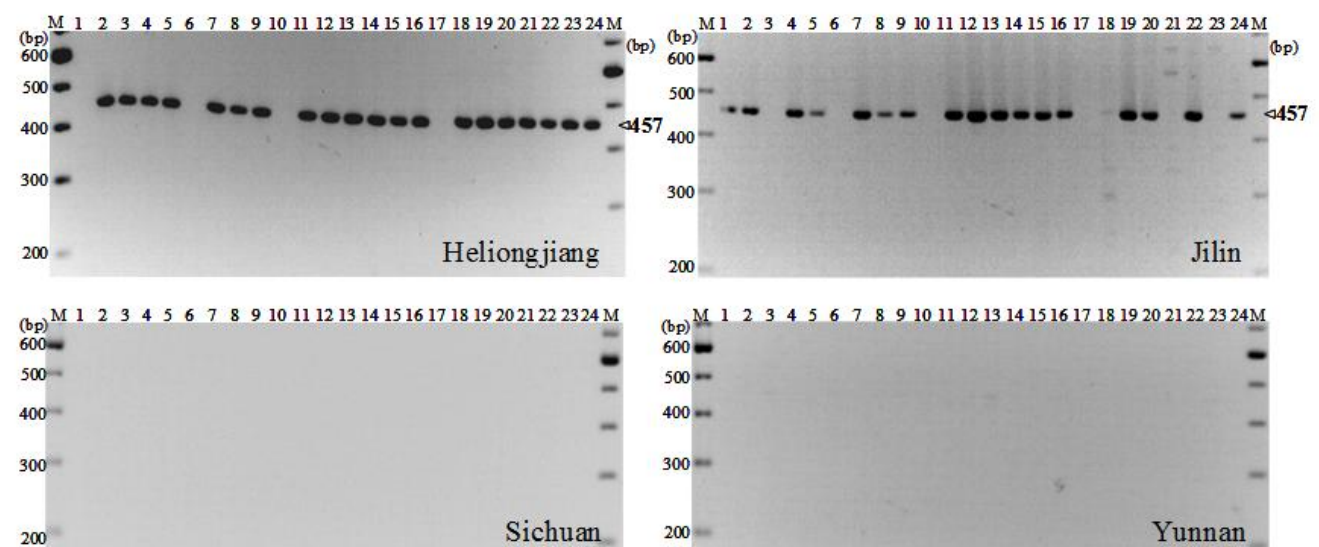
Fig.3 Electrophoretic profiles of *T. matsutake* in China by PCR with primers pDGS�313-1/pS48 (1-24: *T. matsutake* in each province, M: size marker)Fig. 4 Electrophoretic profiles of *T. matsutake* in China by PCR with primers pDGS�719-2/pS48 (1-24: *T. matsutake* in each province, M: size marker)

Table 3 Band patterns obtained from electrophoretic profiles (Fig. 3, 4)

pattern	Primer set							Heilongjiang, China		Jilin, China		Sichuan, China		Yunnan, China	
	pDGSL313-1 / pS48						pDGSL719-2 / pS48								
	573 bp	493 bp	450 bp	337 bp	299 bp	273 bp	457 bp	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%
P02	—	+	—	+	—	+	—	1	4.2	1	4.2				
P03	+	+	—	+	—	+	+	4	16.7	4	16.7				
P04	—	+	—	+	—	—	+			1	4.2				
P05	—	+	—	+	—	+	+	1	4.2						
P07	+	+	—	+	—	—	—			1	4.2				
P08	+	+	—	+	—	—	+	11	45.8	5	20.8				
P12	+	+	+	+	+	+	+	2	8.3	1	4.2				
P13	+	+	+	+	+	—	+	2	8.3	1	4.2				
P14	+	+	—	+	—	—	—	1	4.2	3	12.5				
P15	+	+	—	+	—	+	—	1	4.2	2	8.3				
P16	+	+	+	+	+	—	—	1	4.2						
P17	+	+	—	+	+	—	+			3	12.5				
P18	+	+	—	+	+	+	+			1	4.2				
P19	—	+	+	+	+	—	+			1	4.2				
P10	—	—	—	—	—	+	—					23	95.8	24	100
P11	—	—	—	—	—	+	—					1	4.2		
total								24	100	24	100	24	100	24	100

(+ : band detection, - : no band)

## 3. 2 地理的タイプ

原産地毎にバンドパターンをまとめたものを Table 4 に示す。合わせて、Table 1 で示した判別法に当てはめた結果も表に示す。

極東地域である日本、韓国、北朝鮮、中国吉林省及び中国黒龍

江省産のまつたけの地理的タイプはすべて A タイプとなった。また、中国四川省、中国雲南省及びブータン産のまつたけの地理的タイプは全て B タイプとなったことから、東アジアにおいて、極東地域と中国南西部地域の判別は容易にできることがわかった。

Table 4 Summary of band patterns and omarY1-based *T. matsutake* genotypes in East Asia

Geographical origin		Japan		S. Korea		N. Korea		Jilin, China		Heilongjiang, China		Sichuan, China		Yunnan, China		China*		Bhutan	
pattern	$\sigma_{marY1}$ -based genotype	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%	No. of pieces	%
P01	A	1	50																
P09	A					1	16.7												
P07	A					1	16.7	1	4.2										
P14	A							3	12.5	1	4.2								
P15	A							2	8.3	1	4.2								
P16	A									1	4.2								
P02	A1	1	50			1	16.7	1	4.2	1	4.2								
P06	A1			1	20	1	16.7												
P19	A2							1	4.2										
P04	A3			1	20			1	4.2										
P05	A3			1	20	1	16.7			1	4.2								
P03	A4			2	40			4	16.7	4	16.7								
P08	A4					1	16.7	5	20.8	11	45.8								
P17	A4							3	12.5										
P18	A4							1	4.2										
P12	A4							1	4.2	2	8.3								
P13	A4							1	4.2	2	8.3								
P10	B											23	95.8	25	100	2	100	1	100
P11	B'											1	4.2						
Total		2	100	5	100	6	100	24	100	24	100	24	100	25	100	2	100	1	100

極東地域内の地理的タイプとしては、日本から中国北東部へと原産地が北上するほど A1、A2 の日本タイプから A3 の朝鮮半島タイプ、A4 の中国北東部タイプへと移行する傾向があった。しかし、パターン P02 は A1 の日本タイプであるが、北朝鮮産や中国

吉林省及び黒龍江省の中国北東部産のまつたけの一部もこのパターンを有するものがある。このように原産地が異なるが、同一のバンドパターンを示すものが混在するものもみられた。近接した地域であると、遺伝情報の交流が起こっているものと考えられる。

#### 4. 要 約

まっただ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。PCR 法により、染色体上のレトロトランスポゾンの末端反復配列である、*omarY1* に基づく領域を増幅し、電

気泳動法によりバンドを検出する。得られたバンドパターンを基に東アジアにおける原産地域を特定するという手法である。これにより、極東地域と中国南西部地域との判別は可能である。また、極東地域内においては、原産地が北上又は南下するにつれ、バンドパターンが移行していく傾向が認められた。

#### 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) 上野 勝, 三浦 誠, 三浦 徹, 渡邊 裕之, 三枝 朋樹 : 関税中央分析所報, 48, 5 (2008).
- 3) H. Murata, K. Babasaki, T. Saegusa, K. Takemoto, A. Yamada, A. Ohta : *Applied And Environmental Microbiology*, **74**, 2023 (2008).