

DNA 分析による「マッシュルーム」調製品についての原料種判別

杉島 紋子*, 大田 朋槻*, 赤崎 哲也*

Identification of the species of mushrooms from processed mushroom products by DNA analysis

Ayako MATSUSIMA*, Tomoki OTA* and Tetsuya AKASAKI*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

In order to enforce accurate tariffs, we have developed a DNA-based method for identifying the species of processed mushrooms of the genus *Agaricus*, and have confirmed its applicability for several processed mushroom products (one imported product, twelve commercial products). To extract DNA from processed mushroom products, it was effective to use the CTAB method after freezing the lamella part of the mushrooms of processed mushroom products. Because of processing treatment, the DNA extracted from processed mushrooms was fragmented into lengths ranging from 100 bp to 200 bp. Therefore, by dividing the ITS2 region into three parts and amplifying and assembling them, whole regions of the nuclear ribosomal DNA transcribed spacer 2 (nrITS2) were obtained. Our molecular phylogeny analysis using the base sequence data of the nrITS2 region suggested that all of the raw materials of processed mushroom products analyzed in this study would be identified as *Agaricus bisporus*.

1. 緒 言

はらたけ (*Agaricus*) 属のきのこを調製したものは、関税率表第 2003.10 号に分類される。このうち、砂糖を加えていない気密容器入り (1 個の重量が 10 kg 以下のものに限る) のものは、第 2003.10-211 (協定 13.6%) の「フレンチマッシュルーム」と第 2003.10-219 (協定 9.6%) の「その他のもの」とに分けられる。これらの細分には税率格差があることから、正確に区別を必要がある。

きのこの種判別は、一般に形質学的方法により行われており、専門的知識が必要とされる。¹⁾ *Agaricus* 属の特徴としては、膜があること、ひだが黒いこと、ひだが柄につかないことの 3 点が挙げられる。一方で、食用に加工されるきのこは未成熟な状態で収穫されることも多く、また調理によって、きのこ本来の原型をとどめていない場合もあり、形態的特徴から *Agaricus* 属のきのこかどうかを判別することはできても、種の同定は不可能であることが多い。²⁾ そのため、種判別には DNA 分析が有用であると考えられる。

これまでの研究で、きのこの分類・同定には、リボソーム遺伝子周辺領域である Internal transcribed spacer (以下、ITS) 領域が適していることが報告されている。³⁾ この領域は増幅するためのプライマーが公開されており、Genbank に多様なきのこ類の塩基配列データが登録されている。また、近年では、きのこの種判別に

有用な DNA バーコード領域の 1 つとして認識され、研究が進められている。⁴⁾ 他方、調製品の DNA は、断片化されていることが多く、既知の条件で DNA 分析ができないことも多い。⁵⁻⁶⁾

本研究では、国内において、一般にマッシュルームと称されるきのこを用いた調製品の DNA 種判別法の開発を目的とし、マッシュルーム調製品からの DNA 抽出法の検討を行うと共に、ITS 領域の後半領域 (以下、ITS2 領域と称す。) を用いた分子系統解析により、マッシュルーム調製品として市場で流通している物品及び輸入品の原料種を推定可能かどうか調査した。

2. 実 験

2.1 試 料

試料は、マッシュルーム調製品 (輸入貨物 1 検体、市販のマッシュルーム調製品 12 検体) 及び生鮮マッシュルーム 2 検体を用いた。詳細については Table 1 に示す。

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 Mushroom samples used in this study and their identification results

| Sample | Label description /declared species | Origin | Packaging | Shape | Abbrev. | ITS2-Identification |
|---|-------------------------------------|----------|--------------|--------|---------|---------------------|
| Boiled mushroom, imported | <i>Agaricus comtulus</i> | China | canned | sliced | A | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | China | canned | sliced | B | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | China | canned | sliced | C | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | China | canned | sliced | D | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | China | canned | sliced | E | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | China | sealed pouch | sliced | F | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | no info. | canned | sliced | G | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | no info. | canned | sliced | H | <i>A. bisporus</i> |
| Grilled and pickled mushroom in olive oil | mushrooms | Italy | bottled | whole | I | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | champignons | Spanish | canned | whole | J | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | France | canned | sliced | K | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | Japan | canned | sliced | L | <i>A. bisporus</i> |
| Boiled mushroom | mushrooms | Japan | canned | sliced | M | <i>A. bisporus</i> |
| Brown mushroom, fresh | mushrooms | Belgium | wrapped | whole | N | <i>A. bisporus</i> |
| White mushroom, fresh | mushrooms | Belgium | wrapped | whole | O | <i>A. bisporus</i> |

2.2 試 薬

2.2.1 DNA の抽出

DNeasy® Plant Mini kit (QIAGEN)、ポリビニルピロリドン (PVP) (東京化成工業)

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (和光純薬工業)

1M Tris-HCl (pH8.0)、0.5M EDTA (pH8.0)、TE (pH8.0) (遺伝子工学研究用 和光純薬工業)

塩化ナトリウム、クロロホルム、アミノアルコール、β-メルカプロエタノール、イソプロピルアルコール、エタノール (特級和光純薬工業)

プロテナーゼ K (タカラバイオ)

2.2.2 PCR 及びサイクルシーケンス

TaKaRa Ex Taq™ (タカラバイオ)

ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)

プライマー (ITS 領域及び PCR に使用したプライマーの位置を Fig.1 に示す。)

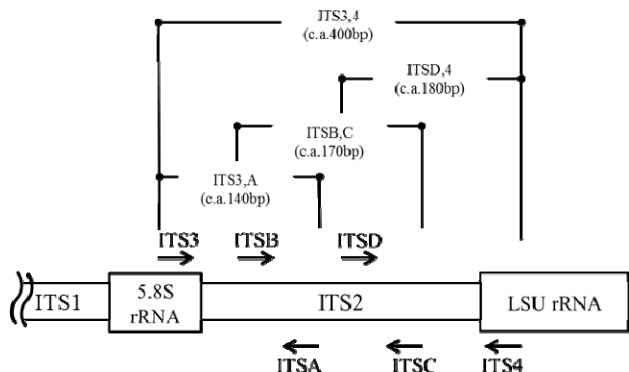


Fig.1 Schematic presentation of the structure of the nuclear ribosomal RNA internal spacer regions and the locations of the designed primers
The arrows indicate the locations and directions of the designed primers and universal primers ITS3⁷⁾ and ITS4⁷⁾.

ITS3⁷⁾ Forward 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'

ITS4⁷⁾ Reverse 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITSA Reverse 5'-AGAGTTGAGAAATTAATGAC-3'

ITSB Forward 5'-CCTTGGTATTCCGAGGAGCA-3'

ITSC Reverse 5'-TCACACTTGTGGCAGATCGC-3'

ITSD Forward 5'-CTCCTCTGAAATGCATTAGC-3'

2.3 分析装置

試料破碎装置 : MM300 (Retsch)

PCR増幅装置 : Veriti 96well Thermal cycler (Applied Biosystems)

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

DNA シークエンサー : 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

2.4 実 験

2.4.1 DNA 抽出方法の検討

マッシュルーム調製品中のきのこの組織片からひだ部分を切り取り、凍結乾燥させたもの約 6mg と液体窒素で凍結させたもの約 50mg を用意し、予め PVP 約 20mg 及びジルコニア・ビーズ 1 個を入れた 2 ml 容のエッペンチューブにそれぞれ量り取り、粉碎後、CTAB 法で DNA を抽出した。また、同様にして各凍結試料を 2 ml 容のエッペンチューブにそれぞれ量り取り、ジルコニア・ビーズ 1 個を加えて粉碎した後、DNeasy® Plant Mini kit (以下、抽出キット) で DNA を抽出した。更に、ひだ部分を切り出したもの約 50mg を 2 ml 容のエッペンチューブに採取し、抽出キットの AP1 バッファー 400μl 及びジルコニア・ビーズ 1 個を加えて粉砕機で処理した後、抽出キットを用いて DNA 抽出を行った。抽出キットによる DNA 抽出は、添付のプロトコルに従った。各抽出方法で得られた DNA 抽出液について、OD₂₆₀ による DNA 収量とサンプル採取量から、DNA の収率 (wet base) を求めた。

2.4.2 PCR 法による ITS2 領域の増幅及び塩基配列の決定

各試料から抽出した DNA について、核 DNA 上の ITS2 領域を含む遺伝子領域を TaKaRa *Ex Taq* を用いて PCR 法で増幅した。PCR の反応溶液は、DNA 抽出液 (約 200ng) : 2 μ l、10 \times *Ex Taq* buffer : 3.0 μ l、dNTP mixture (2.5mM each) : 2.4 μ l、プライマー (5 μ M) : 各 1.0 μ l、*Ex Taq* polymerase (5U/ μ l) : 0.15 μ l、滅菌水 : 20.45 μ l (合計 30 μ l に調製) とした。PCR の反応条件は、熱変性 95 $^{\circ}$ C (1 分) を行った後、プライマー-ITSA を使用した場合は、95 $^{\circ}$ C (15 秒)、45 $^{\circ}$ C (30 秒)、72 $^{\circ}$ C (20 秒) のサイクルを、それ以外は、95 $^{\circ}$ C (15 秒)、50 $^{\circ}$ C (30 秒)、72 $^{\circ}$ C (20 秒) のサイクルを 30 回繰り返した後、72 $^{\circ}$ C (15 秒) の伸長反応を行った。

2%アガロースゲル電気泳動により、増幅した DNA 断片 (PCR 産物) の有無を確認した後、得られた PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、PCR 反応と同じプライマーを用いて、Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits で、添付のプロトコルに従い、5' 側及び 3' 側の両方向からサイクルシークエンス反応を行った。

サイクルシークエンス反応後、エタノール沈殿法により未反応蛍光色素を除去し、DNA シークエンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。

2.4.3 分子系統解析

得られた塩基配列からプライマー配列を除去した後、試料ごとに ATGC ver.4 (Genetix Corp., Japan) で塩基配列を連結することにより ITS2 領域の全長配列を得た。得られた各試料の ITS2 領域の塩基配列を相互に比較し、同一のものを除いた後、各試料の ITS2 全長配列を、Genbank から得た *Agaricus* 属きのこ (35 種) の ITS2 領域の塩基配列と共に、Clustal W⁽⁸⁾ でアライメントし、Mega 5⁽⁹⁾ で、遺伝子距離の計算には Tamura-Nei model⁽¹⁰⁾ を用い、近隣結合法で系統樹を作成した。得られた系統関係から各試料の原料種を推定した。

3. 結果及び考察

3.1 DNA 抽出方法の検討

加工処理されたマッシュルームからの効率的な DNA 抽出法を検討するため、①凍結乾燥 (粉碎) + CTAB 法、②凍結乾燥 (粉碎) + 抽出キット、③液体窒素による凍結 (粉碎) + CTAB 法、④液体窒素による凍結 (粉碎) + 抽出キット、及び⑤生試料片 (粉碎) + 抽出キット、の 5 つの方法で DNA の抽出を行った。各抽出方法から得られた DNA の収率を Table 2 に示す。

Table 2 The yields of DNA from a processed mushroom, obtained by five different methods

| DNA Extraction Methods | yield [μ g/mg] (wet base) (n=6) |
|--|--------------------------------------|
| (1) Freeze dry - CTAB method | 1.38 |
| (2) Freeze dry - Extraction kit | 0.34 |
| (3) Freeze in liquid nitrogen - CTAB method | 1.24 |
| (4) Freeze in liquid nitrogen - Extraction kit | 0.23 |
| (5) wet material - Extraction kit | 0.13 |

“Extraction kit” means “DNeasy[®] Plant Mini kit” (QIAGEN, USA)

Yield (μ g/mg) = OD₂₆₀ × 50 × extract volume (ml) / amount of sample (mg)

For the freeze dried sample, the amount of sample was calculated by:

Amount of sample (mg, wet-base) = Weight of dried sample (mg) / [(100 - moisture (%)) / 100]

Moisture of sample was determined gravimetrically by drying in an oven at 105 $^{\circ}$ C for 4 hours.

DNA の収率は、抽出キットよりも CTAB 法で抽出した方が良好であり、今回検討した 5 つの DNA 抽出法の中では、前処理として、試料を凍結乾燥させた後、CTAB 法で抽出した場合が最も高い収率となったが、試料を液体窒素で凍結後、CTAB 法で抽出した場合とそれほど大きな違いはなかった。一方、抽出キットを用いた場合の収率は、前処理方法に拘らず、CTAB 法に比べて常に低い値となった。

以上より、加工処理されたマッシュルームから効率よく DNA を抽出するには、試料を凍結乾燥又は液体窒素で凍結後、粉碎し、CTAB 法で抽出する方法が有効であることが分かった。

3.2 マッシュルーム調製品の DNA

最も DNA の抽出効率の良かった、凍結乾燥試料を粉碎後、CTAB 法で抽出した DNA の状態を調べたところ、生鮮マッシュルームの DNA は、約 10kbp の長さであったのに対し、加工処理されたマッシュルームの DNA は、輸入貨物及び市販品のいずれも、100~200bp と、加熱調理のために非常に断片化していることが分かった (Fig.2)。

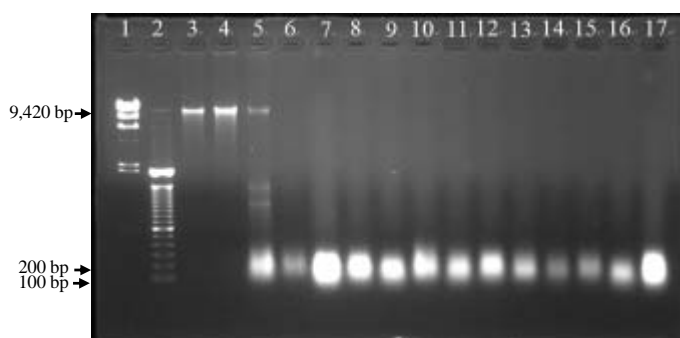


Fig.2 Qualities of the DNA extracted from 15 mushroom samples

Lane 1: λ Hind III digested, Lane 2: 100 bp DNA ladder, Lanes 3 and 4: fresh mushroom samples N and O, respectively, Lanes 5 to 17: processed mushroom samples A to M, respectively.

The electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

Quinteiro ら¹¹⁾は、缶詰に加工されたマグロの DNA が 100bp 未満から 200bp の範囲に断片化していたと報告している。このことから、動植物を問わず、缶詰と同程度に加工処理された試料の DNA は、200bp 以下に断片化されると思われる。

3.3 PCR 産物の電気泳動

試料の ITS2 領域の塩基配列を調べるため、公開されているプライマー (ITS3⁷⁾ 及び ITS4⁷⁾ を用いて PCR を行ったところ、生鮮マッシュルーム及びいくつかのマッシュルーム調製品では、400bp 付近にバンドが確認できたが、ほとんどのマッシュルーム調製品については増幅産物を得ることはできなかった (Fig.3)。これは、Fig.1 で示したように調製品から抽出された DNA のサイズは、100~200bp と非常に断片化しており、プライマー-ITS3 及び ITS4 で増幅される PCR 産物の長さ (400bp) 以上の鋳型 DNA が存在しないためと考えられる。

そこで、Genbank から得た *Agaricus* 属 (35 種) の ITS2 領域の DNA 配列を基に、プライマー-ITS3 及び ITS4 で増幅される領域 (約 400bp) を 200bp 未満の 3 つの領域に分割し、それぞれの領域を増幅するために新たに 4 種類のプライマーを設計した (Fig.1)。プライマーの組み合わせを ITS3-ITSA、ITSB-ITSC 及び ITSD-ITS4 とし、PCR を行った結果を Fig.4 に示す。3 つの領域の全てにおいて、140~180bp の予定された増幅産物を確認した。

3.4 分子系統解析

各試料の ITS2 領域の塩基配列と Genbank に登録されている *Agaricus* 属の同塩基配列との相同性検索を Genetyx Win ver.6 (Genetyx Corp., Japan) を用いて行った結果、いずれの試料も *Agaricus bisporus* (和名: ツクリタケ) と 98~100% の一致率を示した。また、各試料間の塩基配列の一致率は 99~100% であった。

更に、各試料の塩基配列データに Genbank の登録データ (*Agaricus* 属 35 種、外群として *Chlorophyllum* 属 1 種) を加えて、近隣結合法により分子系統解析を行った結果を Fig.5 に示す。

マッシュルーム調製品 (輸入貨物 1 検体及び市販品 12 検体) 及び生鮮マッシュルーム (2 検体) の全てが、ブートストラップ確率 95% で、Genbank に登録されたツクリタケ (*Agaricus bisporus*) とクラスターを形成した。マッシュルーム調製品とツクリタケとの遺伝子距離は、0.000 から 0.009 であり、マッシュルーム調製品とツクリタケの次に近縁関係を示した *A. subperonatus* との遺伝子距離は、0.017 から 0.023 であった。これにより、今回調査したマッシュルーム調製品の原料種は、全てツクリタケであると推定された。また、試料 F を除き、中国産以外のマッシュルーム調製品は全て同じクラスターにまとまったことから、中国産以外のマッシュルーム調製品は、同一又は近縁の株を使用している可能性が示唆された。

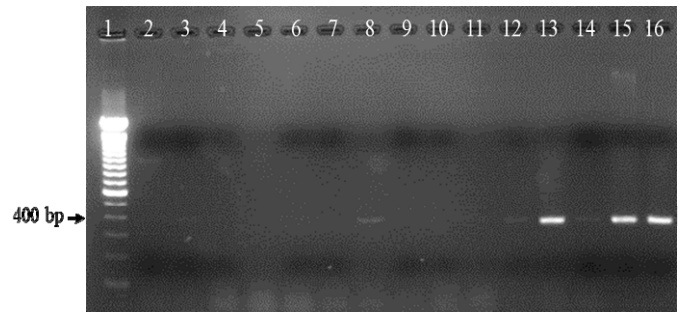


Fig.3 Result of the PCR amplifications for the nrITS2 region of 15 mushroom samples with the primers set ITS3⁷⁾ and ITS4⁷⁾
Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lanes 2 to 14: processed mushroom samples A to M, Lanes 15 and 16: fresh mushroom samples N and O, respectively.
The electrophoresis was performed on 2% agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

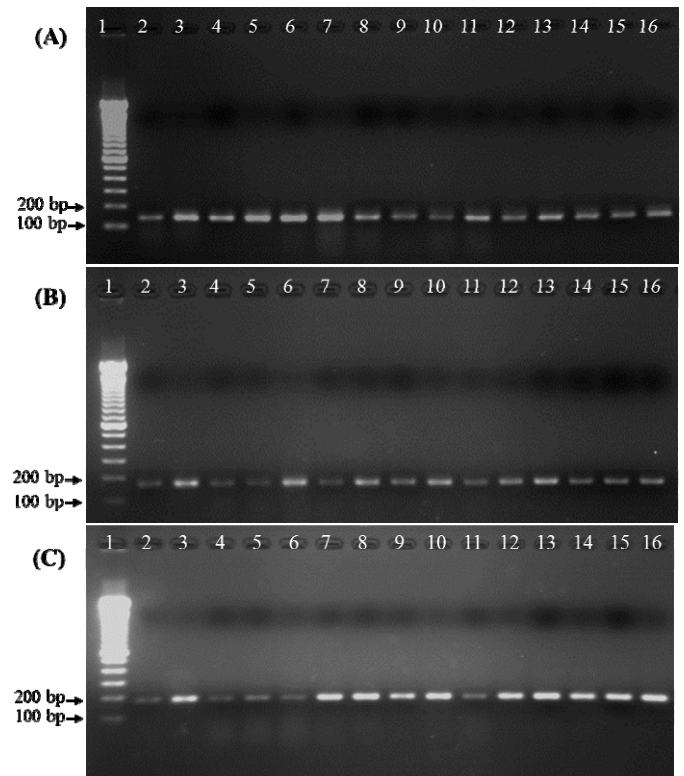


Fig.4 PCR amplifications for the three-divided nrITS2 regions of 15 mushroom samples with the primer combinations of A: ITS3⁷⁾ and ITSA, B: ITSB and ITSC, and C: ITSD and ITS4⁷⁾
Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lanes 2 to 14: processed mushroom samples A to M, Lanes 15 and 16: fresh mushroom samples N and O, respectively
Each electrophoresis was performed on 2% agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

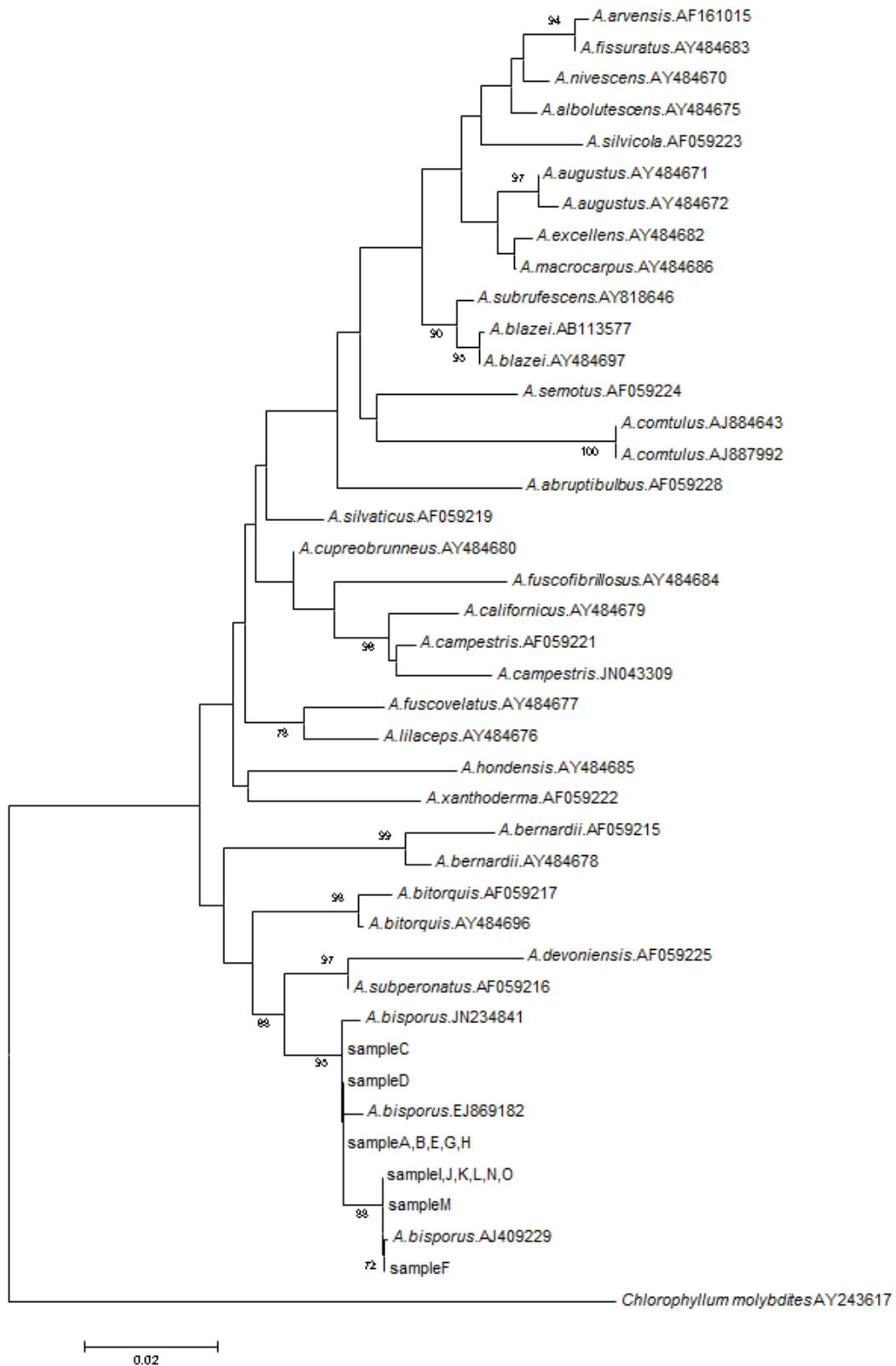


Fig.5 Neighbor-joining phylogenetic tree among 15 mushroom samples together with reference data from Genbank based on the nucleotide sequence of the nrITS2 and its adjacent region (400 bp)
Bootstrap values>70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications=1,000).

4. 要 約

マッシュルーム調製品からの DNA 抽出方法を検討した結果、ひだ部分を凍結乾燥又は液体窒素で凍結させた後、粉碎し、CTAB 法で抽出する方法が有効であることが分かった。マッシュルーム調製品の DNA は、そのサイズが 100~200bp と、非常に断片化していることが判明した。*Agaricus* 属の種判別に有効な ITS2 領域を増幅する公開されたプライマー (ITS3 及び ITS4) は、鋳型 DNA として 400bp 以上のものを必要とするため、このプライマー・セ

ットでマッシュルーム調製品の ITS2 領域を増幅するのは困難であった。このことから、同プライマー・セットで増幅される領域を 200bp 未満の 3 つの領域に分割し、それぞれの領域を増幅するための新たなプライマーを設計した。これらの新規プライマーを用いて、PCR 法で各試料から抽出した DNA の ITS2 領域を部分増幅後、DNA シーケンサーで得られた各塩基配列データを連結することにより、各試料の ITS2 領域の全長配列を得ることができた。ITS2 領域の全長配列を用いた分子系統解析により、今回調査したマッシュルーム調製品 (輸入貨物 1 検体及び市販品 12 検体) の原料種は、全てツクリタケ (*Agaricus bisporus*) であると推定された。

文 献

- 1) 須釜安正, 小池静司, 田村博, 世取山守, 篠原信勝: 栃木衛研所報, **23**, 57 (1993) .
- 2) 前田和彦, 持田裕介, 小松万記, 越智友也, 長瀬光俊, 会見忠則: 日本きのこ学会誌, **16**, 123(2008).
- 3) 昌山敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀雅美, 山野哲夫, 清水充: 食衛誌, **53**, 237 (2012).
- 4) Dentinger B.T.M., Didukh M.Y., Moncalvo J.M.: *Plos One*, **6**, e25081 (2011).
- 5) Wallance L.J., Boilard S.M.A.L., Eagle S.H.C., Spall J.L., Shokralla S., Hajibabaei M.: *Food Res Int*, **49**, 446 (2012) .
- 6) Woolfe M., Primrose S.: *Trends Biotechnol*, **22**, 222 (2004).
- 7) White T.J., T. Bruns, S. Lee, J.W. Taylor, "PCR Protocols: A Guide to Method and Applications", P.315 (1990), (Academic Press Inc.).
- 8) Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.: *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673 (1994).
- 9) Tamura K., Petero D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.: *Mol Biol Evol*, **28**, 2731 (2011).
- 10) Tamura K., Nei M.: *Mol Biol Evol*, **28**, 2731 (1993).
- 11) Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Perez-Martin R.I., Rey-Mendez M., Mackie I.M.: *J Agric Food Chem*, **46**, 1662 (1998).