

毒キノコによる食中毒の検査体制の構築

野田拓史(福井県衛生環境研究センター)

【1. 背景】

毒キノコによる食中毒が発生した場合、原因調査として残された喫食物の形態学的観察による鑑別を行うが、調理加工されたものや細断されたものは鑑別困難となる。そこで、そのような場合でも迅速かつ高精度に鑑別可能な方法として、遺伝子検査法について検討した。今回の検討では、国内で最も食中毒事例の多いツキヨタケを対象とした。

【2. 実験方法】

2-1. DNA抽出

下記に示す抽出キットを用いてキノコからDNA抽出を行った。具体的な抽出方法は図1~図3のとおり。

<DNA抽出キット>

- Genomic-Tip 20/G (QIAGEN)
- DNeasy Plant Maxi kit (QIAGEN)
- DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)

<キノコ>

- ツキヨタケ
- エリンギ
- エノキ
- シメジ



ツキヨタケ (*O. japonicus*)

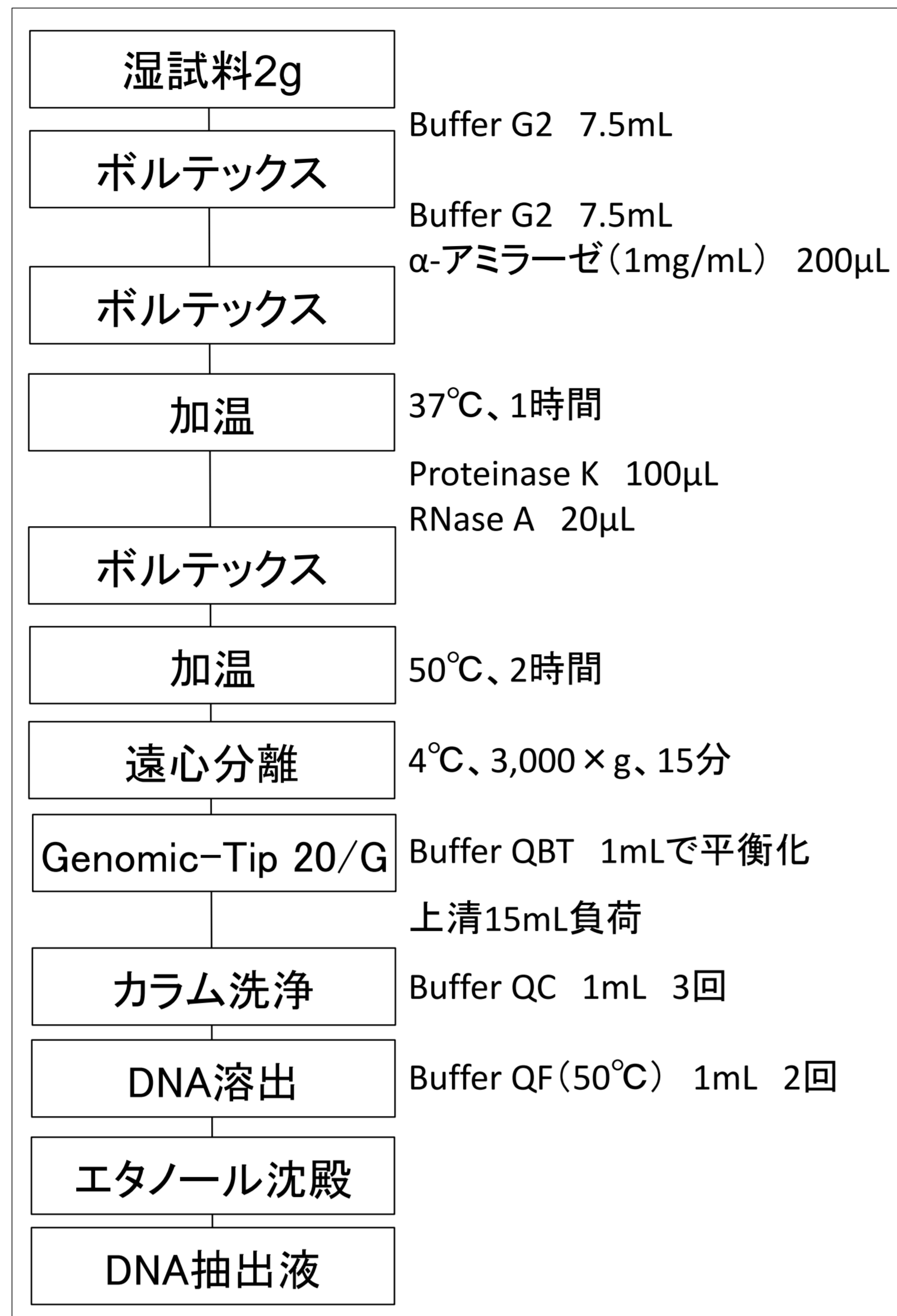


図1 Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出法

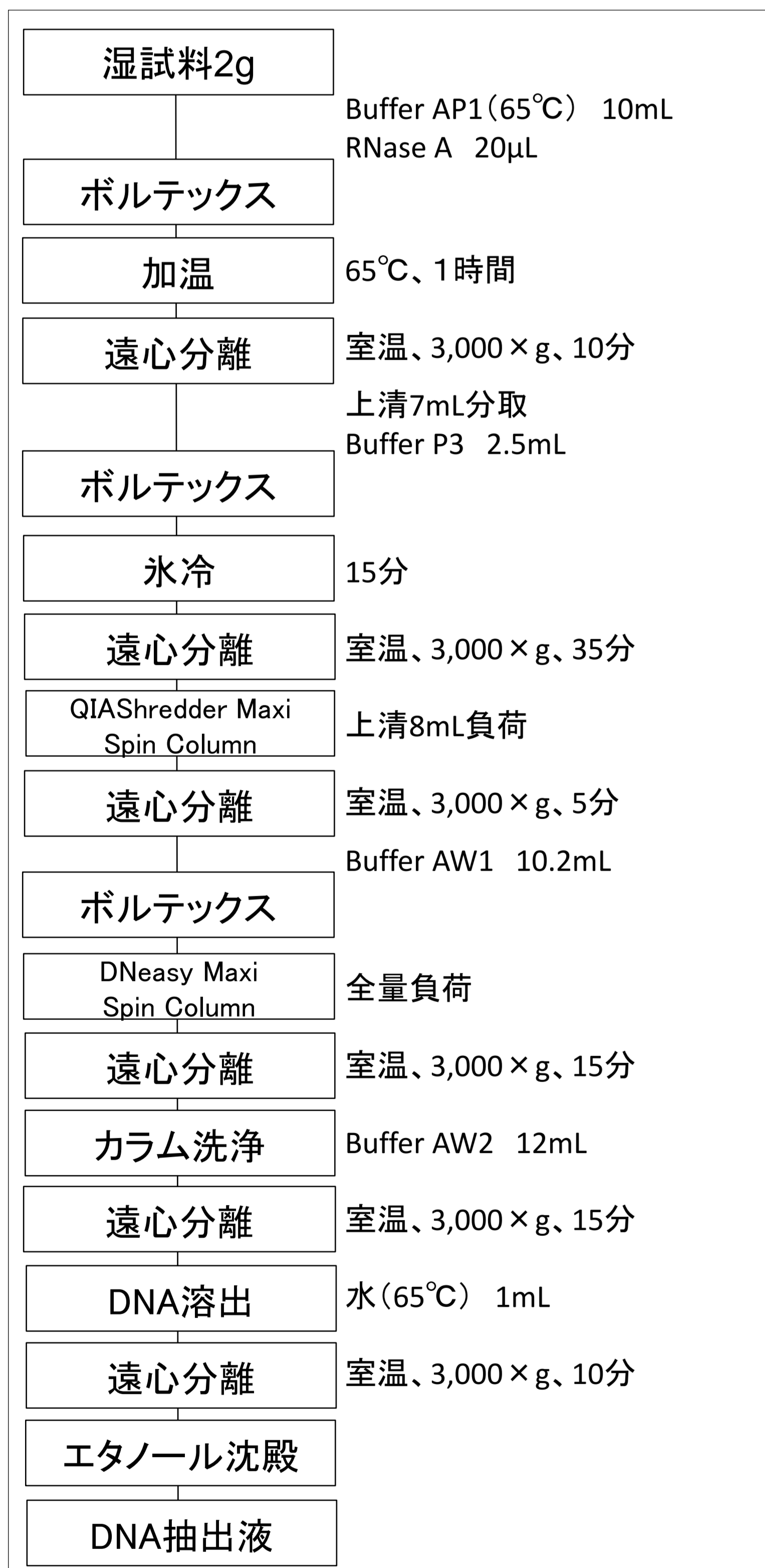


図2 DNeasy Plant Maxi kitによるDNA抽出法

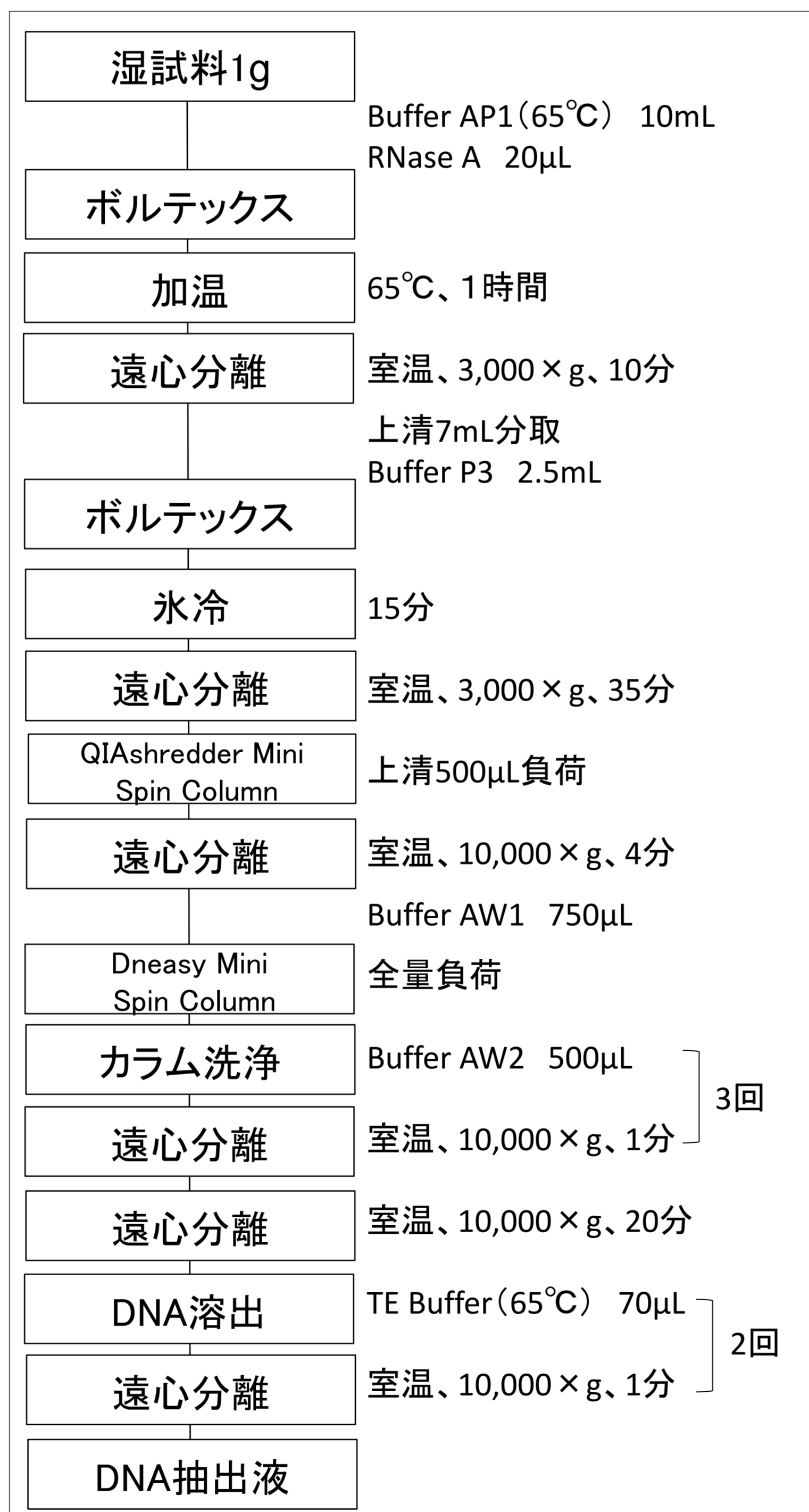


図3 DNeasy Plant Mini kitによるDNA抽出法

2-2. PCR反応

得られたDNA抽出液を鋳型とし、表1に示すプライマーを用いてPCRを行った。反応液は図4のとおり調製し、図5に示す条件で反応させた。得られたPCR産物をAgilent 2100バイオアナライザ(Agilent Technologies)により電気泳動した。

表1 使用したプライマー

Targeted species	Name	Length(bp)	sequence(5'-3')	Position
<i>O. japonicus</i>	OJSP-F	19	GTGCACGTTTCCTTTCAAT	59-77
	OJSP-R	20	AGAATCATCAACAGAGCTGC	165-146
Universal	ITS1	19	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Variable
	ITS2	20	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	Variable
	ITS3	20	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Variable
	ITS4	20	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Variable

water	15.475 μL
10 × PCR Buffer	2.5 μL
dNTP Mix (2mM each)	2.5 μL
MgCl ₂ Solution (25mmol)	1.5 μL
5' プライマー (25 μM)	0.2 μL
3' プライマー (25 μM)	0.2 μL
AmpliTa ^q Gold DNA Polymerase (5U/μL)	0.125 μL
DNA抽出液 (20ng/μL)	2.5 μL
	25 μL

図4 反応液の調製

Initial denaturation	95°C	5分
Denaturation	95°C	30秒
Annealing	60°C	30秒
Extension	72°C	30秒
Final extension	72°C	7分

図5 反応条件

【3. 結果および考察】

3-1. DNA抽出法の検討

キノコからDNAを抽出する方法について3種のDNA抽出キットを用いて検討した。得られたDNA抽出液中のDNA濃度を超微量分光光度計NanoDrop2000(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した(表2)。まず、食用キノコ(エリンギ、エノキ、シメジ)で検討したところ、Genomic-Tip 20/Gにより得られたDNA抽出液が最もDNA濃度が高く、A₂₆₀/A₂₈₀が約1.8であり十分に精製できていた。次に、ツキヨタケからGenomic-Tip 20/Gを用いて抽出を行ったところ、十分量のDNAが抽出できたため、これらのDNA抽出液を20ng/μLに調製しPCRに用いた。

表2 各DNA抽出液中のDNA濃度

	エリンギ	エノキ	シメジ	ツキヨタケ
Genomic-Tip 20/G	162.7	100.1	80.7	85.2
Dneasy Plant Maxi kit	23.3	22.1	23.7	-
Dneasy Plant Mini kit	3.3	4.3	2.7	-

※単位はng/μL

3-2. ITS領域の検出

キノコの分類・同定に広く活用されるInternal transcribed spacer (ITS) 領域にはITS1領域とITS2領域が存在し、これらの検出を試みた。ITS1領域はプライマー(ITS1/ITS2)を用い、ITS2領域はプライマー(ITS3/ITS4)を用いてPCR増幅した。PCR産物を電気泳動した結果、ITS1領域のPCR産物は320~340bpに、ITS2領域のPCR産物は350~500bpにバンドが検出された(図6)。これにより、ユニバーサルプライマーを用いたPCRによりITS1領域およびITS2領域を検出でき、内部コントロールとして使用可能であると考えられた。

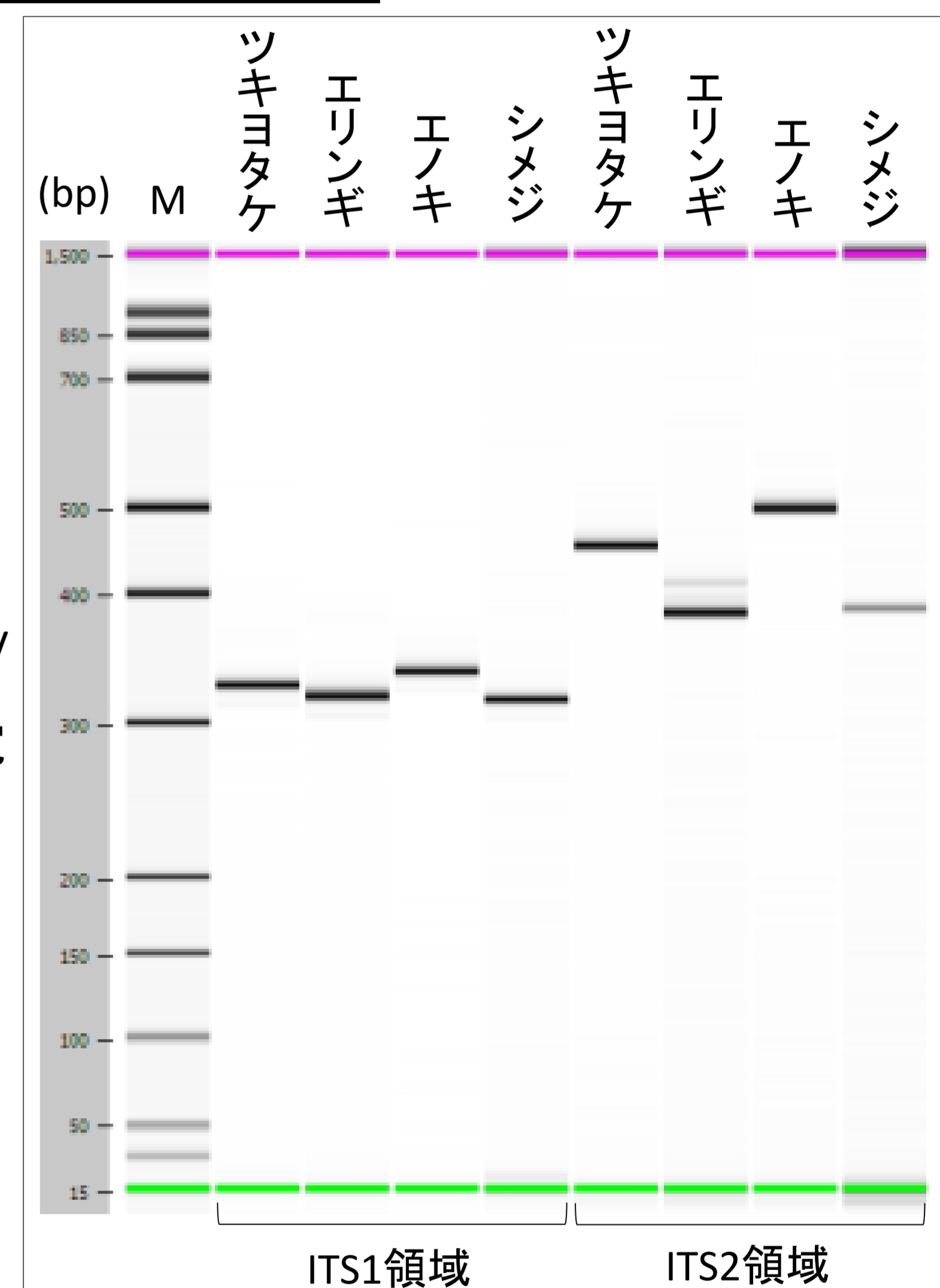


図6 ITS1領域およびITS2領域のPCR産物

3-3. ツキヨタケ特異的遺伝子の検出

ITS1領域に認められるツキヨタケ特異的遺伝子を標的としたプライマー(OJSP-F/OJSP-R)を用いて、ITS1領域の検出を確認したDNA抽出液に対してPCRを行った。PCR産物を電気泳動した結果、ツキヨタケからは約110bpにバンドが検出されたが、他のキノコからはバンドが検出されなかった(図7)。

このことから、プライマー(OJSP-F/OJSP-R)を用いたPCRにより、ツキヨタケを特異的に検出できることが確認できた。

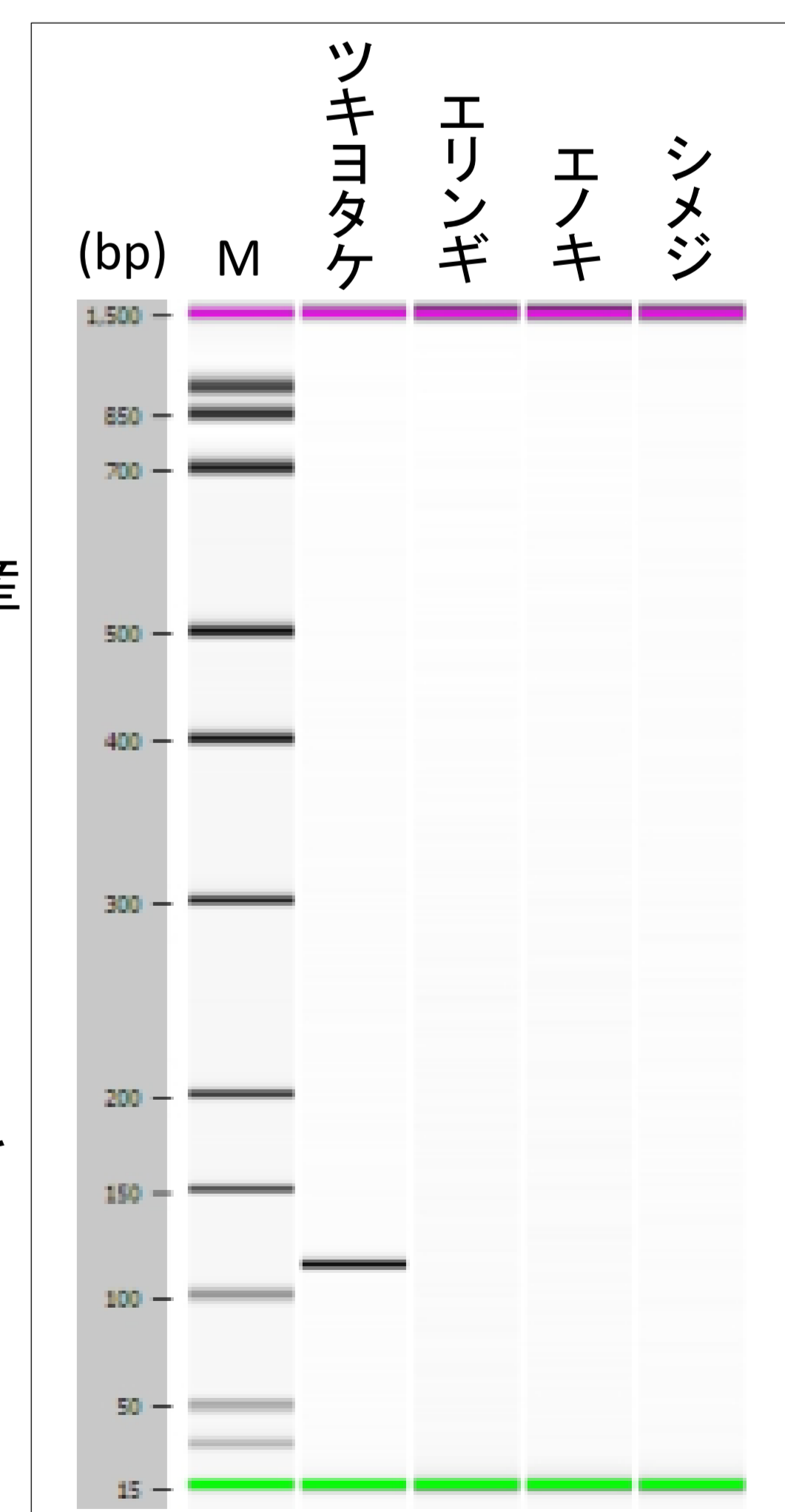


図7 ツキヨタケ特異的遺伝子のPCR産物

【4. まとめ】

ITS領域を用いた遺伝子検査法によるツキヨタケ鑑別法を検討した。キノコから抽出したDNAに対し、ユニバーサルプライマーおよびツキヨタケ特異的遺伝子を標的としたプライマーを用いたPCRにより、ツキヨタケの鑑別が可能であった。

今後は、加熱等の調理加工の程度が高い状態のキノコでも本法により鑑別可能か検討する。