

## PCR-SSCP分析およびRAPD分析を用いたキノコの識別法

九州大学農学部 富田 啓治・白石 進  
森林総合研究所九州支所 宮崎 和弘・根田 仁

## 1. はじめに

キノコはこれまで主に子実体の色、形、大きさなどの形態的特徴を指標として利用した分類が行われてきた<sup>3)</sup>。しかし、栽培環境によっては子実体の形態が変化したり、時には子実体を形成しない場合もある<sup>4)</sup>。そこで子実体の形態によらない、確実なキノコの識別法の確立が必要である。

近年のDNA分析技術の発展により、形態的特徴だけでなく、遺伝情報本体であるDNAを直接分析することでより正確な分類が可能となった。本研究ではシイタケ10菌株についてRAPD (random amplified polymorphic DNA) 法<sup>5)</sup>を用いてクローン識別を行うとともに、DNA型による種内品種の分類を行った。また、一般になじみの深い食用キノコの、rDNAの内部転写スペーサー (ITS) 領域についてPCR-SSCP (single-strand conformation polymorphisms) 分析<sup>1)</sup>を行うことにより、簡便な種の識別法の確立を試みた。

## 2. 材料と方法

## (1) 供試材料

RAPD分析にはシイタケ野生株3菌株、栽培品種7菌株の計10菌株(表-1)、PCR-SSCP分析は上記のシイタケ10菌株と、一般に市販されている食用キノコを

表-1 シイタケ供試材料

サンプル	出 所	
1	野生株	宮崎県北川
2		大分県米入津村
3		宮崎県綾町
4	栽培品種	大貫菌じん1号
5		秋山種菌A-20号
6		深田食菌K. K. 14号
7		ヤクルト春秋5号
8		北研600
9		北研58
10		市販*

\* : 市販のもののため品種名不明

表-2 SSCP分析供試材料

和 名	科	学 名
シイタケ	ヒラタケ科	<i>Lentinus edodes</i>
ウスヒラタケ		<i>Pleurotus pulmonarius</i>
ヒラタケ		<i>P. obtreatus</i>
オオヒラタケ		<i>P. cystidiosus</i>
クロアワビタケ		<i>P. abalonus</i>
ブナシメジ	キシメジ科	<i>Hypsizygus marmoreus</i>
エノキタケ		<i>Flammulina velutipes</i>
マツタケ		<i>Tricholoma matsutake</i>
クリタケ	モエギダケ科	<i>Naematoloma sublateralitium</i>
ナメコ		<i>Pholiota nameko</i>
マイタケ	サルノコシカケ科	<i>Grifola frondosa</i>

中心に、11種類のキノコについて行った(表-2)。

## (2) DNA抽出

菌糸体または子実体から改良CTAB法<sup>2)</sup>により抽出し、Bio-Mag (PerSeptive Diagnostics社)を用いて精製した。

## (3) RAPD分析

PCRは、50mM Tris-HCl pH 8.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 500μg/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0% (w/v) Ficoll, 4mM Tartrazine, 0.1mM EDTA, 0.04units/μl *Tth* DNA polymerase, 0.25M プライマー, 1ng/μl 鋳型DNAの溶液組成で、93℃で1分間熱変性したのち、93℃5秒(変性)、36℃5秒(アニーリング)、72℃15秒(伸長)を60回繰り返す、最後に72℃で2分間の伸長を行った。PCRによって得られた増幅産物は、1%アガロースゲルを用い、TBE緩衝液で約3時間電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、302nmUVトランスイルミネーター上で観察した。

## (4) PCR-SSCP分析

PCRによりrDNAのITS領域を増幅した。PCRは1mM Tris-HCl pH8.3, 5mM KCl, 0.35mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP, 0.05unit/μl *AmpliTaq* DNA polymerase (Stoffel Fragment: PERKIN ELMER社), 0.05μM 各蛍光プライマー, 0.2ng/μl 鋳型DNAの溶液組成で、93℃で2分間熱変性したのち、93℃10秒(変性)、55℃30秒(アニーリング)、72℃60秒(伸長)を30回繰り返す、最後に72℃で7分間の伸長を行

Keiji TOMITA, Susumu SHIRAIISHI (Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812) and Kazuhiro MIYAZAKI, Hitoshi NEDA (Kyushu Res. Ctr. For. and Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860)

Identification of mushrooms using PCR-SSCP and RAPD analysis

った。PCRによって得られた増幅産物は、変性剤（ホルムアミド：タートラジン=125：1）と混合し、94℃で5分間熱変性を行った後、急速冷却した。自動蛍光シーケンサー（Pharmacia Biotech Japan）を用いて電気泳動を行い、蛍光のピークを検出した。

### 3. 結果と考察

シイタケ10菌株について、プライマーF-18を用いてRAPD分析を行った。この分析により得られたPCR増幅産物（バンド）のうち明瞭なものを3本選んだ。これらのバンドの有無によってシイタケ10菌株は、6タイプのDNA型に分類された。4菌株（A, C, D, F）はそれぞれ独自のDNA型を示し、それぞれ異なるクローンであることが明らかとなった。残りの2タイプ（B, E）には同一のDNA型を示す複数の菌株が存在した。これらのグループの中に同一クローンが存在しているか否かを明らかにするため、全PCR増幅産物（バンドパターン）を比較するDNAフィンガープリント分析を行った。使用したプライマーはA-01である。図-1に示すように、それぞれバンドパターンが異なっており、この2グループの中に同一のクローンが存在しないことが明らかとなった。

さらに、7プライマーを用いてシイタケ10菌株のDNA型による分類を行った。全部で12本の明瞭なバンドが得られた。これらのバンドの有無を整理した結果、シイタケ10菌株はそれぞれ異なるDNA型を示した。使用した7プライマーのクローン判別能は表-3に示すとおりである。7プライマーをすべて使用した場合、平均



図-1 プライマーA-01によるフィンガープリント  
1~10：個体番号 A~F：DNA型による分類  
M：サイズマーカー

表-3 各プライマーのクローン判別能

プライマー	最低判別能	平均判別能	最高判別能
A-01	0.45	0.41	0.05
B-01	0.70	0.58	0.30
B-20	0.42	0.29	0.18
F-18	0.34	0.21	0.02
K-06	0.36	0.27	0.16
N-09	0.70	0.58	0.30
O-02	0.70	0.58	0.30
	$0.79 \times 10^{-2}$	$1.32 \times 10^{-3}$	$0.78 \times 10^{-6}$

判別能は $1.32 \times 10^{-3}$ となり、約760タイプのDNA型の分類が可能である。このようにRAPD分析は、キノコのクローン識別に有効であるといえる。

PCR-SSCP分析は核ゲノムDNA中のリボソームRNA遺伝子にあるITS領域を用いて行った。PCR産物をアガロースゲルを用いて電気泳動した結果、シイタケにおいては、種内でITSの長さに変異は見られなかったが、その他のキノコは種によって若干の違いが認められた。シイタケ10菌株およびキノコ11種類のSSCP分析の結果を図-2, 3に示す。シイタケにおいては、1菌株（レーン1）だけが異なるバンドパターンを示したことから、種内変異の存在する可能性が示唆された。また、その他のキノコは種によってそれぞれ異なるバンドパターンを示し、SSCP分析を用いることで、簡便に種を識別できることが示された。

以上の結果から、これらのDNA分子マーカーが、キノコのより正確な分類、クローン識別に非常に有効であることが示された。

### 引用文献

- (1) ORITA, M. *et al.* : Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2766 - 2770, 1989
- (2) 白石 進・渡辺敦史：日林誌 77, 429 - 436, 1995
- (3) 高橋旨象：きのここと木材, pp141, 築地書館, 東京, 1989
- (4) 山中勝次：木材学会誌 41, 795 - 804, 1995
- (5) WILLIAMS J. G. K. *et al.* : Nucleic Acids Res., 18, 6531 - 6535, 1990

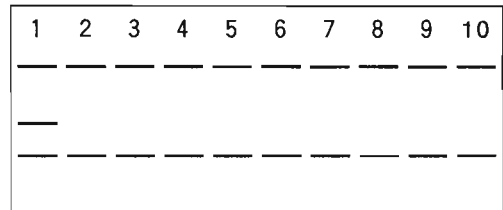


図-2 シイタケ10菌株のITSのSSCP分析によるバンドパターン

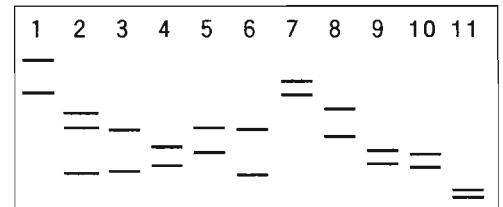


図-3 キノコ11種類のITSのSSCP分析によるバンドパターン

- lane 1：シイタケ                      lane 2：ウスヒラタケ  
lane 3：ヒラタケ                      lane 4：オオヒラタケ  
lane 5：クロアワビタケ              lane 6：ブナシメジ  
lane 7：エノキタケ                    lane 8：マツタケ  
lane 9：クリタケ                      lane 10：ナメコ  
lane 11：マイタケ