

DNA解析によるメシマコブの品種識別^{*1}中島 豊^{*2} ・ 三樹陽一郎^{*2} ・ 宮崎和弘^{*3}

キーワード：DNA, キノコ, メシマコブ

I. はじめに

メシマコブ (*Phellinus linteus*) は野生のクワ立木の心材腐朽菌で、タバコウロコタケ科キノコ属の硬質菌である。宮崎県北部山間地域ではクワナバと称され、健胃、整腸に珍重されてきた。その子実体は中国では古来から桑黄と呼ばれ薬用にされてきたが、近年、メシマコブの培養菌糸体由来の製品が輸入され、需要が増加している。しかし、メシマコブの野生子実体を採取することは稀で、市場にはメシマコブ以外のきのこが多く流通しているのが現状である (1)。これら市場品の子実体は完全なものは外部形態、顕微鏡的形態による同定も可能と考えられるが、十分な形態を残していないものは困難である。しかし、近年ではDNA解析技術を利用した食用きのこの品種識別が可能となってきた (2)。そこで、前述の問題を回避するために、DNA解析によるメシマコブの種及び品種識別方法の開発を目的として試験を行ったので、その結果について報告する。

II. 材料及び方法

(1) 供試材料

RAPD 及び PCR-SSCP 分析には当所保存のメシマコブ 5 菌株、マンネンタケ及びキノコ属 1 菌株の計 7 菌株を用いた (表-1)。

(2) DNA 抽出

SMY 液体培地で培養した菌糸体約 80mg (湿重) を凍結粉砕後 DNA 自動分離装置 (クラボウ PI-50 a) を用いて全 DNA を単離した。

(3) RAPD 分析

RAPD 分析による PCR 反応液 (10.0 μ l) の組成は 20ng 鋳型 DNA, PCR Buffer (10mM Tris-HCl, 10mM KCl, pH8.3), 0.20mM 各 dNTP, 0.25 μ M プライマー, 3.0mM MgCl₂, 0.5 Units AmpliTaq DNA Polymerase Stoffel Fragment (Applied

Biosystems 社) とした。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 を使用し、94°C で 60 秒間熱変性した後、94°C 10 秒 (変性), 36°C 30 秒 (アニーリング), 72°C 60 秒 (伸長) を 60 回繰り返し、最後に 72°C 120 秒の伸長反応を行った。PCR で得られた増幅産物は、2.0% アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーター上で DNA バンドを検出した。プライマーのスクリーニングには 112 種類のランダムプライマー (OPERON 社製, 10mer) を使用し、その中から極めて増幅効率が高く、かつ再現性の高かったプライマーを選抜した。

(4) PCR-SSCP 分析

PCR 反応液 (12.5 μ l) の組成は鋳型 DNA を 5 ng, 各プライマーを 0.05 μ M とし、PCR Buffer, 各 dNTP, MgCl₂ 及びポリメラーゼは上記 RAPD 分析と同様である。サーマルサイクラーは Mini Cyclyer (MJ Research 社) を使用し、まず 95°C 90 秒 (変性), 55°C 90 秒 (アニーリング), 72°C 120 秒 (伸長) を 10 回繰り返し、次に 95°C 60 秒, 55°C 90 秒, 72°C 120 秒を 30 回繰り返し、最後に 72°C 10 分の伸長反応を行った。増幅させた PCR 産物は 95°C 5 分間で一本鎖 DNA に熱変性させた後、氷上に急冷させた。この溶液を、ポリアクリルアミドゲル (5%) にロードし、電気泳動を行ってから展開し、メンブレンにプロットした。その後 UV 照射でクロスリンクさせ、Phototope Star Detection Kit (New England Biolabs 社) を使用して発色反応を行い、X 線フィルムに感光させてバンドを検出した。

III. 結果と考察

(1) RAPD 分析

プライマーのスクリーニングの結果、供試した 7 菌株のうちメシマコブ 5 菌株のみに同サイズのバンドが検出され、かつ系統間で多型的なバンドの保有が認められた 5 種類のプライマーが存在した。

^{*1} Nakashima, Y., Mitsugi, Y. and Miyazaki, K. : Identification of *Phellinus linteus* (*Berk. et Curt.*) Teng. with RAPD and PCR-SSCP analysis

^{*2} 宮崎県林業技術センター Miyazaki Pref. Forestry Tech. Ctr., Saigou, Miyazaki 883-1101

^{*3} 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. and Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

マーカーバンドがあるものを1, 無いものを0と表記し, その出現パターンを各菌株のDNA型とした(表-2)。プライマーA-01 (600bp), Q-14 (610bp), Q-18 (810bp), AH-06 (820bp), AH-09 (520bp)の各バンドはメシマコブ5菌株に共通に存在し, 種識別用として有望なマーカーと考えられた。

さらに, 同プライマーのA-01 (720bp), Q-14 (850bp), Q-18 (400bp), AH-06 (510, 720bp), AH-09 (650bp)を組み合わせるとメシマコブ5菌株間がそれぞれ独自のDNA型を示した。よって, 供試した5菌株はすべて異なる系統であることが認められた。

最終的に, 共通バンドである5マーカーと多型バンドである6マーカーの合計11マーカーをメシマコブの系統識別用に有効なRAPDマーカーとして選抜した。

(2) PCR-SSCP分析

メシマコブ5菌株では, ITS領域の増幅産物の長さに違いはなく, マンネンタケ, キコブタケとは違いが認められた。また,

SSCP解析を行っても, メシマコブ5菌株間で共通のSSCPパターンを示した(図-1)ことから, ITS-1領域のSSCP解析がメシマコブの種識別に有効であることが示唆された。

IV. まとめ

今回の試験結果から, RAPD分析とSSCP分析がメシマコブの識別に有効であることが示された。

今後, さらに識別に有効なプライマーの探索, 今回共通バンドとして有効性の示されたRAPDマーカーの解析等を行い, より正確で再現性の高い解析方法を検討したい。

引用文献

- (1) 久田陽一ほか(2002) Natural Medicines 56 (1): 21-23.
- (2) 富田啓治ほか(1996) 日林九支研論 49: 191-192.

	サンプル	採取地
1	メシマコブ1	宮崎県野尻町
2	〃 2	長崎県男女群島
3	〃 3	宮崎県南郷村
4	〃 4	宮崎県小林市
5	〃 5	岐阜県神岡町
6	マンネンタケ	宮崎県高岡町
7	キコブタケ	宮崎県高岡町

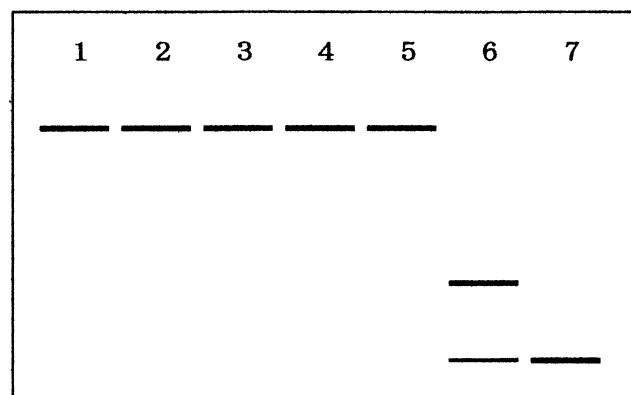


図-1. 7菌株のPCR-SSCP分析によるバンドパターン
lane 1~5:メシマコブ各系統(番号は表-1に対応)
lane 6:マンネンタケ
lane 7:キコブタケ

表-2. メシマコブのRAPD分析

サンプル名	(Primer) (bp)	A-01		Q-14		Q-18		AH-06			AH-09		DNA Type	
		600	720	610	850	400	810	510	750	820	520	650		
メシマコブ1		1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	A	a
メシマコブ2		1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	A	b
メシマコブ3		1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	A	c
メシマコブ4		1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	A	d
メシマコブ5		1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	A	e
マンネンタケ		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	f
キコブタケ		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	f
マーカー区分※		S	C	S	C	C	S	C	C	S	S	C	S	C

※ S:種識別用マーカー C:系統識別用マーカー