

(別紙様式第3号)

## 学位論文要旨

氏名：前田和彦

題目：法科学への応用を目的としたきのこのDNA鑑定システム開発に関する研究

Title : Development of DNA diagnosis system for species identification of edible and poisonous mushrooms

本研究は前半部分において、菌根菌きのこの「DNA鑑定技術による生物種検定法の開発」を試みた。そして、後半部分では、きのこの形態学的特徴による分類に依存しない「加工調理したきのこのDNA鑑定」、さらに、「DNA鑑定技術による迅速な毒きのこ中毒診断システムの開発」を検討した。

### 1 DNA鑑定による生物種検定法の開発

ホンシメジをモデルとし「mt SSU rDNA V4領域の塩基配列」と「形態学的な種」、および「生物種」の関係を比較し、mt SSU rDNA V4領域の塩基配列解析により、きのこの生物種が識別できるか検証をした。

#### (1) プロトプラスト法による生物種の検定法の開発

菌根菌のホンシメジは、人工栽培が困難なきのこであるため、交配用の単孢子分離株が得られにくい。そのため、ホンシメジは「形態学的な種」と「生物種」が一致していない可能性がある。そこで、ホンシメジ二核菌株をプロトプラスト化することにより一核菌株を分離し、交配試験が可能かどうかを検討した。その結果、ホンシメジの二核菌株10株をプロトプラスト化し、得られた再生株から4株を親株とする一核菌株70株が作出できた。その内、親株の両方の交配型を持つ株が1菌株、残りの3菌株から分離した一核菌株は、親株の片方の交配型を持っていた。以上のことから、プロトプラスト再生株によって、ホンシメジの生物種を決定する一核菌株が取得でき、単孢子分離が困難なマツタケなどの菌根菌の育種へ利用され、さらに、この技術は、種苗登録の基準となる「生物種」の検定に応用できることが示唆された。

#### (2) mt SSU rDNAの塩基配列解析による生物種の検定

ホンシメジと称される菌株について、mt SSU rDNA V4領域の塩基配列の分子系統解析を行ったところ、2つのクラスター(Cluster 1, 2)を形成した。また、プロトプラスト技術により、Cluster 1, 2間の交配試験を行ったところ、Cluster間で和合性を示さず、Cluster 1とCluster 2に属する菌株は、異なる生物種であると考えられた。これらのことより、ホンシメジと称されるきのこの中に形態が酷似した2つの生物種が存在する可能性が示唆された。

したがって、mt SSU rDNA V4 領域の塩基配列の違いは、生物種を反映しており、その塩基配列の比較による DNA 鑑定が可能となった。つまり、マツタケなどの菌根菌の育種や種苗登録の基準となる生物種の検定に、この DNA 鑑定技術が応用可能となった。

## 2 DNA 鑑定による加工食品中のきのこの同定法の開発

加工調理により原形をとどめていないきのこ実体の DNA 鑑定を開発するため、シイタケおよびマッシュルームをモデルケースとして、様々な加工調理をしたきのこ実体から DNA を抽出し、DNA の分解程度を検討した。その結果、“焼き”、“炒め”、“揚げ”の調理は高温であるが、短時間しか熱にさらされないため DNA の低分子化は、ほとんど認められなかった。しかし、“茹で”調理では、調理時間が長くなるにつれ DNA の低分子化が著しくなった。次に、これらの調理したきのこ実体から抽出した DNA を鋳型として PCR 増幅できるか検討した。DNA の低分子化が顕著な缶詰、レトルト製品の場合でも、250 bp 程度の断片が増幅可能であり、その塩基配列を解析したところ、ツクリタケ (*Agaricus bisporus*) JB3 株の ITS 1 領域の塩基配列と 100% 相同性を示した。以上のことから、加工食品に含まれるきのこ実体の DNA 鑑定が可能となった。

## 3 DNA 鑑定技術による迅速かつ種特異的な毒きのこ検出法の開発

日本で発生するきのこ中毒の原因となる主要毒きのこ 4 種類（ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ドクササコ、カキシメジ）について、救急医療現場での毒きのこの迅速診断システムの開発を検討した。毒きのこの種特異的プライマーを設計し、それぞれ対応する毒きのこのゲノム DNA をリアルタイム PCR で増幅したところ、種特異的に増幅した。さらに、加熱調理した毒きのこ実体についてもリアルタイム PCR を使用して、短時間で、種特異的に毒きのこを同定できた。これらのことから、リアルタイム PCR を使用して、加工調理した毒きのこを迅速・正確に同定できる DNA 鑑定技術が開発された。

以上のことから、本研究によって、菌根菌きのこの「DNA 鑑定技術による生物種を確立するための生物種検定法の開発」、および、「DNA 鑑定技術による迅速な毒きのこ中毒診断システムの開発」の 2 つの DNA 鑑定技術が確立された。