

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	前田和彦
審査委員	主査 會見 忠則 (印) 副査 前川二太郎 (印) 副査 滝本 晃一 (印) 副査 荒瀬 榮 (印) 副査 時本 景亮 (印)
題目	<b>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 (Development of DNA diagnosis system for species identification of edible and poisonous mushrooms)</b>
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>法科学とは、法令違反に関する捜査上の鑑定や法令で定められている検査・調査などが公正に行われるための方法（公定法）を提供する学問で、農学・生物学の分野においては、きのこの加工品の原材料や種・品種の同定技術などの適用が可能である。きのこの種を同定する法科学的なニーズは多く、例えば、新品種の申請時の種の確認や、毒きのこ中毒の中毒原因の特定などが考えられる。しかし、これらの鑑定は、形態学的特徴により同定が行われているため、高度な専門的知識や熟練した技術が必要である。そこで、本研究では、公定法となりえる様なきのこの DNA 鑑定システムの開発を試みた。</p> <p><b>きのこの生物学的種の検定法の開発</b></p> <p>ホンシメジの「mt SSU rDNA V4 領域の塩基配列」と「生物学的種」の相関関係について検証を行い、V4 領域の塩基配列解析により、生物学的種が識別できるか検討した。ホンシメジと称される 12 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 Cluster 1 および Cluster 2 を形成した。この2つの Cluster の違いが、生物学的種の違いか検討するために、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、Cluster 1, 2 間の交配試験を行った。その結果、Cluster 間で和合性を示さず、Cluster 1 と 2 に属する菌株は、異なる生物学的種であると考えられた。従って、mt SSU rDNA V4 領域の塩基配列の違いは、生物学的種を反映しており、その塩基配列の比較による DNA 鑑定が可能となった。さらに、多くのきのこの種についても相関が確認できれば、シーケンス法による「きのこの生物学的種の検定法」を公定法として利用し、新品種の申請時にきのこの菌株の種の検定の省力化が可能である。</p>	

## 迅速なきのこの同定法の開発

救急医療現場や薬物取締りでは一刻を争うため、迅速な鑑定が求められる。食中毒原因の毒きのこや麻薬きのこを同定するために中毒（麻薬）成分を機器分析により検出する方法が考えられるが、時間を要する、中毒成分が同定できない場合があるなど、緊急を要する法科学の現場には不向きである。そこで、きのこの迅速な鑑定を行うために、種特異的プライマーを用いた検出方法を考えた。ところで、事件・事故で対象とするきのこは、加熱により DNA が損傷を受けている可能性がある。そこで、種特異的プライマーを設計条件の検討のために、高度に加熱されていると思われる缶詰、レトルトなどを用いて検討した。その結果、缶詰およびレトルトでは、ユニバーサルプライマーによる約 350 bp の断片が増幅できなかった。そこで、250 bp 程度の DNA 断片を増幅可能なプライマーを設計し、PCR 増幅を試みたところ、PCR 増幅産物が確認できた。さらに実際の現場を想定し、缶詰のツクリタケの焼き、炒め、揚げ、茹での各調理、およびレトルトを加熱調理した場合においても検討したところ、いずれも約 250 bp の PCR 増幅産物が検出でき、どのような加工品のきのこからでも 250bp までの DNA であれば PCR 増幅できるということが確認できた。

以上の知見を基に、毒きのこの迅速診断システムの開発をするため、日本の毒きのこ中毒の原因となる上位 4 種類の毒きのこ（ツキヨタケ、クサウラボニタケ、ドクササコ、カキシメジ）の種特異的プライマーを設計し、リアルタイム PCR で検出を試みたところ、DNA 抽出開始から判定までおよそ 1.5 時間で種特異的に毒きのこが検出できた。さらに、加熱調理した毒きのこが検出できるか検討したところ、いずれも種特異的に検出できた。

以上のことから、本研究では、2 種類の DNA 鑑定システムの検討を行った。法科学で対象となるきのこの同定は、加熱調理による DNA の断片化や、迅速な鑑定が求められることを考えると、種特異的プライマー及びリアルタイム PCR を用いる方法が公定法として有効であると考えられた。つまり、リアルタイム PCR による迅速なきのこの鑑定法が公定法として法科学の現場において有効な、きのこの DNA 鑑定システムになるものと考えられる。

このように、本学位論文では、法科学におけるきのこの DNA 鑑定法について追求し、これまでの形態学的な同定法の問題点を克服した。本研究で提案したシステムは、現場で直ちに利用可能な技術として有用であり、博士学位として十分な価値を有すると判定した。