

クサウラベニタケ類とその近縁種の判別法

有毒きのこであるクサウラベニタケ近縁種は、食用のウラベニホテイシメジとともにハラタケ目イッポンシメジ科イッポンシメジ属 (*Entoloma*) に属し、形態学的には種内においても変化がありほかの *Entoloma* 属きのこと多様なグループを形成している。2019 年に日本国内でこれまでクサウラベニタケと考えられてきた毒きのこは以下の新規 3 種 *E. lacus*、*E. subrhodopolium*、*E. pseudorhodopolium* (コガタクサウラベニタケ、クサウラベニタケモドキ、ニセクサウラベニタケ) であることが報告された。本検査法は、これらのクサウラベニタケ近縁種 3 種を対象とした食毒判別法、およびリアルタイム PCR を用いた同定法である。

I. PCR-RFLP 法

簡便な方法で、PCR とゲル電気泳動を用いる

1 PCR テンプレート調製

- 1) あらかじめヒートブロックを 100°C に設定する。
- 2) 検体を DW にて洗浄し、表面についているゴミを取り除く。
- 3) 1.5mL 容 tube に wet 100 mg (or Dry 20 mg) 以上を移し、マッシャーで十分にすりつぶす。
- 4) PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400 μ L を添加し、ボルテックスにより懸濁する。
- 5) 懸濁液を 100 °C 下 10 分間、加温する。
- 6) 13000 \times g で 2 分間遠心し、残渣を沈殿させる。
- 7) 得られた上清を新しい 1.5mL 容 tube に移し、PCR テンプレートとする。

2 PCR

以下の表に記す PCR 反応組成および温度条件のもと PCR 試験を行う。

- 1) 生または冷凍または乾燥きのこの場合は rDNA ITS 領域 (ITS) Primer を用いる。
- 2) 加熱・消化されたきのこを用いる場合は Short PCR Primer を用いる。

[PCR 反応液組成] (例) 50 μ L 反応系

2 \times Ampdirect $\text{\textcircled{R}}$ Plus	終濃度	1 x	25.0	μ L
BIOTAQ TM HS DNA Polymerase (5U/ μ L)*		1.25U/50uL	0.25	μ L
10 μ M 5'-Primer	終濃度	0.5 μ M	2.5	μ L
10 μ M 3'-Primer	終濃度	0.5 μ M	2.5	μ L
Template DNA (上清)			1.0	μ L
DW		全量 50 μ L とする量	18.75	μ L

[PCR サーマルサイクル]

95°C	10 min	1 cycle
95°C	30 sec	
55°C	1 min	40 cycles
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 cycle
4°C		∞

3 制限酵素処理

PCR 産物を精製したのち、酵素処理を行う。

[PCR 産物の精製] (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system)

- 1) Load of Mem Bind Solution. 50 μ L with PCR products 50 μ L
- 2) Load mixture onto SV column, standing for 1 min and centrifuge at 13000 \times g, for 1 min
- 3) Wash column twice, with mem wash solution. 700 μ L (500 μ L)
- 4) Ex. 13000 \times g, 1 min
- 5) Load 50 μ L of DW onto column, standing 1 min and centrifuge at 13000 \times g, for 1 min
- 6) Provide the frow-through to Restriction enzyme treatment

[酵素反応液組成] (例) 50 μ L 反応系

Buffer	5.0	μ L
RE (DNA 1 μ g に対して 10 units 使用)	1.0	μ L
Purified PCR products	2.0	μ L
DW	42.0	μ L

酵素種類	温度条件	処理時間 (FastDigest)
<i>Msl</i> I	37°C	>30 min
<i>Dde</i> I		5 min
<i>Hae</i> III/ <i>Hinc</i> II		5 min

4 アガロースゲル電気泳動による判定

Agarose 21(3% in TAE buffer)を用いて電気泳動し、得られたバンドパターンにより判定する。

[制限酵素処理断片の泳動パターンモデル]

<i>Msp</i> I				<i>Dde</i> I				<i>Hae</i> III/ <i>Hinc</i> II			
毒1	毒2	毒3	食	毒1	毒2	毒3	食	毒1	毒2	毒3	食
1000	1000	1000				700		600		600	700
			500	500	480				500		
			300				3-400	200	200	200	200
主に食・毒の判別 毒1～3は制限処理を受けない				毒区分中の品種判別 毒1と毒2, 3を分ける				系統の近・遠の判別 毒3と毒1, 2を分ける			

毒1:クサウラベニタケモドキ, *E. subrhodopolium*, 毒2:ニセクサウラベニタケ, *E. pseudorhodopolium*, 毒3:コガタクサウラベニタケ, *E. lacus*, 食:ウラベニホテイシメジ, *Entoloma sarcopum*
ただし、実際は上記以外にエクストラバンドも出ることがあるので、判別には注意を要する。

II. Real-time PCR を用いた判別法

正確な種別判定を目的とする。

1 DNA 抽出精製

QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 使用する。手順は以下に示す。

- 1) あらかじめヒートブロックを 65°C に設定する。
- 2) 検体を DW にて洗浄し、表面についているゴミを取り除く。
- 3) 1.5mL 容 tube に wet 100 mg (or Dry 20 mg) 以上を移し、マッシャーで十分にすりつぶす。
- 4) 400 μ L の Buffer AP1 と 4 μ L の RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) を添加し、激しくボルテックスする。
- 5) 混合液を 65°C で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中にチューブを 2 ~ 3 回転倒混和する。
- 6) 130 μ L の Buffer P3 をライセートに添加後、混和し、5 分間氷上でインキュベートする。
- 7) 20,000 x g (14,000 rpm) で 5 分間ライセートの遠心操作を行なう。
- 8) 2 mL コレクションチューブ中にセットした QIAshredder Mini Spin Column (薄紫色) にライセートをピペットで入れ、20,000 x g (14,000 rpm) で 2 分間遠心操作する。
- 9) 新しい 2.0mL 容 tube (別途準備) に移した清澄済みライセートに 1.5 倍容量の Buffer AW1 を添加し、ピペットで混和する。
- 10) ステップ 9 の混合液 650 μ L を、2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column にピペットで移す。6,000 x g 以上で 1 分間遠心操作し、ろ液を棄てる。混合液がなくなるまでこれを繰り返す。
- 11) DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、Buffer AW2 500 μ L を添加し、6,000 x g 以上で 1 分間遠心操作する。ろ液を棄て、さらに 500 μ L の Buffer AW2 を DNeasy Mini Spin Column に添加し、20,000 x g で 2 分間遠心してメンブレンを乾燥させる。
- 12) DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5mL 容 tube (別途準備) に移し、40 μ L の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離し、溶出する。
- 13) ステップ 12 をもう一度繰り返し、得られた溶出液を合わせて PCR テンプレートとする。

生のきのこ検体の場合は DNA 濃度を測定し、10ng/ μ L に調製する。

加熱・消化された検体の場合は、溶出液をそのまま用いる。

2 Real-time PCR

反応液組成と検知対象ごとのプライマープローブ組み合わせは以下に記す。(配列は別表に示す)

試薬	Stock 濃度	1 reaction (25 μ L)	反応液中の 最終濃度
FastStart TaqMan Probe Master	x2	12.5 μ L	x1
Primer Forward-1	50 nmol/L	0.25 μ L	0.5 μ M
Primer Forward-2	50 nmol/L	0.25 μ L	0.5 μ M
Primer Reverse	50 nmol/L	0.5 μ L	1.0 μ M
probe	10 nmol/L	0.5 μ L	200 nM
DW		9.0 μ L	
PCR template		2.0 μ L	

検知対象		プライマー	プローブ
コガタクサウラベニタケ	毒	F1/F2/R1	<i>E. lacus</i>
クサウラベニタケモドキ	毒	F1/F2/R2	<i>E. subrhodopolium</i>
ニセクサウラベニタケ	毒	F1/F2/R3	<i>E. pseudorhodopolium</i>
ウラベニホテイシメジ	食	F1/F2/R	<i>E. sarcopum</i>

調製した各 PCR 反応液を 25 μ L/well となるよう測定用プレートに分注し、専用のシーリングホイルで密封する。以下の温度条件で測定を開始する。

step	description	cycles
1	95°C for 600 sec	1
2	95°C for 15 sec	45
	58°C for 60 sec	

得られたデータは用いた PCR 機器専用の解析ソフトを用いて解析する。