

ツキヨタケの遺伝子検出試験のための DNA 抽出法比較

近藤芳和子・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

Comparison of DNA Extraction Methods for *Omphalotus guepiniformis* Genetic Detection Test

Kanako KONDOU and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市内におけるツキヨタケによる食中毒疑い事例に備え、リアルタイム PCR を用いたプローブ法によるツキヨタケとシイタケの同時検出法の開発を行い、2012 年に報告した。その際の DNA 抽出方法は、液体窒素を用いて試料を凍結後粉碎し、シリカゲル膜タイプの抽出キットを用いるものであり、安全性等に課題があった。そこで、作業の簡便性及び安全性を考慮して液体窒素を用いない DNA 抽出法を検討した結果、十分な量の DNA を抽出することができた。また、得られた DNA についてリアルタイム PCR で測定したところ、ツキヨタケ遺伝子の有無を正しく判定できており、検討した抽出法が適用できることが確認できた。

Key Words : ツキヨタケ *Omphalotus guepiniformis*, 食中毒 food poisoning, DNA 抽出 DNA extraction

1 はじめに

ツキヨタケは、キシメジ科ツキヨタケ属のキノコであり、ブナやイタヤカエデなどに重なり合って発生する毒キノコである。毒成分として、イルジン S、イルジン M 及びネオイルジンを有し、誤って喫食すると食後 30 分から 1 時間程で嘔吐、下痢、腹痛等の消化器系の中毒症状が現れる。毒キノコによる食中毒は、毎年全国で発生しており、その中でもツキヨタケを原因とする食中毒事例は過半数を占める。厚生労働省の食中毒統計 (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html) によると令和元年から令和 5 年までの 5 年間で毒キノコを原因とする食中毒件数は 92 件であり、そのうちツキヨタケを原因とする食中毒は 51 件であった。

福岡市保健環境研究所（以下、「当所」とする。）では健康危機管理体制整備の一環として、リアルタイム PCR を用いたプローブ法によるツキヨタケの遺伝子検出試験法を開発し 2012 年に報告¹⁾した。しかし、抽出法は液体窒素を用いて試料を凍結乾燥させ、粉碎後にシリカゲル膜タイプの抽出キットを用いる方法であり、液体窒素を常備しておく必要があること、液体窒素の扱い

に危険が伴うこと、DNA 量が少量しか得られない場合があることといった課題があった。そこで、液体窒素を用いずに抽出可能なタカラバイオ（株）製 Plant DNA Isolation Reagent による抽出法（以下、「塩化ベンジル法」とする。）及び福岡県衛生研究センター年報²⁾を参考にした抽出法（以下、「福岡県法」とする。）の 2 種類を比較したので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販のシメジ及びエリンギ並びに当所で乾燥させデシケーター内で保管していたツキヨタケ及びクサウラベニタケを使用した。

2.2 試薬及び装置

2.2.1 試薬

DNA 抽出キット：タカラバイオ（株）製 Plant DNA Isolation Reagent

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン：富士フイルム和光純薬（株）製分子生物学用トリス（ヒドロキシ

メチル) アミノメタン

2 mol/L 塩酸：富士フイルム和光純薬（株）製容量分析用 2 mol/L 塩酸

EDTA(2Na)：富士フイルム和光純薬（株）製試験研究用エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物

塩化ナトリウム：富士フイルム和光純薬（株）製試薬特級塩化ナトリウム

ドデシル硫酸ナトリウム：富士フイルム和光純薬（株）製生化学用ドデシル硫酸ナトリウム

Proteinase K：富士フイルム和光純薬（株）製遺伝子研究用 Proteinase K

2-プロパノール：富士フイルム和光純薬（株）製分子生物学用 2-プロパノール

エタノール：富士フイルム和光純薬（株）製分子生物学用エタノール (99.5)

1 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 2.42 g を滅菌超純水 70 mL に溶解し、2 mol/L 塩酸で pH8.0 に調整後、滅菌超純水を加えて 100 mL とした。

100 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物溶液：EDTA(2Na) 930.6 mg を滅菌超純水 25 mL に溶解した。

2 mol/L 塩化ナトリウム溶液：塩化ナトリウム 3.5 g を滅菌超純水 30 mL に溶解した。

1.5%SDS 溶液：ドデシル硫酸ナトリウム 450 mg を滅菌超純水 30 mL に溶解した。

20 mg/mL Proteinase K 溶液：Proteinase K 200 mg を 0.5%SDS 10 mL に溶解した。

溶解液：1 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液 1 mL, 100 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物溶液 2.5 mL, 2 mol/L 塩化ナトリウム溶液 10 mL, 1.5% SDS 溶液 10 mL, 20 mg/mL Proteinase K 溶液 0.5 mL を混合し、滅菌超純水で 50 mL にメスアップした。

マスターミックス：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 PowerUp SYBR Green Master Mix

TE buffer:（株）ニッポンジーン製遺伝子工学研究用 TE (pH8.0)

超純水：アドバンテック東洋（株）製 RFU666HA で製造した超純水を用いた。

2.2.2 装置

qPCR 装置：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 QuantStudio5

冷却遠心機：久保田商事（株）製 6200, 久保田商事（株）製 3780, （株）トミー精工製 CAX-571

分光光度計：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 NanoDrop One

超純水製造装置：アドバンテック東洋（株）製

RFU666HA

ハンディーホモジナイザー：（株）QIAGEN 社製 Tissue Ruptor

ペンシルホモジナイザー：アズワン（株）製ペンシルホモジナイザー

2.3 分析方法

2.3.1 DNA 抽出法

1) 塩化ベンジル法

DNA 抽出キット付属の説明書を参考に一部を改変し、抽出を行った。すなわち、1.5 mL チューブに細切した試料を 50 mg 入れ、ペンシルホモジナイザーで 2 分間すりつぶし、Extraction Solution 1 を 400 μ L 加え、ボルテックスミキサーで混合し、Extraction Solution 2 を 80 μ L 加え混合した。Extraction Solution 3 を 150 μ L 加え混合し、50°C で 15 分間インキュベートした後、16,000 $\times$ g, 4°C, 15 分間遠心分離した。上層を 1.5 mL チューブに移し、移した上層液と同量の 2-プロパノールを加え転倒混和後、16,000 $\times$ g, 4°C, 10 分間遠心分離した。上清を除去し、エタノールを 1 mL 加え、16,000 $\times$ g, 4°C, 3 分間遠心分離した。上清を除去後、沈殿を乾燥させ、TE buffer を 80 μ L 加えて溶解させ、DNA 溶液を 80 μ L 得た。

2) 福井県法

15 mL のチューブに細切した試料 200 mg 及び溶解液 2 mL を加え、ボルテックスミキサーで混合した後、ハンディーホモジナイザーで 2 分間粉碎した。55°C で 1 時間インキュベートした後、95°C で 5 分間インキュベートし、3,000 $\times$ g, 4°C, 10 分間遠心分離した。上層を新しい 1.5 mL チューブに移し、DNA 溶液を 1,700 μ L 得た。

2.3.2 純度、濃度の確認及び調製

分光光度計を用いて DNA 溶液の 260 nm の吸光度から DNA 濃度を確認し、TE buffer を用いて DNA 溶液の濃度が 20 ng/ μ L となるよう調製した。また、280 nm に対する 260 nm 吸光度の比（以下、「A260/A280」とする。）及び 230 nm に対する 260 nm 吸光度の比（以下、「A260/A230」とする。）から純度を確認した。

2.3.3 プライマー

キノコを含む菌類共通の DNA 配列³⁾ 検出（以下、「菌類検出系」とする。）プライマーの配列

ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS2: 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'

2.3.4 リアルタイム PCR

1) 反応液調製

qPCR に供する試薬は、PowerUp SYBR Green Master Mix 12.5 μ L に 20 μ mol/L のプライマー溶液を各 0.8 μ L, 20 ng/ μ L の DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、滅菌超純水で全量が 25 μ L となるように調製した。

2) 反応条件

50°Cで2分, 95°C 10分間保持した後, 95°C 15秒間及び60°C 1分間を1サイクルとして45サイクル繰り返した。

3) 判定方法

qPCRの増幅曲線のThreshold line及びbaselineをAuto analyzeにして, 解析を行った。Amplification plot上でThreshold lineと増幅曲線との交点におけるサイクル数をCt値とし, 40未満のCt値及び指数関数的増幅が観察される場合に陽性とした。

3 実験結果及び考察

3.1 DNA抽出法の検討

キノコ等の菌類の細胞壁は, キチン及びグルカンを主として構成されるため, DNAを抽出することが難しい。そこで, 細胞壁を溶解する試薬を用いた塩化ベンジル法及び福井県法を用いて抽出した。

鮮度がよいキノコを試料として用いるために, 市販のシメジ及びエリンギを用いた。2.3.1の1)及び2)に従って, シメジ試料及びエリンギ試料からDNA溶液を得た。結果を表1に示す。

表1 抽出法ごとのDNA収量及び純度の比較

抽出法	試料	試料採取量 (mg)	DNA収量 (μg)	A260/A280	A260/A230
塩化ベンジル法	シメジ	50	25.3	2.1	2.0
	エリンギ	50	56.5	2.1	2.2
福井県法	シメジ	200	655.0	1.9	0.8
	エリンギ	200	844.4	2.0	1.2

試料採取量は, 塩化ベンジル法 50 mg, 福井県法 200 mg とした。塩化ベンジル法では, シメジ試料 50 mg から 25.3 μg の DNA が抽出され, A260/A280 は 2.1, A260/A230 は 2.0 であった。エリンギ試料 50 mg からは, 56.5 μg の DNA が抽出され, A260/A280 は 2.1, A260/A230 は 2.2 であった。一方, 福井県法では, シメジ試料 200 mg から 655.0 μg の DNA が抽出され, A260/A280 は 1.9, A260/A230 は 0.8 であった。エリンギ試料 200 mg からは, 844.4 μg の DNA が抽出され, A260/A280 は 2.0, A260/A230 は 1.2 であった。

塩化ベンジル法にて得られた DNA 溶液は, 鋳型として十分な収量があり, A260/A280 及び A260/A230 のどちらも 1.8 以上あるものの, 毒物である塩化ベンジルを使用する部分で課題が残った。福井県法にて得られた DNA 溶液は, 鋳型として十分な収量があり, A260/A280 は 1.8 以上であったが, 塩を取り除いていないため A260/A230

が 0.8~1.2 と低かった。抽出に要する時間は塩化ベンジル法では約 3 時間, 福井県法では約 2 時間であった。

3.2 インターカレーター法による菌類検出系の確認

DNA の抽出が適切に行われたことを確認するために, 菌類検出系について SYBR Green を用いたインターカレーター法を行った。塩化ベンジル法及び福井県法を用いて, シメジ及びエリンギ試料それぞれから抽出した DNA 溶液 4 検体及びネガティブコントロールについて菌類検出系を行った。DNA 溶液は, TE buffer を用いてそれぞれ 20 ng/μL に調整し, 2.3.4の1) に従い反応液を調製し, 2) の反応条件に従って増幅を行った。結果を表 2 に示す。

表2 抽出 DNA の Ct 値 (n=2)

抽出遺伝子		菌類検出系 PCR Ct値
抽出法	試料	
塩化ベンジル法	シメジ	14.1/13.9
	エリンギ	13.8/13.8
福井県法	シメジ	19.3/19.0
	エリンギ	19.8/22.3
—	ネガティブコントロール	no Ct

全検体において, Ct 値は 40 未満となり菌類検出系陽性であったため, 菌類 DNA の抽出が適切に行われたことを確認した。

福井県法は, 簡便かつ短時間であり塩化ベンジル等の毒物を使用しない方法である。そして, 福井県法により得られた DNA 溶液は, 十分な収量であり, A260/A230 は低いものの, 判定に関わる影響はないと判断した。以上のことから, ツキヨタケの遺伝子検出試験のための抽出法としての第一選択は福井県法とした。

3.3 ツキヨタケ及びクサウラベニタケを用いた確認

当所で保管していたツキヨタケ及びクサウラベニタケを試料として, 福井県法にて DNA 溶液を得た後, 菌類共通系の確認を行った。

ツキヨタケ及びクサウラベニタケは乾燥状態で長期間保存していたため, 湿潤試料の 1/4 量である 50 mg の乾燥試料を採取し, 2.3.1の2) に従って DNA 溶液を得た。結果を表 3 に示す。

表3 抽出 DNA の収量及び純度

試料	試料採取量 (mg)	DNA収量 (μg)	A260/A280	A260/A230
ツキヨタケ	50	1686.9	1.6	1.0
クサウラベニタケ	50	2180.3	1.7	1.0

ツキヨタケ試料 50 mg からは, 1686.9 μg の DNA が得られ, A260/A280 は 1.6, A260/A230 は 1.0 であった. クサウラベニタケ試料 50 mg からは, 2180.3 μg の DNA が得られ, A260/A280 は 1.7, A260/A230 は 1.0 であった.

菌類検出系遺伝子の確認は, 3.2 と同様に行った. 結果を表 4 に示す.

表4 ツキヨタケ及びクサウラベニタケの Ct 値(n=2)

抽出遺伝子 試料	菌類検出系 PCR Ct値
ツキヨタケ	34.4/35.9
クサウラベニタケ	24.3/24.3
ネガティブコントロール	no Ct

ツキヨタケの Ct 値は 34.4/35.9, クサウラベニタケの Ct 値は 24.3/24.3 であり, いずれも 40 未満で菌類検出系陽性となり, 菌類 DNA の抽出が適切に行われたことを確認した.

3.4 ツキヨタケの遺伝子検出試験

福井県法にて抽出したシメジ, エリンギ, ツキヨタケ及びクサウラベニタケの DNA 溶液について, 鶴田らによる報告¹⁾ のとおりリアルタイム PCR を用いたプローブ法によるツキヨタケの遺伝子検出試験を行った. 結果は, シメジ, エリンギ及びクサウラベニタケは陰性, ツキヨタケは陽性であり, ツキヨタケのみから遺伝子検出を確認した.

4 まとめ

福岡市内におけるツキヨタケによる食中毒疑い事例に備え, 液体窒素を用いない DNA 抽出法を検討するため, 塩化ベンジル法及び福井県法を比較した. 収量は, 試料採取量 200 mg に換算すると塩化ベンジル法では 101.2~226.0 μg, 福井県法では 655.0~844.4 μg となり, 福井県法の方が塩化ベンジル法よりも多かった. 純度は A260/A280 は両抽出法ともに 1.8 以上で, A260/A230 は塩化ベンジル法では 1.8 以上, 福井県法では 0.8~1.2 であった. 得られた DNA 溶液を鋳型として菌類共通系のプライマーを使用しインターカレーター法にて菌類共通系の遺伝子を確認した. 全検体において Ct 値が 40 未満で, 菌類検出系遺伝子陽性であり, 菌類 DNA の抽出が適切に行われたことを確認した. 福井県法は, 簡便かつ短時間であり, 塩化ベンジル等の毒物を使用しない方法である. そして, 福井県法により得られた DNA 溶液は, 十分な収量であり, A260/A230 は低いものの, 判定に関わる影響はないと判断し, ツキヨタケの遺伝子検出試験のための抽出法としての第一選択は福井県法とした. 福井県法にて得られた DNA 溶液についてツキヨタケ遺伝子検出試験を行い, ツキヨタケのみ陽性を示すことを確認した.

以上のことから, 福井県法をツキヨタケの遺伝子検出試験のための DNA 抽出法とした.

文献

- 1) Sayuri Tsuruda, et al, Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Omphalotus guepiniformis* and *Lentinula edodes*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 76(7), 1343-1349, 2012
- 2) 野田拓史, 毒キノコによる食中毒の検査体制の構築 (第 2 報), 福井県衛生研究センター年報, 18 54-57, 2019
- 3) 野村 千枝, 他: リアルタイム PCR 法によるオオシロカラカサタケの同定, 日本食品化学学会誌, 26(1), 56~62, 2019