

ITS1 領域塩基配列を用いたトリカブト関連植物及び クサウラベニタケ判別法の検討

Study on Identification Methods for Aconite-related Plants and
Entoloma rhodopolium-like Mushrooms Using ITS1 Region

武内 伸治 高橋 正幸 菅野 陽平
高野 敬志 佐藤 正幸 藤本 啓

Shinji TAKEUCHI, Masayuki TAKAHASHI, Youhei SUGANO,
Keishi TAKANO, Masayuki SATO and Toru FUJIMOTO

Key words : plant poison (植物毒) ; aconite (トリカブト) ; *Entoloma rhodopolium* (クサウラベニタケ) ; ITS region (ITS 領域) ; accidental ingestion (誤食)

緒 言

自然豊かな北海道では、春の山菜や秋のキノコなど、季節に応じた様々な自然の恵みを楽しむことができる。しかしながら、山菜やキノコについては、外観がよく似た毒草や毒キノコが存在しているため、毎年誤食による食中毒が発生し、死亡事例も散発している^{1,2)}。これまで我々は、有毒植物や毒キノコによる食中毒事例が発生した場合に備え、誤食の原因物質となる毒成分の分析手法に関する研究を行う^{3,4)}と共に、分析体制を強化してきた。そして、実際に食中毒が発生した際には、形態学的観察と合わせて有毒植物や毒キノコの毒成分の分析を行い、原因となった植物等の鑑別を行ってきた^{1,5)}。

有毒植物や毒キノコの鑑別は、主に色、形、触感、模様、臭い等の外見的特徴や毒成分の化学分析により判別を行っているが、さらなる選択肢として DNA 塩基配列の差異による判別法がある。すなわち、植物性自然毒による食中毒の原因試料が植物小片や球根など外見での判別が困難な場合や、標的成分が微量もしくは分解していた場合、また想定していた有毒植物や毒キノコ以外の植物やキノコが原因となった場合などには、塩基配列を指標とした判別法が有用と考えられる⁶⁾。

トリカブトは古来より漢方薬や毒薬として使用されるアコニチンを主成分とする有毒植物であり、北海道でも山野に自生している。また、アイヌ民族の間では矢毒の主原料としてトリカブトが用いられた⁷⁾。キンポウゲ科トリカブト属 (*Aconitum*) 植物は「日本の野生植物」では 31 種が知られており、その内 9 種は北海道に分布している⁸⁾。これらのトリカブト属植物は、芽吹きの際には山菜である

ニリンソウ、ゲンノショウコ、ヨモギ等と外見が似ているため、その誤食による食中毒が多数報告されている⁹⁾。そこで我々は、塩基配列によりトリカブト属とトリカブト類似植物を明確に判別するため、植物種間で特異性が高い ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) 領域¹⁰⁻¹²⁾ の塩基配列を指標とした判別法を検討した。また、全国的に食中毒事例が多いクサウラベニタケの塩基配列による系統分類に関する最近の研究から、日本の「クサウラベニタケ」はフィンランドで最初に新種登録されたクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium*) とは異なる複数種から構成されるキノコ群であることが明らかにされた¹³⁾。北海道においてもクサウラベニタケの食中毒事例が報告されており、地元のキノコ愛好家の間ではクサウラベニタケが複数種のキノコから構成されるのではないとも言われている。本研究では、外見的特徴からクサウラベニタケと判定された 5 種類のキノコ試料を用いて、植物試料と同様に ITS1 領域の塩基配列を指標とした判別法を検討したので併せて報告する。

方 法

1. 試 料

植物試料は、すべて当所薬用植物園の植栽品を使用した (図 1)。トリカブト類似食用植物として、ニリンソウ (*Anemone flaccida*)、モミジガサ 2 種 (茎部が有毛と無毛のもの) (*Parasenecio delphiniiifolius*)、ヨモギ (*Artemisia indica*)、オオヨモギ (*Artemisia montana*) 及びゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*) を使用し、これらと誤認しやすい有毒植物として、トリカブト 4 種 (エゾトリカブト (*Aconitum sachalinense*)、ヤマトリカ

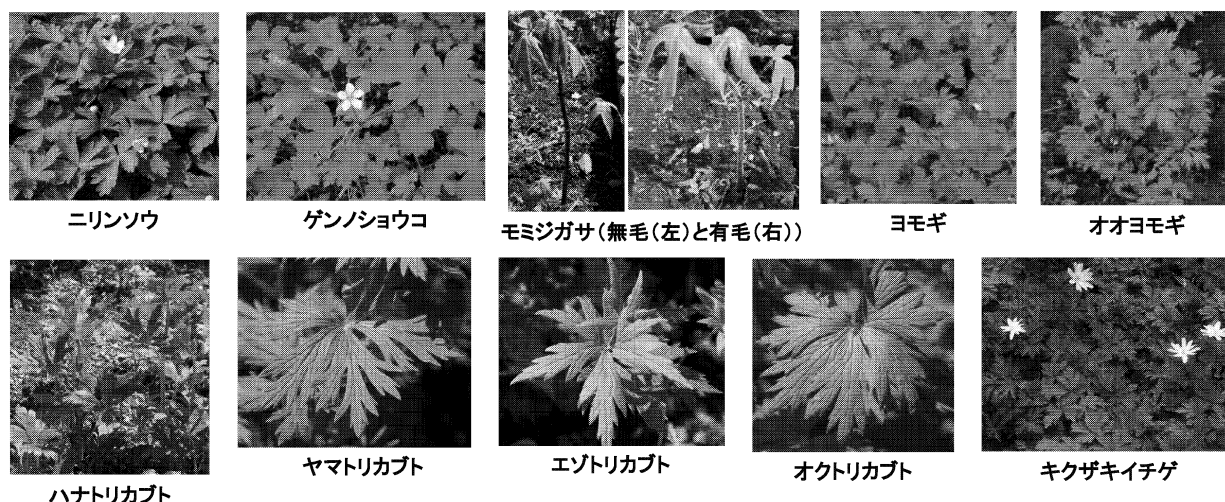


図1 植物試料として使用した山菜類（上段）と有毒植物（下段）

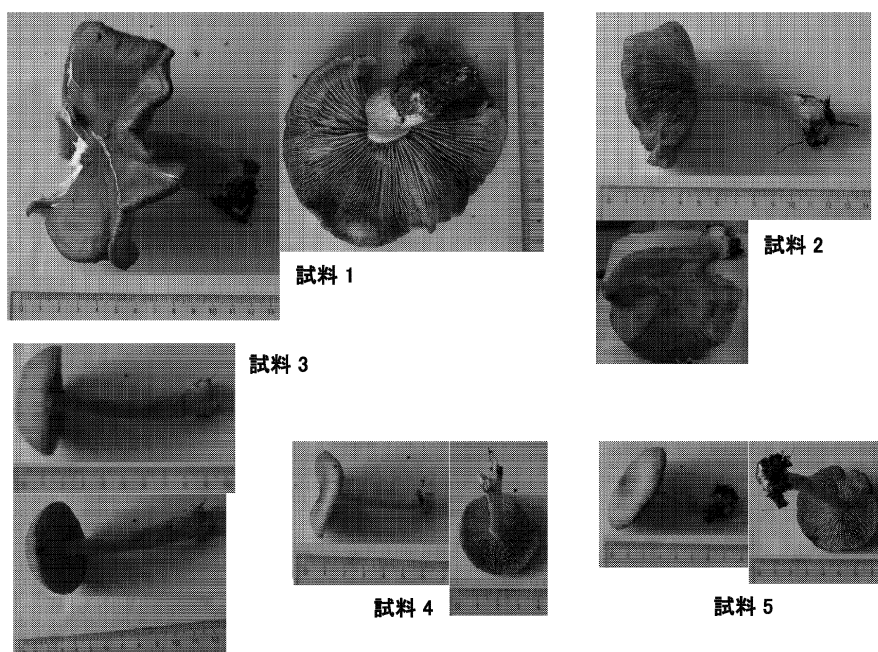


図2 キノコ試料として使用したクサウラベニタケ

プト (*Aconitum japonicum*), オクトリカブト (ヤマトリカブトの一群) 及びハナトリカブト (*Aconitum carmichaelii*) 及びニリンソウと同じキンポウゲ科イチリンソウ属のキクザキイチゲ (*Anemone pseudoaltaica*) を使用した。上記植物 (計 11 種類) の葉部を採取し、DNA 抽出時まで -80°C で保存した。

クサウラベニタケは、札幌キノコの会が主催している観察会で採取され、キノコの学術研究者を含む複数の鑑定者により「クサウラベニタケ」と判定されたキノコを外見の特徴から 5 群に分けて使用した (図 2)。これらのキノコを DNA 抽出時まで -80°C で保存した。

2. 植物及びキノコ試料からの DNA 抽出とシークエンス解析

凍結した植物葉部試料を 1.5 mL のプラスチック製遠心チューブに約 50~250 mg 採取し、 -80°C で 30 分間の凍結過程と 45°C で 10 分間の融解過程を 5 回繰り返した後¹⁴⁾、プラスチック製破砕棒で植物組織を破壊した。DNA 抽出キット (キアゲン社製, DNeasy Plant Mini Kit) を用いて DNA を抽出し、PCR 試薬キット (東洋紡社製, KOD-Plus-Neo) 及び植物異物同定用プライマー¹¹⁾ (ファスマック社製, 植物異物同定用プライマーセット) を用いて以下の条件で PCR 反応を行った。最初に、一本鎖 DNA にするため 94°C で 2 分間の変性反応を行い、次

表1 植物試料の ITS1 領域塩基配列を用いた適合遺伝子の BLAST 検索

試料名	PCR 産物 (塩基数)	適合候補遺伝子	GenBank accession number	配列類似性 (%)
ハナトリカブト	395	<i>Aconitum triphyllum</i>	KX394614	97
ヤマトリカブト	383	<i>Aconitum triphyllum</i>	KX394614	99
エゾトリカブト	382	<i>Aconitum triphyllum</i>	KX394614	100
オクトリカブト	385	<i>Aconitum triphyllum</i>	KX394614	100
ニリンソウ	330	<i>Anemone flaccida</i>	AB120212	99
キクザキイチゲ	318	<i>Anemone quinquefolia</i>	GU257978	98
ゲンノショウコ	360	<i>Geranium thunbergii</i>	KX670795	99
モミジガサ (無毛)	388	<i>Parasenecio delphiniiifolius</i>	EF538281	99
モミジガサ (有毛)	399	<i>Parasenecio delphiniiifolius</i>	EF538281	99
ヨモギ	388	<i>Artemisia argyi</i>	GQ396673	98
オオヨモギ	389	<i>Artemisia argyi</i>	GQ396673	98

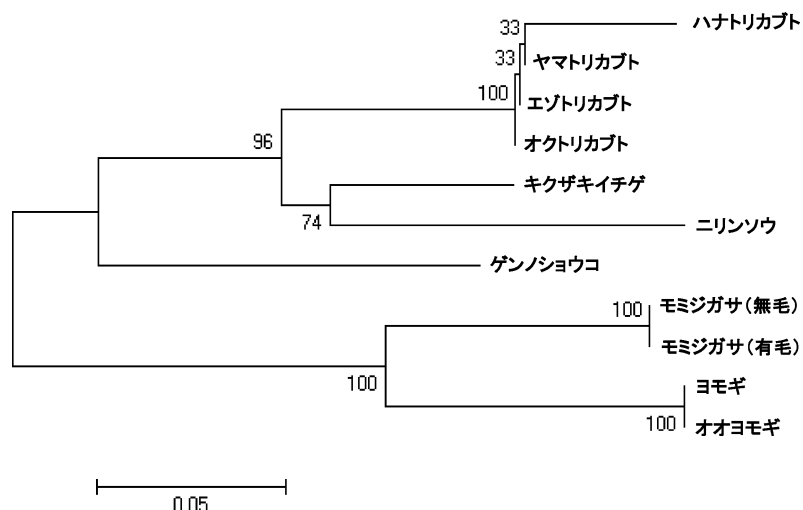


図3 植物試料の ITS1 領域塩基配列に基づいた系統樹と類似性の比較

に1サイクル98°C (10 秒間), 58°C (30 秒間), 68°C (30 秒間) による増幅反応を35サイクル行い, 最後の伸長反応を68°Cで5分間行った。得られたPCR反応生成物を, エチジウムブロミド含有1.5%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い, PCR産物を含む部分のゲルを採取した。得られたゲルを, ゲル抽出キット (キアゲン社製, QIAquick Gel Extraction Kit) により精製し, シークエンスキット (アプライドバイオシステムズ社製, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) を用いてPCRで合成したDNA断片を標識した。得られたDNA断片の塩基配列をキャピラリー電気泳動装置 (アプライドバイオシステムズ社製, 3500 xL Genetic Analyzer) で解析した。

5群に分けたクサウラベニタケ試料は傘部 (約73~137 mg) をそれぞれ採取した後, 植物試料において行った操作のうち凍結融解工程を行わず, 直接DNA抽出キットを用いて前処理し, シークエンス分析を行った。ただし, PCR反応は, キノコITS1領域増幅用プライマー

(ITS1F-F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'¹⁵⁾, ITS2-R: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'^{13,16)}) を使用し, アニール温度を56°Cとした以外は前述の植物試料と同様にPCR反応を行った。なお, 上記各種キット類を用いる際には, 当該メーカーが指定するプロトコルに準じて実験操作を行った。得られた塩基配列についてDNAデータベース (GenBank/NCBI) のBLAST相同性検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) を実施し, 植物及びキノコの種類の同定を行った。塩基配列の照合には塩基配列解析ソフト (MEGA6.0) を用い, 系統樹の作成ではブートストラップは1,000で行った。

結果と考察

植物試料から得られたPCR産物のITS1塩基配列を用いてBLAST検索を行った結果, 表1に示すようにそれぞれの試料に適合候補遺伝子が得られ, いずれの植物においても高い配列類似性 (97~100%) が認められた。山菜

表2 キノコ試料の ITS1 領域塩基配列を用いた適合遺伝子の BLAST 検索

試料名	PCR 産物 (塩基数)	適合候補遺伝子	GenBank accession number	配列類似性 (%)
キノコ試料 1	371	<i>Entoloma eminens</i>	NR_152935	99
キノコ試料 2	337	<i>Entoloma eminens</i>	NR_152935	99
キノコ試料 3	349	<i>Entoloma eminens</i>	NR_152935	100
キノコ試料 4	328	<i>Entoloma</i> sp.	MF773595	89
キノコ試料 5	333	<i>Entoloma pallidocarpum</i>	JQ320106	93

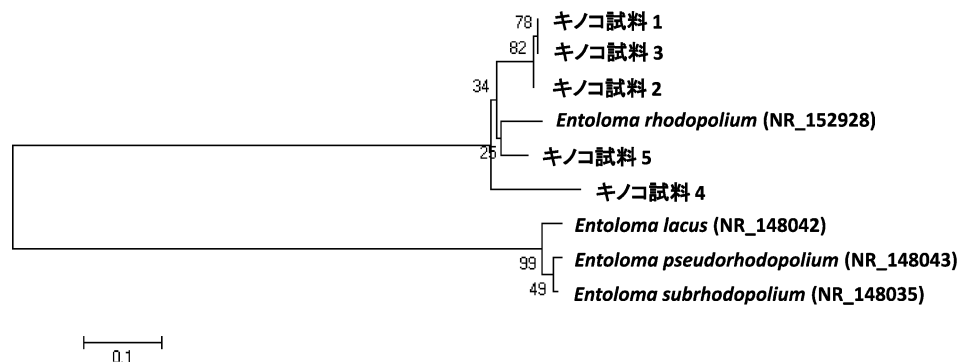


図4 キノコ試料の ITS1 領域塩基配列に基づいた系統樹と類似性の比較

でトリカブト類似植物であるニリンソウ、モミジガサの2種(有毛と無毛)、ヨモギ属の2種(ヨモギ及びオオヨモギ)、ゲンショウコは、それぞれの適合候補遺伝子が、*Anemone flaccida*, *Parasenecio delphinifolius*, *Artemisia argyi*, *Geranium thunbergii* となった。一方、トリカブト属4種のハナトリカブト、ヤマトリカブト、エゾトリカブト、オクトリカブトは、配列類似性に若干の違いはあるものの、適合候補遺伝子として *Aconitum triphyllum* が共通に選ばれ、上記の山菜と判別できることが明らかとなった。また、ニリンソウと同じ属に分類される有毒植物のキクザキイチゲの適合候補遺伝子は *Anemone quinquefolia* となり、ニリンソウとは異なる配列を有することから判別できることが推察された。なお、モミジガサ2種とヨモギ属2種の間では、それぞれ ITS1 塩基配列が完全に一致したため、判別はできなかった。以上の結果を図3の系統樹にまとめた。これらの植物は外見上では見誤って、トリカブト属やキクザキイチゲを誤食してしまう危険性が高いが、塩基配列上では明確に判別できることを示唆している。

本研究で使用した植物 ITS1 増幅用プライマーは、異物混入試験の際に汎用される市販のプライマーである。先行研究において本プライマーをトリカブト関連植物に適用した報告は確認できなかったが、極めて多くの植物種について解析した実績がある。例えば、植物性自然毒による食中毒事例に適用された例として、ヨウシュヤマゴボウの判別に用いられたことが報告されている¹²⁾。これらの研究から

も、本プライマーを用いた判別法の有用性が示唆され、近年道内で多発しているギョウジャニンニクとイヌサフランなど他の植物性食中毒事例^{2,5)}の判別にも活用できることが考えられた。

表2にクサウラベニタケと判定された5群のキノコ試料における ITS1 領域の塩基配列について、BLAST 検索による結果を示す。試料1～3は適合候補遺伝子として *Entoloma eminens* が極めて高い配列類似性(99～100%)で選択された。しかしながら、試料4及び5の適合候補遺伝子は、それぞれ *Entoloma* sp. 及び *E. pallidocarpum* となり、それらの配列類似性は89%及び93%であった。以上の結果は、北海道で採取されたクサウラベニタケの ITS1 塩基配列がフィンランドで最初に新種登録されたクサウラベニタケ(*E. rhodopolium*)とは一致せず異なる塩基配列であることを示唆している。さらに、近藤らが日本に自生しているクサウラベニタケの遺伝子を対象とした最近の研究において、得られた遺伝子が3群の集団からなることを明らかにし、それらを新規3種(*E. lacus*, *E. subrhodopolium* 及び *E. pseudorhodopolium*)として登録し、いずれもフィンランドの *E. rhodopolium* とは一致しなかったことを報告している¹³⁾。これらのことから、本研究で使用したクサウラベニタケ5試料の ITS1 塩基配列は近藤らが報告した3種とも異なることから(図4)、北海道をはじめ日本に自生するクサウラベニタケは遺伝子型から分類した場合、多種類存在することが推察された。

本研究では、キノコ ITS1 領域の塩基配列を標的とした

増幅用プライマーを用いて判別法を検討した。当初は多種のキノコに適用可能とされている ITS1 及び ITS2 領域を同時に標的としたプライマーを用いて検討を行ったが、5 試料とも PCR 産物が数塩基ずれた配列の混合物となり、塩基配列の解析が困難であった。このことから、クサウラベニタケの遺伝子判別法としては ITS1 領域のみを増幅するプライマーを使用した。本研究により検討した判別法は、植物やキノコ試料の遺伝子解析を行う場合に、各種ごとの特異的なプライマーを設計することなく、植物やキノコに対してそれぞれ同一の ITS1 増幅プライマーを使用するため迅速かつ簡便な方法である。今後は、各種の植物性自然毒による食中毒が発生した場合の鑑定において、本法を形態観察や毒成分分析を補完するツールとして活用する予定である。

最後に、キノコ試料の採取にご協力頂いた札幌キノコの会の皆様に感謝致します。

文 献

- 藤本 啓, 佐藤正幸, 内山康裕: 毒キノコ誤食による中毒事例. 道衛研所報, **65**, 21-23 (2015)
- 藤本 啓, 高橋正幸, 佐藤正幸, 姉帯正樹: 北海道内における有毒植物による食中毒発生状況 (平成 17~28 年春季). 北海道公衆衛生学雑誌, **30**, 123-128 (2016)
- 佐藤正幸, 姉帯正樹: 有毒植物フクジュソウ調理品中のシマリン残留量. 道衛研所報, **61**, 15-19 (2011)
- 佐藤正幸, 姉帯正樹: テングタケ類に含有されるイボテン酸及びムッシモール分析. 道衛研所報, **64**, 27-33 (2014)
- 高橋正幸, 藤本 啓, 佐藤正幸: イヌサフラン (コルチカム) 誤食による中毒事例 (第 4 報). 道衛研所報, **66**, 99-100 (2016)
- 菅野陽平, 坂田こずえ, 中村公亮, 野口秋雄, 福田のぞみ, 鈴木智宏, 近藤一成, 谷本義文: PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法. 食衛誌, **53**(3), 113-123 (2017)
- 門崎允昭: アイヌの矢毒 トリカブト, 日本の野生植物草本 II 離弁花類, 北海道出版企画センター, 札幌, 2002
- 佐竹義輔, 大井次三郎, 北村四郎, 旦理俊次, 富成忠夫: 日本の野生植物草本 II 離弁花類, 平凡社, 東京, 1999, pp.61-67
- 笠原義正: 有毒植物による食中毒の最近の動向と今後の課題, 食衛誌, **51**(6), 311-318
- 正村典也, 菊池 亮, 永富靖章: ITS1 塩基配列による植物性遺物同定方法の開発. 分析化学, **63**(3), 245-253 (2014)
- 安藤尚子, 仲井菜都希, 村上友規, 米田正樹, 岡山明子: 健康危機管理体制の強化—キノコによる食中毒における遺伝子を用いた鑑別方法の確立—. 奈良保研年報, **51**, 37-40 (2016)
- 立野幸治, 尾上史一, 村田祥子, 岡本玲子, 戸田昌一, 宮垣明彦, 調恒 明: ITS1 領域塩基配列解析による植物種同定の一事例. 山口環保セ所報, **57**, 51-54 (2014)
- Kondo K, Nakamura K, Ishigaki T, Sakata K, Obitsu S, Noguchi A, Fukuda N, Nagasawa E, Teshima R, Nishimaki-Mogami T: Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. Sci. Rep., **7**(14942), 1-12 (2017)
- 高野敬志, 日野修次: rbcLX 部分塩基配列に基づく日本産 *Aphanizomenon flos-aquae* の系統分析. 陸水学雑誌, **69**, 247-253 (2009)
- Larena I, Salazar O, González V, Julián MC, Rubio V: Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. J. Biotech., **75**, 187-194 (1999)
- 丸山卓郎, 代田 修, 川原信夫, 横山和正, 牧野由紀子, 合田幸広: 内部転写スパーサー領域の塩基配列解析による幻覚性キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム) の基原種の分類. 食衛誌, **44**(1), 44-48 (2003)