

汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法（遺伝子検査法）の確立
及び

自然毒リスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

研究分担者 柴田 識人 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

研究要旨：

本分担研究では、我が国における植物性自然毒（きのこ）の食中毒統計に基づき、食中毒事例が多いものの、遺伝子検査法が開発されていない毒きのこを対象とした検査法の開発・整備を、そして消費者に向けた自然毒に関する効果的と期待される情報提供の方法を提案するべく、厚生労働省ホームページに掲載されている「自然毒リスクプロファイル」の更新を目的とする。

Amanita（テングタケ属）に属する *Amanita virosa*（ドクツルタケ）は致死性の高い猛毒きのこであるが、本年度は、リアルタイム PCR 法を用いたドクツルタケ特異的遺伝子検査法を検討した。テングタケ属の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の系統解析と我々が独自開発した種特異的核酸配列探索ツール (BLAST_TSN) により、ドクツルタケに特異的なプライマー及びプローブを設計した。同プライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR 法は、ドクツルタケ以外のテングタケ属きのこに交差反応しなかったことから、開発した遺伝子検査法の特異性が良好であると示された。本法は各自治体の食中毒原因究明のための利用に期待される。

また、食中毒事例が多い毒きのこであるテングタケに着目した。テングタケはテングタケ属毒きのこであるが、そのゲノム情報が公的データベースに十分には収載されておらず、遺伝子検査法の開発のネックとなっている。そこで、テングタケと推定される国内採取個体のゲノム解析を行った。ロングリードシーケンシングと *de novo* アセンブリにより、高品質なテングタケドラフトゲノムを構築した。当該ドラフトゲノムからはアマトキシン類のペプチドをコードする遺伝子配列は見つからなかった。今後、遺伝子アノテーション等を付け、公開することを目指すと共に、テングタケを検出する遺伝子検査法の開発を試みる。

さらに「自然毒リスクプロファイル」について、新しい知見をもとに更新作業を行っている。更新版は消費者をはじめとした多くの人にとって、より有用な参考資料になることが期待される。

研究協力者

登田 美桜（国立医薬品食品衛生研究所安全情報部）

曾我 慶介（国立医薬品食品衛生研究所生化学部）

成島 純平（国立医薬品食品衛生研究所生化学部）

杉野 御祐（国立医薬品食品衛生研究所生化学部）

A. 研究目的

動物や植物の中には、ヒトや動物の健康に有害な影響をもたらす成分を含むものがある。その成分を「自然毒」と呼び、厚生労働省の食中毒統計では動物性自然毒（フグ毒、貝毒など）と植物性自然毒（きのこ、高等植物の毒成分）に分類される。本分担研究では、これら自然毒に起因する食中毒事

例の把握とその予防策に資する検討を目的に次の2つの課題に取り組むこととした。

第1に、植物性自然毒(きのこ)の鑑別として地方衛生研究所などで実施している遺伝子検査法について、その性能向上および簡便化を本文且研究の目的とした。食中毒事例の多い毒きのこについて、公的データベースにおける識別用のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域や全ゲノム配列の整備状況に基づき、目的に応じたリアルタイム PCR 法や等温増幅反応等の遺伝子検査法の開発を行う。そのために、我が国における植物性自然毒(きのこ)の食中毒統計において、患者数が多く、遺伝子検査法の開発報告の無い毒きのこを対象とした。今年度は、致死性の高い猛毒きのこ *Amanita virosa* (ドクツルタケ) を対象に、リアルタイム PCR 法による特異的遺伝子検査法の開発を検討する。また、ドクツルタケの属する *Amanita* (テングタケ属) に着目し、同じく食中毒事例が多いものの、公的データベースではゲノム情報が利用できないテングタケについて、テングタケと推定される国内採取個体のゲノム解析を行い、ゲノム情報取得を目指す。

第2に、厚生労働省のホームページ上に公開している「自然毒のリスクプロファイル」(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/poison/index.html) の見直しを本分担研究の目的とした。平成20-21年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究(研究代表者:塩見一雄)」において「自然毒のリスクプロファイル」が作成され、厚生労働省では、各自然毒に関する正しい

知識の普及と注意喚起のために、これを公開している。ここでは、毒成分を含む動物、きのこ、高等植物の種類毎に、その分類と特徴、写真、毒成分、中毒症状などが表形式で簡潔に記載され、その自然毒に関する概要を理解できるようにまとめられている。ただ、公開されてから10年以上が経過したが、その間、記載内容についての簡単な修正等に留まっていた。そのため、公開後の新しい知見を含めた全般的な見直しが必要である。

令和3-5年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「自然毒等のリスク管理のための研究(21KA1005;研究代表者:鈴木敏之)」において、きのこ及び高等植物に関する見直しに着手した。本分担研究では、その継続作業を行うとともに動物性自然毒のリスクプロファイルの見直しを行う。

B. 研究方法

子実体サンプル採取情報

テングタケ属と推定されるきのこ(子実体)について、採取地や採取日、子実体の状態を記録後、土汚れを水洗いした上で1センチ角に細断し、凍結乾燥機 FDU-1200 (EYELA) を用いて凍結乾燥処理を実施、使用するまで-30~80°Cで保存した。

DNA 抽出方法

全ての子実体からの DNA 抽出は、Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) を用いた。凍結乾燥済サンプル 0.2 g を液体窒素中で乳鉢乳棒を用いて破碎した後、2.5 mL の 1.5% CTAB バッファー (1.5% CTAB、100 mM Tris-HCl (pH 8)、1.4 M NaCl、20 mM EDTA (pH 8)、1%ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone : PVP)、1%ポリビニルポリ

ピロリドン(Polyvinylpolypyrrolidone : PVPP)、2% 2-メルカプトエタノール : 2-ME) を添加し、56°Cで30分間加温した。加温後の溶液に、1.75 mL の CIA (クロロホルム : イソアミルアルコール = 24 : 1) を添加し、Bio RS-24 Mini Rotator (BIOSAN) にて30 rpm、30分間転倒混和後、遠心 (5,000 rpm, 7分間、室温) して上清を回収した。さらに、回収した上清にその 1/2 倍量の CIA を添加し、50 rpm, 30分間転倒混和後、遠心 (5,000 rpm, 7分間、室温) し、上清を回収した。この上清に対して、1/10 倍量の 10% CTAB 水溶液を添加して転倒混和後、2.5 mL の CTAB 沈殿バッファー (1.0% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM EDTA (pH 8)) を添加して転倒混和した。遠心 (5,000~10,000 rpm, 10分間、室温) して得られた沈殿に対し、500 μ L の 1 M NaCl および 1 μ L の 100 mg/mL RNaseA を添加し、56°Cで加温しながら沈殿を溶解した。最後にイソプロパノールおよびエタノール沈殿により脱塩し、超純水に再懸濁したものを DNA 溶液とした。抽出したゲノム DNA は NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定した。

種推定

rRNA 遺伝子のうち、真菌の同定や系統分類で用いられる ITS 領域、および RNA polymerase II (rpb2) の配列に基づいてサンプルの同定を行った。両遺伝子領域を増幅するために ITS は ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'、ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al, *PCR protocols*:1990: p.315-322)、rpb2 は Am-6F : 5'-TGGGGAATGGTRTGYCCTGC-3' および Am-7R : 5'-CCCATKGCTTGTTTRCCCATGGC-3' (Cai et al,

2014, *BMC Evol Biol.*) をプライマーとして用いた PCR を行った。増幅したアンプリコンを NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) で精製後、サンガー法により塩基配列を決定し、NCBI の BLAST を用いて、相同性の高い種を同サンプルの種として推定した。

テングタケ属 ITS 配列の収集と系統解析

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で種名が掲載されている担子菌門テングタケ属 444 種と、外群として *Lepiota venenata* (キツネノカラカサ属、和名なし)、*Limacella glioderma* (チャヌメリカラカサタケ)、*Limacella glischra* (ヌメリカラカサ属、和名なし) の rRNA 周辺配列を収集した (表 1)。収集した rRNA 遺伝子周辺配列は MAFFT (v7.525) を用いて多重アライメントし、ModelTest-NG (v0.1.7) でモデル推定し、RAxML-NG (v1.2.2) で系統樹推定した。

ドクツルタケの種特異的配列の探索

ドクツルタケ種特異的なプライマー・プローブ配列の探索には、塩基配列情報を基に特異的核酸配列を探索するプログラム BLAST_TSN (https://github.com/NIHS-DNFI/BLAST_TSN/) (Sugino et al, 2025, *ACS Agric. Sci. Technol.*) を一部改変して用いた。ドクツルタケの 18S rRNA 遺伝子配列 695 塩基 (GenBank: AB015676.1) から 1 塩基 sliding window 方式により 25 mer の 671 種の配列を生成し、それらをクエリとして、ドクツルタケ以外の 443 種テングタケ属 ITS 配列に対して BLAST 検索を実施し、配列類似性のない配列、すなわちドクツルタケに特異的な配列を抽出した (図 2A)。

ドクルツタケ特異的遺伝子検査法

BLAST_TSN で抽出したドクツルタケ特異的な配列を基に、ドクルツタケ特異的リアルタイム PCR 用プライマー・プローブを設計した。

設計したプライマー・プローブを用いた検査法の特異性は、FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche) を用いた TaqMan リアルタイム PCR 法で確認した。

ロングリードシーケンス

テングタケの *de novo* 全ゲノムアセンブリを実施するにあたり、PromethION (Oxford Nanopore Technologies) を使用してロングリードシーケンスを実施した。CTAB 法により抽出した DNA から、Short Read Eliminator Kit を用いて短い配列を除去し、Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK114) に従ってシーケンスライブラリを調製した。フローセルは FRO-PRO 114M を使用した。

PromethION から取得したナノポア電流測定値は、Oxford Nanopore Technologies が提供するベースコーラーである dorado (v 0.7.3) の duplex モードによって塩基配列に読み替え、3 種類のロングリード用アセンブラ Flye (v 2.9)、NECAT (v0.0.1)、PECAT (v0.0.3) により、アセンブリを検討した。PECAT ののみ、dorado の correct モードによる読み取りエラー修正モードを実行した。

ドラフトゲノムの完全性を評価するため、Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) (v 5.7.1) を利用し、オーソログデータセットは担子菌門が属する菌界として「fungi_odb10」、および担子菌の分類グループの中でも大きな集団であるハラタケ目として

「agaricales_odb10」を利用した。また、きのこ採取環境中からコンタミネーションする可能性のある真正細菌由来遺伝子を調査するための「bacteria_odb10」を利用した。また、D-GENIES のウェブブラウザ版 (<https://dgenies.toulouse.inra.fr/>) を用いて、既報にある他種の担子菌類ゲノムと比較した。

ミトコンドリア環状ゲノムの探索

真核生物の1つの細胞には細胞核が1つに対し、多数のミトコンドリアが存在している。よって、全ゲノムシーケンスにより得られたリードのカバレッジは核ゲノムよりミトコンドリアゲノムのカバレッジの方が高いと考えられる。そこで、構築したコンティグの中で、シーケンスリードのカバレッジが著しく高いコンティグをミトコンドリアゲノム由来配列と推測した。アライナー minimap2 (v 2.17-r941) を用いて、シーケンスリードを構築したコンティグにマッピングしたのち、計算ツール CoverM (v 0.7.0) でコンティグごとのカバレッジを取得した。

さらに、環状のミトコンドリアゲノムを得るため、ミトコンドリアゲノムと推測したコンティグにマッピングされたシーケンスリードを、細菌などの環状ゲノム構築に特化したアセンブリツール hybracter (v 0.9.0) を使用して、ミトコンドリアゲノム配列のアセンブリおよび環状化を検討した。

リードのフィルタリング

テングタケ全ゲノムアセンブリを行うにあたり、全ゲノムシーケンスリードから不要なリードフィルタリングを検討した。実施した工程を図 6 に示した。第一に、ミトコンドリア由来と推定した

リードを除外した。次に、細菌（他種）ゲノムに相同性の高いシーケンスリードを除外した。そのために、minimap2 を用いて除外対象の細菌ゲノムの参照配列にシーケンスリードを一度マッピングし、Samtools (v 1.11) を用いて、マッピングされなかったリードを抽出した。除外対象の細菌ゲノムの参照配列には *Rhanelia* 属細菌ゲノム (*Rhanelia* sp. Y9602, complete genome, Sequence ID: CP002505.1) を用いた。

既知毒性関連遺伝子の遺伝子座探索

厚生労働省の公開する「自然毒リスクプロファイル」において、テングタケ属担子菌に報告の多い毒成分アマトキシン類、ファロトキシン類のアミノ酸配列（表 2）を基に BLAST プログラムの tblastn（クエリ：アミノ酸配列、データベース：核酸配列）により探索した。本研究で実行した tblastn では、クエリ配列が短いため、すべてオプション（-word_size 2, -evalue 10000）を設定して実行した。

「自然毒のリスクプロファイル」の更新

「自然毒のリスクプロファイル」は厚生労働省 HP に掲載予定のため、令和 3-5 年度厚生労働科学研究費補助金事業（21KA1005）において厚生労働省の食中毒担当部署（医薬・生活衛生局食品監視安全課）と協議して決定した掲載項目等に従って、新規知見をもとに更新作業を実施した。

C. 研究結果

1. 植物性自然毒（きのこ）の鑑別に係る遺伝子検査法の検討

1-1. リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検査法の開発

ゲノム DNA 抽出および種の推定

多数の子実体サンプルからゲノム抽出を実施し、概ね高品質なゲノムを回収することに成功したが、サンプルの状態が悪くゲノム収量が少ない、もしくは分解の著しいものが存在した。一例として、図 1 に 4 種のテングタケ属ゲノムのアガロースゲル電気泳動図を示した。図 1 において、分解が著しいシロテングタケおよびタマシロオニタケについてはより状態の良い別個体から再度ゲノム抽出を実施し、種の推定を行った。

高品質なゲノムを抽出できたサンプルについては ITS および rpb2 配列の増幅・解析を行い、データベース上の配列情報と照会した。その結果、データベース上の配列と高い相同性（概ね 99%以上）を示した 24 種のテングタケ属について、それぞれの種を推定した（表 3）。なお、本研究でサンプルに供した個体の中には、データベース登録配列のいずれの配列とも相同性が低い、もしくは *Amanita* sp.として登録されている配列と相同性が高く、種推定が困難なサンプルが 3 個体存在したが、それらは不明種として特異性試験に供しないこととした。また *Amanita satotamagotake* (サトタマゴタケ) については長年タマゴタケと同一種とみなされてきた経緯から、タマゴタケで配列登録されているものの、最近の報告 (Kodaira et al, 2024, *Mycoscience*)

で Phylogroup B (サトタマゴタケグループ) に分類された個体由来の配列と相同性が高かったことから、サトタマゴタケと推定した。

ドクツルタケの種特異的配列の探索と近縁種の推定

NCBI で収集した 444 種テングタケ属の rRNA 遺伝子周辺配列を用いて、BLAST_TSN によるドクツルタケ特異的な配列の探索を実施した。BLAST_TSN のスキームとしては、まずドクツルタケの 18S rRNA 遺伝子配列 (695 塩基) の 5'側から 25 塩基長で 1 塩基ずつの sliding window 方式で計 671 配列を生成する (図 2A)。次に、それらをクエリ配列としてドクツルタケ以外のテングタケ属 443 種に対して BLAST 検索した。BLAST 検索の結果から 443 種に対して相同性が低い配列、すなわちドクツルタケ特異的な配列を抽出した。BLAST 時の E-value の値を $1e-4$ に設定した結果、671 配列から 33 配列のドクツルタケ特異的配列が抽出された (図 2)。

ドクツルタケと他のテングタケ属のきのこの類縁関係を明らかにするために、NCBI より取得した 444 種テングタケ属および 3 種の外群生物の 18S rRNA 遺伝子周辺配列を用いて系統解析を実施した。多重アライメントは MAFFT の L-INS-i モードを使用した。その後トリミングは実施せずに、ModelTest-NG を使って最尤法で系統樹を作成する際の最適なモデル推定を実施した。その結果、BIC、AIC、AICc のいずれも GTR+I+G4 が最適と推定されたため、上記モデルにて RAxML-NG で系統樹構築を実施した (図 3)。構築した系統樹によるとドクツルタケに最も近縁な種は *Amanita*

amerivirosa (*A. amerivirosa* 和名なし) であることが示唆された。*A. amerivirosa* は元々ドクツルタケと同一種とみなされてきたが、2021 年に形態学的、または分子系統解析によりドクツルタケから独立する形で新種登録がなされた経緯 (Tulloss RE et al, *Amanitaceae*, 2021) もあり、2 種は非常に近縁と推察される。

リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検査法の特異性確認試験

BLAST_TSN により同定されたドクツルタケ特異的配列から、リアルタイム PCR 法による特異的遺伝子検査法の開発を試みた。食中毒の原因究明には嘔吐物のような DNA が分解されたサンプルも想定されるため、PCR 増幅産物長は約 100 塩基程度の短いものになるように検討した。ITS1 上にプライマーとプローブを設計したが、ドクツルタケにおける PCR 増幅産物長は 89 bp となる。444 種テングタケ属の中でドクツルタケおよび近縁な 14 種の rRNA 遺伝子の塩基配列をマルチプルアライメントした結果を図 4 に示した。これら近縁種のうち、*A. pallidorosea* (アケボノドクツルタケ) は入手できたので、アケボノドクツルタケを含め、24 種のテングタケ属ゲノムに対して、これらプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR 法による特異性確認試験を行った。その結果、ドクツルタケのゲノムにのみ、Cq 値 15~18 で指数関数的な増幅が確認された (図 5)。なお、先述したアケボノドクツルタケにおいても交差反応性は確認されなかったことから、本研究で開発したリアルタイム PCR 法による遺伝子検査法はドクツルタケに特異的である可能性が示唆された。

1-2. テングタケのゲノムアセンブリ

次にドクツルタケの属する *Amanita* (テングタケ属) に着目した。テングタケは食中毒事例が多いものの、そのゲノム情報が公的データベースには十分に収載されていないため、遺伝子検査法などの開発が進んでいない。そこで、国内で採取されたテングタケと推定される個体のゲノム配列の解析を行い、ゲノム情報の取得を行った。

ITS 領域の塩基配列による種推定

テングタケ子実体より抽出したゲノム DNA を用いて、サンガーシーケンスにより ITS 領域 610 bp 決定した。この配列について BLAST 検索を行い、データベースと相同性を照合した。本サンプルは学名 *Amanita pantherina* (*A. pantherina*) (Sequence ID: LC832100.1) および *Amanita subglobosa* (*A. subglobosa*) (Sequence ID: PQ855800.1) の ITS 領域と相同率が 100%であった (表 4)。すなわちこの 2 種のきのこは ITS 領域の相同性は 100%であり、この領域のみでは区別できない。一方で、日本国内では和名「テングタケ」は *A. pantherina* と記載されることが多く、厚生労働省リスクプロファイル等でも *A. pantherina* と記載されている。現時点において、日本国内のテングタケがどちらの種を指すか不明だが、以降本サンプルは「テングタケ」とした。

ロングリードシーケンス

ナノポアシーケンサーのリードは 2,398,366 リード、さらに *dorado correct* モードによるポリッシングを経て 1,037,519 リードに絞られた (表 5)。

本研究で検討した各アセンブラに対するコンティグ数および BUSCO (*fungi_odb10*, *bacteria_odb10*) の結果は表 6 に示す通りで、最も繋がってコンティグ数が少ないのは、55 本の PECAT だった。次いで、NECAT (90 本)、Flye (459 本) と続いた。BUSCO 値はアセンブリ間で差が小さく、99.2~99.4%と *fungi* の遺伝子網羅性が高かった。一方で、*bacteria_odb10* の BUSCO 値が一様に 97%以上を示していたため、得られたシーケンスリード、および調製したライブラリは他種 (細菌類) 由来の配列を含んでいると推察された。

ミトコンドリアゲノムの探索

アセンブリによって得られたコンティグに対して、シーケンスリードをマッピングし、そのマッピングカバレッジが突出して高いコンティグのリードをミトコンドリア由来リードと推定した。ミトコンドリアゲノム由来と考えられるリードは 1,328 リードであった。また、hybracter によるアセンブリの結果、54,066 bp で環状になったことを確認し、BLAST 検索でも他のテングタケ属担子菌のミトコンドリア配列と相同性が高いことがわかった。

リードのフィルタリング

Flye で構築したコンティグの BUSCO 値から、細菌属由来のゲノムがコンタミネーションしていることが示唆されていた (表 6)。さらに、コンティグの一部を NCBI BLAST で類似性検索を行うと、*Rhanelia* 属細菌と相同性が高いことが判明した。高品質なテングタケゲノムを構築するにあたり、他生物由来のコンタミリードは除かれていることが望ましい。そこで、全ゲノムシーケンスリー

ドからミトコンドリアゲノム由来及び、*Rhanelia* 属細菌ゲノム (*Rhanelia* sp. Y9602, complete genome, Sequence ID: CP002505.1) (Martinez et al, *J Bacteriol*, 2012) 由来リードを除くために、図 6 のスキームに従い、リードのフィルタリングを実施した。細菌属由来リードの除去を実施した結果、テングタケ核ゲノム由来であると考えられるリードが 967,282 であった (図 6)。これらリードから Flye で構築されたコンティグを BUSCO で評価した際、fungi_odb10 の Complete BUSCO は 99.4% を維持しつつ、bacteria_odb10 は 97% 以上であったのが 5.6% まで減少した (表 7)。

一方、フィルタリングで除かれた細菌属由来と考えられる 68,909 リードから hybracter で構築したコンティグの Complete BUSCO 値は、fungi_odb10 が 5.9%、bacteria_odb10 は 99.2% であったことから、初期アセンブリの bacteria_odb10 の BUSCO 値が高くなる原因となったリードの大部分が除かれたことが確認された。

PECAT を用いたコンティグ構築

得られたシーケンスリードから、ミトコンドリアゲノムおよび他種由来のリードを除いたリード群を用い、最も繋がり良好であった PECAT によるアセンブルを行い、その評価結果を表 7 に示した。コンティグは 20 本に絞られた。併せて BUSCO (fungi_odb10、bacteria_odb10、agaricales_odb10) でテングタケゲノムとしての完全性を評価したところ、Complete BUSCO 値はそれぞれ 99.6%、5.6%、95.4% であり、担子菌類ハラタケ目の主要遺伝子の網羅性が高いことが示唆され、これらコンティグ 20 本をドラフトゲノムとした。

また、本研究において構築されたドラフトゲノムと、既報の担子菌類ゲノムを比較した結果、全染色体の両末端まで繋がった Telomere-to-Telomere ゲノムとして報告されたキシメジ属に属するマツタケ (*Tricholoma matsutake*, GenBank No. GCA_026075535.2, コンティグ数 13, 全長 161 Mb) とはゲノム全体の相同性が低かった (図 7A)。一方で、テングタケと同じテングタケ属に分類されるベニテングタケ (*Amanita muscaria*, GenBank No. GCA_000827485.1, コンティグ数 1,101, 全長 40.7 Mb) のドラフトゲノムとはゲノム全体的に相同性が高いことがわかった (図 7B)。

既知のテングタケ毒性成分について

テングタケの毒性成分は、厚生労働省自然毒リスクプロファイルによると、イボテン酸、ムシモール、スチゾロビン酸、ムスカリン類、アマトキシニン類、アシルグリシン、プロパルギルグリシン 150 が挙げられている。中でもアマトキシニン類は猛毒で、食品衛生の観点では重要な毒性成分の一つである。アマトキシニン類は環状ペプチドであり、前駆体ペプチドから、酵素切断やコアペプチド部分の環状化と修飾などを経て、生合成される (図 8)。この前駆体ペプチドをコードする遺伝子座が知られていることから、ゲノム配列を基にしたアマトキシニン類の有無を推定することができる。コアペプチドのアミノ酸配列が既知のアマトキシニン類 5 種類 (表 2) に関して、テングタケドラフトゲノムにおいて相同性検索を実施した。アミノ酸配列をクエリとする tblastn では、該当アミノ酸配列と完全一致する配列は検出されなかった。

2. 「自然毒のリスクプロファイル」の更新

自然毒のリスクプロファイルの更新にあたり、厚生労働省の食中毒担当部署と協議し、更新作業の優先課題とされた、様式や記載項目の統一、より鮮明で特徴を捉えた写真の掲載、現行版で写真が未掲載のものについての入手・掲載、新しい知見の反映、引用・参考資料の記載を中心に検討した。現在、必要な写真と資料を入手しつつ更新作業を進めている最中である。

D. 考察

リアルタイム PCR 法によるドクルツタケ特異的遺伝子検査法の開発

毒きのこ誤食による食中毒発生時の迅速な原因究明の一環として、本研究ではリアルタイム PCR 法によるドクルツタケ特異的遺伝子検査法について検討した。今回開発したドクルツタケ特異的遺伝子検査法は、ドクルツタケを特異的に検出し、国内で採れたその他 24 種のテングタケ属ゲノムには交差反応性は確認されなかった。今回開発した PCR 法の増幅配列長は 89 bp と比較的に短いため、嘔吐物等からドクルツタケを誤食したことを確認する際にも有用な方法論と考えられる。また今回の検討では、一般的にきのこ種の遺伝子鑑別に利用される rRNA 遺伝子配列周辺の可変領域 ITS を標的として、種特異的核酸配列探索ツール BLAST_TSN を活用することで、ドクルツタケを特異的に検出できるプライマー・プローブセットを見出すことできた。ドクルツタケにはアケボノドクルツタケなどの近縁種が存在しており、図 4 にも示すように rRNA 遺伝子周辺の配列としても非常に相溶性が高いが、ドクルツタケを特異的に検出することに成功した。したがって、この

BLAST_TSN を活用することで、近縁種のある他の毒きのこについても、特異的に判別できる遺伝子検査法の開発が期待される。

本研究で開発したリアルタイム PCR 法による遺伝子検査法はドクルツタケ特異的鑑別手法として新規性が高いと考えられる。一方で、近年、急速にテングタケ属を対象としたスクリーニング検知法に関する論文が見られる。これまで報告されたテングタケ属毒きのこのスクリーニング検査法（リアルタイム PCR や等温反応による）に関する論文について調査し、表 8 に一覧として示した。2020 年以前の論文は定性 PCR による方法論が多かったが、近年報告される方法はリアルタイム PCR 法による特異性の高い TaqMan 法によるものが増えていく傾向であった。また ITS 領域を標的とした方法以外に、アマトキシシン類の前駆体ペプチドをコードする遺伝子座に保存されている塩基配列を標的とした方法論も見られた。こうしたスクリーニング検査法は、食中毒原因の特定には向かないものの、猛毒なアマトキシシン類を含むきのこの有無を網羅的かつ迅速に判定する際には有用であると考えられる。今回の検討で用いた BLAST_TSN は、こうした複数の生物種にのみ共通する核酸配列の探索にも有効であることから（Sugino et al, 2025, *ACS Agric. Sci. Technol.*）、テングタケ属毒きのこのスクリーニング検査法に適した PCR 法の開発にも役立つと期待される。引き続き、国内での食中毒事例を調査しつつ、各検査機関の要望に即した毒きのこ検出法の開発を進めていく。

国内テングタケ名の妥当性について

和名テングタケは一般的に学名 *A. pantherina* (Sequence ID: LC832100.1) を指すことが多い。しかし、*A. subglobosa* (Sequence ID: PQ855800.1) も *A. pantherina* と ITS 配列部分の相同性が 100%であることを踏まえると、我が国で採取されるテングタケが *A. pantherina* 及び *A. subglobosa* のどちらであるのか厳密には判別できていないと考えられる。rRNA 遺伝子配列周辺以外の他配列のシーケンスを比較することで、両者を判別する方法を確立し、種推定の確度を向上することが必要と考えられる。今回のゲノム解析では、両者の可能性を想定しつつ「テングタケ」と称してドラフトゲノムの構築を試みたが、こうした解析結果が *A. pantherina* と *A. subglobosa* の遺伝子鑑別に役立つと期待される。

他生物由来ゲノムリード除去について

今回用いたテングタケ子実体のサンプルは自然環境由来なため、サンプルに付着した土に細菌等がコンタミネーションする可能性もあり、その場合は全ゲノムシーケンスデータ中にも細菌由来リードが含まれることも考えられる。除去リードだけを用いてアセンブリされた配列は BUSCO 値 (bacteria_odb10 : 99.2%) で、フィルタリング前後のテングタケのゲノムアセンブリの BUSCO (Fungi_odb10 : 99.4%→99.4%、bacteria_odb10 : 97.6%→5.6%) であったことから (図 6)、本フィルタリングで適切に細菌由来リードが除かれていると考えられた。今後も細菌由来のリードのコンタミネーションを除く際に、BUSCO を用いてコン

タミネーション種を推定することは有効な手段と考えられる。

テングタケのドラフトゲノムについて

これまで近縁種でゲノムが GenBank に公開されているのはベニテングタケのコンティグ数 1,011 本、BUSCO 値 98.8% (fungi_odb10) のアセンブリがあるが、世界的に見てもまだ高品質のゲノムの報告は少ない。本研究ではコンティグ数が 20 本、BUSCO 値 99.6% (fungi_odb10) と他の報告と比べ、高品質でかつ繋がったドラフトゲノムが構築できたと考えられる。

アマトキシシン類など毒性関連遺伝子について

アマトキシシン類にはアマトキシシン、ファロトキシシン類にはファロイジン等が挙げられるが、今回解析に供したテングタケのドラフトゲノムからは上記毒性ペプチド配列と一致する配列は見つからなかった。過去にテングタケからアマトキシシンを検出した報告はあるが (Faulstich et al, 1976, *FEBS letters*)、テングタケの誤同定やアマトキシシン誤検出、またはテングタケ個体の多様性による可能性も考えられる。本研究結果を基に、今後はテングタケ別個体において、ゲノム解析と化学分析の結果を組み合わせて考察し、テングタケのアマトキシシン類産生について検証する必要があるだろう。

「自然毒のリスクプロファイル」の更新について

「自然毒のリスクプロファイル」は一般消費者に限らず、研究者、地方自治体、メディアなどの情報源にもなっており、ユーザーの裾野はとて広い。例えば、地方自治体のホームページでは、食中毒に関する情報提供のページで「自然毒のリスク

プロフィール」を参考資料として紹介しリンクを貼っているところも多い。本分担研究で更新作業が終了した後は、厚生労働省ホームページに掲載予定である。更新版は、消費者をはじめとした多くの人にとって、より有用な参考資料になることが期待される。

E. 結論

きのこによる食中毒の中でも国内致死率の高いドクルツタケに注目し、BLAST プログラム (BLAST_TSN) を応用し、リアルタイム PCR 法によるドクルツタケ特異的遺伝子検査法のプライマー及びプローブをデザインした。同プライマー・プローブを用いて、テングタケ属内のきのこにおける交差反応性を確認したところ、ドクルツタケのみで検出されたことから、開発したリアルタイム PCR 法の特異性は良好で、各自治体の食中毒原因究明のための利用に期待される。

また、国内食中毒件数の多いテングタケのゲノム情報を取得するため、*de novo* アセンブリにより高品質なテングタケドラフトゲノムを構築した。当該ドラフトゲノムからはアマトキシン類のコアペプチドをコードする塩基配列は見つからなかった。今後、遺伝子アノテーション等を付け、公開す

ることを目指すと共に、テングタケを検出するための遺伝子検査法の開発を行う予定である。

さらにきのこ及び高等植物に関する「自然毒のリスクプロフィール」を進めている。今後動物性自然毒のリスクプロフィールの見直しも行い、更新作業の完了を目指す。

G. 研究発表・業績

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- Soga, K., Yoshiba, S., Narushima, J., Shibata, N., Kondo, K. Genome analysis of toxic mushrooms, *Pleurocybella porrigens*, using both short- and long-read sequencing technologies., IUMS2024, Florence, Italy, 2024 年 10 月 23-25 日
- 成島純平、杉野御祐、曾我慶介、吉場聡子、柴田識人. 生物種特異的遺伝子配列探索ツール BLAST_TSN の開発、第 47 回日本分子生物学会年会、福岡、2024 年 11 月 27-29 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1. NCBIより収集したテングタケ属および近縁種のITS配列一覧

Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.
<i>Amanita abrupta</i>	78360	AB015685	<i>Amanita changtuoia</i>	2303082	MH508299	<i>Amanita fuliginea</i>	67708	KJ466377
<i>Amanita abscondita</i>	2950456	ON705265	<i>Amanita chepangiana</i>	67699	KU714569	<i>Amanita fuligineodisca</i>	699466	FJ890027
<i>Amanita ahmadii</i>	1986131	MF070490	<i>Amanita chiui</i>	2303083	OR058505	<i>Amanita fuligineoides</i>	580329	JX998024
<i>Amanita albidostipes</i>	2303070	MH508501	<i>Amanita chrysolema</i>	3029462	EU071911	<i>Amanita fulva</i>	67709	MK580751
<i>Amanita albifragilis</i>	3039890	OQ780692	<i>Amanita chufiformis</i>	2730955	MT395378	<i>Amanita fulvisquamea</i>	3039892	OQ780690
<i>Amanita albocreata</i>	1812970	KU248128	<i>Amanita cinctipes</i>	1622100	OR354937	<i>Amanita fulvoalba</i>	2479931	PP102313
<i>Amanita alboflavescens</i>	576575	KM052555	<i>Amanita cinereocopia</i>	1004477	MK580797	<i>Amanita fulvogrisea</i>	3068476	OR420078
<i>Amanita albogrisescens</i>	2610870	MN490654	<i>Amanita cinereopannosa</i>	596273	MH508306	<i>Amanita fulvovidea</i>	2610874	MT980918
<i>Amanita albolimbata</i>	2779467	MT966937	<i>Amanita cinereoradicata</i>	2303084	MH508307	<i>Amanita fulvopulverulenta</i>	2733429	MT446251
<i>Amanita alboradicata</i>	2806914	MW016760	<i>Amanita cingulata</i>	2038155	MF952721	<i>Amanita fulvopyramidalis</i>	2803005	MT878221
<i>Amanita alboverrucosa</i>	226593	AY194973	<i>Amanita cinis</i>	2983844	MF489725	<i>Amanita fuscofusa</i>	2303094	MH508372
<i>Amanita alliadora</i>	1906100	KX185611	<i>Amanita cinnamomea</i>	2019495	MF461576	<i>Amanita fuscosquamosa</i>	226594	AY194974
<i>Amanita alpinicola</i>	1804615	KR152655	<i>Amanita cistetorum</i>	2014971	KX834236	<i>Amanita garabitoana</i>	1262676	JX844710
<i>Amanita alboides</i>	2611043	OQ440800	<i>Amanita citrina</i>	67700	KY587527	<i>Amanita gardneri</i>	1982021	KU057387
<i>Amanita altipes</i>	262234	MH508254	<i>Amanita citrinoannulata</i>	2303085	OQ780697	<i>Amanita gemmata</i>	67710	KY596001
<i>Amanita amerivirosa</i>	1906117	PP977127	<i>Amanita citrinoindusiata</i>	2303086	MH508320	<i>Amanita gilbertii</i>	235528	MT594493
<i>Amanita aminoaliphatica</i>	2035819	KY606981	<i>Amanita clarisquamosa</i>	67702	MK388161	<i>Amanita gioiosa</i>	2268035	MH603599
<i>Amanita annulata</i>	2870554	MZ005573	<i>Amanita claristriata</i>	3039891	OQ780688	<i>Amanita glarea</i>	1972505	KY817311
<i>Amanita annulatovaginata</i>	353749	MZ345324	<i>Amanita codinae</i>	1004479	MZ493179	<i>Amanita goossensfontanae</i>	2733442	MT446263
<i>Amanita aporema</i>	1971393	KU714575	<i>Amanita compacta</i>	2820045	MW775275	<i>Amanita grandis</i>	683160	GO925397
<i>Amanita aprica</i>	1427689	KF561973	<i>Amanita concentrica</i>	188874	KU904816	<i>Amanita griselloides</i>	2820041	MW775273
<i>Amanita arctica</i>	2014970	ON059325	<i>Amanita congolensis</i>	1004518	MK327255	<i>Amanita griseocaerulea</i>	2954326	ON994667
<i>Amanita arenaria</i>	676151	GQ925388	<i>Amanita conicoverrucosa</i>	226592	AY194972	<i>Amanita griseofarinosa</i>	223911	MH508374
<i>Amanita arenarioides</i>	2820043	MW775309	<i>Amanita constricta</i>	225430	MK580747	<i>Amanita griseofolia</i>	576577	MW192459
<i>Amanita arenicola</i>	874262	KU985210	<i>Amanita coralli</i>	2610873	OM273377	<i>Amanita griseofusca</i>	2301203	MH241057
<i>Amanita areolata</i>	262742	AB167727	<i>Amanita crasoderma</i>	1291138	KC155382	<i>Amanita griseofotherina</i>	262246	MT660446
<i>Amanita argentea</i>	2610871	ON922911	<i>Amanita crenulata</i>	1004481	MK167208	<i>Amanita griseoturcosa</i>	267473	AB167728
<i>Amanita arkansana</i>	1262670	OM987376	<i>Amanita cretaceaverruca</i>	2972978	OP235485	<i>Amanita griseoumbonata</i>	2303095	MH508389
<i>Amanita armillariiformis</i>	2970140	HQ625012	<i>Amanita crocea</i>	262261	MF278767	<i>Amanita griseoverrucosa</i>	262262	FJ441044
<i>Amanita arocheae</i>	235524	MG926558	<i>Amanita curtipes</i>	258490	PP680674	<i>Amanita groenlandica</i>	2014973	KX834241
<i>Amanita aspericeps</i>	2303071	MH508255	<i>Amanita cyanochlorinosma</i>	2479930	MK064187	<i>Amanita guyanensis</i>	2479932	MK064193
<i>Amanita asteropus</i>	1968644	KY274813	<i>Amanita cyanoindrispora</i>	235527	MT356997	<i>Amanita gymnopis</i>	1621049	MH508393
<i>Amanita atkinsoniana</i>	1004473	MW899480	<i>Amanita daucipes</i>	1004482	OP743556	<i>Amanita hamadae</i>	2303096	MH508395
<i>Amanita atrobrunnea</i>	1824567	KY747455	<i>Amanita decipiens</i>	2811194	MW589095	<i>Amanita harkoneniana</i>	2591481	MK570923
<i>Amanita atrofusca</i>	262241	AY436446	<i>Amanita densa</i>	2303087	MH508328	<i>Amanita heishidingensis</i>	1415364	KC429051
<i>Amanita augusta</i>	1236747	JX515564	<i>Amanita diemii</i>	1965122	KY462705	<i>Amanita hemibapha</i>	67743	FJ441038
<i>Amanita aureofloccosa</i>	2607670	ON695871	<i>Amanita digitosa</i>	3082948	OR725117	<i>Amanita herculis</i>	3068928	OR501895
<i>Amanita australis</i>	700565	GU222314	<i>Amanita djarilmari</i>	1982020	KU057382	<i>Amanita hesleri</i>	1004502	MT036486
<i>Amanita austroviridis</i>	1229395	JX398324	<i>Amanita domingensis</i>	2801441	OP028514	<i>Amanita heterochroma</i>	3141181	PP696889
<i>Amanita avellaneosquamosa</i>	67693	MH508258	<i>Amanita drummondii</i>	1628811	KF859754	<i>Amanita hiltonii</i>	2729196	MT365223
<i>Amanita badia</i>	2986848	OP663323	<i>Amanita dryophila</i>	2014972	ON954752	<i>Amanita huijsmanii</i>	2610875	MW426546
<i>Amanita ballerina</i>	1978193	MW029919	<i>Amanita echinulata</i>	2733428	MT446255	<i>Amanita hunanensis</i>	1729787	KU714581
<i>Amanita basiana</i>	1588741	KP258986	<i>Amanita egregia</i>	1004484	KU714563	<i>Amanita ibotengutake</i>	188935	AB211054
<i>Amanita basii</i>	1262671	MW857546	<i>Amanita eijii</i>	576576	FJ441039	<i>Amanita imazekii</i>	118142	KT779090
<i>Amanita basiorubra</i>	1453772	KF803245	<i>Amanita elata</i>	1621061	OR229914	<i>Amanita incarnatifolia</i>	67714	KU714561
<i>Amanita battarrae</i>	1638308	MK580788	<i>Amanita electra</i>	2611046	MN490646	<i>Amanita intermedia</i>	2600627	MW589076
<i>Amanita beckeri</i>	1032528	ON287053	<i>Amanita eliae</i>	1032529	OR015876	<i>Amanita inzengae</i>	3162772	PP907077
<i>Amanita betulae</i>	2610872	MN490668	<i>Amanita elliptica</i>	2303088	MH508336	<i>Amanita jacksonii</i>	87329	MZ668036
<i>Amanita bingensis</i>	2733427	MZ345346	<i>Amanita elongata</i>	2303089	MN992294	<i>Amanita japonica</i>	67715	AB015684
<i>Amanita bisporigera</i>	87325	EU819411	<i>Amanita emodotrygon</i>	1902620	MF461585	<i>Amanita javanica</i>	552858	ON059326
<i>Amanita breckonii</i>	1477852	KJ535439	<i>Amanita esculenta</i>	262242	KP004947	<i>Amanita junquillea</i>	2681214	MW589077
<i>Amanita brunneotoxicaria</i>	1978194	MH793561	<i>Amanita eucalypti</i>	1837098	OQ200140	<i>Amanita kalamundae</i>	1705360	KP898379
<i>Amanita brunneofuliginea</i>	67694	MH508270	<i>Amanita excelsa</i>	67703	MW258872	<i>Amanita kalasinensis</i>	2974062	OM040562
<i>Amanita brunneola</i>	2972980	OP235499	<i>Amanita exilis</i>	2855729	MZ508449	<i>Amanita karea</i>	2761461	MT863765
<i>Amanita brunneolimbata</i>	2303073	MH508273	<i>Amanita exitialis</i>	262245	JX998027	<i>Amanita kitamogotake</i>	2040641	MN919348
<i>Amanita brunneolocularis</i>	699465	FJ890033	<i>Amanita farinosa</i>	67704	FJ441036	<i>Amanita konajensis</i>	2795595	OR473059
<i>Amanita brunneomaculata</i>	2303074	MH508280	<i>Amanita fense</i>	2802024	MT108788	<i>Amanita kotohiraensis</i>	578074	KP258915
<i>Amanita brunneoprocera</i>	2019491	MF461573	<i>Amanita fibrillosa</i>	1229397	JX398314	<i>Amanita lactea</i>	3132125	PP892757
<i>Amanita brunneosquamata</i>	2019492	MF461582	<i>Amanita flammeola</i>	1156803	MF461585	<i>Amanita lanigera</i>	2303098	PP768065
<i>Amanita brunneostrobilipes</i>	2303075	MH508282	<i>Amanita flavella</i>	3018987	OQ200141	<i>Amanita lanivolva</i>	1691414	KT354671
<i>Amanita brunneoumbonata</i>	2019493	MF461579	<i>Amanita flavidocerea</i>	2019496	MF461578	<i>Amanita lavendula</i>	235526	MK580744
<i>Amanita brunnescens</i>	87326	MK580732	<i>Amanita flavidogrisea</i>	2019497	MF461574	<i>Amanita lepiotoides</i>	2615137	MN497357
<i>Amanita bweiyensis</i>	2591480	MK570919	<i>Amanita flavipes</i>	67705	KF245912	<i>Amanita lesueurii</i>	1229392	JX398315
<i>Amanita cacaina</i>	3028195	ON768707	<i>Amanita flavoconia</i>	71931	EU819463	<i>Amanita levistriata</i>	1656275	KU248113
<i>Amanita caesarea</i>	67695	KU714579	<i>Amanita flavofloccosa</i>	2303090	MH508352	<i>Amanita lignitincta</i>	67716	FJ441045
<i>Amanita caesareoides</i>	1243991	ON059316	<i>Amanita flavopantherina</i>	2303091	ON131735	<i>Amanita lippiae</i>	1588743	KP258991
<i>Amanita calida</i>	2878721	OK316926	<i>Amanita flavorubens</i>	1004486	OR506120	<i>Amanita liquii</i>	262247	MH508427
<i>Amanita calyptratoides</i>	1262675	KP258994	<i>Amanita flavorubescens</i>	87327	GQ166902	<i>Amanita lividopallescens</i>	2014974	MH603609
<i>Amanita calyptrodroma</i>	1194922	MK580737	<i>Amanita flavosquamosa</i>	2303092	ON059324	<i>Amanita longipes</i>	596274	FJ596833
<i>Amanita canescens</i>	2517780	MK461188	<i>Amanita foetidissima</i>	2488683	MK116537	<i>Amanita longistriata</i>	67717	KJ739812
<i>Amanita caojizong</i>	2303076	MH508287	<i>Amanita franchetii</i>	87328	JX515561	<i>Amanita loosei</i>	1260096	OP082440
<i>Amanita carneiphylla</i>	1229396	JX398325	<i>Amanita fraxinosa</i>	2303093	MW036452	<i>Amanita luteolovelata</i>	1004504	MK415847
<i>Amanita castanea</i>	1938718	KU904823	<i>Amanita friabilis</i>	1004475	MH248266	<i>Amanita luteoparva</i>	2019499	MF461575
<i>Amanita ceciliae</i>	67696	OK299148	<i>Amanita fritillaria</i>	67706	ON010560	<i>Amanita macrocarpa</i>	1352050	KY747471
<i>Amanita cerris</i>	3118364	PP258972	<i>Amanita frostiana</i>	67707	OL741520	<i>Amanita madagascariensis</i>	2955310	ON843333

表1. NCBIより収集したテングタケ属および近縁種のITS配列一覧 (つづき)

Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.
<i>Amanita mafingensis</i>	1156804	JQ512089	<i>Amanita parvifritillaria</i>	2303112	ON768701	<i>Amanita smithiana</i>	1004520	KY606983
<i>Amanita magnivelaris</i>	248095	OP643379	<i>Amanita parvirigsea</i>	2952545	ON768716	<i>Amanita solaniolens</i>	1001054	MK580791
<i>Amanita magniverrucata</i>	80575	KR919765	<i>Amanita parvipantherina</i>	262253	KF650998	<i>Amanita solitaria</i>	67729	MH603602
<i>Amanita magnivolvata</i>	2019500	MF461570	<i>Amanita peckiana</i>	71932	MW464411	<i>Amanita spadicea</i>	2610879	OP663324
<i>Amanita mairei</i>	2014976	MN490682	<i>Amanita pekeoides</i>	2761465	MT863761	<i>Amanita spissa</i>	103545	MW589090
<i>Amanita malleata</i>	2014977	MN545697	<i>Amanita pelioma</i>	1004510	OR945128	<i>Amanita spissacea</i>	78359	KM052552
<i>Amanita mallee</i>	2972979	OP235475	<i>Amanita peltigera</i>	2695030	MN894311	<i>Amanita sponsa</i>	3024587	OQ357630
<i>Amanita manginiana</i>	67718	KT779083	<i>Amanita persicina</i>	1662139	PP850626	<i>Amanita spreta</i>	1262681	MK900625
<i>Amanita manicata</i>	940657	HQ625014	<i>Amanita phalloides</i>	67723	KX449212	<i>Amanita squarrosipes</i>	2303139	MH508613
<i>Amanita mansehraensis</i>	2231777	MT445430	<i>Amanita pinophila</i>	2303114	MH508505	<i>Amanita stranella</i>	596281	FJ596814
<i>Amanita mappa</i>	2493756	MN257614	<i>Amanita pleropus</i>	235535	AY325823	<i>Amanita strobiliformis</i>	67730	MZ005547
<i>Amanita marinae</i>	3022902	OQ310901	<i>Amanita polygramis</i>	1004511	PP156188	<i>Amanita suballiaacea</i>	500611	FJ176733
<i>Amanita mamorata</i>	235529	MG252696	<i>Amanita ponderosa</i>	258489	AY486234	<i>Amanita suberis</i>	2974053	PP469622
<i>Amanita masasiensis</i>	1156805	JQ512090	<i>Amanita populiphila</i>	1004512	KU985228	<i>Amanita subfrostiana</i>	67731	KF651010
<i>Amanita melleialba</i>	1821586	ON131736	<i>Amanita porphyria</i>	78358	OR580674	<i>Amanita subfuliginea</i>	1506952	MN061276
<i>Amanita melleiceps</i>	78362	KM052539	<i>Amanita praecleara</i>	2321192	MH806862	<i>Amanita subglobosa</i>	67732	KX810031
<i>Amanita meridiocecliae</i>	3080063	OR652332	<i>Amanita praelongispora</i>	1004513	MK580762	<i>Amanita subhembapha</i>	2303140	PQ062265
<i>Amanita merxmuelleri</i>	1965123	KY462291	<i>Amanita prairicola</i>	940658	HQ625015	<i>Amanita subjunquillea</i>	67733	FJ176733
<i>Amanita miculifera</i>	2303101	MH508434	<i>Amanita preissii</i>	1925421	JX398317	<i>Amanita submaculata</i>	2072937	PP977140
<i>Amanita millsii</i>	1982019	KY977714	<i>Amanita princeps</i>	552863	MW403852	<i>Amanita submelleialba</i>	2831105	MZ045687
<i>Amanita minima</i>	2733444	MT446261	<i>Amanita protecta</i>	1579108	KP224326	<i>Amanita submembranacea</i>	619305	KM658295
<i>Amanita minutisquama</i>	2303102	MH508435	<i>Amanita proxima</i>	1004514	MH603601	<i>Amanita suborientiflava</i>	2019501	MF461584
<i>Amanita mira</i>	67719	MH508437	<i>Amanita pruitii</i>	941433	KM096565	<i>Amanita subovalispora</i>	2019502	MF461580
<i>Amanita modesta</i>	1506948	KT894851	<i>Amanita pseudoarenaria</i>	2820044	MW1775311	<i>Amanita subpallidorozea</i>	1660029	KP691676
<i>Amanita molliuscula</i>	1506954	MN061272	<i>Amanita pseudoargentea</i>	3132126	PP476815	<i>Amanita subparvipantherina</i>	1660236	MG030644
<i>Amanita morenoi</i>	1965124	KY462557	<i>Amanita pseudofritillaria</i>	2950480	ON768702	<i>Amanita supravolvata</i>	1588744	MN490647
<i>Amanita morrisii</i>	1590092	KR919760	<i>Amanita pseudogemmata</i>	262257	OQ983890	<i>Amanita sychnopyriformis</i>	78363	MH508633
<i>Amanita mortenii</i>	1756904	KT317711	<i>Amanita pseudoinculta</i>	683165	GQ925389	<i>Amanita taiepa</i>	700566	MT863755
<i>Amanita multisquamosa</i>	1004505	MK560090	<i>Amanita pseudopantherina</i>	2303116	PP549977	<i>Amanita tanzanica</i>	1156807	JF710838
<i>Amanita mummura</i>	2761462	MT863748	<i>Amanita pseudoporphyria</i>	67725	FJ441046	<i>Amanita tenuifulva</i>	2303141	MH508635
<i>Amanita murrilliana</i>	1262677	MK569745	<i>Amanita pseudoprinceps</i>	2303117	PQ062259	<i>Amanita thiersii</i>	235537	ON256802
<i>Amanita muscaria</i>	41956	AB015700	<i>Amanita pseudosculpta</i>	2952645	OP106386	<i>Amanita timida</i>	2303142	MH508636
<i>Amanita musabilis</i>	1004508	MK580717	<i>Amanita pseudosychnopyriformis</i>	1821588	OM510279	<i>Amanita torrendii</i>	683164	GQ925387
<i>Amanita nana</i>	3056481	OR434193	<i>Amanita pseudovaginata</i>	67726	FJ441042	<i>Amanita tuza</i>	1911238	KT874956
<i>Amanita nauseosa</i>	226595	HQ625013	<i>Amanita punctata</i>	226597	AB015693	<i>Amanita umbrinolutea</i>	67735	ON970906
<i>Amanita nehuta</i>	1962286	MT863749	<i>Amanita pupatju</i>	2820046	JX398329	<i>Amanita vaginata</i>	67736	DQ974691
<i>Amanita neocinctipes</i>	2303103	MH508443	<i>Amanita pyramidata</i>	2303118	MH508535	<i>Amanita validiuscula</i>	2972981	OP235502
<i>Amanita neoovoidea</i>	223910	KX270315	<i>Amanita pyramidifera</i>	226598	AY194979	<i>Amanita variicolor</i>	1507764	KP711844
<i>Amanita nigrescens</i>	1962288	MT863754	<i>Amanita quenda</i>	1601845	KP137063	<i>Amanita velatipes</i>	2303143	MK564535
<i>Amanita nothofagi</i>	2761463	MT863759	<i>Amanita radiata</i>	2086342	MT071958	<i>Amanita veldiei</i>	2321195	MH836565
<i>Amanita nouhrae</i>	1965125	MH930242	<i>Amanita ravenelii</i>	2303119	OP743683	<i>Amanita velosa</i>	315260	MT551941
<i>Amanita novinupta</i>	4905908	DQ974690	<i>Amanita ravicrocina</i>	2906732	OM040567	<i>Amanita verna</i>	112270	GM451533
<i>Amanita oberwinklerana</i>	578075	FJ176724	<i>Amanita regalis</i>	188873	MW553145	<i>Amanita vernicoccora</i>	1055356	KY655747
<i>Amanita oberwinkleriana</i>	3049723	OR058509	<i>Amanita reidii</i>	235536	AY325824	<i>Amanita verrucosivolvata</i>	67737	MW192485
<i>Amanita oblongospora</i>	1055977	JF907762	<i>Amanita retenta</i>	2303120	MK508541	<i>Amanita vestita</i>	1415362	KC429048
<i>Amanita ochracea</i>	2303104	KU714564	<i>Amanita rhacopus</i>	1507762	KY655763	<i>Amanita vidua</i>	2913269	OR293358
<i>Amanita ochrophylla</i>	226596	AY194977	<i>Amanita rhopalopus</i>	87331	MK571178	<i>Amanita virgineoides</i>	67738	FJ441032
<i>Amanita ochroterrea</i>	1456998	KF815735	<i>Amanita rimosa</i>	580330	JX998018	<i>Amanita virginiana</i>	1262682	MK508619
<i>Amanita ocreata</i>	235532	GQ486874	<i>Amanita ristichii</i>	1004517	JX844737	<i>Amanita virosa</i>	78357	AB015676
<i>Amanita oleosa</i>	683163	GQ925399	<i>Amanita roanokensis</i>	1962199	OR825556	<i>Amanita virosiformis</i>	2541715	MK580779
<i>Amanita olivaceobrunnea</i>	2153249	MH166780	<i>Amanita robusta</i>	2733430	MT829161	<i>Amanita viscidolutea</i>	2771316	MW000471
<i>Amanita olivaceofusca</i>	2303105	MH508456	<i>Amanita roseolamellata</i>	226599	KP866164	<i>Amanita vittadinii</i>	1004525	MH603603
<i>Amanita olivaceogrisea</i>	1756905	MH248267	<i>Amanita roseolifolia</i>	2303121	MH508548	<i>Amanita vladimirii</i>	2785055	MW208927
<i>Amanita olivovaginata</i>	2983845	MF489722	<i>Amanita roseotincta</i>	1368465	PP526046	<i>Amanita volvata</i>	67739	MT345230
<i>Amanita onusta</i>	1004509	MZ668200	<i>Amanita rubescens</i>	71933	EU819464	<i>Amanita wadjukiorum</i>	1390192	KF258722
<i>Amanita oreina</i>	3068721	OR419842	<i>Amanita rubiginosa</i>	2303123	MH508565	<i>Amanita wadulawitu</i>	1246612	JX398328
<i>Amanita orienticrocea</i>	2303106	OQ553810	<i>Amanita rubroflava</i>	2303124	MH508566	<i>Amanita walpolei</i>	1456999	KF815736
<i>Amanita orientifulva</i>	262250	FJ441035	<i>Amanita rubromarginata</i>	1262680	PQ062262	<i>Amanita wellsii</i>	1004526	KU248115
<i>Amanita orientigemmata</i>	262251	ON131764	<i>Amanita rubrovolvata</i>	67727	ON059317	<i>Amanita westii</i>	1004527	OP163232
<i>Amanita orsonii</i>	1812971	KX270327	<i>Amanita rubrorunnescens</i>	1811828	ON971238	<i>Amanita xanthocephala</i>	226601	MT571657
<i>Amanita ovalispora</i>	576578	FJ441041	<i>Amanita rufoferruginea</i>	1816455	KU497532	<i>Amanita xerocybe</i>	1291139	KT724071
<i>Amanita ovoidea</i>	2035817	MH603605	<i>Amanita sabulicola</i>	2716916	MT180988	<i>Amanita xyliniivolvata</i>	699468	ON134034
<i>Amanita pachycolea</i>	80576	KT874953	<i>Amanita sabulosa</i>	2820042	KF859749	<i>Amanita yangii</i>	2950479	ON768743
<i>Amanita pachyvolvata</i>	2610876	MN490701	<i>Amanita sculpta</i>	654434	ON768719	<i>Amanita yanshanensis</i>	3144888	PP768066
<i>Amanita pakistanica</i>	1906111	KX061525	<i>Amanita sepiacea</i>	262258	MW258870	<i>Amanita yenii</i>	2303144	MH508652
<i>Amanita pallidocarnea</i>	2303107	MH508482	<i>Amanita shennongjiana</i>	2303125	MH508590	<i>Amanita yuaniana</i>	67740	KU714560
<i>Amanita pallidorosea</i>	1324310	KJ466382	<i>Amanita siamensis</i>	2303126	ON131776	<i>Amanita zambiana</i>	1004528	JX844751
<i>Amanita pallidoverruca</i>	2915010	OM509734	<i>Amanita silvicola</i>	80577	GQ250408	<i>Amanita zangii</i>	1506958	KY747470
<i>Amanita pallidozonata</i>	2303109	MH508486	<i>Amanita silvifuga</i>	940659	HQ625016	<i>Amanita zonata</i>	2303145	ON794400
<i>Amanita paludosa</i>	2135321	MW526935	<i>Amanita similis</i>	1156806	KU714573	<i>Lepiota venenata</i>	2136145	MK095189
<i>Amanita pantherina</i>	67721	AB096044	<i>Amanita simulans</i>	2014969	KX834253	<i>Limacella glioderma</i>	67741	MK412398
<i>Amanita pantherinoides</i>	2291733	OM212972	<i>Amanita sinensis</i>	67728	KY747458	<i>Limacella glischra</i>	56179	KT168211
<i>Amanita parcivolvata</i>	1590093	MK580721	<i>Amanita singeri</i>	1004519	MK461186			
<i>Amanita parva</i>	3127508	PP436690	<i>Amanita sinicoflava</i>	545494	KJ638257			
<i>Amanita parvicurta</i>	2303111	MH508490	<i>Amanita sinocitrina</i>	2303127	MN622709			

表2 アマトキシソ類のクエリとして用いたアミノ酸配列

毒素名	クエリ配列	クエリアミノ酸配列
α -amanitin	α アマニチンコアペプチド	IWGIGCNP
β -amanitin	β アマニチンコアペプチド	IWGIGCDP
amanexitide	amanexitideコアペプチド	VFSLPVFFP
phallectidin	phallectidinコアペプチド	AWLVDCP
phalloidin	ファロイジンコアペプチド	AWLATCP

表3. 本研究で推定したテングタケ属サンプル一覧

学名	和名	採取地	採取日	Identity of rRNA (%)	Identity of rpb2 (%)
<i>Amanita ibotengutake</i>	イボテングタケ	小金井市	2011.10.12	-	99.68%
<i>Amanita lanigera</i>	-	小金井市	2012.9.29	99.03%	99.83%
<i>Amanita orientigemmata</i>	ウスキテングタケ	小金井市	2012.9.30	99.72%	99.84%
<i>Amanita neoovoidea</i>	シロテングタケ	八王子市	2012.10.3	-	98.77%
<i>Amanita pallidorosea</i>	アケボノドクツルタケ	札幌市桜山	2023.8.19	100%	100%
<i>Amanita molliuscula</i>	-	札幌市桜山	2023.9.23	100%	99.81%
<i>Amanita oberwinklerana</i>	ニオイドクツルタケ	横浜市	2024.6.30	-	100%
<i>Amanita orienticrocea</i>	コガネツルタケ	横浜市	2024.6.30	99.38%	99.85%
<i>Amanita spissacea</i>	ヘビキノコモドキ	横浜市	2024.6.30	99.66%	99.66%
<i>Amanita satotamagotake</i>	サトタマゴタケ	高尾山	2024.7.28	99.67% [†]	100%
<i>Amanita flavipes</i>	コガネテングタケ	長野	2024.7.28	-	100%
<i>Amanita muscaria</i>	ベニテングタケ	長野	2024.7.28	100%	98.56%
<i>Amanita caesareoides</i>	タマゴタケ	富士山	2024.9.7	100%	100%
<i>Amanita regalis</i>	オウテングタケ	富士山	2024.9.7	100%	N.A.
<i>Amanita sepiacea</i>	テングタケモドキ	富士山	2024.9.17	100%	100%
<i>Amanita sphaerobulbosa</i>	タマシロオニタケ	宇津峰山	2024.9.26	N.A. [‡]	100%
<i>Amanita virosa</i>	ドクツルタケ	富士山	2024.9.30	100%	99.84%
<i>Amanita citrina</i>	コタマゴテングタケ	富士山	2024.9.30	-	99.37%
<i>Amanita porphyria</i>	コテングタケ	富士山	2024.9.30	99.53%	100%
<i>Amanita pseudoporphyria</i>	コテングタケモドキ	福島	2024.10.3	-	99.20%
<i>Amanita virgineoides</i>	シロオニタケ	福島	2024.10.3	-	100%
<i>Amanita longistriata</i>	タマゴテングタケモドキ	福島	2024.10.4	100%	-
<i>Amanita imazekii</i>	ミヤマタマゴタケ	富士山	2024.10.7	100%	-
<i>Amanita sychnopyraxis</i>	テングタケダマシ	広島	2024.11.1	99.79%	98.31%

[†]サトタマゴタケとタマゴタケのrRNA配列は同一であり、全てタマゴタケとして登録されているため、ここではタマゴタケのrRNA配列との相同性を示す

[‡]NCBIデータベースに配列の登録なし

表4. テングタケITS配列のNCBI BLAST検索結果

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<i>Amanita sp.</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	693	OR058499.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	619	LC832100.1
<i>Amanita subglobosa</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	655	PQ855800.1
<i>Amanita subglobosa</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	723	KX810031.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	671	MW554376.1
<i>Amanita subglobosa</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	715	ON059314.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	674	OQ430774.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	703	AB096044.1
<i>Amanita sp.</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	673	OR058500.1

表5. 各ステップにおけるシーケンスリードの統計値

リード名	reads 1	reads 2	reads 3'	reads 3	reads 4'	reads 4
step	ベースコール (dorado duplex) 後	読み取りエラー訂正 (dorado correct) 後	ミトコンドリアゲノム由来リード	reads 2 からミトコンドリアゲノム由来リードを抜いた後	バクテリアゲノム由来リード	reads 3 からバクテリアゲノム由来リードを抜いた後
リード数	2,398,366	1,037,519	1,328	1,036,191	68,909	967,282
トータル塩基数	33,422,856,116	21,234,493,332	22,382,259	21,212,111,073	1,286,335,346	19,925,775,727
最小塩基長	5	2	226	2	266	2
平均塩基長	13,935.70	20,466.60	16,854.10	20,471.20	18,667.20	20,599.80
最大塩基長	1,196,182	156,474	99,422	156,474	129,944	156,474
配列長： 25パーセンタイル	3,374	9,088	5,188	9,098	8,565	9,139
配列長：中央値	8,714	15,854	6,583	15,861	14,588	15,958
配列長： 75パーセンタイル	19,130	27,434	24,813	27,436	24,595	27,666
N50	25,880	28,345	33,806	28,340	24,771	28,587
N50の配列数	57,864	48,488	224	48,473	12,547	47,672
GC(%)	44.4	46.44	40.79	46.44	48.97	46.28
全リード中割合 (%)	100	43.3	0.1	43.2	2.9	40.3
全塩基中割合 (%)	100	63.5	0.1	63.5	3.8	59.6

※リード名に関しては図6 参照

表6. PromethIONの全ゲノムシーケンスによるアセンブリとBUSCO値

ベースコーラー	dorado duplex		dorado duplex + dorado correct			
アセンブラ	Flye	NECAT	PECAT			
全コンティグ数	459	90	55 ※primary			
全塩基長	79,160,358	69,843,935	52,450,547			
最短塩基長	532	6,994	6,944			
平均塩基長	172,462.70	776,043.70	953,646.30			
最大塩基長	4,258,084	5,547,760	5,549,241			
N50	342,400	1,456,692	3,792,753			
N50 コンティグ数	63	13	6			
GC(%)	46.82	46.44	47.31			
BUSCO database	fungi_odb1 0	bacteria_odb1 0	fungi_odb1 0	bacteria_odb1 0	fungi_odb1 0	bacteria_odb1 0
Complete BUSCOs (%)	99.40%	98.40%	99.20%	97.60%	99.40%	97.60%
Complete and single-copy BUSCOs (%)	68.50%	8.10%	69.00%	96.00%	83.00%	59.70%
Complete and duplicated BUSCOs (%)	30.90%	90.30%	30.20%	1.60%	16.40%	37.90%
Fragmented BUSCOs (%)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.60%
Missing BUSCOs (%)	0.60%	1.60%	0.80%	2.40%	16.40%	0.80%
Total BUSCO groups searched (n)	758	124	758	124	758	124

※PECATで得られる2つのコンティグファイル「primary.fasta」「alternate.fasta」の内、「primary.fasta」を使用して解析した。

表7. フィルタリングリードを用いたアセンブリ結果とBUSCOスコア

ベースコール	dorado duplex		dorado duplex		dorado duplex + dorado correct		
リード由来	-		-		-		
アセンブラ	細菌属		テングタケ		テングタケ		
num_seqs	hybracter		Flye		PECAT		
sum_len	24		356		20		
min_len	10,298,663		57,876,654		44,265,375		
max_len	1,801		1,173		41,995		
avg_len	429,111		162,574.90		2,213,268.80		
sum_gap	3,226,132		2,052,353		9,294,163		
N50	0		0		0		
N50_num	936,362		404,489		3,808,859		
GC(%)	3		41		5		
	49.84		46.19		46.4		
BUSCO database	fungi_odb10	bacteria_odb10	fungi_odb10	bacteria_odb10	fungi_odb10	bacteria_odb10	agaricales_odb10
Complete BUSCOs (%)	5.90%	99.20%	99.40%	5.60%	99.60%	5.60%	95.40%
Complete and single-copy BUSCOs (%)	1.70%	21.00%	88.30%	5.60%	84.60%	5.60%	81.90%
Complete and duplicated BUSCOs (%)	4.20%	78.20%	11.10%	0.00%	15.00%	0.00%	13.50%
Fragmented BUSCOs (%)	1.80%	0.80%	0.00%	18.50%	0.00%	17.70%	0.40%
Missing BUSCOs (%)	92.30%	0.00%	0.60%	75.90%	0.40%	76.70%	4.20%
Total BUSCO groups searched (n)	758	124	758	124	758	124	3870

表8. テングタケ属の遺伝子検出法に関する論文または書籍

No.	方法	標的遺伝子	検出対象	参照	国
1	サンガーSeq →BLAST	ITS、mtDNA	<i>Amanita</i> 属等	rDNAのITS領域のBLAST検索による比較 White et al, 1990, PCR protocol	(書籍)
2	定性PCR 635bp	GPD (glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase)	<i>A. phalloides</i>	Kotlowski et al, 2007, J Food Biochem	ポーランド
3	SYBR-Real- time PCR	毒遺伝子	<i>A. phalloides</i>	Epis et al, 2009, Mycologia	イタリア
4	DNAアレイ	ITS	<i>Amanita</i> species	Harper et al, 2011, J Forensic Sci	米国
5	定性PCR 204bp	ITS	<i>A. Phalloides</i> 等 猛毒種3種	Gausterer et al, 2014, Forensic Sci Int Genet	オーストリア
6	RCA、 定性PCR	AMA	<i>A. phalloideae</i> 節	He et al, 2019, FoodChem	中国
7	LAMP	ITS	<i>A.citrinoannulata</i>	Gao et al, 2022, FoodChem-Oxf	中国
8	TaqMan- Real-time PCR	ITS	10種の強毒Amanita 属	Zhao et al. 2023, LWT	中国
9	定性PCR 300bp	リーダーペプチド MSDIN配列	<i>Amanita</i> 属	Parnmen et al, 2023, Trends in Sciences	タイ
10	TaqMan- Real-time PCR	ITS	<i>A. Phalloideae</i> 節	Duan et al, 2024, Front Microbiol	中国
11	SYBR-Real- time PCR	AMA1 (α -amanitin)	Amanitin産生きのこ	Hoa et al, 2024, Vietnam Journal of Food Control	ベトナム
12	TaqMan- Real-time PCR	ITS	<i>A. exitialis</i>	Zhang et al, 2024, Food Chem	中国
13	DNA- Barcoding	ITS、RPB2	<i>Amanita</i> 属	Xing RR et al. 2024. Appl Microbiol Biotechnol.	中国

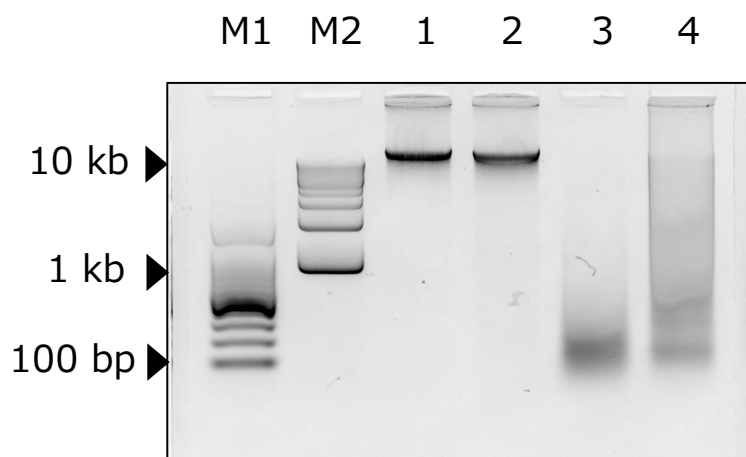
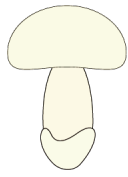


図1. テングタケ属の子実体から抽出したゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動図

抽出したゲノムDNAを1%アガロースゲルで電気泳動した。1: *Amanita molliuscula* (和名無し) , 2: *Amanita orienticrocea* (コガネツルタケ) , 3: *Amanita cf. neoovoidea* (シロテングタケ) , 4: *Amanita cf. sphaerobulbosa* (タマシロオニタケ) , M1: 100 bp Ladder, M2: 1 kb Ladder

A**BLAST_TSN (Target-Specific Nucleotide)**https://github.com/NIHS-DNFI/BLAST_TSN

ドクツルタケrRNA-sequence.fasta (695 base)

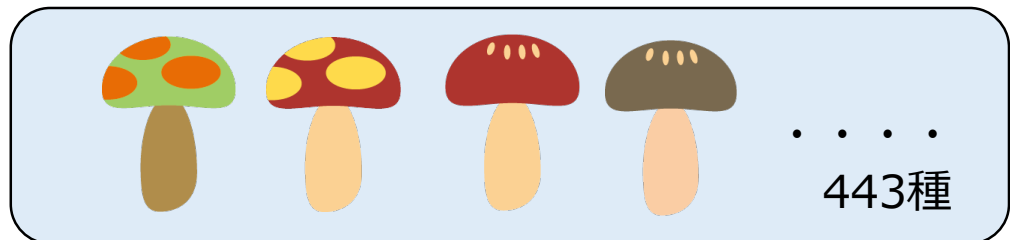
5'  3'

25 mer

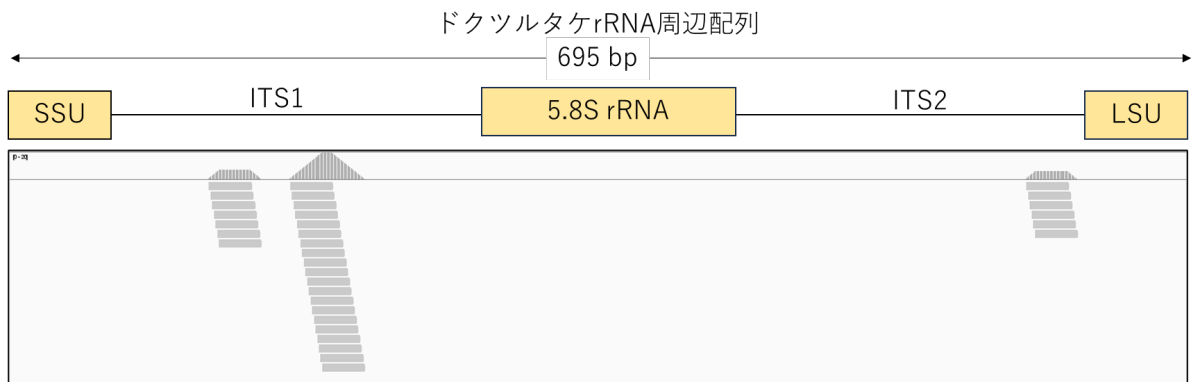
標的遺伝子配列内で25merの 1bp-sliding windowに断片を生成(合計671配列生成)

BLAST e-value: 1e-4

Negative selection



ドクツルタケ特異的配列候補として抽出

B**図2. BLAST_TSNにより同定されたドクツルタケ特異的配列**

A) ドクツルタケ特異的配列抽出スキームをBLAST_TSNで構築。ドクツルタケrRNAの遺伝子配列から 25mer × 671種の配列を生成し、443種のドクツルタケ以外のAmanita属きのこのrRNA遺伝子配列に相同性の低い配列をBLASTによるネガティブセレクションにより抽出した。

B) BLAST_TSNにより同定されたドクツルタケ特異的配列を、ドクツルタケrRNA遺伝子配列にアライメントした結果をIGVで示した。ドクツルタケ特異的配列はITS1上に27配列、ITS2上に6配列の計33配列が同定された。

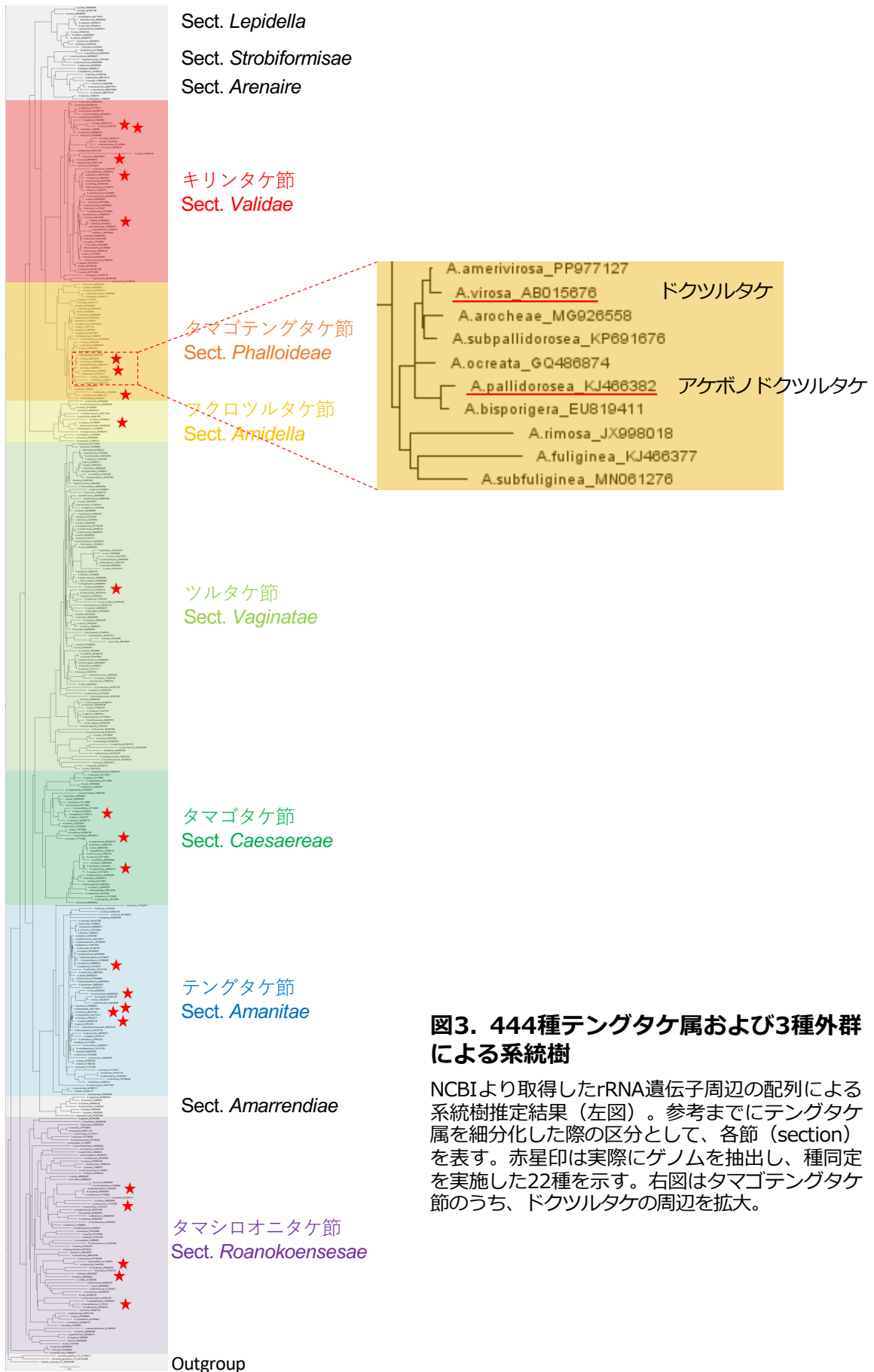
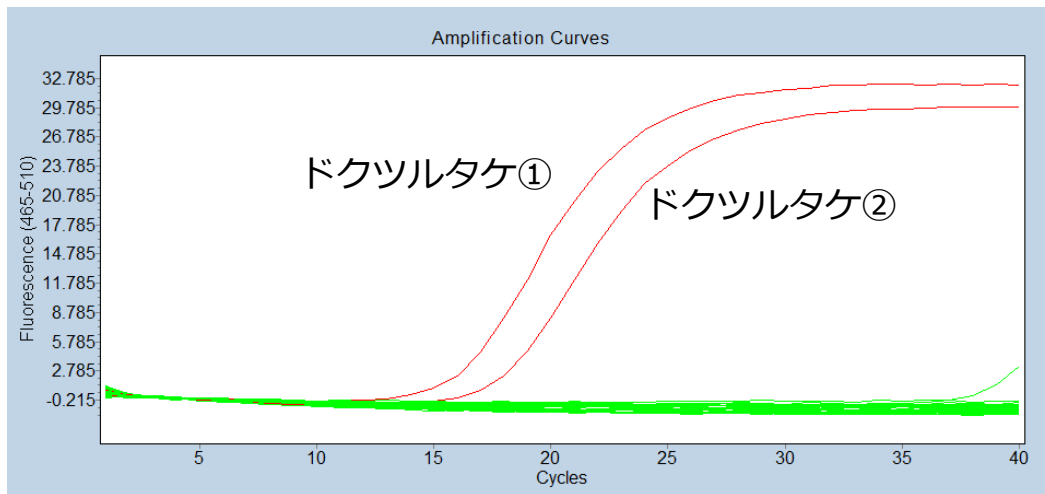


図3. 444種テングタケ属および3種外群による系統樹

NCBIより取得したrRNA遺伝子周辺の配列による系統樹推定結果（左図）。参考までにテングタケ属を細分化した際の区分として、各節（section）を表す。赤星印は実際にゲノムを抽出し、種同定を実施した22種を示す。右図はタマゴテングタケ節のうち、ドクツルタケの周辺を拡大。



サンプル名	Cq値
コタマゴテングタケ	-
コテングタケ	-
テングタケモドキ	-
コガネテングタケ	-
ヘビキノコモドキ	-
ドクツルタケ①	15.85
ドクツルタケ②	17.59
アケボノドクツルタケ	-
<i>Amanita molliuscula</i>	-
コガネツルタケ	-
タマゴタケ	-
タマゴテングタケモドキ	-
ミヤマタマゴタケ	-
イボテングタケ	-
ベニテングタケ	-
オウテングタケ	-
ウスキテングタケ	-
テングタケダマシ	-
シロオニタケ	-
タマシロオニタケ	-
ニオイドクツルタケ	-
シロテングタケ	-
コテングタケモドキ	-
<i>Amanita lanigera</i>	-
SDW	-

図5.リアルタイムPCR法を用いたドクツルタケ特異的遺伝子検査法の特異性確認

テングタケ属キノコ24種のゲノムを用いた特異性試験の結果、本法はドクツルタケのみで増幅が確認された。ドクツルタケのみ2個体用いた。

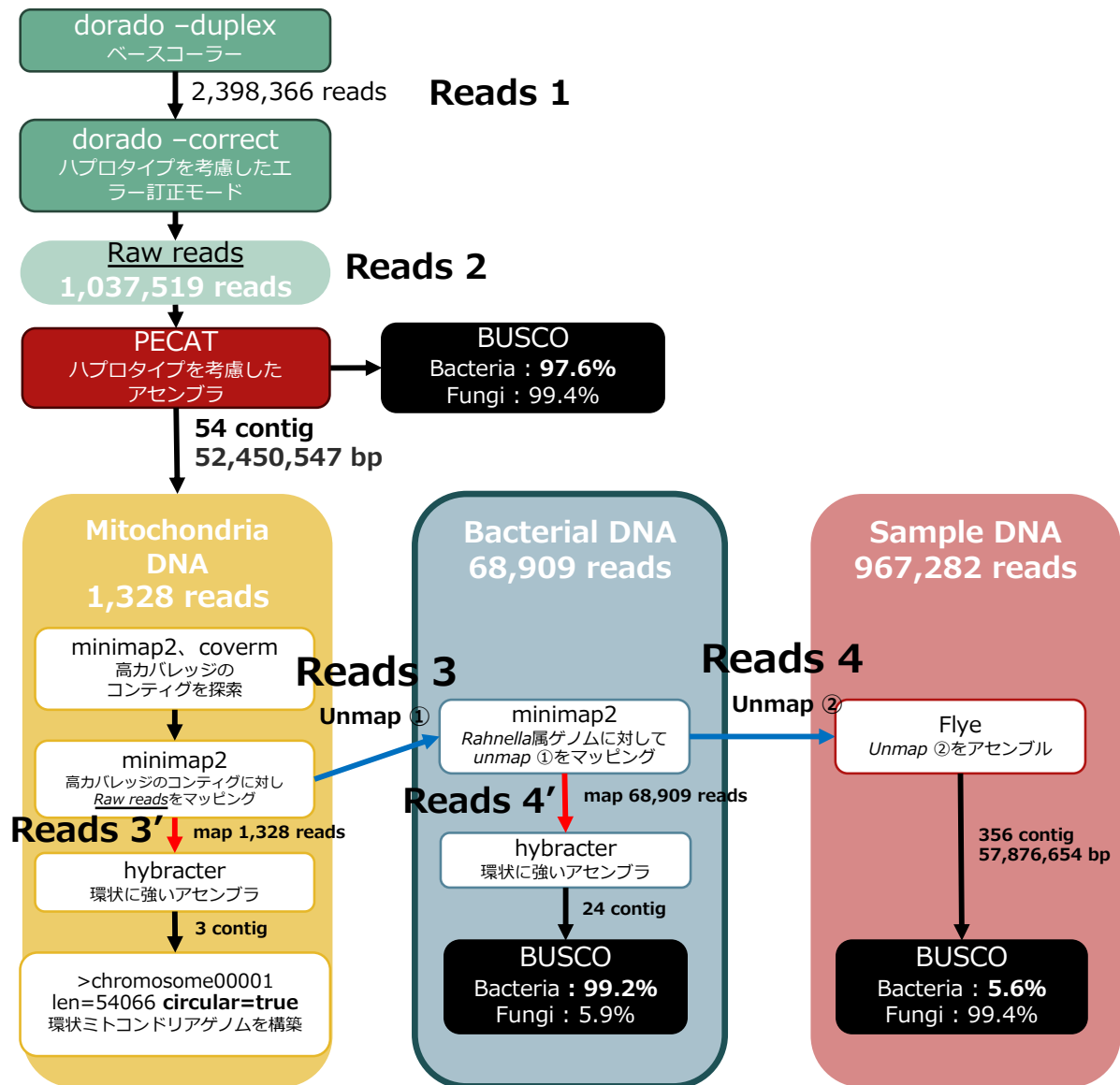
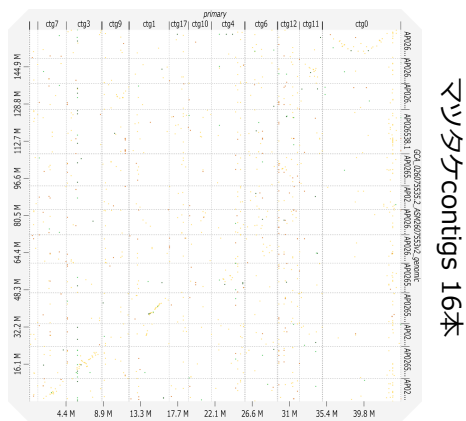


図6. シークエンスリードのベースコールおよびフィルタリングのスキーム

ロングリードシーケンスの全リードであるraw readsから、ミトコンドリアゲノム由来のリードを除外し、次に細菌ゲノム由来のリードを除外するまでの概要を表す。ミトコンドリア由来のリードは環状ゲノム構築に成功した。細菌ゲノム由来のリードから構築したコンティグは、妥当なBUSCO値を示した。また、残ったリードで構築したコンティグのBUSCO値からは、細菌ゲノム由来リードの減少が認められた。図中のBUSCO値はヒットしたBUSCO idのうち、statusがcompleteに分類される割合を示している。

A テングタケcontigs 20本



B テングタケcontigs 20本

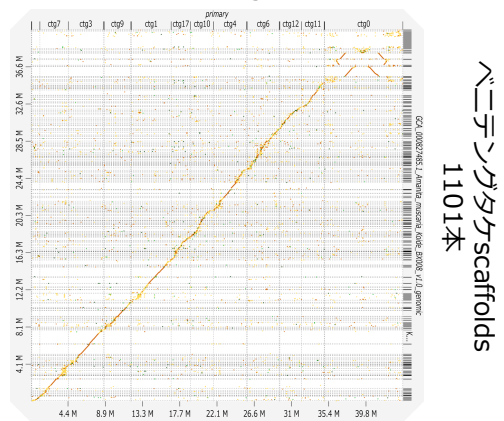


図7. D-GENIESのゲノム比較結果

本研究で構築されたテングタケのアセンブリと、論文報告のある (A) マツタケゲノム (GenBank No. GCA_026075535.2)、(B) ベニテングタケ (GenBank No. GCA_000827485.1) のアセンブリを、D-GENIESを用いて比較した。テングタケと異なるキシメジ科に分類されるマツタケとは相同性が低かったが、テングタケと同じテングタケ科テングタケ属に分類されるベニテングタケとは、高い相同性を有していた。

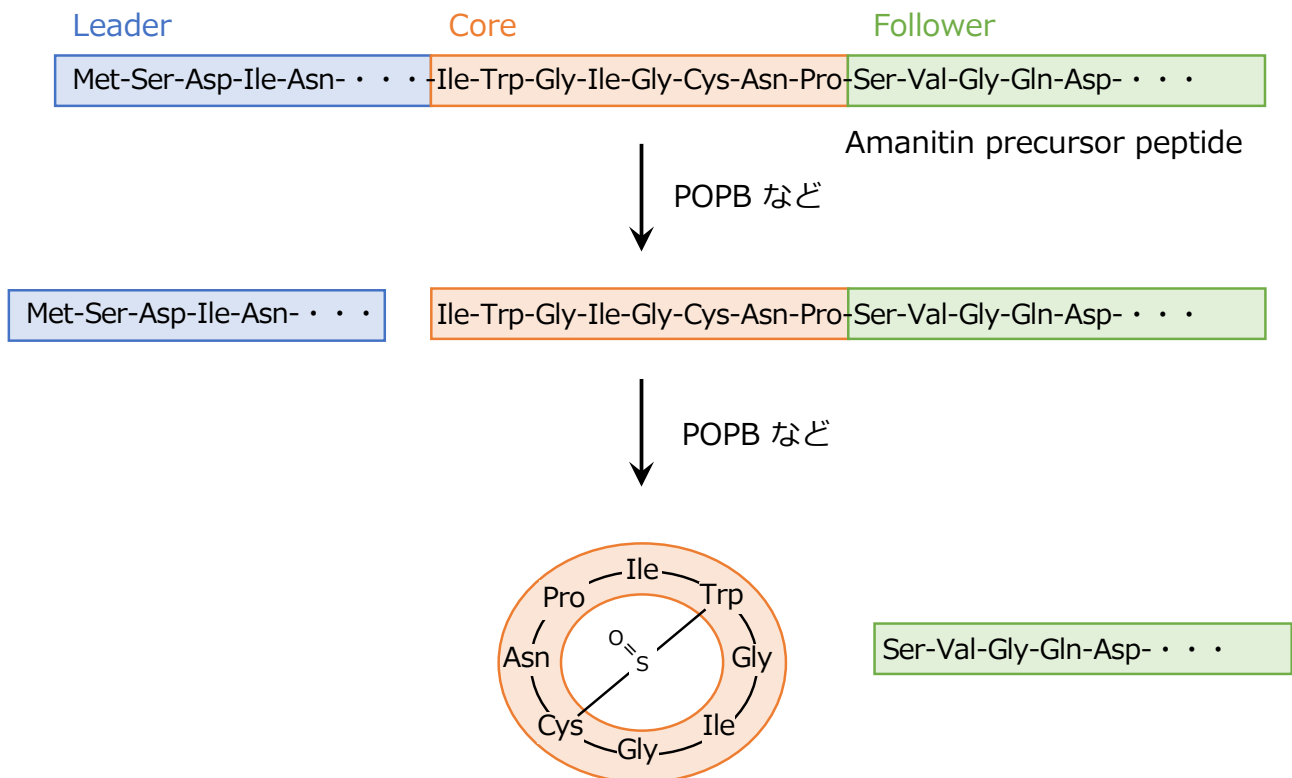


図8. アマニチンの生合成

α-アマニチンの前駆体ペプチドから、環状化α-アマニチンの生合成を図示。
 POPB (prolyl oligopeptidase B)などにより、アマニチンの前駆体ペプチドからコアペプチド部分が切り出され、このコアペプチドが環状化する。