

【緒言】担子菌類の正確な同定は、微生物利用、医療関係、衛生管理、農業分野などの様々な分野で必要とされている。現在は、DNA を用いる同定方法が発達し、検出感度も信頼性も高いために頻用されている。しかし、DNA クローニングには手間がかかり、大量に塩基配列を分析するにはコストが高くなる。そこで、より迅速、簡便で低コストである、細胞中のタンパク質の情報に基づく同定方法が注目されている。この方法では、MALDI-TOF MS を用いて、細胞内の 2000~20000Da の比較的小さなペプチド全てを合わせたスペクトルを用いる。細胞内すべてのタンパク質に基づくスペクトルは種間や種内の変異を検出できる可能性がある。種が未知の菌株より得られたスペクトルを既知の菌種のスペクトルと比較することで種の同定またはタイピングを行う。バクテリアおよび酵母類ではスペクトルのデータベースが作成されており、実用段階の研究が進められている。しかし、糸状菌類ではまた報告が少ない。そこで本研究では、担子菌類の種の同定およびタイピングについて検討することとした。菌糸培養時、成長段階によって異なる菌糸形態を示す株が存在し、この成長段階による MS スペクトルへの影響について検討した。また、毒成分を持つツキヨタケ (*Omphalotus guepiniiformis*) の子実体は、シイタケ (*Lentinula edodes*) やムキタケ (*Panellus serotinus*) の子実体と似ており、誤食が報告されている。このような担子菌類に対する MALDI-TOF MS を用いた同定可能であるか検討した。

【実験方法】木材腐朽菌を中心とした担子菌類を用いた。各供試菌をポテトデキストロース寒天培地で培養し、定常期のコロニーより菌糸を回収した。エタノール-ギ酸抽出法よりタンパク質を抽出し、Bradford 法を用いてタンパク質濃度を測定した。試料板にタンパク質抽出液と Bacterial Test Standard を塗布し、乾燥させた。その上へ重ねて、マトリックス溶液として、アセトニトリル、超純水、トリフルオロ酢酸に溶解した飽和濃度の添加した  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid を塗布した。Autoflex Speed (Burker) を用いてキャリブレーションを行った。その後、サンプルの MS スペクトルを取得し、MALDI Biotyper (Burker) を用いてデータベースを作成した。種間および種内のスペクトルパターンを比較した。

【結果と考察】MALDI-TOF MS を用いて 13 種 61 株の担子菌類から取得した。細胞内に生産されたペプチドすべてについてのスペクトルパターンは、菌種または菌株に特徴的であった。これにより、糸状菌類である担子菌類でも抽出したタンパク質を用いて菌種の同定や種内変異の検出ができる可能性が示された。しかし、ツキヨタケやヤケイロタケ (*Bjerkandera adusta*) のように増殖ステージによってコロニーの色調や形態が変化する種では、増殖ステージによってスペクトルのパターンが変化した。増殖ステージが同一であれば、スペクトルパターンの再現性は高かった。そのため、様々な増殖ステージのスペクトルをデータベースに登録しておくことで多様な成長段階に対応した同定が可能となると考えられる。カワラタケ (*Trametes versicolor*) とその近縁種アラゲカワラタケ (*T. hisuta*) のスペクトルはそれぞれの種内では類似性が認められたが、種間では明らかに類似性が低かった。一方、ウスヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) では種内でも大きな変異が見られた。これらのことから、種・属レベルから種内レベルでの多様性を検出できることが示唆された。子実体が似ているツキヨタケ、シイタケ、ムキタケにおいても、MALDI-TOF MS を用いて判別することができ、食用菌の判定への応用の可能性が示された。