

報 文

内部転写スペ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

(平成 14 年 9 月 3 日受理)

丸山卓郎*¹ 代田 修*¹ 川原信夫*¹
横山和正*² 牧野由紀子*³ 合田幸広*^{1,†}Discrimination of Psychoactive Fungi (Commonly Called "Magic Mushrooms") Based
on the DNA Sequence of the Internal Transcribed Spacer RegionTakuro MARUYAMA*¹, Osamu SHIROTA*¹, Nobuo KAWAHARA*¹, Kazumasa YOKOYAMA*²,
Yukiko MAKINO*³ and Yukihiko GODA*^{1,†}(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;*²Faculty of Education, Shiga University: 2-5-1, Hiratsu, Otsu 520-0862, Japan; *³Kanto-Shin'etsuRegional Narcotic Control Office, Ministry of Health, Labor and Welfare: 2-4-14, Nakameguro,
Meguro-ku, Tokyo 153-0061, Japan; †Corresponding author)

'Magic mushrooms' (MMs) are psychoactive fungi containing the hallucinogenic compounds, psilocin (**1**) and psilocybin (**2**). Since June 6, 2002, these fungi have been regulated by the Narcotics and Psychotropics Control Law in Japan. Because there are many kinds of MMs and they are sold even as dry powders in local markets, it is very difficult to identify the original species of the MMs by morphological observation. Therefore, we investigated the internal transcribed spacer (ITS) region in the ribosomal RNA gene of MMs obtained in Japanese markets to classify them by a genetic approach. Based on the size and nucleotide sequence of the ITS region amplified by PCR, tested MMs were classified into 6 groups. Furthermore, a comparison of the DNA sequences of the MMs with those of authentic samples or with those found in the databases (GenBank, EMBL and DDBJ) made it possible to identify the species of tested MMs. Analysis by LC revealed that psilocin (**1**) was contained at the highest level in *Panaeolus cyanescens* among the MMs, but was absent in the *Amanita* species.

(Received September 3, 2002)

Key words: マジックマッシュルーム magic mushroom; サイロシン psilocin; 内部転写スペーサー領域 internal transcribed spacer region; シビレタケ属 *Psilocybe* genus; ヒカゲタケ属 *Panaeolus* genus; テングタケ属 *Amanita* genus

緒 言

幻覚性キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム, 以下 M.M.) は, 麻薬成分 (サイロシン, **1**; サイロシピン, **2**; Fig. 1) を含有するキノコで, これを摂取すると幻覚作用が現れることがある. 近年, M.M. を食することによる中毒事故が多発したことなどを考慮し, 厚生労働省は, 平成 14 年 6 月より **1**, **2** を含有するキノコ類を麻薬原料植物に指定した¹⁾.

1, **2** は, LSD の約 200 分の **1**, メスカリンの約 50 倍ではあるが, 幻覚性を有している^{2), 3)}.

これらの化合物を含有するキノコ類としては主にシビレタケ属 (*Psilocybe*) およびヒカゲタケ属 (*Panaeolus*) に属するキノコ類が該当するが, その数は現在知られているものだけでも 50 種以上と言われており⁴⁾, 日本国内にも 11

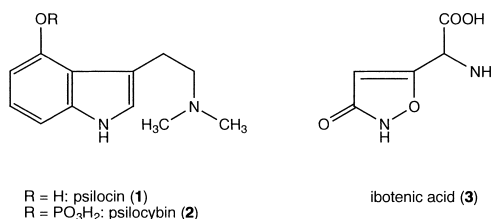


Fig. 1. Structures of hallucinogenic compounds

† 連絡先

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1*² 滋賀大学教育学部: 〒520-0862 滋賀県大津市平津 2-5-1*³ 厚生労働省関東信越厚生局麻薬取締部: 〒153-0061 東京都目黒区中目黒 2-4-14

種が自生する。この種類の多さに加え、M.M. は市場において粉末やカプセル剤として流通している場合も多いため、その同定は形態学的な側面からのみでは困難を伴う。そこで本研究では、M.M. 基原種の DNA による鑑定法を開発するため、まず国内市場品および野生標品について rRNA の内部転写スペーサー (internal transcribed spacer, ITS) 領域における塩基配列の解析、分類を行った。また、各検体についてサイロシン含量を測定し、M.M. 基原種とサイロシン含量との関係を調べた。

実験方法

1. 試料

国内市場品については、平成 13 年度に全国 13 都道府県の店舗および通信販売によって購入された 42 検体 (子実体, 乾燥品) を用いた。キノコの標品は著者の一人 (K. Y.) が同定した野生品 4 種およびアムステルダムの市場にて購入した 1 種を用いた (Table 1)。これらの野生品は、採集後 60°C で送風乾燥し、湿度管理下 (50% 以下)、防虫剤 (ナフタレン) とともに標本箱中で保管したものである。

2. 試薬

Genomic DNA の抽出、精製には、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製) を用いた。PCR 酵素は Gene Taq NT (NIPPON GENE (株) 製) を、緩衝液および dNTP は、酵素に添付のものを用いた。電気泳動用のアガロースゲルは Agarose S (NIPPON GENE (株) 製) を、DNA マーカーは DNA Ladder, 100 bp (Bayou Biolabs 社製) を用いた。アガロースゲルからの DNA の抽出、精製には QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を用いた。また、cycle sequencing 反応には BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems 社製) および DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いた。1 の標品は国立衛研生薬部で合成したものをを用いた。また、各試料液の前処理用フィルターとしてクロマトディスク (非水系, 0.45 μ m; GL Sciences 社製) を用いた。

3. 機器

サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株) 製) を用いた。塩基配列の解析には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosys-

tems 社製) を用いた。振とう機は SR-2w (Taitec 社製) を、遠心機は KUBOTA-6900 ((株)クボタ製) を用いた。また、LC 装置には HP1100 システム (ポンプ: G1312 A, 検出器: G1321A, 恒温槽: G1316A; Hewlett Packard 社製) を、LC/MS 装置には JMS LC-Mate (日本電子 (株) 製) を用いた。

4. ITS 領域および rRNA large subunit 遺伝子の塩基配列解析

乾燥試料 (50 mg) を液体窒素下で粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製) を用いて genomic DNA を抽出、精製した。得られた DNA を鋳型とし、菌類の rRNA 遺伝子配列を基に設計されたプライマーセット (sense-1, antisense-1)^{5), 6)} を用いて PCR を行うことにより ITS 領域を増幅した。

PCR は、反応液を 50 μ L (0.25 mmol/L dNTP, 1.25 unit Gene Taq NT, each 0.5 μ mol/L primers) とし、以下の温度プログラムにより行った。前処理, 94°C 4 分; 熱変性, 94°C 1 分, アニール, 60°C 1 分, 伸長, 74°C 1 分, 30 サイクル; 後処理, 72°C 4 分。

PCR 産物は、アガロースゲル (1%) 電気泳動により分離後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を用いて精製し、Direct Sequencing により塩基配列の解析を行った。抽出した DNA が著しく損傷しており、上記の方法による解析が困難な検体については、さらに sense-2 と antisense-1 のプライマーセットを用いた nested PCR を行い、生成物を Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen 社製) を用いて pCR[®]-Blunt vector に導入後、塩基配列を決定した。

また、rRNA large subunit 遺伝子の部分配列の解析は、プライマーに sense-3, antisense-2 を用いたほかは、上記と同様の方法を用いた。得られた塩基配列の比較、系統樹解析は Clustal W プログラム⁷⁾ を用いて行った。使用したプライマーの配列は Table 2 に示すとおりである。

Table 2. PCR Primers

Name	Sequence
Sense-1	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
Sense-2	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
Sense-3	5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3'
Antisense-1	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
Antisense-2	5'-ATCCTGAGGGAACTTCGGCA-3'

Table 1. Data of Authentic *Psilocybe* and *Panaeolus* sp. Samples

Scientific name	Japanese name	Data of collection	PCR product size (bp) ^{a)}	Accession No.
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	Hikagetake	1999.06.03	281	AY152728
<i>Panaeolus subbatteatus</i>	Senbonsaigyogasa	1983.07.	299	AB092794
<i>Psilocybe argentipes</i>	Hikageshibiretake	1983.07.18	291	AB092792
<i>Psilocybe subaeruginascens</i>	Oshibiretake	1983.09.23	319	AB092793
<i>Psilocybe tampanensis</i> ^{b)}	—	2000.12.04	291	AF548391

^{a)} Sense-2 and antisense-1 primers were used.

^{b)} Purchased in a market in Amsterdam.

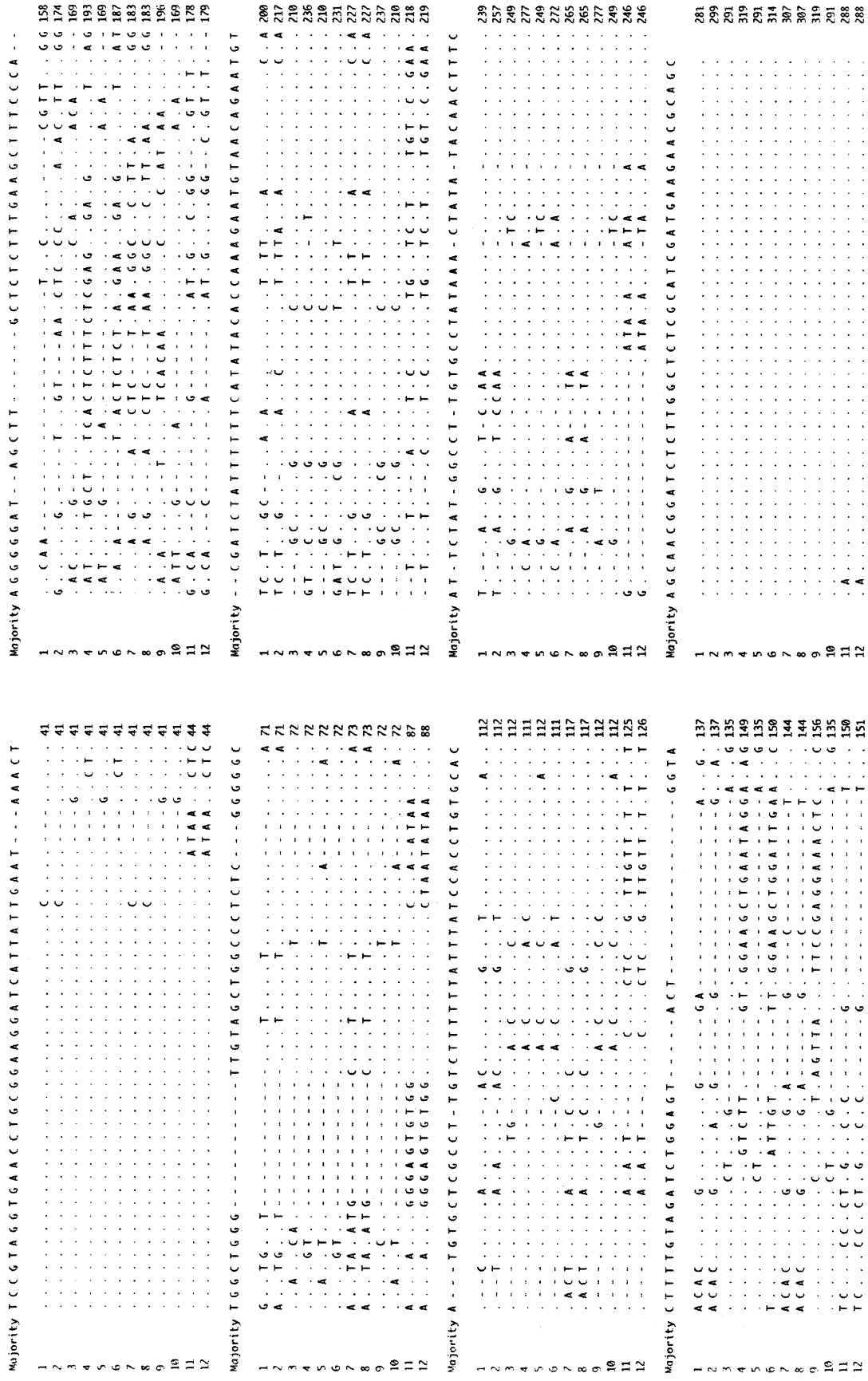


Fig. 2. Sequence alignment of ITS region of several magic mushrooms
 1, *Panaeolus sphinctrinus*; 2, *Pa. subbalteatus*; 3, *Psilocybe argentipes*; 4, *Ps. subaeruginascens*; 5, *Ps. tampanensis*; 6, MM-1; 7, MM-2-1; 8, MM-2-2; 9, MM-3; 10, MM-4; 11, MM-5; 12, MM-6

5. LC および LC/MS 分析

乾燥試料を乳棒、乳鉢あるいは粉碎機を用いて粉末状になるまですり潰した。このもの 200 mg を精密に量り、メタノール-水 (3:1) 10 mL を加え、振とう機で 15 分間振とうした。振とう後、10 分間、遠心分離を行い、上澄み液をフィルターを過し、試料溶液とした。

LC は、カラムに TSKgel ODS-80Ts QA (4.6φ×150 mm; (株)東ソー製) を用い、カラム温度 40°C、紫外可視検出器の検出波長 254 nm、流速 1.0 mL/min、試料液の注入量 10 μL に設定した。溶出には、溶離液 A: トリフルオロ酢酸 (TFA) 0.1% を含む 100% 蒸留水、溶離液 B: TFA 0.1% を含むアセトニトリルを用い、溶離液 A: 溶離液 B (75/5) のアイソクラティック条件で行い、絶対検量線を用いたピーク面積法でサイロシンを定量をした。サイロシンの保持時間は 9.2 分で、定量限界は 5 ng/試料液 10 μL であった。また、上述の LC 条件で分離したピークについて ESI の positive mode でイオン化し、 m/z 205 の疑似分子イオン ($[M+H]^+$) ピークの観察を行うことにより、サイロシンの定性確認を行った。

結果および考察

1. ITS 領域の配列解析による分類

野生標品および国内市場品の ITS 領域の解析結果を Fig. 2 に示した。PCR 産物 (sense-2~antisense-1) のサイズは 281~319 bp と種によって大きな違いが見られた (Table 1, 3) が、各属間での相関関係などは認められなかった。今回調査した国内市場品 42 検体は、ITS 領域の

塩基配列から 6 種類に分類された (MM1~MM6; Table 3) が、このうち MM-3 は Lee らの報告⁵⁾ にある *Psilocybe semilanceata* の配列と一致した。また、MM-4 は *Ps. tampanensis* 標品の配列と二塩基を除いてすべて一致したため、このものは *Ps. tampanensis* であると推定された。MM-5 および MM-6 は互によく似た配列を示したが、*Psilocybe* 属および *Panaeolus* 属標品の配列との相同性は低かった。これらは BLAST search プログラムによる相同性検索の結果、ベニテングタケ (*A. muscaria*; accession no. AB015700)、テングタケ (*A. pantherana*; accession no. AF438558) およびウスキテングタケ (*A. gemmata*; accession no. AF335440) と非常に高い相同性を示し、*Amanita* 属の菌類であると推定された。

検体数の最も多かった MM-1, MM-2 は、標品およびデータベース (GenBank, EMBL, DDBJ) 中に該当するものが見られなかったため、ITS 領域よりさらに下流の rRNA large subunit 遺伝子の部分配列を解析し、既存のデータと比較した。その結果、MM-1 は *Ps. cubensis* (accession no. AF261619) のものと二塩基を除き一致 (968/970; 99.8%) したため、MM-1 を *Ps. cubensis* と推定した。また、MM-2 は *Panaeolus* sp. (accession no. AF261525) のものと高い相同性を示し (926/934; 99.1%)、*Panaeolus* 属のキノコであると考えられた。このことから MM-2 は、*Ps. cubensis* とともにヨーロッパにおいて多く流通している²⁾ *Pa. cyanescens* であると推定された。

Table 3 に示すとおり、国内市場品は *Ps. cubensis* および *Pa. cyanescens* の 2 種が全体の 9 割近くを占めており、国内に流通する M.M. は比較的少数の基原種に由来していることが明らかになった。この結果は、ヨーロッパにおいて上記 2 種の栽培キットが販売されているという事実を反映している。そのほかには、西日本 (近畿以西) で購入した M.M. の 8 割が *Pa. cyanescens* であるという地域的な特徴も見られた。

今回の調査において種内変異の認められた検体は *Pa. cyanescens* および *Ps. tampanensis* それぞれにおける 1 検体 (MM-2-1 と MM-2-2, *Ps. tampanensis* と MM-4; Fig. 2, 3) のみであり、流通種内での ITS 領域の塩基配列のばらつきは小さいことが明らかとなった。前述の地域分布の特徴も含め、この結果は M.M. の供給源が少数に限られていることを示唆するものである。なお、Lee らの報

Table 3. Classification of Magic Mushroom Obtained in Japanese Markets by Size and DNA Sequencing Data of PCR Products and the Name of the Species Elucidated

Group	Number of samples (<i>n</i>)	PCR product size* (bp)	Species
MM-1	22	314	<i>Psilocybe cubensis</i>
MM-2	15	307	<i>Panaeolus cyanescens</i>
MM-3	2	319	<i>Psilocybe semilanceata</i>
MM-4	1	291	<i>Psilocybe tampanensis</i>
MM-5	1	288	<i>Amanita</i> sp.-1
MM-6	1	288	<i>Amanita</i> sp.-2

* Sense-2 and antisense-1 primers were used.

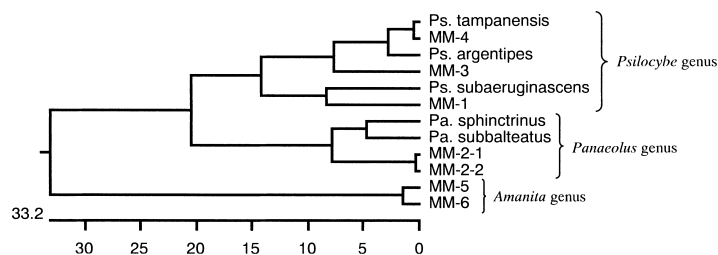


Fig. 3. Phylogenetic tree of DNA sequences of the ITS region. Numbers and branch length represent sequence divergence.

Table 4. Psilocin Content of Magic Mushrooms

Group (species)	Psilocin content (%/dry weight)		
	max	min	mean ± SD
MM-1 (<i>Psilocybe cubensis</i>) ^{a)}	1.36	trace ^{b)}	0.22 ± 0.29
MM-2 (<i>Panaeolus cyanescens</i>)	2.35	trace	1.19 ± 0.62
MM-3 (<i>Psilocybe semilanceata</i>)	0.055	0.034	0.045 ± 0.01
MM-4 (<i>Psilocybe tampanensis</i>)	—	—	trace
MM-5 (<i>Amanita</i> sp.-1)	—	—	n.d. ^{c)}
MM-6 (<i>Amanita</i> sp.-2)	—	—	n.d.

^{a)} 20 samples were used for the determination of psilocin content.

^{b)} Less than 0.00025%.

^{c)} Not detected.

告⁵⁾ では、*Ps. semilanceata* および *Pa. subbalteatus* の ITS 領域において、塩基の欠失に基づく種内変異を認めているが、今回観察された種内変異は、いずれも塩基置換によるものであった (Fig. 2).

MM-5, 6 は *Amanita* 属キノコであるベニテングタケ (*A. muscaria*), テングタケ (*A. pantherina*) およびウスキテングタケ (*A. gemmata*) か、その近縁種と考えられる。これらのキノコはいずれもサイロシン類とは別の幻覚物質である *d,l*-イボテン酸 (3; Fig. 1) を含有していることが知られており、今後の取扱いについて検討する必要があると思われる。

次に、今回得られた ITS 領域の解析結果を基に分子系統樹を作成した。その結果、*Psilocybe* 属 5 種、*Panaeolus* 属 3 種、*Amanita* 属 2 種はそれぞれ個別のクラスターに分類され、これまでの形態学的な分類を反映する結果を与えた (Fig. 3).

なお、各検体について、吸光スペクトルは測定していないが、抽出エキスの色と種の関係に以下のような傾向が見られたことを付記する。*Ps. cubensis*, 淡青色; *Pa. cyanescens*, 淡黄色; *Amanita* sp., 淡橙色。

2. サイロシン含量

国内市場品のサイロシン含量の分析結果を Table 4 にまとめた。最も高い含量を示したのは *Pa. cyanescens* であり、以下 *Ps. cubensis*, *Ps. semilanceata*, *Ps. tampanensis* と続き、*Amanita* 属の 2 種では検出されなかった。一方 Musshoff らは、ドイツ国内で押収された M.M. について同様の分析を行い、サイロシン含量をそれぞれ *Pa. cyanescens* (0.43%), *Ps. semilanceata* (0.23%), *Ps. cubensis* (0.09%), *Ps. tampanensis* (0.02%) と報告している²⁾。これは、本研究において検体数の少なかった *Ps. semilanceata* (MM-3) のものを除き、ほぼ同じ結果である。

まとめ

遺伝子による M.M. 基原種の同定法の開発を目的に、国内市場品および野生標品について rRNA 遺伝子の ITS 領

域を解析した。その結果、得られた M.M. は、3 属 6 種に分類された。また、野生標品の解析結果を加えた系統樹解析では、各属ごとに個別のクラスターを形成し、本法が M.M. の基原種の鑑定に有用であることが確認された。また、各 M.M. 中のサイロシン含量について測定したところ既報とほぼ同様の結果が得られた。M.M. の基原種は非常に多いことが知られている⁴⁾。したがってより確実な鑑定法開発に向け、さらに多くの種について塩基配列情報を蓄積する予定である。

文 献

- 1) 政令第 169 号 (2002) “麻薬、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一部を改正する政令” 平成 14 年 5 月 7 日。
- 2) Musshoff, F., Madea, B., Beike, J., Hallucinogenic mushrooms on the German market—simple instruction for examination and identification. *Forensic Science International*, **113**, 389–395 (2000).
- 3) Nakahara, Y. “Yakubutsu Ranyou No Kagaku”, Tokyo, Kenseisha, 1999. (ISBN 4-87639-382-6)
- 4) Stamets, P. “Psilocybin Mushrooms of the World”, Berkeley, CA, USA, Ten Speed Press, 1996. (ISBN 0-89815-839-7)
- 5) Lee, J. C., Cole, M., Linacre, A., Identification of members of the genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by a DNA test—A preliminary test for hallucinogenic fungi. *Forensic Science International*, **112**, 123–133 (2000).
- 6) White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., J. Taylor, W., “PCR Protocols: Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Genes for Phylogenetics”, Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White T. J., ed., San Diego, CA, USA, Academic Press, 1990, p. 315–322. (ISBN 0-12372-181-4)
- 7) Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4673–4680 (1994).