

空气中胞子検出によるキノコ生育域調査

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 2年 杉山賢大 他5名

1 動機

キノコは身近な食材として昔から人々に親しまれており、現在は自然界での採取と人工栽培による収穫が行われている。自然界での採取では、目視でキノコを探すため、その地域に詳しくなければ発見は難しい。さらに、キノコは多種混在しているため、その地域にどのようなキノコが生育しているか正確に全てを把握するのは困難である。また、マツタケのように人工栽培の手法が確立しておらず、かつ、収穫時期を逃がすと味や風味が劣化し、価値の無くなる種もある。

そこで本研究では、キノコが成長する際に放出する胞子に着目し、胞子の検出によってキノコの生育域の把握と種の特定を行うことを目的とした。胞子の採取は、土壌からの採取^{*1}やろ紙を子実体に付着させて行う採取^{*2}、空气中に飛散・浮遊している胞子を大型吸引機で吸引する採集^{*3}が行われている。しかし、これらの胞子検出方法は費用が高いうえに検出までに時間がかかる。

一方、昨年度本校で行った研究では、空气中から鳥類が羽ばたく際に飛散させる皮脂等に由来するDNA（空中環境DNA）を検出することに成功した^{*4}。ここでは、本校で作成した簡易的な空中微粒子採取装置を用いて空中に浮遊する微粒子を採取し、PCR法によるDNA増幅によって空中環境DNAの検出に成功した。私たちはこの技術を用いて、空气中に浮遊・飛散するキノコの胞子由来DNAを検出し、応用することができるのではないかと考えた。

2 実験方法・結果

(1) キノコの子実体からのDNA増幅

ア 実験方法

市販されている静岡県産シイタケ・シメジ・エリンギ・ヒラタケ・マッシュルーム・マイタケ・エノキ・キクラゲ、そして中国産マツタケの9種類を試料とした。まずこれらの子実体の内部（図2）を切り取り、DNA抽出試薬としてUniversAll Extraction Buffer IIを25 μ L加え、95 $^{\circ}$ Cで加熱し、5 $^{\circ}$ Cで遠心分離を行った。この上澄み液をDNA抽出液とした。

DNA抽出液1 μ LにDNAポリメラーゼとしてKOD One[®] PCR Master Mix 25 μ L、滅菌蒸留水22 μ L、プライマー2 μ Lを加えて図3の温度サイクルでPCR法によるDNA増幅を行った。今回PCR法に使用したプライマーを図4に示す。なお、プライマーについては、九州大学農学部の宮崎和弘博士に情報を提供して頂いた。このプライマーはIGS1領域を増幅するもので、シイタケの品種識別に使われており、シイタケの安定したDNA増幅が確認されているため、使用することとした^{*5}。その後3%アガロースゲルを用いた電気泳動法によりDNA増幅の確認を行った。



図1 切り取ったシイタケ

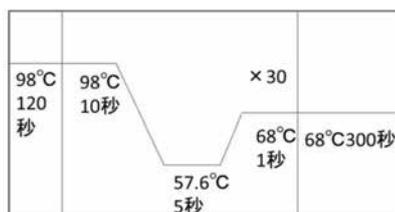


図2 使用した温度サイクル

F 5'-TTGCAGACGACTTGAATGG-3'
R 5'-TAGGATTCGCCGCTGGTCCCCCA-3'

図3 使用したプライマーの塩基配列

イ 実験結果

まず、シイタケの子実体の電気泳動結果を図4に示す。目的の増幅長である1000bpのバンドが確認でき、今回のDNA増幅方法は有効であることが分かった。

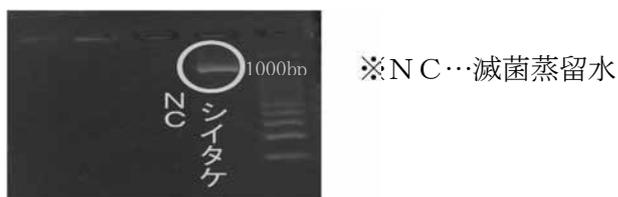


図4 シイタケの泳動結果

次にシイタケ以外の8種類のキノコの子実体の電気泳動結果を図5に示す。キノコの種類によって、バンドの位置がそれぞれ異なることが確認できた。これは今回使用したプライマーが、キノコの種によって異なる増幅長を持つことを示している。キノコの種類ごとのDNA増幅長を表1にまとめた。

表1 各キノコのDNA増幅長

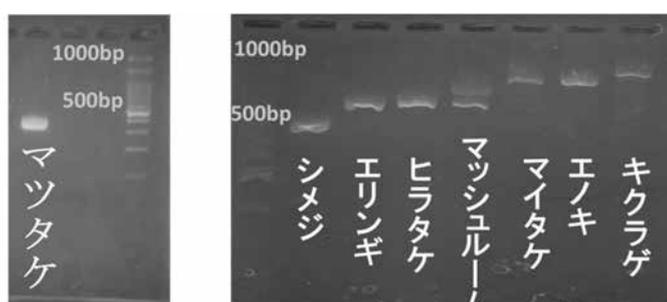


図5 シイタケ以外の泳動結果

キノコの種類	DNA増幅長 (bp)
シイタケ	約1000
キクラゲ	約850
エノキ	約800
マイタケ	700~750
マッシュルーム	約600
ヒラタケ	約600
エリンギ	約600
シメジ	約500
マツタケ	約400

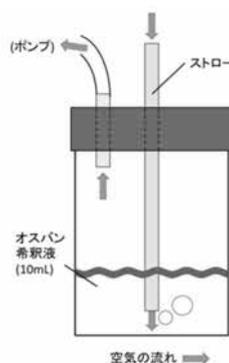
(2) 空気中の孢子由来 DNA 検出

ア 実験方法

空中微粒子採取装置は先行研究で作成したものを使用した。写真と仕組みを図6に示す。装置内のポンプによってストローを通じて空気中の微粒子をボトル内に吸い込む。ボトル内にはDNAの16時間以上の保持が確認されているオスバン溶液が入っており、ここに空気中に浮遊・飛散している微粒子を溶かし込む仕組みとなっている。なお、使用するボトルやストローは使い捨てである。



図6 空中微粒子採取装置とその仕組み



この装置を用いて空気中から孢子が検出可能かを調べるため、静岡県島田市のシイタケ農園内に空中微粒子採取装置を設置し、16時間稼働させた。採取は2019年6月7日17時から同年6月8日9時まで行った。その後、微粒子を含んだオスバン溶液50 μ Lを試料とし、2(1)と同様の方法でDNA増幅を行った。なお、採取装置は農園内の菌床が置いてある棚に設置した(図7)。

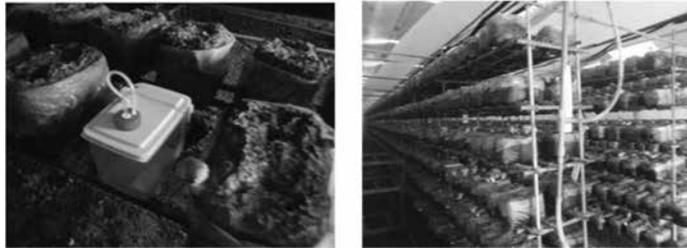


図7 シイタケ農園での装置設置の様子

イ 実験結果

シイタケ農園の空気中から採取した試料の電気泳動結果を図8に示す。シイタケの特異的な増幅長である1000bpのバンドが確認できた。このことから、空気中からキノコのDNAは検出可能であることが示された。



図8 シイタケ農園の空気中試料の電気泳動結果

(3) 野外調査—調査方法の有効性の検証

ア 実験方法

空気中の孢子検出が可能だと確認できたため、野外での孢子検出実験を行った。今回は装置を、静岡県掛川市の小笠山山中の3地点（2019年11月3～4日）に16時間設置した。小笠山では多くのキノコが生育していると考えられ、目視によるキノコ生育調査も行った。

イ 実験結果

静岡県掛川市小笠山の電気泳動結果を図9に示す。この結果から500bpと700bpのDNA増幅長が確認できたため、シメジとマイタケに近い種のキノコが生息していることが考えられた。

一方、目視では装置設置場所から5m程離れた崖にブナシメジ群と思われるキノコを確認した。このことから、今回の方法によるDNA検出結果と生育するキノコは矛盾しないことが分かった。



図9 小笠山の電気泳動結果



図10 小笠山のブナシメジ群

(4) マツタケの生育場所発見への挑戦

ア 実験方法

マツタケの孢子由来 DNA を検出することで、マツタケの生育域を発見することを目的とし、調査を行った。2019年9月～11月に山梨県南都留郡鳴沢村の山中2地点(①・②)、静岡県内の山A・Bの各4地点(①～④)で空気を採取した。16時間採取をし、採取時間中には降雨はなかった。

イ 山梨県南都留郡鳴沢村

この地点はマツタケの生育が確認されており、マツタケの孢子を検出することを目的に、松の1種であるコメツガの木に囲まれた場所に装置を計3カ所設置した。また、設置中にマツタケを発見したため、マツタケの子実体と空気中の微粒子を採取した試料を対象にDNA増幅を行った。



図11 発見したマツタケの様子



図12 山梨での電気泳動結果

電気泳動結果を図12に示した。子実体からは400bpのDNA増幅長が確認できたが、空気中試料からはマツタケの増幅長とは異なる500bpと800bpのDNA増幅長のみ確認できた。

ウ 静岡県内の山A・B

山Aはマツタケの生育がほとんど知られていないが、今回地元の人から生育情報が得られたため、調査を行った。山Bではマツタケの生育は全く知られていないが、マツタケの生育条件であるアカマツの生育が確認できたため、生育の可能性が高い場所だと考え、調査を行った。なお、環境保護の観点から調査場所の詳細は明記しない。



図13 山Bで発見したマツタケの様子

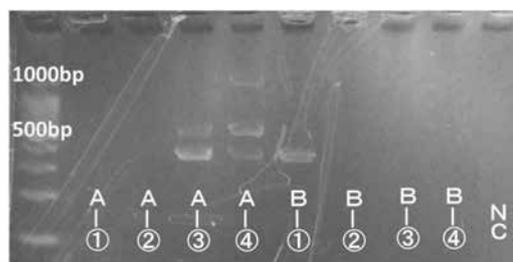


図14 山A・Bの電気泳動結果

装置設置の後、生育するキノコの調査をしたところ、山Bの採取地点周辺でマツタケを発見した(図13)。

次に山A・Bでの電気泳動結果を図14に示した。A・Bどちらの山の空気中試料からもマツタケのDNA増幅長である400bpのDNA増幅長が確認できた。山Bでは目視での発見と孢子検出結果が一致したことから、今回の調査方法はマツタケにも有効であることが考えられた。また、山Bはマツタケの生育が知られておらず、本研究で新たな生育場所を発見することができた。

3 考察・まとめ

今回使用したシイタケのプライマーは他種のキノコの DNA 増幅も可能であり、さらに、キノコの種によって特異的な DNA 増幅長を示した。これは増幅領域内に、種ごとに増幅長の差を生じさせる塩基配列があるためだと考えられる。また、今回調べたキノコの中で、ヒラタケ科ヒラタケ属の近縁種であるヒラタケとエリンギはともに約 600bp の DNA 増幅長であった。このことより、近い種であれば増幅長が同じであることが考えられた。

一方、孢子検出範囲の検証実験では、栽培から 2 週間の、子実体が肉眼で確認できる大きさであれば孢子が検出可能であることが示された。このことから、本研究の検出方法は高感度で検出が可能であると考えられる。

山梨の野外調査では、今回調査した地点では 500bp と 800bp のバンドが見られ、これは子実体の実験結果と照らし合わせると、シメジとエノキまたはキクラゲに近い種のキノコが生育していることが考えられた。一方、マツタケの生育が目視で確認できたにも関わらず、空气中試料からマツタケの子実体と同じ増幅長のバンドは確認できなかった。マツタケは生育数や孢子飛散用が他のキノコと比べて少ないことや、前日まで降り続いた雨の影響が原因として考えられる。

静岡県内の山 A・B の野外調査より、今回の調査方法を用いればマツタケの新たな生育域の特定が可能であることが考えられる。希少なキノコの生育場所を特定するのに、これまで経験則が主だったが、本研究で用いた手法は新しい特定方法になりえると考えられる。

4 今後の展望

今後は種の特定期がどこまで可能か調べるとともに、孢子検出範囲やキノコの成長過程と孢子量の関係について引き続き調査を進め、実用可能な方法へと発展させていく。そして、マツタケに続いてトリュフなどの希少なキノコの新たな生育域の特定を目指していく。また、シーケンス解析を行うなどして、種ごとに増幅長の差を生じさせる部位に見られる塩基配列の特徴を把握していきたい。これに関連し、対象のキノコの種を増やし、増幅長に見られる種との関係性を今後明らかにしていく。

5 謝辞

プライマーの情報を提供していただいた九州大学農学部・宮崎和弘博士、シイタケ農園での微粒子採取装置の設置を了承して下さった静岡県の永井きのこ園の皆様、山梨県南都留郡鳴沢村での野外実験の際に同行し、ご協力して下さった、本栖湖みらいプロジェクトの中原崇様、富士河口湖町鹿処理場所長の滝口雅博様に感謝申し上げます。

6 参考文献

- 1 宜寿次盛生「DNA で土壌中のマツタケ菌を探す」林産試だより 2014 年 3 月号
- 2 藤田徹・藤田博美「孢子採取法の改良の検討」京都府林業試験場
- 3 猪俣衛「全自動吸引式長時間作動型孢子採取器の試作」北日本病虫研録（1980） p 98～ p 100
- 4 空中環境 DNA を使った鳥類調査方法の確立（昨年度の本校の研究）
- 5 宮崎和弘「IGS 1 領域の塩基配列データを利用したシイタケ品種の識別について」平成 24 年度森林総合研究所九州支部 年報第 24 号