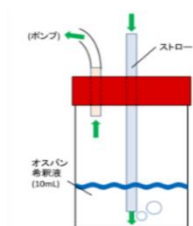


真菌類の環境DNA検出による生育種の判別に関わる研究～森林生態系の生物調査の手法の開発～

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 2 年

1 動機

森林生態系には昆虫類、鳥類、土壌動物などが生息している。私たちはこの中でも真菌類に属するうちの特に担子菌類と子囊菌類を研究対象とした。これらの中には他の昆虫に寄生するもの、菌根菌、腐朽菌などがある。これらの胞子を環境 DNA として検出できれば森林生態系の状態や宿主等の動物を含めた生物の生息域を分子生物学的に把握することができるのではと考えた。そこで本校独自に作成した空中微粒子採取装置を用いて空気中に浮遊する胞子に由来する DNA を検出し、その地域に生育する担子菌類、子囊菌類の種を特定しようと考えた。なお担子菌類、子囊菌類は胞子を放出するため、空気中に浮遊する DNA は胞子に由来するものとした。昨年度の研究では空気中から胞子に由来するシイタケの特異的な増幅長が確認できていることから、空気中から担子菌類の DNA は検出可能であり、応用することとした。



空中微粒子採取装置の仕組み



シイタケ農園で装置を設置した様子

2 研究方法

(1) 実験 1 担子菌類の子実体からの DNA の増幅

子実体の内部を切り取り、DNA 抽出試薬として UniversAll Extraction Buffer II を $25 \mu\text{L}$ 加え、 95°C で加熱し、 5°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 $1 \mu\text{L}$ に DNA ポリメラーゼとして KOD One[®] PCR Master Mix $25 \mu\text{L}$ 、滅菌蒸留水 $22 \mu\text{L}$ 、プライマー $2 \mu\text{L}$ を加えて図 1 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 2 に示す。なお、プライマーについては、九州大学農学部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 の増幅が確認されているため、使用することとした。

その後アガロースゲルを用いた電気泳動法により DNA の増幅の確認を行った。

昨年度は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 種を試料とした。

また本年度は自然界に生息する担子菌類として静岡県磐田市桶ヶ谷沼で採取した 21 種の中で、同定できた 10 種（図 3，4）と富士山周辺に生息していた 11 種の中で、同定できた 9 種（図 5）を試料とした。昨年度はアガロースゲル濃度を 3 % としたが、濃度を下げて泳動速度を上げることによって、増幅長の違いを明確にすることが可能となるため、本年度は 2 % とした。

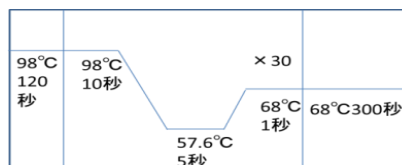


図 1

F 5'-TTGCAGACGACTTGAATGG-3'
R 5'-TAGGATTCCCGCGTGGTCCCCCA-3'

図 2



図 3 カワラタケ



図 4 キアミアシグチ

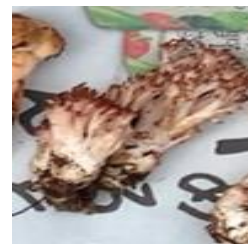


図 5 ホウキタケ

(2) 実験 2 マツタケの生育場所発見への挑戦

2019 年 9 月～11 月に静岡県 小笠地区の 2 つの山（それぞれを山 A、山 B とする）の山中にあるアカマツ林において各 4 地点（①～④）で 16 時間空気を採取した。

山 A はマツタケの生育が一般にはほとんど知られていないが、地元の人から過去の生育情報が得られたため、採取を行った。山 B はマツタケの生育が知られていないが、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、採取を行った。なお、環境保護の観点から調査場所の詳細は明記しない。

(3) 実験 3 子嚢菌類の DNA 増幅に用いるプライマーの検討

子嚢菌類である冬虫夏草属は他の生物に寄生をするためこの関係性を用いた宿主の生息域調査が可能だと考えた。そのため、種によって DNA 増幅長に差があらわれるプライマーの検討から始めた。静岡昆虫同好会 NPO 静岡県自然史博物館ネットワークの福井順治様に提供していただいたセミタケ、ツブノセミタケ、カメムシタケの 3 種を試料とし、図 2 のシイタケの品種識別に使われていたプライマーを使用して菌体からの DNA の増幅を試みた。また、琉球大学の松浦教授に情報を提供して頂いたセミ類の冬虫夏草から安定した DNA の増幅が可能なプライマー（プライマー 1, 2, 3）、参考文献 4 から情報を入手したカメムシタケの特異的なプライマー（プライマー 4）を用いることにした。

プライマー 1 F 5'-GAAACTGCGAATGGCT-3'	R 5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'
プライマー 2 F 5'-GTCTACCACCCGGGCTT-3'	R 5'-GGCATGTCGTTGTCCAT-3'
プライマー 3 F 5'-CCGGCCACCGTGACTTCAT-3'	R 5'-ATGACACCGACGCAACGGTCTG-3'
プライマー 4 F 5'-TCGGCAGGTATTCTTCGGAGTAC-3'	R 5'-ATTGCTTGCTTCTATTTTAG-3'

図 6

(4) 実験 4 真菌類の空中からの環境 DNA の検出と野外採取

冬虫夏草の会の会員の方に協力していただき静岡県内で発見された冬虫夏草属と、発見場所の表を入手し、これを元に、試料を入手することが出来たツブノセミタケ、カメムシタケの県内生息地を図 7 にまとめた。入手した表によると県内ではセミタケは確認されていなかった。また、私たちの学校が位置する掛川市ではツブノセミタケ、カメムシタケも確認されていなかった。そこで、冬虫夏草属が生息しているとされる「鎮守の森」がある掛川市内の神社に空中微粒子採取装置を設置し、調査を行った。また、「鎮守の森」に指定されている掛川市内の山にも装置を設置した。この山にはアカマツ林があるためマツタケの調査も同時に行い、生息していた担子菌類 4 種を採取し、DNA の増幅を行った。なお種を同定することが出来なかったため、今回の論文では採取した 4 種を担子菌類 1、担子菌類 2、担子菌類 3、担子菌類 4 と記載する。

DNA の増幅には静岡県立大学の河原崎先生から情報を頂いたマツタケの特異的なプライマー（図 18）と図 2 のシイタケの品種識別に使われていたプライマー、図 6 のセミ類の冬虫夏草属の安定した DNA の増幅が可能なプライマーを使用した。

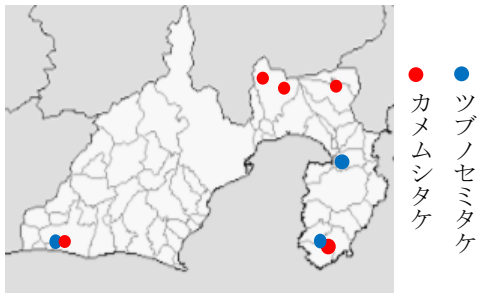


図 7

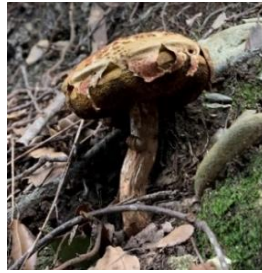


図 8 担子菌類 1



図 9 担子菌類 3

3 実験結果

実験 1 のシイタケの子実体の泳動結果を図 10 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 の増幅方法は有効であることが分かった。



図 10

NC・・・ネガティブコントロールの略 DNA 抽出液の代わりに滅菌蒸留水を 1 μL 加えた

実験 1 のシイタケ以外の 8 種類の担子菌類の子実体の電気泳動結果を図 11 に示す。

今回使用したシイタケの品種識別に使われていたプライマーは担子菌類の種類によって、DNA 増幅長が担子菌類の種によって異なった。

担子菌類の種ごとの DNA 増幅長を表 1 にまとめた。

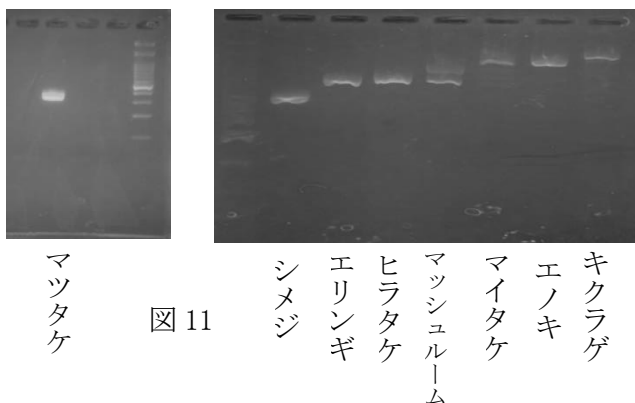


図 11

担子菌類の種類	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

表 1

自然界の担子菌類の DNA 電気泳動結果を図 12 に示す。ツチカブリ、カワラタケ、ハチノスタケ、キアミアシイグチ、アイシメジ、オニナラタケ、ホウキタケ、ヤマイグチ、ショウゲンジの 9 種について DNA の増幅が確認された。この実験で昨年度の市販のキノコに加え、自然界の担子菌類についても種によって DNA の増幅長が異なるということが確認できた。

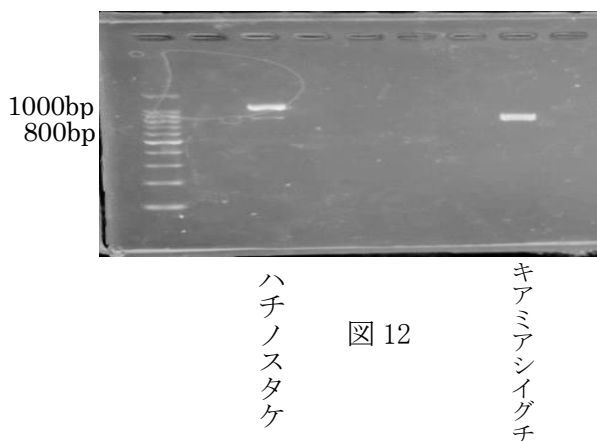


図 12

担子菌類の種類	DNA 増幅長 (bp)
ツチカブリ	約 1500
カワラタケ	約 1250
ショウゲンジ	約 1250
ハチノスタケ	約 1000
オニナラタケ	約 900
キアミアシイグチ	約 800
ホウキタケ	約 600
アイシメジ	約 400
ヤマイグチ	400~700

表 2

山 A・B での空气中試料の電気泳動結果を図 13 に示す。A・B どちらの山の空气中試料からもマツタケの DNA 増幅長と同じ 400bp の DNA 増幅長が確認できた。さらに山 B では装置設置後と回収後の 2 回、周辺の調査を行ったところ装置設置後にマツタケの子実体を発見することができた。(図 14)

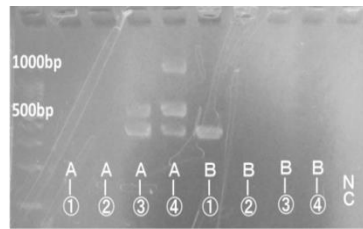


図 13



図 14

このことから山 B では子実体の発見と DNA 検出結果が一致したことが分かり、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。

実験 3 では図 2 のシイタケの品種識別に使われていたプライマーでは子囊菌である冬虫夏草属の増幅は確認できなかった。安定した増幅が可能と言われるプライマー (図 6) では増幅をすることが出来た。今回の実験では種によって DNA の増幅長が異なるということまでは分らなかった。

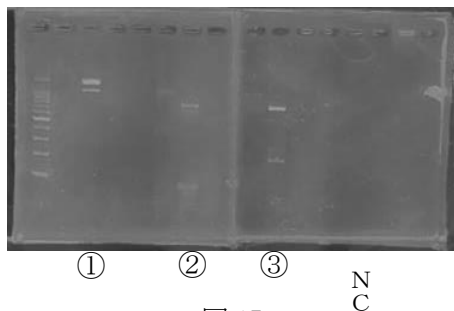


図 15

	①ツブノ セミタケ	②セミタケ	③カメムシタ ケ
プライマー1	約800bp	—	約1000bp
プライマー2	—	約800bp	約800bp
プライマー3	—	—	約1000bp
プライマー4	—	—	約300bp

表 3

実験 4 の掛川市内の山、神社の空中からの検出では山、神社のどちらでも図 2 のシイタケの品種識別に使われていたプライマーを用いて DNA の増幅が確認できた。またどちらでもマツタケの DNA 増幅長と一致する 400bp の DNA 増幅長が確認できた (図 16)。しかし、セミ類の冬虫夏草属の安定した DNA の増幅が可能でプライマーを用いて、増幅することはできなかった。また、マツタケであることを特定する特異的なプライマーでも DNA の増幅が確認できなかった。

シイタケの品種判別のプライマーでは、採取されたキノコである担子菌類 1 の菌体の DNA 増幅長がマツタケと同じ 400bp であったため、空气中試料から得られた 400bp の DNA はこれに由来する DNA であると考えられる。マツタケであることを特定する特異的なプライマーで検出できなければ、他のプライマーで、マツタケと同じ塩基長でもマツタケとは断定できないことが分かった。



図 16

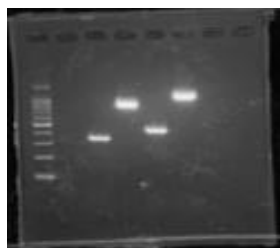


図 17

	DNA 増幅長 (bp)
担子菌類 1	約400
担子菌類 2	約800
担子菌類 3	約450
担子菌類 4	約900

表 5

F プライマー GAGACACAACGGCGAGATT
R プライマー ACCCTTACCCGCTCAGT

図 18

4. 考察

今回使用したシイタケの品種識別に使われていたプライマーは担子菌類の種によって特異的なDNA増幅長を示した。

さらに本年度行った自然界の担子菌類を用いた実験からシイタケの品種識別に使われていたプライマーを用いれば自然界の担子菌類でもDNAの増幅を出来ることが確認できた。また自然界の担子菌類でもDNAの増幅長が種によって異なるということも分かった。

静岡県内の2つの山の野外調査より、今回の調査方法を用いれば絶滅危惧種に認定されたマツタケや、希少な担子菌類の新たな生育域の特定が可能であることが考えられる。

希少な担子菌類の生育場所を特定するのに、これまで経験則による観察調査が主だったが、本研究で用いた手法に、さらに特異的に種を判別するプライマーを組み合わせたり、シーケンス技術を加えたりすることで新しい特定方法になる。

冬虫夏草属についてはセミ類に寄生する冬虫夏草属から安定したDNAの増幅が可能なプライマーを用いたことで3種の子囊菌類のDNAの増幅が確認できた。しかし種によってDNA増幅長が異なるということまでは分からなかった。

今回装置を設置した場所の空中からは、シイタケの品種判別のプライマーによって特異的な塩基長を示す担子菌類が得られ、その一つはマツタケと同じ塩基長であったがそれはマツタケとは異なる担子菌類であったためマツタケ、冬虫夏草属が生息している検証はできなかった。

5. 今後の展望

空気中に浮遊する孢子に由来するDNAが検出可能な距離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。また、対象の担子菌類の種を増やし、使用するプライマーを増やすことで、増幅長に見られる種との関係性を明らかにしていく。種との関係性が明らかになれば、野外で装置を用いた森林生態系の調査を行っていききたい。

冬虫夏草属については今回の実験では種によるDNA増幅長の差は確認できなかった。今後はデータ数を増やし、種とDNA増幅長の関係性を明らかにしていきたい。

6. 謝辞

シイタケの品種識別に使われていた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、セミタケ、ツブノセミタケ、カメムシタケの提供や桶ヶ谷沼での採取に同行し案内してくださった静岡昆虫同好会NPO静岡県自然史博物館ネットワークの福井順治様、マツタケの特異的なプライマーの情報を提供してくださった静岡県立大学の河原崎先生、琉球大学にお礼を申し上げます。

7. 参考文献

1. 空中環境DNAを使った鳥類調査方法の確立（掛川西高校自然科学部 2018年）
2. IGS1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（宮崎和弘 平成24年）
3. セミの共生菌は冬虫夏草由来—寄生関係から共生関係への進化を実証（国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人 琉球大学）
4. 冬虫夏草菌カメムシタケの寄主、形態および遺伝的特性に関する研究（佐々木 史）