九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ツクツクボウシタケ菌の森林土壌内での時空間分布

大賀，祥治
九州大学大学院農学研究院環境農学部門森林環境科学講座

高野，克太
九州大学大学院生物資源環境科学府森林資源科学専攻

孫，竹
九州大学大学院生物資源環境科学府森林資源科学専攻

https://doi.org/10.15017/19558

出版情報：九州大学農学部演習林報告. 92, pp.4-7, 2011-03-30. 九州大学農学部附属演習林
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

九大演報（Bull. Kyushu Univ. For.），92：4–7，2011

論　　文

ツクツクボウシタケ菌の森林土壌内での時空間分布*

大賀祥治**，高野克太***，孫　竹***

ツクツクボウシタケ（*Isaria sinclairii* Kobayasi）を土壌から検出するためにプライマーを設計した，DGGE解析により森林土壌を解析したところ，高い精度で菌の検出が可能であった。次に，これまでに子実体発生が確認されている森林から土壌を採取し，時期，土壌深度ごとに菌の生存を解析した。子実体発生前の6月に菌の存在が認められ，8月には検出のピークがみられ，10月，12月と季節経過に伴い出現頻度が低下した。また，土壌深度5から30cmで菌が存在することが明らかになった。
キーワード：ツクツクボウシタケ，森林土壌，DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）

We tested the reliability and suitability of specific primer set (PC-F-GC / PC-R) by using the Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis for detecting *I. sinclairii* in the forest soil. Soil samples were taken from the sites with fruiting record of *I. sinclairii*. Total DNA was extracted from soil samples and analyzed with respect to the collecting phase and soil depth. The fungus of *I. sinclairii* was detected in June just before fruiting, and then peaked in August. Detection of the mycelia was declined to October and December. The mycelium of *I. sinclairii* was detected within a depth from 5 to 30 cm. The method developed in this study offers an effective tool for the elucidation of the biological characteristic of caterpillar fungi that has not fully been explained.
Keywords：*Isaria sinclairii*, Forest soil, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

1．は　じ　め　に

ツクツクボウシタケ（*Isaria sinclairii*）は冬虫夏草菌の一種である。冬虫夏草菌は子嚢菌門（Ascomycota），核菌綱（Pyrenomycetes），麦角菌科（Clavicipitaceae）に属し，コルジセプス（*Cordyceps*）属及び不完全菌のペシロマイセス（*Paecilomyces*）属を含む8属に分類されている。世界では約400種が知られ，主に土壌，草むら，朽木中の昆虫等を宿主として寄生する菌類である（清水 1997）。

ツクツクボウシタケは，セミ科（Cicadae）のツクツクボウシまたは，稀にアブラゼミの幼虫に寄生し，その頭部から子座（子実体）を発生させる。完全世代を形成するツクツクボウシセミタケ（*Cordyceps sinclairii*）の不完全世代である。子実体は単生または枝分かれして，樹枝状あるいはホウキ状の地上（頭）部と，これを支える不規則円柱状あるいは偏圧した柄の2つの部分からなり，やや肉質である（今関ら 1988）。日本では本州から九州にかけて分布し，7–9月に発生する。東アジア，南アメリカ，マダガスカル島，ニュージーランド，オーストラリアにも分布する（小林・清水 1983）。

冬虫夏草菌はその生理活性の高さから機能性食品・医薬品への応用が期待され（清水 2000），サナギタケ，ハナサナギタケなど数種の冬虫夏草菌では安定的な人工施設栽培や機能性の作用機作に関する検討が進んでいる（Isaka *et al*. 2005; Li *et al*. 2009）。ツクツクボウシタケでは，薬理活性成分として含有するミリオシンを化学修飾した製剤が調製されており，移植細胞のように生体にとって異物となるような細胞を破壊して排除するT細胞に抑制的に働くことが明らかにされている（SehraWatet and Rouse, 2008）免疫抑制剤と併用することにより，臓器移植の拒絶反応抑制や，自己免疫疾患などの治療薬として効果が期待されている（Zhiren *et al*. 2008）。

また，リンゴ・モモ・ナシなどの害虫であるモモシンクイガに対して高い駆除性を示し，微生物的防除の素材としても期待されており，ツクツクボウシタケ菌が土壌から選択培地によって分離，同定されている（柳沼 2002）。しかし，宿主に接触する経路や潜伏期間などの生態については，ほとんど報告例がない。

本研究では，土壌中のツクツクボウシタケの生態を解明するために，特異的なプライマーを設計し，土壌中の微生物群から直接抽出したDNAを鋳型としたPCR増幅法により，時期および土壌深度ごとに本菌存在を検討した。

* Shoji Ohga, Katsuhiro Takano, Zhu Sun: Distribution of *Isalia sinclairii* in the forest soil on various season and soil depth.
** 九州大学大学院農学研究院環境農学部門森林環境科学講座　Division of Forest Environmental Sciences, Department of Agro-environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 811-2415
*** 九州大学大学院生物資源環境科学府森林資源科学専攻　Department of Forest and Forest Products Sciences, Graduate school of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

2．実験方法

2．1．供試菌

福岡演習林50年生スギ林床産ツクツクボウシタケ（*Isaria sinclairii* Kobayasi）KS-77（図1），福岡県久山町遠見岳産ツクツクボウシタケ KS-97，セミタケ（*Cordyceps sobolifera*（Hill.）Berk. et Br.）KS-80，コナサナギタケ（*Paecilomyces farinosus*（Holmsk.）Fr.）KS-79，サナギタケ（*Cordyceps militaris*（Vuill.）Fr.）KS-92，カメムシタケ（*Cordyceps nutans* Pat.）KS-85，ハチタケ（*Cordyceps sphecocephala*（Kl.）Sacc.）KS-93, クモタケ（*Nomuraea atypicola* Yasuda）KS-89。これら九州大学保存菌株をPDA平面培地で25℃，14日間培養したものを供試菌とした。

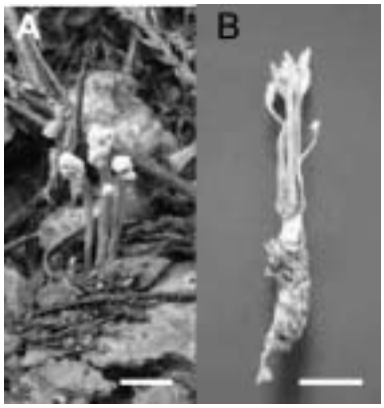

図1．ツクツクボウシタケ子実体
A 発生状況，B 子実体および虫体部
スケール：1 cm

2．2．種特異的プライマーの設計

ツクツクボウシタケの18S rDNA領域の配列は，DNA data bank of Japan（DDBJ)を参照し（Yokoyama and Hara 2002），本菌に特異的な配列を確認するためにBLASTを用いて検討を行い，18S rDNA 領域の配列から種特異的プライマーとしてPC-F（5’-CCAGAAAGCCGACCACTTGAA-3’）・PC-R（5’-GCTTGGTAT CGTTGGCTCATT-3’）を設計した（図2）。プライマーのフォワードと，リバースによって増幅されるDNA領域のサイズは143 bpであった。また，DGGE解析（Marshall *et al*. 2003; Miruna *et al*. 2006）に使用するプライマーとしてフォワードプライマーにGCクランプ（CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG）を付加した。

2．3．DNA抽出

ツクツクボウシタケなどの冬虫夏草菌をPDA平面培地で培養した菌糸および土壌などの試料をビーズチューブに取り，Isoil土壌抽出キット（ニッポンジーン社）を用いて，

① プライマーPC-F　5’-CCAGAAAGCCGACCACTTGAA-3’
② プライマーPC-R　5’-GCTTGGTATCGTTGGCTCATT-3’

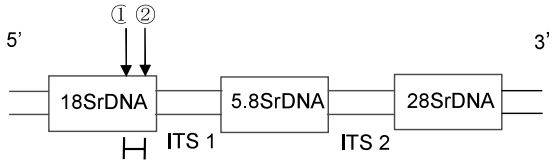

図2．プライマーおよびPCR増幅領域
DNA data bank of Japan, Accession no. AB085886

ビーズビートニング法でDNAを抽出した。なお，DNA 抽出効率をあげるためにビートビーター（Micro Smash MS-100 Tomy）を用いて5500rpm，50秒間の条件下で粉砕した後，60℃ 30分間熱処理を行い，再度同条件でビードビーター処理を行った。遠心後，600 µlの上清を回収し，精製用バッファー400 µlを添加し十分に混和し，600 µlのクロロホルムを添加後15秒間震盪して遠心した。水層800 µlを回収し精製バッファーを800 µl加えて十分に混和した後，遠心した。沈殿物に洗浄バッファーを添加して，転倒混和して遠心した。沈殿物に70%エタノールとEthachinmate 2 µlを添加し震盪して遠心した。沈殿物をTEバッファー[10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA（pH 8.0）] 100 µlに溶解させてDNA抽出物とした。

2．4．PCR反応

PCR（Polymerase chain reaction）反応液として，総量100 µlの反応液[鋳型DNA溶液2 µl，フォワードプライマー100pM，リバースプライマー100 pM， TaqDNAポリメラーゼ（Blend *Taq* TOYOBO）1.25U，10×*Taq* buffer 5.0 µl，dNTPs 各0.2 mM および滅菌DW]を調製した。

PCR反応条件は①熱変性（94℃）30秒間，②アニーリング（62℃）30秒間，③伸長反応（72℃）1分間を1サイクルとする反応を35サイクル行った。なお，最初の熱変性は3分間行い，最後の伸長反応は5分間延長した。

2．5．DGGE解析

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE）として，8%変性アクリルアミドゲル（濃度勾配20−60%）を使用した。GCクランプつきプライマーセットで増幅させたPCR産物20 µlとLoading dye 5 µlを混合した。作成した変性アクリルアミドゲルのセルに注入し，電気泳動（泳動槽: DCodeTM Bio-Rad, バッファー: 0.5×TAE）した（バッファー温度60℃，200Vの定電圧で6時間）。エチジウムブロマイド溶液で染色後，UVトランスイルミネーター上でDNAバンドの観察を行った。

2．6．アガロースゲル電気泳動

PC-F/PC-Rのプライマーセットを用いて得られたPCR増幅産物5 µlとLoading dye 1 µlを混合し，2%のアガロースゲ

ルで35分間電気泳動（泳動槽：Mupid－EXU，バッファー：1×TAE）した後，エチジウムブロマイド溶液で染色後，UVトランスイルミネーター上でDNAバンドの観察を行った。

2．7．時期，深度別の土壌サンプリング

ツクツクボウシタケ子実体の発生が確認された森林土壌から試料を採取した。供試土壌は直径5cm，深さ30cmの土壌サンプラーを用いて，3ヵ所採取した（図3）。採取時期は，子実体の発生前の6月から開始し，8月，10月，さらに12月に行った。

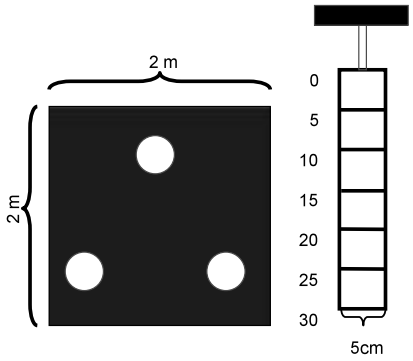

図3．土壌試料の採取方法

3．結果および考察

3．1．プライマーの特異性と検出に対する有効性

ツクツクボウシタケなど冬虫夏草菌のうちの6種を用いて，培養菌糸から抽出したDNAを鋳型として設計したプライマーによるPCR増幅とアガロースゲル電気泳動による解析を行った。ツクツクボウシタケ培養菌糸から抽出したDNAから増幅バンドが得られた。これに対し，他の冬虫夏草菌であるセミタケ，コナサナギタケ，サナギタケ，カメムシタケ，ハチタケ，クモタケでは増幅バンドは得られなかった（図4）。従って，本プライマーはツクツクボウシタケ菌に特異的に反応するものと思われた。

次に，PDA培地での培養菌糸のみと，PDA培地での培養菌糸を土壌と混合したものから抽出したDNAのPCR増幅産物で同一のバンドが確認できた（図5）。土壌を含む試料から抽出したDNAを鋳型として，設計したプライマーによりPCRを行っても，土壌からの影響を受けずにツクツクボウシタケ菌由来のDNAのみが選択的に増幅されることが明らかになった。

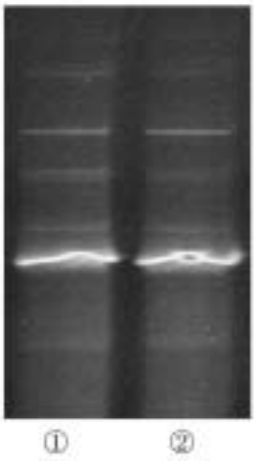

図5．ツクツクボウシタケ菌糸DNAのPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動図
① 培養菌糸
② 培養菌糸と土壌

3．2．土壌からのツクツクボウシタケ菌の検出

土壌試料から得られた増幅バンドが培養菌糸と同一であった。また，サイズマーカーとの比較から，この増幅バンドが目的とする143 bpの PCR増幅産物であることが確認できた（図6）。

以上の結果から，プライマーの種特異性が確認され，土壌中でのツクツクボウシタケ菌の存在を判定するのに有効である事が明らかになった。

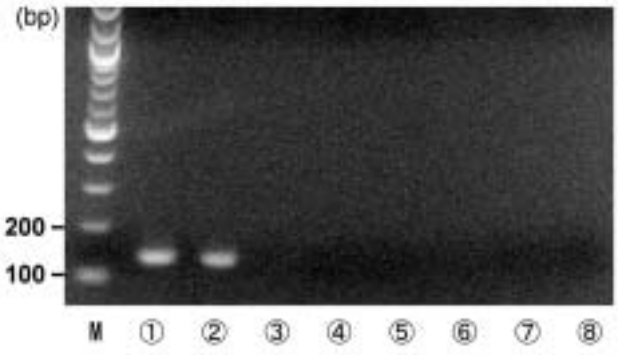

図4．冬虫夏草菌類DNAのPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動図
Mサイズマーカー，①②ツクツクボウシタケ，③セミタケ，④コナサナギタケ，⑤サナギタケ，⑥カメムシタケ，⑦ハチタケ，⑧クモタケ

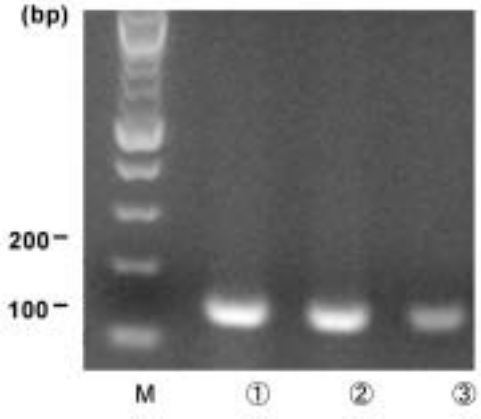

図6．森林土壌中DNAのPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動図
Mサイズマーカー，①培養菌糸（KS-77），②培養菌糸（KS-97），③土壌

3．2．土壌中のツクツクボウシタケ菌の存在状況

時期，土壌深度ごとに供試土壌中のツクツクボウシタケ菌の存在を解析し，表1が得られた。検出時期として，子実体発生前の6月から検出され始め，子実体発生時期の8月に検出のピークが確認された。その後 10月，12月と季節が経過するに従い，検出頻度が低下した。なお，モモシンクイガの生物防除剤として，本菌が使用されているが，同様の傾向が認められている（柳沼 2002）。季節依存性があり，検出頻度が変動することから，本菌の生育力はかなり弱いものと考えられる。

一方土壌深度ごとにみると，ツクツクボウシタケ菌は5−30cmで検出された。深度15, 20cmで検出頻度が高いことが分かった。なお，一般的にセミの幼虫が春季に深さ12−22 cmに生存しているという報告があり（渡辺 1968），土壌中の本菌生存深度との関連性が考えられる。

存在状況として，8月頃，地表から深度20cmまでの土壌中でツクツクボウシタケ菌と幼虫の接触頻度が高いことが示唆された。感染するためには本菌と幼虫の接触が必要条件であり，さらに感染が成立するかどうかについては接触時の菌濃度が影響すると考えられる。なお，ボーベリア属やイザリア属の菌が土壌中の害虫駆除に使用され，感染に必要な菌濃度が菌や宿主昆虫の種類により異なることが報告されている（Kessler *et al*. 2003; Daniel and Wyss 2009）。

以上より，分子生物学的手法で，直接土壌からツクツクボウシタケ菌を迅速に検出出来ることが示された。今後，本手法を活用し，ツクツクボウシタケ菌の生存状況の変化を解析し，感染経路や感染時期の解明が進むものと考えられる。

表1. ツクツクボウシタケ菌の季節および土壌深度毎の検出頻度

時期（月）／深度（cm）	6	8	10	12
5	■	■		
10	■	■	▨	
15	▨	■	▨	■
20	▨	■	▨	■
25	■	▨	▨	
30		▨		

□：検出なし，■：1 ヵ所で検出，▨：2 ヵ所で検出
■：3 ヵ所全て検出

＊ 図 3 の採取方法参照

引用文献

Daniel, C., Wyss, E. (2009) J Appl Entomol, 13, 473−483

今関六也・大谷吉雄・本郷次雄 (1988) 日本のきのこ, 山と渓谷社，東京，p.577

Isaka, M., Prasat, K., Kanyawim, K, Nigel, L.H., Yodhathai, T. (2005) Acc Chem Res, 38, 813−823

Kessler, P, Matzke, H., Keller, S. (2003) J invertebr Pathol, 84, 15−23

小林義雄・清水大典 (1983) 冬虫夏草図譜, 保育社, p.288

Li, C.Y., Chiang, C.S., Tsai, M.L., Hseu, R.S., Chuang, H. J. (2009) Leukoc Biol, 85, 987−995

Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., VanderGheynst, J.S. (2003) J Appl Microbiol, 95, 934−948

Miruna, O., Newton, C.M., Gabriele, N., Kornelia, S. (2006) J Microbiol Methods, 65, 63−75

SehraWat, S., Rouse, B. T. (2008) J Immunol, 180, 7636−7647

清水大典 (1997) カラー版冬虫夏草図鑑, 社団法人家の光協会, 東京, p.53

清水大典 (2000) 冬虫夏草, ニュー・サイエンス社, 東京, pp 1−3

渡辺弘之 (1968) 日本林学会誌, 50, 204−210

柳沼勝彦 (2002) 日本応用動物昆虫学会誌, 46, 225−231