

マツタケ菌糸体定量における qPCR 法とエルゴステロール法の比較

Comparison between qPCR and ergosterol methods in *Tricholoma matsutake* biomass quantification

山口宗義・下川知子

Muneyoshi YAMAGUCHI, Tomoko SHIMOKAWA

森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687

要旨：土壌中のマツタケの菌糸体量を特異的に定量可能な技術を定量 PCR 法(以下 qPCR 法)により開発した。本稿では、従来の菌糸体定量法のひとつであるエルゴステロール定量分析法との比較を行った。両手法ともエルゴステロールおよび DNA 量と菌糸体量とに強い相関関係が得られ、両方法によりマツタケの菌糸体量を推定可能であることが示された。また、菌糸体量とエルゴステロール量と DNA 量との量的関係性も明らかとなった。両方法の測定範囲の違いとして、エルゴステロール法は菌量の多い状況下で、qPCR 法は菌量の少ない状況下でそれぞれ効力を発揮することがわかった。

キーワード：マツタケ・定量 PCR 法・エルゴステロール・菌糸体定量

Abstract: A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil was developed. In this study, qPCR and ergosterol analysis, which is a conventional mycelium assay, were compared. A strong correlation was found between mycelium and ergosterol quantity and between mycelium and DNA quantity. This result showed that both methods could estimate the quantity of mycelium. In addition, the quantitative association of mycelium with ergosterol and DNA was clarified.

Key-word: *Tricholoma matsutake*, qPCR, ergosterol, quantification of mycelium

I はじめに

マツタケは古来より日本で食されてきたきのこで、季節を味わう食材として用いられてきた。近年は収穫量が著しく低下しているが、日本の秋のきのことして珍重されている。マツタケは主にアカマツと共生関係を築きながら土壌中で菌糸や菌根菌として存在し、条件が揃うことによって子実体を発生させる。大半の生活を土壌中で過ごす菌であるが、その生態はまだ未解明な点が多い。我々は土壌中の生態を明らかにするために、マツタケを特異的に定量可能な qPCR 法を開発した(3)が、菌根菌のバイオマスをエルゴステロールといった細胞構成成分の量を指標に定量する従来の方法(1, 2)との比較はなされていない。そこで、本稿は純粋培養したマツタケ菌を用いて、qPCR 法と従来法の一つであるエルゴステロール定量法との比較を行った。

II 材料および方法

1. 材料 供試菌株は、*Tricholoma matsutake* NBRC33136 (Y1 株, (独)製品評価技術基盤機構分譲株), *Tricholoma matsutake* TFM S-08006 (TO-1 株, (研)森林総

合研究所所蔵菌株)を使用した。定量に必要なマツタケ菌糸体は、液体培養によって得た。培養方法としては、ポテトデキストロース液体培地(Difco Potato Dextrose Broth)で 23°C 3 週間暗所静置培養した。培養菌糸体は濾紙にて濾過後、滅菌水にて洗浄し、凍結乾燥した。凍結乾燥した菌糸体をマルチビーズショッカー(安井機械製)にて粉碎し、供試菌糸体とした。

2. 標準試料の作成 既知量のマツタケ菌糸を含む標準試料を作成した。供試菌糸体を 1000 µg/ml となるよう滅菌水中に分散させ、滅菌水で希釈し、1000, 100, 10, 1, 0.1 µg/ml となるように希釈系列を作成した。作成した希釈系列を凍結乾燥し、DNA の抽出およびエルゴステロールの抽出に供した。

3. DNA の抽出および定量 DNA の抽出は Yamaguchi ら(3)の方法にしたがった。凍結乾燥された希釈系列試料に 0.6% スキムミルクを含有した 2% CTAB 液 650 µl を加え、65°C 1 時間攪拌しながら溶解後、750 µl のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で 2 回抽出し、上清を採取した。イソプロパノールで DNA を沈殿、乾燥後、滅菌水 100 µl に溶解し、抽出試料とした。抽出試

料をライトサイクラー-2.0 (ロシユ社製) を用いて qPCR を行い、菌糸体量を算出した。qPCR の条件および算出方法は Yamaguchi ら (3) の方法にしたがった。

4. エルゴステロールの抽出および定量

エルゴステロールの抽出は Clemmensen ら (2) の方法にしたがった。凍結乾燥された希釈系列試料をメタノール (10%KOH) で処理後、シクロヘキサンで抽出し、Chromolith 5-4.6mm カラム (Merck 社製) を用いた HPLC で定量分析を行った。溶離液には 95%メタノールを使用し、UV280nm にてエルゴステロールのピークを検出し定量した。

III 結果および考察

1. qPCR 法によるマツタケ菌糸体定量結果

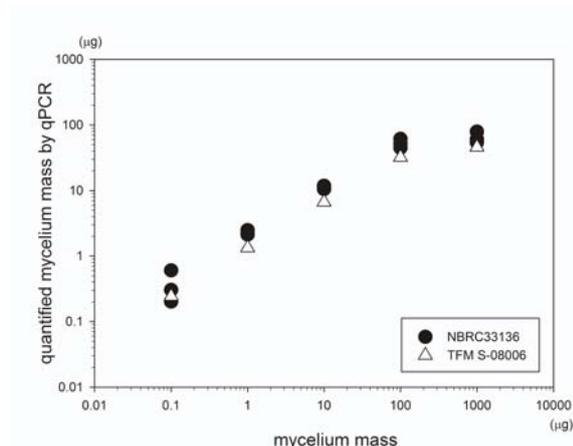


図-1. qPCR 法による菌糸体定量
Fig.1 quantification of mycelium by qPCR

NBRC33136 株 (n=3) および TFM S-08006 株 (n=1) の培養菌糸体を用いて調整された 1000, 100, 10, 1, 0.1 μg のすべてのマツタケ菌糸体から定量することができた (図-1)。1000 μg の試料の菌糸体算出量が低く推定されている点については、DNA 抽出に用いる CTAB 液の DNA を抽出しうる容量を超えているために起こった結果と推察できる。また、0.1 μg の試料の菌糸体算出結果においてばらつきが大きくなっている。この結果は、0.1 μg 程度の菌糸体から抽出された DNA が少なく、抽出された溶液に存在する DNA がポアソン分布に従う状況にあることに起因するものと推察できる。このことから、qPCR による菌糸体推定法において、菌糸体のみを対象とした検出限界は 0.1 μg であることがわかった。また、菌株の違いによる定量結果の違いも見られなかった。

2. エルゴステロール分析によるマツタケ菌糸体定量結果

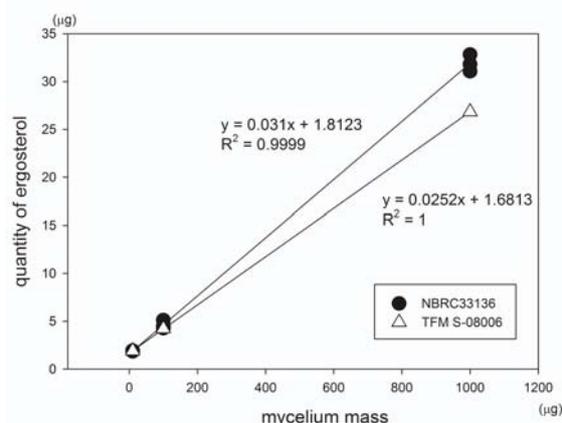


図-2. エルゴステロールによる菌糸体定量

Fig.2 quantification of mycelium by ergosterol analysis

NBRC33136 株 (n=3) および TFM S-08006 株 (n=1) の培養菌糸体を用いて調整された 1000, 100, 10 μg のマツタケ菌糸体から定量することができた (図-2)。1 および 0.1 μg の菌糸体から抽出された試料からはエルゴステロールは検出されなかった。定量された試料データと既知菌糸体量との相関を解析したところ、両菌株とも強い相関を示した (NBRC33136: $R^2=0.9999$, TFM S-08006: $R^2=1$)。菌糸体のみを対象とした本方法の検出限界は 10 μg であることがわかった。菌株の違いによるエルゴステロール定量結果については、1000 μg 程度の菌糸体量の多い時に異なる定量値となったが、100 μg 以下では違いは見られなかった。

3. qPCR 法とエルゴステロール法との比較

qPCR 法による定量の結果のうち、抽出容量的に限界を超えていた 1000 μg のデータを除いて、定量された試料データと既知菌糸体量との相関を解析した (図-3)。

両菌株ともエルゴステロールと同様の強い相関を示した (NBRC33136: $R^2=0.9811$, TFM S-08006: $R^2=0.9996$)。これらの結果は、qPCR 法による定量もエルゴステロール分析による定量も、菌糸体定量法として十分に役割を果たし得ると言える。

菌株間の違いとしては、菌糸体の多い試料に対してエルゴステロールの値で多少のずれはあるものの、両方法ともに、菌株間の違いで定量結果に相違があるとは言えない結果となった。すなわち、培養菌糸体においては、菌糸体量に対して測定対象となる DNA およびエルゴステロールの量が相関し、かつ菌株には影響しないことが示された。

両方法の測定範囲であるが、エルゴステロール分析は 10 μg から 1000 μg 以上の比較的菌量の多い状況下で効

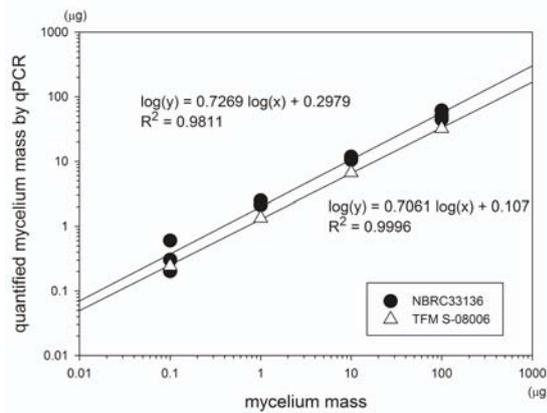


図- 3. qPCR 法による菌糸体定量と相関
Fig.3 quantification of mycelium by qPCR and correlation analysis

力を発揮する方法であると言える。それに対し、qPCR 法による菌糸体定量は、0.1 µg から 100 µg の比較的菌量の少ない状況下で効力を発揮する。分析の特性から、エルゴステロール分析には比較的菌量を多く必要とすることから、少ない菌量を分析する際には、サンプリング量を多くし、分析に際し濃縮する必要がある。その点、qPCR 法はエルゴステロール分析による検出限界値の 100 倍の検出限界を示し、少ない菌量の分析であっても特別な作業を付加することなく分析可能である。ただ、菌量が多い場合、抽出容量限界を越えてしまう場合があるため、サンプリング量の調整や、サンプルの希釈を行った後に分析をする等の工夫が必要である。

IV まとめ

本稿では、エルゴステロール定量法と qPCR 法を用いたマツタケ菌糸量の定量法において菌糸体量を推定できることがあらためて示されたとともに、菌糸体量とエルゴステロール量と DNA 量との量的関係性も明らかとなった。

純粋培養菌体を用いた本稿の結果により、両方法とも菌糸体との相関が高いことがわかったが、マツタケ菌糸体の特異的に定量するといった目的の場合、常に特異性をどのように担保するかが重要となってくる。エルゴステロールは他の菌根菌等の細胞構成成分でもあるために、純粋培養条件でない場合や、野外サンプルを用いる場合、注意が必要である。単にサンプル中のエルゴステロールを定量したいのであれば問題ないが、目的の菌根菌と他の菌根菌や真菌が混在するような条件の場合、これらの総量としてエルゴステロールが定量される。エルゴステロール定量法によるマツタケ菌糸体定量を行う場合は、

なんらかの方法で他の菌根菌や微生物と区別する必要がある。

一方、qPCR 法を用いる方法においても同様に特異性の担保は重要である。qPCR 法による定量は、使用するプライマーによっては、総細菌量や総真菌量を定量したり (5, 6)、特定の菌を定量したりすることが可能である (3, 4)。本稿のように、マツタケ菌糸体の特異的に定量する場合、マツタケ DNA を特異的に増幅することができるプライマーを用いることにより特異性を担保している。これにより、マツタケ以外の菌根菌や真菌、細菌を含む他の微生物が混在している条件であっても、マツタケのみを定量することが可能である。そのため、純粋培養条件でない場合や野外サンプルも、特に区別する手段を必要とせず、定量することができる。本稿では特定の菌を定量することを目的として両手法を比較したが、目的に応じた手法選択が要求される。

本研究は農林水産省農林水産技術会議事務局委託プロジェクト研究「森林資源を最適利用するための技術開発」の一環として実施した。また、本研究は国立研究開発法人森林総合研究所エンカレッジモデルによる研究支援を受けた。

引用文献

- (1) NYLUND, J.E. and WALLANDER, H. (1992) Ergosterol analysis as a Means of Quantifying Mycorrhizal Biomass. *Methods in Microbiology* 24:77-88
- (2) CLEMMENSEN, K.E., BAHR, A., OVASKAINEN, O., DAHLBERG, A., EKBLAD, A., WALLANDER, H., STENLID, J., FINLAY, R.D., WARDLE, D.A., LINDAHL, B.D. (2013) Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* 339: 1615-1618
- (3) YAMAGUCHI, M., NARIMATSU, M., FUJITA, T., KAWAI, M., KOBAYASHI, H., OHTA, A., YAMADA, A., MATUSHITA, N., NEDA, H., SHIMOKAWA, T., MURATA, H. (2016) A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. *Mycorrhiza* 26: 847-861
- (4) YAMAGUCHI, M., NAKAMURA, M., TAKANO, M., SEKIYA, A. (2009) Quantification of the mycelial mass of the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* by real-time PCR. *Bulletin of FFPRI* Vol.8 No.411:133-141
- (5) FIERER, N., JACKSON, J. A., VILGALYS, R., JACKSON, R. B. (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of Taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*: 4117-

4120

(6) LANDEWEERT, R., VEENMAN, C., KUYPER, T. W., FRITZE, H., WERNARS, K., SMIT E. (2003) Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by Real-time PCR compared to conventional quantification techniques. FEMS Microbiology Ecology: 283-292