

速報

菌床シイタケ害菌の26S D1/D2領域および ITS 領域の塩基配列解析^{*1}新田 剛^{*2} · 三樹陽一郎^{*2} · 宮崎和弘^{*3}

新田 剛・三樹陽一郎・宮崎和弘：菌床シイタケ害菌の26S D1/D2領域および ITS 領域の塩基配列解析 九州森林研究 58：232-234, 2005 宮崎県内にある菌床シイタケ生産施設の被害菌床から分離した害菌について、rDNA である26S rRNA 遺伝子内の D 1/D 2 領域および ITS 領域の塩基配列解析を行った。得られた塩基配列データから DNA データベースを利用した相同性検索を行ったところ、分離菌は、*Paecilomyces variotii* および、*Paecilomyces sinensis* に近いことが示唆された。

キーワード：rDNA, ITS, 相同性検索, 系統解析, *Paecilomyces* 属菌

I. はじめに

宮崎県内にあるシイタケ菌床生産施設において、褐変化遅延現象を引き起こす害菌を分離した(2)。この菌は当初、*Scopulariopsis* 属菌であると考えられたが、その後の観察により、*Paecilomyces* 属に属する菌であることが判明した。このように、シイタケ菌床の褐変化遅延現象を引き起こす菌を同定する上では、形態観察だけでは困難な場合がある。

DNA 解析は近年解析技術が広く普及し、DNA データベース上に蓄積されるデータ量も膨大なものとなってきている。特に、糸状菌の系統解析には、ITS 領域や rDNA の塩基配列解析が利用されている。そこで今回、分離菌の DNA 解析を行うことで、分離菌の特定が行い易くなるのではないかと考え、26S rRNA 遺伝子内の D 1/D 2 領域および ITS 領域の塩基配列の解析を行ったので、その結果について報告する。

II. 材料及び方法

1. 供試菌株

本試験では、当センター保存の2菌株(P 1…MFC - N080, P 2…MFC - N048)を用いた。P 1は県内に位置する佐土原町、P 2は県内に位置する北浦町にある菌床シイタケ生産施設の被害菌床から分離した菌株である。菌株は PDA (ポテトデキストロース寒天) (日本製) 平板培地に接種し、25℃の恒温器中で7日間培養したものを以下の試験に供試した。

2. DNA の抽出及び DNA 塩基配列の解析

培養した菌糸体を PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems 社, 以下 AB 社) で抽出したものを鋳型 DNA として

用い、PCR 法により5.8S を含む ITS 1 と ITS 2 及び26S D 1/D 2 領域を増幅した。PCR は、0.5ユニットの *TaKaRa EX Taq™* Hot Start Version (タカラバイオ社)、0.2mM の各 dNTP、2 μ l の10× PCR Buffer 及び1 μ M の各プライマーを20 μ l の溶液中で行った。サーマルサイクラーは GeneAmp® PCR System 9700 (AB 社) を使用し、94℃で3分間熱変性した後、94℃30秒(変性)、55℃30秒(アニーリング)、72℃90秒(伸長)を30回繰り返す、最後に72℃で10分間伸長反応を行った。PCR 産物は ExoSAP-IT® (アマシャム バイオサイエンス社) により、残留しているプライマー及び dNTPs を除去、ダイレクトシークエンスのテンプレートに使用した。シークエンス反応は BigDye® Terminators シークエンスキット (AB 社) で行い、DNA シークエンスは ABI PRISM®310 Genetic Analyzer (AB 社) で塩基配列を解析した。なお、今回使用した ITS 領域プライマー(3) 及び26S D 1/D 2 領域プライマー(1) の塩基配列は、表-1のとおりである。

表-1. プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列 (5' -3')
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL2A	CTTGTTTCGCTATCGGTCTC
NL3A	GAGACCGATAGCGAACAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

3. 相同性検索と系統解析

解析した P1, P 2 それぞれの配列データをもとに、日本 DNA

*1 Nitta, T., Mitsugi, Y. and Miyazaki, K.: Sequence analysis of the 26S D1/D2 regions and intergenic spacer regions of the noxious fungi in the sawdust-based cultivation of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)

*2 宮崎県林業技術センター Miyazaki Pref. Forestry Tech. Ctr., Saigou, Miyazaki 883-1101

*3 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

データバンク (DDBJ) のホームページ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) にある相同性検索メニュー (BLAST) による相同性検索を行った。

また、その結果により近縁と考えられる配列データを DDBJ の配列検索メニュー (SRS) で取得し、P1, P2 の配列データとともに、表-2, 3に示す配列データについて近隣結合法による系統解析を行った。

なお、系統解析に用いた領域は、26S D2 および 5.8S を含む ITS (ITS1 および ITS2) 領域とした。

表-2. 系統解析に用いた配列データ (26S D2 領域)

分類	Accession No.
<i>Paecilomyces</i> sp.	AF173002 AF172343 AY235021 AY235022
<i>Paecilomyces variotii</i>	AF033395 AF222501 AF339533
<i>Paecilomyces farinosus</i>	AF172340 AF172341 AF172342
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	AF170074 AF170075 AF170076 AF170077 AF170078 AF170079 AF170080 AF170081
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	AF172339
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	U47838
<i>Byssochlamys nivea</i>	AY176750
<i>Fennellia flavipes</i>	U28853 U28856
<i>Penicillium spinulosum</i>	AF033410
<i>Aspergillus anthodesmis</i>	AF433061 U17916
<i>Aspergillus conjunctus</i>	U29796
<i>Aspergillus panamensis</i>	U29797 U29798
<i>Neurospora crassa</i> (outgroup)	AF399820

Ⅲ. 結果と考察

DNA 塩基配列解析の結果、P1 632塩基に対して P2 は、20塩基 (17の塩基置換, 3塩基のギャップ) の相違が見られ、残り 612塩基は相同であった。

相同性検索の結果、*Paecilomyces* 属菌群の配列データとの相関が高かったが、*Aspergillus* 属菌群等とも高い相同性を示した。

図-1, 2に系統解析の結果を示す。26S D2 および ITS 領域の解析とも、P1, P2 の2菌株は、同一のクラスターに存在していた (図-1, 図-2)。また、ITS 領域の解析結果からは、P1 が *Paecilomyces variotii* に、P2 が *Paecilomyces sinensis* に近いことが示唆された。

表-3. 系統解析に用いた配列データ (ITS 領域)

分類	Accession No.
<i>Paecilomyces variotii</i>	AF291869 AF291870 AF033395 AF455416 AY373941
<i>Paecilomyces sinensis</i>	AJ243771
<i>Paecilomyces farinosus</i>	AB080088
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	AB086629
<i>Paecilomyces marquandii</i>	AB099511
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	AB124670
<i>Paecilomyces cicadae</i>	AB085887
<i>Paecilomyces coteniobliquus</i>	AF368799
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	AB070371
<i>Paecilomyces cateniannalatus</i>	AF368802
<i>Paecilomyces javanicus</i>	AB099944
<i>Paecilomyces carneus</i>	AB103379
<i>Paecilomyces nostocoides</i>	AB104884
<i>Byssochlamys fulva</i>	AY306013 AY306014
<i>Byssochlamys nivea</i>	AF486189 U18361
<i>Penicillium implicatum</i>	AF033428
<i>Penicillium spinulosum</i>	AF033410 AY373933
<i>Penicillium canescens</i>	AF033493 AY373901
<i>Penicillium roquefortii</i>	AY373929
<i>Penicillium chrysogenum</i>	AF033465 AY213669 AY373902
<i>Neurospora crassa</i> (outgroup)	AF388914

また、P1, P2 の2菌株に形態的に似ていると考えられる *Penicillium* 属菌群と P1, P2 の2菌株とは別のクラスターを形成し、明確に区別することが可能であった。

Ⅳ. おわりに

今回、DNA 塩基配列解析の手法により、シイタケ菌床の褐変変化遅延現象を引き起こした分離菌について、*Paecilomyces* 属菌との系統関係を明らかにすることが可能であった。被害を与えている害菌が何であるかということを知ることは、その害菌の特徴を踏まえて、防除の必要性や対策の判断を行い易くする。よって、形態的な特徴だけで特定の困難な菌については、DNA 塩基配列解析の手法も併せながら調査をすすめることは有効な手段と考えられる。

今後、感染経路の特定等への利用も考え、DNA 塩基配列解析による害菌の特定がより簡便に出来るような検索システムの構築が必要であろう。

謝 辞

本試験を行うにあたり、害菌の形態的特徴等について適切なご助言・ご指導をいただいた独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター岡田元博士に深謝の意を表す。

引用文献

- (1) Kurtzman C.P. *et al.* (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1216-1223.
- (2) 新田剛ほか (2004) 九州森林研究57: 286-288.
- (3) White, T. J. *et al.* (1990) Academic Press:315-322.

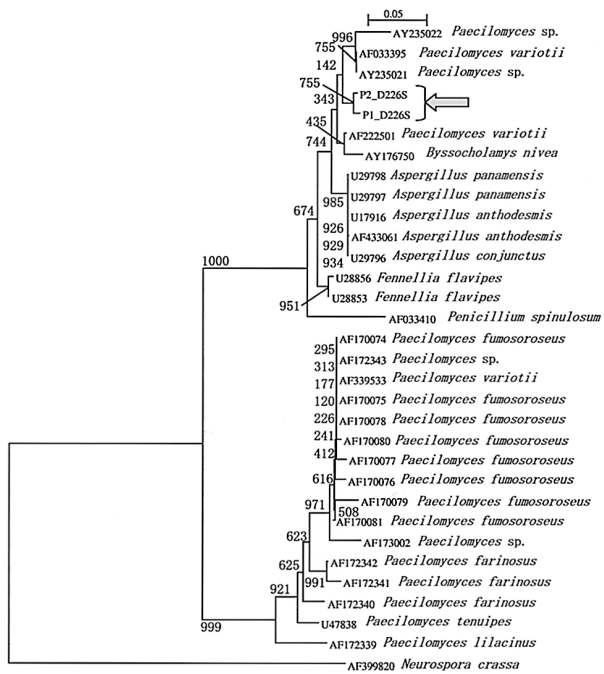


図-1. 系統解析 (26S D 2 領域)
分離菌の結果を図中矢印で示した

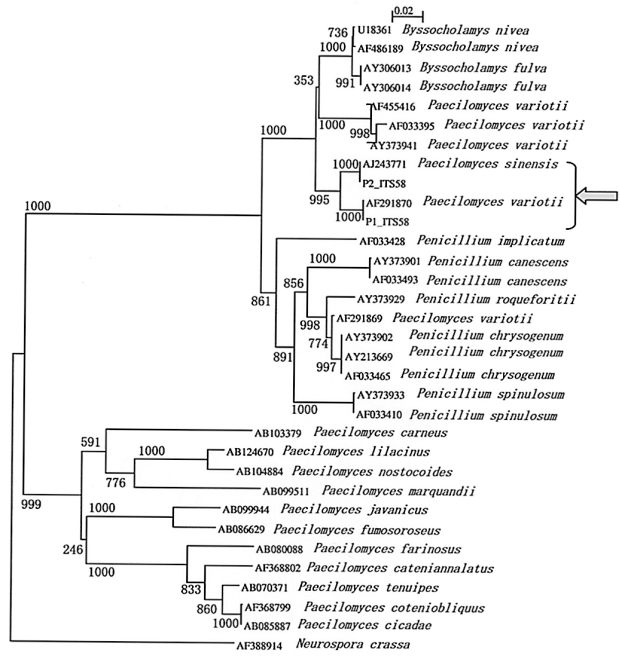


図-2. 系統解析 (ITS 領域)
分離菌の結果を図中矢印で示した

(2004年11月5日 受付; 2004年12月7日 受理)