

皇居吹上御苑のスダジイ林とクヌギ林における キノコ類メタゲノム解析（予報）

保坂健太郎*・宇野邦彦・南 京沃

国立科学博物館植物研究部 〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1

*E-mail: khosaka@kahaku.go.jp

Metagenomic Analysis of Mushroom-forming Fungi from *Castanopsis*- and *Quercus*-dominated Stands in the Fukiage Gardens, the Imperial Palace, Tokyo: A Preliminary Study

Kentaro Hosaka*, Kunihiko Uno, Kyung-Ok Nam

Department of Botany, National Museum of Nature and Science,
4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

*E-mail: khosaka@kahaku.go.jp

Abstract. Massive DNA data generated from pyrosequencing were analyzed to clarify the diversity of mushroom-forming fungi. Soil DNA samples extracted from two sites in the Fukiage Gardens, the Imperial Palace, Tokyo, were subjected to pyrosequencing to compare mushroom floras between *Castanopsis sieboldii* and *Quercus acutissima* stands, but several biases hindered such comparative studies. When dealing with biodiversity studies of microorganisms, including mushrooms, data from additional sampling schemes, such as fruit bodies and mycorrhizae, need to be investigated at the same time.

Key words: DNA, fruit bodies, ITS, mycelia, pyrosequencing, soil, spores.

はじめに

生物学の分野において、多様性の把握というのは最も基礎的かつ重要なトピックの一つである。ただし、動物や植物のように肉眼でその存在が把握できる生物群とは異なり、目に見えない微生物の多様性を把握することは容易ではない。特に菌類は地球上の推定種数が150万を超えるとも言われ、かつその大部分が未記載・未発見の状態で残されている。また、キノコ類に代表されるように、分類群によっては肉眼で確認できる大きさの子実体を形成する時期もあるが、生活環の大部分は人間の目に触れることのない、胞子もしくは菌糸の状態で過ごす。また、子実体の形成は季節による変動が大きく、毎年定期的に発生するとも限らない。そのため、皇居調査のように5年間という限

られた期間で、かつ少人数による子実体ベースの調査では、菌類の多様性を完全に把握するのは、ほぼ不可能である。

菌類を含む微生物の多様性が特に高いと思われるのが、土壌である。これまでに様々な研究グループが土壌中の微生物多様性を把握するために、研究を行ってきた。従来は主に培養から種同定という一連の手法が採られてきたが、近年は培養によらない、環境DNA的手法が盛んに用いられている。そうした一連の研究により、これまでの培養による研究では検出されなかった多様な微生物の存在が明らかにされており、この手法の有効性は明らかである。そして、菌類の中でも大型の子実体を形成し得るキノコ類においても、上記の問題点を克服し、真の多様性把握に迫るためには、子実体サンプリングによらない、環境DNAの

手法を検討する必要がある。

そこで本研究では、微生物の多様性研究に近年盛んに用いられている次世代シーケンサーを利用し、土壌中のキノコ類のDNAをどの程度検出可能なかを調べた。皇居吹上御苑の2地点を選定し、土壌サンプルからのDNAデータと子実体の採集データを比較することにより、DNA情報のみに基づくキノコ相の比較が可能であるかを検討した。

材料および方法

土壌サンプルは皇居吹上御苑のスダジイ優占林(A区, 近田ら, 2000)およびクヌギ優占林(B区, 近田ら, 2000)それぞれから8サンプルずつ採集した。採集日は2013年8月13日である。土壌採取においては、スダジイおよびクヌギそれぞれの根元から1メートル以内の範囲で表層のリターを除去したうえで、直径5センチ・深さ10センチの土壌コアを採集した。土壌サンプリングは最低5メートルの間隔をあけて行った。

採集した土壌サンプルは同日中に実験室に持ち帰り、シリカゲルおよび低温(35℃)の送風で1週間乾燥させた後、リターや石および根などを除去した後に木槌で粉碎し、粉末状になったものだけを使用した。それぞれの土壌サンプルは混合せず、各200mgをDNA抽出に用いた。

DNA抽出はCTABバッファーによる改変法(Hosaka, 2009)と土壌DNA抽出キット(NucleoSpin Soil, TaKaRa)のプロトコルに従い、各土壌サンプルから2回抽出をした。抽出したDNAは菌類の正式なDNAバーコード領域である核ITS領域(Schoch *et al.*, 2012)をPCR増幅し、DNAが抽出されているかを確認した。使用したプライマーはITS8-FとITS6-R(Dentinger *et al.*, 2010)である。PCRは、94℃(35秒)・51℃(30秒)・72℃(1分)を35サイクルの条件で行なった。増幅の有無は、PCR反応液をアガロースゲルに泳動することで確認した。

増幅を確認した後、上記のプライマーにRoche社のLibL/AプライマーおよびLibL/Bプライマーの配列を追加し、かつITS-8F側にはさらにMID6配列を追加した2つのプライマーを用いて各サンプルを増幅した。プライマーの配列はそれぞれ、ITS8-F_LibL/A_MID6(5'-CCATCTCATCCCTGCGTGCTCCGACTCAGATATCGCGAGAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3'), ITS6-R_Lib/B

(5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTTCCCGCTTCACTCGCAGT-3')である。PCRは、94℃(35秒)・51℃(30秒)・72℃(1分)を35サイクルの条件で行なった。増幅の有無は、PCR反応液をアガロースゲルに泳動することで確認した後、全てのDNAサンプルをA区・B区それぞれで混合して、AMPure XP Kit(Beckman-Coulter)を使い精製し、PicoGreen(Invitrogen)を用いて定量した。エマルジョンPCR~パイロシーケンスに至る一連のプロトコルはRocheのマニュアルに従い、GS Junior Titanium emPCR Kit(Lib-L), GS Junior Titanium Sequencing Kit, およびGS Junior Titanium PicoTiterPlate Kitを使用し、GS Juniorを用いてデータ解析を行った。

得られたデータはRocheのプロトコルに従い低クオリティー配列を削除したうえで、gsReadCluster toolのコマンドライン[gsReadCluster-pct 97/]にて97%のクラスタリングを行い、解析に用いた。得られた配列はNCBIのBLAST検索(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)により、分類群を特定した。次世代シーケンスによって検出されたデータは、菌類の門および担子菌門の綱ごとのクラスター数を比較した後、目レベルおよび属レベルの検出の有無を、子実体に基づく採集リスト(長澤・保坂, 早乙女・服部; とともに本報告書)と比較し検証した。

結果と考察

スダジイ優占林(A区)、クヌギ優占林(B区)ともに、土壌DNAの解析からは多様な菌類が検出された(図1, 2)。両調査区ともに優占していたのは担子菌門 Basidiomycotaと子のう菌門 Asco-

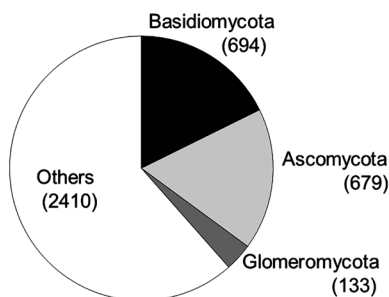


図1. スダジイ優占林(A区)の土壌から検出された菌類(門)。括弧内は得られたITSシーケンスのクラスター数。

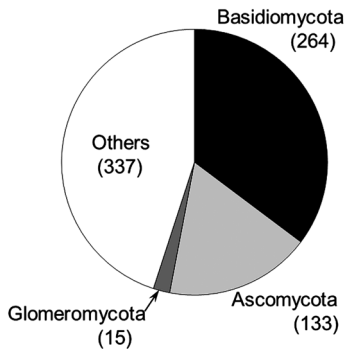


図2. クヌギ優占林 (B区) の土壌から検出された菌類 (門). 括弧内は得られたITSシーケンスのクラスター数.

mycotaであり, 特にB区では担子菌門が全体の約35% (264クラスター) を占めた. その他, グロムス菌門 Glomeromycota やツボカビ門 Chytridiomycota など検出されたが, 全体に占める割合は4%未満であった. さらに門レベルで判断できないシーケンス (図1, 2の“others”) が相当数検出されたが, これらは新規分類群のシーケンスという訳ではなく, 事前のデータ処理で排除しきれなかった低クオリティー配列やキメラ配列が大半を占めていると考えるほうが妥当であろう.

担子菌類以外の配列も相当数検出されたが, これは使用したプライマーが担子菌類に特異的なものでないからである. 今回は Dentinger *et al.* (2010) によるプライマー (ITS8-F と ITS6-R) を使用したが, これらは幅広い担子菌類 (特にキノコ類を多く含むハラタケ綱) のITS領域を増幅させることができると同時に, 非担子菌類も増幅してしまう. 近年はより特定の分類群に特異的で, かつパイロシーケンスに適したプライマーが報告されており (Toju *et al.*, 2012), 対象とする分類群以外をできるだけ排除したい場合は, そのようなプライマーを使用した実験系を考慮する必要がある. ただし, 真に特異的なプライマーを作成し, 特定の分類群のみを増幅し, かつその分類群を漏らさず増幅することは, 実質不可能である. 今回使用したプライマーは特異性では劣るため非担子菌類も多く増幅してしまったものの, ターゲットである担子菌門に属する種についても, 多様な種を逃さずに増幅することができたのではないかと考えている.

担子菌門に限って解析すると, A区・B区ともに最も優占したのはハラタケ綱 Agaricomycetes で

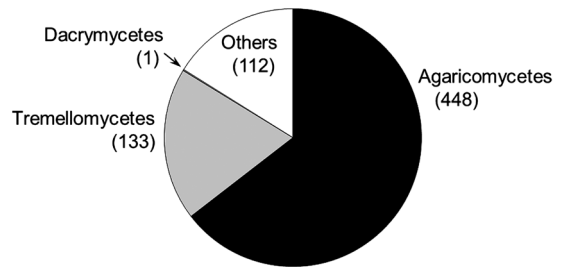


図3. スダジイ優占林 (A区) の土壌から検出された担子菌類 (綱). 括弧内は得られたITSシーケンスのクラスター数.

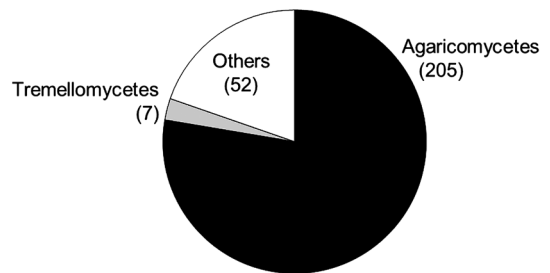


図4. クヌギ優占林 (B区) の土壌から検出された担子菌類 (綱). 括弧内は得られたITSシーケンスのクラスター数.

あった (図3, 4). 続いて優占していたのはシロキクラゲ綱 Tremellomycetes であったが, 全体に占める割合はA区で約19% (図3), B区で約2.7% (図4) であった. アカキクラゲ綱 Dacrymycetes については, A区ではわずか1クラスターが検出されたが (図3), B区からは検出されなかった (図4). その他, サビキン亜門 Urediniomycotina やクロボキン亜門 Pucciniomycotina に属するシーケンスと, 綱レベルの特定ができないシーケンスが検出されたが, 全体に占める割合は20%未満であった (図3, 4). 今回の解析で対象としたのは, 大型の子実体を形成するハラタケ綱・シロキクラゲ綱・アカキクラゲ綱であり, ほほ全てが微小菌であるサビキン類・クロボキン類は対象としていない. パイロシーケンスの解析結果と比較するための標本データも, キノコ類の子実体に基づくものである. 担子菌門内で対象分類群が多く検出できたことから, プライマーの選択については, 一定の成功を収めたと言えるであろう.

検出できたクラスター数は, A区とB区で大きな違いがあった. A区では全クラスター数は3916であった (図1) のに対し, B区では749であった

(図2). また担子菌類に限ってみても, A区では694クラスターであった(図3)のに対し, B区では264クラスターであった(図4). クラスターはITS配列の違いでまとめられるため, クラスター数はDNAレベルで検出された種数に大まかであるが相当する. よってこの結果は, 潜在的には両地区における菌類の多様性の違いを示していると言えるが, パイロシーケンスのランごとのばらつき大きさによるものと考えるほうが妥当であるかもしれない. 今回は両地区のサンプルとも, パイロシーケンスを1回ずつしたにすぎない. 事前研究により, ランごとに得られるリード数が数万~20万リード程度の範囲で大きく変わり, その結果検出できるクラスター数(≒種数)にもかなりのばらつきがあることがわかっている. そのため, 今回の結果は種の多様性の違いではなく, ランの出来, 不出来を反映しているに過ぎないかもしれないのである.

ただし, A区のほうがB区よりもキノコ類の多様性が高いことは, 他のデータからも示唆される. 2009年から2012年の調査中に採集された標本数は, 両地区とも200点を超え, 大きな違いはないものの, 標本を基に同定された種数でみるとA区が約90種, B区が約70種となっている. この種数計算には問題もあり, 未同定の標本が多数含まれ, それらは便宜的に同種と扱ったため, 実際の採集種数はこれよりもはるかに多いのは確実である. ただし, パイロシーケンス・子実体採集の両方の結果が, スダジイ優占林のキノコ相のほうが多様であることを示しているのは考慮すべきであろう.

一方, 両地区の生態環境は大きく異なる. A区は樹木の90%以上を常緑広葉樹が占め, かつ胸高直径が40センチ以上の樹木が最も多く, 巨木も多い. また, 刈り込み等の手入れは最小限しか行われておらず, 自然に近い状態の植生が保たれている(近田ら, 2000). それに対してB区は果樹園および庭園として整備されてきた歴史があり, 大部分の樹木が植栽されたものである. また, 林床のササ類の刈り払いも定期的に行われている(近田ら, 2000). A区で優占するスダジイ, B区で優占するクヌギともにブナ科に属し, 多くの外生菌根性菌類と共生することが知られているが, 両地区の上記のような環境の違いが, 検出できた種数の違いに反映されたことは否定できない.

今回の皇居の生物相調査は, 肉眼による観察と採集によった. そのため, 採集の対象となる分類

表1. 調査地ごとの検出された目数(ハラタケ綱, シロキクラゲ綱, アカキクラゲ綱)

	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)
検出総数(目)	20	16
DNA・子実体の両方で検出	9	10
DNAのみ検出	9	6
子実体のみ検出	2	0

群も, 肉眼で確認できる子実体を形成するキノコ類のみである. パイロシーケンスによりそれ以外の分類群も多数検出されたが, 標本データと比較するために, ハラタケ亜門に属する3綱(ハラタケ綱, シロキクラゲ綱, アカキクラゲ綱)について, 目レベルおよび属レベルの検出結果を解析した.

目レベルにおいては, スダジイ林(A区)からは計20目, クヌギ林(B区)からは計16目が検出された(表1). しかし, DNAおよび子実体の両方で検出できたのは両地区とも半数程度であり, DNAのみから検出された目もA区からは9目, B区からは6目あった. 一方, 子実体は採集されたがDNAは検出されなかった目がA区から2目(スッポンタケ目 Phallales, ヒメツチグリ目 Geastrales)あった. この2目はともに土壤中に広く菌糸体を伸ばし, 特にヒメツチグリ目は広大な菌糸マットを形成することが多い. そのため土壤中の菌糸もしくは胞子を検出することはたやすいように思えるが, DNAレベルでは検出されなかった.

検出された目の内訳を見ると, DNAのみで検出された目とDNA・子実体両方で検出された目は, 両地区で重複しているものが多かった(表2). DNAのみで検出された目のうち, CystofilobasidialesとFilobasidialesはともに酵母状の菌類であり, 今回の調査では採集対象になりえない. ただしそれ以外の目については, 肉眼で確認できる程度の大きさの子実体を形成するグループであり, 今回の調査期間中に発生しなかった, もしくは調査日と発生時期がずれていた可能性が高い.

A区のみから検出されたものが4目, B区からのみ検出されたものが1目あり, すべてDNAレベルでのみ検出された. これらは森林生態系に普遍的に存在するグループであるが, 調査期間中に子実体を採集することはできなかった. このうちキカイガラタケ目 GloeophyllalesやAmylocorticialesに属する多くは木材腐朽菌であり, 土壌が分布の中心では無い. しかし, 同じく典型的な木材腐朽

表2. 調査地ごとの検出された目の内訳

目	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)
Corticiales	D	D
Cystofilobasidiales*	D	D
Filobasidiales*	D	D
Holtermanniales	D	D
Thelephorales	D	D
Amylocorticiales	D	
Gloeophyllales	D	
Gomphales	D	
Sebacinales	D	
Gaeastrales	F	F+D
Phallales	F	F+D
Agaricales	F+D	F+D
Auriculariales	F+D	F+D
Boletales	F+D	F+D
Cantharellales	F+D	F+D
Hymenochaetales	F+D	F+D
Polyporales	F+D	F+D
Russulales	F+D	F+D
Tremellales	F+D	F+D
Dacrymycetales	F+D	
Atheliales		D

D=DNAのみで検出

F=子実体のみで検出

F+D=DNA・子実体の両方で検出

*=酵母状, 不完全菌などで大型の子実体を形成しない目

菌であるコウヤクタケ目 *Corticiales* やタマチヨレイタケ目 *Polyporales* などと同様, 土壌中からDNAとして問題なく検出されている(表2). 木材基質は地上部にあって土壌と接して存在しているし, キノコ類の子実体からは大量の胞子が散布され土壌に落下しているはずである. 今回の結果は, 木材腐朽菌であっても, 土壌サンプリングにより検出できることを示している.

属レベルにおいては, A区から計126属, B区から計76属が検出された(表3). そのうち, DNA・子実体の双方で検出できたのは, A区で24属, B区で11属にしか満たなかった. A区で最も多かったのは, DNAのみで検出されたもの(62属)だったが, B区では子実体のみから検出されたものが41属を占めた(表3). 限られた期間の子実体調査の結果が, 真の多様性の過半数を占めるとは考え難く, やはりクヌギ林のパイロシーケンス結果はランの不出来によるものが大きいと考えられる.

ただし, 検出された属の内訳を見ると, スダジイ林のみから検出された属だけではなく, クヌギ

表3. 調査地ごとの検出された属数(ハラタケ綱, シロキクラゲ綱, アカキクラゲ綱)

	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)
検出総数(属)	126	76
DNA・子実体の両方で検出	24	11
DNAのみ検出	62	24
子実体のみ検出	40	41

林のみから検出された属も相当数存在する(表4). クヌギ林のみから検出された属が本当にスダジイ林には存在しないのか, は今後検討していく必要があるが, やはり成功したパイロシーケンスのランをもってしても, 未検出のものが多く存在することは確実であろう.

キノコ類の子実体発生は期間が限定され, 時期も不定期である場合が多い. しかし, DNAのみで検出されたもののうち, アカヤマタケ属 *Hygrocybe*, フウセンタケ属 *Cortinarius*, ヤマイグチ属 *Leccinum*, サマツモドキ属 *Tricholomopsis* などは, 比較的発生量が多く, 子実体も大型で発見しやすい種が多く含まれる. そのような属を期間中に一切採集できなかったことから, 子実体に基づく調査は5年間では不十分であることは明らかである. *Chamonixia* 属や *Descomyces* 属など, 地下生のいわゆるトリュフ型の子実体を形成するグループも, DNAでは検出されていることは興味深い. 今回の調査では, 主に地上部の子実体を集散的に採集し, 地下の子実体は探索しなかった. これも今後の調査で検討するべきであろう.

一方, 子実体は採集されているが, DNAで検出できなかった属も相当数に上る(表3, 4). 今回の土壌サンプルが, スダジイおよびクヌギという菌根性樹木の直下から採取されたことから, 土壌を分布の中心とする菌根性キノコ類のDNAは比較的検出されやすいのではないかと推測できる. ところが実際は, アンズタケ属 *Cantharellus*, ヤマドリタケ属 *Boletus*, チチタケ属 *Lactarius* など, 子実体は採集されているもののDNAによる検出ができなかった属もあった. 子実体の発生数や頻度(地上部)と菌糸の量(地下部)は必ずしも相関しないことは広く知られているが, ここでも存在さえすれば検出できる, というわけではないことに注意が必要である.

パイロシーケンスの問題点より前段階として, サンプリングの難しさにも言及する必要がある.

表4. 調査地ごとの検出された属の内訳

属	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)	属	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)
Cheimonophyllum	D	D	Pseudoclitocybe	D	
Cryptococcus*	D	D	Ramaria	D	
Cystofilobasidium*	D	D	Repetobasidium	D	
Descolea	D	D	Ripartites	D	
Holtermannia	D	D	Sarcodon	D	
Hygrocybe	D	D	Sarcomyxa	D	
Moniliophthora	D	D	Sebacina	D	
Oliveonia	D	D	Tricholoma	D	
Phanerochaete	D	D	Trichosporon*	D	
Resinicium	D	D	Udeniomyces*	D	
Thelephora	D	D	Mutinus	F	D
Tomentella	D	D	Volvariella	F	D
Tricholomopsis	D	D	Armillaria	F	F
Tulasnella	D	D	Calvatia	F	F
Dacrymyces	D	F	Cantharellus	F	F
Antrodia	D		Crepidotus	F	F
Bullera*	D		Cyptotrama	F	F
Calostoma	D		Echinoderma	F	F
Camarophylloopsis	D		Galerina	F	F
Clavaria	D		Gastrum	F	F
Clitocybula	D		Gerronema	F	F
Clitopilus	D		Gymnopilus	F	F
Conocybe	D		Hydropus	F	F
Coprinopsis	D		Hymenopellis	F	F
Coprinus	D		Hypholoma	F	F
Cortinarius	D		Melanophyllum	F	F
Craterocolla	D		Resupinatus	F	F
Dictyonema	D		Roridomyces	F	F
Dioszegia*	D		Schizophyllum	F	F
Fellomyces*	D		Simocybe	F	F
Gloeophyllum	D		Strobilurus	F	F
Gloeoporus	D		Tricholosporum	F	F
Guehomyces*	D		Xerocomus	F	F
Hohenbuehelia	D		Boletus	F	F + D
Hydnellum	D		Lactarius	F	F + D
Hypsizygus	D		Marasmius	F	F + D
Inonotus	D		Agaricus	F	
Junghuhnia	D		Bjerkandera	F	
Laetiporus	D		Cerrena	F	
Leccinum	D		Coriolopsis	F	
Limonomyces	D		Craterellus	F	
Membranomyces	D		Favolus	F	
Mensularia	D		Fistulina	F	
Minimedusa*	D		Fuscoporia	F	
Mrakiella*	D		Lentinellus	F	
Neolentinus	D		Lycoperdon	F	
Nolanea	D		Microporus	F	
Peniophorella	D		Polyporus	F	
Phaeocollybia	D		Strobilomyces	F	
Phellinus	D		Typhula	F	
Phlebia	D		Laccaria	F + D	D
Podoserpula	D		Agrocybe	F + D	F

表4. 続き

属	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)	属	スダジイ林 (A区)	クヌギ林 (B区)
Auricularia	F + D	F	Skeletocutis	F + D	
Clitocybe	F + D	F	Trametes	F + D	
Coprinellus	F + D	F	Xerula	F + D	
Flammulina	F + D	F	Athelia		D
Gymnopus	F + D	F	Chamonixia		D
Lepiota	F + D	F	Derxomyces*		D
Mycena	F + D	F	Descomyces		D
Pleurotus	F + D	F	Sphaerobolus		D
Pluteus	F + D	F	Stereum		D
Amanita	F + D	F + D	Tylospora		D
Entoloma	F + D	F + D	Dacryopinax		F
Ganoderma	F + D	F + D	Exidia		F
Inocybe	F + D	F + D	Lepista		F
Psathyrella	F + D	F + D	Linderia		F
Rigidoporus	F + D	F + D	Marasmiellus		F
Russula	F + D	F + D	Pholiota		F
Scleroderma	F + D	F + D	Pleurocybella		F
Clavulina	F + D		Tetrapyrgos		F
Perenniporia	F + D		Tremella		F

D = DNA のみで検出

F = 子実体のみで検出

F + D = DNA・子実体の両方で検出

* = 酵母状, 不完全菌などで大型の子実体を形成しない属

まず, キノコ類の菌糸は土壤中に一様に分布しているわけではなく, 大きさ・形とも様々なコロニーがパッチ上に存在しているはずである。そのため, ある一か所の土壌を採取しただけでは, そこにたまたま優占していたキノコの菌糸のみが得られることになる。そのようなバイアスを避けるために, 本研究では各調査区とも8か所から土壌を採取したが, おそらく吹上御苑におけるキノコ相をDNAレベルで把握するためには, さらに数10倍~それ以上のサンプリングが必要になってくるであろう。さらに, 菌糸のコロニーは長期間存在するものばかりでなく, 短期間で成長・死滅を繰り返すものもあり, その両方を採取するためには, 季節を変えて複数回のサンプリングをすることが必須となる。今回の調査では, わずか1日のサンプリングで得られた結果に基づいているが, 子実体採集と同様に, 継続的なサンプリングが必要である。

サンプリングに引き続く, パイロシーケンス・データ解析に至るまでの一連の実験についても, 難しさが伴う。土壌中にはDNAの抽出を妨げる物質が大量に含まれており, また様々な形状の胞子や菌糸からDNAをまんべんなく抽出すること

は不可能であろう。DNAが無事抽出できたとしても, 対象の分類群全てをPCR増幅することのできるプライマーなどは存在しないし, 使用するポリメラーゼの種類などによっても結果は大きく変わる。このような, パイロシーケンス法の問題点については, Lindahl *et al.* (2013) や Tedersoo *et al.* (2012) が詳しく言及している。

パイロシーケンス法においては, 上記の他にもシーケンシングのエラー率が高いことも問題視されており, さらに登録されている配列が誤同定に基づくことも多い。そのため, 調査期間中に採集された子実体全てからDNAは得られているものの, 今回はパイロシーケンスの結果と標本データの種レベルの比較は最低限にとどめた。参考までに, パイロシーケンスにより検出され, かつ子実体が採集されており, ほぼ間違いなく種レベルで一致したのはわずか6種(キクラゲ *Auricularia auricula*, カレエダタケ *Clavulina cristata*, コキララタケ *Coprinellus radians*, エノキタケ *Flammulina velutipes*, アマタケ *Gymnopus confluens*, ヒメカタショウロ *Scleroderma areolatum*) であった。

以上のような問題点はあるが, たった1日のサンプリングで100属以上のキノコ類を検出できた

ことも事実である。土壌菌を扱ったさらに大規模な研究結果 (Toju *et al.*, 2013) を見る限り、サンプル数を増やせばさらに多様な菌類が検出されることは明らかであり、ある地域の菌類相を明らかにするためには、パイロシーケンス法の問題点・限界を認識しつつ、さらなるサンプリング (DNA, 子実体ともに) を継続していく必要がある。

今後の展望

今回の実験は、多数のキノコ子実体を採集した地点で土壌を採取し、土壌DNAから検出できる種数・種構成を、子実体データと比較した。子実体は採集されているにもかかわらず、DNAレベルで相当数の未検出サンプルがあったということは、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析に限界があることを示している。微生物の多様性を調べるにあたっては、各サンプル地点の共通性とともにも固有性が重要になってくると思われるが、固有の種がバイオマスで優占するとは限らず、むしろ稀な種である可能性も高い。多様性研究には、そのような稀な種も含めてできるだけ多くの種を検出する必要があるため、DNAレベルで未検出種が相当数存在する可能性を示した今回の実験の結果は、今後慎重に検討していくべきであろう。

微生物コミュニティは、含まれている種数や、それぞれのバイオマスなどが全く不明な場合がほとんどである。よって、DNAデータのみでは、本当は存在するのに未検出となる種の割合はわからない。そのため、現段階でできる対策としては、(1) 複数のランを行い、ランごとのばらつきを確認したうえで解析する、(2) 抽出方法、PCR増幅の試薬、プライマーなどを検討し、できれば異なるセットで解析を行う、などが考えられるが、いずれも根本的な解決にはならない。やはりDNAデータだけでなく、実体証拠としての標本 (この場合は子実体) の採集を同時並行的に進めていくことは必須である。標本があれば、その種がその場所に存在する間違いのない証拠となるし、DNAからしか検出されない種についても、今後の継続調査で子実体を得ることが可能になるであろう。それを踏まえると、従来の生物調査 (標本採集など) が軽視されがちな傾向にあるが、標本収集の重要性はこれまで以上に高まっていると言える。

謝 辞

本報告をまとめるにあたり、調査にご協力いただいた宮内庁庭園課の職員各氏、土壌サンプルの前処理にご協力下さった西堀和男氏、大塚 恵氏に厚く御礼を申し上げる。

引用文献

- Dentinger, B. T., S. Margaritescu & J.-M. Moncalvo, 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 628–633.
- Hosaka, K., 2009. Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B*, **35**: 151–167.
- 近田文弘・西川 肇・藤井寿生・工藤勝輝・村井宏・伊藤忠夫, 2000. 皇居吹上御苑の森林植生. *Memoirs of the National Science Museum, Tokyo*, **34**: 51–71.
- Lindahl, B. D., R. H. Nilsson, L. Tedersoo, K. Abarenkov, T. Carlsen, R. Kjøller, U. Kõljalg, T. Pennanen, S. Rosendahl, J. Stenlid & H. Kausserud, 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers — a user's guide. *New Phytologist*, **199**: 288–299.
- Schoch *et al.*, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Tedersoo, L., R. H. Nilsson, K. Abarenkov, T. Jairus, A. Sadam, I. Saar, M. Bahram, E. Bechem, G. Chuyong & U. Kõljalg, 2012. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist*, **188**: 291–301.
- Toju, H., A. S. Tanabe, S. Yamamoto & H. Sato, 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One*, **7**: e40863. doi:10.1371/journal.pone.0040863.
- Toju, H., S. Yamamoto, H. Sato, A. S. Tanabe, G. S. Gilbert & K. Kadowaki, 2013. Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: “codominance” of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, **3**: 1281–1293.