HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	佐々木, 史
Citation	北海道大学演習林研究報告, 66(1), 33-57
Issue Date	2009-10-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/43040
Type	bulletin (article)
File Information	RBHUF66-1_002.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

Studies on host insects, morphorogy and genetic characteristics about entomopathogenic fungus *Cordyceps nutans*

by
Fumito SASAKI

要　　旨

日本産カメムシタケ（*Cordyceps nutans*）の寄主範囲を明らかにすると共に、地域内および地域間での遺伝的変異の解析を行い、本菌種の変異と寄主特性の関係を検討した。また、寄主のサイズと子実体サイズとの関係を検討した。更に本菌の組織分離法の改良および特異的PCRプライマーの開発を行なった。表面殺菌法により、成功例の無かった組織分離が可能となった。本菌は20℃～25℃、pH7.0～pH9.0で良好な成長を示した。寄主として４科10属15種のカメムシ類が同定され、形態では寄主種や地理に関連した特異的な傾向は見られなかったが、分子系統解析では２タイプに分かれた。寄主の性によるサイズと感染数の違いに有意差は検出されず、カメムシ体長と子実体頭部長、頭部径および柄部径の間にはそれぞれ高い正の相関が見られた。開発された特異的プライマーは本菌をタイプ別に選択的にPCR増幅することを可能にした。本研究により、カメムシタケは少なくとも異なる寄主に選択的に寄生する２タイプに遺伝的に分けることができ、どのタイプも寄主の雌雄両方に感染し、大型の寄主には大型の子座を形成することが明らかとなった。

キーワード：昆虫病原性菌，寄主特異性，生態的防除，rDNA-ITS，カメムシタケ

2009年４月３日受付，Received April 3，2009
2009年７月21日受理，Accepted July 21，2009
北海道大学大学院農学研究科　森林資源生物学研究室　〒060-8589　北海道札幌市北区北９条西９丁目
Laboratory of Forest Resource Biology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, N9-W9 Kita-ku, Sapporo, Japan

1章　序　論

1-1. 研究小史

冬虫夏草菌は、節足動物および菌類に寄生を行い、子実体を形成する菌類の総称である。古来より、冬虫夏草菌を漢方薬として用いてきた中国においては、冬虫夏草という呼称はシネンシス冬虫夏草（*Cordyceps sinensis*（Berk.）Sacc.）のみを指しており、日本において冬虫夏草菌と呼ぶ多くの菌類は虫草と呼称されている。シネンシス冬虫夏草はコウモリガ（*Hepialus armoricanus* Ober.）の幼虫に寄生し、チベットや青海省、雲南省などの4200m を超える高山地帯に生息しており（黄，1998；卯，1998）、日本での採取記録はない。

冬虫夏草菌に関する歴史的書物ならびに研究は、1082年に證類本草、1249年に重復政和経史證類備用本草、1590年に本草綱目へ蝉花の図が掲載されている。日本においても1726年に松岡恕庵によって用薬須知で蝉花が紹介された。同年、西欧においても Memoire de l'Acad. Sci. Paris に Reaumor により冬虫夏草が紹介され、翌年に Vaillant によりシネンシス冬虫夏草、サナギタケ、ハナヤスリタケがそれぞれ *Clavaria* 属菌の新種として、初めて学術的に Botanicon Parisiense に発表されている（矢萩，2005）。

現在、冬虫夏草菌の多くは子嚢菌亜門核菌綱バッカク菌科の *Cordyceps* 属に帰属する。*Cordyceps* 属は Fries によって1849年に定義され、タイプ種は *Cordyceps militaris*（Linnaeus）Link.（サナギタケ）である（Kobayasi, 1941）。1892年に Cooke により冬虫夏草菌の単行書 Vegetable wasps and plant worms が出版され、その書名が冬虫夏草菌の英名となっている（矢萩，2005）。これまでに300種以上の種が記載されてきている（佐藤，1999）。*Cordyceps* 属に属する冬虫夏草菌はアナモルフ（不完全世代）を持つとされ、それらは不完全菌類に所属しており、主に *Beauveria* 属、*Hirsutella* 属、*Hymenostilbe* 属、*Metarhizium* 属、*Nomuraea* 属、*Isaria* 属などがアナモルフであるとされている（Samson *et al*., 1988；Seifert, 1993；青木，2003）。

冬虫夏草菌の子実体形成後の子嚢胞子などによる寄主への感染経路は詳しく解明されていないが、不完全世代の分生子による昆虫への侵入メカニズムは概ね明らかにされており、以下のようである。

分生子が昆虫体表面に付着した後、発芽した菌糸が酵素によりクチクラ層を貫通して昆虫体内へ侵入する。侵入した菌糸は、短菌糸（ブラストスポア）を昆虫体液内で増殖させ蔓延していく。菌糸の蔓延により、昆虫は体液の吸収を受けることや、産生される毒素や物理的な外骨格内の破壊などで死亡する。死亡した後、昆虫の体節部分より菌糸が伸長し、再び分生子が生産される（福原，1989；深津，1999）。

冬虫夏草菌は、シネンシス冬虫夏草のように草地に生息するものもいるが、その多くは森林内に生息している。例えば矢萩（1979）は、山形県の農林水産省林業試験場東北支場釜淵試験地の広葉樹林内で、42種もの冬虫夏草菌を採取し報告している。Sato *et al*.（1994）は、秋田県八幡平のブナ林において、ブナアオシャチホコガの蛹に寄生したサナギタケの周期的な発生を確認し、ブナアオシャチホコガの幼虫の大発生とその後の減少にはサナギタケが関連していると報告しており、冬虫夏草菌は種によっては、森林生態系における重要な役割を担っていることが考えられる。しかしながら、他の多くの冬虫夏草菌に関しては、ほとんど研究が行なわれておらず、どこで寄主昆虫と遭遇するのか、感染時の形態は何であるのか、子実体の形成を行なっていないときは、どこでどのように生活しているのかといった生態は解明されていないのが現状である（佐藤，1999；内山，1999）。

冬虫夏草菌の利用法として、中国で古くから用いられている漢方薬に代表される薬理的利用と、昆虫類に寄生し寄主を殺すといった性質に着目したバイオロジカルコントロールへの利用という二つが主として挙げられる。

漢方薬としての冬虫夏草菌は、非常に古くから中国や韓国、日本などで利用されてきた（清水，1994；卯，1998；Kinjo and Zhang, 2001など）。中国ではシネンシス冬虫夏草が古くから不老長寿や滋養強壮、結核の薬や薬物中毒の解毒剤など様々に利用され、また宮廷料理としても珍重されてきた（Zhang and Kinjo, 1996；清水，1994；Huang *et al*., 2003など）。韓国ではハナサナギタケ（*C. takaomontana* Yakush. and Kumaz.=*Isaria tenuipes* Peck）が茶として飲用されている。日本でも、セミタケは古くから薬用として利用されていたようであり、また九州八女産のカメムシタケが肺結核や肋膜炎の治療薬として用いられた歴史があると筑後地誌略に記述されている（清水，1994）。

冬虫夏草菌の産生する生理活性物質には様々なものが存在し、薬理効果のある物質としては主にコルジセピン（3'-deoxyadenosine）、D-mannitol、β-glucan、

melatonin などがある（原，2004）。1950年に、サナギタケからコルジセピンが得られることが判明し（Cunningham *et al*., 1950）、子実体採取や菌糸体培養がシネンシス冬虫夏草に比べはるかに容易であり、コルジセピン含有量も多い（Ling *et al*., 2002）ことなどから、代替品として広く用いられるようになってきている。

バイオロジカルコントロールの担体としての冬虫夏草菌は、主にその不完全世代と考えられてきた虫カビ類が研究、利用されてきた（Shimazu *et al*., 2002；清水・山路，2002；Shah and Pell, 2003；Saito and Sugiyama, 2005；Li *et al*., 2007など）。*Cordyceps brongniartii* Shimazu の不完全世代である *Beauveria brongniartii*（Sacc.）Petch がカミキリムシ防除資材として、*C. bassiana* Li, Li, Huang and Fan の不完全世代である *B. bassiana*（Bals.-Criv.）Vuill が鱗翅目昆虫の防除資材として研究され、さらには製剤化されている。その他にも *Verticillium lecanii*（Zimm.）Viegas や *Metarhizium anisopliae*（Met.）Sorokin などが製剤化されているが、これらの利用されてきた不完全菌は、子嚢殻をもつ子実体を形成することが極めてまれであるか、未だに子嚢殻を持つ子実体の発生に関する報告がない。

糸状菌製剤は、各種防除法を組み合わせることによって害虫個体数を被害許容密度以下まで誘導することを目的としている総合防除（坂本・岡田，1981）の一端を担うものとされている。上述のような今までに利用されている糸状菌はジェネラリストと呼ばれる寄主範囲の広いものが多い。例えば *B. bassiana* には、およそ700種の寄主昆虫が存在する（PLi, 1988）。

一方で、寄生後に子実体形成を行うことの多い冬虫夏草菌は、特定の生物に選択的に寄生を行う、いわゆる寄主特異性を持つものが多い（Ito and Hirano, 1996；Nikoh and Fukatsu, 2000）。例えばサナギタケ

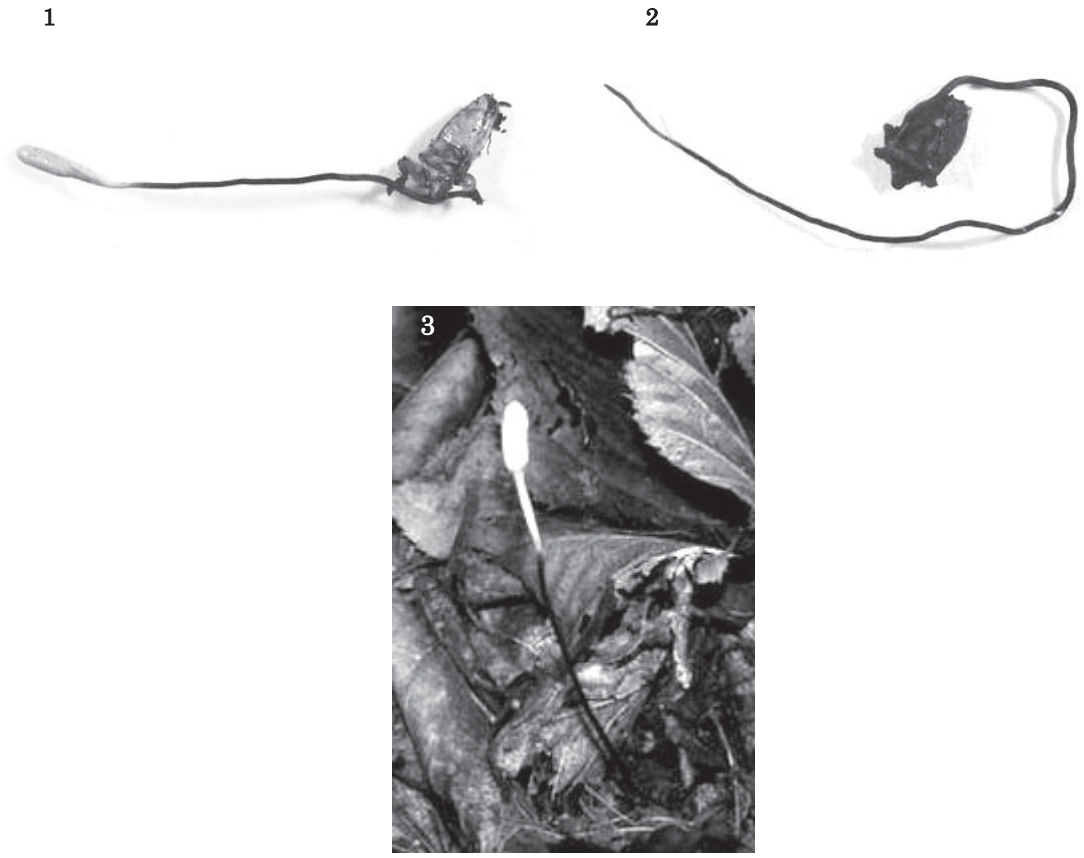

Fig. 1　*Cordyceps nutans*. 1: Mature perithecial head; 2: Immature or sterile head; 3: Protruding from litter layer.

は鱗翅目幼虫と蛹のみ、カメムシタケ（*C. nutans* Pat.）はカメムシ類にのみ寄生を行い（Hywel-Jones, 1995；深津，1999）、死亡させる。昆虫病原菌を害虫防除の担体として利用する場合、標的昆虫への病原性が強く、他の昆虫への影響力が少ないことが求められているが（津田ら，1997）、*B. bassiana* などのジェネラリストと比較するとサナギタケやカメムシタケなどの冬虫夏草菌はこの条件によく当てはまると考えられ、特定害虫に的を絞った防除への利用が期待できる（Ito and Hirano，1997；Sato *et al*., 1997；Evans *et al*., 1999；Nikoh and Fukatsu, 2000）。

カメムシタケ（*Cordyceps nutans*（Fig.1））は1887年にPatouillardによって原記載された、カメムシ類に寄生を行う冬虫夏草菌である。Patouillardの記載には日本の文献から引用した図が挿入されており、日本南部で採取した標本を用いて記載を行なっている。本菌は沖縄を除く日本全土において発生し、国内に一般的に見られる冬虫夏草菌の１つである（清水，1994；盛口，2006）。子実体は寄主胸部または口器に生じ、地上部の高さは3.5～10cmほどで、黒色針金状の柄部と鮮紅色や橙紅色、朱紅色、淡黄橙色などを呈する頭部を持つ（清水，1994）。膨大した頭部を形成せず、未成熟もしくは不稔性の紅色のピンヘッド状頭部のままの子実体が多い（清水，1994）。

カメムシタケの寄主昆虫であるカメムシ類は、半翅目カメムシ亜目に属している。同亜目には農林業において主要な害虫となっている種も数多く含まれている。害虫となっているカメムシ類は陸生で、農業においてはナシやコメ、テンサイなどを、林業においてはスギやヒノキの球果を吸汁し、被害を与える（友国ら，1993）。特に果樹を加害するカメムシ類は化学薬剤による防除が困難であり、他の防除素材が求められているのが現状である（津田ら，1999）。

カメムシタケも他の冬虫夏草菌と同様に、薬理的利用とバイオロジカルコントロールへの利用が考えられる。本菌は中国において、シネンシス冬虫夏草と同様の薬理効果を持つとされている（卯，1998；Liu and Xu, 2000）。シネンシス冬虫夏草は中国やネパールの高山帯でしか発生しないため、鮮度の良い子実体を入手しづらく、特に分離菌株を得るのは非常に困難である。しかしながら、カメムシタケは日本国内に存在しているため鮮度の良い子実体を入手しやすく、薬理成分をより多く含む菌株や成長の早い菌株といったような優良菌株が得やすいと考えられる。

カメムシタケを害虫防除の担体として利用する場合、カメムシ類にしか寄生を行なわないため、カメムシ類以外に加害する昆虫がいない場合や、他昆虫種に比べカメムシ類が際立って加害を行うような場合において、有効な防除資材となるだろう。

1-2．本研究の目的

カメムシタケはカメムシ類にのみ寄生を行なうため、選択性の高いカメムシ防除への使用が期待できる。また、シネンシス冬虫夏草と同等の薬理効果を持つことから、医薬品原料としての利用も期待される。しかしながら、カメムシタケは子嚢胞子が形成されない子実体が多いにもかかわらず、菌株の分離源が子嚢胞子に依存しており、利用目的に適した優良菌株を得るためのスクリーニングを行なうことが困難であることや、分離菌株の成長が非常に遅いことなどから、今まで利用されていない。

バイオロジカルコントロールに昆虫病原性菌を利用する際には、寄主範囲や寄主特性、寄主の雌雄に対する感染率の違いなど、用いる菌と寄主との関係を明らかにしていく必要がある。また、効果的な散布法や消長などを知るために、生活史などの生態的な部分も明らかにしていかなくてはならない。だが、カメムシタケにおけるこれらの知見は全く明らかにされていないのが現状である。

本研究では、カメムシタケの利用に向け、カメムシタケの形態と種の分類の際に用いられることの多い領域である核リボソーマルRNA遺伝子のITS1-5.8S rDNA-ITS2領域の塩基配列を用いて、寄主特性の解明や寄主雌雄とサイズがカメムシタケに与える影響を明らかにすることを目的とし、また子嚢胞子の形成非形成に関係なく分離ができる組織分離法を用いての分離率の検討と、生活史解明などへ応用可能なカメムシタケを特異的に検出することのできるPCRプライマーを作成した。

２章　組織分離法の検討

2-1．目的

冬虫夏草菌の分離は主に成熟子実体から射出された子嚢胞子や子嚢殻中の子嚢胞子を用いて行なわれている（内山，1999）。しかしながら、冬虫夏草菌には未成熟子実体や不稔性子実体が種によっては多く見られ（清水，1994）、そのような子嚢胞子の得られない子実体からの分離法は確立されていない。子嚢胞子の

得られない子実体からも分離を行うことが可能ならば、多くの子実体から分離菌株を得ることが容易となり、薬効成分を多く含有する系統や殺虫能力の強い系統といった有用菌株の検索を行なうことができるだろう。

カメムシタケにおいても、利用に際して問題になっているのが分離の困難さである。分離の試みは過去にいくらかの研究者によって行われている。Samson and Evans（1975）はカメムシタケと、その不完全世代である *Hymenostilbe nutans* Samson and Evans をガーナで採取、記載を行い、分離を試みたが成功していない。Sung *et al.*（1993）および Hywel-Jones（1995）は PDA 培地を用いて子嚢胞子と分生胞子からの分離に成功したが、組織分離はコンタミネーションがひどく、不成功であったと報告している。また、Furuya *et al.*（1983）や広谷・古谷（1996）は数種の培地を用いてカメムシタケの虫体内菌核から70% エタノールによる表面殺菌法により分離を試みているが、成功していない。

本章ではカメムシタケの組織分離法を確立するために、30%H_2O_2表面殺菌による子実体柄部と虫体腹腔内菌体からの純粋分離を試みた。また、表面殺菌時間の違いによる分離率の差を分離部位ごとに検討した。さらに、カメムシタケの分離菌株は成長が極めて遅いと報告されているため（Hywel-Jones，1995）、改善を目的として培養温度と培地初発 pH の検討を併せて行なった。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 供試材料

分離に用いられたカメムシタケは北海道大学北方生物圏フィールド科学センター森林圏ステーション苫小牧研究林において2002年 7 月から 9 月に採取した。採取地は、標高 5 ～95m の平坦な火山灰大地上である。気候は年間を通じて冷涼で、月平均気温が-3.2～19.1℃の範囲にあり、年平均降水量は約1200mm である。樹木相は、主にミズナラやイタヤカエデを始めとした広葉樹林である。供試した子実体総数は52である。

2-2-2. 子実体組織からの分離

カメムシタケ子実体を柄部と虫体に分断し、それぞれ30%H_2O_2を用いて表面殺菌を行った。柄部は 1 子実体あたりおよそ10mm の長さに 5 ～ 6 片、虫体は腹部中心で 2 片にメスで切断して供試した。30% H_2O_2浸漬処理時間は30秒あるいは 5 分とした。1 子実体から得られた各部位の切片について半数ずつ30秒処理区、5 分処理区に供した。殺菌処理後、滅菌蒸留水で十分洗浄を行い、滅菌ろ紙上で乾燥の後、柄部は sabouraud-glucose 寒天培地（Glucose 2 %，Peptone 1 %，Agar 2 %，Streptomycin 0.002%，pH6.5）に挿すように植菌し、虫体腹腔内菌体はメスを用いて虫体腹部から内部菌体を取り出し、Sabouraud-glucose 寒天培地上に植菌した。供試接種片の総数は341である。

4 処理間の差の検定には、全体の検定に χ^2検定を用い、多重比較の有意水準（P =0.05）は Bonferroni method によって補正した。

2-2-3. 子嚢胞子からの分離

組織分離株とコロニーの比較を行うための基本となるカメムシタケ分離株を得るために、一般的な分離方法である子嚢胞子からの分離を行った。内山の方法（1999）を若干改変し、滅菌シャーレ上に飛散させた子嚢胞子を Sabouraud-glucose 寒天培地上に画線培養した。23℃、暗所で数日間培養し、発芽の見られた胞子を新しい培地へ接種して再び同様に培養を行った。子嚢胞子の発芽は倒立顕微鏡（IMT-2, Olympus optical co. ltd.）を用いて確認した。生育したコロニーの色は、Munsell（1990）のカラーチャートに従ってカラーコードを決定した。

2-2-4. DNA 抽出および PCR-RFLP

組織分離成功の確認手段として、子嚢胞子由来菌株と子実体、子嚢胞子由来菌株に似たコロニーを呈した組織分離株を用いて PCR-RFLP を行った。柄部の-20℃凍結サンプル（およそ10mm 長）と分離された糸状菌糸小片（およそ 3 × 3 × 3 mm）、射出胞子由来の菌糸小片（およそ 3 × 3 × 3 mm）を用いた。DNA の抽出は、以上のサンプルを用いて ISOPLANT (Nippon gene）により行った。方法は説明書に従い行った。即ち以下のようである。サンプルを 300μl の抽出バッファ（Solution Ⅰ）に懸濁し、十分なホモジナイズ後に100μl の溶解バッファ（Solution Ⅱ）を添加、50℃で15分間インキュベートした。次に酢酸ナトリウム（Solution Ⅲ，pH5.2）を添加しボルテックスの後、氷上で15分間インキュベート、のち 12,000g、15分間 4 ℃で遠心分離を行った。2 層に分

離した上層の水相部分を別のチューブに分注し、2倍量のエタノールを加え12,000g、10分間4℃で遠心分離を行った。沈殿したDNAペレットを70%エタノールで洗浄した後、乾燥させた。

PCRはShih *et al.*（1995）の方法を改変して行った。即ち以下のようである。抽出したDNAは50μlのTEバッファに溶解させ、RNace Aを1μl添加し37℃で30分間インキュベートした後、1μlをPCRのテンプレートとして用いた。増幅領域は核rDNAのITS1-5.8S rDNA-ITS2領域とした。プライマーにはITS1ならびにITS4（White *et al.*, 1990）を使用した。PCRにはpuRe *Taq* Ready-To-Go PCR Beads（Amersham biosciences K.K.）とGeneAmp PCR System 2400（Perkin elmer）を用いた。PCR反応液の組成は、puRe *Taq* Ready-To-Go PCR Beads、テンプレートDNA1μl、プライマーITS1　1μl、プライマーITS4　1μl、滅菌水22μlである。サンプルは94℃で30秒間変性を行った後、94℃　1分、50℃　1分、72℃　2分を40サイクル行った。PCR産物は3％NuSieve GTG agarose gel（FMC Bioproducts Inc.）および0.5× TBEバッファ（44.5 mM Tris, 44.5 mMホウ酸，1 mM EDTA·2Na·2H_2O, pH 8.0）を用い100Vで55分間電気泳動を行った。その後、1μglのエチジウムブロマイド溶液にて20分間染色を行い、UV照射にてバンドの確認を行った。1本だけバンドが確認されたPCR産物をRFLPに用いた。マーカーには100 bp DNA Ladder（Takara bio Inc.）を使用した。

RFLPは9μlのPCR産物を用いて、*Eco* R Ⅰ、*Hha* Ⅰ、*Alu* Ⅰの各制限酵素（Takara bio Inc.）により35℃で1時間消化を行った。制限酵素断片は上記と同条件で電気泳動、染色、パターンの確認を行った。

2-2-5．培養温度試験

上記方法で分離されたカメムシタケのうちの3菌株を使用した。Sabouraud-glucose寒天培地で25℃、30日間暗所で培養したものを、およそ3 mm立方に切り取り接種片とした。基本培地として

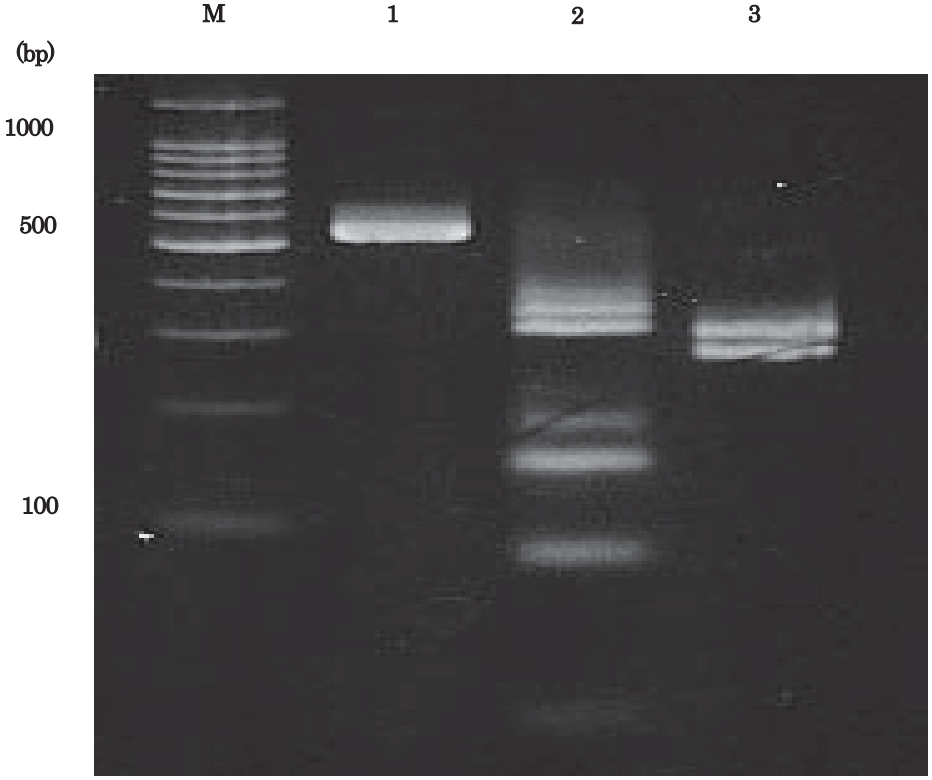

Fig. 2　Amplified DNA and RFLP patterns of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region of *C. nutans*. Lane M: 100 bp ladder marker; Lane 1: amplified DNA with primer pairs ITS1 and ITS4; Lane 2: *Alu* Ⅰ digestion; Lane 3: *Hha* Ⅰ digestion.

Sabouraud-glucose 寒天培地を使用した。5～35℃まで5℃刻みにインキュベーターの温度を設定し、pH6.5、暗所で3ヶ月間培養を行った。各系統につき反復は6で、評価は、シャーレに接種片中央を中心とした垂直に交わる2直線を引き、接種片の長さを差し引いた線上における菌糸の伸長量の平均値を算出した。

2-2-6. 初発 pH 試験

初発 pH の検討は、1 N KOH で5.0～11.0まで1.0刻みに調整し、25℃で培養を行った。他の条件および評価法は温度試験と同様である。

2-3. 結果

子嚢胞子から分離された菌株のコロニーの色は、white（10R 8/1）、pink（10R 8/4）、pale yellow（2.5Y 7/4～8/2）といった比較的淡い色のものから reddish brown（5YR 4/4）、dark reddish brown（5YR 3/2）といった濃色のものまで広い範囲に渡った。また、絡まった短い気中菌糸が見られた。これらは発芽からの成長が著しく遅く、1ヶ月培養後のコロニー直径は5 mm 以下であった。上記の結果より、組織から分離された菌株で子嚢胞子分離株と似た様相を呈したものを *C. nutans*-like fungi とした。

子実体柄部および虫体腹腔内菌体のいずれの接種片からも糸状菌の伸長が見られ、その割合は接種片総数の約72% であった。これら糸状菌を100% とした時、上記のようなコロニーを呈した *C. nutans*-like fungi はおよそ38% であった。

カメムシタケの菌株分離成功の確認手段として、子嚢胞子由来菌株とその分離源である子実体、その子実体組織から分離された *C. nutans*-like fungi の

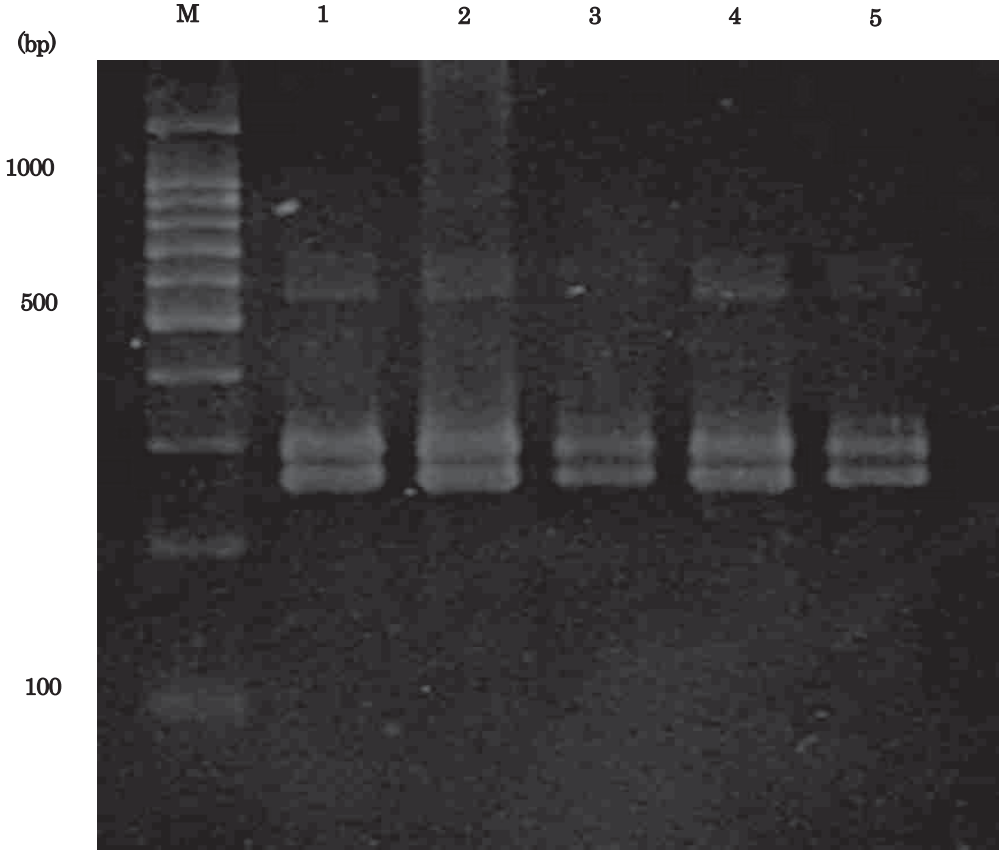

Fig. 3 RFLP patterns of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region of rDNA of *C. nutans* digested with *Hha* Ⅰ. Lane M: 100 bp ladder marker; Lane 1: fruit-body; Lane 2: isolate from ascospores; Lane3: isolate from stipe; Lane 4 and 5: isolates from abdominal tissue.

PCR-RFLP パターンの比較を行った。各サンプルから抽出した DNA はプライマー ITS1ならびに ITS4で全て増幅され、約560bp のバンドを呈した。PCR 産物を RFLP 解析に供した結果、*Hha* Ⅰでは260bp 付近と300bp 付近にバンドが得られた（Fig. 2）。*Alu* Ⅰでは多数のバンドが検出され、およそ130bp、170bp、300bp、340bp、380bp 付近に顕著なバンドが現れた（Fig.2）。*Eco* R Ⅰでは消化を行うことができなかった。供試した全てのサンプルで同一のパターンが得られ（Fig. 3）、*C. nutans*-like fungi とした分離株はカメムシタケと確認された。

各試験区におけるカメムシタケの分離率を Table 1に示した。全処理区間内に有意差が生じ、多重比較を行ったところ、柄部30秒殺菌処理区と柄部５分殺菌処理区ならびに虫体腹腔内菌体試験区の間には有意な差が見られた（$p < 0.008$）。虫体腹腔内菌体の殺菌処理時間における有意差は生じなかった。各試験区における供試子実体総数に対する分離を行うことのできた子実体数は、柄部30秒殺菌処理区において52個中６個（11.5%）、５分殺菌処理区において51個中24個（47.1%）、虫体腹腔内菌体30秒殺菌処理区において45個中24個（53.3%）、５分殺菌処理区において48個中26個（54.2%）であった。カメムシタケ以外の糸状菌ならびにバクテリアや酵母などの非糸状菌コンタミネーション数は順に、柄部30秒殺菌処理区で糸状菌88、非糸状菌27、５分処理区で51と33、虫体腹腔内菌体30秒

Table 1　Fungal isolation of *Cordyceps nutans*

H_2O_2-treatment	source	isolates / inocula*
30 sec	stipe	10 / 126 a
	abdominal tissue	24 / 46 c
5 min	stipe	33 / 119 b
	abdominal tissue	28 / 50 c

*Values followed by the same letter were not significantly different (p<0.008) according to Bonferroni method.

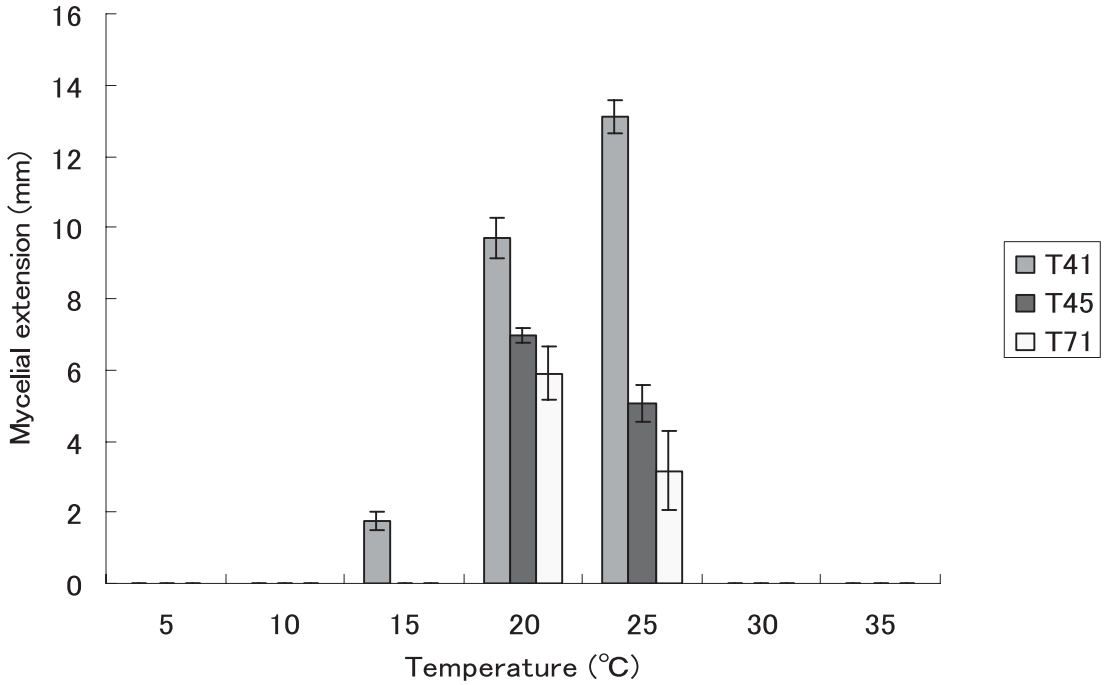

Fig. 4　Average mycelial growth of 3 strains of *C. nutans* on media at various temperature after 3 months incubation. Mean ± S.E.,n = 6 .

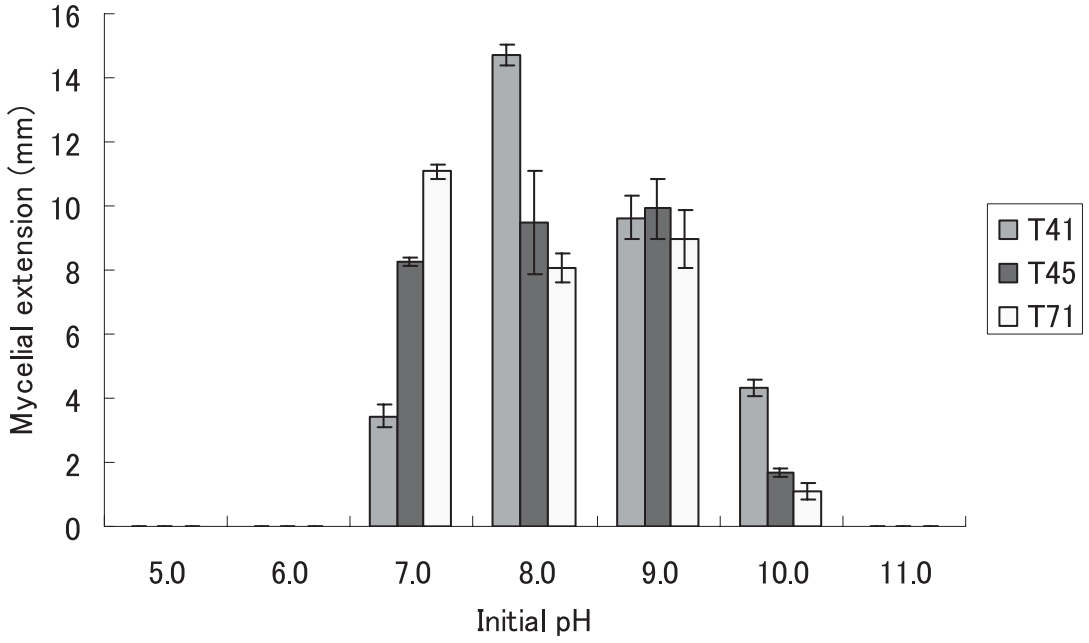

Fig. 5　Average mycelial growth of 3 strains of *C. nutans* on media at various pHs after 3 months incubation. Mean ± S.E.,n = 6 .

殺菌処理区で6と15、5分処理区で7と15であり、柄部試験区では糸状菌のコンタミネーションが多く、虫体腹腔内菌体試験区では非糸状菌のコンタミネーションが多くなった。

各温度による菌糸成長をFig. 4に示した。10℃から25℃の間で菌糸成長は確認された。全体的に20℃および25℃における成長が研著であった。5℃、30℃および35℃ではどの系統においても菌糸の成長はまったく見られなかった。

各pHによる菌糸成長はFig. 5に示した。pH6.0からpH11.0の間で菌糸成長が確認された。pH5.0ではどの系統においても菌糸成長は見られなかった。pH6.0とpH11.0では全ての系統で1 mm以下の菌糸成長であった。全体の傾向として、酸性よりも中性～弱アルカリ性（pH7.0～9.0）において良好な菌糸成長が確認された。PH7.0では他のpHと比較して真円に近い密なコロニーが形成された。

2-4. 考察

Hywel-Jones（1995）は、カメムシタケを分生子から分離し、そのコロニーは著しく成長が遅く、菌糸はまばらで半透明状、30日間PDA培地で培養後のコロニー直径は10mmであったと記載している。本研究の結果と成長の遅い点は共通しており、菌糸の様相や成長程度の差異は使用した培地の違いや、観察を行なった菌株の特性によるものと考えられた。

カメムシタケの生息地は主に森林内であり、落葉層あるいは腐食層に埋没した虫体から地上に子実体を伸長させる。子実体は地上部と地下部に分かれ、地下部は土壌中の多くのバクテリアや菌類と接している。従って、有効な表面殺菌方法が採用されなかった場合、コンタミネーション、もしくは目的の菌を殺してしまう結果を引き起こすことになるだろう。分離方法の詳細はわからないが、Sung *et al.*（1993）は、ひどいコンタミネーションにより組織分離は行えなかったと報告しており、広谷・古谷（1996）は70%エタノールを用いた1～3分間の表面殺菌で虫体内菌核からの分離を試みたが失敗している。本研究により、30% H_2O_2による表面殺菌はカメムシタケを死滅させることなく、コンタミネーションの原因となる菌やバクテリアの殺菌を行える有効な方法であることが示された。

接種片総数における柄部30秒殺菌処理区のカメムシタケ分離率は他の処理区と比較した場合に著しく少なく、分離できた子実体数における割合においても、その値は著しく少なかった。柄部５分殺菌処理区では、接種片総数におけるカメムシタケ分離率は虫体腹腔内菌体からの分離率と比較して低いが、１つの子実体から多くの接種片を得易いという利点により、分離できた子実体数における割合は、虫体腹腔内菌体を用いた場合とあまり変わりはなかった。したがって、分離に柄部を用いる場合には、できるだけ多くの数を切断して接種片にし、30% H_2O_2による表面殺菌に十分な時間（例えば５分）を与えるべきであろう。

虫体腹腔内菌体を用いた分離は、30秒殺菌処理区、５分殺菌処理区のいずれも柄部を用いた分離より分離率が高く、殺菌処理時間による分離数の差は見られなかった。したがって虫体腹腔内菌体からの分離における30% H_2O_2処理は30秒で十分殺菌が行えているものと思われる。

虫体腹腔内菌体からの分離は、成功率は高いが接種片が少量しか採れず、コンタミネーションした場合のリスクは大きい。逆に柄部では、成功率は低いが１つの子実体から多量に接種片を得ることができる。従って、分離成功率を高めるためには１つの子実体から柄部と虫体腹腔内菌体の両方から行うべきである。

コンタミネーションの糸状菌数と非糸状菌数を比較した場合、柄部を用いた分離では糸状菌が多く、虫体腹腔内菌体を用いた分離では非糸状菌が多かった。上記の結果などから、柄部表層の組織間隙には糸状菌などのコンタミネーションの原因となる生物が侵入していることが考えられ、虫体腹腔内はカメムシタケの優占した、特に他の糸状菌に対し排他的な環境が作られていることが考えられた。

今回採取した子実体52個のうち未熟もしくは不稔は、およそ13.5% に相当する７個と少なかったが、一般的には未熟や不稔が多い（清水，1994）とされている。また、採取した不稔や未熟でない子実体も、子嚢胞子を射出しているものはわずか３個であった。さらにカメムシタケの子嚢胞子はサナギタケや *C. brongniartii* などと比較すると、射出力が弱くあまり飛散しない。従って、成熟した子実体でも射出子嚢胞子からの分離は行いにくい。従って、子嚢胞子を必要としない組織分離は非常に有意義なものであると考えられた。

本方法により、カメムシタケ以外にもアワフキムシタケ（*C. tricentri* Yasuda）、ウスイロタンポタケ（*C. gracilioides* Kobayasi）、オオセミタケ（*C. heteropoda* Kobayasi）、クチキツトノミタケ（*C. stylophora* Berk. and Broome）、サビイロクビオレタケ（*C. ferruginosa* Kobayasi and Shimizu）、サナギタケ（*C. militaris*）、トビシマセミタケ（*C. ramosopulvinata* Kobayasi and Shimizu）、ツキヌキハチタケ様ヒルステラ属シンネマ（*C. elongatostromata*?=*Hirstella* sp.）、ハチタケ（*C. sphecocephala* (Klotzsch ex Berk.) Berk. and Curtis）、ハナヤスリタケ（*C. ophioglossoides* (Ehrh.) Link）、*C. brongniartii*、セミ生未同定種（*Cordyceps* sp.）の分離に本方法を用いて成功した。従って、本方法は多くの冬虫夏草菌の分離に応用可能と考えられる。

20～25℃が良好な成長温度であるのは菌類において一般的だが（岩出，1958）、カメムシタケの菌糸成長が可能な温度域は10～25℃であり、サナギタケは１～25℃（原田ら，1995）、*eauveria bassiana* および *Metarhizium anisopliae* が５～35℃（福原，1989）、*Paecilomyces farinosus*（Holmsk.: Fr.）A. H. S. Br. And G. Sm.（=*Isaria farinosa*（Holmsk.: Fr.））が５～40℃（Hallsworth and Magan, 1999）と、他の昆虫病原性糸状菌と比較すると狭い。本菌は北海道で採取したものであるが、冬季は氷点下になる日もある（http://forest.fsc.hokudai.ac.jp/%7Eexfor/Toef/Nature_j.html）。カメムシタケの菌糸は低温下で成長を行うことはできないようであるが、土壌中や寄主の体内で越冬を行うのであろう。５℃で培養した供試菌は、試験後に室温で放置した所、供試した全ての系統で菌糸の成長が見られたことから、低温下で菌は死滅することなく、活性が著しく下がるようであり、本菌の保存する温度に適している可能性が高いと考えられた。

pH 試験では、カメムシタケは中性～弱アルカリ性（pH7.0～9.0）で良好な成長を示した。但し、アルカリ性では菌叢は薄く、バイオマス量としては小さいと考えられた。一般的に菌類の菌糸成長は弱酸性～中性（pH4.0～7.0）で良好であるとされている（岩出，1958；古川，1992）が、他の昆虫病原性糸状菌はシネンシス冬虫夏草が pH3.5～8.0（宮下・米山，2002）、ハナサナギタケ（*Paeciromyces tenuipes* =*Isaria tenuipes*）が pH6.0～8.0（Yamanaka *et al.*, 1998；Xu *et al.*, 2003）、*B. bassiana* が pH8.0～11.0（Shimazu and Sato, 1996）、サナギタケが pH4.0～

9.0（小川ら，1983）等、菌糸成長に適したpHに差異が見られる。小川ら（1983）や宮下・米山（2002）は、サナギタケやシネンシス冬虫夏草が酸性でも良好な成長を行える原因について、生息環境の土壌が酸性であることを挙げている。サンプリングを行った苫小牧研究林の土壌pHは5.3～6.2（Shibata *et al.*, 1998）であるが、カメムシタケは中性～弱アルカリ性で菌糸成長が良好なため、本菌には当てはまらない。

3章　形態とDNAにおける寄主特性と地理変異の検討

3-1. 目的

カメムシタケは、カメムシ類にのみ寄生を行う強い寄主特異性（Hywel-Jones, 1995；深津, 1999）と、一般的に昆虫病原性糸状菌は化学農薬に比べ人畜・環境への悪影響が少ない（福原, 1989）という利点より、カメムシ防除の担体として期待されるが、分離培養が困難なことなどから研究例が極めて少なく、寄主との関わりについても不明な部分が多い。

バイオロジカルコントロールへ昆虫病原性の微生物を用いる場合、自然条件下における寄主範囲を知ることは重要である。過去の研究によるとカメムシタケは、種までは判明していない4科のカメムシ類および *Lelia decempunctata* Motschulsky（トホシカメムシ）、*Molipteryx fuliginosa* Uhler（オオヘリカメムシ）、*Palomena angulosa* Motschulsky（エゾアオカメムシ）に寄生を行うとされているのみであり（Moureau *et al.*, 1949；Samson and Evans, 1975；Sung *et al.*, 1993）、寄主範囲の知見は極めて乏しい。

冬虫夏草菌は寄主や産地が異なることで、形態やDNAの変異を生じることがある（Chen *et al.*, 2001；Wada *et al.*, 2003など）。害虫防除において、利用する菌の変異に関する知見は非常に重要である。形態やDNA配列が異なると、寄生する昆虫種にも違いが生じる事があるためである。その場合、さらに選択的な防除を行なうことができることもある。例えば、すでに防除に利用されている昆虫病原性糸状菌 *B. brongniartii* はカミキリムシ寄生タイプとコガネムシ寄生タイプがあり、各タイプはITS1-5.8S rDNA-ITS2領域の配列が異なり（Wada *et al.*, 2003）、カミキリムシ寄生タイプのDNA配列を持つものは、原則的にコガネムシには寄生を行なわず、カミキリムシの選択的防除に用いられている。

本章では、寄主となるカメムシ類の種の把握と、寄主種、産地および子実体の形態とITS1-5.8S rDNA-ITS2領域における変異との関連性を検討した。なお、試験は地理的変異を考慮する必要の無いよう同所的に多数のカメムシタケを採取して行った試験1と、日本国内数箇所より採取されたカメムシタケを用いて行った試験2によって構成される。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 供試試料

試験1：2002年7～9月に北海道大学北方生物圏フィールド科学センター森林圏ステーション苫小牧研究林で採取した52のカメムシタケ子実体の寄主の同定を行った。同定は日本原色カメムシ図鑑（友国ら, 1993）に従った。同定されたカメムシの種ごとに子実体をグループ分けし、子嚢殻が形成されている子実体を3系統ずつ供試菌として用いた。供試された子実体は60℃で3日間乾燥させ標本にしたものである。子実体が3系統得られなかった場合は、得られた子実体の最大数（1～2系統）を使用した。従って19子実体を供試した。

試験2：上述のカメムシタケに加え、2006年7～10月において北海道江別市で採取された5子実体、2003年8月および2006年8月に山形県で採取された5子実体、2006年7～8月に福島県で採取された7子実体、2006年6月に京都府で採取された13子実体、2004年、2005年および2006年9月に鹿児島県で採取された7子実体を供試し、寄主の同定を行なった。試験1同様、60℃で3日間乾燥を行なった標本を用いた。子嚢殻未形成子実体も多く含まれたため、特定の反復は設定しなかった。

3-2-2. 形態的特徴の観察

観察部位は分類に用いられる子嚢殻、子嚢、二次胞子であり、それぞれの長さと幅の計測を行った。

Hywel-Jonesの方法（1995）に従い、子実体頭部を0.05%のTriton X-100で元の状態に復元させ、凍結ミクロトームを用いて表薄切片を作成し、微分干渉顕微鏡（Olympus optical Co. Ltd.）を用いて観察した。サイズの計測は、デジタルカメラによる撮影の後、PC上で画像解析ソフトMOTIC IMAGES PLUS 2.0S（Motic china Co. Ltd.）を用いて行った。子嚢殻と子嚢は1系統につき20反復、二次胞子は30反復計測した。

試験1において3反復得られたグループに関して

は、グループ間で一元配置の分散分析を統計解析ソフト SPSS ver.10.0J for Windows (Spss Inc.) により行った。

3-2-3．DNA 抽出、PCR およびシーケンシング

DNA の抽出に際し、2章の方法で分離菌株の得られた系統に関しては分離菌株を用い、得られなかった系統に関しては子実体乾燥標本より直接行った。Sabouraud-glucose 寒天培地（pH8.0）を用いて20℃の暗所で培養した菌株は、およそ3 mm 四方を培地より切り出して、子実体乾燥標本はおよそ3 mm の長さに柄部を切り取り抽出に用いた。抽出には DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen）を使用して行った。抽出方法は以下のようである。

1.5ml のマイクロチューブにサンプルおよび400μl の Buffer AP1 を入れ、ポリプロピレン製ホモジナイザーペッスルを取り付けたハンドドリルにより液中で破砕した。破砕後、RNase A を10μl 添加し65℃で10分、数回混和を行いながらインキュベートした。130μl の Buffer AP2 を添加し、5分間氷上でインキュベートした後、シュレッダーカラムを用いて20,000×g で2分間遠心操作し透過液を分取した。分取された液体に1.5倍量の Buffer AP3/E を添加し、急いで混和を行なった後に DNeasy スピンカラムにて6,000×g で1分間遠心操作を行いメンブランに DNA を付着させた。500μl の Buffer AW で6,000×g を1分間と20,000×g を2分間遠心操作しメンブランを洗浄および乾燥させた。100μl の Buffer AE をメンブレン上に添加し5分間インキュベート後、6,000×g で1分間遠心操作を行い、DNA を溶出させた。得られた DNA 溶液は PCR のテンプレートとして用いた。

PCR はプライマーセット ITS1f（Gardes and Bruns, 1993）と ITS4（White *et al*., 1990）を用い、G-*Taq* DNA Polymerase for general PCR (Cosmo genetech Co., Ltd.）もしくは Fast cycling PCR kit（Qiagen）と GeneAmp PCR System 2720（Applied biosystems）により行った。サーマルサイクルは、G-Taq の際は94℃で30秒変性させ、94℃で1分、50℃で1分、72℃で2分を25サイクル行なった後、72℃で10分伸長反応を行なった。Fast cycling PCR kit の際は95℃で5分変性させ、94℃で5秒、50℃で5秒、72℃で21秒を30サイクル行った後、72℃で1分伸長反応を行った。

PCR 産物は2％ AMRESCO Agarose SFR agarose gel（Solon ind.）および0.5× TBE バッファ（44.5 mM Tris, 44.5 mM ホウ酸，1 mM EDTA·2Na·2H_2O, pH 8.0）を用い100V で約55分間電気泳動を行った。その後、1 μgl のエチジウムブロマイド溶液で20分間染色を行い、トランスイルミネーターで UV を照射してバンドを確認した。マーカーには 100 bp DNA Ladder (Takara bio Inc.) を使用した。複数本のバンドが検出された際には、ゲルからピペットを用いて予想されたサイズのバンドを切り出し、一晩-20℃で冷凍した後にドリップ1 μl をテンプレートとして再度上記と同様の条件で PCR を行い、電気泳動に供した。これはバンドが1本になるまで行った。

1本のバンドが得られたことを確認の後、Labo-Pass PCR pulification Kit（Cosmo genetech Co., Ltd.）を用いて精製を行った。具体的手順は以下のようである。PCR 反応液に5倍量の Buffer PB を混合し、付属のスピンカラムで1分間10,000×g で遠心操作、フロースルー液を捨て700μl の Buffer NW を添加し再び10,000×g で遠心操作を行った。フロースルー液を捨てた後、再度 Buffer NW を300μl 添加し1分間14,000×g で遠心操作を行なった。フロースルー液を捨て、50μl の Water（MP Biomedicals Inc.）を添加し1分間、10,000×g で遠心操作を行った。精製後、電気泳動にてバンド確認を行い、明瞭な1本のバンドが得られたサンプルをシーケンシングテンプレートとして用いた。

得られたテンプレートは株式会社日立ハイテクサイエンスシステムズへシーケンス解析を依頼した。使用された機材は ABI Auto Sequencer 3730 (Applied biosystems) であり、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied biosystems) およびプライマー ITS1f と ITS4を用いて ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域のシーケンスは決定された。

3-2-4．分子系統解析

得られた ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域配列は CLUSTAL W (Thompson *et al*., 1994) を用いてアライメントを調節した。遺伝的距離の計算には Kimura 2-parameter model（Kimura, 1980）を用いて遺伝子解析ソフト MEGA ver. 3.1（Kumar *et al*., 2004）により行った。また試験2では、得られた遺伝的距離から MEGA ver. 3.1 を用いて近隣結合法（Saitou and Nei, 1987）により系統樹を作成した。系統樹上に形成されたクラスターの精度を計るため、Bootstrap 解析を

1000反復行なった。

3-3．結果

試験１において、同所的に採取された北海道苫小牧産カメムシタケの52子実体の寄主となったカメムシ類は３科５属９種に分類された。セアカツノカメムシ（*Acanthosoma denticaudum* Jakovlev）、ヒメハサミツノカメムシ（*Acanthosoma forficula* Jakovlev）、ツノアカツノカメムシ（*Acanthosoma haemorrhoidale angulatum* Jakovlev）、ハサミツノカメムシ（*Acanthosoma labiduroides* Jakovlev）、ヒメツノカメムシ（*Elasmucha putoni* Scott）、トホシカメムシ（*Lelia decempunctata* Motschulsky）、ツノアオカメムシ（*Pentatoma japonica* Distant）、アシアカカメムシ（*Pentatoma rufipes* Linnaeus）、ヘラクヌギカメムシ（*Urostylis annulicornis* Scott）である。ツノアオカメムシ、ツノアカツノカメムシ、ヒメツノカメムシ、ヘラクヌギカメムシが寄主のカメムシタケはそれぞれ１子実体しか採取されなかった。従って、形態比較および塩基配列の比較には19系統を供試した。

形態比較では、供試した19系統の子嚢殻、子嚢、二次胞子の長さおよび幅を計測したが、サイズの大きな違いは見られなかった。３系統の反復が供試できたカメムシ種の子実体部位に関しては種間で統計処理を行ったが、有意な差は見られなかった（一元配置の分散分析，$p>0.05$）。したがって、同所的に採取された苫小牧産のカメムシタケでは、寄主の種の違いに関連した形態的変異は確認されなかった。

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域の塩基配列は、供試した全てのサンプルが非常に高い相同性を示した。本領域では最大６塩基の変異が確認されたが、寄主の種との関連性は認められなかった。サンプル間における遺伝的距離は0.007以下となった。コード領域である5.8S rDNA 領域では、全てのサンプルが完全一致の相同性を示した。代表して２サンプルの配列を DNA Databank of Japan（DDBJ）へ登録した。登録番号は AB176462および AB176463である。

試験２では新たな寄主として、エサキモンキツノカメムシ（*Sastragala esakii* Hasegawa）、オオツマキヘリカメムシ（*Hygia lativentris* Motschulsky）、クサギカメムシ（*Holymorpha holys* Stal）、チャバネアオカメムシ（*Plautia crossota stali* Scott）、ツマキヘリカメムシ（*Hygia opaca* Uhler）、モンキツノカメムシ（*Sastragala scutellata* Scott）、ハラビロヘリカメムシ属のカメムシ（*Homoeocerus* sp.）が同定された。苫小牧産と併せると４科10属15種となった。

形態比較には、膨大した頭部を持つ子嚢殻を形成していた子実体より、産地と寄主が異なるものから１つ以上供試した。計測した子嚢殻、子嚢、二次胞子の長さおよび幅は、供試子実体間において大きな差は見られなかった。若干未熟な子実体では、子嚢の形成が見られない、形成されていても比較的短い、二次胞子が形成されていないなどにより観察を行うことができない部位が生じた。逆に過熟なし実体でも、子嚢が破壊されていたり、内部の胞子が全て射出されているなど、観察できない部位が存在した。

今回形態比較に用いた部位の特徴として、子嚢殻は斜埋生であり、子嚢には半球形のキャップが形成され、二次胞子は中途が若干樽状に膨らんでいることが挙げられる。観察できた全ての子実体に、これらの特徴は共通していた。

DNA 解析では、京都産の全てのサンプルと鹿児島産の１サンプル（06Yak2）のみ、他のサンプルと大幅に配列が異なった。京都産サンプルと06Yak2は寄主が全てヘリカメムシ科（Coreidae）に属するカメムシであり、他サンプルの寄主は全て他科に属するカメムシであった。以下、本研究において供試されたヘリカメムシ科カメムシに寄生を行なっていたサンプルをタイプ１、その他の科のカメムシに寄生を行なっていたタイプをタイプ２と呼ぶ。タイプ１とタイプ２との ITS1-5.8SrDNA-ITS2領域の相同性は、ギャップを除いても85%以下であった。また、遺伝的距離に関しても、0.090以上と大幅に遠いものとなり、タイプ１とタイプ２は異なるクラスターを形成した。

タイプ１は、タイプ内においてほとんど変異が存在せず、ギャップを除いた相同性は98%以上、遺伝的距離は0.002以下となり、完全な１つのクラスターを形成した。GenBank に登録されている海外で採取された配列（AJ786583：タイ産；AJ536558：中国産；AJ536560：中国産；AJ309367：中国産）とは、クラスターは分かれたものの、タイプ２よりも遺伝的にかなり近い位置関係となり、遺伝的距離は0.022以下であった。

タイプ２は、タイプ内における遺伝的距離は0.034以下であったが、変異が見られた。

3-4．考察

過去の記載においてカメムシタケの寄主は、

Moureau *et al.*（1949）がサシガメ科（Reduviidae）、カメムシ科（Pentatomidae）、マルカメムシ科（Plataspidae）*Coptosoma* 属のカメムシを、Samson and Evans（1975）がホシカメムシ科（Pyrrhocoridae）のカメムシを、Sung *et al.*（1993）がカメムシ科 *Lelia decempunctata*（トホシカメムシ）、ヘリカメムシ科 *Molipteryx fuliginosa*（オオヘリカメムシ）、カメムシ科 *Palomena angulosa*（エゾアオカメムシ）を挙げている。本研究により同定されたカメムシはカメムシ科、クヌギカメムシ科（Urostylidae）、ツノカメムシ科（Acanthosomatidae）、ヘリカメムシ科の４科に分類されたが、Sung *et al.*（1993）の報告とヘリカメムシ科とカメムシ科のカメムシが、種が判明しているものに関してはトホシカメムシが共通した。Moureau *et al.*（1949）および Sameson and Evans（1975）はアフリカにおいて採取を行なっているが、Sung *et al.*（1993）は日本と比較的距離の近い韓国で採取を行なっているため、寄主が本研究のものに近くなったのではないかと考えられた。

同所的に採取を行なった試験１においては、形態および DNA の ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域に、寄主の種に起因したと考えられる変異は見られなかった。同領域における Kimura 2-parameter model の遺伝的距離は、同種内であれば0.000から0.050の範囲内になるとされている（Chen *et al.*, 2001, 2003）。試験１で用いた菌株間の遺伝的距離は0.007以下であったこともあり、同所的に採取された本研究に用いた苫小牧産のカメムシタケは非常に変異の小さい集団であると考えられた。

試験２における形態比較は、多少のばらつきが生じたが、これは寄主特性によるものではなく、子実体の成熟度合に応じていると考えられた。

形態的にはタイプ１とタイプ２において大きく変わる点は観察されなかったが、DNA 配列の比較では２つのタイプに分かれ、それぞれのタイプで寄主がはっきりと分かれた。タイプ１の寄主であるヘリカメムシ科カメムシ（Coreidae）は、果実類に害を加えることもあるが、主に潅木や草本植物の茎より吸汁を行なう草地性カメムシであり、タイプ２の寄主カメムシは樹上で生活を行ない、果実や球果を吸汁することが多く、ハビタットや吸汁対象が異なる　　（山本私信）。

タイプ２内にみられた DNA 変異は、0.050以下の遺伝的距離であり、またおおよそ１つのクラスターであったため、産地間の距離に伴った変異、もしくは系統差と考えられた。ただし、寄主がクサギカメムシとチャバネアオカメムシだけで形成されたタイプ２内のサブクレードに関しては、山形産、福島産、鹿児島産であり、日本の北方産と南方産の両方を含んでいた。このことから、これら２寄主に寄生していたカメムシタケには、わずかではあるが DNA に特異的な傾向を持っている可能性が考えられた。

GenBank に登録されている海外産のカメムシタケはダイレクトサブミッションであるため、配列と産地情報しか得られないものの、これらは本研究で供試したタイプ１のカメムシタケと遺伝的距離が0.050以下で、タイプ２とは0.050以上であったことや前述の結果から、タイプ１はタイプ２よりも、供試された GenBank 登録されている系統と遺伝的にはるかに近いことが示され、同一のタイプである可能性も示唆された。

タイプ１のカメムシタケは、ウドを加害するオオツマキヘリカメムシやイチジクを加害するツマキヘリカメムシ、カキ、ダイズ、ナシ、リンゴ、柑橘類などを加害する *Homoeocerus* sp. に特異的に寄生を行なうと考えられるため、これらヘリカメムシ科カメムシの選択的防除に利用できると思われた。また、タイプ２のカメムシタケは、アンズ、イチゴ、イチジク、ウメ、オウトウ、カキ、スモモ、ナシ、ビワ、ブドウ、モモ、ヤマモモ、リンゴ、柑橘類といった果樹やイネ、スイートコーン、ダイズ、トウガラシ、トマト、ナス、ピーマンといった野菜類、スギやヒノキの球果などを加害するセアカツノカメムシ、ヒメツノカメムシ、チャバネアオカメムシ、トホシカメムシ、ツノアオカメムシ、クサギカメムシなどのカメムシ類に特異的に寄生を行なうと思われ、これらの選択的防除に利用できると考えられた。特にクサギカメムシとチャバネアオカメムシは農林業において大きな被害を与える種であり（堤，2003）、これらに対してもカメムシタケが寄生を行なうことは防除の上で重要な知見と考えられた。

４章．寄主の雌雄およびサイズと子実体形状の関係

4-1．目的

冬虫夏草菌は利用に際し、分離菌糸体が用いられることもあるが、子実体が必要とされる場合も多い。その理由が幾つか挙げられる。子嚢胞子は寄主に感染をする際の重要なステージとされており（Sato and Shimazu, 2002）、防除担体としての使用が考えられる

が、成熟した子実体頭部の子嚢殻中に形成されるため、不稔性の子実体や未熟子実体から得ることはできない。また、天然と同様の形態である方が漢方薬品として見栄えが良いことや、産生する物質の質や量が子実体と培養菌糸とで違いがある（Hsu *et al.*, 2002；Gong *et al.*, 2004；Guo *et al.*, 2006など）ことなどが挙げられる。

現在までに行われてきている冬虫夏草菌の子実体栽培は、寄主昆虫を用いないで行なわれてきたものもあるが（Kobayasi, 1941；Basith and Madelin, 1968；矢萩ら，2004など）、成功率や再現性などの観点から、寄主昆虫を用いて行われてきた例が多い（Shimazu *et al.*, 1988；原田ら，1995；Sato and Shimazu, 2002；Chen and Ichida, 2002など）。したがって、カメムシタケにおいても子実体栽培が寄主昆虫であるカメムシを用いて行われる可能性は高い。漢方薬としての冬虫夏草菌は、太い子実体が高価で取引されていることから（原・山岸，2007）、より大型の子実体が作出されることが望ましい。

子実体栽培におけるカメムシの利用でカメムシの雌雄を判別する手間や吸汁害の防除を考えると、カメムシの雌雄に対してカメムシタケが同等の感染力を持っていることが期待され、菌に感染した昆虫の性比の知見が重要であるが、とても少ない（Maniania and Odulaja, 1998）。

本章では、野外採取したカメムシタケの寄主の体長と性別、子実体の全長、頭部長、頭部径、柄部径の関係を検討した。

4-2．材料および方法

4-2-1．供試材料

サンプルとして、2002年および2006年に北海道大学北方生物圏フィールド科学センター森林圏ステーション苫小牧研究林で採取された54のカメムシタケ子実体と、2006年に野幌森林公園で採取された10子実体、2003年および2006年に山形県で採取された６子実体、2005年および2006年に福島県で採取された８子実体、2006年に京都府で採取された22子実体、2004年、2005年および2006年９月に鹿児島県で採取された11子実体を用いた。

4-2-2．寄主の同定および計測

カメムシの種および雌雄は日本原色カメムシ図鑑（友国ら，1993）に従って同定、判別を行なった。

子実体および寄主カメムシの以下の部分をデジタルノギス（Mitutoyo Co.）により計測した。子実体全長は子実体頭部先端から寄主の付け根までを、子実体頭部径と子実体柄部径はもっとも太いと思われる部分を計測した。子実体頭部長は頭部先端から頭部と柄部の境界までを計測した。未熟もしくは不稔により、膨大した頭部が確認されなかった子実体は、子実体全長および子実体柄部径の計測のみ行なった。

寄主体長は寄主頭部上端から腹部の下端までを、交尾器を除いて計測した。

4-2-3．統計解析

寄主カメムシにおける雌雄の体長の差の検定をｔ検定により、雌雄の感染数の差の適合度検定を、χ^2検定により行なった。

寄主カメムシの全長とカメムシタケ子実体各部位のサイズより二変量の相関分析を行なった。全ての統計処理は統計処理ソフト SPSS 10.0J for Windows（Spss Inc.）を使用して行なった。

4-3．結果

供試したカメムシタケ111子実体中、オスのカメムシが寄主となっていたのは50、メスが61であった。雌雄の感染数に有意な差は検出されなかった（$p>0.05$）。雌雄の体長にも有意差は検出されなかった（$p>0.05$）。

カメムシの体長と子実体頭部長との間には高い相関が見られた。また、カメムシ体長と子実体頭部径、子実体柄部径においてもそれぞれ高い相関が見られた。寄主の体長が長くなると、上記の部位は長くなる傾向を示した。すなわち、大型の寄主であると、柄部が太く、頭部が長くて太い子実体になることを示した。また、子実体頭部径と子実体頭部長の間にも非常に高い相関があり、どちらか一方が大きくなるのではなく、子実体頭部径が大きくなるときは子実体頭部長も比例して大きくなると言えた。子実体全長と寄主体長との間に相関は見られなかった（$p=0.352$）。

上記の傾向は雌雄別に解析を行った場合でもほぼ同様であった。子実体全長と寄主体長の間にはやはり相関は見られなかった（メス：$p=0.894$；オス：$p=0.173$）。

２章で判明したカメムシタケのタイプ１とタイプ２それぞれで、寄主全長と子実体各サイズとの相関を検討したところ、上記と同様に寄主体長と子実体全長、

子実体頭部長、頭部径、柄部径の間には高い相関が得られた 。子実体全長との間には有意な相関は得られなかった（Type1: p=0.476; Type2: p=0.592）。

4-4．考察

過去、昆虫病原性糸状菌を用いた実験で雌雄別の感染能力の違いが検討されている。Kaaya（1989）は *Beauveria bassiana* と *Metarhizium anisopliae* を *Glossina morsitans morsitans* Westwood（ツェツェバエの１種）に感染させた場合、オスの感染率の方が高かったとしている。また、 Mullens（1985）は *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresenius を *Musca domestica* Linne.（イエバエ）に感染させ、やはりオスの感染率が高かったとしている。一方で Maniania and Odulaja（1998）は *M. anisopliae* を *Glossina morsitans morsitans* と *Glossina morsitans centralis* Machado（両種共にツェツェバエの仲間）に感染させメスの方が感染しやすかったと報告している。前者らはその理由として、オスのほうがメスに比べ小型であるために感染しやすかったのではないかと推察している。 Nishida（1994）の報告を見ると、野外においてカメムシタケは、オオツマキヘリカメムシについては、メスの方が多かったようである。本研究でも、感染数はメスのほうが多くなった。しかし有意差は検出されなかった。寄主体長において、若干メスのほうが大きくなったが、こちらも有意差は検出されなかった。ツチカメムシ科（Cydnidae）のベニツチカメムシ（*Parastrachia japonensis* Scott）では自然界における性比が１：１であったと報告されている（Tojo *et al.*, 2005）。本研究で判明したカメムシ種に関しての自然界における性比は分かっていないが、ベニツチカメムシのように１：１と仮定すると、カメムシタケは小型の寄主に対して特に感染力が高いということはなく、雌雄同等に感染を行なうか、若干メスに対しての感染性が高いと考えられた。従ってカメムシタケをバイオロジカルコントロールに用いた場合、カメムシに対し雌雄ほぼ同等に効果を与えることが可能である。また、カメムシタケ子実体の人工栽培にカメムシを用いる場合、雌雄どちらを用いても子実体収量に差異はないといえる。

寄主体長と子実体全長との間には相関は見られなかったが、おそらく子実体の全長は土壌中の寄主から地上までの深さの違いや、その伸長行程に存在した石などの障害物を避けたりすることで長さが変わるのではないかと推察される。

寄主体長と子実体頭部や柄部径との高い相関は、寄主の養分量が子実体柄部の太さや頭部の大きさに反映することを示唆した。従って大型の寄主を用いて人工栽培を行なうことで、より柄部の太い、大型頭部の子実体を作出しやすいと思われる。

５章　特異的 PCR プライマーの開発

5-1．目的

カメムシタケの寄主となるカメムシ類の生態は明らかにされていない部分が多いが、カメムシタケも、また他の冬虫夏草菌も同様に、寄主に寄生していない時は、どこでどのように生活を行なっているのか、どこで寄主と遭遇し子実体を形成するのか全く判明していない（内山，1999；佐藤，1999）。

菌類の生活史などの生態的情報の解明には、生息場所などから検出を行なう方法が必要である。主に選択培地を用いて分離培養により行う方法と、分子生物学的手法を用いて行なう方法の二つがあるが、前者は対象とする菌の選択培地の開発や、培地上に形成されるコロニーの詳細な特徴が明らかにされていることが必要であり、また、培養時間もかかる（Atkins *et al.*, 2005）。カメムシタケの場合、選択培地もなく、また培地上で分生子世代の形成が今まで確認されていないため、形態的同定は難しく、分離菌株の成長も非常に遅いことから（Hywel-Jones, 1995；Sasaki *et al.*, 2004, 2005）、前者の方法は困難だと考えられる。しかしながら後者の方法の一つである、特異的 PCR プライマーを用いて検出を行なえば、 PCR を行なえる環境であれば適用できるので、カメムシタケの生活史の解明は比較的容易になると考えられる。

カメムシタケをカメムシ防除の担体として利用した際、特異的 PCR プライマーを用いて検出を行なえば、より効果的に散布を行う方法や場所を見つけやすくなるほか、散布後の消長や拡散範囲、感染の有無を知ることにも利用できる。

特異的プライマーは目的とする菌種のみを選択的に PCR で増幅することが可能であり、生態解明へのアプローチ以外にも、動物や人、植物などにおける病原菌の感染診断や樹木の腐朽検出などに用いられてきた（Ersek, *et al.*, 1994；Fell, 1995；Wu *et al.*, 2002；Hantula and Vainio, 2003；河井 , 2003；Nagao et al., 2005など）。特異的プライマーが設計されてきた領域は様々であるが、菌類では ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領

域内に比較的多く設計が行なわれてきた（Beck and Ligon, 1995; Goodwin *et al*., 1995; Amicucci *et al*., 1998; Kikuchi *et al*., 2000など）。本領域は、種間において変異が生じやすい領域であり、種によって特定の配列や長さになる場合が多いので、菌類では種の推定や分類を行う際に頻繁に用いられ（Wada *et al*., 2003; 杉田・西川 , 2004; Luangsa-Ard *et al*., 2005; Inglis and Tigano, 2006など）、GenBank などにおける登録配列も、他の領域に比べると充実しているためと思われる。

本章ではカメムシタケの生活史の解明や寄主特性を判別するのに利用できる、本菌の部分的なITS1-5.8S rDNA-ITS2領域のみを特異的に増幅するPCR プライマーの開発を行なった。

5-2．材料および方法

5-2-1．供試材料

サンプルには3章で用いられた *C. nutans* のタイプ1およびタイプ2と北海道内で採取された冬虫夏草菌および昆虫病原性糸状菌を供試した。具体的にはアワフキムシタケ（*C. tricentri*）、ウスイロタンポタケ（*C. gracilioides*）、オオセミタケ（*C. heteropoda*）、クチキツトノミタケ（*C. stylophora*）、サビイロクビオレタケ（*C. ferruginosa*）、サナギタケ（*C. militaris*）、トビシマセミタケ（*C. ramosopulvinata*）、ツキヌキハチタケ様ヒルステラ属シンネマ（*C. elongatostromata*? =*Hirsutella* sp.）、ハチタケ（*C. sphecocephara*）、ハナヤスリタケ（*C. ophioglossoides*）、マルミノコガネムシタケ（*C. konnoana*）、*C. brongniartii*、セミ生未同定種 *Cordyceps* sp.、ツクツクボウシタケ（*I. sinclairii* (Berk.) Lloyd.）、ハナサナギタケ（*I. tenuipes*）である。さらに、カメムシタケ分離の際に子実体から分離された未同定の糸状菌3種も供試した。

5-2-2．DNA 抽出・PCR およびシーケンシング

上述の菌種の分離菌株もしくは乾燥標本より total DNA の抽出を行なった。方法は3章に記述したものと同様である。PCR、電気泳動、エチジウムブロマイド染色、精製およびシーケンシングも3章と同様である。

5-2-3．プライマー設計

供試サンプルより得られたITS1-5.8S-ITS2領域の配列はCLUSTAL W（Thompson *et al*., 1994）を用いてアライメントを調整した後、Sommer and Tautz の方法（1989）に従ってプライマーの設計を行なった。即ち、設計したいプライマーが20～24塩基であること、プライマーの3'末端の3塩基の配列が増幅する配列と完全に一致することである。さらにカメムシタケを特異的に増幅させるため、カメムシタケにのみ確認された配列部位を選択することと、プライマー設計において一般的な約束事である、プライマー内やプライマー同士が極力相補的にならないことや極力3'末端がGまたはC、5'末端がAまたはTにすること、塩基数に適したTm値になるよう各ヌクレオチドのバランスをとることなどの条件の下に行なった。

プライミング部位は、得られたITS1-5.8S-ITS2領域内に2箇所設定し、上流域をフォワードプライマー配列、下流域相補鎖配列をリバースプライマー配列とした。3章で判明した各タイプを判別できるよう、フォワードプライマーはヘリカメムシ科に寄生を行なうタイプ1のカメムシタケにはプライミングしないように設計し、リバースプライマーはタイプ1、タイプ2の両方にプライミングできるよう設計した。プライミングサイトはITS1領域の5'末端から、フォワードプライマーが約70bp付近のITS1領域内、リバースプライマーが約400bp付近のITS2領域内であり、予想される増幅フラグメントサイズはおよそ320bpである。

設計された各プライマー配列はDDBJのBLAST検索に供試し、他の生物種との相同性を比較した。

5-2-4．特異的 PCR

設計された配列を基に合成されたプライマーを用いてカメムシタケの特異的増幅を確認するPCRを行なった。供試DNAとして本章で抽出し供試したカメムシタケ以外の昆虫病原性菌全てとカメムシタケタイプ1およびタイプ2から数系統を用いた。

テンプレートは数種のDNAを1サンプルに混合せず、1種1サンプルとして供試した。サーマルサイクルは、94℃5分のデナチュレーションの後、94℃1分、最適アニーリング温度1分、72℃3分を30サイクル行い、最後に72℃のエロンゲーションを7分行なった。その他の条件は3章に記述したものと同様である。電気泳動およびエチジウムブロマイド染色に関しても同様である。

5-3. 結果

条件に基づいて設計した結果、次ののプライマー配列が得られた（CnF: 5'-TCGGCAGGTATTTCTTCGGAGTAC-3'; CnR: 5'-ATTGCTTGCTTCTTATTTTAG-3'）。これらプライマーをそれぞれBLAST検索に供試したところ、真菌類において90%以上の相同性を有する配列はカメムシタケを除いて存在しなかった。

設計されたフォワードプライマーCnFのTm値は60℃であり、リバースプライマーCnRのTm値は49℃であった。慣例に従い、PCRサイクルにおけるアニーリングの温度を、低い方のTm値である49℃で行なったところ、約320bpのカメムシタケタイプ２のDNAの増幅が確認された。しかしながら、カメムシタケ以外の数種においても同様のサイズでの増幅産物が確認されたため、アニーリング温度を50℃、55℃、60℃の各温度に変更してPCRを行なったところ、60℃のときにカメムシタケタイプ２のみが増幅され、タイプ１を含むその他の種では増幅が見られないようになった。

5-4. 考察

BLAST検索において、本研究で設計されたプライマー配列と比較的相同性が高かった生物種として、フォワードプライマーCnFではバクテリアの*Pseudomonas syringae* Reddy and Godkin 1923や（プライマー配列24塩基中17塩基相同）、*Medicago truncatula* Gaertn.（タルウマゴヤシ）のゲノムDNA（24塩基中17塩基相同）が、リバースプライマーCnRでは*Homo sapiens* L.（ヒト）や（22塩基中20塩基の相同）、*Oryza sativa* L.（イネ）のゲノムDNA（22塩基中19塩基相同）が検索結果の筆頭として示された。プライマーCnF、CnRの両方に共通して高く相同するカメムシタケ以外の生物種は存在しなかったので、今回設計されたプライマーセットで増幅を行なえば、これら相同性の高かった生物種のDNAがカメムシタケ特異的プライマーにより増幅される可能性は極めて低いと考えられた。従って、カメムシタケ以外の生物由来のDNAが混在してくるようなサンプル、例えば発生環境の土壌や植物などからDNAを抽出してPCRを行なう際でも、カメムシタケのみを選択的に増幅することができるだろう。

本研究で設計されたプライマーセットは、アニーリング温度が60℃のときにカメムシタケタイプ２のみを増幅することができ、それより低い55℃などの温度では他の冬虫夏草菌DNAの非特異的増幅が認められた。一般的にアニーリングの温度が低いと、非特異的増幅が行なわれる傾向にあるが、本プライマーセットにおいても同様のことが起きたと考えられた。逆に温度が高いと、アニーリングが起きにくくなるが、本プライマーセットはプライマー配列がカメムシタケの配列と完全一致するように設計されたため、温度が高くても容易にアニーリングされたと考えられた。

今回作成されたプライマーセットはカメムシタケタイプ２のDNAを選択的に増幅し、カメムシタケタイプ１とPCR法により区別することが可能であるが、フォワードプライマーCnFをITS1f（Gardes and Bruns, 1993）などの糸状菌特異的プライマーに変えてPCRを行なうことで、カメムシタケタイプ１の増幅も可能であると考えられる。

プライマー配列CnFおよびCnRは、カメムシタケタイプ２との相同性が極めて高いので、他のプライマーセットを用いて本領域を増幅した場合のサザンブロッティング法によるカメムシタケ検出を行う際に、プローブとして用いることもできるだろう。

６章　総括

冬虫夏草菌は害虫防除への利用や薬理的利用の可能性を高く秘めた菌類である。カメムシタケはカメムシ類に対して選択的に寄生を行なう冬虫夏草菌の一種で、カメムシ防除や医薬品材料としての利用が期待されるが、いままでほとんど研究が行なわれてこなかった。本研究ではカメムシタケの利用に向け、菌株分離法の確立と寄主と関連した本菌の性状を明らかにすることを目的としている。

本研究は、子嚢胞子が得られない子実体からでも菌株分離行えることを目的とした分離方法の改良と、より良い菌糸成長を目的とした検討（２章）、寄主範囲や寄主特性、地理変異の解明を目的とした検討（３章）、寄主昆虫のサイズや性が子実体に与える影響を明らかにすることを目的とした検討（４章）、野外におけるカメムシタケの生活史やバイオロジカルコントロール担体として利用した際の拡散範囲や消長を解明させるための検出法に使用できる種特異的PCRプライマーの作成を目的とした検討（５章）の４項目より成り立っている。

２章では、過酸化水素水を用いた表面殺菌法を行い、殺菌時間の違いによる分離率の差を柄部と虫体腹

腔内菌体の部位ごとに検討した。また、分離菌株の培養に最適な温度と pH についても検討を行なった。

その結果、本方法による組織分離は可能であり、柄部の30秒殺菌、５分殺菌、虫体腹腔内処理区（30秒または５分）の間には分離率に有意差が生じ、虫体腹腔内から行なった分離の成功率がもっとも高くなった。また、本方法はカメムシタケ以外の冬虫夏草菌12種の分離が可能であったことから、多くの冬虫夏草菌の分離に用いることができると考えられた。

カメムシタケは培養温度10℃から25℃、培地 pH6.0から pH11.0の間で菌糸は成長し、特に20℃から25℃、 pH7.0から pH9.0において良好な成長を示した。５℃で培養していたものは菌糸が成長しなかったが、培養後に常温で放置したところ、再び菌糸成長が見られたことから、５℃は本菌の保存温度に適していると考えられた。

３章では寄主種および産地と子実体の形態および DNA における変異との関連性を検討した。試験は地理的変異を考慮する必要の無いよう同所的に苫小牧研究林でカメムシタケを採取した試験１と、日本国内数箇所より採取されたカメムシタケを用いて行った試験２によって構成される。

試験１において、子嚢殻、子嚢、二次胞子のサイズに、寄主種のグループ間で有意差は確認されなかった。 DNA 配列の比較においても、非常に高い相同性を示し、サンプル間の遺伝的距離は0.007以下となった。従って苫小牧産カメムシタケは非常に変異の小さい集団であり、少なくとも３科５属９種のカメムシ類に寄生することが判明した。

試験２において、１科５属６種の寄主が苫小牧産に加え新たに判明した。形態的比較では、子嚢殻、子嚢、二次胞子のサイズに違いはあまり無く、寄主種や地理に関連した特異的な傾向は確認されなかった。DNA 配列の比較では２つのタイプにわかれ、遺伝的距離が0.090以上と非常に大きくなった。近隣結合法を用いて系統樹を作成したところ、それぞれのタイプは異なるクレードを形成した。各タイプの寄主は分かれ、タイプ１はヘリカメムシ科カメムシ類に、タイプ２は他科のカメムシ類に選択的に寄生を行なっていると考えられた。各タイプ内において、タイプ１は極めて変異の小さい集団であったのに対し、タイプ２では遺伝的距離は小さかったものの変異が見られた。

４章では、野外採取したカメムシタケの寄主体長と雌雄、子実体の全長、頭部長、頭部径、柄部径の関係を検討した。

供試したカメムシタケ子実体111個中、オスのカメムシが寄主となっていたのは50、メスが61で有意な差は検出されなかった（$p>0.05$）。また、寄主の雌雄の体長にも有意差は確認されなかった（$p>0.05$）。

カメムシの体長と子実体頭部長との間には高い相関が見られ、カメムシ体長と子実体頭部径、子実体柄部径においても、それぞれ高い相関が見られた。寄主の体長が長くなると、上記の部位も長くなる傾向を示した。すなわち、大型の寄主であると、柄部が太く、頭部が長くて太い子実体になることを意味した。子実体全長と寄主体長との間に相関は見られなかった（$p=0.352$）。上記の傾向は雌雄別に解析を行った場合でもほぼ同様であった。３章で判明したカメムシタケのタイプ１とタイプ２それぞれで、寄主体長と子実体各サイズとの相関を検討したが、上記と同様に寄主の体長が長くなると子実体頭部長、子実体頭部径および子実体柄部径が大きくなる傾向になった。

カメムシタケをバイオロジカルコントロールに用いた場合、カメムシの雌雄両方に同様の効果を与えることが可能で、子実体栽培にカメムシを用いる際も、雌雄どちらを用いても子実体収量に差異はないと言える。また、大型のカメムシを用いることで、頭部の大きい子実体を作出することができる。

５章では、カメムシタケの部分的な ITS1-5.8S rDNA-ITS2領域のみを特異的に増幅する PCR プライマーの開発を行なった。

設計されたプライマー配列を用いて DDBJ の BLAST 検索を行なったところ、真菌類で90%以上の相同性を有する配列はカメムシタケを除いて存在しなかった。低い方の Tm 値に合わせたアニーリング温度ではカメムシタケタイプ２以外の DNA の非特異的増幅が検出されたので、適温を検討したところ、60℃でカメムシタケタイプ２のみの増幅が認められた。本プライマーセットはカメムシタケタイプ１とタイプ２を PCR 法で区別することが可能であり、またリバースプライマーはタイプ１のカメムシタケにもプライミングできるよう設計を行ったので、フォワードプライマーに真菌特異的プライマーを用いて PCR を行なうことで、両タイプの特異的増幅も可能であると考えられる。

本プライマーを用いることで、様々な生物由来の DNA が混在しているような土壌や植物といったサンプルから DNA を抽出し PCR を行なう場合でも、カ

メムシタケを選択的に増幅することが可能と考えられ、子実体の発生が見られない時分でもその存在を検出できるため、生活史の解明や防除資材として散布した際の拡散範囲や消長などを知るのにも利用できるだろう。

本研究により、過酸化水素水を用いた表面殺菌法はカメムシタケを始めとする多くの冬虫夏草菌の分離に用いることができることが示され、特に虫体内菌体と子実体柄部両方から分離を行うことで分離率が上がることが判明した。カメムシタケは少なくともヘリカメムシ科2属3種に寄生するタイプと3科8属12種のカメムシに寄生するタイプにDNAで分けることができ、どちらのタイプも寄主の雌雄両方に感染し、大型の寄主には大型の子実体を形成することが明らかとなった。また、本研究で作成された特異的プライマーを使用することで、カメムシタケのタイプ分けや自然環境などからの検出をPCR法により行なうことが可能となった。

謝　辞

本研究を進めるにあたり、数々の御指導と御校閲をしてくださいました北海道大学大学院農学研究院森林資源生物学分野教授である矢島崇博士、同准教授である玉井裕博士、同助教である宮本敏澄博士に心より御礼申し上げます。カメムシの種同定をしてくださいました小樽博物館学芸員の山本亜生氏、冬虫夏草菌の採取法や生態などにアドバイスを下さり、冬虫夏草菌発生地に快く案内してくださいました西原羊一氏には厚く御礼申し上げます。また、全国よりカメムシタケの採取に協力してくださいました貝津好孝氏を始めとする日本冬虫夏草の会の方々には深く御礼申し上げます。北海道大学北方生物圏フィールド科学センター苫小牧研究林の方々には、入林の際、多くの便宜を図っていただきました。ここに御礼致します。独立行政法人森林総合研究所の佐藤大樹博士には、冬虫夏草菌を始めとする昆虫病原性糸状菌についての数多くの貴重なアドバイスをしていただきましたので、ここに謝意を表します。

引用文献

Amicucci, A., Zambonelli, A., Giomaro, G., Potenza, L. and Stocchi, V. (1998) Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. Molecular Economy, 7:273-277.

青木襄児 (2003) 昆虫病原菌の探索，全国農村教育協会

Atkins, S. D., Clark, I. M., Pande, S., Hirsch, P. R. and Kerry, B. R. (2005) The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiology Ecology, 51:257-264.

Basith, M. Madelin, M. F. (1968) Studies on the production of perithecial stroma by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Canadian Journal of Botany, 46:473-480.

Beck, J. J. and Ligon, J. M. (1995) Polymerase Chain Reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and Septoria tririci in wheat. Phytopathology, 85:319-324.

Chen, R. and Ichida, M. (2002) Infection of the silkworm, *Bombyx mori*, with *Cordyceps militaris*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 71:61-63.

Chen, Y. Q., Hu, B., Xu, F., Zhang, W., Zhou, H. and Qu, L. H. (2003) Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different regions in China. FEMS Microbiology Letters, 230:153-158.

Chen. Y. Q., Wang, N., Qu, L. K., Li, T. H. and Zhang, W. M. (2001) Determination of anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of ribosomal transcribed spacers and 5.8S rDNA. Biochemmical Systematics and Ecology, 29:597-607.

Cunningham, K. G., Manson, W., Spring, F. S., Hutchinson, S. A. (1950) Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Nature, 166:949.

Ersek, T., Schoelz, J. E. and English, J. T. (1994) PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. Applied and Environmental Microbiology, 60:2616-2621.

Evans, H. C., Smith, S. M., Katundu, J. M. and Kapama, J. T. (1999) A *Cordyceps* pathogen of sugarcane white grubs in Tanzania. Mycologist, 13:11-14.

Fell, J. W. (1995) rDNA targeted oligonucleotide

primers for the identification of pathogenic yeasts in a polymerase chain reaction. Journal of Industrial Microbiology, 14:475-477.

深津武馬（1999）冬虫夏草と昆虫共生微生物－内部共生の進化と起源への洞察－．日本菌学会会報，40:34-41.

福原敏彦（1989）昆虫病理学，学会出版センター

古川久彦（1992）きのこ学，pp450．共立出版

Furuya, T., Hirotani, M. and Matsuzawa, M (1983) N^6- (2-hydoroxyethyl) adenosine, a biologically active compound from cultured mycelia of *Cordyceps* and Isaria species. Phytochemistry, 22:2509-2512.

Gardes, M. and Bruns, T. D., (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2:113-118.

Gong, Y. X., Li, S. P., Li, P., Liu, J. J. and Wang, Y. T. (2004) Simultaneous determination of six main nucleosides and bases in natural and cultured *Cordyceps* by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, 1055:215-221.

Goodwin, P. H., Hsiang, T. Xue, B. G. and Liu, H. W. (1995) Differentiation of *Gaeumannomyces graminis* from other turf-grass fungi by amplification with primers from ribosomal internal transcribed spacers. Plant Pathology, 44:384-391.

Guo, F. Q., Li, A., Huang, L. F., Liang, Y. Z. and Chen, B. M. (2006) Identification and determination of nucleosides in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40:623-630.

Hallsworth, J. E. and Magan, N. (1999) Water and temperature relations of growth of the Entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate pathology, 74:261-266.

Hantula, J. and Vainio, E. (2003) Specific primers for differentiation of *Hetelobasidion annosum* (s.str.) and *H. parviporum* infected stumps in northern Europe. Silva Fennica, 37:181-187.

原彰（2004）冬虫夏草を正しく学ぼう，碧天舎

原彰，山岸健三（2007）冬虫夏草の科学，新風舎

原田幸雄，秋山直司，山本顕司，城田安幸（1995）ヨトウガ蛹を用いたサナギタケ（*Cordyceps militaris*）子実体の人工培養．日本菌学会会報，36:67-72.

広谷正男，古谷　力（1986）動物材料．微生物の分離法（山里英一ら編），pp211-219．R&Dプランニング

黄年来（1998）中国大型真菌原色図鑑，p 7．中国農業出版社　北京

Hsu, T. H., Shiao, L. H., Hsieh, C. and Chang, D. M. (2002) A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. Food Chemistry, 78:463-469.

Huang, L. F., Liang, Y. Z., Guo, F. Q., Zhou, Z. F. and Cheng, B. M. (2003) Simultaneous separation and detection of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33:1155-1162.

Hywel-Jones, N. (1995) Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. Mycological Research, 99:724-726.

Inglis, P. W. and Tihgano, M. S. (2006) Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. Genetics and Molecular Biology, 29:132-136.

Ito, Y. and Hirano, T. (1996) First successful amplification of 18S ribosomal DNA of *Cordyceps* spp. by the PCR method. Mycoscience, 37:109-110.

Ito, Y. and Hirano, T. (1997) The determination of the partial 18S ribosomal DNA sequences of *Cordyceps* species. Letters in Applied Microbiology, 25:239-242.

岩出亥之助（1958）再訂増補キノコ類の培養法，pp353．地球社

Kaaya, G. P. (1989) Glossina morsitans morsitans: Mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. Acta Tropica, 46:107-114.

河井正晶（2003）白癬の診断．日本医真菌学会雑誌，44:261-264.

Kikuchi, K., Matsushita, N., Guerin-Laguette, A., Ohta, A. and Suzuki, K. (2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. Mycological Rsearch, 104:1427-1430.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. Journal of Molecular Evolution, 16:111-120.

Kinjo, N. and Zang, M. (2001) Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China. Mycoscience, 42: 567-574.

Kobayasi, Y. (1941) The genus *Cordyceps* and its allies. Science Report of Tokyo Bunrika Daigaku Section B.5, 84:55-260.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5:150-163.

Li, G., Man, H. S., Xing, Z. L. and Yong, S. C. (2007) Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. Mycorogical research, 111:87-92.

Li, Z. (1988) List on the insect host of *Beauveria bassiana*. (Study and application of entomogenous fungi in China) . pp. 241-255. Academic Periodical Press, China.

Ling, J. Y., Sun, Y. J., Zhang, H., Lv, P. and Zhang, C. K. (2002) Measurement of Cordycepin and Adenosine in Stroma of *Cordyceps* sp. by Capillary Zone Electrophoresis (CZE) . Journal of Bioscience and Bioengineering, 94:371-374.

Liu, J., Xu, Y. C. (2000) Resources of wild macrofungi from Yuhang City. Journal of Zhejiang Forestry College, 17:179-184. (in Chinese with English summary)

Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Manoch, L. and Samson, R. A. (2005) On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. Mycological Research, 109:581-589.

Maniania, N. K. and Odulaja, A. (1998) Effect of species, age and sex of tsetse on response on identification by *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol, 43: 311-383.

卯暁嵐 (1998) 中国経済真菌. 科学出版社 北京

宮下良平, 米山誠 (2002) 冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) の液体培養 (第1報). 日本応用きのこ学会誌, 10(2):79-85.

盛口満 (2006) 冬虫夏草の謎. どうぶつ社 東京

Moureau, J. (1949) *Cordyceps* du Congo Belge. Memoirs Institute royal colonial Belge, 7: 58pp.

Mullens, B. A. (1985) Host, age and sex of and pathogen exposure levels as factors in the susceptibility of *Musca domestica* to *Entomophthora muscae*. Entomologia Experimentalis et Aplicata, 37: 33-39.

Munsell, A. H. (1990) Munsell soil color charts, revised ed. Macbeth Division of Kollmorgen Instruments, Baltimore, Maryland.

Nagao, K., Sugita, T., Ouchi, T. and Nishikawa, T. (2005) Identification of *Trichophyton rubrum* by Nested PCR Analysis from paraffin embedded specimen in trichophytia profunda acuta of tne glabrous skin. Japanese Journal of Medical Micology, 46:129-132.

Nikoh, N. and Fukatsu, T. (2000) Interkingdom Host Jumping Underground: Phylogenetic Analysis of Entomoparasitic Fungi of the Genus *Cordyceps*. Molecular Biology and Evolution, 17 (4):629-638.

Nishida, T. (1994) Spatio-temporal variation of natural and sexual selection in breeding populations of the coreid bug, *Colpula lativentris* (Heteroptera: Coridae) . Researches on Population Ecology, 36: 209-218.

小川睦, 山家敏雄, 横沢良憲 (1983) ブナアオシャチホコに寄生するサナギタケ (*Cordyceps militaris* Link) の生理的性質. 日本林学会東北支部会誌, 35: 122-125.

Patouillard, N. T. (1887) Champignons exlra-europeens. Bulletin Societe Mycologique de France, 3:127.

Saito, T. and Sugiyama, K. (2005) Pathogenicity of three Japanese strains of entomopathogenic fungi against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Applied and Entomology and Zoology, 40: 169-172.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-jointing

method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4:406-425.

坂本与市，岡田一次（1981）畜産昆虫学， pp298．文永堂出版

Samson, R. A. and Evans, H. C. (1975) Notes on entomogenous fungi from Ghana. 3. The genus *Hymenostilbe*. Proceedings, Koninklijke Noederlandse Akadamie van Wetenschappen (Series C), 78:73-80.

Samson, R. A., Evans, H. C. and Latgé, J. P. (1988) Atlas of Entomopathogenic fungi. pp. 10-14. Springer-Verlag, New York

Sasaki, F., Miyamoto, T., Tamai, Y. and Yajima, T. (2004) Isolation of vegetable wasps and plant worms, *Cordyceps nutans*, from fruit-body tissue. Journal of Invertebrate Pathology, 85:70-73.

Sasaki, F. Miyamoto, T., Tamai, Y. and Yajima, T. (2005) Optimum temperature and pH for mycelial growth of *Cordyceps nutans* Pat. (Ascomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 7: 301-304.

佐藤大樹（1999）サナギタケ（*Cordyceps militaris*）の生態—どこで虫に出会い、どう殺すのか—．日本菌学会会報，40:29-33.

Sato, H. and Shimazu, M. (2002) Stroma production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. Applied Entomology and Zoology, 37:85-92.

Sato, H. Shimazu, M. and Kamata, N. (1994) Detection of *Cordyceps militaris* Link (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by burying pupae of *Quadricalcarifera punctatella* Motschlsky (Lepidoptera: Notodontidae). Applied Entomology and Zoology, 29:130-132.

Sato, H., Kamata, N., Shimazu, M. (1997) Aerial infection of *Cordyceps militaris* Link (Clavicipitales: Clavicipitaceae) against larvae of *Quadricalcarifera punctatella* (Motschlsky) (Lepidoptera: Notodontidae). Applied Entomology and Zoology, 32: 249-252.

Seift, K. A. (1993) Integrating anamorphic into the fungal system. In: the fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics (ed. by Raynolds, D. R. and taylor, J. W.), pp. 82-83. C. A. B. International, Wallingford

Shah, P. A. and Pell, J. K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology, 61:413-423.

Shibata, H., Kirikae, M., Tanaka, Y., Sakuma, T. and Hatano, R. (1998) Proton budgets of forest ecosystems on volcanogenous regosols in Hokkaido, northern Japan. Water Air and Soil Pollution, 105: 63-72.

Shih, H. L., Lin, C. P., Liou, R. F. and Tzean, S. S. (1995) Complete nucleotide sequence of *Beauveria bassiana* 5.8s rRNA coding gene and flanking internal transcribed spacers. The Journal of Sequencing and Mapping, 5:381-383.

Shimazu, M., Mitsuhashi, W. and Hashimoto, H. (1988) *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. Transactions of Mycological Society, Japan, 29:323-330.

Shimazu, M. and Sato, H. (1996) Media for selective isolation of an entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Applied Entomology and Zoology, 31 (2):291-298.

Shimazu, M. Zhang, B. and Liu, Y. N. (2002) Fungal pathogens of *Anoplophola glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) and their virulences. 森林総合研究所研究報告，1:123-130.

清水大典（1994）原色冬虫夏草図鑑， pp381．誠文堂新光社

清水進，山路素子（2002）数種の昆虫病原性糸状菌のヤマトシロアリに対する病原性．日本応用動物昆虫学会誌，46:89-91.

Sommer, R. and Tautzs, D. (1989) Minimal homology requirements for PCR primers. Nucleic Acids Research, 16:6749.

杉田隆，西川朱實（2004）DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定．日本医真菌学会雑誌，45: 55-58.

Sung, J. M., Kim, C. H., Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S. (1993) Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C.nutans*. The Korean Journal of Mycology, 21:94-105.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.

(1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680.

友国雅章，川澤哲夫，高井幹夫，安永智秀（1993）日本原色カメムシ図鑑第2巻， pp350．全国農村教育協会

津田勝男，吉岡哲也，堤隆文，山中正博，河原畑勇（1997）カメムシ類から分離した *Beauveria bassiana* のチャバネアオカメムシに対する病原力の検定と検定用飼育容器の開発．日本応用動物昆虫学会誌，40(2):95-98.

堤隆文（2003）果樹カメムシ－おもしろい生態とかしこい防ぎ方－．農村漁村文化協会

内山茂（1999）菌類の採取・検出と分離：冬虫夏草．日本菌学会会報，40:173-179.

Wada, S., Horita, M., Hirayae, K. and Shimazu, M. (2003) Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycota: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. Applied Entomology and Zoology, 38: 551-557.

White, T. J., Brums, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenics. In PCR Protocols (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White), pp.315-322. Academic Press, San Diego.

Wu, Z., Wang, X. R. and Blomquiet, G. (2002) Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi. Journal of Environmental Monitoring, 4:377-382.

Xu, C. P., Kim, S.W., Hwang, H. J., Choi, J. W. and Yun, J. W. (2003) Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exobiopolymer production by *Paecilomyces tenuipes*. Proceedings Biochemistry, 38:1025-1030.

矢萩信夫．(2005) ノムシタケ（*Cordyceps*）属菌の培養とその生理活性物質に関する研究．金沢大学大学院博士論文

矢萩信夫，矢萩禮美子，高野文英，伏谷眞二，田中知明，村上光太郎，太田富久（2004）サナギタケ（*Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr.）とマルミノアリタケ（*Cordyceps formicarum* Kobayasi）の寒天培養における子嚢殻静子座の形成について．日本菌学会会報，45:15-19.

矢萩禮美子（1979）山形県真室川町で採取された冬虫夏草．日本菌学会報，20:395-400.

Yamanaka, K., Inatomi, S. and Hanaoka, M. (1998) Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. Mycoscience, 39:43-48.

Zhang, M. and Kinjo, N. (1996) Type study on the *Cordyceps sinensis*. Acta Botanica yunnanica, 18: 205-208.

Summary

I determined the host range of *Cordyceps nutans* in Japan, analyzed the genomic mutations of *C.nutans* within and between the each habitat, and examined the relation between those mutations and the host specificity. I also examined the relation between host size and the fruit body size of *C. nutans*. Furthermore, I improved the fungal isolation method of *C. nutans* and developed the specific PCR primer. There was no successful report of fungal isolation from tissue of *C.nutans*, however, our surface sterilization method enabled its isolation. *C. nutans* showed optimal growth at the temperature between 20 to 25 ℃ and at pH level between 7.0 to 9.0. In my study, the identified host stinkbugs of *C. nutans* belonged to 4 families, 10 genera, and 15 species. In the collected samples, there was no specific morphological tendencies in relation to the difference of host species and geography. However, as a result of the molecular phylogenetic analysis, the isolates were classified into two types. Although there was no significant difference between *C. nutans* infectivity and the size difference of hosts by sex, highly positive correlation was observed between body length of the host insect and head length and width of the fruit body, and, between host's body length and stype width of the fruit body, respectively. The primer developed in this study enabled selective PCR amplification, and, therefore, enabled the typing *of C. nutans*. My study revealed that my samples can be grouped into at least two genetic types, each of which correlates to different types of specific host. Both types parasite without sex preference of the host insect, and their stroma size is dependent on their host size.

Keywords: Biological control, Entomopathogenic fungi, Host specificity, rDNA-ITS