

日本産 *Allomyces* の分類学的研究

奥西 宏太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

コウマクノウキン (厚膜囊菌) 門は祖先的な真菌類であるツボカビ類より派生した水生菌類の一群で、乾燥に強い「厚膜囊」という構造を作ることにより特徴づけられ、1 目 5 科 16 属約 180 種を含む分類群である。好気性、嫌気性の腐生菌類の他、藻類寄生菌、維管束植物病原菌、節足動物寄生菌など多彩な生活を送る菌類を含む。耐乾燥性の獲得に加え、菌界では珍しい単相・複相同型世代交代を示す種を含むという特徴と、その系統的位置から、真菌類の淡水中における生活圏の拡大や、陸上進出のルートを解き明かす上で重要な鍵を握る分類群と考えられる。

このうち、*Allomyces* (カワリミズカビ) 属は好気性、腐生性の淡水生菌類で、培養が容易なため古くからモデル生物として様々な研究に用いられてきた。本属は、特徴的な二叉分枝性の菌体を生じ、基準種の生活環は、配偶体より単相の、孢子体より複相の遊走子嚢を生じ、孢子体上に休眠性の厚膜囊を形成、この中で減数分裂が生じる典型的な同型世代交代型である。Emerson (1941) は生活環と形態の特徴に基づき本属の分類体系を構築し、以下の三亜属を提唱した。

- *Euallomyces* 亜属: 配偶体と孢子体双方を生じる同型世代交代を行う。孢子体上の厚膜囊が乾燥・休眠した後に減数分裂を行い、放出された遊走子が配偶体に成長する。
(*A. arbusculus*, *A. macrogynus*, *A. javanicus*)
- *Cystogenes* 亜属: 配偶体を持たず、孢子体は大型の厚膜囊を作る。厚膜囊から放出された遊走子が一度シスト化する。
(*A. moniliformis*, *A. neomoniliformis*)
- *Brachyallomyces* 亜属: *Euallomyces* 亜属と同様、菌体上に厚膜囊を生じるが配偶体を生じない。(*A. anomalus*)

しかし、近年 Porter ら (2011) が本属の分子系統解析を行ったところ、これら 3 亜属は系統を反映しないこと、さらに属内において多くの種が多系統になり単系統性が支持されなかったことが示され、属内の分類学的混乱が生じている。

日本では、印東 (1940) や加藤が 1940~1960 年代に本属の分類学的研究を進めたが、それ以降研究が途絶えており、同定された株が現存せず、またいずれの塩基配列データも残されていない。そこで私は本属の分類学的整理を目指すこととし、まず、日本各地から *Allomyces* 属を検出、分離培養し、形態観察と分子系統解析を行い、日本産 *Allomyces* 属菌のフロラを再探索するところから研究を開始した。

【サンプリングと検出】

先行研究では、本属菌は水田、側溝、流れが緩やかな川岸、池の岸等よりよく分離されている。これらの環境に着目し、日本各地 (東北・関東・近畿・中国) から 61 点の土壌試料を採取した。乾燥試料はそのまま、湿潤試料は紙袋に入れて数カ月乾燥させ、40°C~50°C のインキュベーターで一晩加熱した後、滅菌したゴマ種子をベイトとした釣餌法により菌の分離を試みた。その結果、13 サンプルから *Allomyces* 属を検出、内 8 サンプルについて以下の方法で単離培養株を確立した。

【単離培養】

ゴマ上の菌体を一部切除して PmTG 培地上で生育させ、他の細菌類・菌類が無い部分の菌体を切り出し、新しい培地へ移動した。この作業を繰り返し、単一菌体由来の純粋培養を確立した。この培地片を切り出し、滅菌水中に投入、遊走子を放出させ、これを PmTG 培地に落として単遊走子による単離を行った。単離培養した株にはそれぞれ以下の菌株番号を付けた。

- 茨城県つくば市 筑波大学構内 図書館前排水管付近 IK4
- 大阪府高槻市氷室町 鬮鶏山古墳付近 (池岸) OS1
- 大阪府寝屋川市池の瀬町 寝屋川公園墓地 (側溝) OS7
- 兵庫県明石市明石公園 剛の池 (池岸) HG6
- 京都府京都市京大農学部構内 (建物の脇) KT1
- 新潟県三条市代官島 県道 537 号線 水田 (側溝) NG7
- 長野県上田市国分 水田 (側溝) NN5
- 東京都千代田区皇居外苑 道路脇 TK1

【形態観察と種同定】

OS1、OS7、HG6、KT1、NN5、TK1 の計 6 株は配偶体を形成せず、厚膜囊のサイズ (長径約 50 μm)、孢子体の形状から *A. anomalus* と同定された。IK4 株は配偶体を形成し、オレンジ色の雄性遊走子嚢が透明の雌性遊走子嚢の基部に形成されることから *A. arbusculus* と同定された。NG7 株は長径約 70 μm に達する大型の厚膜囊を生じ、厚膜囊表面のくぼみの密度が低く、厚膜囊から放出された遊走子がシスト化することから *Cystogenes* 亜属の一種 *A. neomoniliformis* である可能性が高い。しかし本種に知られる遊走子嚢の連鎖が現段階では認められない。

【分子系統解析】

2017 年 1 月現在、OS1、HG6、IK4 について LSU 及び SSU の部分塩基配列を決定した。3 株の LSU+SSU について系統解析したところ、いずれも *Allomyces* 属内に位置づけられること、また、OS1 株と HG6 株は属内で近縁、もしくは同一種であることが示唆された。

【まとめと考察】

印東 (1940) は日本において *A. arbusculus*, *A. macrogynus*, *A. javanicus*, *A. neomoniliformis*, *A. anomalus* の計 5 種を報告している。本研究ではこの内、*A. macrogynus*, *A. javanicus* を除く 3 種を再発見できた。これらの形態的特徴は、先行研究の記載とほぼ一致したが、暫定的に *A. neomoniliformis* と同定した NG7 株は、遊走子嚢の連鎖を欠くなどの若干の差異が認められ、今後さらなる詳細な検討を要する。また、本研究では *Allomyces* 属は頻繁に乾湿を繰り返す側溝や人工池の岸等から良く分離され、分離株の多くは *Brachyallomyces* 亜属の *A. anomalus* と同定された。配偶体を欠き、厚膜囊から放出された遊走子が孢子体に成長する *Brachyallomyces* 亜属の生活環は、放出された遊走子が配偶体に成長する *Euallomyces* 亜属の生活環や、遊走子が一度シスト化する *Cystogenes* 亜属の生活環と比べ、より頻繁に乾燥する人工環境に対して強い耐性を持つのではないだろうか。