

糸状不完全菌 *Aenigmatospora* の謎 ("enigma") に迫る —キシヤヤスデを介する生活史の解明—

田中 直歩 (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)

【背景および目的】

1999年にキューバの Castañeda らにより、*Aenigmatospora* という不完全菌の新属が記載された。同属は、*aenigmato* (=謎の) + *spora* (=孢子) という名の通り、特異な形態 (キノコ型) の孢子を形成する。原記載以後の再発見例がなく、培養も成功しておらず、分子系統解析もなされていないため、その分類学的所属はおろか、生活史も謎に包まれている。しかし、近年、キシヤヤスデの糞から *Aenigmatospora* 属に類似する菌が繰り返し検出されることが分かった。*Aenigmatospora* 属菌の分類学的位置ならびに生活史の解明を目指し研究を行った。

【材料と方法】

1) キシヤヤスデの採集とその糞上の菌体の観察

2016年9月、八ヶ岳山麓でキシヤヤスデ (*Parafontaria laminata*) を採集し、飼育した。湿らしたキムワイプを敷き詰めたアイスクリームカップにキシヤヤスデを入れ 24 時間放置し、得られた糞を 2~3 週間保湿しながら観察した。糞上に認められた菌体の一部は光学顕微鏡観察、一部は分子系統解析に用いた。

2) キシヤヤスデの解剖・消化管内部の観察

*Aenigmatospora* 属菌は、キシヤヤスデの糞からのみ特異的に生じており、消化管内に本菌が認められると予想した。そこで本菌の消化管内での動態を調べるため、解剖し、消化管を摘出した。50 個体において、前腸・中腸・マルピーギ管周辺・後腸に分けて光学顕微鏡で観察した。各個体の消化管に何等かの菌が存在するか否かと、同じ個体に由来する糞の上に *Aenigmatospora* 属菌が発生するかどうかの関係性を、一般化線形モデル (Generalized linear model) により解析した。その際、個体群の違い、性別、糞を回収してから解剖するまでの日数を考慮した。

3) 分子系統解析

*Aenigmatospora* 属菌については、カバーガラスで押し潰した成熟孢子を、消化管内の菌に関しては寒天培地上で不純物を除去した菌体を用い、DNA 抽出を行った。両者について、核 SSU 領域の塩基配列を決定し、最尤法系統樹を作成した。

【結果】

① キシヤヤスデの糞から得られた *Aenigmatospora* 属菌

キシヤヤスデの糞上に発生した菌体の特徴は以下の通りであった。孢子柄は先端が球形に膨らみ、そこから瓢箪型の細胞を放射状に複数個生じる。その細胞先端に、キノコ型の孢子を一個ずつ作る (図 1)。これらの形態的特徴は *Aenigmatospora* 属の唯一の既知種である *A. pluchra* と酷似していたが、孢子形成細胞の形態、個数、孢子形成部位が異なるため、未記載種と判断された。以下、*Aenigmatospora* sp. と称す。また、発生基質の糞を丁寧にほぐしたところ孢子柄の基部は円筒形の細胞から生じていた (図 1B)。更に、本菌の孢子をカバーガラスで潰すと、外皮が破れ、円盤を伴う楕円形の単孢子性小孢子嚢が現れた。即ち本菌の孢子は、内生的に形成される単孢子性小孢子嚢孢子であることが判明した。これはキクセラ亜門に属す菌群に見られる特徴である。

② キシヤヤスデの消化管内から得られた *Mononema* 属菌

キシヤヤスデの消化管を観察した結果、*Aenigmatospora* sp. の孢子柄基部に見られる円筒形の細胞に類似した細胞を生じる菌体が、前腸壁に認められた。この菌体は付着器により前腸壁に付着し、顕著な油球を含む円筒形の分節孢子を生じる (図 2)。前腸に付着するという生態的特徴も併せ、現在分類学的所属が不明である *Mononema* 属菌の一種と同定された。以下、*Mononema* sp. と称す。腸内に *Mononema* sp. が認められると、糞上に *Aenigmatospora* sp. が出現しやすい一方で、腸内に *Mononema* sp. が認められないと、糞からは一切 *Aenigmatospora* sp. が検出されなかった。本傾向は統計解析からもサポートされた。

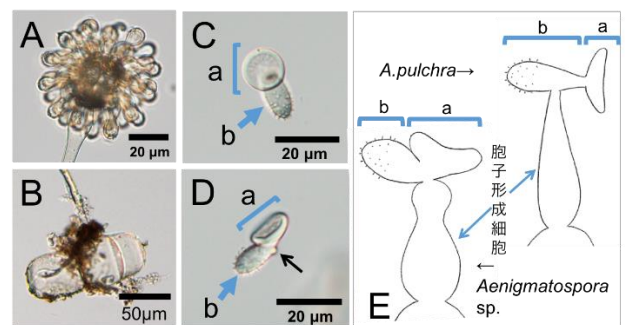


図1. A-E: *Aenigmatospora* sp. A: 孢子形成細胞 B: 基部の円筒形細胞, C, D: キノコ型の孢子. aとbの2細胞からなる. 黒矢印で示す部分で形成細胞と付着していたと考えられる. E: *A. pluchra* と *Aenigmatospora* sp. の孢子形成構造および孢子の模式図.

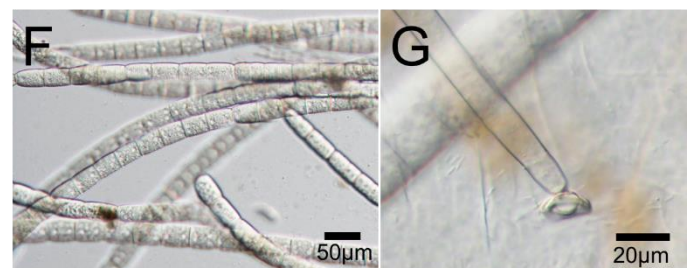


図2. F, G: *Mononema* sp. F: *Mononema* sp. の分節孢子, G: 基部の付着器

③ 分子系統解析の結果

分子系統解析の結果、*Aenigmatospora* sp. と *Mononema* sp. は非常に近縁で単系統群をなした。しかし、両者の塩基配列は一致しなかった (相同性 96%)。また、このクレードはキクセラ亜門に属し、亜門内の既知種いずれとも区別された。しかし、亜門内の正確な分類学的位置を決めるには更なる検討が必要である。

【考察】

*Aenigmatospora* sp. の孢子柄基部の円筒形細胞と消化管内の *Mononema* sp. の孢子は形態的に類似し、両者の出現頻度に相関が見られるため、同一性が強く疑われる。しかし、分子系統解析の結果、両者の塩基配列は極めて近縁だったものの一致はしなかった。形態的には識別できない複数の隠蔽種が存在する可能性も考えられる。今後は、キシヤヤスデの同一個体由来する *Aenigmatospora* sp. と *Mononema* sp. の分子系統解析を行い、その塩基配列の同一性を検証する必要がある。