

異なる昆虫から分離される腸内生キクセラ目菌類の宿主特異性の検討

李 知彦 (筑波生物学類)

指導教員：出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

導入

キクセラ亜門には、土壌や糞上で生育する菌と、節足動物の腸内で生育する菌とが知られてきた。近年、当研究室内でその双方で生育する菌群を把握しつつある。その1つに直翅目昆虫から分離される未記載属のキクセラ目菌類がある。直翅目では食物を咀嚼する前胃が発達しており、これらの菌類は孢子表面の爪状構造により前胃表面の微毛を挟むことで、前胃に留まり増殖する。この属にはカマドウマ科昆虫からのみ得られる sp.1 とコオロギ科昆虫からのみ得られる sp. 2 が含まれる。両菌は宿主腸内に留まって増殖するのに必要な孢子の爪の形態が異なるが、その他は酷似し、近縁な別種と考えられる。宿主の分化は生殖的隔離を生む可能性があり、異なる分離源や両菌の孢子の爪の形状差はその鍵になる。それゆえ、両種は種分化の機構を解明するのに適した材料といえる。更に両種は培養可能で、宿主も入手・飼育が容易であり、実験に好適である。そこで、まず宿主交換実験を行い両菌の宿主特異性を検討した。

材料・方法

1) 両菌の感染頻度の調査・分離・培養

2019年6月～12月の間、長野県、群馬県、栃木県下でカマドウマ科・コオロギ上科昆虫を採集した。種同定は日本直翅類学会(2006)を参照し、形態・鳴き声に基づいて行った。採集個体は湿らせたキムワイプを敷いた容器内で市販の金魚の餌を与えて個別に飼育した。各々から糞を回収し、抗生物質入り素寒天培地に接種した。そして、糞からの菌の出現と前胃への付着孢子数の両方またはいずれかを確認して自然界での両科昆虫への感染頻度を調べた。また、糞から菌が出現した場合、孢子を1/2MA+YEP培地に単離した。両菌の孢子発芽には嫌気条件が必要なため、アネロパウチ・ケンキで約1週間嫌気培養を行い培養株を確立した。

2) 宿主交換実験

本来の宿主と菌のペアと、交換した宿主と菌のペアとで感染実験を行い、宿主特異性を検討した。【材料】宿主としてカマドウマ科のマダラカマドウマ・コノシタウマ(上田市広山寺古墳産)、コオロギ科のフタホシコオロギ(FISH JAPAN店の餌用の市販品)を用いた。また、菌株はコノシタウマ由来の sp. 1 とエンマコオロギ由来の sp. 2 を用いた。各宿主に対して以下3つの実験区を設けた: (i) どちらの菌も与えない(Control) (ii) sp. 1 を与える (iii) sp. 2 を与える。各実験区のサンプルサイズは数字の小さい順にコオロギ科が n=10, 10, 10、カマドウマ科が n=3, 4, 2 だった。【方法】初めに、宿主が両菌を保有していないことを確認するために、糞を3-6回採取し、培地に接種してから二日後に両菌が出現しないことを確認した。続いて、各実験区の菌の孢子を栄養寒天(1/2MA+YEP)に混ぜ実験個体と与え(Controlの場合は孢子なし)、与えた時刻を開始点(Od)とした。孢子量は成熟した孢子柄頂端部に生じる孢子を含む液滴の5滴分とした。実験個体の食餌条件についてはここでは省略する。そして、以下の項目について計測をした。まず、1d・2dに糞を回収し抗生物質入り素寒天培地に接種して、2日後と7日後に菌が出現した糞数をカウ

トした。次に、2dに全個体を解剖し前胃を摘出裂開後、約15秒間バルテックスミキサーで洗浄して乳酸で封入した。そして、光学顕微鏡を用いて付着孢子数のカウントを行った。このとき、付着孢子の発達を4段階に分け、未発達のStage 0から発達を完了したStage 3へと数字の大きさを発達の進行度合を表し、各段階ごとにカウントした。

結果・考察

1) 両菌の感染頻度調査・分離・培養

カマドウマ科昆虫を計209匹採集し、形態に基づき2属5種に同定した。うち2属4種173匹にsp. 1が感染しており合計の感染率は82.8%であった。同様に、コオロギ上科昆虫を計63匹採集し、形態・鳴き声に基づき3科7属7種に同定した。うちコオロギ科の3属3種5匹にsp. 2が感染しており3種合わせた感染率は11.4%(全44個体中)であった。他2科3属3種18匹にsp. 2の感染は見られなかった。sp. 1の感染頻度が非常に高いのに対してsp. 2の感染頻度は低かった。また、感染個体の4種20匹からsp. 1を21菌株、感染個体の2種2匹からsp. 2を2菌株得た。

2) 宿主交換実験

宿主がコオロギ科の場合の前胃に付着した孢子数の結果を表1に示す。Stage 1を除きsp. 1の付着孢子数がsp. 2より有意に少なかった(Mann-Whitney U test; p<0.05)。一方で、宿主がカマドウマ科の場合の両菌の付着孢子数に有意差はなく(同上)、今回のサンプルサイズでは差の有無は判定できなかった。だが、Stage 0以外の発達段階のsp. 2の付着孢子数はほぼ0で、明白にsp. 1の付着孢子数より少なかった。以上から、付着孢子数は宿主を交換した場合に少なくなることが示唆された。加えて、両菌いずれも宿主を交換した場合に明らかに発達段階が進んだ付着孢子数が少なかった。次に、宿主を交換した実験区における糞からの菌の出現は宿主がコオロギ科の場合でのみ認められた。したがって、少なくともsp. 1は宿主がコオロギ科の場合でも潜在的に感染可能であり、今回の実験条件ではカマドウマ科への宿主特異性は否定された。

展望

実験結果に反して自然環境下ではコオロギ科から両菌が分離されることはないため、両科昆虫の共在下での感染実験で検証する予定である。また、宿主交換時の孢子付着数の低下の原因は交換した宿主の前胃の構造に対して孢子(の爪)が付着し難いためではないかと考え、現在SEMを用いた観察により調査中である。

表1 コオロギ科宿主における発達段階ごとの付着孢子数

	sp. 2孢子数(個) 中央値 (25%-75%)	sp. 1孢子数(個) 中央値 (25%-75%)	P値
Stage 0	2.5 (1.25-6.5)	0 (0-1)	<0.001
Stage 1	4 (1.25-5.75)	4 (0.25-8.75)	0.5
Stage 2	31.5 (19.5-37.8)	1.5 (0-9.75)	0.001
Stage 3	117 (53.3-148)	0 (0-1.75)	<0.001
合計	160 (83.8-196)	8.5 (1-20.3)	<0.001

Mann-Whitney U test ; H_a sp. 1 < sp. 2; p<0.05