

Perennicordyceps 属の寄生性について

須川 元 (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)

【背景と目的】

Perennicordyceps 属は子囊菌門フンタマカビ綱ボタタケ目に属する糸状菌の属であり、昆虫等に寄生して宿主上に子実体を形成する“冬虫夏草”と呼ばれる菌群に含まれる。冬虫夏草類は昆虫寄生菌として有名であるが、植物寄生性や菌寄生性を有する種も存在し、中には他種の冬虫夏草に“重複寄生”するものも知られている。冬虫夏草類の多様な寄生性は進化の過程で何度も宿主の乗り換えが起きていることを示しており、この host jumping と呼ばれる現象がどのようにして生じたかという疑問は冬虫夏草類の進化を考える上で非常に興味深いテーマである。

現在 *Perennicordyceps* 属には *P. cuboidea*, *P. paracuboidea*, *P. ryogamiensis*, *P. prolifica* の4種が含まれている。このうち *P. cuboidea* 以外の3種は昆虫寄生種とされているが、*P. cuboidea* は昆虫寄生性に加え重複寄生性を有することが標本の外観に基づいて指摘されており、2つの全く異なる寄生性を併せ持つ例として注目に値する。ただし「昆虫寄生」と「未熟な他種の冬虫夏草類への重複寄生」を外観から見分けるのは難しく、*P. cuboidea* が実際にこの2つの寄生性を併せ持っているかどうかについては疑問の余地がある。

本研究は *P. cuboidea* の寄生性の実態について詳しく検討するとともに *Perennicordyceps* 属全体の寄生性及び系統関係について再検討を行い、寄生性の切り替えがどのように生じたかという疑問に対するヒントを得ることを目的とする。

【方法・結果・考察】

(1) 標本採集・系統解析

東日本5地点より *Perennicordyceps* 属菌23標本を採集し、うち11標本については培養株の確立に成功した。各培養株からは HotSHOT method で DNA を抽出したのち、ITS1-5.8S-ITS2 領域を PCR により増幅し、配列を取得した。得られた配列に GenBank から取得した配列を加え、MEGA X を用いて最尤系統樹を作成した。

その結果、分離・培養に成功した11株のうち7株が *P. cuboidea* クレード、1株が *P. paracuboidea* クレードに位置づけられ、残る3株は *Perennicordyceps* 属内に新規のクレードを形成した。

この新規クレードは、標本の外観及び特異的プライマーによる宿主 DNA 検出 (後述) の結果から、*P. cuboidea* クレードと共に他種の冬虫夏草類への重複寄生性を有することが確認され、これによって *Perennicordyceps* 属内には少なくとも2つの重複寄生クレードが存在することが明らかとなった。また、この2つのクレード同士は姉妹群をなしてはおらず、属内の他のクレードも潜在的に重複寄生性を有している可能性が浮上した。

(2) 標本からの宿主 DNA 検出による寄生性の確認

採集した *Perennicordyceps* 属菌23標本のうち、10標本が重複寄生様、13標本が昆虫寄生様の外観を呈していた。ただし前述のとおり、外観上は昆虫寄生に見える標本であっても未熟な他種の冬虫夏草類への重複寄生の可能性を否定できない。そこで、13

の昆虫寄生様標本のうち、標本サイズ等の条件を満たした9標本について HotSHOT method で DNA を抽出し、他種の冬虫夏草類の DNA の検出を試みた。なお検出にあたっては宿主候補となる *Ophiocordyceps* 属菌をターゲットとした種特異的プライマーを設計し、PCR 後に反応産物をアガロースゲル電気泳動してバンドの有無を確認した。

その結果、外観上は昆虫寄生に見える標本からも比較的高い割合 (9標本中5標本) で他種の冬虫夏草類由来の DNA が検出された。このことから、従来外観に基づいて昆虫寄生と判断されてきた標本の中にも重複寄生の標本が相当数含まれていることが示唆された。ただし、今回実験に用いた標本の一部についてはまだシーケンスが得られておらず、*Perennicordyceps* 属内のどのクレードに位置するのか不明であるため、現在これを決定するための実験を実施中である。

(3) 昆虫への接種試験

「*P. cuboidea* が昆虫寄生性と重複寄生性を併せ持っている」という現在の認識はあくまで標本の外観に基づくものである。しかし、前項の結果は外観のみから冬虫夏草類の寄生性を判断することの難しさを示している。そこで、*P. cuboidea* の寄生性を確認するための新たなアプローチとして昆虫への接種試験を実施した。なお、野外で採集される *P. cuboidea* の標本の多くがキマワリ類等のゴミムシダマシ科幼虫より発生していることから、接種試験の宿主には同科に属するミールワーム (チャイロコメノゴミムシダマシ *Tenebrio molitor*) を用いた。

接種は以下の3つの方法で行った。

- ① ふすま (餌) に分生子を混和
- ② 虫体を分生子懸濁液に浸漬
- ③ 虫体に分生子懸濁液を注射

各系について、*P. cuboidea* の分生子を接種する群の他、ネガティブコントロールとして生理食塩水または精製水、ポジティブコントロールとして *Beauveria* sp. (甲虫目に対し寄生性を有する冬虫夏草類の一種) の分生子を接種する群を設けた。接種後は一週間ごとに死亡個体数をカウントし、経過週数と死亡率との関係を調べた。

その結果、ポジティブコントロールの *Beauveria* sp. 接種群においては接種方法②、③で接種後の顕著な生存率低下が見られたのに対し、*P. cuboidea* 接種群の経過は①~③の全系でネガティブコントロールとはほぼ同様であった。これは *P. cuboidea* が昆虫寄生性と重複寄生性を併せ持つという現在の認識とは矛盾する結果であり、実際には重複寄生性しか有していない可能性が高まった。

本研究の結果は、冬虫夏草類において標本の外観と実際の寄生性が必ずしも一致するわけではないことを浮き彫りにするものである。これまで昆虫寄生性とされてきた他の *Perennicordyceps* 属菌の寄生性についても、今後詳細な再検討が必要と考えられる。

【参考文献】

1. Ban et al. (2009). *Mycoscience*, 50(4), 261-272.