

学 位 論 文 要 旨

菌類内生バクテリアが *Mortierella* 属菌の菌糸生長
および胞子形成に与える影響に関する研究
Studies on the impact of endofungal bacteria on hyphal growth
and sporulation of fungi in the genus *Mortierella*

環境資源共生科学専攻 環境保全学大講座

高島 勇介

真核生物とバクテリアの相互関係は、多くの生物で見出され、宿主の生長・繁殖に重要な役割を持つ。本研究では、*Mortierella* 属菌を宿主とする菌類内生バクテリアについて、菌類内生バクテリア除去株を作出し、菌類内生バクテリアが菌糸生長、無性および有性胞子の形成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

日本国内外より *Mortierella* 属菌を計 44 種 234 菌株入手し、バクテリアの 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR により、菌類内生バクテリアのスクリーニングを行った。その結果、ケカビ門菌類を宿主とする菌類内生バクテリアとして報告されている *Burkholderiaceae*-related endobacteria (BRE) および *Mollicutes*-related endobacteria (MRE) がそれぞれ *Mortierella* 属菌 16 種 49 菌株および 4 種 10 菌株より検出された。また、検出された BRE および MRE の分子系統解析を行った結果、BRE は 3 つのクレード (MorBRE group A, B および C) を形成し、また、MRE は 2 つのクレードを形成することが明らかになった。

BRE の無性胞子を介した垂直伝搬の有無を検証するため、BRE を保有する *Mortierella* 属菌 12 種 16 菌株より胞子嚢胞子 (無性胞子) を単離し、得られた単胞子嚢胞子分離株における BRE の有無を PCR により確認した。その結果、16 菌株すべてにおいて胞子嚢胞子を介した BRE の移行が確認された (移行率 75-100%)。また、*Mortierella* 属菌 2 種 3 菌株 (*Mortierella basiparvispora* E1425, *Mortierella parvispora* YTM39 および E2010) を供試し、抗生物質処理 (シプロフロキサシン) による除去株の作出を試みた結果、3 菌株すべてにおいて、BRE 除去株を確立することに成功した。これらのことから、BRE は *Mortierella* 属菌

の孢子嚢胞子を介して垂直伝搬すること、そして、シプロフロキサシン処理が BRE 除去株の作出に有効なことが明らかになった。

BRE の有無が宿主の菌糸生長および無性胞子の形成に与える影響を検証した。供試菌株として、*M. basiparvispora* E1425, *Mortierella. elongata* FMR23-6, *Mortierella* sp. YTM23, *M. parvispora* YTM39 および E2010 の 4 種 5 菌株を用いた。BRE 保有株および除去株の 10, 20 および 30℃における菌糸生長速度を計測した結果、30℃において、*M. elongata* FMR23-6 の BRE 保有株は除去株と比較して有意に菌糸生長が早かった。しかし、それ以外の供試菌株および温度条件において、BRE の有無は宿主の菌糸生長に影響しなかった。また、*Mortierella* sp. YTM23 および *M. parvispora* YTM39 に関して、BRE の有無が孢子嚢形成に与える影響を比較したが、BRE の有無に関わらず孢子嚢形成は確認された。さらに、これら 2 菌株に関して、BRE 保有株および除去株が形成した孢子嚢胞子の発芽率も比較したが、BRE の有無は孢子嚢胞子の発芽率に影響しなかった。

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析により、単一宿主内に複数の BRE が共存しているかを検証した。BRE が検出された *Mortierella* 属菌 9 種 10 菌株を供試し、*Hha* I 処理による T-RFLP プロファイルを取得した。その結果、*M. parvispora* E2010 においてのみ、group A および C に属する 2 系統の BRE が検出された。また、*M. parvispora* E2010 の単孢子嚢胞子分離株において、group A および C の両方、group A または C のみの 3 種類の T-RFLP プロファイルが確認された。

Mortierella 属菌の交配試験を行う上で、交配型の判別は重要である。そのため、交配型が既知である *M. parvispora* のテスター株 (CBS315.61 および CBS316.61) を基準として交配試験を行うことにより、供試菌株の交配型を判別した。供試菌株には *M. basiparvispora* または *M. parvispora* として分子同定された 11 菌株を用いた。その結果、11 菌株中 3 菌株 (YTM39, YTM128 および NBRC104553) に関しては、テスター株との交配試験に備えた前培養時に単独で接合胞子 (有性胞子) を形成したことから、ホモタリズムを示す新種 *Mortierella sugadairana* として提唱した。また、*M. sugadairana* を除く 8 菌株中 3 菌株 (E1425, E1439 および E2010) に関しては、CBS316.61 と交配することで接合胞子を形成したことから *M. parvispora* であることが確認された。

生殖様式および交配型が判別できた *M. sugadairana* YTM39, *M. parvispora* E1425 および E2010 を対象に BRE の有無が接合胞子形成に与える影響を検証した。その結果、YTM39 では、BRE 保有株 (group C) において、接合胞子形成が確認されなかったが、除去株では接合胞子形成が確認された。また、E1425 では、接合胞子形成は BRE 除去株と比較すると BRE 保有株 (group A) においてより多く確認された。さらに、E2010 では、BRE 保有株 (group A/C または group A のみ) および BRE 除去株において、接合胞子形成が確認されたが、BRE 保有株 (group C のみ) において接合胞子形成は確認されなかった。以上より、本研究では、*Mortierella* 属菌を宿主とする菌類内生バクテリアが接合胞子形成を制御することを明らかにした。