

冬虫夏草菌 *Cordyceps nutans* の寄主、形態および 遺伝的特性に関する研究

学位論文内容の要旨

Cordyceps nutans はカメムシ類にのみ寄生を行なう冬虫夏草菌の一種で、選択的なカメムシ防除への使用が期待されるが、分離法が確立していないこともあり、今日までほとんど研究がなされていない。バイオリジカルコントロールや薬用の子実体生産などに本菌を利用するためには、寄主範囲や寄主特性、寄主の雌雄に対する感染率の違いなど、菌と寄主との関係を明らかにする必要がある。また、効果的な散布法や消長などを知るために、生活史などの生態的な部分も解明しなくてはならない。しかしながら、*C. nutans* におけるこれらの知見は全く明らかにされていないのが現状である。

本研究では、今まで成功例の無い *C. nutans* 組織分離と、*C. nutans* の形態と寄主および核リボソーマル RNA 遺伝子の ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域塩基配列を用いた寄主特性の解明および寄主の性とサイズが *C. nutans* に与える影響を明らかにし、生活史解明などへ応用できる *C. nutans* 特異的 PCR プライマーを作成することにより、バイオリジカルコントロールや薬理的利用に向けた足がかりを得ることを目的とした。

2 章では、過酸化水素水での表面殺菌時間の違いによる *C. nutans* 分離率の差を柄部と虫体腹腔内菌体の部位ごとに検討した。さらに分離菌株の培養に適した温度と pH についても調べた。その結果、本方法による *C. nutans* の組織分離は可能で、柄部の 30 秒殺菌、5 分殺菌、虫体腹腔内菌体処理区 (30 秒または 5 分) の間には分離率に有意差が生じ、虫体腹腔内菌体から最も高い分離率となった。しかしながら虫体腹腔内菌体からの分離は、成功率は高いが接種片が少量しか採れず、コンタミネーションした場合のリスクは大きい。柄部では、成功率は低いが 1 つの子実体から多量の接種片を得ることができる。従って、分離成功率を高めるためには 1 つの子実体から柄部と虫体腹腔内菌体の両方より接種片をとり、5 分殺菌を行なうべきである。本方法を用いて *C. nutans* 以外に十数種の冬虫夏草菌の分離に成功したので、本方法は多くの冬虫夏草菌の分離に利用可能である。*C. nutans* は培養温度 20~25 °C、培地 pH 7.0~9.0 において良好な菌系成長を示した。

3 章では、寄主となるカメムシ類の種の把握と、地理変異および寄主特性を明らかにすることを目的として、寄主種および産地と子座の形態および DNA (ITS 領域) における変異との関連性を検討した。同所的に採取を行なった試験 1 の形態的比較では子囊殻、子囊、二次胞子のサイズに差は生じなかった。*C. nutans* の ITS 領域の配列比較でも非常に高い相同性を示し、サンプル間の遺伝的距離は 0.007 以下となった。試験 1 に供試された *C. nutans* は極めて変異の小さい集団で、少なくとも 3 科 5 属 9 種のカメムシに寄生することが判明

した。国内数箇所より採取を行なった試験 2 では、新たに 1 科 5 属 6 種の寄主が判明した。中でもクサギカメムシ (*Holymorpha holys*) とチャバネアオカメムシ (*Plautia crossota stali*) は農林業において大きな被害を与える種であり、これらのカメムシに対しても *C. nutans* が寄生を行なうことは重要な知見であった。形態的比較では、子嚢殻、子嚢、二次胞子のサイズに差は無く、寄主種や地理に起因する特異的な傾向は確認されなかった。ITS 領域の配列比較において、ヘリカメムシ科カメムシに寄生を行なうもの (タイプ 1) と、他科のカメムシに寄生を行なうもの (タイプ 2) で、遺伝的距離が 0.090 以上と非常に遠くなった。NJ 法により系統樹を作成したところ、異なるクレードを形成した。従って、タイプ 1 の *C. nutans* はヘリカメムシ科カメムシに、タイプ 2 は他科のカメムシへ選択的に寄生していることが明らかとなった。

4 章では、寄主の性やサイズが *C. nutans* に与える影響を明らかにするために、野外採取した *C. nutans* の寄主体長と雌雄、子座サイズの関係を検討した。供試した 111 個体中、オスのカメムシが寄主となっていたのは 50 個体、メスが 61 個体で有意な差は検出されなかった ($p>0.05$)。寄主体長と子座頭部長との間には高い相関が見られ ($r=0.661, p<0.01$)、寄主体長と子座頭部径 ($r=0.643, p<0.01$)、子座柄部径 ($r=0.356, p<0.01$) においてもそれぞれ高い相関が見られた。大型の寄主であると、柄部が太く、頭部が長くて太い子座になることが示された。子座全長と寄主体長との間に相関は見られなかった ($r=0.089, p=0.352$)。これらの傾向は雌雄別に解析を行った場合でも同様であった。*C. nutans* のタイプ 1 とタイプ 2 それぞれで、寄主体長と子座各サイズとの相関を検討したが、やはり上記と同様の結果となった。本菌をバイオリジカルコントロールに用いた場合、カメムシの雌雄両方に効果を与えることが可能で、また、子実体の人工栽培で雌雄どちらのカメムシを用いても問題ないと言えた。大型のカメムシを用いて栽培することで、利用価値の高い頭部の大きい子実体を作出することができるだろう。

5 章では、*C. nutans* の生活史の解明や寄主特性の判別への応用を目的として、*C. nutans* タイプ 2 のみを特異的に増幅できる PCR プライマーセットの開発を行なった。設計されたプライマー配列を用いて DDBJ の BLAST 検索を行なったところ、真菌類で 90 % 以上の相同性を有する配列は *C. nutans* を除いて存在しなかった。低い方の T_m 値に合わせたアニーリング温度では *C. nutans* 以外の DNA の非特異的増幅が検出されたので、適温を検討したところ、60 °C で *C. nutans* タイプ 2 のみの増幅が認められた。リバースプライマーはタイプ 1 の *C. nutans* にもプライミングできるように設計を行ったので、フォワードプライマーに真菌特異的プライマー ITS1f を用いて PCR を行なうことにより、両タイプの特異的増幅も可能である。作成されたプライマーは、様々な DNA が混在している土壌や植物などのサンプルから *C. nutans* の DNA だけを特異的に増幅できると考えられ、子実体の発生が見られない時期などでも存在が検出可能なため、生活史の解明や防除資材として散布した際の拡散範囲や消長などを明らかにできるだろう。

本研究により、過酸化水素水を用いた表面殺菌法は *C. nutans* を始めとする多くの冬虫夏草菌の分離に用いることができることが示され、特に虫体内菌体と子実体柄部両方から分離を行うことで分離率が上がることが判明した。*C. nutans* は少なくともヘリカメムシ科 2 属 3 種に寄生するタイプと 3 科 8 属 12 種のカメムシに寄生するタイプに遺伝的に分けることができ、どちらのタイプも寄主の雌雄両方に感染し、大型の寄主には大型の子座を形成することが明らかとなった。また本研究で作成された特異的プライマーを使用することで、*C. nutans* のタイプ分けや自然環境などからの検出を PCR 法により行なうことが可能となった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	矢島	崇
副査	教授	小池	孝良
副査	准教授	玉井	裕
副査	准教授	小島	康夫
副査	助教	宮本	敏澄

学位論文題名

冬虫夏草菌 *Cordyceps nutans* の寄主、形態および 遺伝的特性に関する研究

本論文は6章からなり、図13、表6、引用文献96を含む91ページの和文論文である。他に参考論文3編が添えられている。

Cordyceps nutans はカメムシ類にのみ寄生を行なう冬虫夏草菌の一種であり、医薬品材料をはじめ、農林業における害虫であるカメムシ類の選択的防除資材としての利用が期待されている。*C. nutans* の寄主特性について、本菌の遺伝的変異の把握も踏まえて理解することが、利用上重要である。また、生活史などの生態的情報も不可欠で、その解明のためには本菌の分離法や検出法が確立していなければならない。本研究では日本産 *C. nutans* の寄主範囲を明らかにするとともに、地域内および地域間での遺伝的変異の解析を行い、本菌種の変異と寄主特性の関係を検討した。また、寄主の雌雄、サイズと子実体サイズとの関係を検討し、感染特性と子実体栽培条件を論じた。さらに、*C. nutans* の組織分離法の改良および種特異的 PCR プライマーの開発を行なった。

まず、*C. nutans* の組織分離法が確立していないため、過酸化水素水を用いた表面殺菌を行い、殺菌時間の違いによる分離率の差を柄部と虫体腹腔内菌体の部位ごとに検討した。また分離菌株の培養に最適な温度と pH についても検討を行なった。その結果、本方法により、これまで成功例の無かった組織分離が可能となり、虫体腹腔内からの分離成功率が最も高くなった。本方法により他の冬虫夏草菌12種の分離も可能であったことから、多くの冬虫夏草菌の組織分離に用いることができると考えられた。本菌は20℃から25℃、pH 7.0からpH 9.0で良好な成長を示した。

寄主種および産地と子実体の形態およびDNA変異との関連性を検討した。*C. nutans* の寄

主として4科10属15種のカメムシ類が同定された。苫小牧で採取した *C. nutans* では、子嚢殻、子嚢、二次胞子のサイズに、寄主種のグループ間で有意差は確認されなかった。DNA配列の比較においても、サンプル間の遺伝的距離は0.007以下となり、苫小牧産 *C. nutans* は変異の小さい集団であった。北海道江別、山形、福島、京都、鹿児島より採取した *C. nutans* の形態的比較では、子嚢殻、子嚢、二次胞子のサイズに違いはあまり無く、寄主種や地理に関連した特異的な傾向は確認されなかった。DNA配列の比較では、遺伝的距離が0.090以上と大きく離れた2タイプが認められた。タイプ1はヘリカメムシ科のカメムシ類と、タイプ2は他科のカメムシ類とそれぞれ選択的に寄生を行なっていると考えられた。タイプ2は京都産の全サンプルと鹿児島産の1サンプルだけに見られた。各タイプ内では、タイプ2は遺伝的距離の小さい変異が確認されたが、タイプ1はほとんど変異が生じていなかった。

C. nutans の寄主体長と雌雄、子実体の全長、頭部長、頭部径、柄部径の関係を検討した。その結果、寄主雌雄のサイズおよび感染数に有意な差は検出されなかった。カメムシの体長と子実体頭部長、子実体頭部径および子実体柄部径の間にはそれぞれ高い正の相関が見られ、大型の寄主に大型の子実体が形成されていた。この傾向は雌雄別や *C. nutans* のタイプ別でも同様であった。本菌をカメムシ防除に用いた場合、カメムシの雌雄両方に同等の効果を与えることが可能で、子実体栽培にカメムシを用いる際、雌雄どちらでも子実体収量に差異はなく、また大型のカメムシを用いることで、大型の子実体を作出することができると考えられた。

生活史の解明や防除資材として散布した際の拡散範囲や消長などを知るために、*C. nutans* のDNAのみを特異的に増幅するPCRプライマーの開発を行なった。フォワードプライマー CnF はタイプ2の *C. nutans* にのみ、リバースプライマー CnR はタイプ1、タイプ2両方にプライミングするよう設計した。プライマーセット CnF と CnR は、アニーリング温度が60℃のとき *C. nutans* タイプ2のみを増幅した。今回開発されたフォワードプライマー CnF の代わりに、ITS1fなどの真菌特異的プライマーを用いてリバースプライマー CnR とPCRを行なうことで、タイプ1も含めた *C. nutans* の選択的増幅を行なうことができると考えられた。

以上のように、本論文では、これまで情報に乏しかった *Cordyceps nutans* の寄主特性、形態および遺伝的変異を初めて明らかにした。また組織分離法の改良や本菌の検出法の開発など、応用的に重要な成果を含み、関連学会においても高い評価を受けている。よって審査員一同は、佐々木史が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。