

糸状菌ヒゲカビの系統保存菌株を用いた研究：胞子発芽における経時的特徴と紫外線、突然変異原感受性からみたヒゲカビ2種由来野生株の違い

宮崎 厚¹・佐々木 勝裕²・星 友莉恵³

Studies on the Fungal Strains in *Phycomyces* Culture Collection: On the Spore Germination Characterized by Its Time-Dependent Feature and UV, Mutagen Sensitivity of Wild Type Strains in Two Species of *Phycomyces*

Atsushi MIYAZAKI¹, Katsuhiro SASAKI², Yurie HOSHI³

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Miyagi 986-8580, Japan

^{2,3} Department of Basic Sciences, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Miyagi 986-8580, Japan

Abstract

There are at least two species in genus *Phycomyces*: *P. blakesleeanus* Burgeff (Pb) and *P. nitens* Kunze (Pn). In this study, we investigated the difference between Pb and Pn on the spore germination characterized by its time-dependent feature and UV, mutagen sensitivity on PDAYC medium at 20°C in the dark. Spore germination of strain NRRL1555 (–), the standard wild type in Pb, was characterized as follows: i) the spore germination started after 6-h culture, and continued during the next 4 h until almost 100%. ii) the spore shape turned from ellipsoid to round at germination point with a increasing cell volume. On the other hand, the spores of strain IFO9422 (–) in Pn germinated after 3-h culture, and at 4-h culture almost 100% germination rate was already observed. We did not find any round shape on Pn spores until germination. We noted that spores of Pb and Pn each had a unique characterization on time course of and changing shape on its germination, although the two species are in a same genus.

Spores of Pb were much more sensitive than those of Pn on both UV light irradiation and NTG treatment. We confirmed that both species functionally had an ability of photoreactivation on spore germination. When the germination rate around 10% was prepared, almost 100% recovery was shown in Pb spores, but only 40% recovery was observed in Pn spores. As there is an indication that Pb has a DNA-photolyase, the enzyme content and activity might be different between Pb and Pn.

1. はじめに

ヒゲカビ (*Phycomyces* 属) には、少なくとも *P. blakesleeanus* Burgeff (以降 Pb) と *P. nitens* Kunze (以降 Pn) の2種の存在が知られる。Pbは、故マックス・デルブリュックが研究(光生物学的研究)をリードするようになってから標準種としての地位を得て、菌株の収集や整理が行われ、多くの研究に用いられている。その中でも NRRL1555(–)株(交配型または接合型が–(マ

イナス)の意)は標準野生株として利用されている系統保存株であり⁽¹⁾、この株を用いた多種多様な突然変異株が作出されて活用されている^(1,2)。また最近、ミトコンドリアゲノムの性依存的遺伝に関する研究に新たな菌株1株が用いられた⁽³⁾。現在、この株を含む新3菌株は石巻専修大学(ISU)コレクションに追加保存されている。

一方、Pnの使用例はまれで、ISUコレクションに保存されている菌株もほとんど活用されてい

¹石巻専修大学理工学部生物科学科

²石巻専修大学理工学部基礎理学科 平成22年度卒業生

³石巻専修大学理工学部基礎理学科 平成25年度卒業生

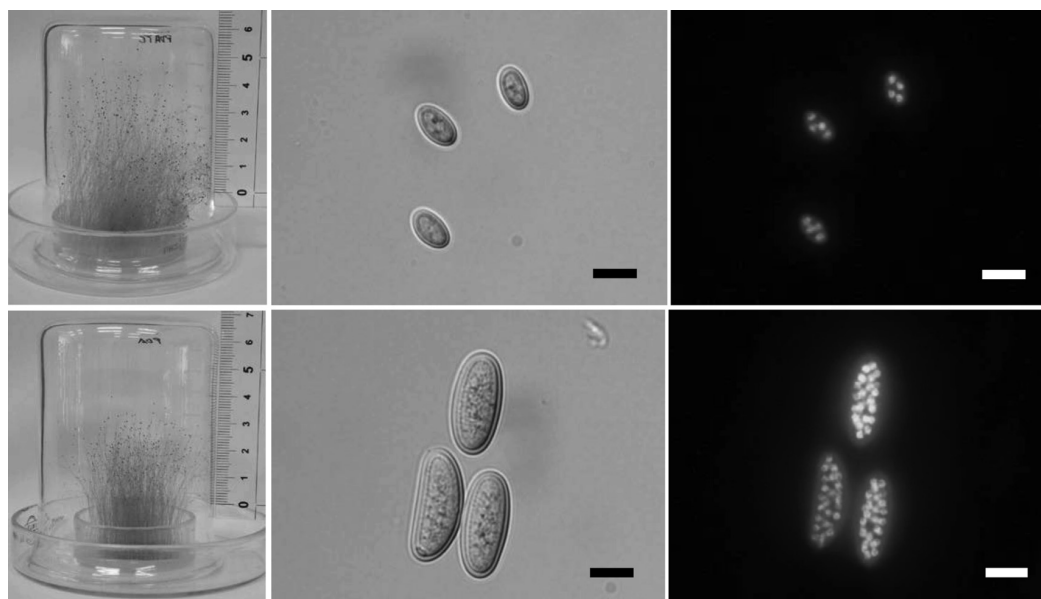


図1 ヒゲカビの培養物（無性生殖）と無性胞子
上段はPbNRRL1555(－)株、下段はPnIFO9422(－)株を示す。左図は全景、中央図は無性胞子の微分干渉顕微鏡像、
右図はDAPI染色による核の蛍光像（UV励起）を示す。スケールバーは10 μ mを示す。

ない。図1にPbとPnの培養物（無性生殖）および無性胞子（以降単に胞子）とその中に含まれる核の蛍光顕微鏡像を示した。培養物の生育状況からでは2種の区別は困難であるが、胞子の形状を比較することで容易に2種を識別できる。大型胞子を形成するPnは胞子当たり約20個の核を含んでいる。Pbでは胞子当たり2～4個の核であることから、Pn胞子をもつこの性質は、研究の進展に必要な突然変異株の作出に不利となると考えられる。しかし、最近の日本産ヒゲカビの記録で見られるように、野外から分離されるヒゲカビのほとんどがPnである⁽⁴⁾。PbとPnにおけるこのような分離状況の差異に関する理由は今のところ不明である。

野生から分離されるヒゲカビの多くがPnであることは、ISUコレクションの立場からも、Pnに関する基本特性の解析や研究の必要性を示唆している。そこで、本研究では、成長の基盤となる胞子の発芽に着目して、PbとPnにおけるその経時変化および紫外線と突然変異原感受性を調べた。

2. 材料と方法

2.1 材料

Pbとしては、系統保存されている菌株のうち最も利用されており標準野生株として扱われるNRRL1555(－)株を用いた。また、Pnとしては、成長や形態形成がよいIFO9422(－)株を用いた。ヒゲカビには(+)株もあるが、今回の実験では性差の違いを考慮して(－)株を用いて検討した。

2.2 培養

市販のPDA (Potato dextrose agar、ニッスイ) 培地に酵母エキス (Yeast extract 1 g/L、ナカライテスク) およびカセトン (Casitone 1 g/L、ディフコ) を添加してオートクレーブ (121 $^{\circ}$ C、15分) した栄養補強PDAYC培地を用い、20W蛍光灯下または暗所（暗箱内）20 $^{\circ}$ Cで一定時間培養した。

2.3 胞子の回収

蛍光灯下 ϕ 9 cmシャーレに1週間培養して十分に成長したヒゲカビより胞子を回収した。シャーレの蓋側に付着した胞子を滅菌水に懸濁し、ミラクロスを通して胞子以外の構造物を除去

した。その孢子懸濁液を2回の遠心操作(3,000回転/分、5分、モデル2410、久保田)により洗浄し、適量の滅菌水に再懸濁して使用するまで4℃で保存した。

2.4 孢子の発芽試験と計測

スライドグラス(65 mm×26 mm)上に厚さ1 mmになるように調整したPDAYC培地(スライドグラス培地)を用意し、48℃、10分間の処理により発芽誘導を行った孢子懸濁液をコンラージ棒で塗布して暗所、20℃で培養した(スライドグラス培養)。塗布量は、孢子の大きさを考慮してPbにおいては 10^5 個、Pnにおいては 10^4 個とした。培養開始後一定時間ごとにスライドグラスを取り出し、蛍光観察装置付き光学顕微鏡(Axio Imager、カール ツァイス)を用いて孢子の写真を撮影した。発芽率を見るための撮影は400倍で行い600~1200孢子を計数した。孢子形状の観察のための撮影は200倍で行い300孢子の短径および長径を計測した。孢子発芽が見られた場合には外挿線を引くことで補正した。計数、計測は各々の処理区で2~4回行った。

2.5 紫外線(UV)処理

UV処理には15W殺菌灯GL-15(東芝)を用い、孢子を塗布したスライドグラス培地より30 cmの位置から一定時間の照射を行った。処理後、暗所または明所(蛍光灯下)、20℃で培養し、Pbでは12時間後、Pnでは6時間後における発芽率を計測(孢子600~1,200個)した。計測は各々の処理区で2~4回行った。

2.6 NTG処理

1.5 mLマイクロチューブ内に入れた50 μ Lクエン酸リン酸緩衝液に 10^6 個の孢子を懸濁し、48℃、10分間により発芽の誘導処理を行った。そこに0.2 mg/Lに調整したNTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)を50 μ L加えてアルミホイルで遮光して振盪処理した。一定時間ごとにNTG処理された孢子を500 μ Lクエン酸リン酸緩衝液で2回洗浄し、続いて500 μ L滅菌水で1回洗浄して適量の滅菌水に懸濁した。懸濁孢子をスライドグラス培地に塗布して暗所または明所

(蛍光灯下)、20℃で培養し、Pbでは12時間後、Pnでは6時間後における発芽率を計測(孢子600~1,200個)した。計測は各々の処理区で2~4回行った。

2.7 DAPI染色

各種処理された孢子における核を観察するために、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)染色を行った。孢子を70%エタノールで固定(室温で30分間)し、1 mL滅菌水で2回洗浄を行った後、150 μ L滅菌水に懸濁し、そこに同量のDAPIを加えて混合し室温にて15分間染色した。過剰のDAPIを除くために1 mL滅菌水で2回洗浄した後、100 μ L滅菌水に再懸濁した。適量を蛍光顕微鏡(UV励起、400倍)で観察、写真撮影を行った。

3. 結果

3.1 孢子発芽の経時変化

48℃、10分間の発芽誘導処理をした滅菌水懸濁孢子を、PDAYC培地によるスライドグラス培養(20℃)に供した結果を図2に示した。培養に最もよく用いられるこの条件では、Pbは6時間まで発芽せず、その後はほぼ直線的に発芽率は上昇して10時間後には95%以上に達し、12時間後には100%に達した。一方、Pnでは、培養開始から6時間後には孢子の発芽率は100%に達しており、Pbとは大きく異なった。また、発芽率の経時変化の状況も大きく異なり、発芽4時間後には10%弱しか発芽が見られなかったが、その後わずか1時間経過後の5時間後には孢子の90%以上が発芽していた。

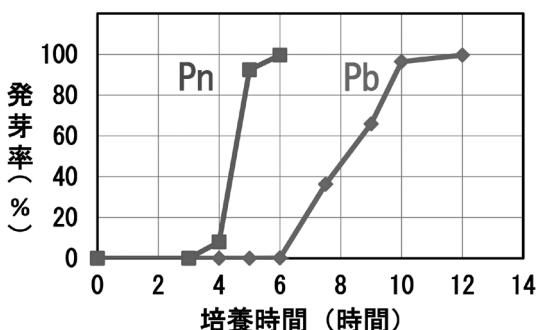


図2 ヒゲカビ Pb と Pn の孢子発芽率の経時変化

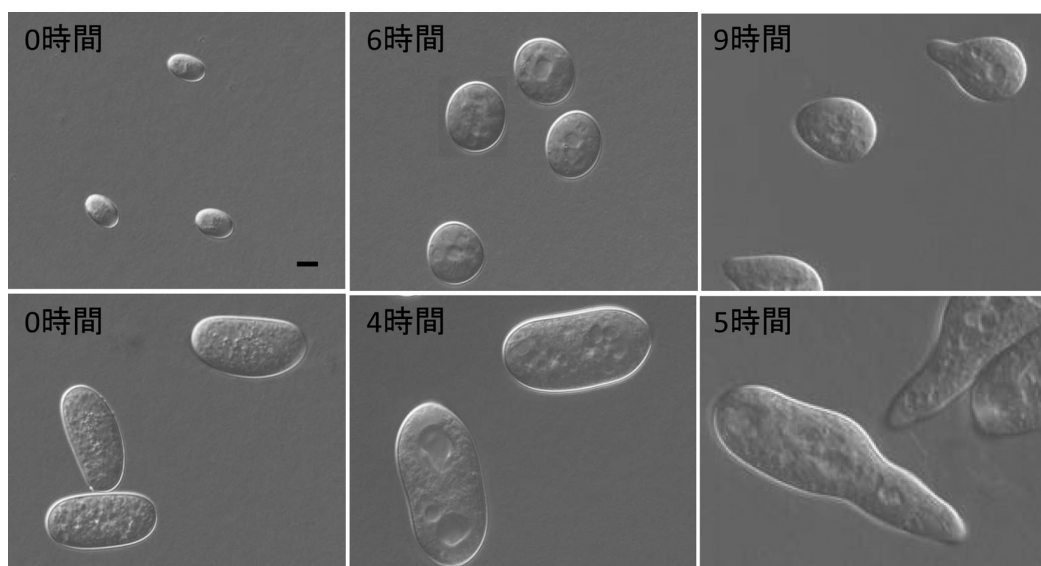


図3 ヒゲカビ胞子の発芽に至る形態変化
上段は PbNRRL1555(－)株、下段は PnIFO9422(－)株の微分干渉顕微鏡像を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

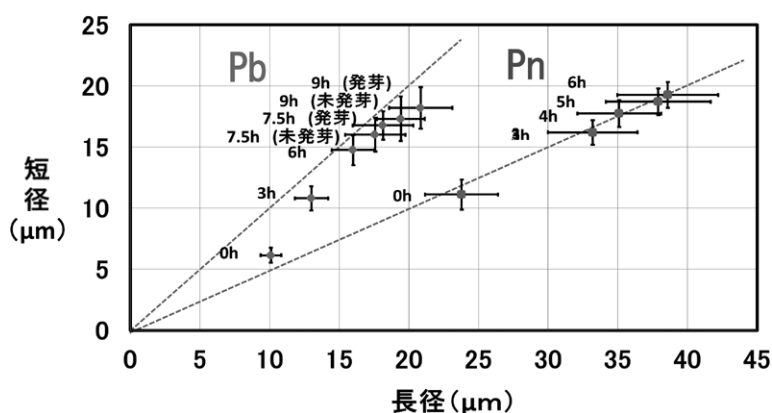


図4 ヒゲカビ胞子の発芽に至る長径と短径の変化

3.2 胞子の形態変化

発芽に伴う胞子形態の顕微鏡観察と計測（長径および短径）を行った。その結果を図3、4に示した。大きさは異なるものの、PbおよびPnともに胞子播種直後は長楕円形（長径／短径は約2）の形態をしていた。その後、Pbでは発芽時期に近づく6時間にかけて肥大球形化が進行し、その球形化の程度はそれ以降の培養において変化しないまま肥大が進行し発芽に至った。一方、Pnにおいては、Pbで見られた球形化は全く見られず、胞子播種直後の形態を保ったまま肥大が進行

し発芽に至った。発芽位置を確認できるPnでの観察から、その位置は短径部位に集中していた。

3.3 胞子発芽におけるUV照射の影響

PbとPnの胞子発芽におけるUV感受性を調べるために、254 nmのUV光を含む20W殺菌灯で処理（30 cm下）した胞子の発芽率を計測した。その結果を図5に示した。この条件において、PbではUV照射30秒で発芽率の低下が明らかに見られ、その後指数関数的に低下が進行して、60秒の照射により発芽率は1%にまで低下

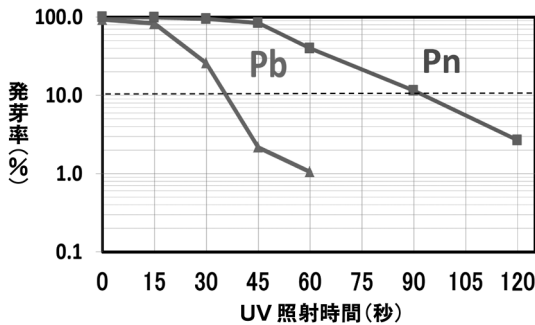


図5 ヒゲカビ孢子発芽における UV 照射の影響

した。一方、Pn においては、UV 照射 45 秒まで発芽率の低下は低く抑えられており、60 秒照射でも 40% の発芽率を示した。Pn においても発芽率の低下は指数関数的に進行したが、Pb と比べてその程度は緩やかであった。120 秒照射では発芽率は 2.5% に低下した。これらの結果は、Pb は Pn に比べて UV 感受性はずっと高く、10% 発芽率で比較した場合、Pb では約 35 秒、Pn では約 90 秒となり、約 3 倍の違いとなって現れた。

3.4 孢子発芽における NTG 処理の影響

Pb と Pn の孢子発芽における突然変異原の影響を調べるために、ヒゲカビの突然変異体を単離する時によく利用される NTG 処理（処理濃度 0.1 mg/L）した孢子の発芽率を計測した。その結果を図 6 に示した。この条件において、Pb では 45 分間処理まで指数関数的に急速に発芽率は低下し 2% 程になった。その後は緩やかに低下し、180 分間処理では 0.8% 程まで低下した。一方、Pn においては、Pb で見られたような急速な発芽率の低下は見られず、180 分間処理まではほぼ単調な指数関数的低下が見られた。45 分間処理では約 25%、180 分間処理では約 2.5% の発芽率となり、今回の処理時間内においては Pb より発芽率は高かった。10% 発芽率で比較した場合、Pb では約 30 分間処理、Pn では約 90 分間処理となり、約 3 倍の違いとなって現れた。

3.5 UV 照射および NTG 処理後における孢子発芽の光回復

UV 照射に続く可視光照射は、UV 照射の影響を回復させることが知られており、光回復と呼ば

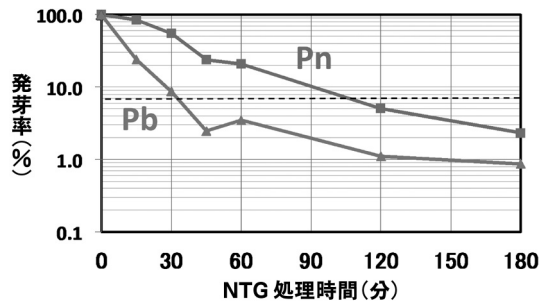


図6 ヒゲカビ孢子発芽における NTG 処理の影響

表1 UV 照射および NTG 処理後におけるヒゲカビ孢子発芽の光回復

	Pbの発芽率(%)		Pnの発芽率(%)	
	暗所	照明下	暗所	照明下
処理なし	96.3	96.8	98.7	97.5
UV照射	16.3	95.4	11.0	38.6
NTG処理	7.0	7.6	6.8	6.7

処理なしにおいては、Pbでは10時間、Pnでは5時間の培養後の計数データ、また、UV処理とNTG処理区においては、Pbでは12時間、Pnでは6時間の培養後の計数データを示す。

れる。Pb と Pn の孢子発芽における光回復の比較実験を行った。また、光回復が起こらない NTG 作用の確認実験を合わせて行った。UV 照射および NTG 処理は、図 5 および 6 より発芽率が 10% になるような処理区を用意し、その処理区に対して光回復効果を調べた。その結果を表 1 に示した。

まず、コントロールとして、Pb および Pn ともに処理が行われない場合には、暗所および明所（蛍光灯照明）下での発芽率はすべて 95% 以上となり差がないことを確認した。Pb では、UV 照射して暗所にて培養した場合 4 回の平均で発芽率は 16.3% まで低下したが、UV 照射直後から明所で培養すると平均で 95.4% に発芽率は回復した。これは、処理なしと比較すると 98.5% の回復率を意味する。一方、Pn では、UV 照射後の暗所培養で平均発芽率は 11% に低下し、明所培養で平均 38.6% に上昇した。これは、処理なしと比較すると 39.6% の回復率を意味する。

NTG 処理した孢子の発芽率（暗所）は、Pb と Pn では、それぞれ平均で 7.0% と 6.8% であり、処理に続く明所培養では、それぞれ平均で 7.6%

と6.7%であった。このことは、NTG処理による作用は光回復されないことを示している。

4. 考察

4.1 PbとPnにおける胞子発芽の経時変化

ヒゲカビの無性胞子を利用した研究は、構成物質分析や細胞壁構造⁽⁵⁾、休眠や発芽条件（熱や有機酸処理の効果^(5,6)、糖質とpHの効果⁽⁷⁾）、発芽時における代謝変動、特にトレハロース代謝⁽⁵⁾、等多岐に亘り行われてきた。使用株から見てみると、1970年代中頃～1980年代中頃にかけてVan Laereらが行った一連の実験ではK1⁺という株が用いられた。1980年代後半～1990年代に入ると、同様な実験がNRRL1555株、加えてその株由来の胞子発芽に関する突然変異株を利用して解析された⁽⁶⁾。しかし、分類形質となる未発芽胞子の形状^(5,8)やPbにおいてその胞子発芽時には肥大“swell”するという観察⁽⁸⁾はあるものの、胞子発芽を経時的に追って調べた類の研究は調べた限りにおいて文献中には見当たらない。今回の条件（PDAYC培地、20℃、暗所）において、PbはPnに比べて発芽までに約2倍の時間を必要とすること、また発芽してから発芽率が100%に達するまでの時間が大きく異なる（Pbは約4時間に対し、Pnでは約1時間）ことが示された（図2）。ここで見られた違いは、PbとPnにおける吸水力や発芽に働く酵素の量や活性における違いを反映していると考えられる。胞子内に存在する各々の核が同じ遺伝子発現能力を持っている保証はないが、PnではPbに比べて胞子当たり6倍以上の核数を保有しており（図1）、この違いが胞子発芽率における経時変化の違いに表れたのかもしれない。今回の実験は性差を考慮して（－）株を用いて行われた。データは示さないが、Pb A56（＋）株の胞子発芽率の経時変化はPbNRRL1555（－）株とほぼ同じであった。また、培養時の温度は胞子発芽のタイミングに大きく影響するが、発芽率の経時変化には影響しないことがわかりつつある。

発芽に至る胞子の形態変化においてもPbとPnで大きな差異が見られた。Pbでは発芽直前の6時間まで球形化を伴う肥大成長が進行するのにに対し、Pnでは球形化は全く起こらず元の形態を

保持したまま肥大成長を続けた（図3、4）。今回の実験で、Pn胞子の発芽に至る肥大化パターンが初めて明らかになった。同じヒゲカビ属内の2種において大きな違いが見られた理由は不明であるが、面白いことに、発芽時直前の胞子の短径（Pbでは長径も）は、PbとPnで15～20μmに収まっている。定性的な観察であるが、Pnにおける発芽は短径部位に集中している（図3）。このことは、細胞壁における構造的な弱さが関係しているかもしれない。

4.2 PbとPnの胞子発芽におけるUV照射とNTG処理に対する感受性

PbとPnの胞子発芽における差異を調べる目的で、UV照射およびNTG処理に対する感受性を確認した（図5、6）。UV照射は物理的突然変異原、またNTGは化学的突然変異原として知られ、ともに遺伝情報を担うDNAに対して前者は塩基間ダイマー（チミジンダイマー）の形成、後者は塩基置換を引き起こすことで遺伝子変異を誘発する。今回のUV照射処理は、以前の報告⁽⁹⁾に沿った条件で行われており、Pb胞子のUV感受性パターンの再現性が確認された。どちらの処理においてもPb胞子はPn胞子に比べて明らかに感受性が高いことが判明した。このことは、胞子当たりに保有する核数の違いに原因を求めることができるかもしれない。すなわち、Pbの突然変異株（巨大単核胞子を多数形成する変異株）を用いた実験において、この変異株の胞子は野生株のそれに比べてさらにUV感受性が高いことが示されている⁽⁹⁾。観察される巨大核は、DNA量の測定から複数の核の合体により形成されていることが確認されたにもかかわらず、機能的には単核として振舞った⁽⁹⁾。このことは胞子内の核数の減少を意味し、UV感受性を高めたと推察された。しかし、本実験における比較は、PbとPnという種間であることから、より慎重な議論が必要である。

UV照射による発芽抑制効果は、引き続き可視光照射により回復することが知られている（光回復）。胞子の発芽率が暗所と明所で変わらないことを確かめた上で、光回復の状況を調べた（表1）。10～15%まで胞子発芽率を低下させるUV照射

処理に対し、Pb および Pn とともに引き続く可視光照射により光回復が見られた。可視光の波長を変える実験から、Pb 胞子発芽の光回復には光回復酵素の存在が示唆されている⁽¹⁰⁾。今回の実験では、その程度には2種間で大きな違いがみられ、Pb では95%強まで発芽率が回復したのに対し、Pn では40%弱に止まった。Pb 胞子において、発芽率を1%以下に低下させた場合には、最も効果の高い385 nmの光でも光回復効果は30%であった⁽¹⁰⁾。このことは、Pn 胞子の方がより強く核(DNA)へのダメージを受けたことを示唆する。胞子の厚みはあるものの、図1に示す通りDAPI染色による核の存在状況を見る限りでは、PbとPnのどちらもUV照射は胞子内の各々の核に様に照射されると思われる。従って、同じ程度の発芽率低下(10~15%まで)でも、胞子当たり核をずっと多く保有するPn胞子の方が全体的にはダメージが強かったのかもしれない。同じ発芽率に対して、Pn胞子はPb胞子より3倍長くUV照射を受けていることが影響している可能性が考えられる。あるいは、光回復酵素自身の量や活性に2種間で違いが存在するのかもしれない。NTG処理による胞子の発芽率低下は可視光照射により回復することはなかった(表1)。この結果は予想通り、NTGの作用点はUV照射の場合と違い、その障害は光回復酵素では修復されないことを示している。

5. 謝辞

本研究は平成25年度石巻専修大学研究助成を受けて行われたもので、ここに謝意を表します。

6. 文献

- (1) 宮寄 厚 (2008) 微生物保存機関巡り (15). 日本微生物資源学会誌 24:153-154
- (2) Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (eds) (1987) PHYCOMYCES. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- (3) Shakya VPS, Idnurm A (2014) Sex determination directs uniparental mitochondrial inheritance in *Phycomyces*. Eukaryotic Cell 13:186-189
- (4) 出川洋介、酒井きみ (2004) 小田原市入生田におけるヒゲカビ(接合菌綱ゲカビ目)の記録. 神奈川自然誌資料 25:75-78
- (5) Van Laere AJ, Van Assche JA, Furch B (1987) The sporangiospore: Dormancy and germination. In: Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (eds) PHYCOMYCES. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 247-279
- (6) Rivero F, Cerdá-Olmedo E (1987) Spore activation by acetate, propionate and heat in *Phycomyces* mutants. Mol Gen Genet 209:149-153
- (7) Martínez-Cadena G, Saavedra-Calixto J, Messina-Valencia G, Domínguez-Gutiérrez G, Novoa-Martínez G (1995) Effect of carbon source and pH of the growth medium on spore germination in *Phycomyces blakesleeenanus*. Arch Microbiol 164:231-234
- (8) Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (1987) A biography of *Phycomyces*. In: Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (eds) PHYCOMYCES. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 7-26
- (9) Ootaki T, Orihara N, Umemura S, Yabe S, Miyazaki A (1991) A mutant of *Phycomyces blakesleeenanus* with a high proportion of uninucleate spores. Trans Mycol Soc Japan 32:87-102
- (10) Galland P (1996) Ultraviolet killing and photoreactivation of *Phycomyces* spores. Microbiol Res 151:9-17

