

ケカビ亜門ヒゲカビの胞子発芽における温度感受性と活性酸素種

宮寄 厚¹・千葉 千尋²・星 友莉恵³・佐藤 海名子⁴

On the spore germination characterized by its temperature sensitivity and ROS production in *Phycomyces* (Mucorales, Mucoromycotina)

Atsushi MIYAZAKI¹, Chihiro CHIBA², Yurie HOSHI³, Minako SATO⁴

^{1,2,4}*Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Miyagi 986-8580, Japan*

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 Mucoromycotina *Phycomyces*: *P. blakesleeanus* Burgeff (Pb) and *P. nitens* Kunze (Pn). In this report, we studied the differences between Pb and Pn on the spore germination characterized by its temperature sensitivity and production of reactive oxygen species (ROS) when cultured on PDAYC medium. Spore germination of strain NRRL1555 (–) and A56(+), the standard wild type in Pb, were characterized as follows: i) the spore germination started after 6-h culture at 20°C, and continued during the next 6 h until almost 100%. ii) the culture time until the spore germination changed to 9 h at 15°C, 3 h at 25°C, and about 5 h at 30°C, respectively. And the curves of germination rate at each temperature showed parallel manner. On the other hand, the spores of strain IFO9422 (–) in Pn germinated after 3-h culture, and at 5-h culture almost 100% germination rate was already observed. Future on the curves of germination rate at each temperature was same as those of Pb. ROS assay by NBT method showed that timing of the ROS detection was same between Pb and Pn, though the intensity of ROS production was stronger in Pn than Pb. Unexpectedly, we observed only the fluorescence showing NO production with a specific probe, which was localized in/on vacuoles.

1. はじめに

ケカビ亜門の糸状菌ヒゲカビ (*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 と Pn は、それらの胞子の大きさにより容易に区別することができる⁽¹⁾。故マックス・デルブリュックの提唱 (研究材料の統一性と公開性) 以来⁽²⁾、研究のほぼ全ては Pb またはそれ由来変異株により行われているが⁽³⁾、日本・小田原近辺における野外からの4年間にわたる分離報告では、分離菌12例はすべて Pn であった⁽⁴⁾。ヒゲカビの野生における分布や生態はまだよくわかっていない。

よく用いられる培養温度 (20°C) における Pb

と Pn の胞子発芽特性に関する私たちの研究により、発芽に至るまでの時間、胞子形態の変化、紫外線や突然変異原への感受性が両種で大きく異なることが明らかになった⁽¹⁾。Robbins らにより⁽⁵⁾、ヒゲカビ胞子の発芽が熱刺激 (48°C で数分~120分) により強く促進されることが発見されてから、ヒゲカビ胞子発芽の研究はもっぱら熱刺激の処方と発芽との関連が注目されており、胞子発芽の温度感受性についての報告は知られていない。

活性酸素種 (reactive oxygen species、以降 ROS) には、主にスーパーオキシド ($O_2^{\cdot -}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($OH^{\cdot}$) が知られ、動物や植物と同様に菌類においても発生

¹石巻専修大学理工学部生物科学科

²石巻専修大学大学院理工学研究科生命科学専攻 修士課程2年

³石巻専修大学理工学部基礎理学科 平成25年度卒業生

⁴石巻専修大学理工学部生物科学科 平成29年度卒業生

や分化に重要な役割を担っていることが知られる⁽⁶⁾。胞子の発芽に関しては、子囊菌 *Aspergillus nidulans* を用いた研究において、発芽直前に胞子内での ROS 発生とその偏在が検出され、胞子発芽の先導に関与していることが示唆されている⁽⁷⁾。担子菌 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* の胞子発芽と菌糸伸長では、ROS と NO (nitric oxide 一酸化窒素、広義には ROS に含まれる。窒素の含有に着目して、RNS (reactive nitrogen species) の一種とされることも多い。) の両者における存在バランスが重要であると報告されている⁽⁸⁾。しかし、同様な研究例はヒゲカビを含むケカビ亜門では乏しい現状にある。

そこで本研究では、ヒゲカビ胞子の発芽特性をより理解するために、培養温度による影響と子囊菌門や担子菌門菌類において発芽との関連が指摘される活性酸素種 ROS (NO を含む) の動向を調べた。

2. 材料と方法

2.1 材料と培地

Pb には、菌株で最も利用されており標準野生株として扱われる NRRL1555 (−) 株と A56 (+) 株を用いた。また、Pn には、成長や形態形成の状況がよい IFO9422 (−) 株を用いた。これらの菌株は本学に系統保存されている。培地には、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℃、15 分) し、チアミン塩酸 (0.5 mg/L) を加えた栄養補強 PDAYC 培地 (以降、PDAYC 培地) を用いた。

2.2 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から次の操作に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。その胞子懸濁液を 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。保存は 1 ヶ月以内とし、それを超える場合には再度回収作業を行った。

2.3 胞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 (ヒートショック処理) を行った胞子懸濁液をコンラージ棒で塗布して暗所、インキュベーター内にて一定の温度で培養した (スライドグラス培養)。塗布量は、胞子の大きさを考慮して Pb においては 10^5 個/スライド、Pn においては 10^4 個/スライドとした。培養開始後一定時間ごとにスライドグラスを取り出し、光学顕微鏡 (CH-2、オリンパス) と顕微鏡カメラ (MacWin130MW、サイエンス・アイ)、解析ソフト DinoXcope と PC (iBook G4、アップル) の組合せを用いて胞子の写真を撮影した。発芽率は 400~500 胞子の計測を 1~3 回行った結果を使って算出した。

2.4 胞子培養と ROS の検出

5 mL チューブに PDAYC 培地を 2 mL 分注した上に 1 cm 四方の透析シートを敷いたチューブ培地を作製し、20℃ にセットしたブロックインキュベーター (CTU-min、タイテック) に一定時間以上において培地温を一定に保った。ヒートショック処理をした胞子懸濁液を 5 μ L 滴下 (Pb, 6.7×10^4 ; Pn, 6.7×10^3 個)、一定時間の培養後 (チューブ培養)、チューブに 2.5 mM ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 溶液を 20 μ L 滴下して暗所、20℃ で 30 分間の反応後、シートごと胞子を取り出して生物顕微鏡で写真撮影した (NBT 法⁽⁷⁾)。撮影には光学顕微鏡 (エクリプス E200、ニコン) を用い、ROS の検出状況と発芽率を調べた。計測には画像解析ソフト ImageJ (Fiji 版) を用いた。

2.5 ROS の蛍光観察

ROS の種類を特定する目的で、各種 ROS に特異的な蛍光試薬を使って蛍光観察 (エクリプス Ni と DS カメラコントロールユニット DS-U3 の組合せ、ニコン) を行った。NBT 法により十分な ROS 産生が起こっていると考えられる 3 時間のチューブ培養における状況を観察した。H₂O₂、O₂^{•−}、OH[•] の検出には、それぞれ Cell Meter™

細胞内蛍光過酸化水素アッセイ (AAT Bioquest、販売元コスモ・バイオ)、MitoROSTM580 (AAT Bioquest、販売元コスモ・バイオ)、Cell MeterTM ミトコンドリア特異的ヒドロキシラジカル検出キット (AAT Bioquest、販売元コスモ・バイオ) を用いた。また、NO (一酸化窒素) は、DAF-FMDA (五稜化薬) により検出した。観察に際し、胞子と試薬との反応温度や時間は各試薬の取扱説明書に従った。

3. 結果

3.1 胞子発芽と培養温度

標準の培養条件である 20℃、暗所における胞子発芽は、Pb (A56(+)) では培養開始後 6 時間から 12 時間、また Pn (IFO9422(-)) では 3 時間から 5 時間にかけて起こりほぼ 100% に達した (図 1)。培養温度を 5℃ 刻みで変化させたところ、Pb の胞子発芽では、培養開始からの時間は、9~15 時間 (15℃)、3~9 時間 (25℃)、約 5~9 時間 (30℃) と変動した。面白いことに、発芽率の上昇曲線は標準とした 20℃ の曲線とほぼ平行関係にあった (図 1 上段)。一方 Pn の胞子発芽では、培養開始

からの時間は、5~7 時間 (15℃)、2~4 時間 (25℃)、4~7 時間 (30℃) と変動し、発芽率上昇曲線は Pb と同じく 20℃ の曲線の平行移動となった (図 1 下段)。Pb と Pn に共通して、発芽までの時間は 20℃ を標準とした場合、15℃ で遅く、25℃ で早くなった。30℃ では Pb は 20℃ とほぼ同様、Pn は 20℃ より遅くなった。

なお、10℃ および 35℃ では少なくとも 15 時間までは Pb と Pn の両種とも発芽は全く見られなかった。また、一連の結果は、Pb (NRRL1555(-)) でも同様であった。

3.2 NBT 法による ROS 検出

NBT が活性酸素種により還元されて不溶性のブルーホルマザンを生じることを利用して ROS の検出を簡便に行うことができる。子囊菌 *Aspergillus nidulans* で用いられた方法⁽⁷⁾ をケカビ亜門ヒゲカビに適用した。

Pb および Pn においてブルーホルマザンの形成 (染色) が見られ、ヒゲカビ胞子発芽に際しても ROS の発生が確認された (図 2 右写真)。染色性は Pn の方が Pb より強かった。また、Pn では染色が偏在する傾向にあった。培養時間に伴い染色が確認される割合を調べたところ、予想に反して Pb と Pn とも 2 時間後には 60% またはそれを超える染色割合を示した (図 2 左グラフ)。その後染色割合はなだらかに上昇を続け、Pb では 6 時間後、Pn では 4 時間後に 100% に達した。

3.3 ROS 分子の蛍光観察

NBT 法により検出された ROS の本体分子を特定するために、各種 ROS に特異的とされる蛍光試薬を用いた観察を行った。NBT 法により ROS が確実に発生している 3 時間培養における結果は、予想に反して NO のみ蛍光 (緑色) が観察された (図 3)。試薬の取扱説明書にある標準操作では、細胞全体が強く蛍光しており、反応が飽和していてバックグラウンドが高くなっている可能性が考えられた。そこで、反応条件を NBT 法に準じて再度観察したところ、液胞部分のみが蛍光を発していた (図 4)。この結果は、ヒゲカビの胞子発芽においては、NBT 法と蛍光法による ROS の存在場所が一致しないことを示した。

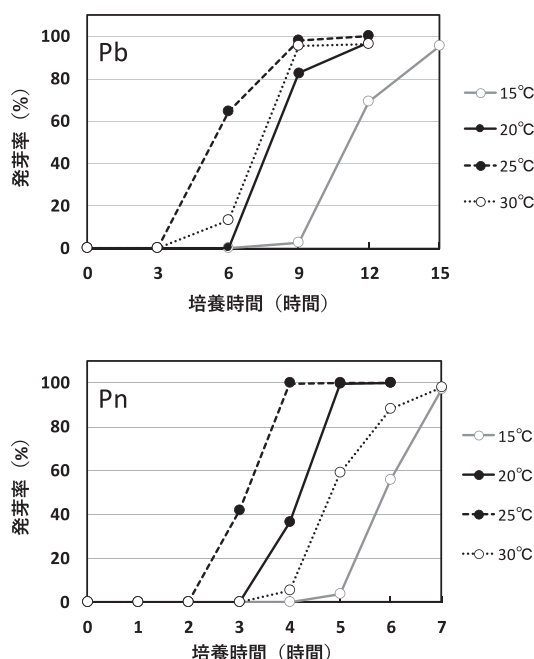


図 1. ヒゲカビ Pb (上段) と Pn (下段) の各温度における発芽率。横軸の培養時間のスケールに注意。

ケカビ垂門ヒゲカビの胞子発芽における温度感受性と活性酸素種

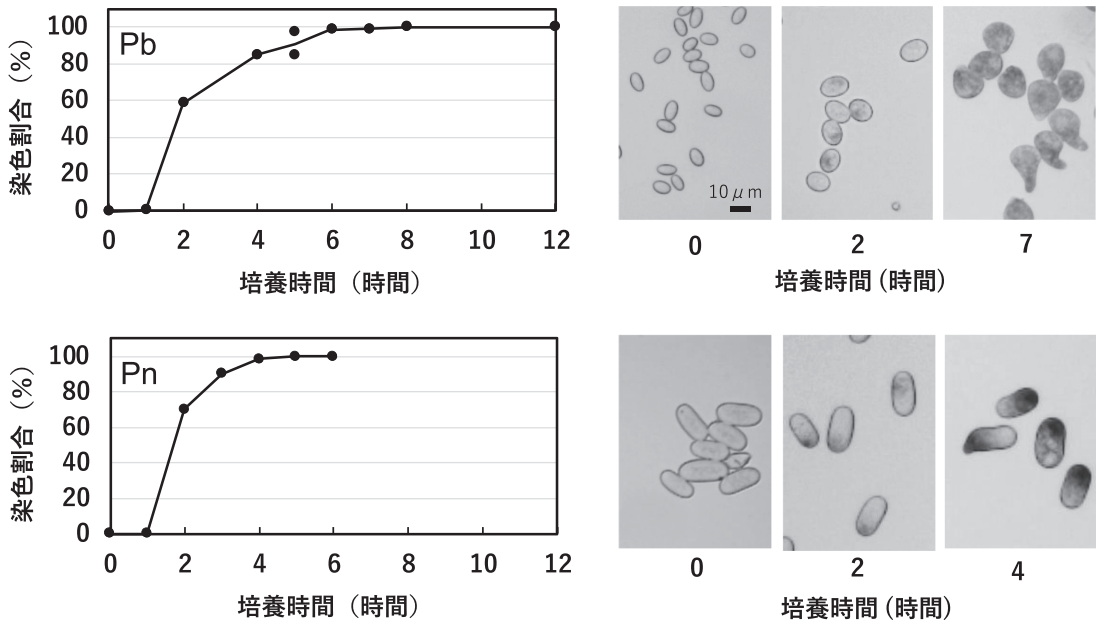


図2. ヒゲカビ Pb (上段) と Pn (下段) の NBT 法による ROS 検出
 左のグラフは ROS 染色が見られた胞子の割合、右の写真は各培養時間における染色 (青色) の状況を示す。

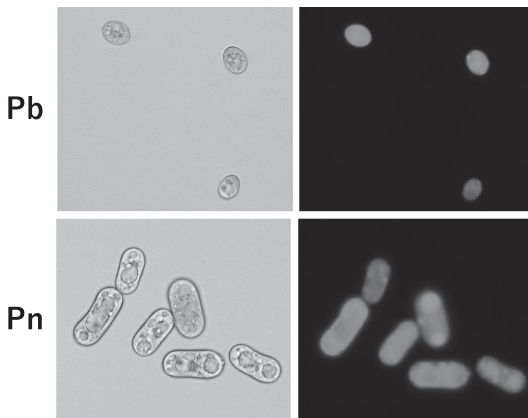


図3. ヒゲカビ Pb (上段) と Pn (下段) における NO の蛍光検出
 3 時間培養した胞子を標準操作により反応 (37℃、1 時間) させて蛍光 (緑色) を観察した。

4. 考察

4.1 Pb と Pn における胞子発芽の温度感受性

ヒゲカビ胞子を利用した研究は、Pb を中心に構成物質分析や細胞壁構造⁽⁹⁾、休眠や発芽条件^{(熱や有機酸処理の効果^(9,10)、糖質と pH の効果⁽¹¹⁾、発芽時における代謝変動、特にトレハロース代謝⁽⁹⁾、等多岐に亘り行われてきた。しかし、}

発芽における温度感受性を調べる研究や材料として Pn を用いた研究はほとんど行われてこなかった。

ヒゲカビの生理に関する研究は 20℃ を標準として行われるが、培養温度を 10℃ から 35℃ まで 5℃ 刻みに調整して胞子発芽を観察したところ、Pb と Pn とともに 10℃ と 35℃ では発芽が見られなかった。発芽までの時間は 15℃ になると標準の 20℃ より遅れるが、その後は正常に発生が進行した (データ未記載)。しかし、30℃ では発芽は見られたもののその後は菌糸生長が異常となり発生が正常に進行しなかった (データ未記載)。したがって、ヒゲカビ胞子の発芽温度範囲は 15℃ 付近から 30℃ 未満と考えられる。25℃ で培養を行うと、発芽は 20℃ より早くなり、また正常な発生を行うことから、ヒゲカビの胞子発芽における至適温度は 25℃ 付近にあると推察される (図 1)。種々の菌類における胞子発芽の至適温度をまとめたデータによると、10℃ 以下を好む菌類が存在する一方、30℃ を超えた温度に至適をもつ菌類も存在し、胞子発芽の至適温度は多様性が高い⁽¹²⁾。

胞子発芽までの時間が Pb と Pn において大きく異なることは、吸水力や発芽に働く酵素の量や

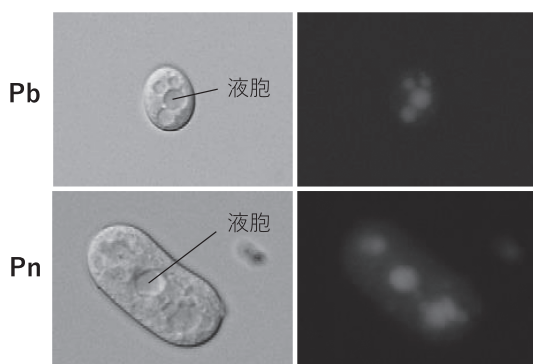


図4. ヒゲカビ Pb (上段) と Pn (下段) における NO の蛍光検出
3 時間培養した胞子を NBT 法に準じて反応 (20℃、30 分
間) させて蛍光 (緑色) を観察した。

活性における違いを反映しているのかもしれない。面白いことに、各培養温度における発芽率上昇曲線は平行関係になった (図 1)。このことは、温度に依存した発芽の律速段階が極少数であること、または複数の過程が同程度に代謝変動していることを示唆している。

4.2 NBT 法による ROS 検出からみた Pb と Pn の胞子発芽

Pb と Pn の胞子発芽までの時間は大きく異なることから (図 1)、ROS 発生が胞子発芽に直接的に関与するなら、その発生の経時変動も同様な経時特性を持つと推察して実験を行なった。しかし、結果は Pb と Pn においてほぼ同じ経時変動を示した (図 2)。発芽しない胞子は ROS の発生が見られないことから、ROS の発生は発芽に関連していることは確かである。ブルーホルマジンによる染色性から判断される ROS 発生量は局所的に見れば Pn の方が Pb よりかなり多いと考えられる (図 2 右写真)。したがって、ヒートショック処理を受けてから ROS 発生が誘導されるタイミングは両種において代謝的差異はないが、その後に行進する ROS 発生量や ROS 依存的な発芽誘導過程には代謝的差異が生じていることが想定される。この差異が Pb と Pn における胞子発芽までの時間的差異を引き起こしているのかもしれない。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⁽¹⁾、この違いが代謝的差異に関係しているかも

しれない。

4.3 ROS 分子の特定

ROS 分子特異的な蛍光試薬を用いて、NBT 法により検出された ROS の本体分子を特定する実験を行った。その結果、蛍光を検出することができたのは NO のみであった (図 3)。これまで、NBT 法による ROS は主にスーパーオキシドの動向を見ているとして議論されてきたが、これらの結果は子囊菌や担子菌を用いた研究である^(7,8)。ヒゲカビ以外のケカビ亜門の菌類を用いたさらなる研究が必要と思われる。

試薬との反応条件を調整することにより、NO の検出される場所は液胞部分であることが判明した (図 4)。今回の観察では、液胞膜なのか液胞内部も含むのかはわからない。3 次元的な解析が可能な共焦点レーザー顕微鏡の利用が望まれる。

NO が液胞部分に発生していた観察結果は、NBT 法による ROS の発生部位 (ブルーホルマジンの染色部位) を説明できない。少なくともヒゲカビ胞子発芽においては、NBT 法はスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル以外の ROS の動向を検出していると考えられる。蛍光観察法ではないが、ヒゲカビの光依存的な胞子嚢柄発生では、NO の発生とその合成酵素が関与することを示す報告がある⁽¹³⁾。このことは、ヒゲカビの発生現象では、ROS のうち NO が重要な役割を担っていることを示唆している。

5. 謝辞

本研究の一部は平成 31 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, 佐々木勝裕, 星 友莉恵, 石巻専修大学研究紀要 27(2016)11-17.
- (2) 大瀧 保, 日菌報 40(1999)65-76.
- (3) E.Cerdá-Olmedo, E.D.Lipson (eds) PHYCOMYCES. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1987)430pp.
- (4) 出川洋介, 酒井きみ, 神奈川自然誌資料 25(2004)75-78.

- (5) W.J.Robbins, V.W.Kavanagh, F.Kavanagh, Bot. Gaz.104 (1942) 224-242.
- (6) P.Tudzynski, J.Heller, U.Siegmund, Curr. Opinion in Microbiol.15 (2012) 653-659.
- (7) C.P.Semighini, S.D.Harris, Genetics 179 (2008) 1919-1932.
- (8) S.Yin, Z.Gao, C.Wang, L.Huang, Z.Kang, H.Zhang, Front.in Microbiol.7(2016) Article 178.
- (9) A.J.Van Laere, J.A.Van Assche, B.Furch, In: Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (eds) PHYCOMYCES. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1987) 247-279.
- (10) F.Rivero, E.Cerdá-Olmedo, Mol.Gen.Genet. 209 (1987) 149-153.
- (11) G.Martínez-Cadena, J.Saavedra-Calixto, G. Messina-Valencia, G.Domínguez-Gutiérrez, G.Novoa-Martínez, Arch.Microbiol.164 (1995) 231-234.
- (12) D.H.Griffin, Fungal Physiology, 2nd ed. Wiley-Liss, New York (1994) 375-398.
- (13) J.Maier, R.Hecker, P.Rockel, H.Ninnemann, Plant Physiol.126 (2001) 1323-1330.