

森林性二形性真菌の培養形態*1

畑 邦彦*2 · 大楠美佐子*3 · 川本 進*3 · 曾根晃一*2

畑 邦彦・大楠美佐子・川本 進・曾根晃一：森林性二形性真菌の培養形態 九州森林研究 60：9-12, 2007 栄養増殖形態として菌糸状の細胞と酵母状の細胞を有する二形性真菌の森林における存在意義を探る一助として、甲虫類と関係の深い3種と黒色真菌2種の培養試験を行い、いくつかの培地で栄養増殖形態を観察した。その結果、非酵母の黒色真菌 *Rhinoctadiella* sp. を除く4種で菌糸と酵母の両形態が確認された。酵母状のアンプロシア菌 *Hormoascus* sp. は基本的に酵母として成長したが、寒天培地では菌糸も出現した。カシノナガクイムシ坑道由来の *Raffaelea quercivora* とマツ枯死材由来の青変菌 *Ophiostoma minus*、黒色酵母 *Aureobasidium pullulans* は基本的に菌糸だったが、液体培地では酵母も比較的よく出現した。特に *R. quercivora* と *O. minus* は寒天培地と液体培地という基質の違いによく反応した。

キーワード：二形性、酵母、菌糸、甲虫共生菌、黒色真菌

Hata, K., Ohkusu, M., Kawamoto, S. and Sone, K.: Dimorphic growth of several forest fungi on culture Kyushu J. For. Res. 60 : 9 -12, 2007 Morphology of three species of symbiotic fungi with beetles and two species of dematiaceous fungi were observed on several artificial culture media. As a result, both hypha and yeast form were observed for 4 species except for *Rhinoctadiella* sp., dematiaceous but not black yeast species. *Hormoascus* sp., a yeast-like symbiont of ambrosia beetle, grew mainly as yeast, but hyphal form also appeared on agar media. *Raffaelea quercivora* isolated from the gallery wall of ambrosia beetle, blue stain fungus *Ophiostoma minus*, and black yeast *Aureobasidium pullulans* grew mainly as hypha, but yeast form also frequently appeared on liquid culture. *R. quercivora* and *O. minus* were relatively sensitive to the difference in agar and liquid culture.

Key words: dimorphism, yeast, hypha, symbiotic fungus with beetle, Dematiaceous fungus

I. はじめに

真菌類において二形性・多形性は様々な局面で見られるが、特に重要なのが栄養増殖形態として菌糸状の細胞と酵母状の細胞の両形態を有する真菌類のことを二形性真菌と呼ぶケースである。このような菌糸・酵母の二形性は医真菌学などの分野では良く知られており、例えば人間に重篤な病気を引き起こす真菌で、環境中では菌糸状に生育するが、人体組織内では酵母状の生育を行うものは少なくない(山口, 2005)。

森林性の真菌類においても様々な菌が二形性を示すことが知られている。例えば、畑ほか(2004)はナラカシ類の集団枯損を引き起こす *Raffaelea quercivora* が菌糸だけでなく酵母形態を有していることを報告しているし、昆虫寄生性の糸状菌が虫体内で hyphal body と呼ばれる酵母状の形態で生育することはよく知られている(鳥津, 2000)。樹木病原菌でも *Exobasidium* (モチビョウキン) 属など酵母状の生育形態が知られている菌は少なくない(小林ほか, 1992)。

しかしながら、これら森林性の二形性真菌はその普遍性の割に注目度は低く、何故そのような生活形が森林に生息する真菌類の間に広く存在するのかという意義はよく分かっていない。畑ほか

(2004) は、液体培地か寒天培地かという基質の違いが *R. quercivora* などキクイムシの共生菌の形態形成に強く影響することを示しており、このような基質の物理性の違いに対する反応がそれらの菌の生息環境への適応を反映している可能性を論じている。そこで、このような森林性の真菌が持つ二形性の生態的意義を探る一助として、異なる分類群、生態群に属する二形性真菌、具体的には甲虫類の共生菌と、いわゆる黒色真菌とに着目し、異なる培地における培養形態の観察を行い、その結果を比較した。

甲虫の共生菌には酵母状に生育する菌がしばしば知られており、特にキクイムシにおいては養菌性キクイムシにおけるアンプロシア菌(梶村, 2000)、樹皮下穿孔性キクイムシにおける青変菌(山岡, 2000)など、森林性の真菌として重要性の高いものが多い。一方、黒色真菌とはメラニン色素を持ち、菌糸が黒色を呈する糸状菌の総称だが(医真菌学でしばしば使われる表現である)、それら黒色真菌の中には *Aureobasidium* 属や *Exophiala* 属などしばしば黒色酵母(black yeast)と呼ばれる二形性菌のグループが存在している(de Hoog and Hermanides-Nijhof, 1977)。黒色酵母を含む黒色真菌は森林でも極めて普遍的に存在している。これら甲虫の共生菌と黒色真菌は生態的な位置付けも異なり、かつ異なる分類群の菌が含まれることから、比較調査の対象として

*1 Hata, K., Ohkusu, M., Kawamoto, S. and Sone, K.: Dimorphic growth of several forest fungi on culture

*2 鹿児島大学農学部 Fac. Agric. Kagoshima Univ., Kagoshima 890-0065

*3 千葉大学真菌医学研究センター Res. Cent. for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba Univ., Chiba 260-8673

表-1. 各培地における各供試菌株の培養形態。
Table-1. Morphology of the cells of the test strains in each culture media.

| | Liquid culture | | | | | | Agar culture | | | | | |
|-----|----------------|-----|-----|-----|------|-----|--------------|-----|-----|-----|------|-----|
| | PDB | | MEB | | YPGB | | PDA | | MEA | | YPGA | |
| | Y | H | Y | H | Y | H | Y | H | Y | H | Y | H |
| H1 | +++ | ± | +++ | - | +++ | - | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| O1 | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ |
| O2 | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ |
| R1 | ++ | +++ | +++ | ++ | + | +++ | - | +++ | + | +++ | - | +++ |
| R2 | ++ | +++ | +++ | ++ | + | +++ | + | +++ | ++ | +++ | + | +++ |
| A1 | ++ | +++ | ± | +++ | - | +++ | - | +++ | - | +++ | + | +++ |
| A2 | ++ | +++ | ± | +++ | ++ | +++ | - | +++ | - | +++ | - | +++ |
| Rh1 | - | +++ | - | +++ | -* | +++ | - | +++ | - | +++ | - | +++ |

Y: 酵母形態 yeast form H: 菌糸形態 hyphal form

-: 観察されない。Not observed.

±: それらしいものがわずかに観察される。Suspicious cells of that form rarely observed.

+: 存在は確認できるが、多くはなく、確認に手間取る。Certainly existed but rare.

++: かなりの量が存在し、容易に確認できる。Easily distinguishable.

+++ : 菌体の大半を占める。Most of the cells were that form.

*: 数細胞の塊状体がかかり出現。Masses of several cells were considerably formed.

菌種の並び順は酵母が安定して出現しやすい傾向のある順とした。

The order of the fungal species follows the tendency to form yeast form more consistently.

H1: *Hormoascus* sp. O1, O2: *Ophiostoma minus* R1, R2: *Raffaelea quercivora*

A1, A2: *Aureobasidium pullulans* Rh1: *Rhinoctadiella* sp.

PDB: Potato Dextrose Broth

PDA: Potato Dextrose Agar

MEB: Malt Extract Broth

MEA: Malt Extract Agar

YPGB: Yeast Peptone Glucose Broth

YPGA: Yeast Peptone Glucose Agar

好都合であると思われる。

今回は、畑ほか (2004) で報告したキクイムシの共生菌 2 種のデータに、別の 3 種の真菌類での観察結果を加えて報告する。

II. 材料及び方法

供試菌として、畑ほか (2004) で観察を行った①ナラ・カシ・シイ類集団枯損の病原菌であり、その際ベクターである養菌性キクイムシ (カシノナガキクイムシ *Platypus quercivorus*) の外部共生菌となっている *Ophiostoma* に近縁の真正子囊菌系不完全菌 *Raffaelea quercivora* (Jones and Blackwell, 1998), ②養菌性キクイムシ (ヤチダモノナガキクイムシ *Crossotarsus nipponicus*) の外部共生菌である半子囊菌の酵母 *Hormoascus* sp. (Kurtzman and Robnett, 1995) に加え、③マツノザイセンチュウの主要な餌であり、マツノマダラカミキリなどマツ枯死材内の二次性甲虫類とも密接な関係があるとされている青変菌 *Ophiostoma minus* (前原, 2000), ④森林では樹木の葉面やリター表面等で見られる黒色酵母の一種 *Aureobasidium pullulans* (二井・畑, 2000), ⑤カシノナガキクイムシの古い坑道より分離された黒色真菌 (古い坑道という分離状況から甲虫自体との直接の共生関係はないと思われ、また黒色酵母ではない) *Rhinoctadiella* sp. の計 5 種を用いた。この中で *Hormoascus* sp. は菌糸状形態はあるものの通常は酵母として生育する菌、*Rhinoctadiella* sp. は酵母形態を持たない通常の糸状菌であり、これらの菌の採用には、通常は糸状菌で条件によって酵母形態になる他三種に対する正負のコントロールとしての意味合いがある。供試菌株は、*R. quercivora* についてはマテバシイのカシノナガキクイムシ坑道より分離された R01031303 株 (以下本論文内での仮称として R 1 株とする) とミズナラのカシノナガキクイムシ坑道由来の a-7-2 株 (R 2 株),

Hormoascus sp. ではミズナラのヤチダモノナガキクイムシ坑道由来の F20-1 株 (H 1 株), *O. minus* ではアカマツの材線虫による枯死木由来の 020821 株 (O 1 株) と 031126 株 (O 2 株), *A. pullulans* ではクロマツ落葉より分離された A 1 株と A 2 株, *Rhinoctadiella* sp. ではマテバシイのカシノナガキクイムシ坑道より分離された Rh 1 株の計 8 株を用いた。なお、R 1 株と Rh 1 株は同一林分 (鹿児島県桜島) のマテバシイ枯死木より分離されたものである。

培地は、三種類の組成について、それぞれ寒天培地と液体培地として用いた。それぞれポテトデキストロース寒天培地 (PDA) 及び液体培地 (PDB), 2% 麦芽エキス寒天培地 (MEA) 及び液体培地 (MEB), YPG (1% 酵母エキス, 1% ペプトン, 1% グルコース) 寒天培地 (YPGA) 及び液体培地 (YPGB) である (寒天はいずれも 2%)。これらを 20°C で 12 日間培養し (液体培地は 100rpm で振盪培養), ノマルスキー型微分干渉顕微鏡 (OLYMPUS BX-60 および BX-51) により観察を行った。

なお、ここでは真菌類の単細胞栄養増殖形態、すなわち単細胞から単細胞が生じる形で栄養増殖を行っている細胞を酵母とみなしている。従って、酵母か否かの判断基準としては出芽状態の細胞の有無を用いている (菌糸の発芽とは形態が異なる)。また、胞子と比較して細胞のサイズが不均一になりやすいので、それも判断の目安とできる場合が多い。

III. 結果

各供試菌株がそれぞれの培地において示した生育形態を表-1 に示した。*Hormoascus* sp. の場合、液体培地ではほぼ酵母として生育したが、寒天培地では菌糸もかなり出現した。*O. minus* は寒天培地では基本的に菌糸として生育したが、酵母も容易に出現し、

液体培地ではむしろ酵母が優勢であった。*R. quercivora* については、寒天培地では概ね菌糸として生育したが、酵母も見られた。液体培地では酵母は安定してかなり出現し、MEBではむしろ酵母が優勢であった。*A. pullulans* は概ね菌糸として生育し、特に寒天培地では酵母はあまり出現しなかったが、いくつかの液体培地では酵母も出現した。一方、*Rhinocladia* sp. は専ら菌糸で生育し、酵母は出現しなかった。ただし、酵母ではないが、YPGB培地では数細胞からなる塊状の栄養体が出現した。

以上のように、全く酵母の出現しなかった *Rhinocladia* sp. を除く4種においては、いずれの菌でも酵母は液体培養の方が寒天培養より出現しやすく、逆に菌糸は寒天培養の方が液体培養より出現しやすいという傾向が見られた。例えば、同一の栄養分組成で比較した場合に寒天培養の方が液体培養より明らかに酵母が多く見られたのは一例（A 1株の YPG 培地）のみであった。ただし、酵母形態の出現しやすさの度合いは種によって異なり、*O. minus* と *R. quercivora* において全ての液体培地で酵母形態が安定して存在していたのに比べ、*A. pullulans* では液体培養でも酵母形態が出現しない、あるいはしにくい場合がしばしば見られた。

IV. 考 察

以上のように、寒天培地か液体培地かという基質の物理的な特性がこれら二形性真菌の形態形成に重要な意味を持つと考えられた。二形性真菌の形態形成は *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans* などヒトの病原菌でよく研究されており、これらヒト病原真菌で二形性を決定する要因としては温度や栄養条件がよく知られている（山口, 2005）。ヒトの病原性真菌が腐生状態では菌糸、生体内では酵母として生育するケースはしばしば知られており（山口, 2005）、それらの要因はそういった生活史を反映するものと考えられる。今回目立った基質の物理的特性の違いに対する反応は二形性菌を培養する際にしばしば見られる性質ではあるが、やはりこれらの菌の生活史を反映している可能性がある。例えば、甲虫類と密接な共生関係にある *Hormoascus* sp., *R. quercivora*, *O. minus* については酵母も菌糸も比較的出現しやすいという結果が得られ、こういった菌において二形性が甲虫との共進化の過程で獲得された可能性が考えられる。これらの菌はしばしば甲虫の作った坑道や蛹室の表面に生息するとともに、樹木の材組織中への伸長、甲虫の菌嚢などでの運搬に対応する必要がある（梶村, 2000; 山岡, 2000）。こういった複数の生息環境を経験する菌が、外部環境、例えば周囲に水が存在するかどうかに反応して菌糸形態も酵母形態も容易に取りうるという性質を持っていれば、適応的に有利となりうるかもしれない。*A. pullulans* は基質の違いにそこまで敏感ではなかったものの、今回の条件でも菌糸と酵母の両形態を示した。黒色酵母は腐生菌としてしばしば生葉や落葉落枝などの基質表面に生息している（二井・畑, 2000）。乾湿の差が激しい基質表面という環境は、二形性を持つ真菌が周囲の水分環境に反応して菌糸と酵母を使い分けことが出来れば有利となりうるかもしれない。

一方、半子囊菌綱に属する *Hormoascus* sp. が基本的に酵母であったのに対し、真正子囊菌綱である他4種は基本的には菌糸で

生育した。半子囊菌は基本的に酵母、真正子囊菌綱は基本的に糸状菌であることから、このこと自体はごく妥当な結果であるが、これに加えて、近縁種である *O. minus* と *R. quercivora* は基本的に菌糸として生育するが液体培地では比較的容易に酵母形態を生じるといった比較的類似した形態形成パターンを示したのに対し、真正子囊菌中では分類群的に両種と離れている *A. pullulans* については今回の培養条件では両種に比べて酵母形態が出現しにくく、*Rhinocladia* sp. は酵母にならなかった。このことは、二形性の出現パターンは分類群と関係がある可能性を示唆する。すなわち、液体培地で酵母が出現しやすくなるという性質は、二形性を示す真菌類の中でも分類群によってその度合いが決まっている可能性が考えられた。

今回は限られた分類群・生態群での試験であったが、それでも森林性真菌における二形性の意義をある程度示唆する結果が得られた。今後は植物や昆虫の病原菌、担子菌類など他の生態群や分類群の森林性二形性菌についても調査を進める必要があると思われる。

謝 辞

本研究は千葉大学真菌医学研究センター共同利用研究として行われた。また、R 2株及びH 1株は森林総合研究所の升屋勇人博士より、O 1株及びO 2株は京都大学大学院農学研究科の二井一禎教授より御提供いただいたものである。厚く御礼申し上げる。

引用文献

- de Hoog, G. S. and Hermandes-Nijhof, E. J. (1977) *Stud. Mycol.* 15: 1-222.
- 二井一禎, 畑邦彦 (2000) 落葉分解に関与する植物の内部共生菌—見えざる共生者・内生菌とその生態学的位置づけ—. (森林微生物生態学. 二井一禎・肘井直樹編, 322pp, 朝倉書店, 東京). 27-39.
- 畑邦彦ほか (2004) 九州森林研究 57: 117-119.
- Jones, K. G. and Blackwell, M. (1998) *Mycol. Res.* 102: 661-665.
- 梶村恒 (2000) 微生物を“栽培”する繁殖戦略—養菌性キクイムシとアンブロシア菌—. (森林微生物生態学. 二井一禎・肘井直樹編, 322pp, 朝倉書店, 東京). 179-193.
- 小林享夫ほか編著 (1992) 植物病原菌類図説. 685pp, 全国農村教育協会, 東京.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1995) *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1): S824-S830.
- 前原紀敏 (2000) 微生物と線虫を利用する昆虫の繁殖戦略—マツノマダラカミキリによるマツノザイセンチュウの伝播—. (森林微生物生態学. 二井一禎・肘井直樹編, 322pp, 朝倉書店, 東京). 196-207.
- 島津光明 (2000) 昆虫から栄養摂取する微生物—昆虫疫病菌類による昆虫の病気—. (森林微生物生態学. 二井一禎・肘井直樹編, 322pp, 朝倉書店, 東京). 126-136.
- 山口英世 (2005) 病原真菌と真菌症第3版. 193pp, 南山堂, 東京.

山岡裕一 (2000) 微生物による繁殖源の創出—樹皮下キクイムシと青変菌—. (森林微生物生態学. 二井一禎・肘井直樹編, 322pp, 朝倉書店, 東京), 148-162.

(2006年11月14日受付; 2007年1月4日受理)