

クモの網に捕集される菌類の多様性調査のための手法開発 ー ジョロウグモを対象とした新手法の評価ー

安富 将吾（筑波大学生物学類） 指導教員：岡根 泉（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

クモの網には様々なバイオエアロゾルが捕集されることが知られ、クモの網の捕集物を調べることで、生態系の理解やアレルギー対策などに繋がることを期待されている。

しかし、これまでの研究は調査対象として花粉に主眼を置いたものがほとんどであり、クモの網に捕集される菌類を調査する方法は確立に至っていないのが現状である。先行研究では、採集したクモの網を塩酸で溶かし、残った胞子を観察するという手法がとられているが (Bera et al., 2002)、この手法では菌が死滅し DNA も破壊されるため、菌の分離・培養やゲノム解析ができないという問題がある。

そこで本研究では、クモの網に捕集される菌類の多様性調査のための適正な手法の確立のために、「菌を死滅させずにクモの網だけを除去する手法」と「菌類の胞子がクモの網に付着している様子を観察する手法」を検討・開発することを目的とした。そして、これらの手法の適用の可否を評価するため、ジョロウグモ (*Trichonephila clavata*) の網を対象に、菌類相調査を行った。

【手法の開発】

○ 直接接種法

採集したクモの網を素寒天培地に直接接種し、発生したコロニーから菌を分離して PDA 培地に移植し培養する手法を検討した。

○ クモ網破砕法

クモの網を乳鉢に入れ、5%重曹水 1 ml を加えて乳棒を用いて約 15 分間すり潰すことで、クモの網を破砕し溶解させることに成功した。得られたサンプル溶液を培地に塗布したところ、コロニー発生が見られたことにより、溶液中の菌の生存が確認された。

○ クモ網プレパラート

クモの網とスライドガラスおよびカバーガラスをしっかりと接合させクモの網の破損を防ぐための接着剤兼緩衝材として、グリセリンとゼラチンを混合しマウントゼリーを作製した。プレパラートの作製については、マウントゼリーを塗布したカバーガラスとスライドガラスでクモの網を挟み込み、カバーガラスの外縁に沿って網からプレパラートを切り出した。

【調査方法】

筑波大学の実験排水処理施設の西側のクリ林にて、6 つのジョロウグモの網を対象にサンプリングを行った。まず、網の左右の半円からプレパラートを 1 枚ずつ切り出し、網の残りの部分は飲料用プラスチックストローで巻き取って採集した。

採集したクモ網サンプルについて、直接接種法で得られた胞子とクモ網破砕法のサンプル溶液からプレパラートを作製した。

3 通りの手法により得られたプレパラートを、光学顕微鏡を用いて観察した。観察できた胞子について、形態観察にもとづいて同定およびグループ分けを行った。

【結果】

全体として、*Alternaria* 属、*Cladosporium* 属、*Curvularia* 属、*Monochaetia* 属、*Nigrospora* 属、黒穂胞子に類似した 6 種類の菌と上記以外に 25 グループの菌の、合計 31 グループが確認された。

確認された菌類のグループ数について、3 通りの手法と 6 つの実験区の対応をまとめた (表 1)。直接接種法では、1 実験区あたり 1~3 グループの菌が分離されたが、一部では孢子形成が見られず、胞子を観察できた菌は合計 7 グループとなった。クモ網破砕法とクモ網プレパラートでは共に合計 28 グループの菌が確認されたが、クモ網プレパラートではクモ網破砕法に比べて、実験区ごとに見られた菌のグループ数の差異が大きい傾向があった。

表 1：ジョロウグモの網サンプル A~F および全体における 3 手法を用いた孢子形態観察によって確認された菌のグループ数

サンプル	直接接種法	クモ網破砕法	クモ網プレパラート
A	1	18	9
B	3	15	5
C	3	14	14
D	2	13	25
E	3	18	26
F	2	13	10
平均	2.33	15.17	14.83
全体	7	28	28

【考察・結論】

直接接種法は検出できる菌のグループ数が少なく形態観察に不適だが、実験操作は単純であり、ゲノム解析に使用する目的で、生きた菌体を確保するには有用であると考えられる。

クモ網破砕法は検出できる菌のグループ数が安定して多かった。サンプル作製も容易であり、クモの網に捕集される菌類の形態観察を行う上で、最も汎用且つ有用な手法と考えられる。また、サンプル溶液中の菌は生存しているため、単孢子分離や溶液の培地への直接塗布によって、菌を培養しゲノム解析を行うことが可能と予想される。さらに、サンプル溶液から菌体 DNA も直接抽出できることが確かめられれば、本手法の有用性がより高まることが期待される。

クモ網プレパラートはクモの網に付着した菌の胞子の観察に適する。しかし、検出できる菌のグループ数は不安定である点、マウントゼリーでプレパラートが密閉される点、プレパラート作製に技術を要する点から、本手法は多様性調査への適正は高くはないことが示唆された。

結論として、クモの網に捕集される菌類の多様性を調べるには、直接接種法とクモ網破砕法を用いて形態観察とゲノム解析を行うことが有効と考えられる。これにメタゲノム解析を組み合わせることで、より正確な多様性調査が行えると予想される。