

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18370035
 研究課題名 (和文) 菌根性のキノコ類における分子情報を活用した生物学的種の認識と宿主特異性の進化
 研究課題名 (英文) Molecular taxonomical analyses of cryptic species in the ectomycorrhizal fungi and evolution of their host specificity.
 研究代表者
 村上 哲明 (MURAKAMI NORIAKI)
 首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：60192770

研究成果の概要：キノコ類は形が単純であり、種の分類・識別に使える情報が少ない。したがって、これまで分類学的に認識されてきたキノコの種には、形で区別することが難しいが、生物学的には別の種（隠蔽種と呼ばれる）が複数、含まれている可能性が高い。本研究では、最近、野生のキノコ類からでも容易に取り出せるようになった DNA レベルの分子情報を用いて、オニイグチ類というキノコの一群に多数の隠蔽種が含まれていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：菌根菌，オニイグチ類，生物学的種，核 DNA，ミトコンドリア DNA，葉緑体 DNA，隠蔽種，宿主特異性

1. 研究開始当初の背景

形態的には差異が見られないが、互いに生殖的に隔離されている種は隠蔽種と呼ばれる。隠蔽種間には、しばしば生態的な特性の違いが見られることが報告されているので、隠蔽種を識別することは分類学の上で重要なだけでなく、その生物群の生態的特性や進化を理解する上でも重要である。高等菌類であるキノコ類では、その子実体（いわゆるキノコ）の形態が単純であり、可塑性にも富んでいるため、キノコ類にも多数の隠蔽種が存在することが予測される。しかしながら、キ

ノコ類では人工的交配実験等を行うのが困難な種群も少なくないので、キノコ類における隠蔽種研究は進んでいない。

キノコ類の中で、菌糸と植物の根の共生体（外生菌根）を形成するものを外生菌根菌と呼ぶ。外生菌根菌と宿主植物は栄養的に相互依存関係にあり、相利共生関係を結んでいる。これまでの外生菌根菌の子実体の周辺植生を観察した研究や菌根の調査の研究から、外生菌根菌は一般的に宿主植物に対する特異性が低いと考えられてきた。しかし、従来の外生菌根菌の宿主特異性を評価した研究で

は、隠蔽種の識別が不十分であること、宿主樹種の同定が直接的な証拠である菌根の調査解析に基づいて行われていないことが多かったことから、従来の研究では外生菌根菌の宿主特異性は正確に評価されていない可能性がある。

2. 研究の目的

菌根性のキノコ類であるオニイグチ属 (*Strobilomyces*, Strobilomyceataceae) 菌類を材料にして、そのDNAの塩基配列解析をすることにより、この群に含まれる隠蔽種を効率よく認識し、さらに、オニイグチ類の菌根の菌類と植物それぞれのDNAを解析することで、どのような種の組合せで共生しているのかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、オニイグチ属菌の種をなるべく網羅的に集めてくるため、様々な植生をもつ日本国内と台湾の合計 15 の地域から、60 個のオニイグチ属菌の子実体サンプルを収集した。子実体サンプルから全 DNA を抽出し、PCR 法を用いて特定の DNA 領域を増幅させることにより、核 DNA にコードされている RNA ポリメラーゼ II の大サブユニット遺伝子 (*rpb1*) と、リボソーム RNA の遺伝子間領域 2 (ITS2)、ならびにミトコンドリア DNA にコードされている ATP アーゼの第 6 サブユニットの遺伝子 (*atp6*) の部分 DNA 塩基配列を調べた。得られた情報を解析することによって、この群に含まれる隠蔽種を探索した。

一方、宿主樹種を決定するためには、菌根から菌糸をたどって子実体を探すとともに、植物根をたどって植物本体を探せばよいはずである。しかしながら、菌糸は非常に微細であり、地下ではしばしば複雑な根系が存在しているため、野外においてこの方法をとることは現実的に不可能である。そこで、本研究では、菌類の菌糸と植物根の融合体である菌根から、菌類と植物の両方の塩基配列を解読することによって、宿主樹種を決定するという手法をとった。宿主樹種の同定を行うため、菌根サンプルから菌根菌のミトコンドリア *atp6* 遺伝子の塩基配列を決定し、宿主樹種の葉緑体 DNA リブロースブスリン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (*rbcL*) を決定した。

4. 研究成果

(1) 外生菌根菌オニイグチ属菌の隠蔽種の網羅的探索と宿主特異性の再評価

最初に、オニイグチ属菌の形態種にどの程度の隠蔽種が見られるかということについて検討し、同時に隠蔽種を識別することでオ

ニイグチ属菌がどの程度の宿主樹種をもっているかということについて調べた。

核 DNA とミトコンドリア DNA は異なる遺伝様式 (両親遺伝、片親遺伝) をもっているため、両者の分子系統樹で一致して支持されるクレード (DNA タイプ) が存在することは、そのクレード間で生殖的隔離があることの証拠となる。この原理を利用して、核 DNA にコードされている *rpb1* 遺伝子と、リボソーム RNA の遺伝子間領域 2 (ITS2)、ならびにミトコンドリア DNA にコードされている *atp6* 遺伝子の部分 DNA 塩基配列を解読比較することによって、外生菌根菌オニイグチ属菌の隠蔽種の網羅的探索を行った。これまでオニイグチ属には、オニイグチ (*S. strobilaceus*)、オニイグチモドキ (*S. confusus*)、コオニイグチ (*S. seminudus*)、トライグチ (*S. mirandus*) という 4 つの記載種が知られていた。核 DNA の塩基配列情報から分子系統樹を構築したところ、オニイグチ属菌で、遺伝距離によって識別できる DNA タイプが合計で 14 個識別することができた (図 1)。それぞれの形態種ごとでは、オニイグチモドキとコオニイグチの複合種は 4 つの DNA タイプに、オニイグチは 7 つの DNA タイプに、形態形質が顕著に他の 3 種と異なるトライグチは 1 つの DNA タイプに、それぞれ分けられることが分かった。また、2 つの DNA タイプはいずれの形態種とも合致しない特殊な形態をもっていた。これらの DNA タイプのまとまりはいずれも高いブートストラップ値と事後確率によって支持された。一方で、ミトコンドリア DNA の塩基配列情報から分子系統樹を構築したところ、核 DNA と比べると解像度が悪いものの、核 DNA で識別されたものとまったく同じ DNA タイプが検出された (図 2)。このように、遺伝様式が独立している核 DNA とミトコンドリア DNA で共通して支持される DNA タイプが明らかに形態種の数よりも多数見られたことから、オニイグチ属菌では、互いに生殖的に隔離された隠蔽種が多数存在している可能性が強く示唆された。

次に、それぞれの DNA タイプごとでどういった宿主樹種をもっているかということを検討した。その結果、オニイグチ属菌では、一つの DNA タイプ (DNA タイプ 3) のみがアカマツとブナ科樹種の双方を宿主としていたが、他の DNA タイプはブナ科樹種のみを宿主としていたことが示された (図 1)。この結果から、オニイグチ属菌では隠蔽種が混同されていたために、その宿主特異性が過小評価されていたという仮説が支持された。

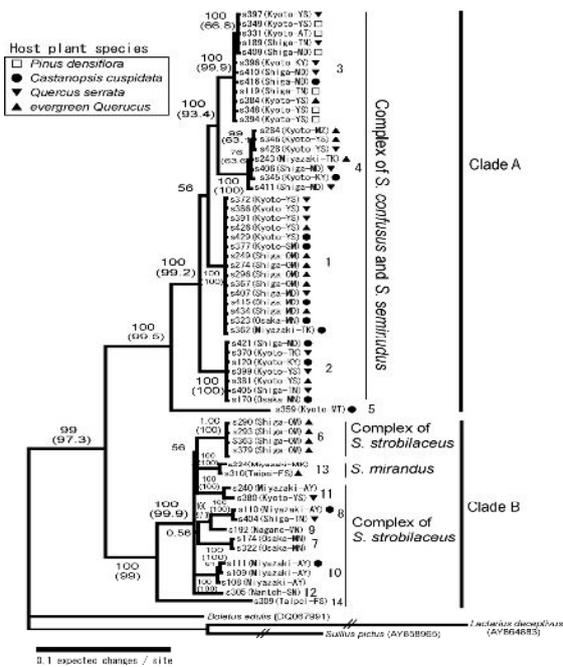


図1. 核 *rpb1* 遺伝子の DNA 塩基配列の情報に基づいてベイズ法により得られた 50%多数決合意樹. 分枝上の数値は、上部の数値がベイズ法による事後確率 (50%以上のもののみ) を示し、下部の括弧内の数値が最節約法に基づくブートストラップ値(50%以上のもののみ)を示している。分子系統樹の横に配置されている数値は、各 DNA タイプの番号を示している。

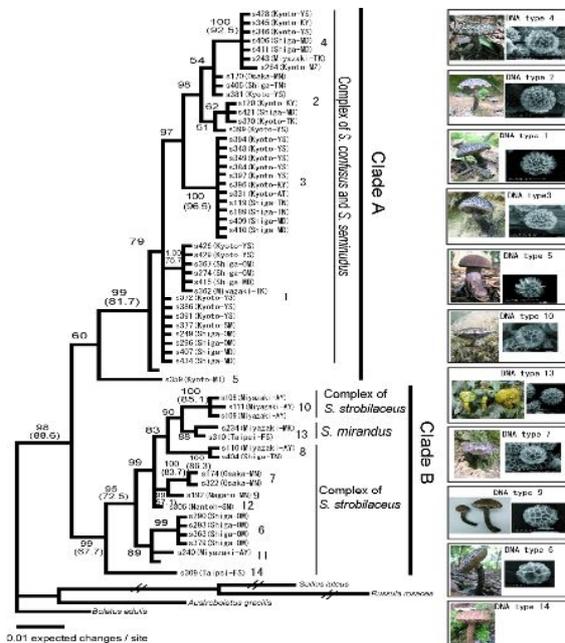


図2. ミトコンドリア *atp6* 遺伝子の DNA 塩基配列の情報に基づいてベイズ法により作成した 50%多数決合意樹. 分枝上の数値は、上部の数値がベイズ法による事後確率を示し、下部の括弧内の数値が最節約法に基づくブ

ートストラップ値を示している。分子系統樹の横に示された DNA タイプの番号は図 1 のものと対応している。分子系統樹の右側には、オニイグチ属菌の各 DNA タイプの子実体の写真と、走査電子顕微鏡を用いて 8000 倍で撮影した担子胞子の写真を示した。

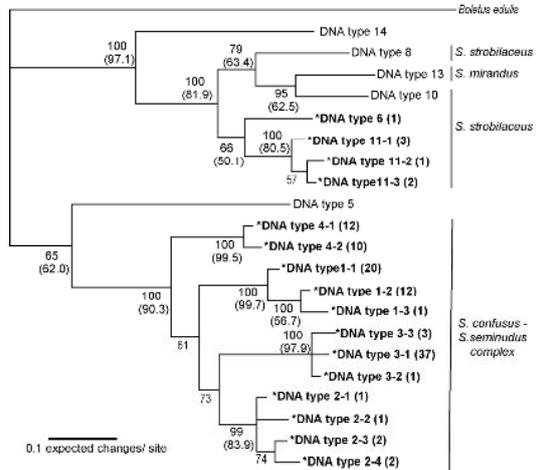


図3. オニイグチ属菌のミトコンドリア *atp6* 遺伝子と *cox3* 遺伝子の結合塩基配列に基づいて構築したベイズ法の多数決合意樹. 分枝の上の数値は事後確率 (50%以上のもののみ) を示しており、その下に最節約法に基づくブートストラップの値 (50%以上のもののみ) を示した。京都市吉田山から採集することのできた DNA タイプは太字で示し、さらに DNA タイプの名前の横にアスタリスクをつけた。DNA タイプの右側に示した括弧内の数値は、その DNA タイプが検出された個体数を示している。

(2) 共優性遺伝マーカーを用いた集団遺伝学的解析

次に、核 DNA とミトコンドリア DNA の塩基配列情報から識別された DNA タイプの間で、互いに生殖的な隔離があるかどうかを集団遺伝学的解析によって検証した。先の研究では、異なる DNA タイプ間に生殖的な隔離がある可能性が示唆されはしたが、同じ地域からは少数のサンプルしか採集、解析していなかったこと、遺伝子流動を計測するのに必要なヘテロ接合体、ホモ接合体の頻度を調べていなかったことから、認識できた 14 個の DNA タイプ間に生殖的隔離があることを実証することまではできていなかった。異なる DNA タイプ間で完全に遺伝子流動が絶たれており、同一の DNA タイプ内では任意交配をしていることを示すためには、同所的に複数の DNA タイプが共存する集団で、ミトコンドリア DNA の塩基配列に基づいて識別した DNA タイプに対して、核遺伝子由来の共優性遺伝マーカーを適用して遺伝型を調べる必要がある。ここでは、第 1 章の結果から複数のオニ

イグチ属菌の DNA タイプが共存していることが示されていた京都市の吉田山を調査地として、集団遺伝学的解析を行った。

吉田山から 109 個のオニイグチ属菌の子実体サンプルの採集を行った。採集した子実体サンプルに対して、ミトコンドリア *atp6* 遺伝子とチトクロム酸化酵素の第 3 サブユニットの遺伝子 (*cox3*) の部分 DNA 塩基配列を解読して、その塩基配列に基づいてオニイグチ属菌の DNA タイプを決定した。その結果、吉田山には先の研究で識別した DNA タイプのうち、6 つ (DNA タイプ 1、2、3、4、6、11) が共存しており、そのうち 3 つ (DNA タイプ 1、3、4) は高い割合で集団中に存在していることが分かった (図 3)。頻度の高い 3 つの DNA タイプに対して、核のシングルコピー遺伝子である *rpb1* 遺伝子、RNA ポリメラーゼ II の二番目に大きいサブユニット遺伝子 (*rpb2*)、グルセルアルデヒド 3 リン酸脱水酵素遺伝子 (*Gapdh*) に対して、PCR 増幅産物の制限酵素切断断片長の多型を調べる解析 (CAPS マーカーによる解析) を行った。この CAPS マーカーは共優性遺伝マーカーであり、核遺伝子でホモ接合体とヘテロ接合体を区別できる分子マーカーである。集団全体に対して多型解析を行った結果、それぞれの DNA タイプは完全に異なるホモ接合体で固定しており、DNA タイプ間でヘテロ接合体は 1 つも検出されなかった (図 4)。この結果から、DNA タイプ間では完全に遺伝子流動がないということを示唆された。また、同一の DNA タイプをもつ分集団内でも、多型解析を行ったところ、いずれの DNA タイプをもつ分集団内でもホモ接合体とヘテロ接合体が多数見られた (図 4)。同じ DNA タイプをもつ分集団に対して、近親交配の指標である近交係数を計算したところ、それぞれの DNA タイプをもつ分集団の近交係数はいずれも任意交配をしているときの値に近い値を示した (図 5)。さらに、各 DNA タイプの分集団の遺伝子型頻度がハーディ・ワインベルク平衡から期待される値からずれているかどうかを χ^2 乗検定で検定した。その結果、いずれの DNA タイプの分集団でも、観測された遺伝子型頻度が期待値からずれないという帰無仮説は棄却されなかった (図 5)。この結果から、同じ DNA タイプをもつ分集団内では、菌個体は任意交配を行っているということが示唆された。以上の結果から、これらの DNA タイプは互いに独立した生物学的種 (隠蔽種) であることが証明された。

本研究から、核 DNA とミトコンドリア DNA を比較することによって、キノコ類の隠蔽種を効果的に探索・識別できることが明らかになった。この手法は人工交配実験と違ってどのようなキノコ類にも適用が可能であるため、本研究でこの手法を確立したことは今後

のキノコ類の分類学的研究に重要な貢献を果たしたのではないかと考えている。

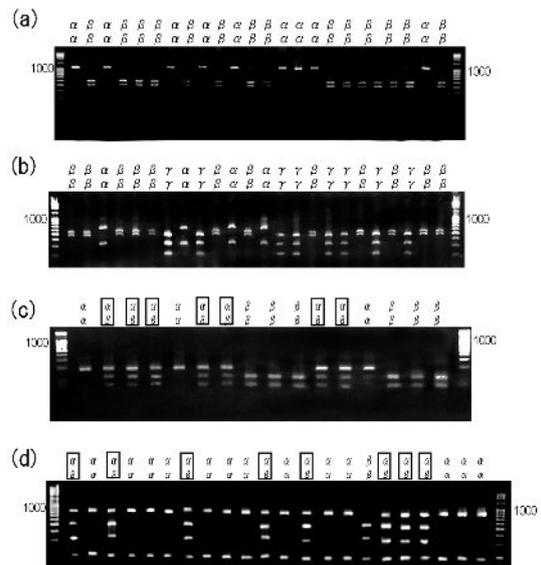


図 4. PCR 増幅した DNA 断片を各制限酵素で処理した後、アガロースゲルに電気泳動して得られたバンドパターン。写真の上部にそれぞれのバンドパターンを示した個体の遺伝型を表した。a) *rpb1* 遺伝子の部分 DNA 断片を *ClaI* で制限酵素処理したもの b) *Gapdh* 遺伝子の部分 DNA 断片を *HpaI* で制限酵素処理したもの c) *rpb1* 遺伝子の部分 DNA 断片を *AciI* で制限酵素処理したもの d) *Gapdh* 遺伝子の部分 DNA 断片を *TspRI* で制限酵素処理したものを示す。

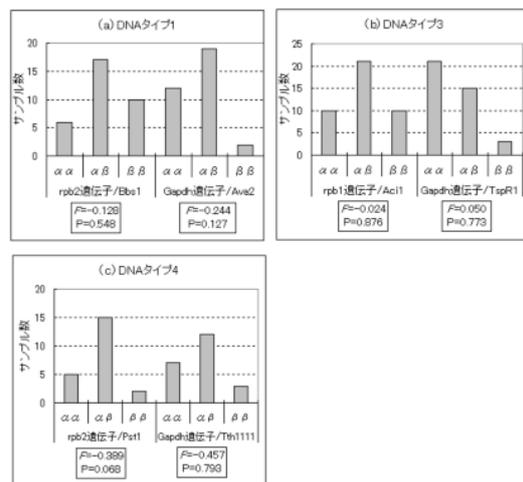


図 5. それぞれの DNA タイプ内に見られた核遺伝子の遺伝子型。DNA タイプはミトコンドリア DNA の塩基配列情報に基づいて識別された隠蔽種の候補を示している。核遺伝子に対して CAPS マーカーによる多型解析を行い、一つの DNA タイプの中にもどのような核遺伝子の多型が見られるかを、(a) DNA タイプ 1、(b) DNA タイプ 3、(c) DNA タイプ

4 ごとで調べた結果を示す。

(3) 外生菌根菌オニイグチ属菌で見られた隠蔽種間の宿主特異性と宿主選好性の分化

ここまでの研究で、オニイグチ属菌の多くの DNA タイプで、ブナ科樹種に対して特異性がある可能性が示唆されていた。しかしながら、これまでの研究では、同じ地域から少数のサンプルしか調べていなかったため、DNA タイプ間でサンプルを採集した地域の隔たりのある可能性があり、それが宿主樹種構成の違いに影響している可能性を棄却できなかった。このような可能性を企画するため、同じ地域に生育するオニイグチ属菌の DNA タイプ（隠蔽種）間で、宿主樹種の構成に関して違いが見られるかどうかについて調べた。この研究では、先の集団遺伝学的研究と同じく、京都市の吉田山において、調査を行った。吉田山では先の研究から複数のオニイグチ属菌の DNA タイプが検出されており、ツブラジイ、アラカシ、コナラといったブナ科樹種やアカマツといったマツ科樹種が共存している地域である。もし、オニイグチ属菌の DNA タイプ間で宿主樹種構成や宿主特異性に違いが本当に見られるのであれば、この地域内ではっきりとその傾向が見られるはずである。

オニイグチ属菌のそれぞれの DNA タイプについて、十分な数の宿主樹種のデータを得るために、吉田山においてオニイグチ属菌の子実体サンプルと菌根サンプルの採集を新たに行った。DNA タイプを決定するため、子実体サンプルのミトコンドリア *apt6* 遺伝子と *cox3* 遺伝子の部分 DNA 塩基配列を解読した。また、宿主樹種を同定するため、菌根サンプルから菌根菌の DNA 塩基配列と宿主樹種の DNA 塩基配列を決定した。その結果、55 サンプル（DNA タイプ 1：20 サンプル、DNA タイプ 2：2 サンプル、DNA タイプ 3：21 サンプル、DNA タイプ 4：10 サンプル、DNA タイプ 11：2 サンプル）について宿主樹種を決定することが出来た。このうち、比較的サンプル数を多く確保できた DNA タイプ 1、3 及び 4 の間で宿主樹種構成について比較を行った。

DNA タイプごとの宿主樹種構成を調べたところ、DNA タイプ 1 はブナ科のみを宿主樹種としており、その中でもコナラを宿主樹種としている割合が高いことが分かった（図 6）。DNA タイプ 3 は、ブナ科樹種もアカマツも宿主樹種としていたが、中でもアカマツを宿主樹種としている割合が高いことが示された（図 6）。DNA タイプ 4 はブナ科樹種の中でも、コナラやカシ類などコナラ属のみを宿主樹種としていることが分かった（図 6）。Fisher の直接確率計算法で、DNA タイプ間の宿主樹種構成比に違いが見られるかどうかについて検定を行った。その結果、DNA タイプ 3 は

他の DNA タイプと有意に異なった宿主樹種構成比をもっていることが明らかになった。

宿主樹種を同定した結果、いずれの DNA タイプでも、すべての樹種を同じ割合で宿主樹種にしているというよりも、特定の樹種を優先的に宿主樹種としている傾向が見られた。しかし、この偏りが、オニイグチ属菌が特定の樹種を選好しているからなのか、それともサンプルの採集地である吉田山の樹種構成比の影響を受けたに過ぎないのかがはっきりしなかった。そこで、本研究では、吉田山の樹種構成比を調べ、それをオニイグチ属菌の宿主樹種構成比の期待値と考えた上で、それぞれの DNA タイプの宿主樹種構成比がその期待値からずれているかどうかについて検討した。その結果、DNA タイプ 1 と DNA タイプ 3 が有意に期待値からずれた宿主樹種構成比をもっていることが明らかになった（図 6）。DNA タイプ 1 はコナラを優先的に宿主樹種としており、DNA タイプ 3 はアカマツを優先的に宿主樹種としている結果がすでに得られている。この検定結果は、これら 2 つの DNA タイプが任意の宿主樹種を選んでいるわけではなく、特定の樹種に対してははっきりとした選好性をもっていることを示す結果となった。この中でも、DNA タイプ 3 の結果は非常に興味深く、単に宿主特異性が低いと考えられてきた DNA タイプ 3 は、この研究によって新たに宿主樹種を選んでいる種であるということが明らかになった。

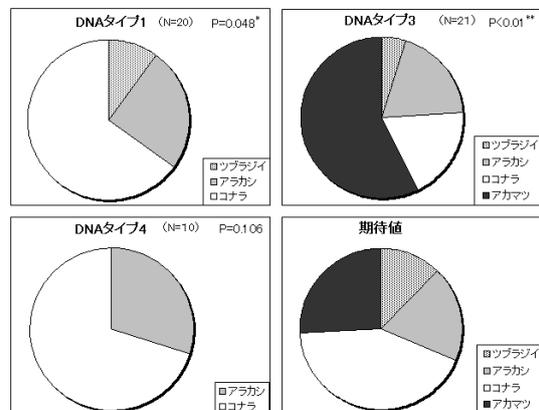


図 6. 各 DNA タイプの宿主樹種構成と吉田山内の各樹種の構成比に基づいて算出した期待値。P 値は各 DNA タイプの宿主樹種構成が期待値から有意にずれているかどうかを、 χ^2 乗検定によって検定したときの値である。

従来、オニイグチ属菌には高い宿主特異性をもった形態種は知られていなかった。しかし、本研究で、隠蔽種を識別し、菌根から宿主樹種を同定するという試みを行ったことによって、実際にはブナ科樹種に対して特異性をもつ種とアカマツに対して選好性をもつ種に分けられるということが明らかにな

った。本研究ではオニイグチ属菌のモデルとして研究を行ったが、本研究の成果から、従来の研究では、隠蔽種の混同や宿主樹種の同定ミスといった問題によって外生菌根菌の宿主特異性が過小評価されている可能性が高いということが実証された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ①Sato H. and N. Murakami. Reproductive isolation among cryptic species in the ectomycorrhizal genus *Strobilomyces*: population-level CAPS marker-based genetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 326-334. 2008. 査読あり.
- ②Sato, H., Yumoto, T. and N. Murakami. Cryptic species and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Strobilomyces* (Strobilomyceataceae). *American Journal of Botany* 94: 1630-1641. 2007. 査読あり.
- ③佐藤博俊・村上哲明 「植物の進化：キノコ類の隠蔽種とその宿主特異性」遺伝別冊 No. 20 「進化でどこまでわかるか？」213-218. 2007. 査読なし.

[学会発表] (計9件)

- ①佐藤博俊・村上哲明 「同所的に生育する菌根性キノコ類・オニイグチ属の隠蔽種間でみられた宿主樹種構成に関する分化」日本植物分類学会第7回大会(八王子) 2008年3月21日～23日
- ②佐藤博俊・村上哲明 「CAPS マーカーによって示唆された外生菌根菌オニイグチ類の mtDNA タイプ間における生殖的隔離」日本植物学会第71回大会(野田) 2007年9月6日～9日
- ③村上哲明 「分子情報に基づいて認識された植物の隠蔽種を分類に反映させる上での問題点」日本進化学会第9回大会(京都) 2007年8月31日～9月2日
- ④村上哲明・佐藤博俊 「菌類と動植物との間で見られる相互作用と共進化」日本進化学会第9回大会(京都) 2007年8月31日～9月2日
- ⑤佐藤博俊・村上哲明 「菌根性菌類オニイグチ属の隠蔽種と宿主特異性」第38回種生物学シンポジウム(滋賀) 2006年12月1日～3日
- ⑥佐藤博俊・村上哲明 「分子マーカーによる菌根性菌類の種分類と宿主特異性の解明」日本進化学会 2006年大会(東京) 2006年8月29日～31日
- ⑦村上哲明 「進化学夏の学校1 植物の進

化」日本進化学会 2006年大会(東京) 2006年8月29日～31日

- ⑧Sato, H. and N. Murakami. "Recognition of cryptic species and host specificities in the ectomycorrhizal genus *Strobilomyces* using molecular markers". 8th International Mycological Congress (Cairns, Australia) 2006年8月20日～25日
- ⑨佐藤博俊・村上哲明 「外生菌根菌オニイグチ属における生物学的種と宿主特異性の探索-分子手法を用いて-」日本菌学会 50周年記念大会(千葉) 2006年6月2日～4日

[その他]

ホームページ等

<http://dept.biol.metro-u.ac.jp/lab0.asp?ID=plasys>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 哲明 (MURAKAMI NORIAKI)
首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：60192770

(2) 研究分担者

横山 和正 (YOKOYAMA KAZUMASA)
滋賀大学・教育学部・名誉教授
研究者番号：50024948

(3) 研究協力者

佐藤 博俊 (SATO HIROTOSHI)
首都大学東京・大学院理工学研究科・
客員研究員
大槻 涼 (OTSUKI RYO)
首都大学東京・大学院理工学研究科・
博士後期課程2年