

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05734

研究課題名（和文）スギ花粉の飛散を抑制するスギ黒点病菌の遺伝的多様性と遺伝的集団構造の解明

研究課題名（英文）Genetic diversity and population structure of *Sydowia japonica*, an agent for control Japanese cedar pollen

研究代表者

高橋 由紀子 (Takahashi, Yukiko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：60725266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、スギ花粉飛散抑制のための微生物資材として注目されるスギ黒点病菌（*Sydowia japonica*）の日本国内における遺伝的多様性と遺伝的構造を明らかにするとともに、国内に自生するスギの遺伝的構造との関係を明らかにすることを目的とする。先行研究でスギの遺伝的構造を調査した天然林を中心にスギ黒点病菌の分布調査と菌株の採集を行い、20道府県56個所でスギ黒点病の発生を確認した。同菌の全ゲノム配列を解読し、DNAマーカー作成に資するゲノム情報を整備した。作成したDNAマーカーを用いて国内の菌株の遺伝子型を同定し、遺伝的構造を解析した結果、地域毎に個体群集団を形成していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の4割が罹患し、社会問題と化しているスギ花粉症の対策として、スギ雄花を選択的に枯死させるスギ黒点病菌（*Sydowia japonica*）を用いた花粉飛散抑制技術の開発が進められている。本菌を原体とするスギ花粉飛散防止剤の森林への大規模な空中散布が想定されているが、通常、微生物農薬は圃場のような管理された場所や森林内の一部を対象に使用されるのと異なり、自然環境下で生息する在来微生物群衆への遺伝子汚染が懸念される。今後想定されるスギ花粉飛散防止剤の散布に先立ち、スギ黒点病菌の遺伝的多様性を把握することは、微生物農薬の散布による遺伝子攪乱の影響評価を可能にするものである。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to determine the genetic diversity and genetic structure of *Sydowia japonica*, which has expected as a microbial material for suppressing Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen dispersal in Japan, and to clarify its relationship with the genetic structure of native cedar trees in Japan. The distribution of *Sydowia japonica* was surveyed at Japanese cedar forests including natural forests where the genetic structure of Japanese cedar trees had been studied in a previous study, and confirmed the occurrence at 56 locations in 20 prefectures. The whole genome sequence of the fungus was decoded, and genomic information was prepared for the development of DNA markers. Using the DNA markers developed, the genotypes of the domestic strains were identified and their genetic structure was analyzed. The results revealed that population clusters were formed in each region.

研究分野：森林病理

キーワード：スギ花粉症 分子生態 *Sydowia japonica* スギ花粉飛散防止剤 微生物農薬 遺伝的多様性 遺伝子攪乱 マイクロサテライト

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は国土の7割が森林であり、中でも、主要な造林樹種として戦後の拡大造林期に植栽されたスギがその3割を占める(倉本 2016)。伐期を迎えたスギから発生する花粉が、スギ花粉症の原因として社会問題化していることから(馬場・中江 2008)、林野庁は、花粉発生源対策として、スギ人工林を伐採して少花粉や無花粉の品種への転換を進めている(林野庁 2016)。植え替えが進むには長い年月が必要とされることから、即効性の高いスギ花粉症の対策として、スギ雄花を枯死させるスギ黒点病菌(*Sydowia japonica*)を用いた花粉飛散抑制技術の開発が進められており、本菌を用いた微生物農薬の実用化を目指し、製剤化や散布方法の検討が行われている(森林総合研究所 2017)。その一方で、自然条件に近い環境である森林における微生物農薬の使用は、圃場等の管理された環境で施用する場合とは異なり、在来の微生物群集に対する遺伝子汚染が懸念される。現行の農薬取締法においては、微生物農薬を使用する際の遺伝子攪乱は考慮されておらず、その影響についても議論されていない。これを評価するためには、今後想定される微生物農薬の実用化に先立ち、原体となる本菌の国内各地の遺伝的多様性を把握する必要がある。また、本菌の宿主であるスギは、重要な木材・遺伝資源として遺伝的多様性に関する情報が蓄積されており、地域毎の遺伝的変異と生理特性に基づいて種苗の配布制限が設定されている(津山・陶山 2015)。スギの雄花に特異的に寄生する本菌は、宿主の分布や多様性とも強い連関性があることが予想されるが、植物と菌の共進化の過程で、宿主側の遺伝的多様性が菌側の遺伝的多様性の制限要因となり得るのか、両社がどのような関係性があるのかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、日本国内におけるスギ黒点病菌の遺伝的構造を明らかにするとともに、国内に自生するスギの遺伝的構造との関係を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) スギ黒点病菌の分布調査と菌株の収集

先行研究でスギの遺伝的構造を調査した天然林(Tsumura et al. 2014、Kimura et al. 2014)を中心に、国内各地のスギ林においてスギ黒点病菌の分布調査を行い、スギ黒点病菌感染雄花を採集した。得られた感染雄花は表面殺菌の後、2%麦芽エキス寒天培地平板上で、13℃、暗黒条件下で培養し、出現した菌叢の外観からスギ黒点病菌選抜し、分離菌株とした。分離菌株をクロラムフェニコール含有ツアパックドックス・酵母エキス培地で20℃、120rpmで振とう培養し、得られた酵母状菌体からDNAを抽出した。抽出DNAを鋳型として、スギ黒点病菌特異的プライマーを用いてPCRし、増幅したものをスギ黒点病菌と同定し、同菌の菌株として確立した。

#### (2) スギ黒点病菌のDNAマーカー作成

スギ黒点病菌のDNAマーカーの作成を目的として、次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。はじめに、マイクロサテライトマーカーの作成を目的として、基準菌株(NITE P-757(西会津株))のDNAを基に、HiSeq2000(Illumina)によるde novoシーケンスを行った。得られた配列情報を基に繰り返し配列を抽出し、プライマーを設計・作成した。作成したマーカーを用いて、採集地の異なる菌株に対してPCRを行い、増幅したバンドが明瞭で多型があるものを選抜した。次に、選抜したプライマーに蛍光標識を付与したものをを用いてPCR増幅し、DNAアナライザーにより断片長を解析し、結果が明瞭で、判別が容易なプライマー対をマイクロサテライトマーカーとして選抜した。

次に、ゲノム情報の整備と一塩基多型(SNP)マーカーの作成を目的として、PacBio Sequel(PacBio)による基準菌株の全ゲノムシーケンスを行い、先に取得したde novo配列を用いてアセンブルとエラーコレクションを行うことで、完全長ゲノム配列を決定した。さらに、FFPRI411107菌株(飯南株)のDNAを基に、NovaSeq6000(Illumina)によるリシーケンス解析を行い、基準菌株の全ゲノム配列をリファレンス配列として、SNPを探索した。

#### (3) スギ黒点病菌の遺伝的構造解析

作成したマイクロサテライトマーカーを用いて、全調査地から得られた菌株のDNAを鋳型としてPCR増幅し、DNAアナライザーで遺伝子型を同定した。得られた遺伝子型多型データを元に、基礎統計量を算出し、個体群間に遺伝的な構造があるかを検証するとともに、国内のスギ黒点病菌の遺伝的多様性を調査した。

### 4. 研究成果

#### (1) 国内におけるスギ黒点病菌の分布調査

先行研究でTsumura et al. (2014)とKimura et al. (2014)が遺伝構造を調査したスギ天然林37地点のうち同じ林分又はその付近の人工林17カ所で調査を行い、このうち15カ所で罹病雄花を確認した他、スギが天然分布しない北海道道南地域4カ所を含む、20道府県56個所で

スギ黒点病の発生を確認した。罹病雄花からの組織分離によって得られた菌株のうち、スギ黒点病菌と同定された菌株は 2090 菌株であった。スギ黒点病菌は、本調査で分布が確認された調査地点以外で過去に菌株が採取された地点（廣岡ら 2011、Hirooka et al. 2013 ほか）と Masuya et al. (2018) の報告と合わせて、日本国内の 34 道府県に分布していることが明らかになった。



図．本研究で調査したスギ黒点病菌の分布。赤丸は罹病雄花が確認され菌株が得られた地点、黄丸は罹病雄花が確認された地点、橙丸は過去に菌が採取された地点、緑丸は罹病雄花が確認されなかった地点を示す。

### (2) スギ黒点病菌の全ゲノム解析と DNA マーカーの作成

スギ黒点病菌の基準菌株である NITE P-757 菌株(西会津株)のゲノム解析の結果、29,464,572 bp、16 コンティグのゲノム情報を得た。リシーケンスでは、リファレンス配列 19,464,452 base の 99.99%以上の配列に対してマッピングを実施し、このうち 97.51%のリードがマップされた。一塩基多型 (SNP) は 312,677 箇所、挿入は 18,420 箇所、欠損は 18,248 箇所あった。全ゲノム配列に基づく遺伝子プロファイリングを行った結果、BUSCO によるゲノムデータの完全性評価により、97.5%の子嚢菌類の必須遺伝子が含まれていることが明らかになった。糖質関連酵素 (CAZymes) をコードする遺伝子は 381 個確認され、全体的にゲノムサイズが小さく、遺伝子数も少ない傾向があった。乾燥耐性に関与するアクアポリン遺伝子が 12 個あり、一般的な子嚢菌類が通常 2~3 個であるのに対して多いことが明らかになった。子嚢菌の交配型遺伝子の一つである MAT 1 遺伝子が特定され、本菌の交配様式がヘテロタリックである可能性が示唆された。PHIbase による寄生性関連遺伝子の探索の結果、本菌の感染能力に関連する遺伝子を特定された。

ゲノム配列に基づき、BatchPrimer を用いて 2~5 塩基からなる繰り返し配列を含むプライマーを設計した。設計したマーカーのうち 41 個のプライマー対を用いて、11 県から採取された由来の異なる 40 菌株と陽性対照菌株 (基準菌株) および陰性対照菌株を PCR 増幅し、増幅が認められバンドが明瞭な 24 個を一次選抜した。蛍光標識プライマーを用いて 20 個を二次選抜した。

### (3) スギ黒点病菌の遺伝的構造

天然林を中心とする日本国内 28 道府県 45 市町村のスギ林から得られたスギ黒点病罹病雄花分離菌株のうち、スギ黒点病菌特異的マーカーにより選抜した同菌菌株について、スギ黒点病菌のマイクロサテライト (SSR) マーカーの 7 遺伝子座を用いて、DNA 多型解析を行った。同定した遺伝子型データをもとに基礎的統計解析を行った結果、複数の個体群で Hardy-Weinberg 平衡からの有意なずれが検出された。固定指数  $F_{st}$  をもとに集団間の遺伝的分化を評価した結果、個体群集団をスギの種苗配布区域を基に定義した場合では、第二区と第三区 (太平洋側の南東北から中部) ではほとんど遺伝的に分化しておらず、それ以外の個体群間での分化の程度は中程度であった。第四区 (主に山陰地方) と第六区 (九州地方) の個体群では高い遺伝的分化が認められた。一方、都道府県別に個体群集団を定義した場合では、神奈川と静岡のそれぞれの個体群ではほとんど遺伝的に分化していなかったが、そのほかの地域間では中程度の遺伝的分化が認められた。北海道の個体群は北関東以南の個体群と高度に遺伝的に分化しており、特に中部地方以西の太平洋側と九州の個体群と非常に高度の分化が起こっていた。このことから、スギ黒点病菌は元来スギの分布していなかった北海道道南地域に生息するスギ黒点病菌は東北地方の特定の個体群に由来したものと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuya, H., Ichihara, Y., Aikawa, T., Takahashi, Y., Kubono, T.	4. 巻 59
2. 論文標題 Predicted potential distribution of <i>Sydowia japonica</i> in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 392-396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.myc.2018.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋由紀子	4. 巻 14
2. 論文標題 菌類を利用したスギ花粉飛散抑制技術	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物資源	6. 最初と最後の頁 14-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋由紀子・升屋勇人
2. 発表標題 スギ黒点病菌 <i>Sydowia japonica</i> のゲノム解析
3. 学会等名 日本菌学会第64回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------