

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710200

研究課題名（和文） コウヤクタケ類担子菌遺伝資源データベースの構築

研究課題名（英文） Construction of genetic-resource database for "corticoid" basidiomycetes

研究代表者

須原 弘登 (SUHARA HIROTO)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：90423540

研究成果の概要：コウヤクタケ類データベース作製のために、その基盤となる遺伝子資源の収集を行なった。鳥取県内を始め日本全国各地において調査を行った。研究期間中にコウヤクタケ類を中心とし、約400 点の標本と約800 点分離株を収集した。

遺伝子資源の収集と並行して遺伝資源データベースの構築のため、既存の菌株を用い、コウヤクタケ類の代表的グループである *Phanerochaete*, *Phlebia* 属及び、亜熱帯性の種を多く含む *Gramothele-Epithela* 属グループを中心に遺伝子解析を行い、約350 株の遺伝子解析を終了した。現在これらのデータについて、データベース化を行っている。

今後は収集した分離菌株を順次、液体窒素保存タンクにて保存する予定である。収集した標本・分離株の形態学的な情報や遺伝子配列情報は全てデータベース化し、遺伝子資源の保全を行うと共に、収集した菌株の有効な利用法について検討する予定。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：生物遺伝子資源保全

1. 研究開始当初の背景

担子菌類（きのこ）の多くは木材腐朽能力を持ち、森林生態系における還元者として重要な役割を演じている。中でも白色腐朽菌類はリグニンを分解可能な唯一の生物群で、その多くはコウヤクタケ類やサルノコシカケの仲間に含まれる。この事から担子菌類は森林生態系の炭素循環に深く関わっていると考えられている。また、フミン、フルボ酸、ポリフェノール類、有機酸類等のリグニン分解産物や担子菌類の二次代謝物が森林の水源涵養機能に大きく貢献している。木材腐朽担子菌が植物遺骸を分解することで土壌が形成され、多様な生物からなる森林生態系が形成される。担子菌類は森林生態系の物質循環において鍵となる生物群である。

しかし、生態系内での担子菌の多様性や動態を明らかにする試みは、他の生物群と比較すると遅れている。その遅れの大きな原因は分類学の難解さに起因する。担子菌の種同定は子実体の形態学的特徴をもとに行われるが、特にコウヤクタケ類をはじめとする木材腐朽菌類の多くは特徴に乏しく分類が非常に困難で、研究の遅れが著しい。また亜熱帯～熱帯地域の分類学的研究が遅れており、未だ分類体系の全容解明にはほど遠い。現在コウヤクタケ類は全世界で 250 属 1700 種が知られているが (Hjortstam 他、Windahlia 23: 1- 1998)、全体の 5%程度しか発見されていないと推定されている (Lutzoni 他、AJB 91:1446- 2004)。また既知種も菌株や遺伝子情報を容易に入手できるものはごくわずかで、その利用は容易では無い。日本は冷帯～亜熱帯まで幅広い気候風土を有しており、多様な種を収集できることが期待される。日本では約 230 種のコウヤクタケ類が報告されているが、多くは本州以北

で採取したものでフローラの全容解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では「生態系における役割の大きさ」や「生物学的な多様性」に反し、研究の遅れが著しいコウヤクタケ類担子菌を主な対象として研究を行う。日本国内各地で調査を行い、子実体を収集し、乾燥標本・分離株を作製し、遺伝子解析を行いこれをデータベース化し、コウヤクタケ類の遺伝子資源保全と種多様性解明に寄与する。

3. 研究の方法

データベース化は主に以下の 4 つの工程からなる。

I: 調査：研究の遅れが著しい亜熱帯～熱帯地域の担子菌類フローラの解明のために南西諸島に着目し研究を行った。調査地は世界遺産にも指定され原始の天然林が多く残っている屋久島、本研究と関連する他研究テーマにより、奄美大島、石垣島、西表島でも調査を行った。調査においては子実体の発生の状態、宿主、腐朽様式など可能な限りの生態的諸性質を記録し、同時にデジタルカメラによる撮影を行い、新鮮な状態の形質や色彩を記録する。発生している子実体の一部を採取する。

II: 分離菌株・乾燥標本の作製：調査で収集した子実体は速やかに以下の 3 つの工程に供する。1) 採取した子実体の一部を乾燥機で乾燥し乾燥標本を作製した。2) 子実体の一部を用いて多孢子分離及び組織分離により分離菌株を得る。3) 子実体の一部をエタノールに浸漬し -20 °C で保存。DNA 解析に供する。この工程で得た分離菌株は今後順次、研究代表者の所属する鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター (FMRC) 保有の液体窒素凍結保存システム

で保存する。

III: 作製した乾燥標本は微分干渉顕微鏡により組織観察を行い、組織学的特徴の記載を行い、可能な限り線画を作製した上で、その形態学的特徴をもとに分類学的検討及び種の同定を行う。これらの情報は電子データ化しデータベースに供する。

IV: 分離菌株及び子実体より CTAB 法によりゲノム DNA を抽出し、PCR によりリボソーム遺伝子の ITS 領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列の解析を行った。子実体と分離株の塩基配列が一致する、または、複数株から同じ塩基配列 (>98%) が取得できたものは、解析の信頼性が高いと看做しデータベースに登録した。

4. 研究成果

本研究テーマのもとで、いくつかの分類群に付いては重点的に検討を行った。検討を行ったのは次の 2 グループ。

A: *Phanerochaete* – *Phlebia* 属グループ

B: *Gramothele* – *Epithele* 属グループ

以下にその成果を報告する。

A: *Phanerochaete* – *Phlebia* 属グループ

Phanerochaete 属は、担子菌門サルノコシカケ目に属する木材腐朽菌で、日本からは 20 種が報告されている。近年の分子系統学的研究で、*Phanerochaete* 属は単系統のグループとしての支持は難しく、形態学的に似た異種をグループ化した属であることが示唆されている。本研究では、日本産 *Phanerochaete* 属およびその類縁属の標本と分離菌株を用いて形態学的及び分子系統学的解析を行い、*Phanerochaete* 属の分類群の再検討を行うことを目的とした。

ITS 領域を用いた系統解析の結果、*Phanerochaete* 属およびその類縁属は、タ

イプ種である *Phanerochaete velutina* を含み主に *Phanerochaete* 属種からなるクレード A、タイプ種である *Phlebia radiata* を含む *Phlebia* 属のみで構成されるクレード B、これ以外の *Phanerochaete* 属種と多くの近縁属を含む多系統なクレード C から構成されることが示唆された。このうちクレード A には、狭義 *Phanerochaete* 属と、それに近縁な *Rhizochaete* 属クレード、*Hjorstamia* 属クレードが含まれており、このクレードが *Phanerochaete* コアクレードであることが示唆された。以上のことから、*Phanerochaete* 属はこれまでの研究と同様に、狭義 *Phanerochaete* 属とそれ以外の多系統な種の集合であることが示された。また、今回初めて *Phanerochaete* コアクレードのサブクレードとして *Hjorstamia* 属クレードが示され、この *Hjorstamia* 属クレード内に、日本新産種の *Hjorstamia amethystea* (Hjortstam & Ryvarde) Boidin & Gilles (図 1,2) を見出した。

Hjorstamia amethystea (Hjortstam & Ryvarde) Boidin & Gilles

子実体は背着生、膜質である。周縁部は線毛状である。子実層表面は平滑もしくはわずかに波打っており、青紫色～紫茶色であり、3%KOH 溶液で黄色に変色した。菌糸型は二菌糸型である。形成菌糸の直径は 4-5 μm で、クランプはなく、単隔壁で、表面は平滑であり、壁は厚い(～1.6 μm)。骨格菌糸は、紫がかった黄褐色で、4-5 μm の幅がある。シスチジアは非常に多く、先端が結晶に覆われたスケルトシスチジアで、やや紡錘形で、64-80 \times 6-16 μm 、明茶色で、壁は厚い。担子器は、棍棒状で、32-36 \times 4.2-5.6 μm で、基部にクランプは無く、4 孢子性である。担子胞子は、楕円形から楕円筒形で

あり、5.2-5.8 × 2.6-3.4 μm で、表面は平滑、壁は薄く、非アミロイドである。



図1 *Hjorstamia amethystea* の子実体

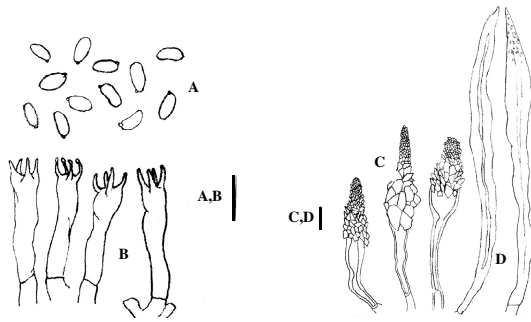


図2 *Hjorstamia amethystea* の組織学的特徴

A: 担子胞子、B: 担子器、C: シスチジア、
D: 過熟した組織中のシスチジア Bar = 10 μm

B: *Grammothele* – *Epithele* 属グループ

アイアナタケ属 (*Grammothele*) および類縁属菌は熱帯および亜熱帯地域の枯枝や枯幹上に発生し、*Porogramme*、*Hymenogramme* および *Theleporus* の類縁属とともに、担子菌門、サルノコシカケ目に所属している。これら分類群の子実体は背着生で、不定形の浅い管孔を形成し、子実層は管孔壁に形成されず、管孔の底部に形成されることによって特徴付けられている。日本においては、アイアナタケ属および類縁属菌として南西諸島、小笠原諸島などの

亜熱帯域に分布しているアイアナタケ (*G. fuligo*) のみが報告されている。本研究では、日本産アイアナタケ属およびその類縁属菌の未同定乾燥標本およびこれらの分離菌株を用いて、形態学および分子系統学的解析に基づき分類を行った。

供試標本の形態学的解析を行った結果、*Grammothele fuligo*、*Grammothele* sp. 1、*Grammothele* sp. 2 および *Theleporus calcicolor* の4種を同定した。これらの種はいずれも子実体の菌糸構成が三菌糸型であり、樹状糸状体を有する。*Grammothele fuligo* はタコノキなどの単子葉類上に発生し、灰色から灰青色の子実体を形成する。骨格菌糸が KOH 中で帯オリーブ黒色を呈し、メルツァー試薬中でデキストリノイド反応を示す。*Grammothele* sp.1 は広葉樹に発生し、灰白色から淡褐色であり、子実体表面は薄刃状または不定形の角張った孔を形成し、子実層面に円錐形、褐色の *hyphal peg* を有する。これらの特徴は *G. lineata* に類似するが、担子胞子の大きさが異なることから *Grammothele* sp.1 は新種と考えられる。*Grammothele* sp.2 は広葉樹に発生し、子実体表面が淡黄色で、円筒形の針状から断続する壁を形成する。また、本種は *Grammothele* sp.1 と同様に *hyphal peg* を形成するが、担子胞子の大きさおよび *hyphal peg* が無色であることから新種と考えられる。*Theleporus calcicolor* は主に広葉樹に発生し、白色からクリーム色であり、孔は不定形で角張る。孔壁を構成する菌糸にはクランプがあり、デキストリノイド反応を示さず、菌糸先端には樹状糸状体をもつ。

25SrDNA 塩基配列に基づく分子系統解析の結果 (図3)、日本産アイアナタケ属およびその類縁属菌はサルノコシカケ目のコア・クレード (core poriporid clade) 内に

位置し、*Epithele* とともに *Epithele-Grammothele* clade を形成した。さらに本クレードは 4 つのクレード (クレード 1、2、3 および 4) に分かれた。クレード 1 は *G.fuligo*、クレード 2 は *Grammothele* sp.1、クレード 3 は *Grammothele* sp.2、また、クレード 4 は *T. calcicolor* にそれぞれ対応した。また、系統解析の結果において、*Grammothele* 属種が複数のクレードに認められたこと、さらに *Grammothele* および類縁属に加えて *Epithele* との類縁性が認められたことより、今後 *Epithele-Grammothele* clade 内の属レベルの分類群における検討が必要である。

これらのグループの研究成果と並行して、採取した分離菌株に付いても遺伝子解析を進め、データベース化を行っている。現在までの所、先に述べた 3 テーマと合わせて、研究期間中に合計約 350 株の遺伝子解析を行った。現在これについてはデータベース化を進めている所である。

今後は引き続き収集した菌株の遺伝子解析を進めると共に、乾燥標本の形態学的特徴を基にした種の同定も進めて行き、データベース構築を進める予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 足立亜衣, 久野祐功、須原弘登、近藤隆一郎、前川二太郎「外生菌根菌 *Lyophyllum shimeji* によるダイオキシン分解」日本菌学会 52 回大会 (2008.5.31.-6.1. 於三重大学)
- ② 牛島秀爾・前川二太郎・須原弘登「ブナ倒木上に発生する *Oudemansiella* 属 (広義) の一種について」日本菌学会 52

- ③ 回大会 (2008.5.31.-6.1. 於三重大学)
彌永このみ、須原弘登、霜村典宏、前川二太郎「日本産 *Peniophorella praetermissa* 集合種の分類と系統」日本菌学会 52 回大会 (2008.5.31.-6.1. 於三重大学)
- ④ 牛島秀爾・前川二太郎・須原弘登「小笠原諸島産コウヤクタケ類 (担子菌門) の分類学的研究」日本菌学会 51 回大会 (2007.5.26.-27. 於筑波大学)

[図書] (計 0 件)
[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

須原 弘登 (スハラ ヒロト)
鳥取大学・農学部・附属菌類きのこ遺伝資源研究センター・講師
研究者番号：90423540

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

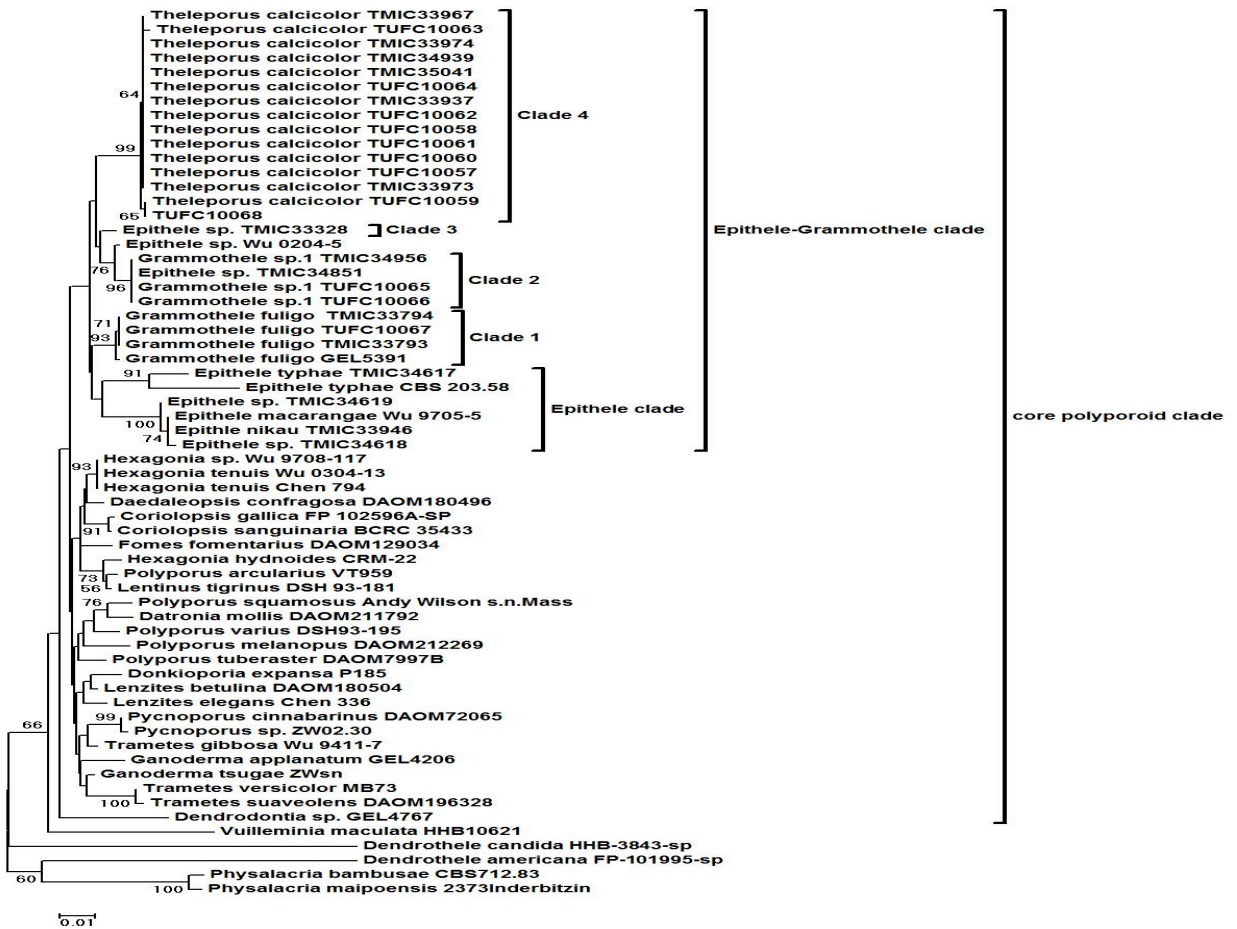


図3. 25S rDNA領域のNJ法により作成した系統樹

内部枝の数値はブートストラップ値を示す。

アウトグループとして*Vuilleminia maculata*, *Dendrothele candida*, *D. americana*, *Physalacria bambusae*および*P. maipoensis*を用いた。