

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：2019～2021

課題番号：19K06137

研究課題名（和文）日本の黒トリュフの起源を探る

研究課題名（英文）Unraveling the origins of Japanese black truffles

研究代表者

木下 晃彦（Kinoshita, Akihiko）

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：70533983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：日本国内のトリュフの分布について包括的に調査した研究は本研究が初めてである。解析対象とする標本収集にあたり、アジアクロセイヨウショウロは北海道から熊本県まで、一方、イボセイヨウショウロも北海道から鹿児島県まで合計25都道府県で発生することが明らかになった。北日本ではミズナラをはじめとする落葉広葉樹が主要な宿主だったのに対し、南西日本では落葉広葉樹が主な宿主であることが想定された。これら黒トリュフの集団遺伝解析の結果、黒トリュフは動植物と同じように、地理的な制約を受けており、最終氷河期での陸橋形成時の宿主の分散パターンが重要な影響を与えたのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胞子や菌糸などの繁殖体を長距離散布できないきのことして地下生菌であるトリュフを対象とし、国内の広範囲から収集した大量のサンプルを高い精度で解析することによって、日本列島へのきのこ類の移入や多様化の解明に貢献を果たした。またトリュフは樹木と共生する菌根菌のため、本成果は、宿主樹木の成立解明においても重要な知見になると予想される。近年、我が国でメディアや食品を通じて高級食材としての関心が向けられるが、生物学的側面に触れられることはほとんどない。本研究では、トリュフが長い時間をかけて大陸から列島に定着した生態的に重要な微生物であることを提示した。

研究成果の概要（英文）：This is the first comprehensive study of two black truffles distribution in Japan. *Tuber himalayense* and *T. longispinosum* occurs in 25 prefectures from Hokkaido to Kyushu. In northern area, deciduous broad-leaved trees such as *Quercus crispula* were the main host tree species, whereas evergreen oak were assumed to be the main host species in southwestern Japan. Phylogenetic analyses on genome-wide single nucleotide polymorphism for each two black truffle suggest that they are geographically constrained like plants and animals, and that host dispersal patterns during the last glacial period may have had an important factor for their distribution.

研究分野：森林微生物学

キーワード：菌根菌 生物地理 ゲノムワイドSNP 集団遺伝学

1. 研究開始当初の背景

日本には20種を超えるトリュフが自生し (Kinoshita et al. 2011)、そのうち2種の黒トリュフが北海道から九州にかけて分布する (アジアクロセイヨウショウロ: *Tuber himalayense*、イボセイヨウショウロ: *T. longispinosum*)。両者は姉妹種で、前者は中国、台湾、インドにかけて分布するアジア広域種で、後者は日本固有種である。2種ともにマツ科、ブナ科、カバノキ科樹種と共生する菌根菌で、樹木の養分吸収や定着、森林の成立過程において重要な役割を果たしている。

一般の地上生きのこ類は、風による孢子散布によって広範囲に分布域を拡げるのに対し、トリュフは地中に子実体 (きのこ) を形成するため、動物による摂食・排泄に孢子散布を依存 (有性繁殖) または菌根から伸びる菌糸を通じて隣の樹木に伝播 (無性繁殖) によって分布域を拡げる。地続きでのみ分布拡大するため、海や河川などの物理的障壁は種分化や種内の遺伝的構造を形成する要因となる。従って、きのこ類の中でもトリュフは進化や多様化のプロセスを追跡しやすい (Murat et al. 2004; Feng et al. 2016)。

我々は国内21地点から採集された2種の黒トリュフを対象に7遺伝子領域の塩基配列データをもとに分子系統解析を行い、2種ともに遺伝子型が地域ごとに纏まることを明らかにした (Kinoshita et al. 2011, 2018a)。アジア広域種は地域間で遺伝的変異が大きいが、日本固有種は小さいことも分かった。このことから、2種は地域的な固有性を維持しつつ、個々に分布拡大したと考えられるが、その過程は分かっていない。本研究の解明は、トリュフの生物地理の解明のみならず、また菌根共生相手となるコナラ属やマツ属など日本の森林樹木の多様性の解明の上で重要な知見となる。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、日本列島への黒トリュフの定着プロセスと国内の遺伝構造の解明することを目的とした。そして、将来的な栽培化を見据えて、黒トリュフの遺伝攪乱を防ぐための感染苗木の移植ガイドラインを提示することとした。

3. 研究の方法

解析対象サンプルは先行研究で用いた子実体の乾燥標本 (13地点約60サンプル) に加え、国内の4博物館に収蔵されている標本、そして新たに調査を行い収集した標本を対象とした。全ての乾燥標本からCTAB法によりDNAを抽出した後、ゲノム中のSNP探索のため、Suyama & Matsuki (2015)らが開発したMIG-seq法に順じて、1st PCRを行った。その後のライブラリー調整や次世代シーケンス解析は、(株) GENODASに委託した。

取得した生データに対して、短い断片とQV値の低い延期配列を除去した。その後、種ごとに産地情報を加えたテキストファイルを作成してstacks ver. 2.61により、一塩基多型の抽出を行なった。SNPの欠損率が100%のサンプルを除去した後、IQ-TREEを用いて塩基置換モデルを選択後、最尤法に基づく分子系統解析を行なった。

4. 研究成果

北海道から鹿児島県にかけて、25都道府県から495サンプルを収集した (アジアクロセイヨウショウロ: 235、イボセイヨウショウロ: 260)。北海道ではミズナラなど落葉広葉樹下で子実体が見られたが、九州ではシラカシなど常緑広葉樹下で発生する事例が多く見られた。2種ともに国内で広域分布することが明らかになった。

アジアクロセイヨウショウロ:

MIG-seq解析から取得した、192個体、30,029の一塩基多型のマルチプルアライメントをもとに、最尤法による分子系統解析を行なった結果、日本のアジアクロセイヨウショウロの集団は、中国の集団とは区別され、国内の地域ごとの集団が形成された (図1)。すなわち、北海道、東北、関東、中部、近畿、中国、四国、九州からなるクレードである。系統解析では国内の集団は、2つの主要なクレードにわかれ、一つ目のクレードでは、北海道の集団が初期に分岐した後に、さらに2つの集団、近畿~中国地方の集団と、関東と九州~四国の集団に分岐したことが推定された。もう一方のクレードでは、前者のクレードとは逆に、九州の集団が初期に分岐した後、東北の集団が続いて分岐し、その後さらに北海道、関東、中部の集団へ分岐した。

このような2つのクレードで、分岐順序が対照的となった結果は不明だが、朝鮮半島およびサハリンと日本列島が陸橋で繋がっていた最終氷期の樹木の移入経路や分布変遷の影響を受けていると考えられる。今後、集団遺伝解析を進め、経路や祖先集団の推定など進める。

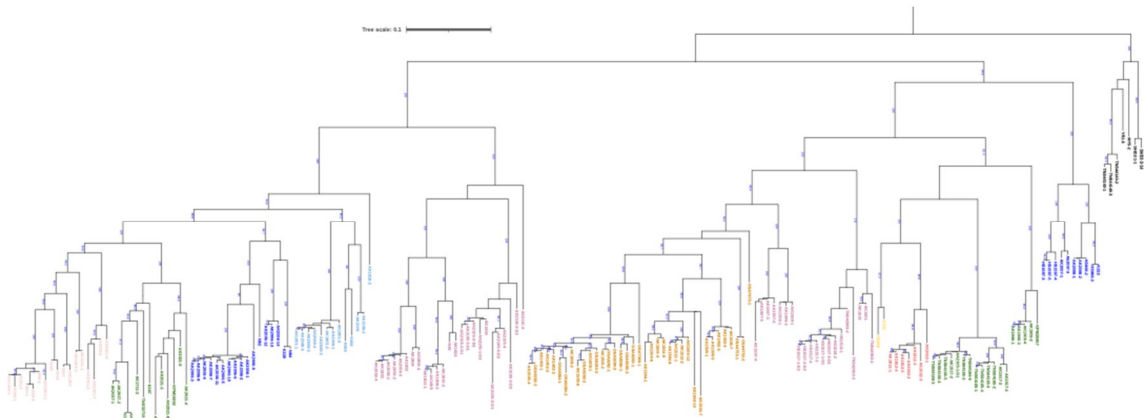


図1 . 30,029の一塩基多型に基づくアジアクロセイヨウショウロ集団の最尤系統樹

イボセイヨウショウロ :

220個体から取得された24,248の一塩基多型に基づく分子系統解析の結果、アジアクロセイヨウショウロの場合と同様に、国内の地域集団はまとまった系統群を形成し、多系統となることが明らかとなった(図2)。イボセイヨウショウロは1例のみ中国での発生例があるが、ほとんどは日本でのみ発生する。従って祖先集団は日本のいずれかの地域から拡散したと考えられるが、今後集団遺伝解析を進め明らかにする。

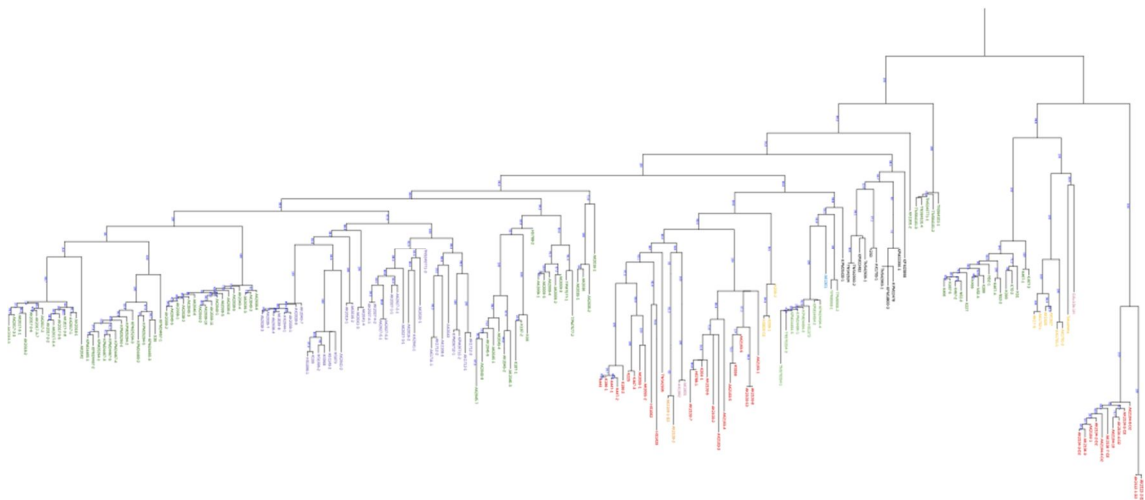


図2 . 24,248の一塩基多型に基づくイボセイヨウショウロ集団の最尤系統樹

以上のように、日本の黒トリュフ2種は地域ごとに遺伝的に分化していることが明らかになったが、種によって拡散の背景が異なる可能性がある。栽培化にあたっては、地域ごとに、どの菌株をどの程度の範囲まで利用しても差し支えないかなど、指針を設ける。

引用文献

- Feng, B., Zhao, Q., Xu, J., Qin, J., & Yang, Z. L. (2016). Drainage isolation and climate change-driven population expansion shape the genetic structures of *Tuber indicum* complex in the Hengduan Mountains region. *Scientific Reports*, 6(1), 21811.
- Kinoshita, A., Nara, K., Sasaki, H., Feng, B., Obase, K., Yang, Z. L., & Yamanaka, T. (2018). Using mating-type loci to improve taxonomy of the *Tuber indicum* complex, and discovery of a new species, *T. longispinosum*. 21.
- Kinoshita, A., Sasaki, H., & Nara, K. (2011). Phylogeny and diversity of Japanese truffles (*Tuber* spp.) inferred from sequences of four nuclear loci. *Mycologia*, 103(4), 779-794.
- Murat, C., Díez, J., Luis, P., Delaruelle, C., Dupré, C., Chevalier, G., Bonfante, P., & Martin, F. (2004). Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial recolonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 164(2), 401-411.
- Suyama, Y., & Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: An effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kinoshita, A., Sasaki, H., Orihara, T., Nakajima, M., Nara, K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Tuber iryudaense and T. tomentosum: Two new truffles encased in tomentose mycelium from Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mycologia	6. 最初と最後の頁 653-663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00275514.2021.1875709	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 木下晃彦、佐々木廣海	4. 巻 4
2. 論文標題 国立科学博物館の黒色系トリュフ（セイヨウショウロ属）標本の見直しと形態識別ガイド	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Truffology	6. 最初と最後の頁 9-16
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Kinoshita, Kohei Yamamoto, Toshiyuki Tainaka, Toshifumi Handa, Akiyoshi Yamada	4. 巻 63
2. 論文標題 Tuber torulosum : A new truffle species decorated with moniliform cystidia from Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 26-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.47371/mycosci.2021.10.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------