

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770083

研究課題名(和文)メタゲノミクスを用いた菌類エンドファイトの多様性解析

研究課題名(英文)Analysis of the diversity of fungal endophytes with metagenomics

研究代表者

大園 享司(Osono, Takashi)

京都大学・生態学研究センター・准教授

研究者番号：90335307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯林・亜熱帯林における樹木葉のエンドファイトの多様性をメタゲノミクスにより解析した。得られた菌類DNAの95278配列は、相同性閾値97%により224の操作的分類群(OTU)に区分された。門まで特定された178 OTUのうち148 OTUは子囊菌類であった。主要なOTUは一般的なエンドファイト・病原菌として知られる種であった。菌類群集の類似性は同一樹種の葉間で低く、高い多様性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The alpha diversity and taxonomic composition of endophytic fungi associated with leaves of six tree species were examined in two lowland tropical forests and a subtropical forest in Asia and Australia, using ITS metabarcoding with Roche 454 pyrosequencing. A total of 95,278 fungal reads were clustered into 224 OTUs at 97% similarity threshold. Of the 178 OTUs identified to the phylum, 148 and 30 OTUs belonged to Ascomycota and Basidiomycota, respectively. Major OTUs were common foliar endophytes and pathogens. The low similarities of endophytic fungal assemblages between leaf samples of a single tree species suggested high beta diversity.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：エンドファイト メタゲノミクス 多様性 林冠生物学 次世代シーケンサー 熱帯林 菌類

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 菌類は地球上に 150 万種いると見積もられており、昆虫に次いで多様な生物群である。菌類は動植物の寄生者ないし相利共生者として、多様な生物とさまざまな生物間相互関係を結んでおり、また動植物遺体の分解者として有機物の分解・還元に関わっている。菌類は地球上の生態系において、他の生物にはないユニークな生態的役割を担っている。菌類は生態系の生物多様性の創出、物質生産の維持、二酸化炭素など温暖化ガスの発生調整など、地域・地球レベルの生態系の働きに直接的、間接的に関与している。

(2) 菌類は微小で、なおかつ形態的な特徴に乏しいため、その多様性研究は他の生物群に比べて立ち遅れていた。ところが近年の分子系統学的手法の発展により、菌類研究の進展を妨げていた方法論的な問題点が克服されつつある。特に今日では、大量の塩基配列を迅速かつ効率的に解読できる次世代 DNA シーケンサーの登場が、飛躍的な研究発展の契機を与えている。次世代シーケンサーにより、菌類群集を対象とした効率的なメタゲノミクス、生態学的に重要な機能を担う遺伝子の同定を目的とした非モデル菌類種のゲノム解析・発現解析、情報量の多いシーケンス・ベースの集団遺伝学的解析などが可能となっている。

(3) このうちメタゲノミクスでは、単一菌種の分離・培養を経ずに、環境中の菌類の集団から直接ゲノム DNA を調整し、そのヘテロなゲノム DNA をそのままシーケンシングする。これにより、膨大な数の塩基配列データが一気に入手可能となる。しかしながら、菌類の多様性科学の分野における次世代シーケンサーを用いたメタゲノミクスの適用例は、国内およびアジア熱帯地域では申請者の知る限りほとんどなく、海外でもまだ少ない。

(4) 本研究課題では、エンドファイトとよばれる菌類群を解析対象とする。菌類エンドファイトは植物の生葉の組織内に無病徴で感染している菌類である。多様な菌類エンドファイトが葉から出現するが、それらの菌類は植物の生長促進や植食性動物による摂食の阻害、および植物組織の枯死後の分解プロセスに関わっていることが実証されており、生態的機能の面でも多様な機能群である。特に熱帯降雨林では、最近の研究により、菌類エンドファイトが「超多様」であることが示唆されている。従来の分離・培養法やクローンライブラリー法では、この菌類エンドファイトの「超多様性」の全貌を明らかにすることができなかったが、次世代シーケンサーを用いたメタゲノミクスで、熱帯降雨林における菌類エンドファイトの「超多様性」の実態が明らかになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

メタゲノミクスによって熱帯降雨林における菌類エンドファイトの多様性を解析する。マレーシアとオーストラリアの熱帯降雨林において、林冠クレーンを用いて採取した計 4 樹種の生葉と、本邦亜熱帯林において採取した 2 樹種、計 6 樹種を実験に用いた。

## 3. 研究の方法

(1) 生葉サンプルは、マレーシア・サラワク州のランビルヒル国立公園と、オーストラリア・クイーンズランド州のケープトリビューレーションで採取した。マレーシアでは 2009 年 2 月に、オーストラリアでは同年 8 月に、それぞれ林冠クレーンを用いて林冠部から生葉を採取した。林冠部の樹高は、マレーシアで 40m、オーストラリアで 30m 程度である。マレーシアでは *Dryobalanopsis aromatica* および *Shorea beccariana* (いずれもフタバガキ科) の 2 優占樹種を、オーストラリアでは *Endiandra microneura* (クスノキ科) と *Cleistanthus myrianthus* (コミカンソウ科) の 2 優占樹種を対象とした。加えて、沖縄本島北部においてスダジイ *Castanopsis sieboldii* (ブナ科) とイジュ *Schima wallichii* (ツバキ科) の生葉を採取して実験に用いた。

(2) 葉は葉片 (直径 5.5cm) を打ち抜いて表面殺菌後、DNA 抽出・精製のあと菌類特異的なプライマーを用いてリボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域を PCR 増幅したのち、ロシユ 454 Titanium を用いてパイロシーケンシングした。得られた塩基配列はクオリティチェック後、Claident を用いて類似度閾値 97% で操作的分類群 (Operational Taxonomic Unit、以下 OTU) にクラスタリングしたあと、データベース検索により分類群を特定した。

## 4. 研究成果

(1) 全体で 95,278 配列が得られ、それらは類似度閾値 97% で 224 OTU に区分された。樹種ごとに配列数 OTU 数曲線を作成したところ、沖縄で採取したスダジイとイジュのサンプルでは、3,000 配列付近でカーブがほぼ頭打ちになる傾向が認められたが、その一方で、マレーシアとオーストラリアで採取したサンプルでは、3,000 配列付近まで比較的急速に増加するパターンが得られた (図 1)。

(2) この配列数 OTU 数曲線に基づいて Jack1, Jack2, Bootstrap の各方法により OTU 数を推定したところ、沖縄で採取したスダジイとイジュのサンプルでは 3,000 配列でほぼ 100% の OTU が得られることが分かった。その一方で、マレーシアとオーストラリアのサンプルでは、今回の分析により、推定 OTU 数の 75~98% の OTU が得られたと考えられた。

(3) 全 224 OTU のうち、分類群を門まで特

定できたのは 178 OTU であり、このうち子囊菌類が 148 OTU (83%)、担子菌類が 30 OTU (17%) であった。子囊菌類は 6 綱 (クロイボタケ綱、フンタマカビ綱、ユーロチウム菌綱、ズキンタケ綱、チャシブゴケ菌綱、タフリナ菌綱)、担子菌類は 3 綱 (ハラタケ綱、シロキクラゲ綱、アガリコスチルプム綱) に属していた。種まで特定できたのは 8 OTU (全 224 OTU の 4%) にすぎなかった。

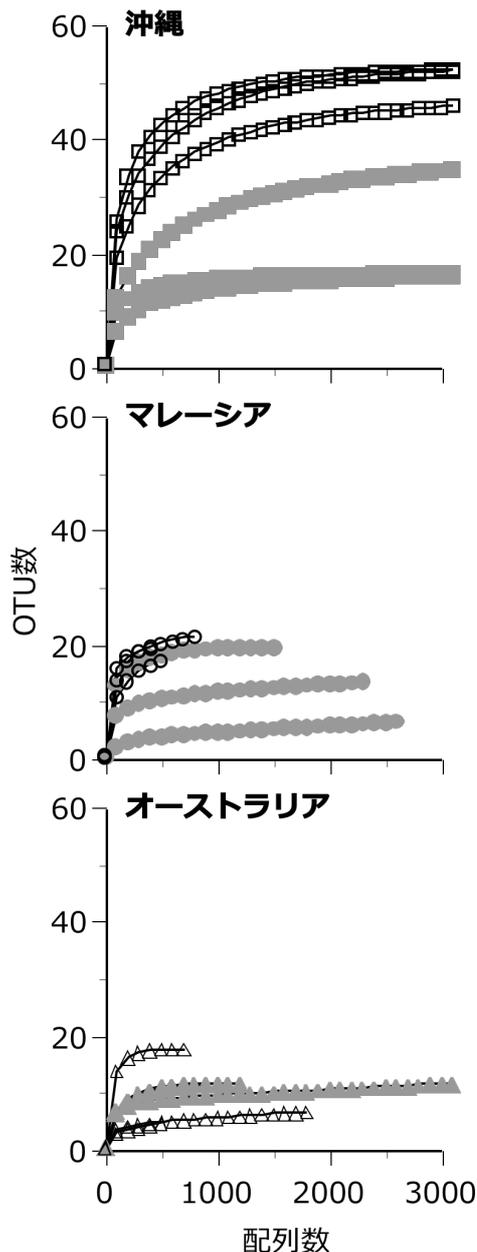


図 1. 配列数 OTU 数曲線. シイ, イジユ, *Dryobalanopsis aromatica*, *Shorea beccariana*, *Cleistanthus myrianthus*, *Endiandra microneura*.

(4) 樹種ごとにエンドファイトの綱構成は異なっていた。クロイボタケ綱は樹種によらず、もっとも OTU 数の多い綱であった。タフリナ綱はイジユでのみ見られた。フンタマカ

ビ綱はマレーシアの *Shorea beccariana* では検出されなかった。担子菌類 OTU はスダジイ、イジユ、マレーシアの *Dryobalanopsis aromatica* でみられたが、他の 3 樹種では検出されなかった。

(5) 出現頻度の高い主要 OTU として 17 OTU (子囊菌類 12 OTU、担子菌類 5 OTU) が得られた。もっとも頻度が高かった OTU は、一般的なエンドファイトである *Guignardia magniferae* や *Mycosphaerella heimii* と塩基配列が 100% 一致していた。これらの高頻度種は、さまざまな地域の、さまざまな植物種の葉において見出される一般的なエンドファイト・病原菌として知られる。6 樹種すべてから検出された OTU はなかった。

(6) 菌類 OTU 組成の類似度を Sorensen 指数 (完全一致で 1、完全不一致で 0 となる) で評価したところ、同樹種の葉サンプル間での類似度は 0.30~0.54 であった。これに対して、同一地域の樹種間では 0.05~0.18、異なる地域のサンプル間では 0.01~0.04 と類似度が低かった。同一樹種であっても葉サンプル間で類似度が比較的低かったことから、解析に用いる葉サンプル数を今後さらに増やせば、あるいは対象とする樹種や地域を拡げれば、さらに新しいエンドファイト OTU が得られるものと考えられた。

#### 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 11 件)

1) Osono T. Metagenomic approach yields insights into fungal diversity and functioning. In: Species Diversity and Community Structure: Novel Patterns and Processes in Plants, Insects, and Fungi. SpringerBriefs in Biology (eds. by T. Sota et al.), Springer, Berlin, 2014, pp.1-23. (査読あり)

[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-4-431-54261-2\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-4-431-54261-2_1)

2) Osono T. Diversity and ecology of endophytic and epiphytic fungi of tree leaves in Japan: a review. In: Advances in Endophytic Research (ed. by V.C. Verma and A.C. Gange), Springer, Germany, 2014, pp.3-26. (査読なし)

[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-81-322-1575-2\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-81-322-1575-2_1)

3) Ikeda A., Matsuoka S., Masuya H., Mori A.S., Hirose D. & Osono T. (2014) Comparison of the diversity, composition, and host recurrence of xylariaceous endophytes in subtropical, cool temperate, and subboreal regions in Japan. Population Ecology 56: 289-300. (査読あり)

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10144-013-0412-3>

4) Hirose D., Matsuoka S. & Osono T. (2013) Assessment of the fungal diversity and succession of ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis. *Mycologia* 105: 837-843. (査読あり)

5) Hirose D., Tanabe Y., Uchida M., Kudoh S. & Osono T. (2013) Microfungi associated with withering willow wood in ground contact near Syowa Station, East Antarctica for 40 years. *Polar Biology* 36: 919-924. (査読あり)

<http://www.mycologia.org/content/105/4/837.abstract>

6) Hirose D., Sakai S., Itoioka T. & Osono T. (2013) Microfungi associated with a myrmecophyte *Macaranga bancana*. *Tropics* 22: 19-25. (査読あり)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/tropics/22/1/22\\_19/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tropics/22/1/22_19/_article/-char/ja/)

7) Osono T., Tateno O. & Masuya H. (2013) Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. *Mycoscience* 54: 54-61. (査読あり)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354012000125>

8) Osono T., Hirose D., Nagamasu H. & Itoioka T. (2013) Biodiversity of fungi in a tropical rain forest. Eds by Sakai S., Ishii R. & Yamamura N. *Collapse and Restoration of Ecosystem Networks with Human Activity*. RIHN Project Report. pp. 137-140. Published by Research Institute for Humanity and Nature. (査読なし)

9) Osono T. & Masuya H. (2012) Endophytic fungi associated with leaves of Betulaceae in Japan. *Canadian Journal of Microbiology* 58: 507-515. (査読あり)

10) Osono T. (2012) Endophytic fungal assemblages on leaves of 73 deciduous tree species in a cool temperate forest. *Applied Forest Science* 21: 13-20. (査読あり)

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w2012-018#.U2CA2HMspal>

11) Osono T. & Hirose D. (2011) Colonization and lignin decomposition of pine needle litter by *Lophodermium pinastri*. *Forest Pathology* 41: 156-162. (査読あり)

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0329.2010.00648.x/abstract>

〔学会発表〕(計 19 件)

1) 阪口瀬理奈・松岡俊将・川口恵里・森章・広瀬大・大園享司 知床羅臼岳の針広混交林における樹木葉内生菌の標高分布とその制

限要因. 日本菌学会第 57 回大会 東京農業大学 東京 2013 年 6 月

2) 阪口瀬理奈・松岡俊将・川口恵里・森章・大園享司 知床羅臼岳の標高傾度に沿った内生菌類群集の変化. 日本生態学会第 60 回大会(ポスター講演)グランシップ 静岡 2013 年 3 月

3) 阪口瀬理奈・松岡俊将・伊藤公一・広瀬大・矢澤重信・西村理・田邊晶文・東樹宏和・大園享司 次世代シーケンサーを用いたアジア熱帯林における内生菌類の群集構造の比較. 日本菌学会第 56 回大会 岐阜大学 岐阜 2012 年 5 月

4) Sakaguchi C, Matsuoka S, Ito K, Hirose D, Yazawa S, Nishimura O, Tanabe A, Toju H, Osono T. Next-generation sequencing reveals the hyper-diversity of endophytic fungi associated with tree leaves in tropical forests. The 5th East Asian Federation of Ecological Societies (EAFES) International Congress. March 2012, Ryukoku University, Shiga, Japan (poster session).

5) Ikeda A, Hirose D, Matsuoka S, Osono T. Diversity of Xylariaceous fungi on living and dead leaves: endophytes become saprophytes? The 5th East Asian Federation of Ecological Societies (EAFES) International Congress. March 2012, Ryukoku University, Shiga, Japan (poster session).

6) 阪口瀬理奈・松岡俊将・伊藤公一・広瀬大・矢澤重信・西村理・大園享司 次世代シーケンサーで明らかにする亜熱帯林内生菌の超多様性 日本菌学会第 55 回大会 北海道大学 札幌 2011 年 9 月

7) 大園享司・升屋勇人 カバノキ科樹木の葉に見いだされる菌類エンドファイトの多様性 日本菌学会第 55 回大会 北海道大学 札幌 2011 年 9 月

8) 池田あんず・広瀬大・松岡俊将・大園享司 国内亜熱帯林におけるクロサイワイタケ科内生菌の多様性 気候帯間比較による評価 日本菌学会第 55 回大会 北海道大学 札幌 2011 年 9 月

9) Ikeda A, Hirose D, Matsuoka S, Osono T. Diversity and host-specificity of endophytic Xylariaceae in a subtropical forest in Japan inferred from rDNA sequence analysis. XIII International Congress of Mycology (IUMS2011 Sapporo), September 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan. (poster session)

10) Sakaguchi C, Matsuoka S, Ito K, Hirose D, Yazawa S, Nishimura O, Osono T. 454 sequencing reveals the hyper-diversity of endophytic fungi associated with tree leaves in a subtropical forest in southern Japan. XIII International Congress of Mycology (IUMS2011 Sapporo), September

2011, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan. (poster session)

11) Osono T., Hirose D. Environmental DNA analysis reveals the fungal succession on *Camellia japonica* leaves and the functioning of ligninolytic endophytes. XIII International Congress of Mycology (IUMS2011 Sapporo), September 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan. (poster session)

12) Osono T. Metagenomics of hyper-diversity of tropical fungi. 日本進化学会 2011 京都 シンポジウム「未知の多様性探索とゲノム情報」 京都大学 京都 2011年7月

13) Sakaguchi C, Matsuoka S, Ito K, Hirose D, Yazawa S, Nishimura O, Osono T. Next-generation sequencing reveals the hyper-diversity of endophytic fungi associated with tree leaves in a subtropical forest in southern Japan. The 5th International Symposium of the Biodiversity & Evolution gCOE, July 2011, Kyoto University, Kyoto, Japan. (poster session)

14) Nagao Y, Hirose D, Osono T. The diversity of fungi in ant-plants and a three-way symbiosis. The 5th International Symposium of the Biodiversity & Evolution gCOE, July 2011, Kyoto University, Kyoto, Japan. (poster session)

15) Osono T., Hirose D. Phylogenetic diversity and host specificity of *Coccomyces* in Asian forests. The 5th International Symposium of the Biodiversity & Evolution gCOE, July 2011, Kyoto University, Kyoto, Japan. (poster session)

16) Ikeda A, Hirose D, Matsuoka S, Osono T. The diversity of Xylariaceous endophytes in a subtropical forest in Japan: comparison with different climate zones. The 5th International Symposium of the Biodiversity & Evolution gCOE, July 2011, Kyoto University, Kyoto, Japan. (poster session)

17) 池田あず・ 広瀬大・松岡俊将・大園享司 亜熱帯林における内生菌の種多様性と宿主特異性. 京都大学微生物科学寄付研究部門主催シンポジウム「微生物科学研究の現状と展望」(ポスター講演) 京都大学 京都 2011年6月

18) 阪口瀬理奈・松岡俊将・伊藤公一・広瀬大・矢澤重信・西村理・大園享司 次世代シーケンサーで解析する亜熱帯林内生菌の超多様性. 京都大学微生物科学寄付研究部門主催シンポジウム「微生物科学研究の現状と展望」(ポスター講演) 京都大学 京都 2011年6月

19) 広瀬大・大園享司 漂白化した落葉上に子実体形成する *Coccomyces* 属菌の系統的多様性と宿主特異性. 平成 23 年度日本菌学会関東支部会年次大会 東京農業大学 東京 2011年4月

〔図書〕(計 6 件)

1) 大園享司 熱帯林・亜熱帯林の落ち葉は白く腐る. 生き物たちのつづれ織り(下)(阿形清和・森哲監修、高林純示ほか編) 京都大学学術出版会、2012、pp. 139-149.

2) 大園享司 分解. 森のバランス 植物と土壌の相互作用(森林立地学会編) 東海大学出版会、2012、pp. 187-196.

3) 大園享司(訳) グラスエンドファイト その生態と進化(原題: Ecology and Evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis, Cheplick G.P. & Faeth S.H.) 東海大学出版会、2012.

4) 広瀬大・大園享司(訳) 菌類の生物学(原題: Fungal Biology, Understanding the fungal lifestyle, second edition, Lysek G. & Jennings D.H.) 京都大学学術出版会、2011.

5) 大園享司・鏡味麻衣子 生態学からみた微生物の世界. 微生物の生態学(大園享司・鏡味麻衣子編) 共立出版、2011、3-15.

6) 大園享司・鏡味麻衣子 微生物の生態学、共立出版、2011.

〔その他〕

アウトリーチ活動

1) 2011年10月2日 ひらめき ときめきサイエンス~ようこそ大学の研究室へ~ KAKENHI「みんなちがうのにいっしょにくらしている生態系の不思議: 生物の多様性って何だろう?」実施分担者

2) 2012年11月18日 サイエンスカフェ高槻「みんなの知らない南極のカビ・きのこの話」講師

ホームページ等

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~tosono/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大園享司 (OSONO, Takashi)

京都大学・生態学研究センター・准教授

研究者番号: 90335307