

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870017

研究課題名(和文) 外生菌根菌の進化とその種多様化の起源を探る

研究課題名(英文) Evolution and origin of diversification in ectomycorrhizal fungi

研究代表者

佐藤 博俊 (Sato, Hirotoshi)

京都大学・人間・環境学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10635494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の重要な共生者である外生菌根菌の分子系統推定の精度を向上させることを目的とした研究を行った。従来、外生菌根菌の分子系統推定は数個程度の遺伝子の配列から行われていたが、推定精度を上げるためには大量の遺伝子配列で分子系統推定を行う必要があった。本研究では、菌のシングルコピー遺伝子を増幅できるPCRプライマーを新たに96ペア開発し、次世代シーケンサーを用いることでこれらの遺伝子配列を効率的に解読する方法を確立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to improve the resolution of molecular phylogenetic inference of ectomycorrhizal fungi, which are important plant symbionts. In the previous studies, molecular phylogenetic analyses of ectomycorrhizal fungi were performed based on the nucleotide sequences of a few genes, and thus it remains an important challenge to increase the number of genes used for inferring the phylogeny of these fungi and thereby improve the resolution of phylogenetic inference. In this study, 96 pairs of PCR primers by which single copy genes of ectomycorrhizal fungi can be amplified were designed, and high-throughput analysis for sequencing these genes using the next generation sequencer were developed.

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 菌類 共生 進化 DNA 多様性

## 1. 研究開始当初の背景

地下部における菌類と植物の共生系である菌根共生は陸上生態系で最も普遍的にみられる共生系の一つである。菌根菌と呼ばれる菌類はその菌糸を宿主植物の根に侵入させることで、菌糸と植物根の融合体である菌根を形成している。菌根を介して、菌根菌は宿主植物から光合成産物を得ており、その逆に宿主植物は菌根菌が土壌に張り巡らせた微細な菌糸から吸収した水分や窒素・リンといった養分を受け取っており、両者は通常、相利共生関係にある。菌根の中でも、マツタケやトリュフなどいわゆるキノコ類と、ブナ科・マツ科・カバノキ科・フタバガキ科といった温帯や熱帯において優占種となる樹木が形成する菌根は外生菌根と呼ばれる。本研究では、外生菌根を形成する菌類である外生菌根菌に着目した研究を行う。

外生菌根菌は約2億年前に初めて出現したとされているが、その多様化が進んだのは、主要な被子植物が出現した白亜紀中期から後期ごろであると考えられている。外生菌根菌はその進化の初期段階においてはグネツム科やマツ科といった裸子植物と共生関係を結んでいたが、白亜紀にはブナ科・カバノキ科・フタバガキ科など様々な被子植物と共生関係を結ぶようになったと考えられている。しかしながら、従来の研究では、配列のアライメントの難しいリボソーム RNA 遺伝子の領域が分子系統推定に使用されることが多く、分子系統樹の解像度に難があることが多かった。近年、よりアライメントの行いやすいタンパクコード領域が分子系統に使用されるようになってはきているものの、配列の情報量が十分ではないため、高次分類群の分子系統樹の解像度は不十分であるのが現状である。

このような先行研究での問題を踏まえて、本研究では、外生菌根菌の進化を明らかにするためには、外生菌根菌の分子系系統樹を高精度に推定する手法を確立することが必要であると私は考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、外生菌根菌の進化やその多様化の歴史を明らかにすることを目指す前段階として、分子系統推定の精度を向上させることを目的としている。分子系統推定の精度を向上させるためには、タンパクコード領域のシングルコピー遺伝子を多数、分子系統推定に用いることが必要である。しかしながら、これまで限られた遺伝子に対してのみ、PCRプライマーが開発されているのが現状であるため、多数のシングルコピー遺伝子に対してプライマーを開発することが必要である。さらに、大量の遺伝子情報の配列解読を行うため、効率的な大量処理の方法を確立することが必要である。本研究では、多数のシングルコピー遺伝子のプライマー開発と、大量配列情報の効率的な解読方法の確立という2点

を主要な目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、ゲノム解読済みの菌のアミノ酸配列情報を公開している FunyBase において、*Phanerochaete chrysosporium* という菌のシングルコピー遺伝子のアミノ酸配列を取得した。次に、真菌ゲノムデータベースにおいて BLAST 解析 (tblastn) を行って、20 種のハラケ亜綱の菌のゲノム情報から、*Phanerochaete chrysosporium* のアミノ酸配列に相関な塩基配列を探索した。得られたシングルコピー遺伝子の塩基配列に対してそれぞれアライメントを行い、保存性の高い領域についてプライマーの設計を行った。増幅長さは 400~600bp 程度になるように設計し、設計したプライマーはソフトウェアを用いてヘアピン構造やダイマー形成の有無のチェックを行った。

次に、開発したプライマーの実用性について確認するため、カレバハツ (*Russula castanopsidis*)、コテングタケモドキ (*Amanita pseudoporphyria*)、コオニグチ (*Strobilomyces seminudus*)、およびボタニイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) の4種の外生菌根菌を対象として、開発したプライマーペアを用いた PCR を行った。この際、1 回目の PCR において目的とする産物の増幅を行い、2 回目の低サイクル PCR で次世代シーケンサーが配列を認識するためのアダプター配列やサンプルを識別するためのタグ配列を目的産物の両端に組み入れる反応を行うという、2 段階の PCR を行った。さらに、これらの PCR 産物の精製産物をライブラリーとして、次世代シーケンサー (GS - Junior, Roche) によるシーケンス解析を行った。

## 4. 研究成果

FunyBase において探索を行った結果、*Phanerochaete chrysosporium* のシングルコピー遺伝子のアミノ酸配列が 246 個得られた。これらの配列を菌のゲノムデータベースに照合したところ、10 種以上の菌において共通して見られる遺伝子は 155 個であった。これら 155 個の遺伝子の塩基配列情報についてアライメントを行い、保存的な領域を探索してプライマーの設計を行ったところ、96 個の遺伝子についてプライマーを設計することができた。ソフトウェアを用いて、外生菌根菌のゲノムデータに対して、これらのプライマーを用いた PCR のシミュレーションを行ったところ (in silico PCR)、すべてのプライマーペアで増幅が期待されることが分かった。これらのプライマーペアで PCR 増幅される配列長の期待値は約 550bp であった。

次に、これらの PCR プライマーを用いて、カレバハツ (*Russula castanopsidis*)、コテングタケモドキ (*Amanita pseudoporphyria*)、コオニグチ (*Strobilomyces seminudus*)、およびボタニイボタケ (*Thelephora*

*aurantiotincta*) の 4 種の外生菌根菌を対象として実際に PCR を行い、得られた PCR 産物に対して次世代シーケンサーによるシーケンス解析を行った。次世代シーケンサーによる解析の結果、合計で 161,295 (Passed Filter Wells) のリードが得られ、キメラ配列やノイズ配列を除去した上では、56,124 リードが得られた。次に、アセンブラソフトウェアを用いて、類似度の高い配列についてアセンブルを行い、Contig の作成を行った。解析の結果、4 種の外生菌根菌は、96 個のプライマーペアのうち、それぞれ 79, 48, 59 および 81 個のペアについて期待された遺伝子の配列が確認できた。完全に単一の Contig が得られたものに関しては、96 個のプライマーペアのうち、それぞれ 59, 42, 51 および 28 個のペアについて配列が確認できた。以上の結果から、本研究で開発したプライマーは外生菌根菌の様々な系統群の遺伝子配列の増幅が可能であること、本研究で開発したプライマーを用いることで相当数のデータセット (40~50 遺伝子×550 bp) を得ることが可能であること、さらには、本研究で行った PCR 法や次世代シーケンス法を用いることで大量サンプルについて大量の遺伝子配列の配列解読が短時間で可能であることが示された。一方で、本研究で開発したプライマーは必ずしもあらゆる種群を増幅できるほど万能ではないので、十分な遺伝子数・配列数を確保するには、すべての分類群で増幅する遺伝子だけに絞らずに増幅していないサンプルがあっても許容する穴開きのデータセットを用いていくことが必要であることも分かった。

今後の課題としては、実際に開発したプライマーを用いて実践的に分子系統推定を行っていくことがまず必要であると私は考えている。現在、外生菌根菌の種群であるイグチ目菌のサンプルを世界中から収集し、DNA 産物を確保してあるので、今後、これらのサンプルを用いて分子系統推定の実践を行っていくつもりである。また、今回は、外生菌根菌の様々な種群に適用が可能なプライマーの開発を行ったが、そのために、100%に近い増幅率は実現できなかった。今後、より分類群を限定することで、より増幅効率のよいプライマーを開発できないかも検討していく予定である。さらに、今回は、4 種の外生菌根菌について実際に PCR を行い、次世代シーケンスを行ったが、これらは新鮮な標本であったため、今後は博物館の乾燥標本などより DNA の保存状態の悪いサンプルについても適用が可能かどうかについてもあわせて検討していく予定である。

##### 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 10 件)

Sato H, Morimoto S and Hattori T (2012) A Thirty-Year Survey Reveals That Ecosystem Function of Fungi Predicts Phenology of Mushroom Fruiting. *PLoS one* 7: e49777. (査読あり), doi:10.1371/journal.pone.0049777

Sato H, Tsujino R, Kurita K, Yokoyama K and Agata K (2012) Modelling the global distribution of fungal species: new insights into microbial cosmopolitanism. *Molecular Ecology* 21: 5599-5612. (査読あり), doi: 10.1111/mec.12053

Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S and Sato H (2012) High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS one* 7: e40863. (査読あり), doi:10.1371/journal.pone.0040863

Toju H, Sato H, Yamamoto S, Kadowaki K, Tanabe AS, et al. (2013) How are plant and fungal communities linked to each other in belowground ecosystems? A massively parallel pyrosequencing analysis of the association specificity of root-associated fungi and their host plants. *Ecology and Evolution* 3: 3112-3124. (査読あり), doi: 10.1002/ece3.706

Toju H, Yamamoto S, Sato H and Tanabe AS (2013) Sharing of Diverse Mycorrhizal and Root-Endophytic Fungi among Plant Species in an Oak-Dominated Cool-temperate Forest. *PLoS one* 8: e78248. (査読あり), doi: 10.1371/journal.pone.0078248

Toju H, Yamamoto S, Sato H, Tanabe AS, Gilbert GS, et al. (2013) Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: co-dominance of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution* 3: 1281-1293. (査読あり), doi: 10.1371/journal.pone.0078248

Sawada A, Sato H, Inoue E, Otani Y and Hanya G (2013) Mycophagy among Japanese macaques in Yakushima: fungal species diversity and behavioral patterns. *Primates*: 1-9. (査読あり), doi: 10.1007/s10329-013-0396-9

Toju H, Sato H and Tanabe AS (2014) Diversity and Spatial Structure of Belowground Plant-fungal Symbiosis in a Mixed Subtropical Forest of Ectomycorrhizal and Arbuscular Mycorrhizal Plants. *PLOS ONE* 9: e86566. (査読あり), doi:

10.1371/journal.pone.0086566  
Kadowaki K, Sato H, Yamamoto S,  
Tanabe AS, Hidaka A, et al. (2014)  
Detection of the horizontal spatial  
structure of soil fungal communities in  
a natural forest. Population Ecology  
56: 301-310. (査読あり), doi:  
10.1007/s10144-013-0424-z  
Yamamoto S, Sato H, Tanabe AS,  
Hidaka A, Kadowaki K, et al. (2014)  
Spatial Segregation and Aggregation of  
Ectomycorrhizal and Root-Endophytic  
Fungi in the Seedlings of Two Quercus  
Species. PloS one 9: e96363. (査読あ  
り), doi: 10.1371/journal.pone.0096363

〔学会発表〕(計4件)

佐藤博俊・服部力・東樹宏和 マレーシ  
アサラワク州の低地フタバガキ林におけ  
る外生菌根菌と根圏内生菌の宿主特異性  
と、多様性について. 第124回日本  
森林学会テーマ別セッション. 岩手 2013  
年3月

佐藤博俊 シンポジウム: 菌類における  
メタゲノム解析の現状と今後の展望 - メ  
タゲノム解析から何が分かるのか? -  
日本菌学会第55回大会. 岐阜 2012年5  
月.

佐藤博俊・田辺晶史・東樹宏和 真菌類  
ハラタケ亜門のシングルコピー遺伝子を  
対象としたユニバーサルプライマーの開  
発~次世代シーケンサーを用いた分子系  
統推定を目指して~ 日本植物分類学会  
第13回大会 熊本 2014年3月(口頭)

佐藤博俊・服部力・東樹宏和 東南ア  
ジア熱帯雨林における根圏共生菌の多様  
性パターンと宿主特異性の解明. 日本植  
物分類学会第12回大会 千葉 2013年3  
月. (ポスター)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
アウトリーチ活動  
サイエンスカフェ~これからの「きのこ」の  
話をしよう~in虹色カフェ. 2012年11月(京  
都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博俊 (Sato Hirotooshi)

京都大学・大学院人間・環境学研究科  
研究員

研究者番号: 0635494