

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840128

研究課題名(和文) 外生菌根菌の種多様性はなぜ低緯度で低くなる？～共生樹種の系統的多様性に着目して～

研究課題名(英文) What factors drive low biodiversity of ectomycorrhizal fungi in low-latitude areas

研究代表者

佐藤 博俊 (Sato, Hirotoishi)

龍谷大学・科学技術共同研究センター・博士研究員

研究者番号：10635494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：外生菌根菌は、低緯度地域よりも高緯度地域に多様性のピークがあるとされており、このようなパターンが生まれる原因はよく分かっていなかった。私は、外生菌根菌では共生樹種の転換が多様化のきっかけになったのではないかと考え、オニグチ属菌を用いて、分子系統学的なアプローチからこの仮説の検証を行った。この研究の結果から、オニグチ類は、共生種類の転換、とりわけ、北半球温帯域に広く分布するブナ科・マツ科樹種に宿主転換することで、急速にその分布域を拡大し、異所的種分化が促進される形で急速に多様化したことが示された。この研究を通して、オニグチ属菌をはじめとした外生菌根菌の多様化の起源が明らかになってきた。

研究成果の概要(英文)：Ectomycorrhizal fungi, such as truffle and matsutake, form symbiotic and mostly beneficial relationships with the living roots of a tree. Intriguingly, species diversity of ectomycorrhizal fungi is known to decrease toward lower latitudes unlike most other organisms. However, the evolutionary origin of diversity of those fungi remains to be investigated. Using molecular phylogenetic approaches, our studies suggest that the evolutionary diversification of ectomycorrhizal fungi can be driven by the switches to novel symbiotic host trees. In particular, symbioses with temperate trees in the Northern Hemisphere (oaks and pines) likely have allowed ectomycorrhizal fungi to broaden their ecological niche or to enter novel adaptive zones, thereby promoting their diversification in temperate areas. Our findings have important implications for understanding about the evolutionary origin of ectomycorrhizal fungi.

研究分野：菌類系統分類学

キーワード：多様性 菌類 共生 DNA 系統

1. 研究開始当初の背景

大半の陸上植物は、地下部において『菌根』とよばれる菌類との共生体を形成している。このような『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り、菌根共生を行う菌類は『菌根菌』という名前で総称される。菌根は、共生体の外部形態、共生する植物の種類や植物との相互作用関係のあり方によって、細かく分類されている。その中でも、『外生菌根』とよばれるものは、マツタケ・ホンシメジ・トリュフなどいわゆるキノコ類と、ブナ科・マツ科・ヤナギ科・カバノキ科・フトモモ科・フタバガキ科など温帯や熱帯において優占種となる樹木とが形成する菌根である。外生菌根を形成する菌類と植物は通常、互いに利益をもたらす相利共生関係にあることが古くから分かっている。外生菌根を介して、外生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外生菌根菌が土壤に張り巡らせた微細な菌糸から吸収した水分や窒素・リンを受け取っている。両者は、互いの存在がなければ自然界で生存していけないほど、強い相互依存関係をもっている。

本研究で着目したのは、外生菌根菌の多様性およびその成り立ちについてである。自然界には、多様な外生菌根菌が生育しており、世界で2万~2万5千種ほどが生育しているとされている。特筆すべきことに、外生菌根菌は、熱帯地域よりもむしろ、温帯地域で特に多様性が高くなるのが先行研究から分かっている。一般的に、生物の多様性は赤道に近い地域ほど高くなる傾向にあるので、外生菌根菌は例外的な多様性のパターンをもっていることになる。外生菌根菌の多様性の成り立ちを理解する上では、外生菌根菌がその進化の過程でどのように多様化してきたかという多様化の起源を調べるのが重要である。しかし、これまでの研究では、具体的にどのようなきっかけで外生菌根菌の多様化が進んだのかは解明できていなかった。

一般的に、生物の多様化の進む重要なきっかけの1つとして挙げられるのが、生育地域の急速な拡大である。広大な地域に生育する生物種がいた場合、長い年月の間に、その生育地は徐々に分断化されていき、分断化されたパッチ間で遺伝子の交換が行われなくなると、それぞれが独立の種として枝分かれ(異所的種分化)していくことになる。このように、最初は少数だった種が樹木の枝のように枝分かれしていくことで、生物の多様化は進むと考えられている。

この研究では、『外生菌根菌において急速な分布拡大をもたらした要因は何なのか?』という観点から、外生菌根菌の多様性の起源を探る研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、外生菌根菌が急速に生育地域を拡大できたきっかけとして、共生相手となる宿主樹種との関係の変化、すなわち、宿主転換に着目した。外生菌根菌は、種ごとに、共生できる宿主樹木の種類が大よそ決まっているため、相性のよい樹木のいる場所であれば生育できない。一方、外生菌根菌は、その進化の過程で、ごくまれに共生樹種の樹種を換える(宿主転換する)ことがあることが広く知られている。このような背景から、外生菌根菌は、狭い地域に分布する樹木から広い地域に分布する樹木へ宿主転換することで急速な分布拡大を果たし、その後多様化したのではないかと仮説を考えた。そして、さらに、この広域の分布域をもつ宿主樹種こそが温帯地域に生育するブナ科・マツ科等の樹木だったのではないかと考えた。この研究では、このような仮説について検証する研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、研究材料としては、外生菌根菌の一種であるオニイグチ類(オニイグチ属[Strobilomyces]とアフロボレタス属[Afroboletus])を用いた。オニイグチ類の標本(DNAサンプル)の収拾は、筆者自身の国内または国外(マレーシア)での調査、および各地の標本庫からのサンプル提供によって行い、最終的には東アジア・東南アジア・ヨーロッパ・北米・中米・オーストラリア・アフリカから185個の標本を入手した。

この研究では、まず、オニイグチ類のDNA塩基配列情報に基づいて分子系統樹を構築し、オニイグチ類で起こった種分化の歴史について推定した。分子系統樹は、オニイグチ類がどのように多様化し、宿主転換してきたかを推定する上で基盤となる情報となるので、精度の高いものを得る必要がある。高精度の分子系統推定を行うためには、単一あるいは数個の遺伝子の配列を利用するのではなく、可能な限り大量の遺伝子(それもシングルコピー遺伝子であることが望ましい)の配列を利用することが重要である。このため、本研究では、ゲノム解読済みの菌の配列情報に基づいて、96個のシングルコピー遺伝子について、PCR用のプライマーを新たに設計し

た。オニグチ類 28 種の DNA サンプルに対して、設計したプライマーを用いて PCR を行い、大量塩基配列解読装置（次世代シーケンサー）を利用して、得られた大量の塩基配列情報を同時並列的に解読した。最終的に、80 個の遺伝子配列（23,027 bp）を安定して配列解読することができたので、得られた配列情報に基づいて分子系統推定を行った。最尤法による分子系統推定は RAxML を用いて行い、1000 回のブートストラップを行い、樹形の信頼性の評価を行った。また、ベイズ法による分子系統推定も同時に行い（Beast）樹形の信頼性を事後確率によって評価した。ベイズ法による分子系統推定では、超計量的樹形図（ultrametric tree）を構築し、オニグチ類において種分化の起きた相対的なタイミングを推定した。

次に、分子系統樹の樹形と、現存する種の共生樹種の情報から、オニグチ類において祖先種がどのような樹木と共生していたかを最尤法を用いて推定した（祖先形質復元）。この際、どのような進化速度で異なる樹種に宿主転換するのかについても、赤池情報量規準（AIC）に基づいて推定し、適切な形質進化モデルについても同時に選定を行った。

さらに、分子系統樹の樹形に基づいて、オニグチ類において急速な多様化が進んだタイミングの推定も行った（diversitree と BAMM）。一般的に、分子系統樹の枝分かれが密集している箇所において、急速な種分化が起こっていることが想定される。ここで用いた解析は、このような急速な枝分かれが分子系統樹上の特定の箇所に見られるかどうかに基づいて、多様化速度（種分化速度と絶滅速度の差）の変化について検定する解析である。この解析では、どの樹種と共生しているかと宿主状態によって、オニグチ類の多様化する速度に違いが見られるのかについても検定を行った。

4. 研究成果

オニグチ類の分子系統推定の結果、分子系統樹の大半の枝において、上限値に近い数値のブートストラップ確率（最尤法）ならびに事後確率（ベイズ法）が得られた。本研究の分子系統推定では、従来の菌類の分子系統学的な研究と比較して、配列長にして 4~8 倍程度、解読遺伝子数にして 10~20 倍程度の情報量を利用しており、情報力を圧倒的に増やすことで推定精度を向上させることに成功した。また、次世代シーケンサーを用いて超並列的に配列を解読するという手法を

用いたことから、短時間で大量の情報を入手・処理することができた。本研究で用いた手法は、今後の菌類の分子系統学的な研究の指針となるものと考えている。

オニグチ類において、共生樹種に関する宿主転換の歴史を推定した結果、オニグチ類の共生相手の樹木は 4 種類に分けられ、オニグチ類はその進化の過程で何回か宿主転換してきたことが分かってきた。オニグチ類は、その進化の最初期段階においては、アフリカの樹種（ジャケツイバラ亜科・モノトテス亜科）と共生しており、その後、東南アジア地域の樹種（フタバガキ亜科）と共生するようになり、さらに後に、北半球温帯~亜熱帯域の樹種（ブナ科・マツ科）あるいはオーストラリア温帯~亜熱帯域の樹種（ナンキョクブナ科・フトモモ科ユーカリ属）と共生するようになったということが分かった。このような結果から、オニグチ類では、地理的に全く異なる地域に生育する樹種への宿主転換は容易に起こらないことが分かった。おそらく、同所的にこれらの樹種が生育している地域において、オニグチ類の宿主転換は起こったのではないかと考えている。

また、オニグチ類の進化過程における多様化速度の変化について推定した結果、オニグチ類では、過去に複数回、急速な多様化が起こっていることがわかった。また、オニグチ類の多様化速度は、その宿主状態によって大きく異なっていることが示されたことから、共生樹種の宿主転換が引き金となってオニグチ類の起こることが分かってきた。とりわけ、北半球の温帯地域に広く分布するマツ科・ブナ科の樹木に宿主転換にした後に、オニグチ類は顕著に多様化していたことが示された。このような結果から、オニグチ類は、宿主転換によって、分布可能な地域を拡大し、異所的種分化が促進される形で、多様化してきた可能性が高いことが示された。北半球の温帯性樹種に宿主転換し、多様化したというパターンは、オニグチ類のみに起こった特殊な現象とは考えづらく、むしろ、様々な外生菌根菌で起こった現象ではないかと考えられる。このような多様化が起こったことで、外生菌根菌は北半球の温帯地域で多様性のピークをもつようになったのではないかと考えられる。本研究の成果は、長年、菌類の研究者の間で疑問とされていた外生菌根菌の多様性の緯度パターンについて、有力な解釈を与えるものと考えている。

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 9 件)

Kuo L-Y, Chen C-W, Shinohara W, Ebihara A, Kudoh H, Sato H, Huang Y, Chiou W (2017) Not only in the temperate zone: independent gametophytes of two vittarioid ferns (Pteridaceae, Polypodiales) in East Asian subtropics. *Journal of Plant Research* **130**, 255-262. (査読あり)

Sato H, Tanabe AS, Toju H (2017) Host shifts enhance diversification of ectomycorrhizal fungi: diversification rate analysis of the ectomycorrhizal fungal genera *Strobilomyces* and *Afroboletus* with an 80-gene phylogeny. *New Phytologist* **214**, 443-454. (査読あり)

佐藤博俊 (2016) 第15回 日本植物分類学会奨励賞受賞記念論文: オニイグチ類とキクバナイグチ類の菌類で発見された新種とその形態的特徴. 日本植物分類学会誌 16: 107-114.

佐藤博俊 (2016) 日本菌学会奨励賞受賞記念論文: 外生菌根菌オニイグチ属菌における隠蔽種の識別と宿主特異性の解明. 日本菌学会報 57: 1-12.

Sato H, Hattori T (2015) New species of *Boletellus* section *Boletellus* (Boletaceae, Boletales) from Japan, *B. aurocontextus* sp. nov. and *B. areolatus* sp. nov. PLOS ONE 10: e0128184. (査読あり)

Sato H, Tanabe AS, Toju H. (2015) Contrasting diversity and host association of ectomycorrhizal basidiomycetes versus root-associated ascomycetes in a dipterocarp rainforest. PLOS ONE 10 e0125550. (査読あり)

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)

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)

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)

[学会発表](計 12 件)

佐藤博俊・東樹宏和 多数遺伝子座を用いた分子系統推定から明らかになるイグチ目菌の進化 日本植物分類学会第16回大会. 京都 2017年3月

大田峻真・堀清鷹・村上哲明・佐藤博俊 分子情報に基づくニガクリタケの隠蔽種の探索 日本植物分類学会第16回大会. 京都 2017年3月

佐藤博俊 多数遺伝子座を用いたイグチ目の分子系統解析～宿主樹種の転換に着目して～ 日本菌学会第60回大会. 京都 2016年9月

佐藤博俊 (2016) 多数遺伝子座を用いたイグチ目の分子系統解析. 日本菌学会第60回大会. 京都. 2016年8月

大田峻真・堀清鷹・村上哲明・佐藤博俊 ニガクリタケにおける分子解析に基づく隠蔽種の認識 日本植物分類学会第15回大会 富山 2016年3月

佐藤博俊 共生関係から外生菌根菌の多様性・生物地理・進化を解明する. 日本植物分類学会第15回大会. 富山 2016年3月(招待講演)

吉村彩・堀清鷹・村上哲明・佐藤博俊 キチチタケ(ベニタケ科)における分子情報に基づく隠蔽種の認識 日本植物分類学会第15回大会 富山 2016年3月

大田峻真・堀清鷹・村上哲明・佐藤博俊 ニガクリタケ(モエギタケ科)における隠蔽種の探索 日本植物学会第79回大会 新潟 2015年9月

佐藤博俊・田辺晶史・東樹宏和 大規模遺伝子配列の分子系統解析から明らかになる外生菌根菌オニイグチ属の種多様性の起源 日本菌学会第59回大会 那覇 2015年5月

佐藤博俊・田辺晶史・東樹宏和 外生菌根菌オニイグチ属の進化とその種多様性の起源について～大規模遺伝子配列を用いた分子系統学的研究～ 日本植物分類学会第14回大会 福島 2015年3月.

佐藤博俊・田辺晶史・東樹宏和 真菌類
のシングルコピー遺伝子の新規プライ
マー開発～次世代シーケンサーを用い
た分子系統推定を想定して～ 日本菌
学会第58回大会 小松 2014年5月.

Hirotooshi Sato. Inferring the global
distribution of macro-fungi using
international nucleotide sequence
database (in Symposium S1:
Understanding the evolution of fungi
in space and time). 10th International
Mycological Congress. Bangkok,
Thailand. Aug. 2014. (招待講演)

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

(4) 研究協力者 ()

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博俊 (Sato Hirotooshi)
龍谷大学・科学技術共同研究センター
・博士研究員

研究者番号: 10635494

(2) 研究分担者

()