

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18603

研究課題名(和文) 外生菌根菌オニグチ属の地理的分布パターンの解明～共生樹種に着目して～

研究課題名(英文) Elucidation of the geographical distribution of ectomycorrhizal fungal genus *Strobilomyces*: special emphasis on effects of host plants

研究代表者

佐藤 博俊 (Sato, Hirotoishi)

京都大学・人間・環境学研究所・助教

研究者番号：10635494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、外生菌根菌のオニグチ類を対象として、その隠蔽種を識別し、その地理的分布を解明することを目的とした研究である。本研究では、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の配列情報の比較から、オニグチ類には世界で30種の種が存在することを示した。また、オニグチ類には、ブナ科・マツ科樹種の分布、フタバガキ科フタバガキ亜科の分布、ナンキョクブナ科・フトモモ科ユーカリ属の分布、または、フタバガキ科モノトリス亜科の樹種の分布に沿って分布する種に分かれることが示された。本研究の結果から、オニグチ類の近縁種間で、共進化した共生樹種によって独自の地理的な分布パターンをもつことが分かってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコ類は、食用資源として重要であるだけでなく、生態系において重要な役割を果たす生物としても近年着目されている。しかしながら、キノコ類の分類や生物地理は研究が十分に進展していないのが現状である。本研究では、オニグチ類という小さな分類群に限定した研究成果ではあるものの、有用な手法を提示し、明確な結果を示している。本研究の成果は、今後、様々なグループのキノコ類の分類および生物地理を進めていく上で重要な知見になると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the biogeography of ectomycorrhizal fungal genera, *Strobilomyces* and *Afroboletus* by detecting cryptic species of those fungi. In this study, based on the comparison of nuclear and mitochondrial DNA, the genera appeared to comprise 30 species in the world. Moreover, species of the genera were proven to be divided into four groups, including those distributed along the distribution of Fagaceae/Pinaceae, those distributed along the distribution of Dipterocarpoideae, those distributed along the distribution of Nothofagaceae/Eucalyptus, and those distributed along the distribution of Monotoideae. Our results suggest that species of the fungal genera show distinct biogeographic patterns that are determined by coevolving host plant species.

研究分野：菌類系統分類学

キーワード：菌類 菌根 キノコ 共生 隠蔽種 生物地理

1. 研究開始当初の背景

生物種の分布情報は、その生物の基礎情報であると同時に、生態・進化や種分化を知る上で重要な手がかりとなる情報である。大型の動植物では、古くから個々の種の分布情報はよく調べられており、最近などの微生物でも近年、急速に情報が蓄積されつつある。しかしながら、大型の子実体を形成する菌類（いわゆるキノコ類）では、多くの種において、どのような地理的分布をもつのが明らかになっていないのが現状である。その最大の原因は、キノコ類において、隠蔽種の探索および識別が進んでいないことであると考えられる。隠蔽種とは、互いに形態的に類似しており、形態形質に基づく識別が難しいものの、実際には生殖的に隔離されている種のことである。形態形質が単純で可塑性に富むキノコ類では、このような隠蔽種が多数存在すると考えられている。キノコ類では、このような隠蔽種の探索や識別が明らかに不足しているため種ごとの分布情報を正確に把握するのは難しいのが現状である。

このような問題から、私は過去に行った研究において以下のような試みを行っている。この研究では、まず、屋久島でキノコ類の子実体を多数採集し、DNA バーコード領域（核の rRNA 遺伝子の遺伝子間領域）の塩基配列を解読した。次に、屋久島で採取されたキノコ類と同種の菌が見つかった地域を全球規模で探索するため、解読配列を国際塩基配列データベース（INSD）に対して BLAST 検索し、相同性の高い配列を取得し、その配列の元となった標本が採集された地域を記録した。その上で、データベースへの配列の登録率が地域間で異なることを想定したモデリングを用いて、屋久島で見られたキノコ類の分布を全球規模で推定した。この研究の結果、キノコ類の中でも、樹木と共生する菌類である外生菌根菌は、分散能力の低い共生樹種に分布を制約されて狭い分布域をもつことが示された。一方で、死んだ植物体などを利用する腐生菌は、はるかに広範囲に分布することが示された。この研究を通して、キノコ類は孢子分散による高い分散能力を潜在的にもっているものの、生育条件の制約が強ければ、その分布範囲が制限されることが分かってきた。

しかし、この研究では、キノコ類の群集の分布傾向をまとめて推定していたため、個々の種ごとに分布パターンを解明し、比較することはできていなかった。また、単一遺伝子の配列の類似性に基づいて機械的に DNA タイプを識別していたため、隠蔽種を完全に識別しきれていない可能性も残されていた。そこで、私は、外生菌根菌を対象にして、より慎重に隠蔽種の識別をした上で、共生樹種による影響に着目しながら、個々の種のもつ分布パターンを推定する本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物と共生する外生菌根菌であるオニイグチ属菌を研究対象として、隠蔽種を効果的に識別した上で、近縁種間でどのように分布パターンが異なるかを明らかにすることである。私のこれまでの研究でも明らかになったように、外生菌根菌はその分布パターンが分散能力のより低い共生樹種の分布によって制約されている可能性が高い。本研究では、オニイグチ属菌の分布パターンがどのような共生樹種の分布による制約を受けているかを調べることによって、個々の種がどのような樹種と共進化してきたかを明らかにする。さらに、オニイグチ属菌の分子系統樹を利用することによって、オニイグチ属菌が種分化の過程において、どのように共生樹種を転換し、分布変遷をしたのかを考察する。本研究によって、従来、解明の進んでいなかった、外生菌根菌の分布パターンや外生菌根菌と共生樹種の共進化関係について、理解が進むと考えている。

3. 研究の方法

本研究での研究材料は、オニイグチ類、すなわち、外生菌根菌の一種であるオニイグチ類（*Strobilomyces*）とその姉妹群であるアフロボレタス属（*Afroboletus*）とした。オニイグチ類の標本の収集は、私自身の国内外での調査と、各地の標本庫からのサンプル提供によって行った。最終的に、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 454 個の標本を入手した。

この研究では、まず、遺伝様式の独立したミトコンドリア DNA と核 DNA の配列情報から一致して識別できる DNA タイプを探索することによって、互いに自然状態で交配の起きていないオニイグチ類の種（隠蔽種）を探索した。この方法は、同じ場所から採集した菌サンプルの間で、核 DNA とミトコンドリア DNA で共通して識別されるグループは互いに遺伝子流が起こっておらず（連鎖不平衡）互いに生殖的に隔離した種であると考えられるという理論に基づいている。この手法を実践するため、採集したオニイグチ類の全サンプルに対して、核の rRNA 遺伝子の遺伝子間領域（ITS2 領域）とミトコンドリアのシトクロームオキシダーゼの第 3 サブユニット（*cox3*）の配列をそれぞれ PCR によって増幅した。そして、サンガー法によって、それぞれの遺伝子配列を決定した。得られたそれぞれの配列に対して、RAxML を用いて、最尤法に基づく分子系統推定を行った。また、分子系統樹上のそれぞれのクレードの信頼性については、ブートストラップ確率を用いて評価した。その上で、核 DNA とミトコンドリア DNA で共通して識別される DNA タイプの探索を行った。

また、本研究では、隠蔽種の識別結果をより強固にするため、合祖理論に基づく種の境界の推定も行った。この解析では、種内変異の最大値よりも種間変異はずっと大きいという前提

に基づいて、分子系統樹上から種の境界を推定する手法である。本研究では、ベイズ法に基づく Generalized Mixed Yule-Coalescent model (bGMYC) というモデルを用いて解析した。この解析を行うために、まず、核の ITS2 領域の配列に対して、マルチプルアライメントを行った。ITS2 領域は、インデル(挿入・欠失の変異)が非常に多いため、アライメントミスを軽減するため、Gblocks というプログラムを用いて、アライメントの信頼性の低い箇所をトリミングした。得られたアライメントファイルから、GTR ガンマモデルを用いて、ベイズ法による分子系統推定を行った。ベイズ法による分子系統推定には Beast を用い、超計量的樹形図 (ultrametric tree) を構築した。得られた 9000 個の系統樹のうち、ランダムに 100 個の系統樹を抽出し、それらに対して bGMYC を適用した。bGMYC によるグループ分けの信頼性は、事後確立によって評価した。そして、bGMYC によって推定された、分子系統樹上の種の境界線が核 DNA とミトコンドリア DNA の比較に基づいて得られた DNA タイプの識別パターンと一致するかどうかを確認した。

得られた隠蔽種の識別結果に基づいて、個々の種がどのような分布パターンをもつかを推定した。さらに、それぞれの標本の採られた森林の樹種構成に基づいて、どのような樹種によってオニグチ類の分布が制約されているかについて検討した。

さらに、オニグチ類の複数の DNA 塩基配列情報に基づいて分子系統樹を構築し、オニグチ類で起こった種分化の歴史について推定した。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、80 個のシングルコピー遺伝子の配列(23,027 bp)を解読した。得られた配列に対して、ベイズ法による分子系統推定を行い、超計量的樹形図を得た。この分子系統樹に、オニグチ類の推定宿主の情報を配置し、オニグチ類における宿主転換の歴史を最尤法によって推定した。

4. 研究成果

核 ITS2 領域を解読した結果、オニグチ属菌では 28 個の DNA タイプが検出され、アフロボレタス属では 2 つの DNA タイプが検出された。これら 30 個の DNA タイプは、いずれも DNA タイプ内の変異は小さく、その単系統性は分子系統樹上で高いブートストラップ値(88~100)によって支持された。ミトコンドリア *cox3* 遺伝子領域では、ITS2 に比べて変異がはるかに少なかったため、ブートストラップ値は個々のクレードで低く算出されたものの、ITS2 で検出された 30 個の DNA タイプはすべてミトコンドリア *cox3* の分子系統樹上でも識別することができた。

bGMYC による合理理論に基づく解析を行ったところ、ITS2 領域の分子系統樹からオニグチ属とアフロボレタス属がそれぞれ 28 個と 2 個ずつ検出され、これらのグループ分けは高い事後確率によって支持された。このグループ分けは先の核 DNA とミトコンドリア DNA の分子系統樹の比較の結果と完全に一致した。これらの結果から、オニグチ属とアフロボレタス属では、世界で、それぞれ 28 個と 2 個の種が存在することが強く支持された。

識別された 30 種それぞれに対して宿主植物情報を調べた結果、オニグチ類の分布パターンおよび共生樹種のパターンは 4 つに大別されることが分かった。オニグチ類のうち、14 種は日本を始めとする東アジアの温帯地域に分布し、ドングリを作る樹種であるブナ科樹種の分布に沿って分布していた。オニグチ類のうち、6 種は、マレーシアなどの東南アジアの低地熱帯林に分布しており、フタバガキ科フタバガキ亜科樹種の分布に沿って分布していた。オニグチ類のうち、6 種は、オーストラリアなどのオセアニアの温帯・亜熱帯地域に分布しており、ナンキョクブナ科やフトモモ科ユーカリ属の樹種の分布に沿って分布していた。オニグチ類のうち、アフロボレタス属である 2 種は、アフリカの温帯・熱帯域に分布しており、フタバガキ科モノトテス亜科の樹種の分布に沿って分布していた。本研究の結果から、オニグチ類は、本来、孢子分散を介した高い分散能力をもっているものの、より分散能力の低い共生樹種の分布に制約される形で限られた範囲に分布することが分かってきた。

また、オニグチ類の分子系統樹上にそれぞれの種の共生樹種の情報を配置し、共生樹種の転換について推定した結果、オニグチ類の共通祖先はアフリカのフタバガキ科モノトテス亜科の樹種と共生していた可能性が高いという結果が得られた。次に、オニグチ類は、東南アジア熱帯のフタバガキ科フタバガキ亜科と共生するようになり、その後、東アジア地域のブナ科やマツ科、あるいはオセアニア地域のナンキョクブナ科やフトモモ科ユーカリ属と共生するようになったという推定結果が得られた。

本研究を通して、オニグチ類だけではなく、キノコ類の隠蔽種を効果的に識別する方法について提示することができた。また、本研究から、オニグチ類では、近縁種間でも共進化した共生樹種が大きく異なっており、それによって地理的な分布パターンが決まってくるのが分かってきた。本研究では、オニグチ類という小さな分類階級の結果なので、必ずしも今回の結果全体を外生菌根菌全体に一般化できるわけではないものの、外生菌根菌の生物地理や進化に対する重要な新知見を示せたのではないかと私は考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Sato H, Toju H. 2019. Timing of evolutionary innovation: scenarios of evolutionary diversification in a species-rich fungal clade, Boletales. *New Phytologist* 222(4): 1924-1935.
2. Fujii K, Doi H, Matsuoka S, Nagano M, Sato H, Yamanaka H. 2019. Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. *PLoS One* 14(1): e0210357.
3. Amma S, Toju H, Wachrinrat C, Sato H, Tanabe AS, Artchawakom T, Kanzaki M. 2018. Composition and Diversity of Soil Fungi in Dipterocarpaceae-Dominated Seasonal Tropical Forests in Thailand. *Microbes and Environments*: ME17168.
4. Kadowaki K, Yamamoto S, Sato H, Tanabe AS, Hidaka A, Toju H. 2018. Mycorrhizal fungi mediate the direction and strength of plant–soil feedbacks differently between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal communities. *Communications Biology* 1(1): 196.
5. Toju H, Sato H. 2018. Root-associated fungi shared between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal conifers in a temperate forest. *Frontiers in Microbiology* 9: 433.
6. Toju H, Sato H, Yamamoto S, Tanabe AS. 2018. Structural diversity across arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic plant–fungus networks. *BMC Plant Biology* 18(1): 292.
7. Toju H, Tanabe AS, Sato H. 2018. Network hubs in root-associated fungal metacommunities. *Microbiome* 6(116): 270371.
8. Kuo L-Y, Chen C-W, Shinohara W, Ebihara A, Kudoh H, Sato H, Huang Y-M, Chiou W-L. 2017. Not only in the temperate zone: independent gametophytes of two vittarioid ferns (Pteridaceae, Polypodiales) in East Asian subtropics. *Journal of Plant Research* 130(2): 255-262.
9. Sato H, Sogo Y, Doi H, Yamanaka H. 2017. Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Scientific reports* 7(1): 14860.
10. 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(1): 443-454.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 佐藤博俊 国際塩基配列データベースを活用した大型菌類の種数と多様化パターンの推定. 日本植物分類学会第 18 回大会. 東京 2019 年 3 月
2. 佐藤博俊 高スループットシーケンサを用いた分子系統推定-大型菌類を用いた実践-. 日本進化学会第 19 回大会. 京都 2017 年 8 月.
3. Hirotoshi Sato Host shift dependent diversification in ectomycorrhizal fungal genera *Strobilomyces* and *Afroboletus*. 9th International Conference on Mycorrhiza. Prague. Aug. 2017.
4. 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
5. 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
6. 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

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。