

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291076

研究課題名(和文) 寄生植物と真菌エンドファイトの多様な共生関係とその進化過程の解明

研究課題名(英文) Evolutionary processes of symbiotic interactions between parasitic plants and endophytic fungi.

研究代表者

横山 潤 (Yokoyama, Jun)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：80272011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：エンドファイトは、植物に病原性を示すことなく体内に生活する微生物である。本研究では、寄生植物に共生する真菌エンドファイトを調べ、それぞれの菌類が寄生植物の生育に果たす役割を明らかにし、寄生植物と真菌エンドファイトの共生関係の進化過程を解明することを目的とした。寄生植物の真菌エンドファイトには一定の割合で植物病原菌と考えられる菌類が見られた。これらの共生関係に関する遺伝的背景は十分明らかにならなかったが、一部の真菌エンドファイトは寄生植物の初期成長過程に悪影響を及ぼしうることが示された。寄生植物と真菌エンドファイトの関係は複雑で、生活史全体での関係性の調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：This study intended to reveal the evolutionary processes of symbiotic interactions between parasitic plants and their endophytic fungi (those live interior of plant body without any symptoms). For the purposes, we conducted i) floristic investigations of endophytic fungi in various parasitic plants and ii) ecological functions of those fungi to the plants, especially their effect to plant growth. We found plant pathogenic fungi to an extent in each parasitic plant we examined. We cannot fully reveal their genetic background related to symbiotic interactions. Some fungal species showed, however, deleterious effects on parasitic plants in their early stage of growth. Interactions between parasitic plants and endophytic fungi may be more complicated as expected and we need more information about their interaction throughout their life cycles.

研究分野：植物系統進化学

キーワード：寄生植物 真菌類 共生 寄生 進化

1. 研究開始当初の背景

エンドファイトは、植物に病原性を示すことなく体内に生活する微生物の総称である。近年は特に真菌類（以下真菌エンドファイト）でその存在が広く知られており、植物の耐病性や被食防御機構の誘導(Omacini et al., 2001, Nature 409: 78-81; Arnold et al., 2003, PNAS 100: 15649-15654)、植物の成長や発達の促進(Harman et al., 2004, Nature Review Microbiology 2: 43-56; Omacini et al., 2012, Applied Soil Ecology 61: 273-279)など、植物の適応度に重要な貢献をしている。一方、真菌エンドファイトの中には、近縁種が植物病原菌であるものも少なくなく、共生的に生育する真菌エンドファイトと病原菌の間は「紙一重」である可能性が高い(Ma et al., 2010, Nature 464: 367-373)。加えて、近年の分子生物学的解析の発達、特に次世代シーケンシング技術の発達によって、植物体内には莫大な種数の真菌エンドファイトが生育している可能性が示唆されるようになり(Unterseher et al., 2011, Molecular Ecology 20: 275-285など)、これらの植物との関係性は相当に複雑で、その全容解明には、まだほど遠い状態にあるのが現状である。

植物と真菌エンドファイトの関係も、他の共生関係と同様、コスト・ベネフィットの関係で決まっている。さまざまな機能を付与することによって植物の適応度に正の影響を与える真菌エンドファイトに、植物は炭水化物や無機養分などの投資を行うことで、両者の共生関係が成立する。一方この植物と真菌エンドファイトの関係に、他の生物、特に寄生性の生物が関わると、状況は複雑になる。特に寄生植物は、体制や代謝・生理など寄主植物（以下宿主）と同じ基本システムを持っているので、宿主と類似した微生物との関係をもつ可能性が高い。実際寄生植物に菌根菌や真菌エンドファイトが共棲している例が知られており(de Vega et al., 2010, American Journal of Botany 97: 730-737; Martin et al., 2012, American Journal of Botany 99: 2027-2034)、我々の予察的研究からも、寄生植物に共棲する菌類が確認されていた。

ホスト-真菌エンドファイトに寄生植物を加えた三者系は、コスト・ベネフィットの関係もさらに複雑になる。寄生植物に真菌エンドファイトが共生している場合、宿主は寄生植物の真菌エンドファイトを養うコストも払うことになる。例えば、もし宿主と寄生植物の真菌エンドファイトが共通であるなら、宿主が自身の真菌エンドファイトと共生関係を維持することが、そのまま寄生植物の共生相手を養うことにつながってしまう。また、寄生植物にとっては真菌エンドファイトであっても、宿主にとっては病原性真菌である場合もある。この生態的意義は不明だが、寄生者同士の協働によって寄主植物への感染・定着確率を向上させる効果があるかもしれないし、単純に寄生植物が病原菌

の「乗り物」として利用されているのかもしれない。我々の予察的研究からも、寄主にとっての病原菌が寄生植物のエンドファイト菌となっていることが明らかになっている(*Monochaetia*, *Guignardia*, *Rhizoctonia* など)。このように、寄生植物に共生している真菌エンドファイトは、多様な生態的役割をもつ可能性があり、寄生植物との関係の進化過程は非常に興味深い。全世界で4000種以上が知られている寄生植物の中で、真菌エンドファイトとの共生関係の実態はおろか、真菌エンドファイトの種相など基礎的な情報が得られている種もほとんどないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、寄生植物に共生する真菌エンドファイトを、特に宿主の真菌エンドファイトと共通か、寄主植物に対して病原性を示すか、という二つの視点から分類して、それぞれが寄生植物の生育に果たす役割を明らかにし、寄生植物と真菌エンドファイトの共生関係の進化過程を解明することを全体の目的とした。このために、具体的に次のことを明らかにすることを目標とした。

(I) 寄生植物の真菌エンドファイトフロラは、どのような種で構成されているのか。また、その宿主の真菌エンドファイトフロラと比較して、種構成にどのような特徴があるのか。

(II) それぞれの真菌エンドファイトが、寄生植物の適応度にどのように影響するのか。

(I) については、対象植物およびその宿主から培養可能真菌エンドファイトを単離して種構成および相対的優占度を明らかにすることを目指した。培養の難しい真菌エンドファイトが存在する場合など、単離法だけではフロラの全体像がつかめない可能性があり、この問題をメタゲノム解析によって補完した。

(II) については、共生関係の指標となる遺伝子の解析と単離菌株を用いた寄生植物と真菌エンドファイトの感染実験によって、各種真菌エンドファイトが寄生植物に与えるコストとベネフィットを評価することを目標とした。

3. 研究の方法

研究系として、寄生様態(茎部か根部か)、光合成の有無(全寄生か半寄生か)、生活史型(一年生か多年生か)を考慮し、4つの寄生植物-宿主系を用いることを検討した。

(i) ヒノキバヤドリギ-常緑樹木: 茎部寄生植物、木本性の多年生植物、半寄生植物だが、宿主体内に菌糸状に植物体を延ばし、次々とシュートを展開するため、やがて宿主を衰弱させる。

(ii) ネナシカズラ-草本植物: 茎部寄生植物、一年生草本、全寄生植物。

(iii) カナビキソウ-草本植物: 根部寄生植

一方、メタゲノム解析からは、最も多く得られた配列は *Neofusicoccum* 属のもので、全体の約 54.1%を占めた。次いで *Cladosporium* 属 (同約 18.1%)、*Guignardia* 属 (同約 9.8%) で、培養で最も多く得られた *Pestalotiopsis* 属は全体の 5%未満に過ぎなかった (図 2)。

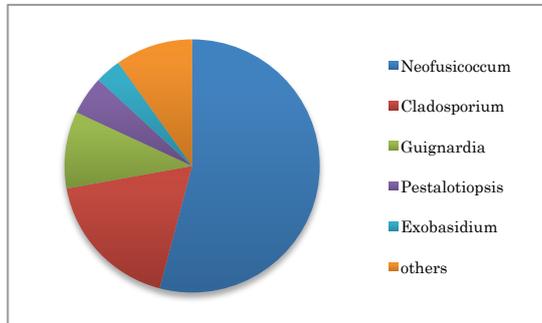


図 2. 次世代シーケンス解析によってヒノキバヤドリギから得られた菌類由来の配列の内訳。

しかし、主要な菌類の優占度にはそれぞれ結果で違いはあるが、両方の解析で得られた菌相に質的な違いは見られなかったので、培養不可能な菌類が主要な真菌エンドファイトになっている訳ではない事が示された。

ヒノキバヤドリギとその宿主から単離培養によって得られた真菌エンドファイト相を比較すると、ある宿主とそれに寄生しているヒノキバヤドリギとでは、エンドファイト相が類似する傾向がある事が示された。これは寄生植物-宿主間の物理的なつながりが真菌エンドファイトの相互感染につながっている可能性を示す結果として興味深い (図 3)

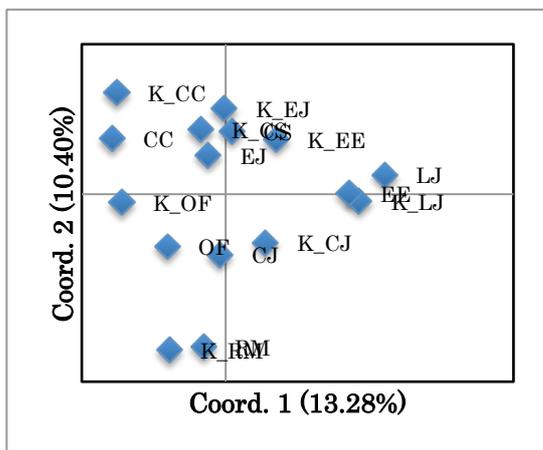


図 3. 単離された真菌エンドファイト相に基づく主座標分析の結果。アルファベット 2 文字標記は宿主を、K_はそれにつくヒノキバヤドリギを示している。

キヨスマイツボからは 200 株以上の真菌を単離し、外形で分類した後、約 80 株の同定を行った。その結果、得られた菌株の約 30%が *Ilyonectria* 属であった。その他の真菌類の割合は、本属に比べると著しく低く、キヨ

スマイツボはかなり偏りのある真菌エンドファイト相を持つ事が示された (図 4)。解析できた宿主の数は多くないが、宿主がムラサキシキブであることが判明し、それから得られた真菌エンドファイトは、*Leptodontidium* 属、*Pezicula* 属などが中心で、構成がキヨスマイツボとは大きく異なっている事も示された (図 4)。

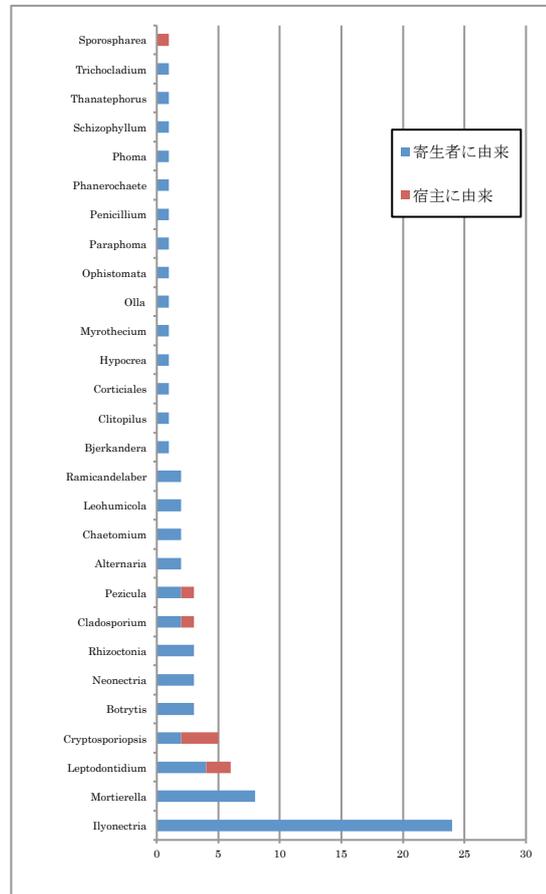


図 4. キヨスマイツボおよびその宿主 (ムラサキシキブ) から単離・分子同定された真菌エンドファイト。青がキヨスマイツボから得られた菌、赤が宿主から得られた菌であることを示す。再下段の最も多く単離された菌が *Ilyonectria* 属。

属単位で見ると、キヨスマイツボの真菌エンドファイト相は単純だが、得られた *Ilyonectria* 属の菌をより詳細に解析すると、その内容なそれほど単純ではない事が示された。 *Ilyonectria* 属菌類の ITS 領域塩基配列に基づく系統解析の結果は、キヨスマイツボから得られた *Ilyonectria* 属菌類は大きく 3 つの独立した系統に属することを示した (図 5)。主要なものはそのうちの 2 つで、これらは比較的系統的に近縁だが、それらからやや離れた位置にある系統群からも稀に菌株が得られており、多様な *Ilyonectria* 属菌類がキヨスマイツボ内に感染している状況が示された (図 5)。これら異なる系統に属する *Ilyonectria* 属菌類のそれぞれの役割を解明する事ができれば、両者の関係の解明がさらに進む事が期待できる。

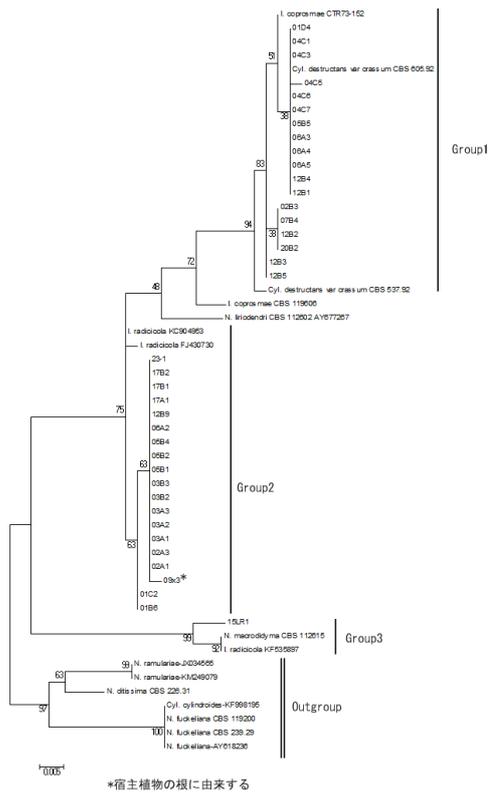


図5. キヨスミウツボから得られた *Ilyonectria* 属菌類の ITS 配列に基づく系統関係 (最尤法)。クレードわきの縦線は、系統群のまとまりを示している。

一方、メタゲノム解析によってキヨスミウツボから最も多く得られた配列は、ヒノキバヤドリギの時と同様に、培養結果と異なっていた。最も多く得られた配列は、担子菌類の *Thanatephorus* 属であった (得られた菌類の配列の約 48.2%)。次いで、同じく担子菌類の *Psathyrella* (イタチタケ) 属 (同 21.4%) であり、培養菌株として最も多く得られた *Ilyonectria* 属は全体の 10.7%にとどまった (図6)。

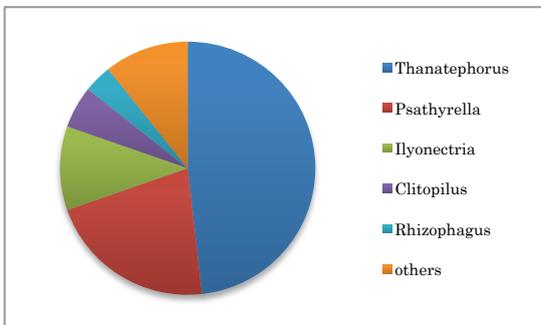


図6. 次世代シーケンス解析によってキヨスミウツボから得られた菌類由来の配列の内訳。

最も多く得られた *Thanatephorus* 属は、低頻度だが培養からも得られていた。本属は、ラン科植物の菌根菌としてよく知られてい

る菌類である。また、3%程度と低頻度だが、グロムス菌類である *Rhizophagus* 属の配列も検出された。これはアーバスキュラー菌根菌として、ホストであるムラサキシキブを含む多くの植物と共棲関係を結んでいる。寄生植物は一般に菌根共生を行わないと考えられているため、これらの一般的に菌根菌として生活している菌類と寄生植物との関係がどのようなものかは、今の所不明である。しかし、これらの菌類が根部寄生の植物に発見されたことには、何らかの意義があると思われる。今後これらの菌類との間の関係を精査する必要があると考える。

カナビキソウから得られた菌類のうち、同定できたのは 20 株程度にとどまった。得られた菌類の大部分は *Penicillium* 属と *Cladosporium* 属であった (図7)。一方、低頻度ながら *Purpureocillium* 属の菌類が得られたのは、本属菌類がネコブセンチュウへの抵抗性と関係している可能性が指摘されている点で興味深い (図7)。

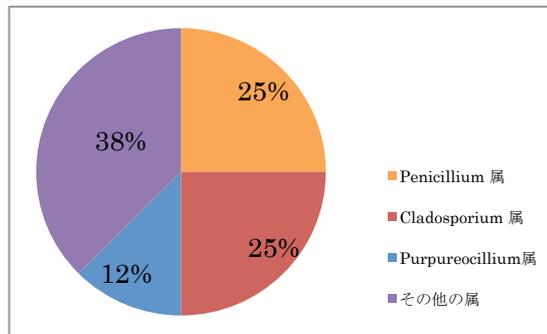


図7. カナビキソウから単離された真菌エンドファイトの内訳。

(2) 寄生植物の真菌エンドファイトがもつ、共生系のコスト・ベネフィットに関連する遺伝子の解析

既知配列に基づくプライマーによって、単離菌株の一部から GH32 遺伝子の部分塩基配列を決定する事ができた。これらに基づいて、各遺伝子のコピー数を推定した。得られた結果は、既報 (Parrent et al. 2009, BMC Evolutionary Biology 9:148) の結果をよく反映しており、属内に植物病原菌を含むものではコピー数は多い傾向にあった。分泌性 chitinase については明瞭な傾向は検出できなかった。このことは、これらの真菌エンドファイトのベネフィットの側面はあまり強くないことを示しているのかもしれない。

(3) 寄生植物への真菌エンドファイト感染実験

当初行う予定であったホストへの直接感染実験は、発芽率、ホスト植物の生残率など予備的な実験の成績が悪かったこと、ヒノキバヤドリギでは一部の種子で垂直感染であると思われる状況は見られたため、寄生植物、およびホスト植物を培地上で短期間独立に

培養する方法で真菌エンドファイトの感染実験を行った。

ヒノキバヤドリギからは、単離培養の段階で、ツバキの病原菌である *Monochaetia camelliae* (ツバキ斑点病菌) が、メタゲノム解析から *Exobasidium camelliae* (ツバキのモチ病菌) が得られている。このことから、ヒノキバヤドリギの真菌エンドファイトは、少なくともその一部は明確に宿主の一部 (ツバキ) に対して病原性を示すと考えられる。また、メタゲノム解析で最も多く得られた *Neofusicoccum* や、主要な菌の一つとなっていた *Guignardia* は、一般に植物病原菌として知られている。感染実験の結果は、特異的な病原菌を除くとヒノキバヤドリギの初期成長にも悪影響がある可能性を示しており、ヒノキバヤドリギがこれらの菌と高頻度で共存していることの意味は十分明らかにならなかった。ヒノキバヤドリギの種子の一部 (約 15%) は、表面殺菌後に播種しても菌が単離され、これらの一部は、成体から得られた菌とは異なっていた。寄生植物と真菌エンドファイトとの関係は、生活史全体の視点で解析する必要がある事が、本研究から示唆され、今後は種子から様々な成長段階の個体を比較していく必要があると考えられる。

キヨスミウツボから最も多く単離された *Ilyonectria* も、植物に対して病原性を示す菌として一般的に良く知られている。これらはホストに対して悪影響があることが示され、ヒノキバヤドリギのケースと同様に、寄生植物が病原性をもつ真菌類と共存していると考えられる。一方、前述の通りキヨスミウツボは一般的に菌根菌として機能している菌類とも共存しており、この点は茎部寄生植物にはない特徴である。

このように、寄生植物と真菌エンドファイトとの関係は、当初考えていたよりも複雑であり、本研究の成果を手がかりとして、今後さらに生活史全般にわたる包括的な解析を行う必要がある。

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 9 件)

1. Makino, T. T. and Yokoyama, J. 2015. Non-random composition of flower color in a plant community: mutually different co-flowering natives and disturbance by aliens. PLoS ONE 10(12): e0143443. 査読あり.

2. Ikeda, H., Fukuda, T. and Yokoyama, J. 2016. Endophytic fungi associated with a holoparasitic plant, *Balanophora japonica* (Balanophoraceae). American Journal of Plant Sciences 7: 152-158. 査読あり.

3. Kumekawa, Y., Kubose, Y., Fujimoto, H., Uemoto, C., Ozaki, Y., Nakayama, H., Yokoyama, J. and Fukuda, T. 2016. A New Form of *Aster hispidus* Thunb. var. *leptocladus* (Makino) Okuyama f. *tubuliflorus* Kumekawa, J. Yokoy. & Tatsuya Fukuda (Asteraceae). Journal of Japanese Botany 91: 49-51. 査読あり.

4. Hayakawa, H., Yamazaki, J., Konuma, A. and Yokoyama, J. 2016. Morphological variation in the species of *Cephalanthera* (Orchidaceae) in Japan. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 67: 199-203. 査読あり.

5. 横山 潤・池田秀子・工藤幸太 2016. 寄生植物と真菌エンドファイトの共生関係の進化. 遺伝 70: 279-283. 査読なし.

[学会発表] (計 28 件)

1. 池田 (武浪) 秀子・横山 潤. 半寄生植物ヒノキバヤドリギとその寄主植物のエンドファイト菌類相の関係. 日本植物学会第 78 回大会 (神奈川). 2014 年 9 月 14 日.

2. 齋藤拓哉・吉田政敬・横山 潤. ハマウツボ科全寄生植物の根圏エンドファイト菌類相. 東北植物学会第 4 回大会 (山形) 2014 年 12 月 13 日.

3. 大橋謙太郎・横山 潤. 東日本に分布するヒメクロオトシブミの揺籃形成による葉の内生菌相の変化. 日本生態学会第 62 回大会 (鹿児島) 2015 年 3 月 19 日.

4. 工藤幸太・横山 潤. 全寄生植物キヨスミウツボ (ハマウツボ科) のエンドファイト菌類相. 日本植物学会第 80 回大会 (沖縄) 2016 年 9 月 16 日.

5. 對馬宗志・武浪秀子・横山 潤. 半寄生植物ヤドリギ (ビャクダン科) における真菌エンドファイトの種構成. 東北植物学会第 6 回大会 (宮城) 2016 年 12 月 10 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 潤 (YOKOYAMA JUN)

山形大学・理学部・教授

研究者番号: 80272011

(2) 研究分担者

福田 達哉 (FUKUDA TATSUYA)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授

研究者番号: 00432815