

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22269

研究課題名（和文）アーバスキュラー菌根菌胞子果の同定分類と有性生殖の探索

研究課題名（英文）Exploration of sexual reproduction for sporocarpic arbuscular mycorrhizal fungi along with species identification

研究代表者

大和 政秀（Yamato, Masahide）

千葉大学・教育学部・教授

研究者番号：00571788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：グロムス亜門に属するアーバスキュラー菌根（AM）菌ではこれまでに有性生殖体の報告例がないが、*Rhizophagus irregularis*を対象とした先行研究では、核型と交配型領域の遺伝子パターンから、有性生殖が行われている可能性が示唆されている。本研究ではAM菌の胞子果が有性生殖体である可能性を検証することを目的として、*R. irregularis*と*Diversispora epigaea*の胞子果形成胞子を対象としたSNPs解析を実施した。その結果、両種の胞子果はいずれもクローン胞子によって形成されていることが明らかとなり、これらは無性の繁殖体として機能しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陸上生態系でもっとも普遍的な共生系であるアーバスキュラー菌根（AM）はケカビ門グロムス亜門の菌類によって形成される。外生菌根菌および内生菌を含むケカビ門ケカビ亜門のアツギケカビ目菌類が作る胞子果は接合胞子嚢を含むことから、有性生殖体として知られているが、本研究で解析したケカビ門グロムス亜門の胞子果はいずれもクローン胞子によって形成されていることが明らかとなった。ケカビ門内の系統的に近接したグループ間で胞子果の繁殖体としての役割に違いがあることが明らかとなり、学術的に重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Recent genome analysis of some arbuscular mycorrhizal (AM) fungal strains revealed two types of nuclear status, homokaryosis and dikaryosis, in which heterozygous in the putative mating type locus was confirmed in the dikaryosis strains. The result indicates the existence of (para) sexual processes in the AM fungi, however sexual reproductive bodies have never been observed among AM fungi. In this study, spores isolated from the same AM fungal sporocarps molecularly identified as *Rhizophagus irregularis* and *Diversispora epigaea* were examined for SNPs in reduced genomic libraries to study their genetic composition. The result indicates that those sporocarps comprise clonal spores. Therefore, sporocarps with clonal spores may have different functions than sexual reproduction.

研究分野：Fungal Ecology

キーワード：アーバスキュラー菌根 グロムス亜門 グロムス科 ディバーシスポラ科 Mig-seq SNPs MAT領域 H D2遺伝子

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根 (AM) 菌はケカビ門 (Mucoromycota)、グロムス亜門 (Glomeromycotina) に属する菌類として知られ、陸上植物の根に共生し、宿主植物にリン酸、窒素などの土壌養分を供給するはたらきをもつ。この共生系は陸上植物の出現とともに 4 億年以上の歴史をもつとされているが (Redecker et al. 2000)、これまでに AM 菌の有性生殖体を報告する研究例は存在しない。AM 菌は菌糸体には隔壁が存在しない多核体であり、Ropars et al. (2016) はグロムス科 (Glomeraceae) の *Rhizophagus irregularis* において、単一種の核によって構成されるホモカリオンと二種の核によって構成されるダイカリオンの系統が存在することを明らかにした。さらに、この研究では *R. irregularis* のダイカリオンの系統では交配型 (mating type: MAT) 領域の遺伝子がヘテロで存在することが示されたが、このパターンは担子菌門、子う菌門などの有性生殖を行う菌類の遺伝構造と類似している。また、*R. irregularis* では単一核由来のゲノム解析の結果から核間で DNA の組換えが行われていることを示唆するダイカリオンの菌株も見つかっており (Chen et al. 2018)、本種をはじめとする AM 菌においても (擬似) 有性生殖が行われている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

多くの AM 菌は単一の胞子を土壌中に形成するが、グロムス科、ディバーシスポラ科 (Diversisporaceae) の一部の AM 菌は複数の胞子をクラスター状に形成し、さらに着色した菌糸あるいは小胞によって覆われた直径 1 cm 以上にもなる胞子果を土壌表面に形成する種も知られている。胞子果が菌糸で覆われる形態はケカビ門ケカビ亜門 (Mucoromycotina) に属するアツギケカビ属 (*Endogone*) の接合胞子果と類似しており (Yamamoto et al. 2015)、本研究ではこのような AM 菌胞子果において有性生殖が行われる可能性について検証した。胞子果の形成と共に有性生殖が行われているのであれば、胞子果形成胞子の間に遺伝的多型がみられると考え、単一胞子を対象として塩基多型 (SNPs) を遺伝マーカーとする遺伝子型の解析を行った。すでにゲノムが解析されている 2 種の AM 菌 (*R. irregularis* (Glomeraceae), *Diversispora epigaea* (Diversisporaceae)) について、胞子果を採取できたため、これらを調査対象とした。

3. 研究の方法

R. irregularis は 4 胞子果 (CE1405, CE1901, CE1903, CE2001) を 2 ヶ所の自生地 (東京都多摩市、神奈川県厚木市) から、*D. epigaea* も 3 胞子果 (CE2018, CE2022, CE2105) を 2 ヶ所の自生地 (茨城県常陸太田市、栃木県那須烏山市) から、それぞれ採取した。*R. irregularis* はいずれもクスノキ (*Cinnamomum camphora*) の樹下に、*D. epigaea* はいずれもスギ (*Cryptomeria japonica*) の樹下に見られた。

これらの AM 菌胞子果について、胞子プレパラートを作成して、形態観察とリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の塩基配列に基づく分子系統解析を行い、種レベルでの分類を確認した。また、各胞子果から無作為に取り出した 8 胞子について Suyama and Matsuki (2015) に従い、multiplexed intersimple sequence repeats genotyping by sequencing (Mig-seq) によるゲノム縮約ライブラリーのシーケンスを行った。得られた *R. irregularis* と *D. epigaea* のリードをそれぞれのレファレンスゲノムに対してマッピングし、SNPs を遺伝マーカーとする遺伝子型の解析を行った。また、*R. irregularis* の MAT 領域の HD2 遺伝子について、先行研究で得

られた配列から多型領域を増幅するプライマーセットを設計し、孢子果から得られた孢子について、当該領域の塩基配列をもとに最尤法による分子系統解析を実施した。

4. 研究成果

R. irregularis と同定された孢子果のうち、形態的特徴の記載は CE1405 を対象として実施した。この孢子果は 2014 年 5 月 31 日に神奈川県厚木市の自生地で 23 × 12 mm の大きさで土壌表面に現れ、直径(28.7–)63.9(–90.1) × (41.3–)80.6(–134.3) μm の倒卵型の黄色い小胞によって覆われていた(図 1B, C, D)。この小胞の層の直下には直径(58.9–)83.0(–104.1) × (60.9–)85.3(–111.0) μm の褐色の孢子が形成され(図 1C, D, E) 孢子壁は 2 層あるいは 3 層となっており、厚さは(4.9–)6.5(–8.4) μm だった(図 1E, F)。他の孢子果(CE1901, CE1903, CE2001)とともに、AM 菌のバーコード領域とされる rDNA の SSU-ITS-LSU 領域(1513-1526 bp)の塩基配列に基づく分子系統解析を最尤法によって行なったところ、いずれの孢子果も *R. irregularis* としての帰属を確認することができた。この結果は *R. irregularis* 孢子果の初めての報告例となった。

D. epigaea と同定された孢子果のうち、形態的特徴の記載は CE2018 を対象として行なった。この孢子果は 2020 年 12 月 15 日に茨城県常陸太田市の自生地で 19 × 14 mm の大きさで土壌表面に現れ、白色あるいはオレンジ色の菌糸によって覆われていた(図 2A, B)。この菌糸層の直下には直径(175.5–)214.0(–265.1) × (175.9–)225.2(–268.4) μm の褐色の孢子が形成され(図 2C)。厚い laminated wall(8.0–)13.7(–18.2) と外側の薄い壁(1.5–)2.5(–3.5) μm によって構成される孢子壁の厚さは(10.2–)16.2(–22.7) μm であった(図 2D)。

他の孢子果(CE1901, CE1903, CE2001)とともに、rDNA の SSU-ITS-LSU 領域(1499-1508 bp)の塩基配列に基づく分子系統解析を最尤法によって行なったところ、いずれの孢子果も

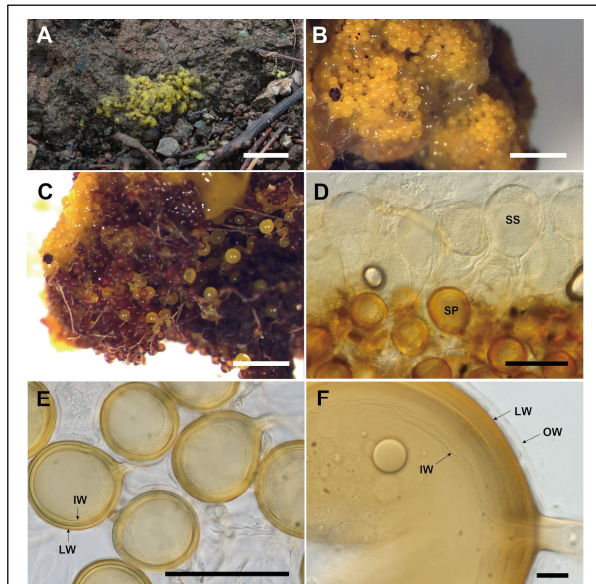


図 1. *Rhizopogon irregularis*. A 孢子果 . B 孢子果断面 . C 孢子果形成孢子と小胞 . D. 孢子果形成孢子 . SS, swollen structure; SP, spore; IW, inner wall; LW, laminated wall; OW, outer wall. スケール : A=1 cm; B=500 μm; C=100 μm; D=100 μm.

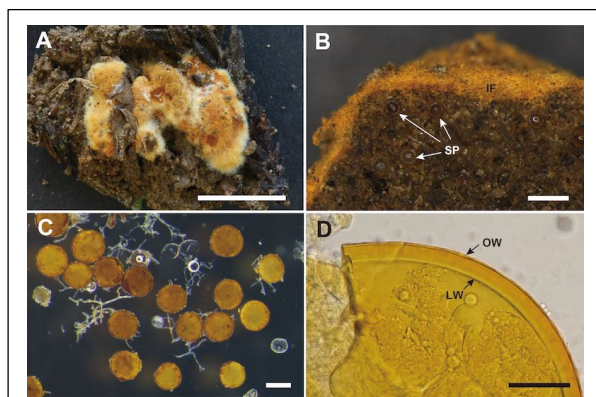


図 2. *Diversispora epigaea*. A 孢子果 . B 孢子果断面 . C 孢子果形成孢子 . D 孢子果形成孢子的孢子壁 . IF, interwoven hyphae; SP, spore; SS, swollen structure; OW, outer wall; LW, laminated wall. スケール : A=1 cm; B=500 μm; C=200 μm; D=50 μm.

D. epigaea としての帰属を確認することができた。

各孢子果から取り出した 8 孢子を対象として MIG-seq によって得られた縮約型ゲノムライブラリについて、SNPs の解析を行ったところ、*R. irregularis* では 425-482 個の SNPs が、*D. epigaea* では 1727-4173 個の SNPs がそれぞれ検出された。いずれの孢子果においても約 9 割の SNPs が 8 孢子間で共有される結果が得られ、これらがクローン孢子によって構成されていることが強く示唆された (図 3)。

また、*R. irregularis* の MAT 領域の HD2 遺伝子について、3 孢子果から得られた計 75 孢子について当該領域の塩基配列をもとに最尤法による分子系統解析を行なったところ、全ての塩基配列が Ropars et al. (2016) によって報告された MAT1-MAT6 とは異なる単一タイプのクレイドを形成したため、これを新規に MAT7 とした。この結果から *R. irregularis* の孢子果孢子がホモカリオンであることが確認されたが、異なる採取地から得られた複数の孢子果においていずれも単一タイプの HD2 遺伝子がみられたことから、この遺伝子と孢子果形成の間に関連性がある可能性も考えられた。

以上の結果から、本研究で解析した孢子果形成孢子はいずれもクローン増殖した孢子

によって構成されていることが明らかとなった。今回調査対象とした 2 種の孢子果はいずれもよく目立つ外観で土壌表面に形成されており、*R. irregularis* については仄かな匂いも確認された。齧歯類の糞から分離された AM 菌孢子に発芽能力があることが確認された研究例もあり (Trappe & Master 1976; Janos et al. 1995) このような孢子果は動物による散布を目的として形成されている可能性も考えられる。AM 菌で有性生殖が行われるのであれば、ダイカリオンの系統である必要があり、今後、さらに孢子果が有性生殖体である可能性を検証するためには、そのような系統の孢子果を探索する必要があると考えられる。

今回の研究では、AM 菌の単孢子を対象として Mig-seq 法を適用して構築したゲノム縮約ライブラリから SNPs に基づく遺伝解析が実施可能であることが示された。この手法は孢子果に限らず、単独で孢子を形成する AM 菌種にも広く適用できるため、フィールドでの AM 菌の遺伝構造の解析などにも適用可能と考えられる。本研究の成果は Yamato et al. (2022) で報告した。

また、リンドウ科植物フデリンドウの発芽個体に共生し、菌従属栄養に関与する AM 菌について分離培養を行ったところ、孢子果の形成が確認されたので、この AM 菌の同定分

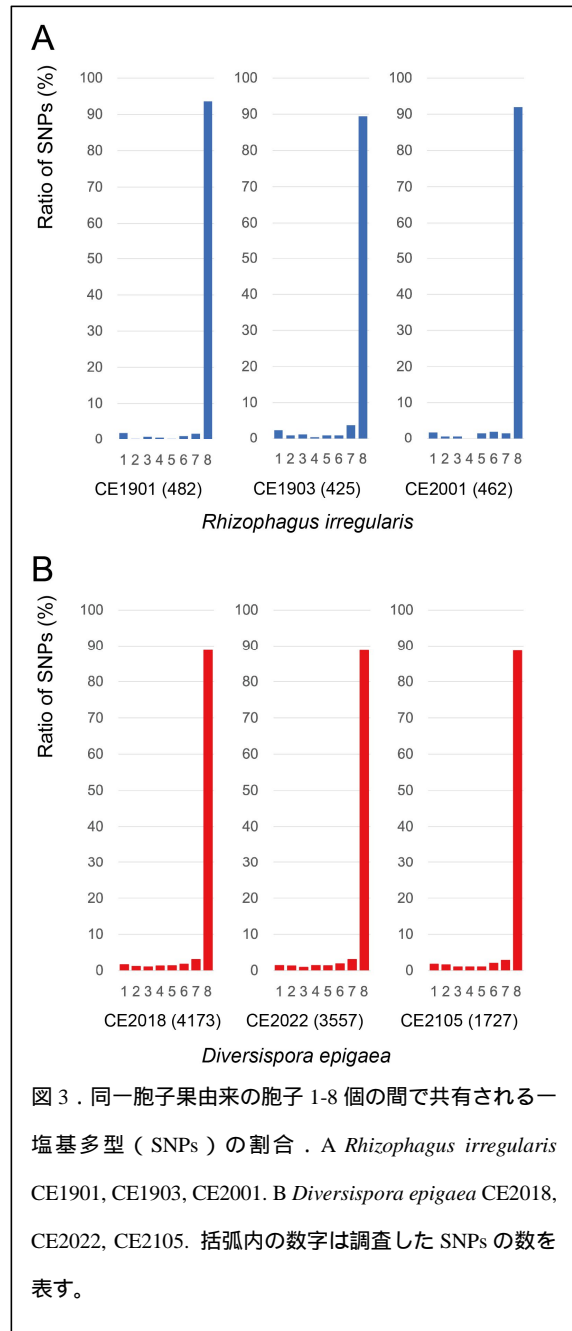


図 3 . 同一孢子果由来の孢子 1-8 個の間で共有される一塩基多型 (SNPs) の割合 . A *Rhizophagus irregularis* CE1901, CE1903, CE2001. B *Diversispora epigaea* CE2018, CE2022, CE2105. 括弧内の数字は調査した SNPs の数を表す。

類を行った。その結果、本菌は孢子形態と rDNA の塩基配列に基づく分子系統解析の結果から *Dominikia aurea* と同定され、日本の森林生態系に普遍的に分布する AM 菌 (Miyake et al. 2020) の一つであることが確認された (Kusakabe et al. 2023)。

さらに神奈川県横浜市のスギ樹下から採取された孢子果形成 AM 菌 *Epigeocarpum japonicum* について、新種記載を行った (Błaszowski et al. 2023)。本報告は日本国内で初めての AM 菌記載報告となった。

引用文献

- Błaszowski J, Yamato M, Niezgodą P, Zubek S, Milczarski P, Malinowski R, Meller E, Malicka M, Goto BT, Uszok S, Casieri L, Magurno F (2023) A new genus, *Complexispora*, with two new species, *C. multistratosa* and *C. mediterranea*, and *Epigeocarpum japonicum* sp. nov. *Mycological Progress* 22: 34
- Chen ECH, Mathieu S, Hoffrichter A, Sedzielewska-Toro K, Peart M, Pelin A, Ndikumana S, Ropars J, Dreissig S, Fuchs J, Brachmann A, Corradi N (2018) Single nucleus sequencing reveals evidence of inter-nucleus recombination in arbuscular mycorrhizal fungi. *eLIFE* 7: e39813
- Janos DP, Sahley CT (1995) Rodent dispersal of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Amazonian Peru. *Ecology* 76: 1852-1858.
- Kusakabe R, Yamato M (2023) Isolation and identification of an arbuscular mycorrhizal fungus specifically associated with mycoheterotrophic seedlings of *Gentiana zollingeri* (Gentianaceae). *Mycoscience* 64: 55-62
- Miyake H, Ishitsuka S, Taniguchi T, Yamato M (2020) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in forest ecosystems in Japan's temperate region may be primarily constituted by limited fungal taxa. *Mycorrhiza* 30:257-268
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Ropars J, Toro KS, Noel J, Pelin A, Charron P, Farinelli L, Marton T, Krüger M, Fuchs J, Brachmann A, Corradi N (2016) Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology* 1: 16033.
- Suyama Y, Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963.
- Trappe JM, Maser C (1976) Germination of spores of *Glomus macrocarpus* (Endogonaceae) after passage through a rodent digestive tract. *Mycologia* 68: 433-436.
- Yamamoto K, Degawa Y, Hirose D, Fukuda M, Yamada A (2015) Morphology and phylogeny of four *Endogone* species and *Sphaeroceas pubescens* collected in Japan. *Mycological Progress* 14: 86.
- Yamato M, Yamada H, Maeda T, Yamamoto K, Kusakabe R, Orihara T (2022) Clonal spore populations in sporocarps of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 32: 373-385

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamato Masahide, Yamada Hiroki, Maeda Taro, Yamamoto Kohei, Kusakabe Ryota, Orihara Takamichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Clonal spore populations in sporocarps of arbuscular mycorrhizal fungi	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mycorrhiza	6. 最初と最後の頁 373 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00572-022-01086-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusakabe Ryota, Yamato Masahide	4. 巻 64
2. 論文標題 Isolation and identification of an arbuscular mycorrhizal fungus specifically associated with mycoheterotrophic seedlings of <i>Gentiana zollingeri</i> (Gentianaceae)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.47371/mycosci.2023.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Blaszkowski Janusz, Yamato Masahide, Niezgodna Piotr, Zubek Szymon, Milczarski Pawe?, Malinowski Ryszard, Meller Edward, Malicka Monika, Goto Bruno Tomio, Uszok Sylwia, Casieri Leonardo, Magurno Franco	4. 巻 22
2. 論文標題 A new genus, <i>Complexispora</i> , with two new species, <i>C. multistratosa</i> and <i>C. mediterranea</i> , and <i>Epigeocarpum japonicum</i> sp. nov.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mycological Progress	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11557-023-01882-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大和政秀、山田洋輝、前田太郎、山本航平、折原貴道
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌 <i>Rhizophagus irregularis</i> と <i>Diversispora epigaea</i> の胞子果はクローン胞子によって構成される
3. 学会等名 菌根研究会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大和政秀、山田洋輝、前田太郎、山本航平、日下部亮太、折原貴道
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌 <i>Rhizophagus irregularis</i> と <i>Diversispora epigaea</i> の胞子果内胞子の遺伝構造
3. 学会等名 日本菌学会第66回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下部亮太、大和政秀
2. 発表標題 フデリンドウの発芽個体と共生するアーバスキュラー菌根菌の単離と同定
3. 学会等名 日本菌学会第66回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田洋輝、前田太郎、山本航平、日下部亮太、折原貴道、大和政秀
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌 <i>Redeckera</i> spp.の胞子果形成胞子の遺伝構造
3. 学会等名 菌根研究会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下部亮太、大和政秀
2. 発表標題 単一の根片を用いたアーバスキュラー菌根菌の単離・菌株化
3. 学会等名 菌根研究会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	折原 貴道 (Orihara Takamichi) (30614945)	神奈川県立生命の星・地球博物館・学芸部・主任学芸員 (82709)	
研究 分担者	前田 太郎 (Maeda Taro) (50631404)	龍谷大学・公私立大学の部局等・研究員 (34316)	
研究 分担者	山本 航平 (Yamamoto Kohei) (60806248)	栃木県立博物館・学芸部自然課・研究員 (82207)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------