

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370031

研究課題名（和文） 植物 アーバスキュラー菌共生系における植物の独立栄養性から従属栄養性への進化

研究課題名（英文） Evolution of plant heterotrophy from autotrophy in plant-arbuscular mycorrhizal fungi mutualistic systems.

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、アーバスキュラー菌に依存する菌寄生植物を対象に、菌根菌との対応関係、栄養摂取様式に関連した菌根菌との対応関係の変化、および炭素源移動に関連する生理的機能を明らかにして、植物の従属栄養性の進化を総合的に解析することを目的とした。菌寄生植物とリンドウ科植物の菌根菌の分子同定を行なった結果、*Glomus* Group A 系統に属する菌が菌根を形成していることが明らかになった。これらの菌類は周辺植物、特にハナヤスリ科植物から高頻度に検出された。菌寄生植物やリンドウ科植物から得られた菌根菌の炭水化物トランスポータ遺伝子には、栄養摂取様式と関連する変異は見つからなかったが、発現量が栄養摂取様式と関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on plant-fungal relationships, partnership changes, and physiological mechanisms of carbon transfer in myco-heterotrophic plant-arbuscular mycorrhizal fungi interactions and conducted comprehensive analyses of the evolution of heterotrophy in plants. Molecular identifications showed that myco-heterotrophic plants and *Gentiana zollingeri* have mycorrhizal fungi of *Glomus* group A and the same fungi were found from some photosynthetic plant, especially plants belonging to Ophioglossaceae with high colonization rates. Partial sequences of hydrocarbon transporter genes from mycorrhizal fungi of myco-heterotrophic plants and *G. zollingeri* had no differentiations associated with trophic modes. However, there were possible differentiations in expression level of the genes between heterotrophic and autotrophic plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：アーバスキュラー菌根菌・寄生・共生・菌寄生植物・菌根・相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

植物の中には、自活した光合成能を失い、他の生物に炭素源を完全に依存して生育す

る従属栄養性のグループが知られている。全寄生植物や菌寄生植物（腐生植物）がこれに対応し、前者は他の植物から直接、後者は菌

根菌を介して他の植物や周辺の腐植などから炭素源を得ている。これら従属栄養性の植物は、光合成能の消失に伴う生理的な変化の他、特異な形態の進化 (Davis et al., 2007, *Science* 315: 1812) 分子進化速度の極端な上昇 (Barkman et al., 2004, *PNAS* 101: 787-792; Nickrent et al., 2004, *BMC Evolutionary Biology* 4: 40) 寄主生物からの遺伝子の水平伝搬 (Davis & Wurdack, 2004, *Science* 305: 676-678) など、進化生物学的にきわめて興味深い現象を多数内包しており、植物の進化を研究する上で貴重な材料を提供してくれている。

菌寄生植物 (腐生植物) は、植物の従属栄養性の進化を研究する好適な材料となっている。種数こそ全世界で 400 種程度とマイナーな生活型であるが、科内に光合成を行う独立栄養性のものから菌根菌に寄生する従属栄養性のものまでを含むものがあるため、同じグループの植物で様々な栄養摂取段階を比較できるためである。菌寄生植物の研究は、主にイチヤクソウ科植物とラン科植物の 2 つのグループで詳細に行われている。この 2 つのグループでは、菌寄生植物の進化に伴い、菌根菌パートナーの変化が生じている。したがって、このパートナーチェンジによって、菌根菌ないしは菌根菌が依存している植物からの炭素供給を得ることができるようになったことが、従属栄養性の進化の重要な契機になっていると考えることができる。

これに対し、それ以外の 8 つの科に属する菌寄生植物は、一般的な植物にみられるアーバスキュラー菌根を持つことが知られており、上記 2 群と異なり菌根菌パートナーの大きな変更を伴わずに従属栄養性を進化させたと考えられる。この際に問題となるのは、アーバスキュラー菌根菌が完全共生菌で、植物からの炭素源供給なしに独立して生存することができないという点である。つまり菌寄生植物に感染しているアーバスキュラー菌根菌も、どこから炭素源を得ているはずである。このことに関連して、コルシア科の菌寄生植物から得られたデータは、1 つの仮説を想起させる。この植物から記録されたアーバスキュラー菌根菌は、独特の系統に属することが指摘されており (Bidartondo et al., 2002, *Nature* 419: 389-392) それは前葉体が従属栄養性であるハナヤスリ科植物のアーバスキュラー菌根菌と類縁があることも示された (Winther & Friedman, 2007: *Amer. J. Bot.* 94: 1248-1255)。つまり、これだけから見ればアーバスキュラー菌根をもつ菌寄生植物は、生活史の一部に従属栄養性のステージがある原始的なシダ植物の菌根菌にパートナーチェンジをすることで、自身の従属栄養性の進化を可能にしたと考えることができる。

しかしこの関連性は、野外集団で周辺の植物を含めた菌根菌との対応関係を調べなければ、直接明らかにすることはできない。コルシア科以外のアーバスキュラー菌根菌に依存する菌寄生植物についての情報も不可欠である。リンドウ科の菌寄生植物では上記のような明瞭な特異性が見いだせず (Bidartondo et al., 2002, *Nature* 419: 389-392) 上記の仮説の一般性には問題があるからである。さらに、コルシア科は菌寄生種のみからなる科であるため、独立栄養性の種から菌根菌との相互作用に関するどのような過程を経て、従属栄養性が進化したのかを段階的に明らかにすることができない。このように多くの菌寄生植物がたどった、アーバスキュラー菌根菌との相互作用を維持した従属栄養性の進化の過程に関する研究は端緒についたばかりで、その全容の解明のためにはさまざまな情報が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、アーバスキュラー菌根菌に依存する菌寄生植物を対象に、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 従属栄養性の植物の持つアーバスキュラー菌根菌は、周辺のどの独立栄養性の植物と共通であるのか。

(2) 独立栄養性から従属栄養性の進化の過程で、アーバスキュラー菌根菌との種間対応関係にどのような変化が生じているのか。

(3) 種間対応関係の変化は、炭素源獲得に関連する生理的メカニズムと対応しているのか。

(1) については、当該菌寄生植物が自生する場所に生育する、アーバスキュラー菌根をもつすべての植物を対象に、菌根菌の分子同定を行い、菌根菌の共通性から菌寄生植物が炭素源を依存している独立栄養性植物を同定する。(2) については、科内に多様な生活型の種を内包するリンドウ科を対象に、栄養摂取様式の変化に伴うアーバスキュラー菌根菌との対応関係の変化を、(1) と同様に菌根菌の分子同定を行う事で明らかにする。

(3) については、近年明らかになったアーバスキュラー菌根菌の炭水化物トランスポータ遺伝子 (Schüßler et al., 2006, *Nature* 444: 933-936) に注目し、この遺伝子の発現量を指標として、菌根菌と植物との間に生じる炭素源移動の潜在的な能力差を評価する。

## 3. 研究の方法

研究材料として、ホンゴウソウ科およびヒナノシャクジョウ科の菌寄生植物、菌寄生に移行しつつある状態の植物としてフデリンドウ (リンドウ科) を用いる。フデリンドウ

は一般には菌寄生との関連で認識されることがない植物だが、植物体の形状と栽培できないことから菌根菌への依存度を高めつつある状態の植物であると判断でき、本研究の材料として解析を行うこととした。

(1) 従属栄養性の植物のもつアーバスキュラー菌根菌および周辺植物種のアーバスキュラー菌根菌の分子同定

自生地から対象植物および自生地周辺に生育するアーバスキュラー菌根をもつ植物を採集する。採集した植物の根から DNA を抽出して、アーバスキュラー菌根菌特異的なプライマーを用いて PCR 法で核 rDNA 領域の増幅を行う。得られた産物の塩基配列を決定し、国際データベースに登録されている配列と比較して、アーバスキュラー菌根菌の同定を行う。特に周辺植物の中で、菌寄生植物やフデリンドウと共通の菌を持ったものがないかを検索する。

(2) リンドウ科を対象とした独立栄養性から従属栄養性への進化に伴うアーバスキュラー菌根菌の変化

菌寄生に移行しつつある状態の植物として選択したフデリンドウと、同じ科に属するリンドウ、エゾリンドウ、アサマリンドウ、ツルリンドウ、アケボノソウ、センブリ、ハナイカリの各種を採集し、(1)と同様に根から DNA を抽出して、アーバスキュラー菌根菌特異的なプライマーを用いて PCR 法で核 rDNA 領域の増幅を行う。得られた産物の塩基配列を決定し、国際データベースに登録されている配列と比較して、アーバスキュラー菌根菌の同定を行う。

(3) アーバスキュラー菌根菌各種の炭水化物トランスポータ遺伝子の塩基配列の比較

(1)(2)で得られた DNA および(1)で樹立した培養菌株から抽出した DNA を用いて、Schüßler et al. (2006)が報告している炭水化物トランスポータ遺伝子の塩基配列を決定する。プライマーは、既に得られている菌特異的な MST 遺伝子族の各種配列を比較して新たに設計する。このプライマーを用いて PCR 法で得られた塩基配列を相互に比較し、得られた植物や地域と関連する変異が存在するの否かを検討する。また、それぞれの変異をタンパク質の構造と比較して、機能的な変異に関連するの否かについても合わせて検討する。

(4) アーバスキュラー菌根菌各種の炭水化物トランスポータ遺伝子の発現量解析

菌寄生植物やフデリンドウなどのリンドウ科植物について、サンプルを新たに自生地から採集して根及び地上部から mRNA

を抽出する。(3)で得られた結果に基づいて作成したプライマーを用いて、半定量 PCR による炭水化物トランスポータ遺伝子の発現量解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 菌寄生植物およびフデリンドウの菌根菌の分子同定

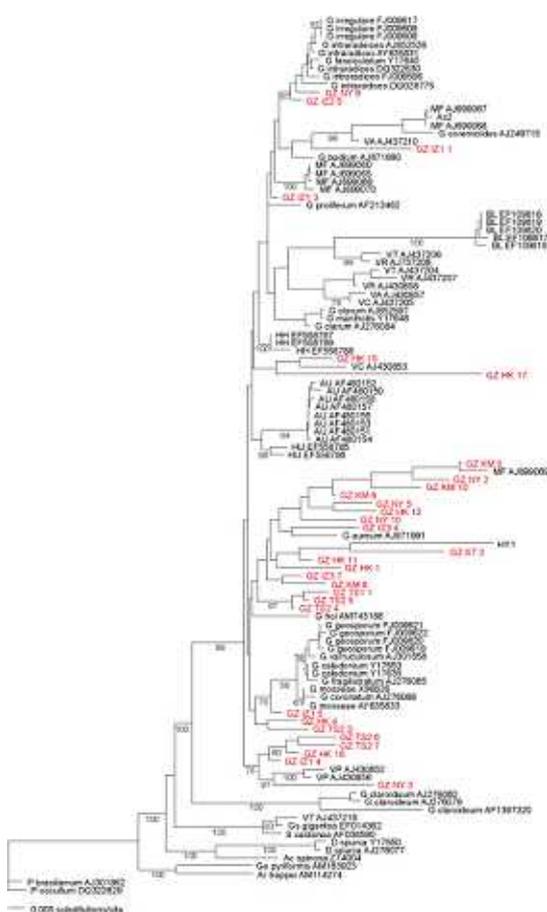
菌寄生植物としてホンゴウソウ科4種、ヒナノシャクジョウ科1種、混合栄養性種(光合成も行うが菌からの炭素源供給にも依存する植物)としてフデリンドウを解析対象として、核 18SrDNA 領域の部分配列を用いて菌根菌の分子同定を行った。その結果、いずれの植物からもアーバスキュラー菌根菌の配列が得られ、それらは全て *Glomus* 属の Group A と呼ばれる系統群に所属することが明らかとなった。サンプル数の問題もあるが、ホンゴウソウ科、ヒナノシャクジョウ科の各種は、*Glomus* Group A の中でも比較的限られた系統のもののみを菌根菌として利用しているのに対し、フデリンドウは8系統群にもおよぶ非常に幅広い菌根菌を利用していることが示された(図1)。既知の配列と比較すると、いずれの植物から得られた菌根菌も、他の菌寄生植物から得られた菌やタイ類の共生菌などと系統的にまとまることが示され、菌寄生植物など菌に依存して生活する植物が特定の *Glomus* のグループを利用する傾向があることが大域的には示された。

(2) リンドウ科植物の菌根菌の分子同定と従属栄養性の進化との関係

(1)で用いたフデリンドウの他に、リンドウ科4属7種の菌根菌を同様に解析した。その結果、いずれの種からも *Glomus* Group A に属する菌が菌根菌として得られた。フデリンドウと同様、菌根菌の範囲は広く、*Glomus* Group A 内のさまざまな系統群に及んでいた。このことから、一見するとフデリンドウのような菌依存度の高い種の進化の過程で、特異性が高くなる方向への進化は生じなかったように見える。しかし各系統群の検出比率などを比較すると、フデリンドウでは明らかに *Glomus aureum* の系統群に属する菌が多く検出されており、独立栄養性種からフデリンドウのような混合栄養性種への進化の過程で、主に関係を結ぶ菌の種相が変化した可能性が示唆される。

一方、フデリンドウと同様に菌根菌への依存度が相対的に高いと考えられるセンブリでは、フデリンドウのような明瞭な傾向は見られなかった。これらの差異がどのような要因によっているのかは、今後さらに検討する必要がある。

図1. フデリンドウから得られた菌根菌の



Glomus 属内での系統的位置。赤字で示したものがフデリンドウから得られた菌の配列である。

### (3) 周辺植物の菌根菌の分子同定と金寄生植物やフデリンドウなどの菌根菌との類似性

菌寄生植物およびフデリンドウの自生地で、その周辺に生育していた独立栄養性種のうち、自生量が多くアーバスキュラー菌根を形成する 20 種について、(1) (2) 同様に菌根菌の分子同定を行った。その結果、イネ科植物を中心に低頻度ながら (1) で得られた菌根菌と同じ菌が得られた。従属栄養性のこれらの植物は、共通の菌根菌を介して独立栄養性種から炭素源を得ている可能性が高い。さらに、シダ植物、中でもハナヤスリ科に属する 2 種(ヒロハハナヤスリ、コハナヤスリ)からは高頻度に (1) と同じ系統に属する菌が検出された。ハナヤスリ科は配偶体が地中に形成され、菌寄生性の生活を営む特殊なシダ植物の一群であり、このような生活様式の植物が菌寄生植物やフデリンドウと類似した菌相を示すことは、生活史の少なくとも一部を菌に依存する植物と関係結びやすいアーバスキュラー菌根菌が存在していることを示唆している点で興味深い。このような生活史の少なくとも一部は従属栄養性になるが系統的に大きく異なる植物同士の菌根

菌の類似は、コルシア科の菌寄生植物でも報告されていたが、本研究での結果は同じ植物群落内に生育している植物間での共通性を見だし、より直接的なつながりがあることを示した点で重要である。

### (4) アーバスキュラー菌根菌の炭水化物トランスporter 遺伝子の解析

既知の配列から炭水化物トランスporter 遺伝子の部分配列を特異的に増幅するプライマーを作成し、ホンゴウソウ科 2 種およびフデリンドウからアーバスキュラー菌根菌の当該遺伝子の部分配列を決定した。リンドウ科の光合成種 3 種(リンドウ、フデリンドウ、センブリ)についても、同じプライマーを利用して部分配列を決定し、比較を行った。その結果、従属栄養性の植物から得られた遺伝子に特異的に見られる変異はなく、塩基配列レベルで差異が生じているということはないと考えられた。一方、半定量 PCR によって発現量の大きな比較を行った結果、フデリンドウでは発現量の増加が見られる傾向にあることが示された。この発現量の違いが、栄養摂取様式の差異と関連していると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

Hayakawa H, Muroi M, Hamachi H, Yokoyama J, Fukuda T (2011) Correlation of variation between leaf and flower characters in *Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f. (Orchidaceae). *Journal of Japanese Botany* 86: 82-92. 査読あり

Nonomura N, Kawada Y, Minamiya Y, Hayakawa H, Fukuda T, Kang Y, Sakurai K (2011) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Athyrium yokoscense* of the Ikuno mine site, Japan. *Journal of Japanese Botany* 86: 73-81. 査読あり

Hayakawa H, Hamachi H, Muramatsu Y, Hirata A, Minamiya Y, Matsuyama K, Ito K, Yokoyama J, Fukuda T (2010) Interspecific hybrid between *Arisaema sikokianum* Franch. et Savat. and *A. tosaense* Makino (Araceae) revealed from chloroplast and nuclear DNA comparisons. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 61: 57-63. 査読あり

Tsukaya H, Yokoyama J, Imaichi R, Ohba H (2008) Taxonomic status of *Monotropastrum humile*, with special reference to *M. humile* var.

*glaberrimum* (Ericaceae, Monotropoideae).  
Journal of Plant Research 121: 271-278. 査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

Nojima, Hiroshi, Yuki Sakamoto, Jun Yokoyama, Masayuki Maki. Molecular identification of mycorrhizal fungi in the mixotrophic plant *Chimaphila umbellata*. East Asian Botany: International Symposium 2011, Tsukuba Botanical Garden, Tsukuba, Japan, 19 March, 2011.

中野志保乃・横山 潤・ハナヤスリ属(ハナヤスリ科)に共生するアーバスキュラー菌根菌の分子同定 .日本植物学会東北支部第 22 回大会(石巻専修大)2010 年 12 月 18 日 .

野島大志・中井静子・横山 潤 . 分子同定に基づくフデリンドウと菌根菌の対応関係の解析 . 日本植物学会第 74 回大会(中部大学)2010 年 9 月 10 日 .

Sakamoto, Yuki, Jun Yokoyama, Masayuki Maki. Mycorrhizal fungal identification in *Cephalanthera longibracteata* and phylogenetic analysis of strong fungus-dependent *Cephalanthera*. East Asian Plant Diversity and Conservation 2010, Seoul National University, Seoul, Korea, 20-21 August, 2010.

Yokoyama, Jun. Mycorrhizal symbiosis and evolution of myco-heterotrophy in plants. The 7<sup>th</sup> Okazaki Biology Conference “The Evolution of Symbiotic Systems” (Kakegawa, Shizuoka) Jan. 13, 2010.

坂本裕紀・横山 潤・牧 雅之 . 混合栄養性植物ササバギンランの利用菌根菌 . 日本植物分類学会第 8 回大会(仙台)2009 年 3 月 15 日 .

横山 潤・福田達哉・糠塚ゆりか・三吉一光・辻田有紀・小林史郎・遊川知久 . サイハイラン属(ラン科)とその地下部に内生する菌根菌との対応関係 . 日本植物学会第 72 回大会(高知)2008 年 9 月 25 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

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :