

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570102

研究課題名（和文）多様な種分化をした子囊菌類の系統に基づいた新分類体系の研究

研究課題名（英文）Taxonomic studies for novel systems of ascomycetes with diverse speciation based on phylogeny.

研究代表者

細矢 剛（HOSOYA TSUYOSHI）

国立科学博物館・植物研究部・グループ長

研究者番号：60392536

研究成果の概要（和文）：分類学的再検討が必要とされる子囊菌類のビョウタケ目について、ヒアロスキファ科を中心とした分子系統学的解析を行った。ヒアロスキファ科の属は毛の性状を主要形質としてまとめられており、属のまとまりはおおむね支持された一方、従来の分類で亜科あるいは連としてまとめられてきたグループは単系統性が支持されなかった。また、17種の日本新菌類を見出した。

研究成果の概要（英文）：Molecular phylogenetic analysis was carried out for the order Helotiales, phylum ascomycota with special attention to the family Hyaloscyphaceae. The genera in Hyaloscyphaceae is largely depend on hair characteristics, and generic delimitation was supported. However, monophyly of the groups regarded as subfamilies or tribes were not supported. In addition to the phylogenetic analysis, 17 species new to Japan was found.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：多様性・分類

キーワード：チャワソウタケ類・ビョウタケ目・ヒアロスキファ科・分子系統学・ITS-5.8S 遺伝子・D1D2 領域・RPB2 領域・アナモルフ

1. 研究開始当初の背景

菌類は推定種数 150 万種ともいわれる巨大な生物群で、陸上はもとより海中・淡水中にわたる広い範囲で様々な生活形態を営んでいる。その 2/3 は子囊菌類と呼ばれ、有性生殖の結果、子囊という袋の中に有性胞子を形成する。子囊はさまざまな形の子囊果（きのこ）

中に生じ、子囊菌類は、この子囊と子囊果の形態によって分類されている。子囊果の中には、子囊を完全に包み込む形のもの（子囊殻、閉子囊殻）や、層状に並んだ子囊を広く露出する形（子囊盤）のものが含まれており、古い分類体系では子囊果の形態によっておおむね綱レベルの体系が整理されていた。この

うち、子囊盤を形成する菌は子囊菌の約 1/3 とされており、分子系統学的な証拠から、子囊盤を形成する菌類は子囊殻や閉子囊殻を形成する菌に対して、原始的であることが明らかにされた。子囊盤が共有原始形質であったことから、このことを根拠にまとめられていた盤菌綱は解体され、現在は 7 目に分割されて並列している。ビョウタケ目は、この中で最大の種数(約 3,900 種)を含む目であり、主に子囊の先端にふた状の構造がない無弁子囊を形成することでまとめられている。本目は合計 10 科に分類されるが、各々の科の単系統性、それらの間の系統関係については十分解析されていない。

ヒアロスキファ科は 71 属 933 種からなるビョウタケ目中最大の科である。本科は多数の種を含むため、科内の亜科あるいは連として、3 つのグループ(クモノスチャワタケ類・ヒナノチャワタケ類・シロヒナノチャワタケ類)に分けられている。本科に所属する菌は、有柄あるいは無柄の子囊盤を形成し、その外側に様々な形態の毛を有することが特徴であり、子囊盤を構成する構造と毛の形態によって分類されてきた。しかし、これらの形質は収斂による可能性があるため、形態形質を基にした分類体系は研究者によって異なるという混乱があり、形態形質を吟味した上での分類体系の再構築が必要である。予備的な分子系統解析によって、本科は多系統群であることが示されており、本科の分類体系を再構築するには、本科を中心として、ビョウタケ目菌類の様々な菌群を含む分子系統学的検討を行ない、科内の系統関係を詳細に把握する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、真菌類中もっとも多様な種分化をとげた子囊菌類の系統を明らかにし、新規の

分類体系を再構築することを目指すものである。そのために、最も多数の種を含むヒアロスキファ科を中心としたビョウタケ目菌類の分子系統学的解析を行ない、形態形質、ライフサイクルの特徴、生態を対照することによって、その形質進化を解明する。真菌類特有のアナモルフ(無性生殖時代)や、基質選択性という生態的な特徴を解析に加味することによって、菌類特有の進化過程を解明し、それに基づいた分類体系の再構築を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 材料の採集・分離

日本全国で採集を行ない、材料は分離に供するまで低温で保存し、現地からは低温宅配便を利用して輸送した。材料からは、スカーマン式マイクロマニプレータを用いた単孢子分離によって、単一孢子に由来する菌株を得た。分離できなかったものについては緩衝液中で子囊盤を保存し、DNA 抽出に供した。

(2) DNA の抽出、PCR とシーケンシングと分子系統解析

各菌株を液体培地で培養し、その一部から DNA を抽出した。既存の解析で有効とされている ITS-5.8S リボゾーム領域(ITS)、LSU の D1-D2 領域(D1D2)、polymerase II second largest subunit(RPB2)、ミトコンドリアリボゾーム小サブユニット領域(mtSSU)を増幅し、シーケンスし、連結して最尤法、最大節約法、ベイズ法によって解析した。

(3) 培養によるアナモルフの検討

得られた培養株を複数の培地(ポテト・デキストロース・アガー、オートミールアガー、三浦培地)で培養し、培養下で形成されるアナモルフ(無性生殖時代)を観察した。

なお、標本は国立科学博物館にて保存し、培養株については適切な菌株保存機関に寄託する。得られた菌株については、必要に応

じ、適当な菌株保存機関（NITE-NBRC など）に寄託した。

4. 研究成果

(1) ヒアロスキファ科の分子系統学的解析

ヒアロスキファ科は、大きく 1) 子実体形成菌糸層を持ち、無柄の子囊盤を形成するクモノスチャワнтаケ *Arachnopeziza* 類, 2) 中型から大型で槍形の側糸か、顆粒を有する毛を持つシロヒナノチャワнтаケ *Lachnum* 類, 3) 小型で、さまざまな形態の毛をもつヒナノチャワнтаケ *Hyaloscypha* 類の 3 群から構成される。このうち、シロヒナノチャワнтаケ類については、すでに単系統性が示されている (Hosoya et al. 2011) が、それ以外の 2 群についての単系統性は示されていない。11 属 77 種を用い、(ITS、D1D2、RPB2、mtSSU の 4 遺伝子を結合して最尤法で解析した。系統樹の中では属ごとのまとまりはおおむね支持され、種内の ITS 遺伝子はほぼ一致した。2 種の変種 (var. *spiralis*, var. *albohyalina*) を含む *Hyaloscypha albohyalina* は、側系統であることが判明した。このことから、毛を重要視した従来の分類体系は部分的に支持された。しかし、クモノスチャワнтаケ類は 2 群に分かれ、そのうちの *Proliferodiscus* はシロヒナノチャワнтаケ類のクレードに入り、シロヒナノチャワнтаケ類は側系統となり、残りのクモノスチャワнтаケ類は *Arachnopeziza* 属のみで単系統となった。ヒナノチャワнтаケ類は、多系統となった。これらのデータはヒアロスキファ科が単系統でないことを示唆している。そこで、次に、単系統性を示したヒアロスキファ科のメンバーを減らし、他の科に属するビョウタケ目の菌類を入れることによって 60 種について、さらに解析を行った (図 1)。

ヒアロスキファ科はそれぞれ強く支持される 10 個のクレードに分かれ、このうちク

レード 1~4 がさらにまとめて支持された。また、これらの間にはビョウタケ目の様々な科が入りこむことによって、ヒアロスキファ科が異質性の高い分類群であることを示唆した。ヒアロスキファ科に認められていた 3 群はほぼ完全に分解したが、シロヒナノチャワнтаケ類については、クモノスヒナノチャワнтаケ類の *Proliferodiscus* を含むことによって、単系統性が維持された。

ヒナノチャワнтаケ類については多系統的であることが判明したが、このうちクレード 1~4 としてまとめられたグループは、*Hyaloscypha* とは異なる位置で高く支持される系統群を構成した。クレード 1~3 の共通形質は長矩形の托外皮層と細長い胞子、クレード 4 の共通形質は、顆粒を有する単細胞で円筒形の毛の存在であった。

分子系統樹は、また、きわめて類似した形質が収斂の結果生じたことを示した。

Hyalopeziza と *Urceolella* はともに樹脂様の物質によって壁が厚壁化したガラス様の毛をもつが、後者の毛は KOH で処理すると物質が融解するのに対して前者は不変で、ガラス様の見かけ上は、収斂の結果であることが示唆されていた。両者は分子系統学的解析の結果でも異なるクレードに位置することから、収斂の結果であることが決定的となった。

(2) 培養によるアナモルフの検討

ヒアロスキファ科には、複数の不完全時代 (アナモルフ) が知られている。これらは、内生出芽と全出芽の二つのタイプに分類される。ヒアロスキファ科における前者としては、フィアロ型という分生子形成様式でまとめられた *Catenulifera* が型アナモルフが知られるが、これを共有する *Hyphodiscus* の単系統性が支持されたのに対し、全出芽のアナモルフでは、分子系統学的には単系統性が支持された *Hyaloscypha* には *Cheiromycella*,

Pseudaegerita の二つが対応した。これらの分生子の形態は全く異なっているため、アナモルフは属レベルで異なる分類とされているが、いずれも水辺環境への適応の結果と考えられ、外生出芽のアナモルフが収斂しやすいことを示した。

(3) 分類学的処置

すでに述べた系統学の問題点を分類学的に解決するため、次のような処置を行った。

- ① *Proliferodiscus* の所属をクモノスヒナノチャワಂತケ類からヒナノチャワಂತケ類に移した。
- ② *Hyaloscypha albohyalina* var. *spiralis* を *Hyaloscypha spiralis* stat. nov. とした。
- ③ *Hyaloscypha albohyalina* var. *monodictys* を *Hyaloscypha monodictys* stat. nov. とした。
- ④ *Hyalopeziza pygmaeus* の属を組み換え、本種に適用される新属 *Hyalodiscus* を提唱し、*Hyalodiscus pygmaeus* comb. nov. とした。
- ⑤ 新種 *Amicodisca castaneae* sp. nov. を提唱した。

本研究の結果、ヒアロスキファ科は、単系統でないことが示された。これを単系統に保つためには、基準属である *Hyaloscypha* を含み、単系統性が支持される系統群のみをヒアロスキファ科とすることが考えられる。しかしながら、本研究の結果は、*Hyaloscypha* が単独で単系統であることを示し、これに基づくヒアロスキファ科は *Hyaloscypha* のみによって定義されるばかりでなく、除外されたほかの属に対して小さな科を多数設定しなくてはならなくなる。これは論理的に正しいが、分類学的には混乱を招く恐れがある。そこで、本研究では、ヒアロスキファ科が単系統でないことを指摘するのにとどめた。

(4) その他のビョウタケ目

上記の他、本研究の過程において、次の分類群が日本新産であることを見出し、報告した。

Bisporella discedens, *Hyemenoscyphus immutabilis*, *Hymenoscyphus caudatus*, *Hymenoscyphus epiphyllus*, *Hymenoscyphus menthae*, *Lachnum rachidicola*, *Lambertella yunnanensis*, *Lanzia pruni-serotinae*, *Lanzia longipes*, *Lanzia microserotina*, *Moellerodiscus lentus*, *Mollisia amenticola*, *Phialina pseudopuberula*, *Poculum sydowianum*, *Proliferodiscus alboviridis*, *Stamnaria americana*.

ビョウタケ目全体の系統は過去も明らかにしようと試みられてきた。しかし、現在までにビョウタケ目全体についての信頼性の高い分子系統樹は得られていない (Spatafora 2006, Wang et al. 2006)。この原因は、ビョウタケ目の種数が膨大で、驚異的な多様性をもつことに加え、その評価のために仮によりどころとなる現在の分類体系に疑問があることに由来する。本研究では、「毛を持つ」ことによってまとめられたグループを詳細に検討することによって、まず、その分類学的単位としての価値を検証した。その結果、本分類群が単系統ではなく、毛の進化は収斂によることが示唆された。今後、同時にその周辺菌群についても検討を進めることによって、さらに分類学的に前進を図ることが重要と考えられる。

本研究の途上、韓国の高麗大学の Jae-Gu Han 氏が同分類群について研究を進めていることが判明し、共同研究を行うことができた。本研究においては同氏によるデータ解析の貢献も大きい。1990年代からヒアロスキファ科の菌類の研究は研究代表者らによって積極的になされ、世界的にもリードした状態にある。これをさらに進め、国際的な共同

研究に発展させることができたのは望外の喜びである。

【文献】

Spatafora et al. (2006) Mycologia 98: 1018-1028.
Wang et al. (2006) Mol. Phylogen. Evol. 41:295-312.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)、すべて査読付き

- ① Hosoya T, Saito Y, Harada Y, Tanaka K, Zhao YJ, Kakishima M (2013) *Stammaria americana*, new to Japan and occurring on *Equisetum* stems Mycosystema (accepted for publication).
 - ② Zhao Y-j, Hosoya T, Baral HO, Hosaka K, Kakishima M (2012) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan Mycotaxon 122:25-41.
 - ③ Hosoya T, Hosaka K, Saito Y, Degawa Y, Suzuki R (2013) *Naemacyclus culmigenus*, a newly reported potential pathogen to *Miscanthus sinensis*, new to Japan Mycoscience (accepted for publication)
 - ④ Hosoya T, Zhao YJ, Han JG, Saito Y, Kakishima M (2012) Enumeration of remarkable Japanese discomycetes (6): Notes on two inoperculate discomycetes new to Japan and One operculate discomycete Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series. B 38:139-146.
 - ⑤ Hosoya T, Han JG, Saito Y, Zhao Y-j, Kakishima M, Shin HD (2011) Enumeration of remarkable Japanese discomycetes (5): First records of one operculate and two inoperculate discomycetes in Japan Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B 37:147-154.
 - ⑥ Hosoya T, Sung GH, Han JG, Shin HD (2010) Enumeration of remarkable Japanese Discomycetes (4): First records of one operculate and two inoperculate Helotialelean discomycetes in Japan. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. Ser. B. 36:165-172.
- 〔学会発表〕(計 12 件)
- ① 細矢 剛・齊藤由紀子・保坂健太郎・鈴木 亮・出川 洋介, 2012.5.26. ススキに発生した日本新産盤菌類 *Naemacyclus culmigenus*. 日本菌学会, 岐阜大学.
 - ② Zhao Y-J, Hosoya T, Baral HO, Hosaka K, Kakishima M, 2012.

5.26. Taxonomic consideration of *Lambertella albida* reported from Japan. 日本菌学会, 岐阜大学.

- ③ 趙彦傑、細矢剛、柿寫眞, 2011.9.10. 国立科学博物館標本庫から見出された *Lambertella* 3 試料についての分類学的検討. 日本菌学会第 55 回大会, 北海道大学.
- ④ 細矢剛、HanJaeGu, Sung GiHo、平山裕美子、保坂健太郎、Shin HyeonDong, 2011.9.10. 複数遺伝子を用いたヒアロスキファ科の分子系統学的研究. 日本菌学会第 55 回大会, 北海道大学.
- ⑤ Zhao Y-J, Hosoya T, Kakishima M, 2011.8.10. Preliminary molecular phylogenetic analysis of *Lambertella*, Rutstroemiaceae. Asian Mycological Congress 2011, Incheon University.
- ⑥ Hosoya T, Degawa Y, Hosaka K, 2011.8.10. Reevaluation of *Roesleria subterranea* in Japan. Asian Mycological Congress 2011, Incheon University.
- ⑦ Hosoya T, Han J-G, Sung G-H, Hosaka K, Shin HD, 2011.8.7. Reassessment of Hyaloscyphaceae (Helotiales, Leotiomyces) based on molecular phylogenetic analysis.. Asian Mycological Congress 2011, Incheon University.
- ⑧ Hosoya T, Han JG, Sung GH, Hirayama Y, Shin HD, Tanaka I, Hosaka K, 2010.8.4. Multi-gene molecular phylogeny of the family Hyaloscyphaceae with special reference to *Hyaloscypha* and its allies. International Mycological Congress 2010 (Edinburgh), Edinburgh.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細矢 剛 (HOSOYA TSUYOSHI)

国立科学博物館・植物研究部・グループ長
研究者番号: 60392536 研究者番号:

(2) 研究分担者

保坂 健太郎 (HOSAKA KENTARO)

国立科学博物館・植物研究部・研究員
研究者番号: 10509417

出川 洋介 (DEGAWA YOUSUKE)

筑波大学生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 00311431 研究者番号:

(3) 研究協力者

Jae-Gu Han, University of Seoul

RAxML tree INTER-SET
(60 taxa, 4168 characters)
ITS-5.8S + D1-D2 28S +RPB2
+ mtSSU
ML BS/ MP BS/ Bayesian PP
(50</ 50</ 0.9<)

ARACHNOPEZIZEAE
HYALOSCPHEAE
LACHNEAE

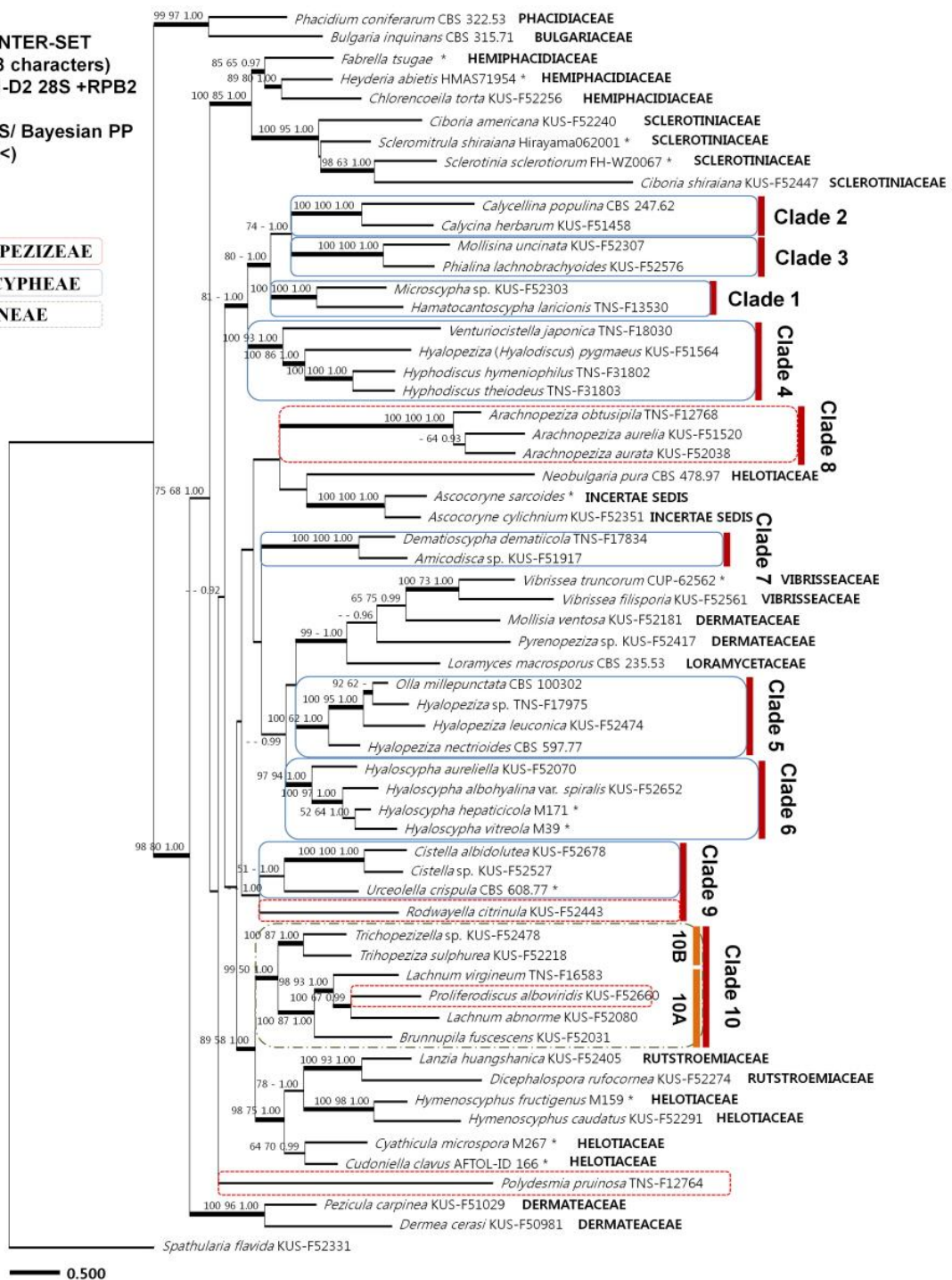


図 1. ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2), リボゾーム大サブユニット D1-D2 領域, RPB2、ミトコンドリアリボゾーム小サブユニット(mtSSU)遺伝子を連結して最尤法によって解析した系統樹。最尤法および最節約法による 50%を超えるブーツストラップ値 (BP)、ベイズ法による 90%を超える事後確率をこの順に枝上に示した。太い枝は最尤法の BP ≥ 80%。GenBank より得たシークエンスは*を記した。