

研究成果報告書（第28回学術研究助成）

2022年 3月 30日

公益財団法人 藤原ナチュラリスト振興財団
理事長 野村 茂 樹 殿

所属機関名 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻
職 名 博士課程2年
氏 名 板垣ひより

1. 研究課題

『ヘソタケ科*Pyrenopeziza*属の標本とDNA配列を用いた種多様性の探索と、バーコードの手法の有用性の検討』

2. 共同研究者

細矢 剛（国立科学博物館 植物研究部長）

3. 研究報告

I. 目的

子囊菌門ビョウタケ目ヘソタケ科（*Dermateaceae sensu lato*）の菌類は、温帯域を中心に世界的に分布し、微小な子実体（子囊盤）をつくる腐生菌として知られる。ヘソタケ科は無柄の子囊盤と、褐色で球形の細胞から成る托外皮層、そして無色で（多くは）単細胞の子囊胞子が特徴である。本菌群は、属あるいは種レベルで識別するための顕著な形質に乏しいにも関わらず（あるいはそのために）、これまでに非常に多くの種が記載されてきた。

近年、次世代シーケンサーを用いた研究により、健全な植物組織から本科菌類のDNAが高頻度で検出され、腐生だけでなく生きた植物にも内生することが示唆された(Toju et al, 2013)。報告者は、ホオノキの落葉に発生するヘソタケ科の一種、ホオノヘソタケ（*Pyrenopeziza protrusa*）を日本新産として報告し(Itagaki et al., 2019)、本菌がホオノキの落葉だけでなく、葉や根などの健全な組織にも生息することを示し、その「多能な」生態の一端を解明した(Itagaki & Hosoya, 2021)。このように、ヘソタケ科は生態的に重要な菌群であるという認識が高まりつつある一方で、本科の系統分類学的な整理はほとんど進んでいない。本邦において報告された本科菌類は、わずか数種にとどまっているが、各地から採集されたヘソタケ科標本が国立科学博物館（以下、科博）に所蔵されている。本科菌類の標本の多くは、その形態や基質に基づいて“*Pyrenopeziza* sp.”や“*Mollisia* sp.”などの属レベルの仮同定がされており、種名が付与されている標本は1割に満たない。本科の菌類は培養が比較的容易なため、標本由来の菌株も保管されている。

本科のように、形態だけでの種識別が難しい菌類においても有効的な同定手法として、核ITS領域によるDNAバーコーディングが利用されつつある(Schoch et al., 2012)。種の識別領域としてのITS領域の有用性は、様々な分類群の菌類において報告されており、この遺伝子領域における98.5%以上の相同性が種の範囲の指標の一つとして提唱されている(Nilsson et al., 2012)。

そこで本研究では、科博に保管されているヘソタケ科の菌株に加え、新たな採集で得られたヘソタケ科菌株からDNAを抽出し、ITS領域における相同性が98.5%以上の配列どうしをまとめ、この分子系統学的なまとまりを“種の候補”として扱うことで、日本における本科菌類の種多様性の把握を試みた。次に、それぞれの種の候補に共通する形態や宿主を探索し、既知種の配列や形態と比較することで日本産ヘソタケ科菌類の同定と記載を試みるとともに、本科におけるバーコードの手法の有用性を評価した。

II. 方法

新型コロナウイルス感染症流行のため、遠方の調査を取りやめ、新規の採集は関東～中部地方（茨城・群馬・長野・岐阜・静岡・石川）を中心に実施した。採集後は速やかに子囊盤から子嚢胞子を分離し、培養菌株を確立した。残りの子囊盤は乾燥後、標本として科博に寄託した。科博に保管されている菌株に加え、新規の採集で得られたヘソタケ科の菌株からDNAを抽出し、プライマーペア（ITS1F/ITS4）を用いてITS-5.8S rDNA領域をPCR増幅し、サンガーシーケンスにて配列を決定した。得られたITS配列をCD-HITを用いて98.5%以上の相同性を持つ配列どうしでクラスタリングした。次に、各クラスターの代表配列に対して98.5%以上の相同性を示す既知種のタイプ標本由来あるいはカルチャーコレクション（CBS）由来の配列（参照配列）をNCBIデータベースから抽出し、科博標本由来の配列と併せて近隣結合法にて分子系統解析を行った。

III. 結果と考察

ヘソタケ科標本計186点が、互いに98.5%以上の遺伝的相同性を示す配列から成る65のクラスターにまとまった（図1）。このうち半数は、2～19点の標本を含むクラスターとなったが、残り半数は一度しか採集されていないシングルトンであった。各クラスターを“種の候補”と見なす場合、本邦には少なくとも65種ほどのヘソタケ科菌類が分布していると推測できる。クラスターを構成する標本のラベル（仮同定）を調べると、一部のクラスターでは、遺伝的には同一であるにもかかわらず、2つ以上の異なる属に同定されていた。このことから、本科菌類は形態に基づく種同定が非常に難しいことが改めて示された。

近隣結合法による分子系統解析の結果、NCBIデータベースに登録されている既知種と近い遺伝的距離を有し、高いブートストラップ値（ ≥ 90 ）で支持される多数のクレードが認められた（図2）。文献情報をもとにした既知種の形態と、既知種と同一のクレードに含まれる科博標本の形態とを比較した結果、ヘソタケ科の主要な属である*Mollisia*から5種、*Phialocephala*から8種の日本新産種が確認できた。さらに分子系統樹からは、他のクレードから遺伝的距離が離れたまとまりが見出された（図2の赤枠）。この集団を構成する8つの“種の候補”は、白色の子実層と褐色の托外皮層、絡み合い菌組織から成る托内皮層、そして（多くは1~3隔壁の）長い子嚢胞子を共有しており、ヘソタケ科の既存の属である*Belonopsis*に類似しているが、托組織にシュウ酸カルシウムの結晶を含まない点で異なっている。*Belonopsis*のタイプ種（*B. excelsior*：現在は後発名として別属に所属）のITS配列を加えて改めて系統解析した結果、*B. excelsior*は本集団とは、遺伝的に十分に離れた位置にあることが明らかとなった（図は非公開）。本集団をヘソタケ科の新属として記載するには、ITS領域に加えて、進化速度の異なる複数の遺伝子配列を用いた解析が必要である。

また、その他の分類学的新知見として

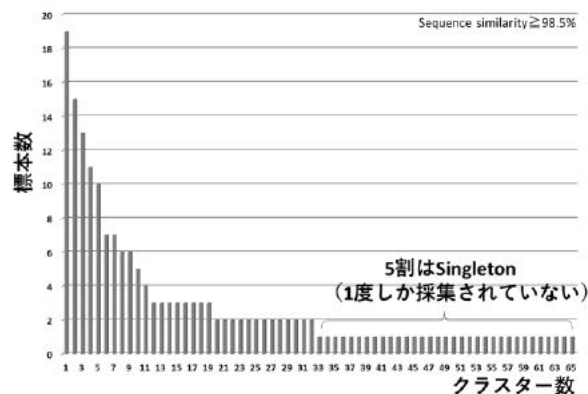


図1 遺伝的相同性に基づくクラスタリング

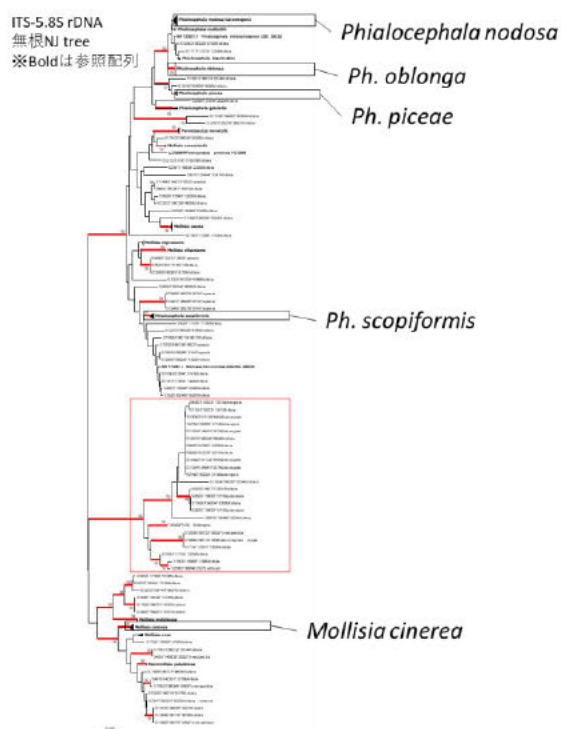


図2 近隣結合法による分子系統樹



。 (3) 参照配列が未取得の既知種においても、文献に記載された形態と、本研究により採集された子嚢盤の形態とがおおむね一致する標本が見つかり、*Tapesia* 1種、*Pyrenopeziza* 2種の新産種が、*Trichobelonium*からは2種の新種が明らかとなった。残りのクラスターは現時点では該当する既知種の配列がないことから、配列未取得の既知種もしくは未記載種である可能性が示された。以上から、ITS領域を用いたバーコード的手法は、本科菌類においても種多様性の理解に有効であることが示された。

III. 成果発表

- 1) 日本菌学会第65回大会
2021年8月23～29日 Zoomオンライン開催
口頭発表『日本産*Mollisia*・*Phialocephala*類縁菌類の種多様性の探索』
○板垣 ひより、細矢 剛
- 2) GBIFワークショップ21世紀の生物多様性研究第16回「DNAで探る生物多様性」
主催：国立科学博物館/東京大学大学院総合文化研究科
後援：国立遺伝学研究所
2021年12月18日 Zoomオンライン開催
講演題目『Reverse taxonomyを活用した日本産Mollisioid菌類における多様性の探索』

V. 今後の課題

本研究で明らかとなった日本新産種や新種の報告と記載を進めていく。また、本研究で得た標本由来のITS配列・標本の写真・微小形態のスケッチ等は、報告者が所属する研究室が運営するデータベースホームページMolliBase (<http://mollibase.jboli.org/ja>) にて公開する予定である。また、菌類の環境DNAや、植物組織から分離された菌株、そして標本から得られたバーコード配列情報を集積し、98.5%以上の相同性を示す配列を同種として扱い、SH (Species Hypothesis) 番号によって管理・公開するデータベース、UNITE (<https://unite.ut.ee/index.php>) においても、本研究で得られた情報を積極的に登録し共有していく。