論文紹介:アーバスキュラー菌根菌胞子果のクローナル胞子集団

Introduction to "Clonal spore populations in sporocarps of arbuscular mycorrhizal fungi"

大和 政秀

Masahide Yamato

千葉大学教育学部, 〒 263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33 Faculty of Education, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

E-mail: myamato@chiba-u.jp

Article Info: Submitted: 25 October 2022 Published: 31 December 2022

アーバスキュラー菌根 (AM) 菌 *Rhizophagus irregularis* (Blaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler, *Diversispora epigaea* (B.A. Daniels & Trappe) C. Walker & A. Schüßler の胞 子果がクローン胞子によって構成されていることを Yamato et al. (2022) で明らかにしたので、本普及記事にて紹介する。

ケカビ門 (Mucoromycota)、グロムス亜門 (Glomeromycotina) に属するアーバスキュラー菌根(AM)菌は陸上植物と4億年 以上共生関係を営んできたと考えられているが(Redecker et al. 2000)、これまで有性生殖体の報告例は存在しない。AM 菌の 菌糸体には隔壁が存在しないため、AM 菌は多核体として知ら れており、さらに AM 菌のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) に は多型がみられる (Sanders et al., 1995)。このことから、AM 菌 が遺伝情報の異なる核を有する多核体(ヘテロカリオン)であ る可能性とともに、ヘテロカリオシスの中で適切な核が選抜され ることによって、クローン増殖によって蓄積しうる有害遺伝子が 排除される仕組みがあるのではないかと議論されてきた(Hijri & Sanders, 2005; Young, 2015)。 しかし、 Maeda et al. (2018) が Rhizophagus irregularis のゲノム解析を行い、単一菌のゲノム内 に rDNA の多型が見られることを明らかにするとともに、Ropars et al. (2016) によって R. 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が明らかとなり、少なくとも R. irregularis に おいては、AM 菌のヘテロカリオン説については否定されている。 さらに、Ropars et al. (2016) 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、このパターンは担子菌門、子のう菌門などの 有性生殖を行う菌類と類似していることから、本種においても有 性生殖が行われている可能性が示唆される。

多くの AM 菌では、単一の胞子を土壌中に形成することが知

られているが、Glomeraceae、Diversisporaceaeの一部の菌では複数の胞子がクラスター状に形成され、さらに着色した菌糸あるいは小胞によって覆われた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いるため(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。

既にゲノムが解析されている2種のAM菌、*R. irregularis* (Glomeraceae) と*D. epigaea* (Diversisporaceae) を対象とし、こ れらの胞子果内の胞子の形態観察を行なった。

Rhizophagus 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(表 1)。*R. irregularis* はいずれもクスノキの樹下に、*D. epigaea* はいずれもスギの樹下に見られた。

*Rhizophagus irregularis*の胞子果は 23 × 12 mm で土壌表面に 現れ(図1A)、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る(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 の褐色の胞子が形成される(図1C, D, E)。胞子壁の厚さは (4.9–)6.5(–8.4) μm で、2 層あるいは 3 層からなる(図1E, F)。

Diversispora epigaea の胞子果は 19×14 mm 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る(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 の褐色の胞子が形成される(図 2C)。 胞子壁の厚さは(10.2-)16.2(-22.7) μm で、厚い laminated wall (8.0-)13.7(-18.2) μm と外側の薄い壁(1.5-)2.5(-3.5) μm によって

表 1. アーバスキュラー菌根菌胞子果の供試サンプルと採取地

種	サンプルNo.	採取日	採取地	東経	北緯
Rhizophagus irregularis	CE1405	2014年5月31日	神奈川県厚木市飯山	139.30	35.47
	CE1901	2019年5月12日	東京都多摩市永山	139.44	35.62
	CE1903	2019年5月15日	神奈川県厚木市飯山	139.30	35.47
	CE2001	2020年5月24日	神奈川県厚木市飯山	139.30	35.47
Diversispora epigaea	CE2018	2020年12月15日	茨城県常陸太田市真弓町	140.58	36.55
	CE2022	2020年12月15日	茨城県常陸太田市真弓町	140.58	36.55
	CE2105	2021年11月14日	栃木県那須烏山市大木須	140.22	36.61



図 1. *Rhizophagus irregularis* (Yamato et al. (2022) から許諾を得て転載). A: 胞子果. B: 胞子果表面の小胞. C, D: 胞子果内の胞子と小胞. E: 胞子果 内の胞子. F: 胞子壁. SS, swollen structure; SP, spore; IW, inner wall; LW, laminated wall; OW, outer wall. スケール: A = 1 cm; B, C = 500 µm; D = 100 µm; E = 100 µm; F = 10 µm.



図 2. Diversispora epigaea (Yamato et al. (2022) から許諾を得て転載). A: 胞子果. B: 胞子果断面. C: 胞子果内の胞子. D: 胞子果内の胞子の胞子壁. 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.

構成される(図 2D)。

これらの形態はいずれも R. irregularis および D. epigaea の記 載論文(Blaszkowski et al., 2008; Daniels & Trappe, 1979)とは 胞子のサイズ、色などの点が異なっていたが、AM 菌のバー コード領域とされる rDNA の SSU-ITS-LSU 領域(R. irregularis: 1513–1526 bp; D. epigaea: 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、それぞれ R. irregularis および D. epigaea への帰属を確認することができた。 胞子果形成胞子と土中に単独に形成される胞子との間に見られ る形態の違いについては更なる研究が必要である。

Rhizophagus irregularis について3胞子果 (CE1901, CE1903, CE2001)、*D. epigaea* についても3胞子果 (CE2018, CE2022, CE2105)を対象として、各胞子果から無作為に取り出した8胞子(計48胞子)について Suyama & 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を構築した。*R. irregularis* は DAOM181602 (GCA_002897155.1)、*D. epigaea* は IT104 (GCA_003547095.1)をそれぞれレファレンスゲノムとして 用い、一塩基多型 (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8胞子間で共有される結果が得られ、これらがクロー

ン胞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、多型領域を増幅するプライマーセット(MAT-HD2F: 5'-TGCTCTTGGATTRTCTRACG-3', MAT-HD2R: 5'-GGTATTCATTTKCCAGCTTG-3')を設計し、3 胞子果から得ら れた計 75 胞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*の胞子果胞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胞子果におい 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 遺伝子と胞子果形成の間に関連性がある可能性も考えられた。 この点についてはさらに多くの胞子果について調査を行う必要が あり、今後の研究課題である。

以上の結果から、本研究で解析した胞子果形成胞子はいず れもクローン増殖した胞子によって構成されていると考えられた。 今回調査対象とした2種の胞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* については仄かな句 いもした。齧歯類の糞から分離された AM 菌胞子に発芽能力 があることが確認された研究例もあり(Trappe & Master, 1976; Janos et al., 1995)、このような胞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、 さらに胞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胞子果を探索する必要がある。

今回の研究では、AM 菌の単胞子を対象として MIG-seq を行 い、構築したゲノム縮約ライブラリーから SNPs に基づく遺伝解析 が実施可能であることが示された。この手法は胞子果に限らず、 単独で胞子を形成する 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役立つと考えられる。

謝辞

本研究はYamato et al. (2022) Clonal spore populations in sporocarps of arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 32: 373–385. として発表された。論文共著者の山田洋輝氏、前田太郎氏、山本航平氏、

日下部亮太氏、折原貴道氏に感謝申し上げる。神奈川県立博物館の中島稔氏にはサンプリングに多大なご協力をいただいた。 この場をお借りして厚くお礼申し上げる。本研究は JSPS 科学研 究費補助金(19K22269)の助成を受けて行なった。

引用文献

- Blaszkowski J., Czerniawska B., Wubet T., Schäfer T., Buscot F. (2008) *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the Glomeromycota. Mycotaxon 106: 247–267.
- Daniels B.A., Trappe J.M. (1979) *Glomus epigaeus* sp. nov., a useful fungus for vesicular-arbuscular mycorrhizal research. Canadian Journal of Botany 57: 539–542.
- Janos D.P., Sahley C.T. (1995) Rodent dispersal of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Amazonian Peru. Ecology 76: 1852–1858.
- Hijri M., Sanders I.R. (2005) Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. Nature 433: 160–163.
- Maeda T., Kobayashi Y., Kameoka H., Okuma N., Takeda N., Yamaguchi K., Bino T., Shigenobu S., Kawaguchi M. (2018) Evidence of nontandemly repeated rDNAs and their intragenomic heterogeneity in *Rhizophagus irregularis*. Communications Biology 1: 87.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. Science 289: 1920–1921.
- Ropars J., Toro K.S., 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.
- Sanders I.R., Alt M., Groppe K., Boller T., Wiemken A. (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. New Phytologist 130: 419–427.
- 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 J.M., 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 *Sphaerocreas 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.
- Young J.P.W. (2015) Genome diversity in arbuscular mycorrhizal fungi. Current Opinion in Plant Biology 26: 113–119.