

植物防疫基礎講座：植物病原菌の分子系統樹—そのシステムと見方—(7)

Neotyphodium 菌

畜産草地研究所飼料生産管理部 **すが** **わら** **こう** **や**
菅 **原** **幸** **哉**

はじめに

ここまでの本連載で、生物間の類縁性や系統関係、そしてその進化の歴史を考察する強力なツールである分子系統解析の概略と、近年の糸状菌研究におけるその活用例が代表的な植物病原菌を取り上げながら紹介されてきた。本稿では、系統解析の申し子として誕生した *Neotyphodium* 属を取り上げ、このユニークな菌群における研究例を紹介するとともに、系統解析が単に系統関係や類縁性等を推定・視覚化する以上の働きをしようこと、また、関連研究の将来展望なども考察したい。

I *Acremonium* 属の解体と *Neotyphodium* 属の設立

Neotyphodium 属の糸状菌は、寒地型イネ科草本植物の共生糸状菌として知られている。感染によって宿主植物の耐乾性や害虫虫抵抗性を向上させたり、生育を促進することが知られるが、菌の種類によっては牛や羊などの草食動物への毒性を示すこともある。このため有用微生物としての利用と、家畜中毒原因菌としての両面から、世界的に研究が進められている (CRAIG et al., 2004)。

Neotyphodium という属名は、GLENN et al. (1996) がリボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) の解析結果をもとに、当時 *Acremonium* 属の一部 (sect. *Albolanosa*) とされていた菌群を独立させる形で提唱したものである。GLENN et al. (1996) の解析ではこの群がバツカクキン (麦角菌) 目に含まれ、イネ科植物のがまの穂病菌 (*Epichloë* 属菌) に近縁であることが示されている (図-1)。植物防疫基礎講座の一部である本連載で、多くの病原菌とともに *Neotyphodium* 属が取り上げられているのはこうした経緯にもよる。タイプ種とされているのはトールフェ

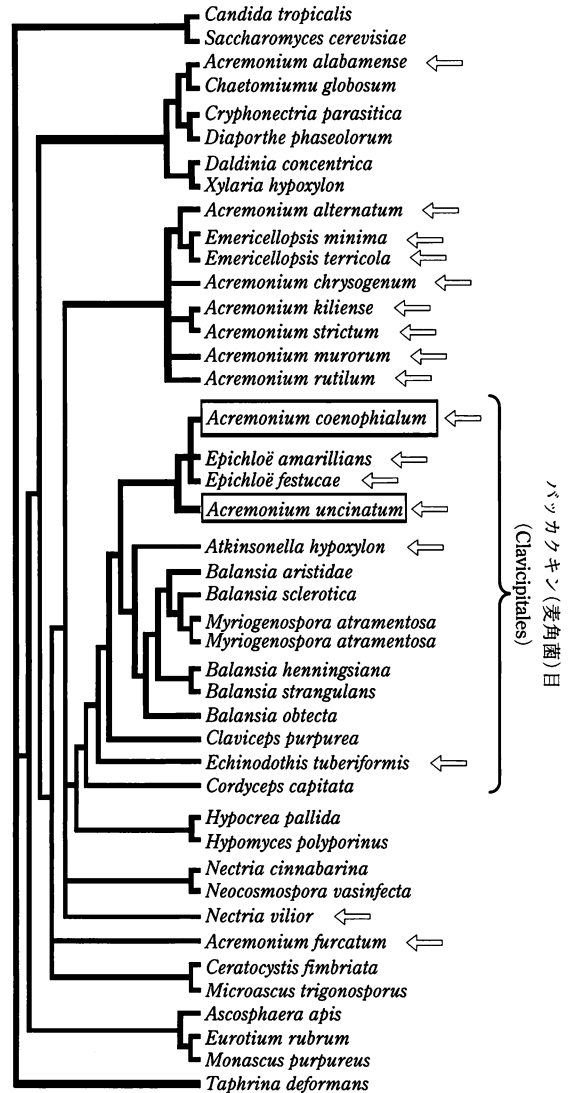


図-1 18S rDNA 配列の比較で推定された子のう菌各種の系統関係と、*Acremonium* 様の不完全世代をもつ種の分布の概略図 (GLENN et al., 1996 を基に作図)
Acremonium 様の不完全世代をもつ菌に矢印を付し、新設された *Neotyphodium* 属への転属が提唱された菌種を矩形で囲って示した。完全世代名と不完全世代名が混在しているので注意。

Molecular Phylogenetic Analysis in *Neotyphodium* Species : To Identify and Beyond. By Koya SUGAWARA
(キーワード: *Neotyphodium* 属菌, *Epichloë* 属菌, 分子系統解析, 雑種形成, 網状進化, 共進化, 共生)

スク (*Festuca arundinacea*, オニウシノケグサ) の体内に共生している *Neotyphodium coenophialum* (syn. *Acremonium coenophialum*) である。

系統解析への rDNA の利用は本連載でも度々取り上げられているが、このケースでは当時の *Acremonium* 属が多系統 (polyphyletic) であり、その中にがまの穂病菌 (*Epichloë* 属) の無性世代として独立させて扱うべきグループ (= 現 *Neotyphodium* 属) が存在することがきれいに示されている (図-1)。しかし、次章以降で示すように、この例のような「きれいな結果」がいつでもシンプルに得られるとは限らない。

II 糸状菌における雑種形成

「雑種」という概念は、「種」を規定する概念の多くが、他の集団との遺伝子交流の断絶 (特に生殖的隔離) をその定義に含むことと矛盾する。これは、近年提唱され、本誌またはこの連載の中でも度々取り上げられている TAYLOR et al. (2000) の提起をはじめとする Phylogenetic Species Concept (系統学的種概念) に基づいての考察 (高松, 2005; 土佐, 2005) をした場合でも同様である。しかし現実的には各種の要因によって様々な「雑種」、すなわち、一度相互に隔離された生物・生物集団の再融合で生じた生物が存在し、雑種形成とそれに伴う異なるゲノムの融合・再編成は生物進化の大きな原動力になっていると考えられている。特に植物においては多数の事例が知られ、各種のムギ類、特に栽培種が高次の異質倍数体である例 (木原, 1973) をはじめ古くから研究されてきた。近年の分子系統解析の発展によってその研究は生物界全体へと大きく広

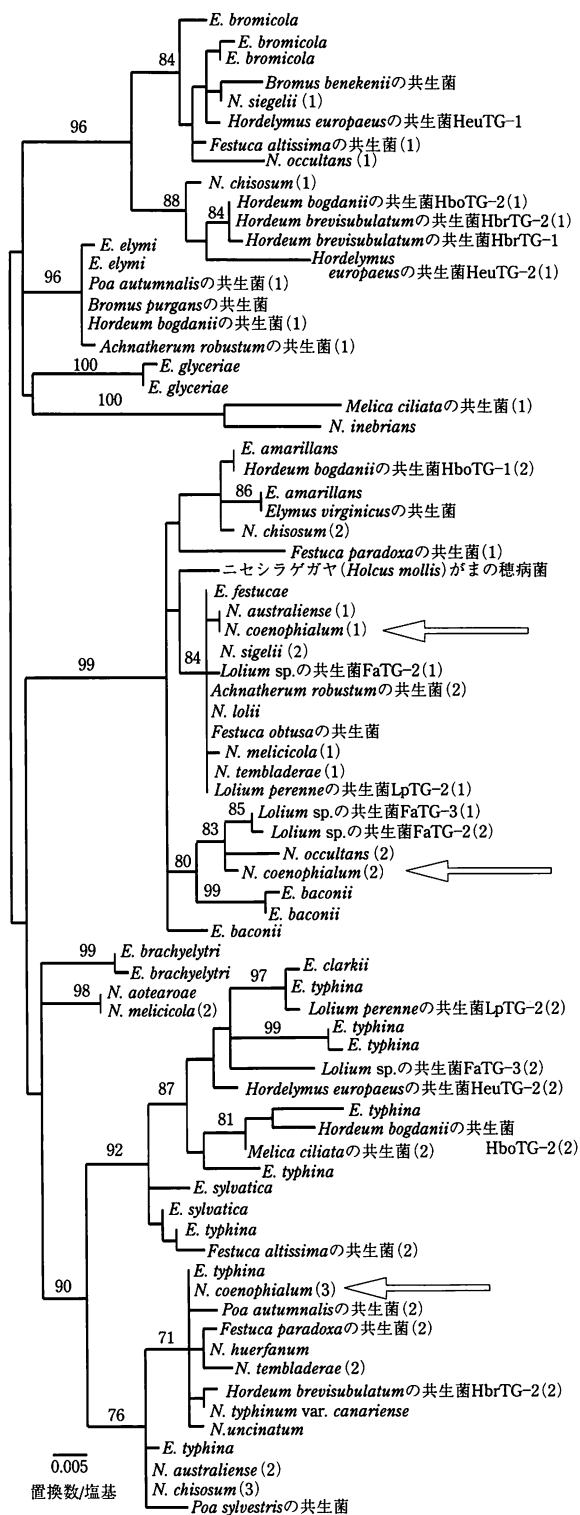


図-2 *Epichloë-Neotyphodium* 属菌の β チューブリン遺伝子の系統関係 (Moon et al., 2004 を基に作図) 最尤法による系統樹。同一菌株から複数タイプの遺伝子が見出されている場合、菌種名の後に (1), (2), (3) を付して並記, 種名未詳の菌は「〇〇 (宿主植物名) の共生菌/がまの穂病菌」とし, 同宿主の別菌種は「TG (Taxonomic Group) -1, TG-2, …」として区別している。枝上の数字は 1,000 回試行でのブーツストラップ値 (% , 70% 以上のみ表記)。多くの菌で、ゲノム内に系統的に離れた複数タイプの β チューブリン遺伝子が保持されている。これは、この菌群の大半の種が雑種化を繰り返しながら進化したためとされている。一例として *N. coenophialum* (syn. *Acremonium coenophialum*) のゲノム中に共存する 3 タイプの遺伝子を矢印で示した。

がりを見せ、糸状菌においても急速に知見が集積されつつある (BRASIER, 2000)。現在 *Neotyphodium* 属とされているイネ科植物の共生菌は、糸状菌において最初に雑種形成が確認された菌群である (SCHARDL et al., 1994; TSAI et al., 1994)。この発見は米国・ケンタッキー州立大学 (SCHARDL 研) を中心としたグループが国際共同研究で得た成果で、関係者から多くの総説が出されている (SCHARDL and PHILLIPS, 1997; CLAY and SCHARDL, 2002)。また、同研究室のホームページ (<http://www.ca.uky.edu/agcollege/plantpathology/schardl/evolution.htm>) でも、これらの菌群の生態や雑種形成過程についての美しい写真・イラストによる図解や、多数の関連文献などを見ることができる。その後の同グループによる網羅的な系統解析から、今日知られている *Neotyphodium* 属菌の大半が雑種であることが判明している (MOON et al., 2004, 図-2)。こうした場合、進化の過程や系統関係を総合的に図示するならば、一度形成された種の境界が消滅して複数の種が融合するため、系統樹というよりは網目状、大河下流域の氾濫原のような、流れの分岐と融合が繰り返される図形になる。系統解析によって種の同定や系統関係がシンプルに理解できると期待する人には頭痛もの話であるが、「網状進化」とされるこうした現象は、実は生物界に広く見られている (綿貫, 2000)。植物と病原体との共進化、また、広く生物の進化と多様性を明らかにするうえで重要な現象と言えるであろう。また、こうした現象の総合的な考察が可能になったのも、分子系統解析の進展のおかげと言える。

共生菌として植物体内に取り込まれ、外界と遮断されているように見える *Neotyphodium* 属菌において、雑種形成はどのように行われたのであろうか? MOON et al. (2004) は、共生菌と宿主植物の系統解析の比較などから『1・がまの穂病菌 (*Epichloë* 属菌) が「間違った」宿主植物に感染したために有性世代を形成できなくなり、恒久的に植物体内に取り込まれた形 (*Neotyphodium* 属菌) になる。2・取り込まれた菌は、有性世代を失ったことでゲノムに有害な突然変異が集積し、多くは死滅していく。3・しかし後から同じ植物体に重複感染した別の *Epichloë* 属菌と体細胞融合して雑種化した菌は、ゲノムを補完・修復し、新しい遺伝子を獲得できるため、生存のチャンスが増える。このため *Neotyphodium* 属菌には雑種化した菌が多くなる。』と推察している。

Epichloë 属菌が宿主とする植物 (広義のムギ類とその

近縁種) には異質倍数体が多いことから、がまの穂病菌が宿主を「間違った」、あるいは宿主から出られなくなった原因にも宿主植物側の雑種化が関与している可能性が高く、共進化を考えるうえでも興味深い。また、糸状菌において雑種化が生存に有利になるような状況はほかにも考えられるかもしれない、今後の研究が待たれる。多核やヘテロカリオンを常態とする各種の糸状菌についても同様の考察が求められよう。

III 遺伝子の重複と系統解析

本連載の第1回 (高松, 2005) で「(系統解析においては) 複数コピーからなる遺伝子ではパラロガスな比較をしてしまう可能性があるので注意が必要である」という注意喚起がなされている。過去の複製ミスなどによるゲノム内での遺伝子重複で生じた類似遺伝子や偽遺伝子などが主にパラロガス (paralogous: 相同性はあるが、系統関係を異にする) な配列とされるが、重複した遺伝子という意味では、前述のような雑種形成によってもゲノム内に多数の「パラロガスな配列」が生じる。rDNA も複数タイプのものが同一生物体内に持ち込まれるが、*Neotyphodium* 属菌においては、どうやら遺伝子座間の相互交換の結果、各菌種ごとに一つのタイプに落ち着いており (GANLEY and SCOTT, 2002), rDNA を用いた系統解析 (GLENN et al., 1996, 図-1) は破綻せず、きれいな結果 (*Epichloë-Neotyphodium* 属菌の単系統性) を示している。一方こうした、いわば「統廃合」を経ていない遺伝子、例えば β チューブリン遺伝子の解析ではこのような訳にはいかず、まとまった結果を得るためには大変な労力が必要であった (MOON et al., 2004, 図-2)。しかし、あえてこのような遺伝子を比較することで、その生物・生物群がたどってきた進化の歴史が明らかになったわけである。系統解析では、解析対象遺伝子およびその類似配列がゲノム内にいくつ、どのような状態で保持されているか、またそうした状態に到った経緯などについても考慮に入れつつ、実験・解析を行うことが重要と言える。

実際の分子系統解析の現場において「パラロガスな配列」は研究者の前に「対象遺伝子領域の PCR 増幅を試みたのだが、増幅産物を泳動してみたらサイズが異なる複数の産物が出てきた」、あるいは「増幅産物をシーケンサーにかけたら、ある部位で複数のピークが重複して (または、ある部分から先でピークが微妙にずれて) 遺

伝子配列が読めない」といった現象として現れることが多い。分子系統解析を行うためにゲノム DNA の配列を解読（シーケンス）する場合には、ダイレクトシーケンス、すなわちゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅した DNA 断片を解読するのが定番であるが、ゲノム内に配列が微妙に異なる（≒パラログスな）遺伝子が複数共存している場合、PCR の増幅産物が複数種類生じることになる。それらのサイズが異なる場合は前者、サイズが等しい（通常の電気泳動では分離・識別できない）場合は後者の形で認識される。従来こうした現象に直面した場合、プライマーの設計をやりなおして対象配列とパラログスな配列を別々に増幅できるようにする、それぞれの配列をクローニングしてシーケンスするなどの方法が採られてきたが、手間がかかることからあきらめて他の遺伝子を解析する研究者も多かった。しかし近年、機器や試薬の進歩でシーケンス作業自体が容易になり、また、濃度勾配ゲル電気泳動など、同一鎖長の DNA 分子を塩基配列の差異による立体構造の違いでふるい分ける手法が普及しつつあることから、今後こうした「やっかいな配列」についても解析が進むものと期待される。

IV Captured in the ryegrass —草に捕まったカビたち

Neotyphodium 属菌は植物体内に共生していることからネオティフォディウム・エンドファイトと通称される。親株からの種子伝染でのみ植物集団内に維持され (SUGAWARA et al., 2004), また、潜在感染していることもあって本格的な記載・研究の歴史は比較的浅い。牧草として利用されるライグラス類、フェスク類での感染が家畜中毒要因になったことから、ここ 20 年ほどでヨーロッパ、南北アメリカ、オセアニアでかなりの調査・記載が行われたが、アジア・アフリカ圏での調査例はまだ少なく、その遺伝資源が期待されている。ほとんど単純な菌糸としてのみ生育して形態の特徴が少なく、また、一部の菌では培養も困難であることから、研究にはここまで述べてきたような分子系統解析の利用が不可欠である。主な菌種・菌系については rDNA のデータが登録されているので、rDNA の配列の比較と系統解析で異同の検討が可能であるが、雑種化で生じた菌種・菌系が多数存在することから、rDNA だけでは検討が困難な菌種・菌系も多い。こうした場合には、Moon et al. (2004) が用いているマイクロサテライトマーカーなども併せて

利用すべきであろう。その結果未知の菌であると考えられた場合には、前述の β チューブリン遺伝子ほか、複数の遺伝子を用いた総合的な検討が必要となる。近年の分子系統解析からは、雑種化に成功し、かつ宿主植物との相利共生を確立できたエンドファイトだけが繁栄し、それ以外の種は消滅、あるいは雑種を構成する遺伝子の一部としてのみ痕跡をとどめているか、未知の植物中に潜んでいるという図式が示されている (GANLEY et al., 2002; MOON et al., 2004)。現在、栽培種のムギ類と共生する *Neotyphodium* エンドファイトは知られていないが、いつかこうした知識をもとに、人類が「小麦のエンドファイトの合成」をする日が来るかもしれない。

おわりに

植物病理の分野では、分子系統解析の功績として生物の同定を容易にした点にのみ目が行きがちであるが、高松 (2005) が本連載の冒頭で記したように、本来の眼目は膨大な量の相互比較可能なデータの蓄積と、これを用いた生物の進化・変遷過程の推定を可能にしたことにある。植物病原菌や共生菌の研究においても、今後、菌の進化や侵入・拡大の歴史の検討、宿主範囲・レースの変遷の推定などへの活用が広がっていくであろう。失われた過去の生物の DNA が封じ込まれているのは、何も琥珀や永久凍土の中だけとは限らないのである。

本稿の執筆に当たり、花き研究所 病害制御研究室長 月星隆雄博士、岐阜大学生命科学総合研究支援センター 須賀晴久博士より、多数の有益なご助言をいただいた。記して厚く御礼申しあげたい。

引用文献

- 1) BRASIER, C. (2000): *Nature* 405: 134 ~ 135.
- 2) CLAY, K. and C. L. SCHARDL (2002): *The American Naturalist* 160 (suppl.): S99 ~ S127.
- 3) GANLEY, A. R. D. and B. SCOTT (2002): *Fungal Gen. Biol.* 35: 39 ~ 51.
- 4) CRAIG, A. R. et al. (2004): *Neotyphodium* in cool-season grasses, Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA, 379 pp.
- 5) GLENN, A. E. et al. (1996): *Mycologia* 88: 369 ~ 383.
- 6) 木原 均 (1973): 小麦の合成, 木原 均随想集, 講談社, 東京, 388 pp.
- 7) MOON, C. D. et al. (2004): *Molecular Ecology* 13: 1455 ~ 1467.
- 8) SCHARDL, C. L. and T. D. PHILLIPS (1997): *Plant Dis.* 81: 430 ~ 438.
- 9) ——— et al. (1994): *Genetics* 136: 1307 ~ 1317.
- 10) SUGAWARA, K. et al. (2004): *Mycoscience* 45: 222 ~ 226.
- 11) 高松 進 (2005): *植物防疫* 59: 116 ~ 121.
- 12) TAYLOR, J. W. et al. (2000): *Fungal Gen. Biol.* 31: 21 ~ 32.
- 13) 土佐幸雄 (2005): *植物防疫* 59: 97 ~ 100.
- 14) TSAI, H.-F. et al. (1994): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2542 ~ 2546.
- 15) 綿貫泰行 (2000): *種生物学研究* 23: 111 ~ 138.