

# 新潟県の海浜より再発見されたアカダマスツポントケ

糟谷 大河・丸山 隆史・布施 公幹・保坂健太郎・箕輪 一博

柏崎市立博物館 館報 第30号抜刷

平成28（2016）年9月発行

## 新潟県海浜より再発見されたアカダマスツポントケ

糟谷 大河<sup>1</sup>・丸山 隆史<sup>2,3</sup>・布施 公幹<sup>2,4</sup>・保坂健太郎<sup>5</sup>・箕輪 一博<sup>2,6</sup>

*Phallus hadriani* rediscovered from the coastal dune of Niigata Prefecture, Central Honshu, Japan

Taiga Kasuya<sup>1</sup>, Takashi Maruyama<sup>2,3</sup>, Kimiyoshi Fuse<sup>2,4</sup>, Kentaro Hosaka<sup>5</sup> and Kazuhiro Minowa<sup>2,6</sup>

### はじめに

2015年10月、新潟県長岡市の海浜において、スツポントケ型の子実体を形成する海浜生の担子菌きのご類であるアカダマスツポントケ *Phallus hadriani* Vent. (スツポントケ目スツポントケ科) を筆者の丸山と布施が採集した。本種は北半球に広く分布すると考えられており (糟谷ら, 2015), 日本では東京都の小石川植物園で採集された子実体に基づき初めて報告され, 和名が与えられた (川村, 1954)。また, 新潟県産キノコ類目録で本種については“砂丘地, 新潟海岸, 稀ならず”と記載があり (松田ら, 1980), 新潟県新潟市の海浜に発生したアカダマスツポントケの原色写真を紹介しているが (松田, 1981), これらの記録は証拠標本を伴ったものではなかった。その後, 北海道石狩市の石狩浜産の標本に基づき, 日本産アカダマスツポントケの形態的特徴が詳しく報告された (糟谷ら, 2007)。さらに, 糟谷ら (2015) は北海道斜里町の海浜で採集された標本に基づき分子系統解析を行い, 日本産アカダマスツポントケの系統的位置を明らかにした。このように, 日本においては, 証拠標本を伴ったアカダマスツポントケの確実な分布記録はこれまで北海道のみで知られていた。新潟県では, 過去に本種が発生したという記録はあるものの (松田, 1981), その分布の実態は不明なままであった。

日本におけるアカダマスツポントケの分布は, 自然で良好な海浜に局在していると考えられており, そのような環境の開発による急激な減少・悪化に伴い, 本種は今後消滅する可能性が高いとされている (糟谷ら, 2007, 2015)。これらのことから, アカダマスツポントケは環境省のレッドリストにおいて絶滅危惧 I 類 (CR+EN) に指定されている (吹春・糟谷, 2010)。したがって, 種の保存を検討する上でも, 本種の日本における分布状況を記録していくことは重要である。そこで, 新潟県で再発見されたアカダマスツポントケの子実体の形態的特徴, 発生環境および系統的位置について報告する。

<sup>1</sup>千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科, 〒288-0025 千葉県銚子市潮見町3 (Department of Environmental Risk and Crisis Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-cho, Choshi, Chiba 288-0025, Japan. E-mail: tkasuya@cis.ac.jp)

<sup>2</sup>柏崎きのご研究会会員 (Members of Kashiwazaki Mushroom Society)

<sup>3</sup>〒945-1355 新潟県柏崎市大字軽井川2450-9 (2450-9, Karuigawa, Kashiwazaki, Niigata 945-1355, Japan)

<sup>4</sup>〒945-0812 新潟県柏崎市半田1-8-22 (1-8-22, Handa, Kashiwazaki, Niigata 945-0812, Japan)

<sup>5</sup>国立科学博物館植物研究部, 〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1 (Department of Botany, National Museum of Nature and Science, 4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan)

<sup>6</sup>柏崎市立博物館, 〒945-0841 新潟県柏崎市緑町8-35 (Kashiwazaki City Museum, 8-35, Midori-cho, Kashiwazaki, Niigata 945-0841, Japan)

## 材料および方法

### 1. 子実体の採集および標本作製

2015年10月31日に、新潟県長岡市寺泊野積の海浜で採集した子実体を食品用乾燥機 (Snackmaster Express Food Dehydrator FD-61, Nesco/American Harvest, Two Rivers, WI, USA) を用いて46 °Cで48時間熱乾燥させ、乾燥標本作製した。乾燥標本に加えて、Hosaka & Castellano (2008), Hosaka et al. (2010), Kasuya et al. (2012) の方法に従い、子実体から剃刀の刃を用いてグレバ (基本体) の一部を切り取り、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) および0.1 M亜硫酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) を添加したDMSOバッファー (Seutin et al., 1991) 中に浸漬し、4 °Cで保存した。供試標本は柏崎市立博物館の収蔵庫 (KCM) および国立科学博物館植物研究部の菌類標本庫 (TNS) に保管した。

### 2. 形態的特徴の観察

子実体の肉眼的特徴は新鮮な生の子実体に基づき記載した。また、乾燥標本のグレバの徒手切片を作成し、それらを水酸化カリウム (KOH) 3 % (w/v) 水溶液で封入した後、光学顕微鏡を用いて担子胞子の形態的特徴を観察した。担子胞子の大きさは、光学顕微鏡の1,000倍の倍率下で無作為に抽出した40個を用いて測定した。

### 3. DNA抽出, PCRおよびシーケンシング

子実体からのDNA抽出は、DMSOバッファー中に浸漬した試料を用いて行った。DNA抽出は、ガラスミルクを用いた改変CTAB抽出法 (Hosaka & Castellano, 2008; 糟谷ら, 2013) により行った。これにより得られたDNAを鋳型とし、PCRにより核rDNA遺伝子の転写領域内部スペーサー (ITS) 領域および核rDNA遺伝子の大きなサブユニット (LSU) を増幅した。ITS領域の増幅にはITS5とITS4 (White et al., 1990), LSUの増幅にはLR0RとLR5 (Vilgalys & Hester, 1990) のプライマーセットをそれぞれ用いた。PCRは、反応液を20  $\mu$ l [1  $\mu$ lの精製DNA, 1  $\mu$ lのdNTP (4 mM), 1  $\mu$ lの各プライマー (8  $\mu$ l), 0.5 unitsのTaqポリメラーゼ (タカラバイオ, 大津), 2  $\mu$ lのMgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2  $\mu$ lのBovine Serum Albumin (BSA)] とし、以下の温度プログラムにより行った: 前処理, 94 °C 3分を1サイクル; 熱変性, 94 °C 35秒, アニーリング, 51 °C 30秒, 伸長, 72 °C 1分を30サイクル; 後処理, 72 °C 10分を1サイクル。

PCR産物は1 %アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドにより染色し、紫外線照射により可視化させた。これにより遺伝子の増幅が確認された場合、PCR産物をillustra ExoStar (GE Healthcare, UK) を用いて精製し、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) により定法に従ってダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

なお、新潟県産アカダマスツポントケに加えて、系統解析において比較する目的で、国立科学博物館植物研究部の菌類標本庫に保管されている北海道産アカダマスツポントケ、および千葉、神奈川、石川の各県産スツポントケ*P. impudicus* L.の標本についても同様にDNA抽出、PCRおよ

びシーケンシングを行い、ITS領域とLSUの塩基配列を決定した。

#### 4. 系統解析

本研究により新たに得られたITS領域とLSUの塩基配列について、ATGC Ver. 6(GENETYX, 東京)でアセンブルし、NCBI GenBankに登録した (Table 1)。その後、ITS領域とLSUについてそれぞれ、GenBank上に公開されているアカダマスツポントケを含むツポントケ型きのこ類の塩基配列を加えて系統解析を行った。データセット (Table 1) はMuscle v.3.6(Edgar, 2004a, b)によりアライメントを行い、さらにBioEdit ver. 7.0.1(Hall, 1999)を用いてその結果を目視で確認し、必要に応じて補正した。その後、PAUP\* ver. 4.0b10(Swofford, 2002)を用いて最節約法により系統樹を作成した。最節約系統樹の探索にはMULTREESオプションを用いて発見的探索法を、また、初期系統樹の作製にはrandom additionオプションを用いて1,000回反復を行った。すべてのキャラクターはunorderedおよびequal weightとした。枝の位置交換はtree-bisection-reconnection (TBR) に設定した。また、総体一致指数 (consistency index = CI)、保持指数 (retention index = RI)、修正一致指数 (rescale consistency index = RC) についても求めた。さらに、最節約法により得られた系統樹の各枝の支持率には、ブートストラップ解析を10,000回反復して行った。外群にはアカダマスツポントケと同じくツポントケ科に属する種を選定し、ITS領域の解析ではキツネノロウソク *Mutinus caninus* (Huds.) Fr.を、LSUの解析ではタヌキノベニエフデ *M. elegans* (Mont.) E. Fish.を用いた (Table 1)。

Table 1. Sequence data used for the present phylogenetic analyses. Asterisks (\*) indicate sequences newly generated from the present study.

Species	Voucher specimen no.	Locality	GenBank accession no.	
			ITS	LSU
<i>Phallus calongei</i>	AH31862	Pakistan	–	FJ785522
<i>P. costatus</i>	MB02040	USA	–	DQ218513
<i>P. hadriani</i>	TNS-F-61696	Japan, Hokkaido, Shari	KP222542	KP222544
<i>P. hadriani</i>	TNS-F-70034	Japan, Hokkaido, Shari	–	KU516105*
<i>P. hadriani</i>	TNS-F-70036	Japan, Niigata, Nagaoka	KU516100*	KU516107*
<i>P. hadriani</i>	AH39161	Pakistan	KF481956	–
<i>P. hadriani</i>	KH11092003-1	USA	DQ404385	AY885165
<i>P. hadriani</i>	OSC107658	USA	–	DQ218514
<i>P. impudicus</i>	TNS-F-70033	Japan, Chiba, Abiko	–	KU516104*
<i>P. impudicus</i>	TNS-F-70037	Japan, Chiba, Sakura	KU516101*	KU516108*
<i>P. impudicus</i>	TNS-F-70031	Japan, Ishikawa, Komatsu	KU516097*	KU516102*
<i>P. impudicus</i>	TNS-F-70035	Japan, Ishikawa, Komatsu	KU516099*	KU516106*
<i>P. impudicus</i>	TNS-F-70032	Japan, Kanagawa, Oiso	KU516098*	KU516103*
<i>P. impudicus</i>	ASI25008	Korea	AF324171	–
<i>P. impudicus</i>	OSC107655	USA	–	AY574642
<i>P. indusiatus</i>	ASI32011	Korea	AF324160	–
<i>P. luteus</i>	–	China	HQ414538	–
<i>P. luteus</i>	TNS-F-61695	Japan, Shiga, Otsu	KP222543	KP222545
<i>P. ravenelii</i>	CUW s.n.	USA	–	DQ218515
<i>Mutinus caninus</i>	KM81429	England	GQ981513	–
<i>M. elegans</i>	OSC107657	USA	–	AY574643

## 結 果

### 1. 形態的特徴の記載

*Phallus hadriani* Vent., Mém. Inst. Nat. Sci. Arts 1: 517, 1798. (Figs. 1-2)

和名：アカダマスッポントケ (川村, 1954)

子実体 (Fig. 1) は基部に菌蕾を有し、そこから托と、グレバを備えたかさが生じる。菌蕾は高さ3.5-5.5 cm, 幅2-3.5 cm, 幼時は地中生あるいは半地中生で淡紅色, 空気に触れると赤紫色～紫色となる。菌蕾の殻皮は、外皮, 中皮および内皮の3層からなる: 外皮は平滑だが、下部では不明瞭な網目状, 膜質で薄く剥がれやすい。中皮は粘性のあるゼラチン層で、特に基部では赤紫色～赤ワイン色の液体を満たす。内皮は半透明～淡白色の膜質で非常に薄く、グレバの表面を覆う。菌蕾が成熟すると托が伸長し、菌蕾の外皮と中皮は托の基部に袋状のツボとして残るが、内皮は消失する。托は菌蕾から1本生じ、高さ10-12 cm, 上部の径1.5-2 cm, 膨大部の径2-2.5 cm, 基部に向かい徐々に細くなり、円筒状でやや紡錘形を呈する。托の頂部はリング状の蓋をかぶせたような白色～薄紫色の被膜に覆われ、のち中央部は内側に陥入し外縁部が残る。托の壁は卵白色～クリーム色, 泡沫状で中空, 径1.5-3.5 mmの多数の小孔を有する。かさは釣鐘形, 高さ2.5-3 cm, 頂部は截断状, 托が伸長すると、グレバに覆われた卵白色～クリーム色で粗く隆起した網目が露呈する。グレバは粘液状で、托が伸長し成熟すると緑褐色～黒褐色, 刺激臭を発し、時間の経過とともに臭いはより強くなる。担子胞子 (Fig. 2) は円筒形～楕円形, 3.5-5 × 1.5-2 μm, 光学顕微鏡下では表面は平滑, 淡白色～淡黄色, 厚壁。

供試標本：新潟県長岡市寺泊野積, コウボウムギ・ハマニガナ群落内の砂地, 2015年10月31日, 丸山隆史・布施公幹採集, KCM-K001 = TNS-F-70036. Specimen examined: Japan, Niigata Pref., Nagaoka-shi, Teradomari, Nozumi (N37°41'03", E138°46'50"), ca 6.0 m alt., on sand among the community of *Carex kobomugi* Ohwi and *Ixeris repens* (L.) A. Gray in the coastal dune, October 31, 2015, coll. T. Maruyama and K. Fuse, KCM-K001 = TNS-F-70036.

### 2. 系統解析

新潟県産アカダマスッポントケを含むスッポントケ科菌類のITS領域を用いて最節約法による系統解析を行った結果, 733 サイトから構成されるITS領域の部分配列のうち98 サイトに変異があり, それらは最節約法における系統学上, 有用な情報であった。PAUP\* ver. 4.0b10を用いた最節約法による解析では, 160 ステップからなる5個の系統樹が得られた (CI = 0.7600, RI = 0.8542, RC = 0.6492)。この解析の結果, 日本 (新潟県・北海道), パキスタンとアメリカ合衆国産のアカダマスッポントケは同一のクレードを形成した (Fig. 3)。また, このクレードの単系統性は最節約法のブートストラップ値で強く支持された (Fig. 3)。

LSUのデータセットを用いて同様に最節約法による解析を行った結果, 602 サイトから構成されるLSUの部分配列のうち38 サイトに変異があり, それらは最節約法における系統学上, 有用な情報であった。PAUP\* ver. 4.0b10を用いた最節約法による解析では, 63 ステップからなる10個の系統樹が得られた (CI = 0.6912, RI = 0.8264, RC = 0.5712)。この解析の結果, 日本 (新潟県・北海道) およびアメリカ合衆国産のアカダマスッポントケは同一のクレードを形成した (Fig. 4)。また, このクレードの単系統性は最節約法のブートストラップ値で強く支持された (Fig. 4)。

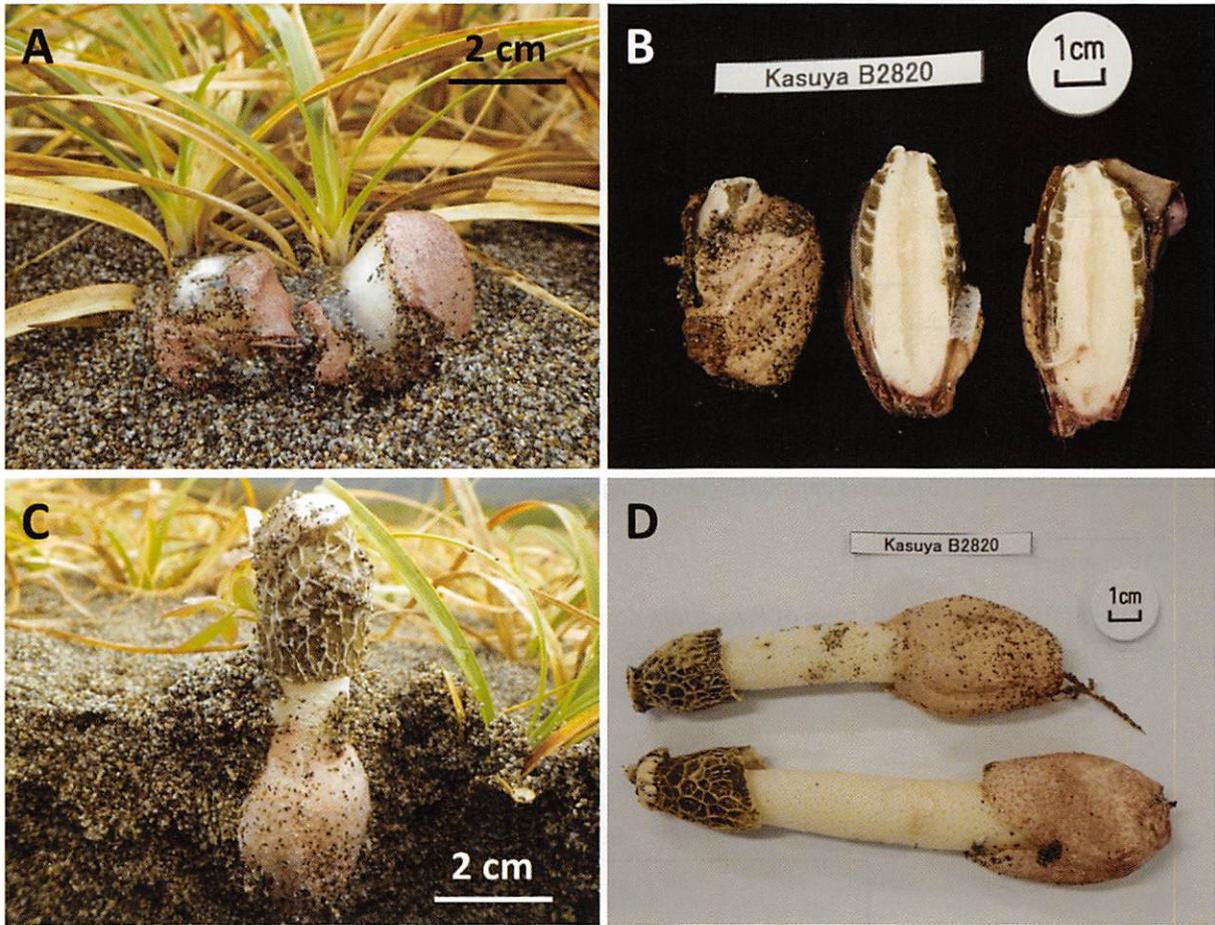


Fig. 1. Basidiomata of *Phallus hadriani* (KCM-K001 = TNS-F-70036). A. Two immature basidiomata having reddish purple egg on sand among the community of *Carex kobomugi*. B. Vertical sections of immature basidiomata. C. A mature basidioma on sand among the community of *C. kobomugi*. D. Two mature basidiomata.

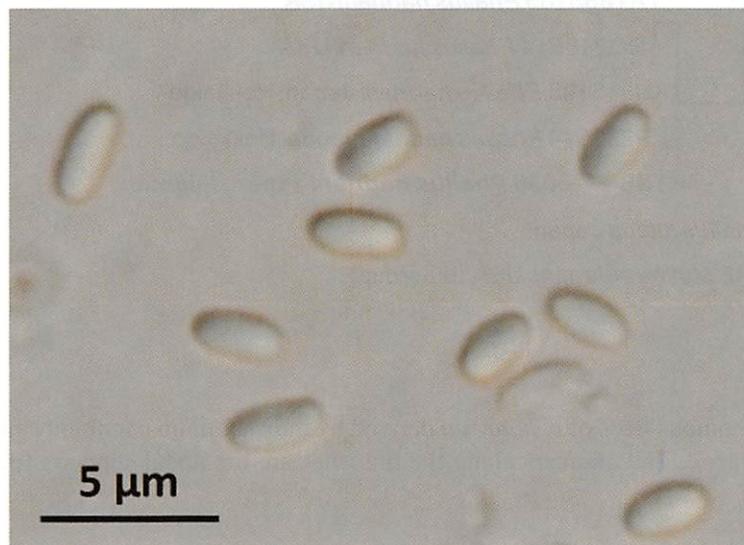


Fig. 2. Basidiospores of *P. hadriani* under the light microscope (KCM-K001 = TNS-F-70036).

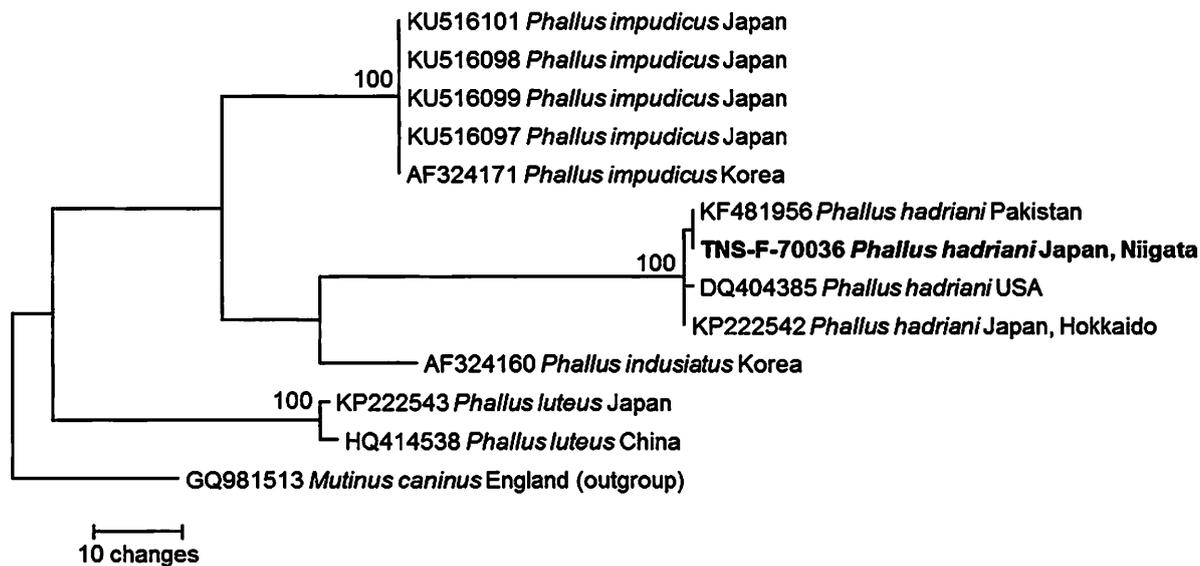


Fig. 3. One of five parsimonious trees of *P. hadriani* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA ITS region. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

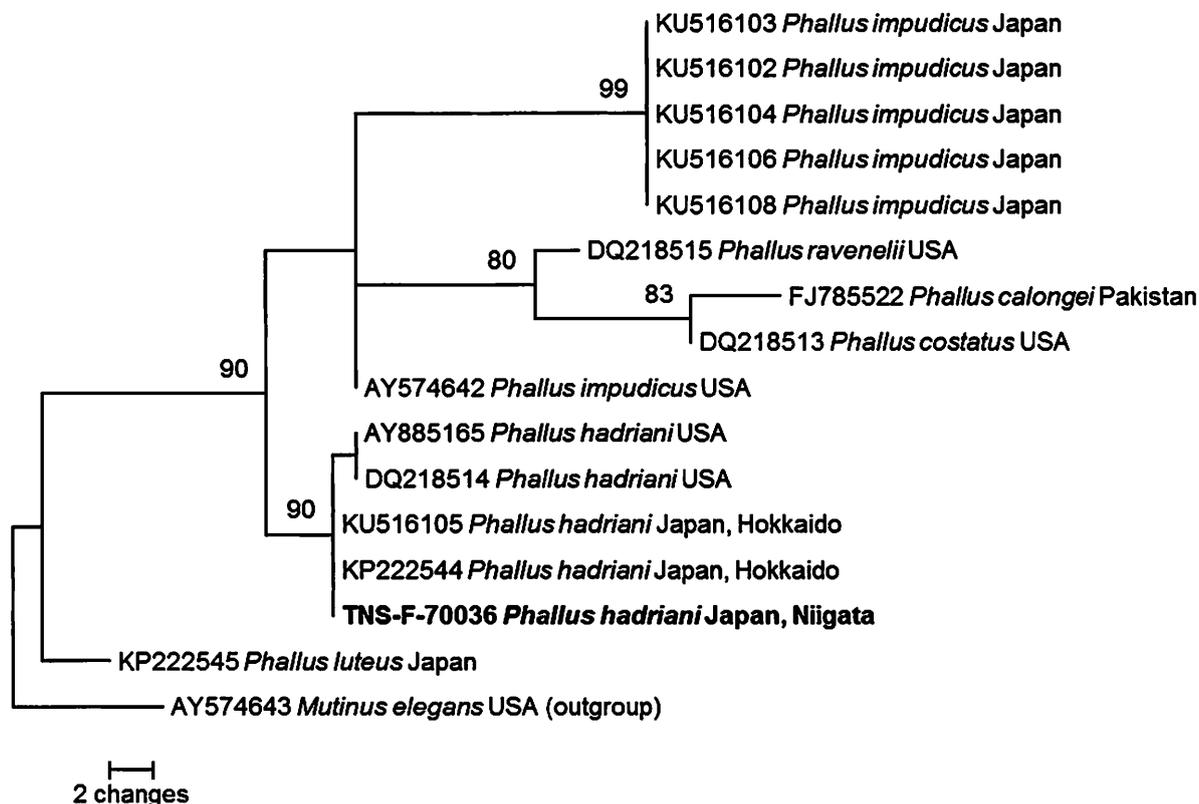


Fig. 4. One of 10 parsimonious trees of *P. hadriani* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA large subunit gene. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

## 考 察

本種は形態的に、菌蕾が空気に触れると速やかに赤紫色～紫色に変色するという点により特徴づけられる(糟谷ら, 2007, 2015)。新潟県産標本の形態的特徴は、これまでのアカダマスッポントケの記載(Andersson, 1950; Breitenbach & Kränzlin, 1986; Eckblad, 1955; 糟谷ら, 2007, 2015; Long & Stouffer, 1948)とよく一致した。このため筆者らは、新潟県産標本を形態的特徴に基づきアカダマスッポントケと同定した。また、ITS領域とLSUを用いた系統解析の結果、新潟県産標本は北海道、パキスタンやアメリカ合衆国産のアカダマスッポントケと単系統群をなすことが明らかとなった(Figs. 3-4)。このように、新潟県産標本はアカダマスッポントケであることが分子系統学的にも支持された。

なお、日本に広く分布するスッポントケはアカダマスッポントケと形態的に類似するが、前者は菌蕾が白色で、空気に触れても変色しない点などの違いがあり(糟谷ら, 2007, 2015)、アカダマスッポントケとは形態的に識別可能な別種であると考えられる。ITS領域とLSUを用いた系統解析の結果からも、両種はそれぞれ異なるクレードに位置し(Figs. 3-4)、異なる種であることが示された。

日本では、アカダマスッポントケは北海道の海浜における分布が詳しく報告されている(糟谷ら, 2007, 2015)。本州では過去に東京都(川村, 1954)および新潟県新潟市(松田ら, 1980; 松田, 1981)で発生したという記録はあるものの、証拠標本が残されておらず、詳しい形態的・生態的特徴も報告されていなかった。本研究は、本州における証拠標本を伴ったアカダマスッポントケの初の確実な記録であり、今回明らかとなった新潟県長岡市の発生地は、日本における本種の分布西限である。

本種は砂地、特に海浜に多く発生することが世界的に知られている(Andersson, 1950; Eckblad, 1955)。供試標本は、日本海に面する新潟県長岡市の、コウボウムギやハマニガナが繁茂する海浜で採集された。北海道でも同様の海浜から採集されており(糟谷ら, 2007, 2015)、本種は日本では亜寒帯から暖温帯にかけての降雪地域の海浜を中心に分布していると考えられる。なお、日本では自然で良好な海浜環境が開発により急激に減少・悪化しているため、アカダマスッポントケは今後消滅する可能性が危惧されている(吹春・糟谷, 2010)。このため、今後も新潟県における本種の分布状況の調査を継続し、より詳細な分布や子実体発生の消長を明らかにしていく必要がある。

## Abstract

*Phallus hadriani*, a rare phalloid fungus, was collected from the coastal dune of Nozumi, Teradomari, Nagaoka-shi of Niigata Prefecture at October 2015. This maritime Basidiomycete was rediscovered from Honshu since 1981, with the voucher specimen certainly identified. This report contains a description of *P. hadriani* and illustrations of its morphological characteristics based on a specimen collected from Niigata Prefecture. By the maximum parsimony analyses of the nuclear rDNA ITS region and the nuclear rDNA large subunit gene, *P. hadriani* samples collected from Japan (Niigata and Hokkaido), Pakistan and United

States were placed within the same well-supported clade. Therefore, the specimen collected from Niigata Prefecture was identified as *P. hadriani* with supports of morphological observations and phylogenetic analyses.

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、野外調査に際してご協力いただいた新潟大学教育学部の下保敏和氏、下保有紀子氏、ならびに分子生物学実験に際してご協力頂いた国立科学博物館植物研究部の南京沃氏に深謝いたします。

## 文 献

- Andersson, O. 1950: Larger fungi on sandy grass heaths and sand dunes in Scandinavia. *Botaniska Notiser Supplement*, 2, 1-89.
- Breitenbach, J. & Kränzlin, F. 1986: Fungi of Switzerland. Vol 2. Non gilled Fungi. 412 pp. Verlag Mykologia, Luzern.
- Eckblad, F. E. 1955: The Gasteromycetes of Norway. The epigaeal genera. *Nytt Magasin for Botanikk*, 4, 19-86.
- Edgar, R. C. 2004a: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797.
- Edgar, R. C. 2004b: MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 113.
- 吹春俊光・糟谷大河. 2010: アカダマスツポントケ. 環境省自然環境局野生生物課 (編), 改訂レッドリスト付属説明資料 菌類. p. 6. 環境省自然環境局野生生物課, 東京.
- Hall, T. A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hosaka, K. & Castellano, M. A. 2008: Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B*, 34, 161-173.
- Hosaka, K., Kasuya, T., Reynolds, H. T. & Sung, G. H. 2010: A new record of *Elaphomyces guangdongensis* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Fungi) from Taiwan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B*, 36, 107-115.
- Kasuya, T., Hosaka, K., Uno, K. & Kakishima, M. 2012: Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*. *Mycoscience*, 53, 411-426.
- 糟谷大河・竹橋誠司・山上公人. 2007: 日本から再発見された3種のスツポントケ属菌. *日本菌学会会報*, 48, 44-56.
- 糟谷大河・都野展子・橋屋誠・黒川悦子・宇野邦彦・保坂健太郎. 2013: 石川県小松市においてナガエノスギタケの発生により確認されたコウベモグラの営巣例, および日本産ナガエノスギタケの系統的位置に関する知見. *小松市立博物館研究紀要*, 47, 23-34.
- 糟谷大河・内田暁友・保坂健太郎. 2015: 北海道東部の海浜から新たに発見されたアカダマスツポントケ. *知床博物館研究報告*, 37, 13-19.
- 川村清一. 1954: 原色日本菌類図鑑第6巻. 90 pp. 風間書房, 東京.
- Long, W. H. & Stouffer, D. J. 1948: Studies in the Gasteromycetes XVIII. The phalloids of the Southwestern United States. *Lloydia*, 11, 60-76.
- 松田一郎・酒井修一・伊藤尚威. 1980: 新潟県産キノコ類目録. *新潟県生物教育研究会誌*, 15, 1-19.
- 松田一郎. 1981: 新潟県のキノコ. 290 pp. 新潟日報事業社, 新潟.
- Seutin, G. B., White, N. & Boag, P. T. 1991: Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 82-90.
- Swofford, D. L. 2002: PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony and other methods (\*PAUP version 4.0 beta 10). Sinauer, Sunderland.
- Vilgalys, R. & Hester, M. 1990: Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 4238-4246.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. W. 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds.), *PCR protocols*. pp. 315-322. Academic Press, New York.