

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960485

氏名

瀬戸健介

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ミシガン大学 (国名: 米国)
2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
ツボカビの比較ゲノムクスから迫る真菌類の起源・初期進化
3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名: University of Michigan
部局名: Department of Ecology and Evolutionary Biology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1) 藻類寄生性ツボカビのゲノム解析および比較ゲノムクス

近年、ゲノムデータを用いて真菌類の進化を解き明かす試みが多数なされている。具体的には、200 以上の遺伝子を用いた大規模な系統解析 (ファイロゲノムクス) や機能遺伝子の系統間比較による真菌類の形態・生態の進化の考察 (比較ゲノムクス) といったアプローチがある。しかし、このような手法による研究は、担子菌、子囊菌などの派生的な真菌類において盛んに行われている一方、ツボカビを含めた基部系統群についてはゲノムデータの不足から十分な解析結果が得られていない。特に、培養が困難である寄生性ツボカビのデータが著しく不足しており、真菌類基部系統群の系統進化研究における大きな障壁となっている。本研究課題では、独自に確立してきた藻類寄生性ツボカビの二員培養株を材料とし、そのゲノム解析に取り組んだ。ここでは、珪藻寄生性の *Pendulichytrium sphaericum* (Chytridiales)、*Zygothlyctis* (Zygothlyctidales) の 3 種 4 株、緑藻寄生性の *Zygorhizidium willei* (Zygorhizidiales)、*Collimyces mutans* (Rhizophydiales) の 6 種 7 株を対象とし、その比較ゲノム解析を行うことで、ツボカビ門内における寄生性ツボカビの進化を明らかにすることを目的とした。

藻類寄生性ツボカビのゲノム解析における課題は、対象とするツボカビとその宿主の分離および培養株に混入しているバクテリア類の除去である。これらについて、1) ゲノムシーケンス前の細胞の分離、2) ゲノムシーケンス後のバイオインフォマティクス技術によるデータ処理の 2 点により解決を目指した。1) については、1-1) フローサイトメトリーによるツボカビの遊走子の分離、1-2) 超音波処理による細胞破碎後のツボカビの遊走子囊の分離の 2 点を試みたところ、後者の方法で良好な結果が得られた。分離した遊走子囊について、市販のキットを用いて DNA 抽出および MDA (Multiple Displacement Amplification) による全ゲノム増幅を行った。得られた DNA サンプルについて、UMICH Advanced Genomics

Core の受託シーケンスに外注し、Illumina NovaSeq による全ゲノムシーケンスを行った。シーケンスデータについて、配列のクオリティトリミング後アセンブルを行い、ドラフトアセンブルを得た。ドラフトアセンブル内の rDNA 配列を調べたところ、低カバレッジながらもバクテリアの混入があることが判明したため、受入研究室にて開発されたツール (SCGid, Amses et al. 2020, *Bioinformatics* 36: 1994-2000) を用い、バクテリア由来の配列を除去した。以上の解析により、総塩基数約 11~21 Mb の藻類寄生性ツボカビのドラフトゲノム配列を得ることができた。特に、ツボカビ門の中でも寄生性に特化した目に属す *Zygorhizidium* の 3 種 (約 11~12 Mb)、*Zygorhizidium willei* (約 13 Mb) のゲノムサイズは、これまで報告されてきたツボカビ類のゲノム (20~60 Mb) と比べ極端に小さいことが分かった。

藻類寄生性ツボカビの系統的位置を解明するために、得られたドラフトゲノムデータを用いたファイロゲノミクス解析を行った。これまでの藻類寄生性ツボカビの分子系統解析は、rDNA 領域のみの解析に留まっており、配列の系統シグナルの不足のため十分な精度が得られていなかった。そこで、本研究で得られたデータに加え、既存のゲノムデータや受入研究室にて解読されたツボカビのデータを含めた 55 タクサのデータセットを構築し、431 遺伝子のアミノ酸配列に基づく分子系統解析を行った。その結果、解像度の高い系統樹を得ることに成功し、それぞれの藻類寄生性ツボカビの系統的位置を定めることができた。

現在、得られた藻類寄生性ツボカビのゲノムと、既存の腐生性ツボカビのゲノムとの比較解析を進めている。一次代謝関連遺伝子のレパートリー、高等菌において知られる病原性因子の有無などに着目し、ツボカビ門内の複数系統に存在する藻類寄生性ツボカビのゲノム進化を明らかにすることを目指している。

2) 関連する研究①: シングルセル解析による寄生性菌類の網羅的バーコーディング

近年、メタバーコーディング解析により、土壌・水圏環境における真菌類の膨大な多様性が明らかになった一方、Dark Matter Fungi (DMF) と呼ばれる正体不明の菌類の存在が示された。DMF は、ツボカビ門、アフェリダ門、ロゼラ門などの真菌類の基部系統群において顕著である。DMF の配列が相次いで発見される原因の一つに、寄生性菌類の塩基配列データの不足が考えられる。特にツボカビ類において寄生性種が多数記載されているが、培養が困難であるため、塩基配列データが取得された例は限られている。そこで、真菌類基部系統群における寄生性菌類の多様性を明らかにすることを目的とし、藻類・微小動物寄生菌を対象としたシングルセル解析による網羅的バーコーディングに取り組んだ。シングルセル解析技術を用いることで、培養困難な菌類を対象とした DNA 解析が可能となる。

2019 年 7 月~2020 年 8 月にかけてミシガン州内の湖沼にて採集した水サンプルを倒立顕微鏡により観察し、検出した寄生菌を 1 細胞 (菌の孢子囊およびその宿主) ずつ単離した。単離細胞に対し、DNA 抽出、MDA による全ゲノム増幅、真菌類特異的プライマーによる PCR、Nanopore MinION あるいは Sanger 法によるシーケンシングを行った。合計 254 細胞を単離し、うち 206 細胞を対象とした DNA 解析を行った結果、108 細胞について真菌類の塩基配列の取得に成功した。分子系統解析の結果、これらはコウマクノウキン門の 2 OTU (Operational Taxonomic Unit)、ツボカビ門の 33 OTU、アフェリダ門の 5 OTU、ロゼラ門の 7 OTU、門所属不明の 3 OTU の合計 51 OTU に分けられた。ツボカビ門内の OTU は、既知の 5 目にいずれかに属し、多くは目内の新規系統群であった。これらの結果は、真菌類基部系統群において寄生菌の多様性が見落とされてきたことを示している。

本研究の成果は 原著論文として発表予定で現在原稿の準備中である。また、成果の一部を日本菌学会第 64 回大会 (2020 年) にて公表した (大会中止により要旨登録のみの発表)。

3) 関連する研究②: 藻類寄生性ツボカビのシングルセルゲノミクス

近年、シングルセルゲノミクスの技術の発達に伴い、難培養生物のゲノム解析が行われるようになりつつある。真菌類でも、絶対寄生菌のシングルセルゲノム解析の成果が数例発表された。上述の「1. 藻類寄生性ツボカビのゲノム解析」では、確立済みの藻類寄生性ツボカビの二員培養株を用いてゲノム解析を行ったが、上記「2. 関連する研究①」で得た単離細胞を対象とした、培養を経ないシングルセルゲノム解析にも取り組んだ。

接合藻 *Micrasterias* の細胞内に寄生するツボカビ *Olpidium* sp. の単離細胞について、全ゲノム増幅サンプルを供試し、UMICH Advanced Genomics Core の受託シーケンスに外注し、全ゲノムシーケンスを行った。ゲノムアッセムブルの結果、対象とした寄生性ツボカビ、重複寄生菌および混入したバクテリア複数からなるドラフトアッセムブルが得られた。上述のツール SCGid を用いて、バクテリアゲノムの除去および、ツボカビと重複寄生菌のゲノムの分別を行い、それぞれのドラフトゲノムを得た。予備的なファイロゲノミクス解析の結果、ツボカビ *Olpidium* sp. は Rhizophydiales に属し、両生類寄生菌で知られるカエルツボカビ属を含むクレードと近縁であることがわかった。重複寄生菌はロゼラ門に属し、ツボカビや卵菌の細胞内寄生物として知られる *Rozella* 属のクレードに位置した。*Rozella* 属は、生活環中に鞭毛を有す遊走子を形成することが知られる。本研究で得られた重複寄生菌のドラフトゲノム中の鞭毛関連遺伝子のレパートリーを相同性検索により探査したところ、基本的な遺伝子のセットを全て有することが分かり、本菌が藻類寄生性ツボカビの細胞内に寄生する *Rozella* 属の一種であることが示唆された。

本研究により、これまでゲノム解析が困難であった難培養性の寄生性菌類について、シングルセルゲノム解析により一定のクオリティのゲノムデータを得る方法が確立された。現在、上記「2. 関連する研究①」で得た単離細胞のうち、興味深い系統に位置した 10 細胞についてのゲノム解析が進められており、今後これらの比較ゲノム解析を行う予定である。

4) 関連する研究③: ミカヅキモ寄生菌 *Ancylistes closteri* の培養および分子系統解析

Ancylistes とは、接合藻類ミカヅキモ (*Closterium*) あるいはネトリウム (*Netrium*) の細胞内に寄生するハエカビ亜門 (Entomophthoromycotina) の一群である。ハエカビ亜門は、主に昆虫寄生菌あるいは腐生菌を含む分類群であるが、*Ancylistes* は亜門内、さらにはその上位分類群のトリモチカビ門 (Zoopagomycota) 内で唯一の藻類寄生菌であり、ハエカビ亜門の進化を考える上で重要であると考えられる。しかし、*Ancylistes* は、1872 年の原記載以来、十数回の観察が報告されたのみの希少菌であり、現在までに塩基配列データが取得されたことがない。そこで、*Ancylistes* の再発見およびその培養および分子系統解析に取り組んだ。ハエカビ亜門は、研究課題で対象としていたツボカビ類とは異なるが、近縁な真菌類基部系統群の一つであり、真菌類の初期進化を考える上で重要な生物であるため、ここに報告する。

ミシガン州アナーバー市内の道路脇の水たまりのサンプルより、ミカヅキモに寄生した *Ancylistes* を発見した。培養試行により、菌と宿主を含む二員培養の確立に成功した。詳細な形態観察により、本菌は既知種 *Ancylistes closteri* と同定された。DNA 解析については、上記の「3. 関連する研究②」で述べたシングルセルゲノミクス解析を、*Ancylistes* の菌体のみを含む感染末期のミカヅキモ細胞に対し適用し、全ゲノム解析を試みた。ゲノムアッセムブルの結果、十分なクオリティのドラフトゲノムを得ることができなかったが、rDNA 領域の配列を得ることに成功した。本配列を用いて分子系統解析を行った結果、*Ancylistes closteri* がハエカビ亜門の基部系統に位置することが判明した。その後、寒天培地を用いた分生子形成の誘導およびその収集方法の開発し、*Ancylistes* の純粋な DNA サンプルの取得に成功し、これを用いたゲノム解析を試みた。その結果、十分なクオリティのドラフトゲノムを得ることに成功した。*Ancylistes* の新規ドラフトゲノムを含めたファイロゲノミクス解析 (452 遺伝子、49 タクサ) を行った結果、rDNA 領域の系統解析と同様の系統的位置をより高い精度で示すことができた。

現在、他の系統群、特に昆虫寄生性のハエカビ類、菌寄生性あるいは微小動物寄生性のトリモチカビ類との比較ゲノム解析が進行中である。本成果の一部は、2020 Meeting of the Mycological Society of America (2020 年 7 月) のポスター発表にて公表した。

5) 関連する研究④: エリー湖の寄生性ツボカビのバーコーディングおよび培養

Great Lakes Institute for Environmental Research (GLIER) および Bowling Green State University と共同で、エリー湖の冬季の珪藻ブルームにおけるツボカビ類の生態に関する研究に着手した。本共同研究内で、1) 珪藻寄生性ツボカビの培養株の確立、2) エリー湖の珪藻ブルームに発生するツボカビ類の網羅的バーコーディングを担当した。

1) では、2019 年 4 月のサンプルより、珪藻ブルームの優占種の 1 種 *Stephanodiscus binderanus* に寄生するツボカビを発見し、その二員培養株の確立に成功した。形態観察および分子系統解析の結果、本ツボカビは未記載種であることが分かった。確立された培養株 (KS116 株) は、Bowling Green State University にて、環境要因とツボカビの感染の関係の解明を目的とした生理学的実験に用いられた。また、KS116 株は、上記の「藻類寄生性ツボカビのゲノム解析および比較ゲノミクス」における、新規ゲノム解析の材料としても用いた。

2) の解析は、「2. 関連する研究①」で述べたシングルセル解析によるバーコーディングの一貫で行った。その結果は上述の結果に含まれる。

6) 関連する研究⑤: イカダモの大量培養に発生した寄生菌アフェリダ類の培養および同定

近年、微細藻類を用いたバイオ燃料や有用物質の生産が多数試みられている。特に、バイオ燃料の生産は次世代バイオ燃料として注目されている。しかし、微細藻類を屋外で大量培養する過程で混入する寄生生物などが藻類の収量に影響し問題となっている。アフェリダ類は、藻類の細胞内に寄生するツボカビ類と似た真菌様生物である。現在までに、アメリカ、ロシア、中国において、イカダモ (*Scenedesmus*) などの微細藻類の大量培養系にアフェリダが発生し、培養槽がクラッシュした例が報告されており、大きな問題の一つとして認識されている。また、アフェリダ類は、ツボカビ類よりも原始的な系統に位置し、真菌類の起源を考える上で重要なグループである。

藻類培養施設において培養されていた緑藻 *Scenedesmus obliquus* および *Monoraphidium minutum* にアフェリダの感染が確認されたため、そのサンプルを入手し、培養株の確立を試みた。アフェリダと宿主 *Scenedesmus obliquus* を含む二員培養株の確立に成功し、形態観察および分子系統解析の結果、本アフェリダは既知種 *Amoebophilidium occidentale* と同定された。現在、本株は共同研究者により、宿主特異性の検討等のための実験に供試されている。また、今後、本菌のゲノム解析が行われる予定である。