

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16254

研究課題名(和文) 深在性真菌症のゲノム多様性解析

研究課題名(英文) Population genomics of pathogenic fungi

研究代表者

松前 ひろみ (Matsumae, Hiromi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00735681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：木材腐朽菌であり、深在性真菌症の原因真菌のキノコ・スエヒロタケの日本産株の全ゲノムと転写産物を解析した。核酸抽出系も確立していなかったため、DNA及びRNA抽出系の確立も目指した。DNA抽出では安定的にMinIONとショートリードでシーケンシングできた。またRNA抽出はDNA以上に分解が早く困難であったが、最終的に高品質なRNAを抽出できた。アセンブルの品質はBUSCOで98-99%に達した。日本株のうち代表的な2株について、ゲノム支援を受け、PacBio Iso-Seqで完全長アイソフォームを取得し、遺伝子アノテーション予測を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、医学から菌学まで幅広い領域に関わる多細胞性の真菌のゲノム基盤を構築していることにある。今後、医学的には人体に定着しアレルギー症状を引き起こすようなタンパク質などの探索に利用できる。またゲノム科学において、菌類のモデル生物は単細胞性の酵母に限定されているが、スエヒロタケは培養も容易なため、多細胞性のキノコのモデル生物として最適である。さらに生態学的には野外で普遍的に観察される木材腐朽菌で、そのゲノム情報は医学を超えて活用できる可能性があり、汎用性が高いと言える。

研究成果の概要(英文)：In this project, we analyzed whole genome sequences and full-length transcripts of mushroom-forming fungi, *Schizophyllum commune* known to be Allergic bronchopulmonary mycosis in humans.

We built DNA and RNA extraction methods for this species. We obtained high-quality DNAs from Japanese strains and sequenced the DNAs using MinION and short-read sequencers. RNA of the fungi was more unstable than DNA, but finally, we obtained high-quality RNAs for NGS.

We selected two strains from the Japanese strains as reference genomes to enrich gene annotation because this fungus showed the highest genetic diversity among the known species in the world. BUSCO scores of the assembled genomes reached 98-99%. We built gene annotations on the assembled genomes using PacBio/Iso-seq supported by Platform for Advanced Genome Science.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノム解読 遺伝的多様性 医真菌 木材腐朽菌 バイオインフォマティクス de novo assembly Iso-Seq キノコ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) は、担子菌門ハラタケ目に属する木材腐朽菌と知られるキノコで、日本を初めとして南極以外の世界各地でごく自然に見られる。培養が容易なため、化合物スクリーニングなどさまざまな菌研究の用途に用いられてきた。ゲノム科学的には、アメリカの菌株のドラフトゲノムが 2010 年に JGI によって解読されており、染色体数 14、ゲノムサイズ 38.5Mb であることが分かっている (Ohm et al, Nat Biotechnol. 2010;28: 957-963)。その後の欧米の株を NGS で解析した報告では、既知の生物の中で、最も高い遺伝的多様性をもつという進化的に興味深い特徴をもつことが分かっている (Baranova et al, Mol. Biol. Evol. 2015;32: 2775-2783)。また稀ではあるもののヒトの病気と関連があり、深在性真菌症の 1 つであるアレルギー性気管支肺真菌症の原因真菌として知られ、特に日本などの東アジアでの報告数が多い。そこで、日本のスエヒロタケのゲノムを解読し、欧米で報告されている同種のゲノムと比較することで、特定の遺伝型をもつ菌株が発病に関与するかどうかといった基礎的な背景をゲノム科学から明らかにする。

2. 研究の目的

日本の患者から分離された臨床分離株および、野外で採取された野生分離株のゲノムを解読し、「病気になりやすい株」があるのかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サンプル

臨床分離株は千葉大学真菌医学研究センターより譲渡を受けた。野生分離株は細矢剛博士 (国立科学博物館) らが、全国から収集・単孢子分離した一次菌糸株を用いた。

(2) ゲノム解析

遺伝的多様性の高いゲノムの解析精度を高めるため、いくつかの工夫を施した。まず、ゲノム解析は、リシーケンス解析ではなく、ロングリードの次世代シーケンサー (NGS) を使った de novo アセンブリとした。先行研究では、多様性が高すぎるがゆえに、ショートリードでのリシーケンス解析は不適切で、de novo assembly が必要であることが示唆されている。そこでロングリードの MinION とショートリードの DNB-SEQ を併用し、菌株ごとに de novo assembly を行った。特に MinION でのゲノム解析には、高純度・高分子の DNA が必要不可欠である。菌類では多糖類などにより核酸抽出が困難なケースが多く、本研究でもスエヒロタケに特化した DNA 抽出法を探索した (松前ら、分子生物学会, 2020, ポスター発表)。

またゲノムの倍数性にも着目した。ゲノム解析では、1 倍体のゲノムを使う方がアセンブリの精度が高まる。菌類は生活史の中で核の数が異なり、1 次菌糸と呼ばれる状態が 1 倍体に相当する。本研究では、ゲノム解析にスエヒロタケの 1 次菌糸を使用した。

得られたリード配列は、コンタミ配列のチェックを行ってから、Canu を用いてアセンブリを行った。複数のパラメータを検証し、最適と思われるパラメータセットを決定した。ロングリードのみで得られたアセンブリ配列に対して、ショートリードの配列を使い Pilon でエラー補正を実施した。アセンブリの精度は、BUSCO を用いて評価した。

ゲノム支援に採択されたため、交配することを確認した臨床分離株と野生分離株を 1 つずつ選びだし、PacBio/Iso-Seq による遺伝子アノテーション予測を実施した。その際、新たに RNA 抽出法も探索した。

(3) 形質の定量解析

高い遺伝的多様性は表現型の多様性にも影響していると考えられる (例えばヒトに定着しやすい菌とそうでない菌など)。そこでゲノムに対応づける形で、1 次菌糸の形質を測る方法として、菌の生育の画像解析の検討を行った。

4. 研究成果

(1) ゲノム解析の結果

臨床分離株 1 株、野生分離株 3 株を MinION で解読した。MinION でのリード配列の N50 は当初 6.84kb であったが、その後、DNA 抽出法の改良や MinION のプロトコルの変更により、14.08kb まで伸長した。得られた MinION のリード配列をアセンブルしたところ、40~50 程度のコンティグ

にまとまることが分かった。エラー補正後の BUSCO の値は 99%程度に達し、十分な精度を得ることができた。

このゲノム配列に対して、JGI の遺伝子モデルとの間に相同性を確認したところ、identity の平均は 66%程度であった。この違いは、アメリカの株と日本の株の遺伝的な差なのか、技術的な課題なのか不明であったため、日本独自に遺伝子アノテーション予測を行うことにした。そこで、アノテーション対象を、日本の臨床分離株と野生分離株それぞれ一株ずつと決め、RNA を抽出し、転写産物の完全長アイソフォーム配列の取得を目指した。RNA の抽出には数ヶ月かかったが、最終的に PacBio でシーケンシングすることができ、遺伝子アノテーション予測に活用することができた。その結果、本研究で得られた転写産物においても株間の相同性が低いことが示され、欧米の先行研究で報告された高い遺伝的多様性について、日本のスエヒロタケでも支持することとなった。遺伝子アノテーション予測は単年度では終了しなかったため、今後も継続する予定である。

(2) 形質の画像解析の結果

高い遺伝的多様性に対応する形質の測定として、菌株の画像解析を行った。核酸抽出に苦戦して培養を繰り返すうちに、菌株毎に増えやすい株、DNA が取れやすい株などの特徴があることに気付いたため、合計 6 株に対して 4 条件(1 条件につき 5-6 replicates)で培養し、ImageJ で株毎の特徴を定量的に分析する系を新たに立ち上げた。その結果、培養条件によって株特有のパターンが見えてきた。今後も、より多くの菌株特有の特徴を正確に捉えるような画像解析を行っていく予定である。

(3) まとめ

本研究を進める中で、新たに 2 つの株を選んで日本産スエヒロタケのリファレンスゲノムを構築する機会に恵まれた。2 つの株間から多様性の高さが示唆された。リファレンスゲノムを決めるにあたり、そのゲノムを持つ菌体の特徴を記述する方法として画像解析を取り入れた。今後はスエヒロタケのリファレンスゲノムを充実させた上で、国際誌へ投稿を予定している。加えて、これらのリファレンスゲノムを用いて、本来の目的であったゲノムの多様性解析も行っていく予定である。

本研究では二株に対して遺伝子アノテーション予測を行っているが、将来的に疾患に関わるような候補遺伝子が見つかってきたときに、機能探索の手助けになるだろうと考えている。本種は、種内であっても遺伝子配列の相同性も低いため、複数のリファレンスゲノムがあれば、解析の技術的問題によるものなのか、本当に相同性が低いのか、利用者にとって見極める手がかかりとなりうるだろう。

さらにこのようなゲノム基盤の構築は、スエヒロタケの研究のみならず、様々な菌類を対象にしたゲノム研究に貢献できると考えている。なぜならば、ゲノム科学の文脈で菌類のモデル生物と言えば単細胞性の酵母であり、スエヒロタケのような多細胞性で身近な菌類のゲノム基盤は、動物や植物に比べると十分に整備されているとは言えないからである。分類学的に見ても菌類は、推定で陸上植物の 6 倍以上の種数をカバーするにも関わらず、93%の種が科学的に未同定・未発見であり、生物界のダークマターと言われるほどである(Royal Botanic Gardens, Kew, State of the world's fungi, 2018)。多くの菌類は難培養性で、研究すら困難である。ゲノムが解読されている菌の多くは、培養が容易だったり、人間社会にとって有用・有害な微生物か、食用可能なキノコである。スエヒロタケは、ヒトの疾患に関わるものの、野外での本来の役割(森林の分解者)である。培養が容易で普通種であるスエヒロタケは、多細胞性の菌類のモデル生物として利用価値が高いといえよう。

ただ単にゲノムを読むだけではなく、形質という生物の実態を定量化し記述することは、進化などさまざまな現象を測るための大事なステップである。担子菌類を対象とした画像の定量解析は細菌や植物などに比べると少ないため、本研究で得た経験を元に手法を改善するなどして、より盤石な手法に磨き上げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松前ひろみ、鎗田響子、仲里猛留、横山圭子、Lucas Mohn、坂智広、清水健太郎、今西規、亀井克彦、細矢剛
2. 発表標題 真菌・担子菌類スエヒロタケの全ゲノム解析のためのgenomic DNA抽出法の比較
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松前ひろみ
2. 発表標題 バイオインフォマティクスから見た Museomics: 博物館における 『生き物のモノとコト』 の研究と展望
3. 学会等名 バーチャル研究会 生物多様性のDNA情報学-自然の計測と生命の理解のために
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松前ひろみ
2. 発表標題 菌類で進化研究のためのゲノム基盤を構築する
3. 学会等名 第6回ユニーク会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	細矢 剛 (Hosoya Tsuyoshi) (60392536)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------