

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82617

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657042

研究課題名(和文)地衣類を構成する共生菌および共生藻に生じる形質変化と遺伝子発現

研究課題名(英文)Gene expression with phenotypic changes in the lichen mycobiont and photobiont

研究代表者

大村 嘉人(OHMURA, Yoshihito)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：40414362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：地衣類は、菌と藻の共生によって形態的・生理的に特殊な性質を獲得した生物である。しかし、地衣類の共生現象においてどのような遺伝子が発現しているのかについてはほとんど分かっていない。本研究では、地衣類の野外サンプルおよび培養株を材料として、共生によって生じる生理的・形態的变化に伴うmRNAの発現を次世代シーケンサー等の活用によって解析し、共生現象に関連する遺伝子発現の探索を行った。その結果、乾湿条件での遺伝子発現の違いや共生・脱共生状態によって形態が変わる共生藻について知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Lichen is a symbiotic organism composed of fungus and alga (and/or cyanobacterium). The morphological, ecological and physiological natures of lichens are fundamentally designed by the results of symbiosis. Gene-expressions related to the symbiosis of lichens, however, have been poorly understood. This study intended to explore which genes are involved to lichen symbiosis using a next generation sequencer, and to study gene expressions in morphological transformations of lichen photobiont. As the results, we found the differences of gene expressions related to protein or nitrogen-compound synthesis pathway between dry and wet conditions of natural thalli. The photobiont of *Botryolepraria lesdainii* was newly identified as *Sticococcus mirabilis*. Morphology of this alga is proved to be spherical with symbiotic condition in the field and elongated with non-symbiotic condition in a culture. The mRNA were extracted from both conditions and will be analyzed in the further researches.

研究分野：植物分類学

キーワード：地衣類 共生 進化 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

地球上には約 1000 万種の生物がいると見積もられている。これらの生物は現在見られるような姿に単独で進化してきたわけではなく、異なる生物同士が互いに関係を持ちながら進化を遂げてきた。生物間の相互作用には、被食 - 捕食の関係、競争関係、共生関係などがある。この中でも共生関係では、異なる生物同士が形態的・生理的な形質を分化させるなどして生育環境に巧みに適応し、進化的に高度な関係を構築している。共生生物の例として知られる地衣類は、菌類と藻類とが安定した地衣体を作って両者の間で栄養の授受を行い、形態的・生理的にも特殊な分化が起こることが知られている。菌・藻が地衣類となること(地衣化)によって、一般に次のような変化が生じることが知られている。

地衣体の形成：葉状体や樹枝状体などの地衣体を形成し、背腹性または内部構造の分化が起こる。共生藻類の形態変化：培養時と比べて矮小化したり、自然状態からの形状変化が起こる。二次代謝産物の産生：共生菌類が単独では生産しない二次代謝産物を大量に作り、それらによって乾燥や紫外線などに対する耐性、抗細菌などの性質が獲得されている。以上のような共生によって引き起こされる形質変化により、地衣類は極域や砂漠などの極限環境にも適応できる特殊な性質を獲得しているのである。地衣類が維管束植物などよりも早く 6 億年以上前には陸上進出に成功していたのは、それらの共生によって獲得された性質のためだと考えられている。このように地衣類は、「共生」をキーワードとした進化研究の材料として非常に興味深い材料であるにも関わらず、国内外でほとんど研究が進んでいないのが実情である。その理由としては、培養による再合成実験に熟練した技術を必要とすることや、化学成分分析や遺伝子解析など高度な実験技術や設備を伴うことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

本課題では、地衣類を構成する菌および藻に生じる形質変化に関わる遺伝子発現を明らかにするために、次の3つのサブテーマについて実験を行う。野外サンプルを用いて、生理活性の高い状態と低い状態でどのような遺伝子発現の違いが見られるのか調べ、共生体として自然界の中で起こっている遺伝子発現について明らかにする。サルオガセ由来の培養株を用いて、単独 - 共生状態の菌類側の遺伝子発現の違いを明らかにする。共生状態で矮小化や形状が顕著に変化する藻類に着目し、共生状態 - 単独での藻類側の遺伝子発現の違いを明らかにする。それらの遺伝子解析は、サブトラクション法および次世代シーケンサーによる解析で実施する。

## 3. 研究の方法

(1) 野外の地衣体における湿潤時と乾燥時の遺伝子発現の違い

地衣類は、光照射下において湿潤時に光合成や呼吸などの生理活性が高く、乾燥すると生理活性がほとんど停止状態にまで低くなることが知られている。一方、地衣体の成長のためには乾湿のサイクルが必要であり、常に湿潤状態となっている培養条件下において多くの種で再合成がうまくいかないのは、乾湿サイクルの欠如が理由の一つである。このように、乾湿サイクルが地衣類の生理的活動および成長などの形態形成に及ぼす影響は非常に大きく、これに伴って遺伝子発現の違いが見られることが予想される。言い換えれば、地衣類は乾湿サイクルに適応して進化してきたグループであると言えるであろう。このことから、乾湿時にオン・オフされる遺伝子群の中に共生に関わる遺伝子が含まれる可能性が高いと考えた。そこで、野外から採集した新鮮なコフクレサルオガセ *Usnea bismolliuscula* およびハコネサルオガセ *U. hakonensis* のサンプルを用いて、湿潤時の地衣体および乾燥時の地衣体をそれぞれ光照

射下に置いたのち、両者の遺伝子発現の違いをサブトラクション法および次世代シーケンサーによって解析した。

#### (2) 地衣類の菌株、共生藻株、再合成株の遺伝子発現

野外から採集したハコネサルオガセから共生菌および共生藻をそれぞれ単離し培養株を確立した。両株を混合し、地衣体の再合成を誘導した。単独株および再合成株それぞれから RNA を抽出し次世代シーケンサーで解析を行った。

#### (3) 共生藻の形態変化と遺伝子発現

共生藻の共生状態から脱共生状態への形態変化に伴う遺伝子発現を調べるために、ツブレブラゴケ *Botryolepraria lesdainii* の共生藻を材料にして、野外の共生状態の地衣体および共生藻単離培養株からそれぞれ RNA を抽出した。共生状態の地衣体における発現遺伝子から、共生菌・共生藻が単独の時の発現遺伝子を差し引くことによって、共生菌および共生藻の共生遺伝子などが残ることになる。それらの塩基配列について相同検索を行い、共生藻の形態変化に関係する遺伝子の推定を行うことを計画した。なお、発現遺伝子の解析は他の実験と同様にサブトラクション法および次世代シーケンサーによって行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 野外の地衣体における湿潤時と乾燥時の遺伝子発現の違い

コフレサルオガセとハコネサルオガセの湿潤時と乾燥時の遺伝子発現の違いについて、得られた 2850 の遺伝子配列を BLASTX 検索によって約半数を特定した。さらに GO を用いた解析によりこれら遺伝子を関連する代謝経路ごとに分類した。見出された遺伝子は、光合成、ペントースリン酸経路、タンパク質合成、シグナル伝達に関連するものなどであった。湿潤条件と乾燥条件ではタンパク質合成系や窒素化合物合成系の遺伝子の

発現に違いが見られたが、多くの代謝系では乾湿で差が認められず、それらについては乾湿サイクル下での代謝制御が転写レベルで行われていない可能性も考えられた。

#### (2) 地衣類の菌株、共生藻株、再合成株の遺伝子発現

ハコネサルオガセから共生菌・共生藻の単離培養を行い、それぞれの培養株を混合して、発生初期段階の地衣体を再合成した(図1)。共生菌単独、共生藻単独、再合成株のそれぞれから RNA を抽出し、cDNA を作成した。



図1. 再合成株から分化したハコネサルオガセの地衣体。

サブトラクション法により菌株と再合成株との間で発現遺伝子を差し引いたもの、および藻株と再合成株との間で発現遺伝子を差し引いたものを作成し、それらについて次世代シーケンサーで解析を行い計 276323 リード得た。これらから contig を作成し、得られた発現遺伝子配列について BLASTX 検索によって解析を進めている。膨大なデータ処理のために本研究期間内で遺伝子の特定作業をすべて完了することはできなかったが、引き続き解析を行っていく予定である。

#### (3) 共生藻の形態変化と遺伝子発現

ツブレブラゴケの共生藻が、共生状態では球形であり、脱共生状態になると細胞が伸長することを予備実験および本研究で確認した(図2)。さらに、広島、群馬、東京産のツブレブラゴケから単離培養した藻類株を解析した結果、それぞれ形態的にはいずれも

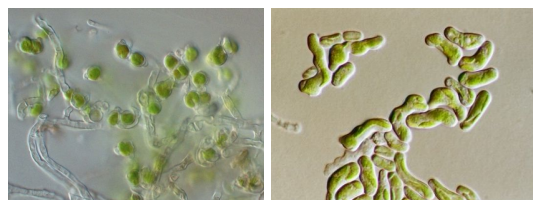


図2. 共生状態(左)・脱共生状態(右)の *Sticococcus mirabilis*。

*Sticococcus mirabilis* と同定されたが、葉緑体 *rbcL* 遺伝子にもとづく分子系統解析では2つのクレードが見いだされた。一方のクレードには *S. sequoieti* (UTEX1820) が含まれていた。*S. mirabilis* と *S. sequoieti* との関連について詳細な分類学的検討を行っている。

野生状態のツブレプラゴケ共生藻とその単離培養株から、それぞれの cDNA の作成または RNA の抽出も行った。今後、共生状態の違いによる発現遺伝子について解析していく予定である。

本課題を通して、真菌類と藻類の共生体である地衣類における遺伝子発現をサブトラクション法および次世代シーケンサー等を活用して解析する実験系を確立することができた。次世代シーケンサーそのものが開発過渡期であったこともあり、使用していた機器 (GS Junior, Roche) の性能が不十分であったことやメーカー側のマニュアルの不備等が明らかになり、期待していた研究成果を十分に得ることができなかった点は残念であった。次世代シーケンサーから得られる大量データの効率的な処理方法など課題が残るが、世界的にも最先端の研究分野に取り組んで、野外サンプル (乾湿条件) および培養サンプル (共生菌単独・共生藻単独・再合成) を用いて、共生に関わる遺伝子探索のためのデータを着実に得ることができたのは大きな成果であった。今後、次世代シーケンサーの性能および操作性の向上や大量データ解析方法の開発など、テクニカルな面は大幅に進歩するものと思われる。従って、本研究の実験系を応用することによって、より詳細な共生関連遺伝子の探索が可能になると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Frisch, A., Ohmura, Y., The phylogenetic position of *Normandina*

*simodensis* (Verrucariaceae, lichenized Ascomycota). Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B, 査読有、41 巻、2015、1-7.

Tokizawa, M., Ohmura, Y., Moon, K. H., Takeshita, S., *Sarcogyne endopetrophila* (Acarosporaceae, lichenized Ascomycota), a new species from Japan. Journal of Japanese Botany, 査読有、90 巻、2015、46-51.

Kon, Y., Ohmura, Y., Regeneration of *Pseudocyphellaria aurata* transplanted on a tree in Japan. Lichenologist, 査読有、46 巻、2014、833-836.  
DOI: 10.1017/S0024282914000450

Fedrowitz, K., Frisch, A., Kaasalainen, U., Ohmura, Y., *Nephroma squamigerum* (Nephromataceae, lichenized Ascomycota) is a distinct species. Journal of Japanese Botany, 査読有、89 巻、2014、346-354.

Ohmura, Y. *Usnea flavocardia* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota) new to Japan. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B, 査読有、40 巻、2014、69-72.

半田信司・アンドレアス フリッシュ・大村嘉人、皇居で採取されたホシゴケ目地衣類に共生するスミレモ類の単離培養による形態観察、国立科学博物館専報、査読無、49 巻、2014、219-226.

半田信司・堀口健雄・大村嘉人・樋口正信、日本新産の気生渦鞭毛藻類 *Rufusiella insignis* (Hassal) Loeblich III (グロエオジニウム科, フィトジニウム目), *Hikobia*, 査読有、16 巻、2013、311-314.

〔学会発表〕(計9件)

大村嘉人・平山裕美子・宇野邦彦・細矢剛・半田信司、降雪中に含まれる菌類・藻類のメタゲノム解析から示唆される地衣類の散布体動態、日本植物分類学会第14回大会、2015.3.5-9、福島大学(福島県・福島市)。

Ohmura, Y., Uno, K., Hosaka, K., Hosoya, T., DNA fragmentation of herbarium specimens of lichens, and significance of epitypification for threatened species of Japan. The 10th International Mycological Congress, 2014.8.3-9, Bangkok, Thailand.

河野美恵子・大村嘉人・颯田葉子、乾湿条件下での遺伝子発現の比較からみた地衣類の応答、進化学会第 16 回大阪大会、2014. 8.21-24、高槻現代劇場（大阪府・高槻市）。

河野美恵子・大村嘉人・颯田葉子、乾湿環境での遺伝子発現からみた地衣類の進化、日本遺伝学会第 85 回大会、2013.9.19-21、慶応大学（神奈川県・横浜市）。

宇野邦彦・大村嘉人、地衣類収蔵標本における DNA の経年断片化、日本植物学会第 77 回大会、2013.9.13-15、北海道大学（北海道・札幌市）。

半田信司・坪田博美・Andreas Frisch・大村嘉人・中原・坪田美保・溝淵綾・正田いずみ、地衣類に共生するスミレモ類の多様性～Trentepohlioid ですませていいの？～、第 42 回地衣類研究会大会、2013.8.31-9.1、吉和魅惑の里（広島県・廿日市市）。

河野美恵子・大村嘉人・颯田葉子、遺伝子発現から見た地衣類の乾湿応答とその進化、日本進化学会第 15 回つくば大会、2013.8.28-31、筑波大学（茨城県・つくば市）。

河野美恵子・大村嘉人・颯田葉子、コフクレサルオガゼの乾燥・湿潤状態における遺伝子発現、地衣類研究会第 41 回大会、2012.9.1-2、信州大学農学部西駒ステーション（長野県・伊那市）。

河野美恵子・大村嘉人・颯田葉子、*Usnea* 属の地衣類における乾湿サイクルと遺伝子発現の関係、日本進化学会第 14 回大会、2012.8.21-24、首都大学東京（東京都・八王子市）。

〔図書〕(計 2 件)

大村嘉人(分担執筆) ウォッチング日本の固有植物、東海大学出版会、2014、142 pp.

大村嘉人(分担執筆) 日本菌学会、新菌学用語集、2014、200 pp.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 嘉人(OHMURA, Yoshihito)  
独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹  
研究者番号：40414362

(2) 研究分担者

颯田 葉子(SATTA, Yoko)  
総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授  
研究者番号：20222010

(3) 連携研究者

奥山 雄大(OKUYAMA, Yudai)  
独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究員  
研究者番号：40522529

(4) 研究協力者

半田 信司(HANDA, Shinji)  
近 芳明(KON, Yoshiaki)  
河野 美恵子(KONO, Mieko)