

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06801

研究課題名(和文) 異数化が関与すると推定される“無性時代”酵母の多様性獲得の仕組みの解明

研究課題名(英文) How does an anamorphic yeast acquire species diversity?

研究代表者

高島 昌子 (Takashima, Masako)

東京農業大学・その他部局等・特命教授

研究者番号：20333304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Trichosporonales目(担子菌ハラタケ亜門)は真菌症の起病因菌を含む一方で、油糧酵母として囑望される株も含む活性の高い分類群である。本菌群においては未だ有性生殖は報告されていないことから、当該研究ではその高い活性や種多様性を如何にして取得してきたかを探ることを目的とした。Cutaneotrichosporon cavernicola複数株のゲノム解析を行ったところ、本菌群はヘテロザイガスゲノムを有する株1株とその両親に極めて近縁な株から成ると推定された。これらの菌群は染色体レベルのゲノムデータと株の両方がそろっており、今後種内多様化や種分化研究のモデルとなると期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出芽や分裂によって増殖する酵母は、系統学的には子囊菌門および担子菌門の両方に存在する極めて多様な菌群である。一方、酵母の既知種の半数以上は有性生活環が知られていない“無性時代”である。それでは“無性時代”酵母は単にクローンとして細胞分裂を繰り返し、突然変異の蓄積だけで、これほど広範な多様性を獲得してきたのだろうか？本研究により、この問いに対する研究遂行に資するための酵母菌株と染色体レベルのゲノム情報の両方が整ったデータセットが得られた。

研究成果の概要(英文)：Trichosporonales (subphylum: Agaricomycotina; phylum: Basidiomycota) is a taxon which includes causative agents of both deep-seated and superficial mycoses, as well as strains that have high potential as oleaginous yeasts, indicating the high metabolic and functional activity of this taxon. As teleomorphs have not yet been reported in this group, this study was conducted to clarify the reason behind this high activity. Chromosome-level genomic information from Cutaneotrichosporon cavernicola strains indicate that one strain has a heterozygous genome, and the other strains presumably include the parental genomes of the heterozygous genome strain. We suggest that this group of strains is a suitable model for future studies of intraspecific or interspecific hybridization and for speciation research.

研究分野：Yeast taxonomy

キーワード：Cutaneotrichosporon species taxonomy

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の蓄積に伴って、*Saccharomyces* 属等発酵や醸造に用いられている種の domestication や、*Candida albicans* の異数化による薬剤耐性の獲得などといった、環境への適応のために、ゲノム構造の変化や進化が起きていることがわかってきた。我々も以前 Trichosporonales 目 (担子菌類ハラタケ亜門) において *Trichosporon coremiiforme*, *T. ovoides* および *Cutaneotrichosporon mucoides* にハイブリッドゲノム株があることを報告した (Sriswasdi et al. 2016. Genome Res. 26: 1081-1090; Takashima et al. 2018. Yeast 35: 99-111)。また、本目には他の種でもゲノムサイズが大きい株があることが複数の研究者によって明らかにされている。

Trichosporonales 目は未だ有性世代は報告されておらず、また二核菌系や異核も報告されていないが、ゲノム情報が蓄積され、交配型遺伝子座についての報告が Sun et al. により行われた (Sun et al. 2019. PLoS Genet. 15: e1008365)。それによると、我々が報告した3株のハイブリッドゲノムにおいては、*T. coremiiforme* および *C. mucoides* のゲノムには2種類の交配型 (A1型およびA2型) が含まれていたが、*T. ovoides* には一つの型 (A1) が2種類存在しているとのことであった。この事実は Trichosporonales 目においても、過去に交配または接合が行われていたことを示唆している。さらに、本目の一部の系統群においては、交配型遺伝子座におけるホメオドメイン領域とレセプターの組み合わせが通常 (A1では *STE3 + SX12*, A2では *STE3a + SX11*) と逆 (A1<sup>\*</sup>では *STE3 + SX11*, A2<sup>\*</sup>では *STE3a + SX12*) になっている場合が存在することからも、他の種より交配型遺伝子座の可塑性が高いのではないかと推定されている。

研究協力者である雪真弘博士 (理研バイオリソースセンター微生物材料開発室) の協力の下、ハプロイドである *T. asahii*, *T. faecale*, およびハイブリッドゲノム株 *T. coremiiforme* の細胞周期をセルソーターにより観察したところ、3株ともピークは1つしか観察されなかったものの、*T. coremiiforme* では *T. asahii* および *T. faecale* よりも DNA 量が多い方にピークが認められた。この現象は *Cryptococcus neoformans* の二倍体では、*S. cerevisiae* に類似したようなシフトが観察されていること (Lin et al. 2005. Nature 434: 1017-1021)、また既に取得していた他のヘテロザイガスと推定されるゲノムでは、ゲノムサイズに応じて DNA 量の多い方にシフトしているが、G0/1 と G2 が観察できている、ということから、本菌群に特有なことでありと推定された。そこで我々は、Trichosporonales 目は“無性時代”とされているが、近縁な種間や同種の別株間での接合・異数化などにより、生物学的多様性を増してきており、通常の培養状態であってもそれが観察できる菌群ではないかと推定した。これまでに *Trichosporon* 属においては核型解析のデータは報告されていないが、これも研究は実施されているものの明確な結果が得られないためであり、本件も本菌群が特有の細胞周期を有することを示唆している。

## 2. 研究の目的

出芽や分裂によって増殖する酵母は、系統学的には子囊菌門および担子菌門の両方に存在する極めて多様な菌群である。一方、酵母の既知種の半数以上は有性生活環が知られていない“無性時代”である。そこで、“無性時代”酵母は単にクローンとして細胞分裂を繰り返し、突然変異の蓄積だけで、これほど広範な多様性を獲得してきたのだろうか? という問いが生まれる。これに対して、本研究では、既にハイブリッドゲノム株を報告した Trichosporonales 目 (担子菌類ハラタケ亜門) を材料として用い、菌学および分子生物学的手法によりこの多様性獲得の仕組みを多角的に探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

当初、2020年度は本目の複数の株を各種条件下で培養し、セルソーターを用いて細胞周期の観察を行う予定であったが、コロナ感染症の流行による緊急事態宣言やそれに伴う組織の措置により、特に2020年度前半は研究室に滞在できる時間が制限された。そこで、2021年度に実施予定であった *Cutaneotrichosporon cavernicola* (6株) およびその近縁種 *C. spelunceum* (1株) のドラフトゲノム解析を先に開始した。Trichosporonales 目は一般に培地上 (寒天培地、液体培養共) で「栄養細胞」「菌糸」「分節胞子」が共存して生育する。

*Cutaneotrichosporon* 属のハイブリッドゲノムであった *C. mucoides* と近縁な種であり、本目の中では他に比べて形態的にも多様で酵母細胞が多いという特徴がある。また、日本の洞窟から分離し、本科研費申請時に在籍していた明治薬科大学において同定し、新種記載を行ったわが国固有の種でもある。これを成果有体物移転契約にて東京農大に移転し、実験に供試した。

Nextseq によるドラフトゲノム解析の結果、一株のゲノムサイズが大きいことが判明したため、この株を含めた3株にロングリード解析を実施した。アノテーション情報の充実を図るべく RNAseq も行い、その後、比較ゲノム解析を実施した。

#### 4. 研究成果

ドラフトゲノム解析は、*C. cavernicola* 6株 (HIS019、HIS002、HIS471、HIS631、HIS641、HIS712) および近縁の *C. spelunceanum* 1株 (HIS016) を用いて行った。

供試した *C. cavernicola* 6株は、Illumina シーケンサーによるショートリードの解析およびナノポアによるゲノム解析の結果、5株のゲノムは約20Mbである一方、HIS712のゲノムは約40Mbと大きかった。また、*C. spelunceanum* のゲノムは *C. cavernicola* よりやや小さく約19Mbであった。そして、ゲノムサイズが大きかった HIS712 については PacBio によるロングリードの解析を実行し、品質のよい配列を得た。また、RNA-Seq に基づいたアノテーションを行い、交配型遺伝子座を調べた。その結果、全株ともに交配型遺伝子座の存在が確認された。また交配型遺伝子領域から近縁種である *C. oleaginosum* のフェロモンペプチドやフェロモンレセプターと類似度の高い配列が得られた。これらの配列を用いて系統樹を作成すると、本種は2つのグループ (HIS019、HIS002、HIS631H、IS641、および HIS471) に分かれた。また、興味深いことに、ゲノムサイズが大きかった HIS712 ではこの両方の配列を有していた。

Trichosporonales 目では、これまでに *Trichosporon* 属で2株、*Cutaneotrichosporon* 属で3株のヘテロザイガスゲノムが公開されていることから、本株もグループ とグループ の両方を有しているヘテロザイガスゲノムと推定した。

さらに、より詳細な比較ゲノム解析を行うため、グループ の代表として HIS19、およびグループ の HIS471 の2株についても PacBio によるロングリードの解析を追加し、高品質なゲノムを得た。アセンブリの結果、ほぼ染色体完全長コンティグを得ることができ、また染色体数は7本と推定された。シンテニー解析により、HIS019、HIS002、HIS631 および HIS641 の4株は概ね同様の染色体構造を持っていると考えられたが、これに対し HIS471 は、HIS019 等と比較すると20か所以上の転座・逆位といった染色体構造変化が確認できた。一方で、これら5株の菌類簡易同定の指標であるバーコード配列 (ITS 領域) は一致していた。子囊菌酵母では *Saccharomyces* 属の種間や *Candida albicans* と *C. dubliniensis* など極めて近縁な種間では、シンテニーはよく保存されていると報告されている。そこで既に種間ハイブリッドの存在が報告されている子囊菌酵母 *Saccharomyces* 属および担子菌酵母 *Cryptococcus* 属のゲノム情報を用いて比較解析を行った。その結果、ITS 配列、全ゲノム配列、染色体構造の多様化のバランスが、それぞれの属内で大きく異なっていることを見出した。このことから、本結果は、種の境界を推定する際に用いられるバーコード領域の類似度とゲノムシンテニーの関連についての新たな知見につながるものと考えられ、内容を総括し、論文として発表した。

*Cutaneotrichosporon* 属を含む Trichosporonales 目では未だ有性世代の報告はなく、*C. cavernicola* 菌群についても交配は未確認の段階であるが、ゲノム情報から交配型遺伝子座を有することは上記ゲノム解析により得られている。また、本菌群に存在するゲノムサイズの大きい株は両方の型を有しているということは、過去に交配もしくは細胞融合によってゲノムの倍加が起こったことを示唆している。現在はこれを実験室内で再現することを目指し、各種条件下で菌株を共培養し、交配によって表出すると考えられる細胞形態やゲノムサイズの変化を観察している。セルアナライザーを用いた細胞周期の観察についても、研究室内において実施できる体制を整え、培養条件や固定方法等の条件検討を行っている。

Trichosporonales 目は深在性および表在性真菌症の起因菌を含む一方で、油糧酵母として囑望される酵母も含まれ、活性の高い菌群である。我々が以前に報告したハイブリッドゲノム3株ではゲノムが既にハイブリッドゲノムになっており、親株とは別の進化をたどって一つの種となってしまうが、*C. cavernicola* においては親株に極めて近縁と推定できる段階の株が得られている。本菌群は染色体レベルのゲノムデータと株の両方がそろっており、今後種内多様化や種分化研究のモデルとなる可能性があるかと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Yuuki, Kayamori Ayane, Aoki Keita, Shiwa Yuh, Matsutani Minenosuke, Fujita Nobuyuki, Sugita Takashi, Iwasaki Wataru, Tanaka Naoto, Takashima Masako	4. 巻 24
2. 論文標題 Chromosome-level genome assemblies of <i>Cutaneotrichosporon</i> spp. (Trichosporonales, Basidiomycota) reveal imbalanced evolution between nucleotide sequences and chromosome synteny	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-023-09718-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林裕樹、栢森綺音、青木敬太、志波優、藤田信之、杉田隆、田中尚人、高島昌子
2. 発表標題 ゲノム情報に基づいた担子菌酵母 <i>Cutaneotrichosporon cavernicola</i> の種分化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栢森綺音、青木敬太、志波優、藤田信之、杉田隆、高島昌子、田中尚人
2. 発表標題 比較ゲノムによる <i>Cutaneotrichosporon cavernicola</i> の交配型遺伝子座の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuuki Kobayashi, Ayane Kayamori, Keita Aoki, Yuh Shiwa, Minenosuke Matsutani, Nobuyuki Fujita, Takashi Sugita, Wataru Iwasaki, Moriya Ohkuma, Naoto Tanaka, Masako Takashima.
2. 発表標題 Intragenomic genomic relationship and evolution of non-model Basidiomycota yeasts based on chromosome-level genome assemblies.
3. 学会等名 37th International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY37) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林裕樹, 栢森綺音, 青木敬太, 志波優, 藤田信之, 杉田隆, 岩崎渉, 田中尚人, 高島昌子
2. 発表標題 担子菌酵母Cutaneotrichosporon属ゲノムにみる塩基配列と染色体構造の変異速度.
3. 学会等名 日本菌学会第67回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林裕樹, 栢森綺音, 青木敬太, 志波優, 松谷峰之介, 藤田信之, 杉田隆, 岩崎渉, 大熊盛也, 田中尚人, 高島昌子
2. 発表標題 全ゲノム情報に基づいた担子菌酵母の変異と種分化の解析.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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	杉田 隆  (Sugita Takashi)		
研究協力者	雪 真弘  (Yuki Masahiro)		
研究協力者	田中 尚人  (Tanaka Naoto)		

6. 研究組織（つづき）

	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	小林 裕樹  (Kobayashi Yuuki)		
研究協力者	青木 敬太  (Aoki Keita)		
研究協力者	松谷 峰之介  (Matsutani Minenosuke)		

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