

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840135

研究課題名(和文)生活環・感染様式から探る藻類寄生性ツボカビ類の進化

研究課題名(英文)Evolutional study on the chytrids based on life cycle and infection manner

## 研究代表者

大田 修平(Ota, Shuhei)

東京大学・新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：20455926

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)：本研究は原始的真菌類の一群であるツボカビ類の糖鎖を認識するレクチン結合パターン、生活環や感染様式を観察し、藻類と菌類の相互作用やツボカビの進化を明らかにすることを目的とした。透過型電子顕微鏡によって細胞微細構造を調べ、タイムラプス顕微鏡による生活環の各ステージ移行過程、および、レクチンを用いた染色による蛍光顕微鏡観察を行い、生活環の各ステージにおける細胞表面の糖鎖分布について調べた。その結果、遊走子放出タイミングやレクチン結合パターンが種あるいは生活環ステージによって異なることがわかった。アミノ糖の一種 N-アセチルグルコサミンが遊走子嚢の仮根の基部に集積していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal the evolution and fungi-algae interaction based on the detailed observation of life cycle and manner of infection in chytrids, a primitive group of fungi. Chytrid ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. Time-lapse microscopy was performed to observe their transition of life cycle stage, and fluorescent microscopy was performed to examine lectin-binding pattern in each life cycle stage. As a result, the lectin-binding patterns and the timing of zoospore release were different among life cycle stages or chytrid species. It was suggested that N-acetyl-D-glucosamine, one of the amino-sugars, was accumulated highly at the basal part of the rhizoid system.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：ツボカビ レクチン 生活環

## 1. 研究開始当初の背景

ツボカビ類 (Chytridiomycota) は菌類の系統で最も初期に分岐した一群として知られる (1)。ツボカビ類は生活環の中に鞭毛をもつステージが存在し、他の真菌類と異なる際立った特徴を有する。近年、ツボカビ感染症を含む多種類の真菌による感染症が深刻な生物絶滅を引き起こしていることが報告された (2)。特に、ツボカビ類は両生類の種多様性減少に深刻な影響を与えており、ツボカビ感染によって世界中の半分近くまで種の多様性が失われたことが報告されている (3)。このような背景から、ツボカビ類は菌類の初期進化の解明のみならず、水圏生態の生物多様性の保全などの研究に重要なグループであると考えられる。

微細藻類の中でアスタキサンチンと呼ばれるカロテノイド類の一種を産生する *Haematococcus lacustris* (ヘマトコッカス藻) は屋外培養でコウマクノウキン類 (Blastocladiomycota) に感染することが報告された (4)。コウマクノウキン類は広義のツボカビに属し、2006 年に門レベルでまとめられ、新設された比較的新しい分類群である (5)。動物感染性ツボカビ類や海産藻類寄生性ツボカビ類と比較して、コウマクノウキン類は数種が記載されているのみで、その実体はほとんど不明である。ヘマトコッカスが産生するアスタキサンチンは商業的価値が高く、屋外培養も試みられているが、コウマクノウキン類を含むツボカビの感染により、藻類細胞の死滅などの被害が知られるようになった。コウマクノウキン類を含むツボカビ類の生活環や感染過程を詳しく観察し、その多様性や進化を明らかにすることが重要である。

## 2. 研究の目的

本研究は真菌類の一群であるツボカビ類の生活環・感染様式を詳細に観察し、その進化を明らかにすることを目的とした。生活環の観察には明視野・蛍光ライブイメージを用いた。レクチン染色により各生活環ステージにおける糖鎖分布様式を観察し、さらに宿主細胞内のツボカビ類の形態と構造を電子顕微鏡レベルで詳細に観察することで、コウマクノウキン類などの原始的菌類における細胞体制や生活環の進化を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では米国タイプカルチャーコレク

ションに維持されている培養株を用いて、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡により形態・微細構造を詳細に観察した。またツボカビ類の感染過程や生活環の移行過程をタイムラプス法などで詳細に観察した。FITC (fluorescein isothiocyanate) を付加したレクチン (WGA: Wheat Germ Agglutinin) 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、生活環各ステージの糖鎖分布パターンについて詳しく調べた。

## 4. 研究成果

本研究では、原始的菌類の一群であるツボカビ類の生活環・感染様式を詳細に観察し、その進化を明らかにすることを目的として研究を展開した。明視野・蛍光ライブイメージングによりツボカビ類の生活環を明らかにし、藻類への感染過程における宿主の認識や感染様式、さらに宿主細胞内のツボカビ類の動態を電子顕微鏡レベルで詳細に観察することで、原始的菌類における細胞体制や感染様式の進化を解明した。

初年度はツボカビ類のカルチャーコレクションの収集とその継代維持培養系の確立について重点的に取り組んだ。米国タイプカルチャーコレクション (ATCC) よりツボカビ類 3 種 (*Terramyces subangulosum* ATCC-MYA-4067, *Chytriomycetes hyalinus* ATCC-28165, *Allomyces macrogynus* ATCC-38327) の分譲を受け、それらの基本的な体制と生活環を光学顕微鏡により観察した。特に *C. hyalinus* と *T. subangulosum* については、タイムラプス顕微鏡観察により遊走子の放出タイミングや様式を詳細に観察した。また、レクチン (FITC-WGA) 染色を行い、生活環各ステージの糖鎖分布について詳しく調べた。遊走子が着生したばかりの細胞や仮根 (rhizoid) には WGA に結合する糖鎖局在シグナルはなかったが、遊走子嚢の細胞壁、とくに仮根の基部で強い WGA のシグナルが見られた (図 1)。今回のレクチン染色観察により、アミノ糖の一種 N-アセチルグルコサミンが遊走子嚢の仮根の基部に集積していることが示唆された。レクチン染色の結果および遊走子から遊走子嚢に至る過程をタイムラプス顕微鏡法により観察し、論文として報告した (6)。

ツボカビ類の遊走子嚢または配偶子嚢から遊走子または配偶子が放出される条件やタイミングを調べたところ、ツボカビの種によって全く異なっていることがわかった。例えば、*C. hyalinus* では植え替え後数十分で

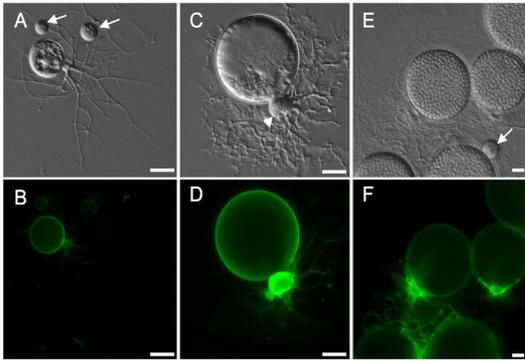


図1: *Chytriumyces hyalinus* における WGA 結合パターン (A, B) 培養 1 日目の細胞。矢印は着生したばかりの遊走子を示す。(C, D) 培養 2 日目の細胞。(E, F) 培養 2 日目の細胞 (成熟した配偶子嚢)。矢印は着生したばかりの遊走子を示す。A, C, E: 微分干渉像。B, D, F: FITC-WGA でラベルした蛍光像。緑の部分は WGA 結合部位を示す。C の矢印は仮根 (rhizoid) の基部を示す。Scale bars=10 μm

遊走子は放出され始めるが、*T. subangulosum* では数日 (2~3 日) で遊走子が放出された。これらの特徴は、種あるいは属レベルの特徴であることが予想された。宿主生物として注目した藻類種であるヘマトコッカス藻は、レクチン (WGA) 染色により全く染色されないが、今回調べたツボカビは基本的に染色された。この藻類とツボカビのレクチン染色の違いは、将来的に屋外コンタミネーションのモニタリングなどにも応用できるだろう。

本研究では、宿主藻類として注目したヘマトコッカス藻の学名に複数のシノニムがあり、学名の適用に関して混乱している問題にも取り組んだ。ヘマトコッカス藻はアスタキサンチン産生藻類として商業的にも利用されている数少ない微細藻類の一つであり、学名の整理が非常に重要であると考えたからである。ヘマトコッカス藻のシノニムリストを整理し、エピタイプ指定を行い、ヘマトコッカス藻の学名適用に関する安定化を図った (7)。

本研究では、透過型電子顕微鏡による観察を試みた。化学固定や急速凍結固定など複数の固定法を試行し、それぞれの種に適した固定法を探索した。今研究では固定に供する細胞数を得るのが困難であったため、論文として出版できるほどの十分なデータが蓄積できなかった。しかし、限られた電顕データのなかでも、*C. hyalinus* の眼点様構造を発見することができた。ツボカビ類の一種 *Blastocladiella emersonii* にはロドプシンがあり、ロドプシンとグアニル酸シクラーゼ複

合体が走光性に関与することが報告された (8)。このようにツボカビ類には走光性が確認されているものの、電子顕微鏡的に眼点様構造を確認した例は少ない。眼点は細胞空間構造を調べる基準となるという意味でも重要である。すなわち眼点や鞭毛装置構造を基準とすることで、細胞内位置関係を 3 次元的に理解することができる。クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) などでは、オス・メス (接合型プラス・マイナス) で細胞空間構造に非対称性があることが知られている。ツボカビ類も有性生殖をするものがあり、動物と菌類からなるオピストコント生物群にもこのような非対称性が存在するかどうかは興味深い。今後は、眼点様構造や性の進化に注目して研究を展開したい。

#### < 引用文献 >

- (1) James, T. Y. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**, 818–822 (2006).
- (2) Fisher, M. C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186–194 (2012).
- (3) Stuart, S. N. *et al.* Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**, 1783–1786 (2004).
- (4) Hoffman, Y. *et al.* Isolation and characterization of a novel chytrid species (phylum Blastocladiomycota), parasitic on the green alga *Haematococcus*. *Mycol. Res.* **112**, 70–81 (2008).
- (5) James, T. Y. *et al.* A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* **98**, 860–871 (2006).
- (6) Ota, S. & Kawano, S. Life cycle and lectin-binding patterns in the chytrid fungus *Chytriumyces hyalinus*. *Cytologia* **80**, 125–129 (2015).
- (7) Nakada, T. & Ota, S. What is the correct name for the type species of *Haematococcus* Flot. (Volvocales,

Chlorophyceae)? *Taxon* **65**, 343–348 (2016).

- (8) Avelar, G. M. *et al.* A rhodopsin-guanylyl cyclase gene fusion functions in visual perception in a fungus. *Curr. Biol.* **24**, 1234–1240 (2014).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計18件)

1. Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., Oshima, K., Hattori, M., Bišová, K., Zachleder, V., Kawano, S. Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. *Scientific Reports* 6: 25731 (2016) , 査読有
2. Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Kim, S., Yu, Z., Yoshihara, M., Takeda, K., Tsuyoshi, T., Hirata, A., Bišová, K., Zachleder, V., Hattori, M., Kawano, S. Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure. *Biotechnology for Biofuels* 9:13 (2016) , 査読有
3. Nakada, T., Ota, S. What is the correct name for the type species of *Haematococcus* Flot. (Volvocales, Chlorophyceae)? *Taxon* 65: 343–348 (2016) , 査読有
4. Suzuki, R., Ota, S., Yamazaki, T., Toyoda, A., Nonaka, S., Matsukura, C., Kuwano, K., Kawano, S. Morphological changes of giant mitochondria in the unicellular to multicellular phase during parthenogenesis of *Ulva partita* (Ulvoephyceae) revealed by expression of mitochondrial targeting GFP and PEG transformation. *Phycological Research*, in press (2016) , 査読有
5. Takeshita, T., Takeda, K., Ota, S., Yamazaki, T., Kawano, S. A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. *Cytologia* 80:475–481 (2015) , 査読有
6. Yamazaki, T., Yamashita, Y., Ota, S., Takeshita, T., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S. Characterization of isolates derived from heavy-ion-beam irradiated cells in the unicellular green alga *Parachlorella kessleri*. *RIKEN Accelerator Progress Report* 48: 309 (2015) , 査読有
7. 大田修平, 河野重行: 藻類バイオと電顕 3D. *Plant Morphology* 27: 3-7 (2015) , 査読無
8. Ota, S., Yoshihara, M., Hirata, A., Kawano, S. 3D-TEM imaging demonstrating dynamic conversion of starch and oil in a cell of *Chlorella sorokiniana*. *Cytologia* 79:287–288 (2014) , 査読有
9. Ota, S., Kawano, S. Life cycle and lectin-binding patterns in the chytrid fungus *Chytriumyces hyalinus*. *Cytologia* 80:125–129 (2015) , 査読有
10. Ichihara, K., Suzuki, R., Yamazaki, T., Ota, S., Mogi, Y., Kagami, Y., Kuwano, K., Kawano, S. *Ulva partita* sp. nov., a novel *Enteromorpha*-like *Ulva* species from Japanese coastal areas. *Cytologia* 80:261–270 (2015) , 査読有
11. Yamazaki, T., Endo, M., Ito, K., Suzuki, R., Ota, S., Kuwano, K., Miyamura, S., Toyoda, A., Kawano, S. HAP2/GCS1 is involved in the sexual reproduction system of the marine macroalga *Ulva compressa* (Ulvoales, Chlorophyta). *Cytologia* 79:575–584 (2014) , 査読有
12. Yamazaki, T., Hirai, C., Ota, S., Kuwano, K., Kawano, S. Use of FM1-43, a membrane-specific fluorescent dye, to estimate plasma membrane integrity in the cryopreservation of green algae. *Cryo Letters* 35: 180–187 (2014) , 査読有
13. Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., Kawano, S. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under strong illumination and aeration culture conditions. *Bioresource Technology* 158: 127–134 (2014) , 査読有
14. 大田修平 *Haematococcus* 属とその近縁属に関する系統分類学的研究. 藻類 62: 11-14 (2014) , 査読無
15. 松田尚大、竹下毅、大田修平、山崎誠和、風間裕介、阿部知子、平田愛子、河野重行、微細藻類への重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株の作出. 生物工学会誌 92:602–606 (2014) , 査読無
16. Ota, S., Matsuda, T., Takeshita, T., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T., Kawano,

- S. Phenotypic spectrum of *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta) mutants produced by heavy-ion irradiation. *Bioresource Technology* 149: 432–438 (2013) , 査読有
17. Ota, S., Matsuda, T., Takeshita, T., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S. Effect of heavy-ion beam irradiation on the survival and growth rates in *Parachlorella kessleri*. *RIKEN Accelerator Progress Report* 46: 266 (2013) , 査読有
  18. Ohnuki, S., Nogami, S., Ota, S., Watanabe, K., Kawano, S., Ohya, Y. Image-based monitoring system for green algal *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) cells during culture. *Plant & Cell Physiology* 54: 1917–1929 (2013) , 査読有
- 〔学会発表〕(計 25 件)
1. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、大島健志朗、服部正平、平田愛子、河野重行「イオウ飢餓で誘導されるクロレラのオイル蓄積とミトコンドリアと葉緑体のオートファジー」第 40 回日本藻類学会大会、日本歯科大学生命歯学部、東京都、2016 年 3 月 20 日
  2. 清水恭夫、山崎誠和、大田修平、市原健介、鈴木亮吾、宮村新一、桑野和可、河野重行「*Ulva partita* ゲノムの雌雄特異的領域にある遺伝子とその発現パターン」第40回日本藻類学会大会、日本歯科大学生命歯学部、東京都、2016年3月20日
  3. 竹下毅、大田修平、山崎誠和、河野重行「クロレラ 6 種 8 株の実験室培養系におけるデンプンとオイルの蓄積と屋外大量培養系への展開」第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、盛岡市、2016 年 3 月 18 日
  4. 山崎誠和、鴻巣絵梨香、武田行平、竹下毅、平田愛子、大田修平、風間裕介、阿部知子、河野重行「硫黄飢餓におけるクロレラの脂質とデンプンの蓄積動態」第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、盛岡市、2016 年 3 月 18 日
  5. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、宮下英明、河野重行「強光ストレスによるクロレラ類の劇的な色調変化とカロテノイド蓄積」日本生物工学会、城山観光ホテル、鹿児島市、2015年10月28日
  6. 山崎誠和、鴻巣絵梨香、竹下毅、大田修平、平田愛子、風間裕介、阿部知子、河野重行「微細緑藻 *Parachlorella kessleri* のシステイン要求性変異体はオイルとデンプンの蓄積動態に異常を示す」日本生物工学会、城山観光ホテル、鹿児島市、2015 年 10 月 28 日
  7. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、大島健志朗、許斐麻美、平田愛子、服部正平、河野重行「栄養飢餓ストレスによるクロレラ類の液胞内ポリリン酸とオートファジーの動態」日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、新潟市、2015 年 9 月 6 日
  8. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、許斐麻美、平田愛子、河野重行、「栄養塩飢餓ストレス下のクロレラ類の高電子密度顆粒の微細構造とリンの蓄積動態」日本植物形態学会第 27 回総会・大会、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、新潟市、2015 年 9 月 5 日
  9. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、南郷脩史、平田愛子、河野重行、「*Chlorella sorokiniana* におけるオートファジーの 3 次元微細構造学的研究」、日本藻類学会、九州大学箱崎キャンパス、福岡市、2015 年 3 月 22 日
  10. 竹下毅、山下 雄一、大田修平、山崎 誠和、大島 健志朗、服部 正平、風間 裕介、阿部 知子、河野 重行、「クロレラの重イオンビーム照射による突然変異誘導と屋外大量培養株の作出」、日本藻類学会、九州大学箱崎キャンパス、福岡市、2015 年 3 月 21 日
  11. 仲田崇志、大田修平、「アカヒゲムシ (*Haematococcus* ; 緑藻綱, オオヒゲマワリ目)の異名整理と正名の合意形成に向けて」、日本植物分類学会、福島大学金谷川キャンパス、福島市、2015 年 3 月 6-8 日
  12. Shuhei Ota, Tomokazu Yamazaki, Tsuyoshi Takeshita, Aiko Hirata, Kateřina Bišová, Vilém Zachleder and Shigeyuki Kawano. *Parachlorella* genome provide insights into sequential accumulation of starch and lipid induced stressfully by sulfur deficiency, 第 6 回ヨーロッパ藻類学会議、Hotel Novotel London West, イギリス、ロンドン、2015 年 8 月 23-28 日
  13. 大田修平、河野重行、「藻類バイオと電顕 3D」(招待講演)、日本植物学会、明

- 治大学生田キャンパス、川崎市、2014年9月12日
14. 吉原真衣、大田修平、山崎誠和、許斐麻美、平田愛子、河野重行、「クロレラ類の栄養飢餓条件における物質の蓄積動態を電顕 3D 法で立体構築する」、日本植物学会、明治大学生田キャンパス、川崎市、2014年9月12日
  15. 竹下 毅、山崎 誠和、大田 修平、Zachleder Vilém、河野 重行「クロレラ類のデンプン・オイル蓄積とその生産性に及ぼす強光と屋外大量培養系の影響」、日本生物工学会、北海道大学札幌市、2014年9月11日
  16. 山崎誠和、大田修平、竹下毅、佐藤聖樹、大島健志朗、服部正平、河野重行「オイル蓄積を誘導する硫黄飢餓に対する微細緑藻 *Parachlorella kessleri* のトランスクリプトーム解析」、日本生物工学会、北海道大学、札幌市、2014年9月11日
  17. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、仲野靖孝、許斐麻美、平田愛子、河野重行「*Parachlorella kessleri* に見られるポリリン酸様高電子密度顆粒の同定とその蓄積動態」日本藻類学会第 38 回大会、東邦大学、船橋市、2014年3月16日
  18. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、Vilém Zachleder、河野重行「強光培養系と屋外大量培養系によるパラクロレラ変異株のデンプンとオイルの蓄積動態の解析」日本藻類学会第 38 回大会、東邦大学、船橋市、2014年3月16日
  19. Shuhei Ota, Tsuyoshi Takeshita, Tomokazu Yamazaki, Milada Vítová, Vilém Zachleder, Tomoko Abe, Shigeyuki Kawano. Phenotypic spectrum and 3D/TEM analysis of *Parachlorella kessleri* mutants produced by heavy-ion irradiation, BioTech 2014 & 6th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, National Technical Library, チェコ共和国プラハ、2014年6月11-14日
  20. Tsuyoshi Takeshita, Ivan Ivanov, Shuhei Ota, Tomokazu Yamazaki, Vilém Zachleder, Shigeyuki Kawano. Starch and lipid accumulation in *Chlorella* species under high light intensity in the laboratory and outdoor mass cultures, BioTech 2014 & 6th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, National Technical Library, チェコ共和国、プラハ、2014年6月11-14日
  21. Ivan Ivanov, Tsuyoshi Takeshita, Shuhei Ota, Tomokazu Yamazaki, Shigeyuki Kawano, Vilém Zachleder, Kateřina Bišova. Production of lipids and starch in *Parachlorella kessleri*, BioTech 2014 & 6th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, National Technical Library, チェコ共和国、プラハ、2014年6月11-14日
  22. 山崎誠和、大田修平、佐藤聖樹、竹下毅、風間祐介、阿部知子、河野重行「微細藻類への重イオンビーム照射による突然変異率の算出と凍結保存法による変異体の安定性評価」日本生物工学会第 65 回大会、広島国際会議場、広島市、2013年9月18日
  23. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、河野重行「クロレラ6種8株の強光通気培養下のイオウ欠乏に対するオイルとデンプンの蓄積の動態」日本生物工学会第 65 回大会、広島国際会議場、広島市、2013年9月19日
  24. 大田修平、吉原真衣、南郷脩史、平田愛子、河野重行「電顕 3D を用いた栄養塩欠乏ストレスによるクロレラのデンプン・オイル蓄積動態解析」、日本植物学会第 77 回大会、北海道大学、札幌市、2013年9月15日
  25. 大田修平、吉原真衣、南郷脩史、平田愛子、河野重行「三次元微細構造観察によるクロレラのデンプン・オイル蓄積動態解析」日本植物形態学会第 25 回大会、北海道大学、札幌市、2013年9月12日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大田 修平 (OTA, Shuhei)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：20455926