

## <菌学講座(後編)>

# ゲノムプロジェクトが真菌類研究にもたらすインパクト

大 沼 雅 明

### 1. はじめに

真菌類は地球上におよそ150万種類存在すると考えられており、我々人間を含めた他の生物と互いに影響を及ぼしながら地球上の生態系を形成している。真菌類は分解者として、植物による光合成で得られた有機物や人間が人工的に合成した有機化合物を無機物へと分解する過程において非常に大きな役割を担っており、地球上の物質循環に欠かすことのできない生物群であるが、それ故にそのはたらきは文化財の劣化をもたらす要因になりうる。また真菌類には様々な二次代謝産物を産生するものが知られており、代謝産物の中には他の生物の生命活動に影響を及ぼす有機化合物を合成するものが存在する。それらの化合物にはペニシリンのように細菌類に毒性を示すために抗生物質として利用されるものもあれば、アフラトキシンなどのように人間に対して毒性を示すカビ毒として知られる化合物もある。ある種の真菌は人間に対して寄生して体内で増殖することにより病原性を示すものがある一方で、醸造過程などで工業的に利用されるものも存在する。このように真菌類のはたらきは我々の生活に対して損益の両方の側面を持つものであり、真菌類がどのようにその生命機能を制御しているのかについて理解することはきわめて有用である。そのため、分類学を手始めに細胞生物学や生化学などのさまざまな手法を用いて研究が進められてきたが、1980年代から急速に進んだ分子生物学的手法を用いた遺伝情報の解読によって得られた知見は極めて重要で示唆に富むものであり、これまでの知識の枠組みに大きな変化をもたらしている。本稿ではその内容を概観するとともに、多様な性質を示すカビの特徴がどのように遺伝情報に格納されているのかについて、真菌類のゲノムプロジェクトによって得られた解析結果の知見をもとに述べていく。

### 2. 分子生物学がもたらした菌類の系統分類体系の変更

生物の持つすべての遺伝情報を解読するというゲノムプロジェクトが始まる以前の1980年代、分子生物学の分野において重要な技術革新が起こった。あらかじめ塩基配列が分かっている2つの領域の間のDNAを指数関数的に増幅して合成することができるPCR法を用いることによって、遺伝情報の本体であるDNAの塩基配列の解読が容易に行えるようになったのである。この研究手法は生物の系統分類にも用いられて、それによって得られた結果は真菌類を含む生物の分類体系に大きな変更をもたらすことになった。

生物の遺伝情報は、祖先から子孫へと複製されて受け継がれていくうちに徐々に変異が生じていく。遺伝情報に変異が入ることでその子孫の生存が不利になった場合には、その変異を持った個体は自然淘汰されてしまい後世にその変異が残ることはないが、もし子孫の生存に不利にならず自然淘汰が起これなかった場合には、変異が生じた遺伝子は子孫に引き継がれてそれが生物の進化の原動力となる。このように進化の過程でそれぞれの遺伝子に変異が入る頻度には違いが現れる。タンパク質合成を行う場であるリボソームを構成するRNA (rRNA) をコードする遺伝子に突然変異が起こるとタンパク質合成がうまく機能しなくなるので、ほとんどの場合では生存に不利に働くと考えられる。そのためrRNAをコードする遺伝子はどの生物でも変異が子孫に引き継がれにくく、結果として生物の進化の過程を経てもこの遺伝子の塩基配列はよく保存されている。しかしその領域の近傍には、突然変異が生じてもそれが子孫の生存に不利に働かないために比較的変異が生じやすい領域が存在しており、その領域では生物の進化の過程で一定時間が経過するごとに一定の

割合で塩基配列に変異が蓄積されていく。そのため共通の祖先生物を持つ生物種間であっても種分岐してから時間が経過するとともにその遺伝情報には違いが増加していく。各々の種についてこの領域の塩基配列を比較することで、共通の祖先生物から分岐した時期が推定することが可能になり、それを用いて生物種間の系統分類を行うことができるようになった。比較に用いられる遺伝子には、上記のようなrRNAをコードする遺伝子近傍領域(ITS)の他にも、生物の生存に欠かすことのできない機能を持つ $\beta$ -チューブリンやペプチド延長因子などのタンパク質をコードする遺伝子も用いられる。これらの遺伝子もrRNAと同様に突然変異が生じにくい、時間経過とともにやはりこれらの遺伝子にも少しずつ突然変異が生じる。このように生物種の間で共有されている複数の遺伝子について相同性を比較することで、それらの生物種がどれほど近縁なのかを数値的に表すことができる。

こうした分子生物学的手法によって得られる遺伝情報の相同性を用いた分子系統分類の方法論は、肉眼的に観察できる色や形といった表現形質や生命活動によって生じる二次代謝産物の組成といった生化学的形質を用いた分類法とは異なる原理に基づいている。そのため遺伝情報の比較によって得られた分子系統分類法による結果はそれまで歴史的に築き上げられてきた生物の系統分類としばしば違いが生じるが、近年では分子生物学的手法によって得られた結果に基づいて生物の分類体系の見直しが進められてきた。真菌類の分類においても、接合菌門が解体されてなくなるといった大きな変化があったほか、属以下の分類では実にさまざまな変化がおこっている。Fig. 1にいくつかの代表的な子囊菌類の系統関係を示した。

分子生物学的手法が導入されたことで、真菌類に関する分類体系の見直しが進むとともに、歴史的な経緯による真菌類の特殊な分類命名法が見直されることになった。分類学では新たに発見された生物種に名前を付ける際に、一つの生物に複数の名前が付くような混乱を避けて正しく命名できるように命名規約が存在している。真菌類の命名法は植物に近いとされていた過去の経緯もあり

植物命名規約によって定められていて、真菌類のうち有性生殖を行う有性時代と無性生殖で増殖する無性時代の両方の生活環を有する子囊菌類・担子菌類の一部の種に対してそれぞれの生殖時代に対して別の学名を与える二重命名法が使われていた。これには真菌類の示す形質が生活環で大きく異なっていることが関わっている。真菌類の分類に用いることができる表現形質の種類には、分離培養を行った際に形成されるコロニーの形状や色調、栄養要求性、菌糸体や胞子、分生子の形状などがある。ところが有性生殖と無性生殖の両方の生活環をもつ菌類はそれぞれの時代で表現形質が大きく異なっており、それぞれの形質を比較しても同じ生物種であると認識することが不可能である。そのため分類対象種が有性生殖時代にある場合はテレオモルフとよんで子囊菌類あるいは担子菌類として、無性生殖時代にある場合にはアナモルフとよんで「不完全菌類」として分類を行い、それぞれに対して命名することができるという真菌類にのみ適用される植物命名規約の条項が存在していたのである。ある種のテレオモルフとアナモルフとの対応関係は、子囊胞子などのテレオモルフを単一に分離し、培養を行って得られるアナモルフを確認することで証明できるが、その対応関係を見つけることができない場合も多い。現在でも *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属にはテレオモルフが見つからない種が数多く存在している。

ところが従来の手法とは異なり分子生物学を用いて得られるDNAの配列情報には、テレオモルフとアナモルフの間での違いが存在しない。有性世代、無性世代のどちらの生活環にあっても同じ生物であれば同じ遺伝情報を持っているので、あるテレオモルフとあるアナモルフから得られた遺伝情報が等しければ、どれほど形状が違っていても両者は生物学的に同一と考えることができる。これによってテレオモルフが不明であるために「不完全菌」に分類されていた種であっても、分子系統分類学的にどのテレオモルフに近縁であるかを推定することができるようになったため、国際菌学会、国際植物学会菌類命名委員会などでの討議を経て2011年に国際植物命名規約の改訂を行って菌類に関する二重命名法をあらため

ることになった。しかし命名法の改訂を行うにあたっては、特に *Aspergillus* 属 (コウジカビ) や *Penicillium* 属 (アオカビ) のように工業的、医学的にも重要な種を含むものでは学名が変更されることによって生じる影響が大きいので、現在でも国際シンポジウムなどが開催され具体的な検討や討議がなされている。

今回の改訂にあたって多くの討議がなされたものの一つが *Aspergillus* 属である。Gamsらによる従来の分類法では *Aspergillus* 属は6つの亜属 (Subgenus), 18の節 (Section) に分類されており、これらに対応するテレオモルフとの関係については Table 1 に示したとおりである。また Houbraekenらは分子系統解析を用いた結果から *Aspergillus* 属を4つの亜属に再分類している。命名規約を改訂するにあたって規約条項をどのように解釈して属名を決定するかは各研究者の考え方に任された面があり、一般的によく知られた *Aspergillus* 属の菌種の学名がテレオモルフの発見によって変更になる可能性が指摘されていた。実際、2009年に *Aspergillus fumigatus* のテレオモルフが得られ、*Neosartorya fumigata* と命名されたために *A. fumigatus* が正式な学名でなくなるのではないかという議論がおり、国際植物命名規約の改訂作業に大きな影響が生じた。*Aspergillus* 属のテレオモルフ (*Eurotium*, *Neosartorya*, *Emericella* など) は一つの祖先から分岐して生じた分岐群であり、現在のところこれらのテレオモルフに対して *Aspergillus* という統一名を与える方向で議論が進んでいるが、今後の研究の進展によっては植物命名規約の改定による影響の余波が続くことも考えられる。

また改訂によって *Penicillium* 属の名称にも若干の影響があるものと思われる (Table 2)。*Penicillium* と関連するテレオモルフとしては *Eupenicillium* と *Talaromyces* に大別される。*Eupenicillium* から生じるアナモルフには *Penicillium* が使用されるが、*Talaromyces* からは生じるアナモルフとして *Penicillium*, *Geosmithia*, *Paecilomyces* の3属が含まれており多系統属であるため、これらに対してはそれぞれ異なる系統名を使用することが提案されている。

学名は一度決定したら不変であるように考えがちであるが、今回のような規約改訂によってこれまで使用していた学名が単なる通称名になってしまう可能性もある。文化財保存に関連して好乾性カビとして頻繁に名前が現れる *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属がその中に含まれていることは記憶にとどめておいてほしい。

### 3. 真菌類のゲノム情報から得られる知見

複数の遺伝子のDNA塩基配列情報に基づく真菌類の系統分類が行われるのと並行して、生物の持つ遺伝情報を全て解読しようとするゲノムプロジェクトも進められた。プロジェクト開始当初は塩基配列を読むためのシーケンス技術が現在ほど進歩していなかったため、細胞内に存在するDNAのサイズが小さいものから解読が進められ、ウイルス、バクテリアに次いで、1997年真核生物で最初に発芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の全ゲノムの塩基配列が決定された。*S. cerevisiae* のゲノムサイズは約12Mb、遺伝子数が6500、全ゲノムに対するタンパク質をコードしている領域の割合は約70%であった。この後、線虫などの真核生物のモデル生物について全ゲノム配列の解読が次々と完了した。ゲノムプロジェクト最大の目標であるヒトゲノムの解析では哺乳類細胞のゲノムサイズの大きさがネックとなっていたが、次世代シーケンサーによる塩基配列解読技術の革新および得られた遺伝情報の処理技術の進歩によって2003年4月14日に全ゲノムの解読が終了したことが発表された (ゲノムサイズ約3Gb)。真菌類では2002年に分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (ゲノムサイズ12.6Mb)、2003年に子囊菌門に属する糸状菌であるアカパンカビ *Neurospora crassa* (ゲノムサイズ41Mb) のゲノムが解読された。

このようなモデル生物の遺伝情報の解読プロジェクトと並行して、工業的、医学的な重要性を持つ菌種を多く含む *Aspergillus* 属のゲノム配列の解読が比較的早い時期から進められてきた。2005年に各研究機関で平行して進んできた *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae* などのゲノム配列解読がおおよそ終了



し、その解析結果が公表された。*A. oryzae* ゲノムについては日本の研究機関コンソーシアムが中心となって解読され、そのゲノムサイズは38Mbであり近縁種である *A. fumigatus*, *A. nidulans* に比べて30%ほど大きく、それに対応するように遺伝子数も約30%多いことが分かった。また *A. oryzae* は加水分解酵素遺伝子や一部のアミノ酸や脂質の合成や分解などに関する遺伝子を近縁種よりも多く持つことなどが明らかとなり、ゲノム中の遺伝子の並び方を比較することで、*Aspergillus* 属の菌種ごとの特徴を推測できることが示唆された。また興味深いことに、他の生物種の対応する遺伝子との相同性が進化系統樹とは一致しない遺伝子が見いだされ、真菌類は進化の過程で他種の生物から遺伝子を獲得している可能性も示唆された。このことは少数の遺伝子の塩基配列を用いて系統分類を行うことに対して注意を払う必要性があり、より確度の高い系統分類を行うためには多くの遺伝子についての塩基配列情報を比較することが重要であることを示している。

現在のところ、全ゲノム情報の解読が完了した真菌類は暫定的なもの(ドラフト)も含めると約200種にのぼっている。真菌類の全ゲノム解読プロジェクトは現在も進行中であり(参考 URL <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>)、その数はこれからも確実に増加していくことが見込まれ、文化財に影響を及ぼすような好乾性カビや木材腐朽菌などのゲノム情報も今後得られてくるものと考えられる。様々な種類の真菌類のゲノム情報が解読されて遺伝情報に存在する共通点、相違点を比較して調べることができるようになると、菌類がその生活環の中で示すさまざまな特徴的な表現形質が、各々の遺伝子によってどのように制御されているのかという知見が得られることが期待される。

Zhaoらは全ゲノム情報が得られた103種類の菌類について、グリコシド結合加水分解酵素をはじめとする糖質の加水分解に関わる一群の酵素ファミリー(CAZy)がゲノム中に何種類くらい存在しているのかについてメタゲノム解析を行った。植物細胞の細胞壁を構成するペクチンの分解に関与する酵素群についてみると、調べた子

菌類のうちのおよそ30%がこれらの酵素を欠く一方で、担子菌類ではヒトの皮膚にのみ寄生する性質をもつ *Malassezia globosa* だけがこれらの酵素を欠いていた。また植物に寄生する性質を持つ菌類ではより多くの種類のペクチン分解酵素を持つ傾向にあることもわかり、これらの酵素数と菌類の基質を分解する性質や能力との間に関連性があることを示唆している。さらにペクチン以外の植物細胞の細胞壁構成成分であるリグニンやセルロースが形成する複合体構造を分解する酵素をコードする遺伝子は全ての種で複数存在していたが、植物に寄生する性質をもつ菌類は動物寄生菌や腐生菌に比べてより多くの種類のセルロース分解酵素を有している傾向にあることが示され、このこともゲノム中にコードされている遺伝子の機能や種類と、各々の菌種が生活環において示す性質の間に関連性があることを示唆している。

好乾性カビとして知られるワレミア属(*Wallemia*)の2種、*W. sebi*, *W. ichthyophaga* の全ゲノム情報の解読は2012年に終了し、それぞれ9.8, 9.6Mbのゲノムサイズを持ち、ゲノム全体の約70%が遺伝子をコードする領域であることが分かった。約10Mbというゲノムサイズは他の真菌類のゲノムサイズと比較してもかなり小さく、*W. ichthyophaga* の解析データによれば、タンデムリピートやトランスポゾンに起因する繰り返し配列は全ゲノムの1.67%を占めるに過ぎない。タンパク質をコードしていると考えられる遺伝子数は *W. sebi*, *W. ichthyophaga* でそれぞれ5284, 4884個であり、ゲノムサイズ同様に他の担子菌門の菌類の遺伝子数の半分以下、出芽酵母の遺伝子数とほぼ同じであることがわかった。*W. sebi* と比較して、*W. ichthyophaga* のゲノム中には有性生殖を行うために必要な減数分裂に関与する遺伝子群のうちの一部が欠失しており、このことは *W. ichthyophaga* がテレオモルフを形成できなくなっているということを示唆している。

乾燥に伴う浸透圧ストレスがかかった場合、ワレミアがどのように遺伝子レベルで対応しているのかについては、出芽酵母(*S. cerevisiae*)の高浸透圧に対する耐性に関わる遺伝子のうちワレミア属のゲノム中で失われずに残っている遺伝子を

調べることによって、おおよそのメカニズムを推定することができる。同じ浸透圧ストレスであっても *W. sebi* と *W. ichthyophaga* では高浸透圧をもたらす溶質が塩類であるか糖質であるかによって異なる反応性を示す。*W. ichthyophaga* は *W. sebi* と比べてより好塩性であり、その生存のためには高塩濃度の溶質の存在が必要であるが、この理由として *W. ichthyophaga* の細胞膜に存在する陽イオン輸送タンパク質の種類と性質の違いに帰着できる可能性が考えられている。

*Xeromyces bisporus* は極端に低い水分活性を示す高濃度の糖類存在下 (水分活性  $A_w=0.61$ ) で生育可能な真菌として知られ、2014年に全ゲノム情報が解読された (ゲノムサイズ 22Mb, 遺伝子数 10062)。*X. bisporus* は高浸透圧条件下で生育可能な真菌ではあるが、ワレミアとは異なり好塩性ではない。この性質の違いも細胞膜に存在する陽イオン輸送タンパク質などのタンパク質の働き方の違いによるものと考えられている。

また *X. bisporus* のゲノム構造からは菌類の二次代謝経路の機能推定に関する興味深い知見も得られている。*Aspergillus* などの多くの菌類のゲノム構造を比較することによって、二次代謝産物の合成に関与する酵素をコードする遺伝子は、代謝産物ごとに染色体上の異なる一統きの領域 (クラスター) にかたまって存在していることが明らかになってきた。*Aspergillus nidulans* と *X. bisporus* のゲノム間で対応する遺伝子領域を比較すると、*A. nidulans* のゲノム中に存在するクラスターが *X. bisporus* では全て欠けていることがわかり、実際 *X. bisporus* は二次代謝産物を生成しないことが知られている (Fig. 2)。このことは真菌類のゲノム構造を比較して、どのような遺伝子クラスターが存在しているかを調べることによって、その菌種が産生する二次代謝産物について予測を行うことが可能であることを示唆している。またこれに関連して、好乾性を示す真菌類であっても *Aspergillus* 亜属のうち *Restricti* 節に位置する種は二次代謝産物をほとんど産生しないが、*Aspergillus* 節 (テレオモルフ名 *Eurotium*) に位置する種は二次代謝産物を多く産生することが知られている。これらの違いについては、今後

*Eurotium* のゲノム構造が解明されることで理解が進むことが期待される。

以上で述べてきたように生物が細胞内に持っているゲノム配列の情報を解読しさらにメタゲノム解析などを行うことで、真菌類が有する生命現象の発現メカニズムを理解するための多くの手がかりが得られることが期待される。今後多くの菌種についてゲノム解析が蓄積されていくと、真菌類が有するおおよその形質がゲノム情報を参照するだけで分かるような日がくるかもしれない。遺伝情報を用いたメタゲノム解析から得られる考察は非常に示唆に富んだものであるが、その反面で単なる塩基配列にすぎないものに踊らされてしまう危険性もはらんでいる。ゲノムに格納された遺伝情報が実際に生命体で発現して機能しているかどうかについては常に留意する必要がある。

(おおぬま・まさあき

久留米大学医学部自然科学教室)

## 参考文献

- 1) Houbraken L. and Samson RA. (2001) Phylogeny of *Penicillium* and segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.*, 70:1-51.
- 2) Gams W. et al. (1985) Infragenetic taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus.*, pp 55-62
- 3) 矢口貴志 (2014) 日本医真菌学会雑誌, 55 (1) :13-17
- 4) Joan W. Bennett (2007) An Overview of the Genus *Aspergillus*. In *The Aspergilli Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, pp 3-14
- 5) Zajc et al. (2013) Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 14:617
- 6) Zhao et al. (2013) Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 14:274
- 7) Su-lin L. et al. (2014) Genome and physiology of the ascomycete filamentous fungus *Xeromyces bisporus*, the most xerophilic organism isolated to date, *Environmental Microbiology*, in press.

Table 1 *Aspegillus* 属の分類と関連するテレオモルフとの対応

亜属(文献1)	亜属(文献2)	節	テレオモルフ	統一名(案)
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Aspergillus(?)</i>
		<i>Restricti</i>		
	<i>Circumdati</i>	<i>Cremeri</i>	<i>Chaetosartorya</i>	
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>		<i>Hemicarpensteles</i>	
			<i>Sclerocleista</i>	
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>	
		<i>Cervini</i>		
	<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>		
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>	
		<i>Versicolores</i>		
		<i>Usti</i>		
		<i>Sparsi</i>		
		<i>Terrei</i>		
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>	
		<i>Wentii</i>		
		<i>Flavi</i>	<i>Petromyces</i>	
		<i>Nigri</i>		
		<i>Circumdati</i>		
		<i>Candidi</i>		

Table 2 *Penicillium* 属と関連するテレオモルフとの対応

アナモルフ	テレオモルフ	統一名(案)
<i>Penicillium</i>	<i>Eupenicillium</i>	<i>Penicillium</i>
	<i>Talaromyces</i>	
		<i>Rasamsonia</i>
		<i>Thermomyces</i>
<i>Paecilomyces</i>	<i>Byssochlamys</i>	<i>Byssochlamys</i>
	<i>Thermoascus</i>	<i>Thermoascus</i>

Fig. 1 子囊菌および一部の担子菌類の系統樹 (右の数字はゲノムサイズ Mb と遺伝子数, - は未決定)。四角で囲んだ菌類は好乾性を示す (文献7より)。

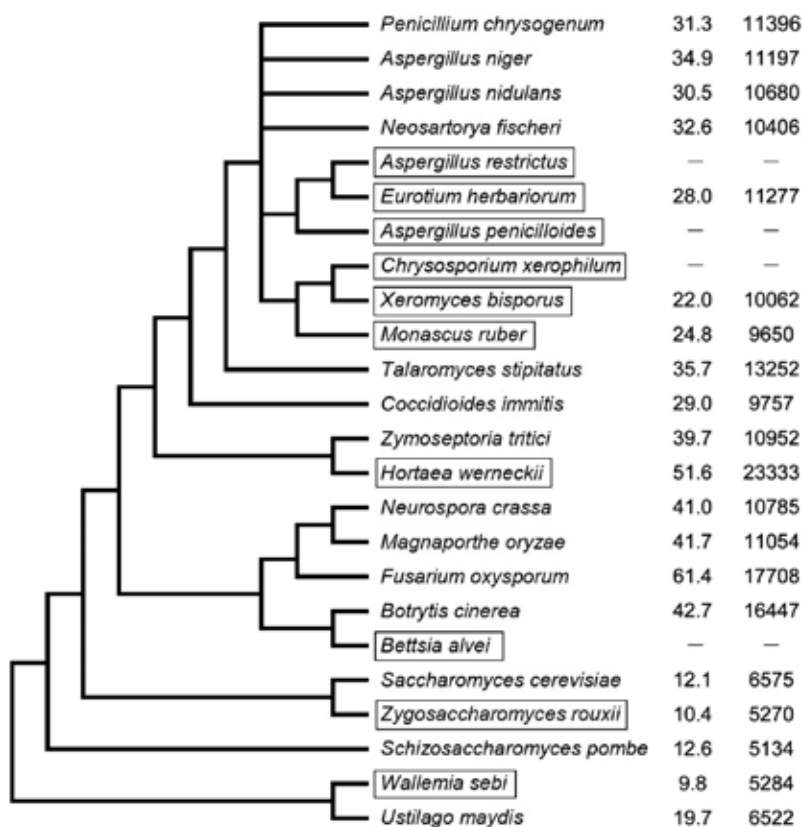


Fig. 2 *Aspergillus nidulans* の二次代謝産物 Asperthecin 合成に関する遺伝子クラスターの近傍の遺伝子の配置構造と、それに対応する *Xeromyces bisporus* のゲノム領域との比較。X. *bisporus* では Asperthecin 遺伝子クラスターが完全に欠失していることがわかる (文献7より)。

