

氏 名 河野 美恵子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1949 号

学位授与の日付 平成29年9月28日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命共生体進化学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The genetic basis of symbiosis in lichen *Usnea hakonensis*

論文審査委員 主 査 准教授 大田 竜也
教授 颯田 葉子
助教 寺井 洋平
教授 伊村 智 極域科学専攻

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Symbiosis has been involved in many evolutionary innovations in the history of life, and considered as one of the most important interactions between organisms. Lichens are symbiotic associations of fungi, alga, and bacteria. As symbiotic entities, they are adapted to diverse environments, often where water supply is transient and nutrients are scarce. They are able to inhabit extreme environments such as polar regions, deserts, and high altitudes. The principle of lichens is symbiotic interaction between a fungus, the mycobiont, and a photosynthetic partner, the photobiont. Symbiotic associations between mycobionts and photobionts induce dramatic shifts in morphology and metabolism of both symbionts. The most prominent is morphogenesis of symbiosis-specific structures (thalli), some of which are the most complex vegetative structures in the fungal kingdom. Inside a thallus, the photobiont benefits by protection from environmental stresses, while the mycobiont benefits by photosynthetic products supplied by the photobiont. However, genetic bases of symbiotic interactions between mycobionts and photobionts have not been revealed.

When I started the doctoral course, or even nowadays, characterization of genetic mechanisms in lichen symbiosis is a challenging topic with only few previous studies. Although high-throughput sequencing techniques have enabled to investigate genomes and transcriptomes of non-model organisms, those techniques have not been applied to investigate interaction between the mycobiont and the photobiont in lichens.

In this thesis, I examined genetic mechanisms that regulate symbiotic interaction between a lichen-forming fungus and its photosynthetic partner by using *Usnea hakonensis*-*Trebouxia* sp. system. The symbiotic association of *U. hakonensis* and *Trebouxia* sp. can be resynthesized *in vitro* from isolated cultures of the fungus and the alga. To identify differentially expressed genes between the symbiotic and non-symbiotic states of this lichen, I compared transcriptomes of resynthesized thalli and isolated cultures of the mycobiont/photobiont by using high-throughput RNA sequencing technique (RNA-seq). For the accurate comparison, I first sequenced and annotated the genomes of *U. hakonensis* and *Trebouxia* sp, which were both unavailable.

In Chapter 2, I performed whole genome sequencing of the photobiont *Trebouxia* sp. The predicted size of the algal genome is 69 Mb, which is comparable to other *Trebouxia* algae. Unexpectedly, the result implied association of a novel Alphaproteobacterium, *Sphingomonas* sp. 'TZW2008' with the alga. This bacterium had not been visually identified during the 8 years of culturing in laboratory conditions, but fluorescence *in situ* hybridization confirmed the localization of bacterial cells on algal cells. Growth of the bacterium was synchronized with that of the alga, and its dependency on algal photosynthetic products was identified. Although the result of this study presented bacterial benefit from the symbiotic interaction with the alga in terms of carbon source, algal benefit from the interaction remained unclear. However, closely related bacteria were also detected in *U. hakonensis* thalli collected in the field, indicated that this bacterium might also be the essential participant of the symbiosis in this species.

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

In Chapter 3, the genome of the mycobiont, *U. hakonensis* was determined. The fungal genome was annotated by using RNA-seq reads derived from the transcriptome of the isolated fungal strain. The genome was found to be compact, showing close proximity of genes. When conventional genome annotation methods were used, few reads derived from read-through mRNAs connected neighbouring genes, resulted in misannotation. Therefore, I developed a pipeline which includes extra steps to eliminate reads with intergenic sequences. The genes in the annotated genome were classified into gene families according to sequence similarity. The size of the gene families was then compared among fungi with different lifestyles (lichen-forming, free-living, and parasitic fungi). The result indicated that some of the transporter gene families were contracted in the lichen-forming and the parasitic fungi, whereas three gene families were only identified in the lichen-forming fungi and predicted to be lichen-specific. The common genomic features identified in the lichen-forming fungi may reflect long-term symbiotic association with algae.

In Chapter 4, I examined differential gene expression between the symbiotic and non-symbiotic states of the *U. hakonensis-Trebouxia* sp. system. The sequenced genomes of the mycobiont and the photobiont, separately discussed in Chapter 2 and 3, were re-annotated using RNA-seq reads derived from transcriptomes of resynthesized thalli and isolated cultures. Re-annotation provided new genes, some of which may represent symbiosis-specific gene expression. More than half of the identified differentially expressed genes had no similar sequences in the NCBI database, raising possibility that the lichen obtained novel genes for symbiosis. On the other hand, the differentially expressed genes common to other organisms were indicated to play important roles in symbiosis. As expected, transfer of photosynthetic products from the photobiont to the mycobiont was indicated from the up-regulated expression of fungal sugar transporter genes. Moreover, transfer of nutrients, such as nitrogen, phosphorus, and carbon dioxide, from the mycobiont to the photobiont was also indicated. In the *U. hakonensis-Trebouxia* sp. system, it appears that bidirectional transfer of nutrients is the principle that sustains the symbiotic association. However, many of the differentially expressed genes still need to be examined for their functional roles in symbiosis.

In this thesis, I identified a set of genes that change expression upon *in vitro* symbiosis of lichen *U. hakonensis*. Functions of the genes up-regulated in the symbiotic state were predicted in terms of symbiotic interaction between the mycobiont and the photobiont. In the process, the genomes of the *U. hakonensis* and *Trebouxia* sp. were sequenced and annotated. A novel lichen-associated bacterium was detected and its roles in symbiotic association were predicted. Further investigation on expression of the identified genes in natural symbiotic states of *U. hakonensis* would lead us to a deeper understanding of genetic mechanisms underlying lichen symbiosis.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

菌類と緑藻あるいはシアノバクテリアの複合体である地衣類 *lichen** は地衣体 *thallus* という特殊な構造を形成する。自然界で共生体として存在し独特の形質を示す地衣類は、他の生物が生息困難な極限環境にも適応し広い分布域をもつ。共生という生命現象を研究するにあたって地衣類は格好の材料である。なかでもハコネサルオガセは菌類 *Usnea hakonensis* と共生する緑藻 *Trebouxia sp.* を個別に培養することや地衣体に類似した *fibril* と呼ばれる共生体を再構成する系が確立されている。

* (注) 地衣類には菌類の種名が用いられ、ハコネサルオガセの種名も *Usnea hakonensis* である。

このような背景の下、出願者は本論文で地衣類における共生の分子基盤、特に遺伝的基盤を解明することを目的に、ハイスループットシーケンサーによるゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、ハコネサルオガセの遺伝子を大規模かつ網羅的に解析した。本論文の中で行った主な解析および結果は次のものである。

1) 培養個体由来の DNA を用い、共生する緑藻のゲノム解析を行った。その結果、緑藻の 69Mbp にわたるゲノムのほぼ全容を明らかにするとともに、そこに緑藻由来ではない 3.5Mbp の DNA が含まれることを示した。遺伝子の相同性検索および 16sRNA 遺伝子の進化系統解析からこの 3.5Mbp の DNA が *Sphingomonas* 属の真正細菌由来であること、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) による解析でこの真正細菌が緑藻の細胞表面に多数存在すること、細胞培養の解析でこれら二種の生物の細胞増殖が同期すること、さらに真正細菌が地衣体中の糖類で培養可能なこと、系統解析により自然界のハコネサルオガセにも近縁の真正細菌が共存することを示し、ハコネサルオガセは菌類 *Usnea hakonensis*、緑藻 *Trebouxia sp.*、真正細菌 *Sphingomonas sp.* の三種類の共生体であることを示した。

2) 培養個体由来の DNA および RNA を用い、菌類 *Usnea hakonensis* のゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、41.2Mbp の菌類ゲノムのほぼ全容およびそのゲノム上の 13,695 個の遺伝子構造を明らかにした。また他の地衣類として存在する菌類や異なる生活様式を示す菌類のゲノムと比較し、地衣類として存在する菌類のゲノムには三種類の多重遺伝子族に属する遺伝子が特異的あるいは特徴的に存在すること、そして細胞膜での物質輸送 (例えば、糖の輸送) に関わると考えられる多重遺伝子族に属する遺伝子が少ないこと等を明らかにした。さらに、この研究過程においてゲノム上の遺伝子構造をより効率的に解明できるよう解析手法も改良している。

3) ハコネサルオガセにおいて *fibril* を再構成した後に発現する遺伝子と個別培養の菌類 *Usnea hakonensis* および緑藻 *Trebouxia sp.* で発現する遺伝子の発現量を比較し、共生体再構成時あるいはその後の共生体維持に寄与する遺伝子を探索した。緑藻ゲノムにおける 19,041 個の遺伝子構造、また菌類ゲノムにおいて 10,328 個の遺伝子構造 (先の結果を

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

合わせ合計 24,023 個の遺伝子構造)を明らかにした上で、菌類で 474 個の遺伝子が、また緑藻で 412 個の遺伝子が、再構成後発現が上昇していることを示した。その中で菌類において糖(炭素化合物)、窒素化合物、リン酸化合物等の栄養物の輸送に関わる可能性のある遺伝子の発現上昇が生じていることを示し、ハコネサルオガセにおける共生の分子基盤を明らかにするための大きな一歩を踏み出した。

出願論文にはハコネサルオガセについての多くの新規の発見が記載されており、またその中でハコネサルオガセが地衣類での共生の分子機構の研究において最適な研究材料の一つとみなせるまでの研究基盤を構築している。これらは博士(理学)論文に値するものである。

公開発表会では、ハコネサルオガセにおける共生の遺伝的基盤に関し、緑藻 *Trebouxia* sp.と真正細菌 *Sphingomonas* sp.の共生関係の解明、菌類 *Usnea hakonensis* や緑藻 *Trebouxia* sp.のゲノム解析、共生体再構成前後の遺伝子発現量の比較等について、それらの研究の結果と考察を出願論文の内容に沿って発表した。特に、ハコネサルオガセが三種類の生物の共生体であることを明らかにした点、これら三種の生物のゲノムの全容を解明し今後の研究の発展を支える学術基盤を構築した点等は評価された。質疑応答においても多岐にわたる質問に対し適切に応答している。

口頭試問では、基礎的知識から専門的研究内容に関する審査員の質問やコメントにも適確に応答した。これまで出願者個人が主導的に研究を行い一定の成果を上げている点などはその資質の高さを示すものとみなされた。本研究に基づいた今後のさらなる研究の進展も十分に期待された。

語学力に関しては、出願者を筆頭著者とした論文が国際誌に受理されている点、出願論文が英文で適確に書かれている点、さらに公開発表会における英語による発表・質疑応答の様子から優れていると判断された。

以上、出願者は総合研究大学院大学先導科学研究科の課程博士(理学)としての要件を充たしており、学位授与に相応しいと判断された。